

50376  
1993  
63

50376  
1993  
63

n° ordre 1094

## THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences de Lille  
spécialité : Génétique Microbienne

par

Brigitte DELRUE



**Les amidons synthétases liée et solubles définissent  
deux nouvelles voies indépendantes pour la  
synthèse de l'amylopectine chez l'algue unicellulaire  
*Chlamydomonas reinhardtii***

Soutenue le 26 Février 1993 devant la Commission d'Examen :

**Président**           A. VERBERT (Lille)  
**Rapporteurs**       C. GAILLARDIN (Paris)  
                          F.A. WOLLMAN (Paris)  
**Examineurs**       R. LOPPES (Liège, Belgique)  
                          R. MATAGNE (Liège, Belgique)  
                          S. BALL (Lille)

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Biologique (UMR n°111 du CNRS) dirigée par le Prof. A. Verbert, dans l'équipe de Génétique Microbienne du Prof. S. Ball. J'exprime ma profonde reconnaissance à "Monsieur Le Directeur" pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles et surtout...pour ses chocolats sans lesquels je ne serais jamais parvenue à finir cette thèse ! Je tiens aussi à remercier tout particulièrement S. Ball pour son entrain, son soutien, et pour avoir supporté mon mauvais caractère (quoique j'ai personnellement supporté ses idées les plus folles).

Je remercie très sincèrement M<sup>TS</sup> C. Gaillardin et F.A. Wollman d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs de cette thèse.

J'ai eu l'occasion d'apprécier F.A. Wollman ainsi que R. Loppes et R. Matagne, notamment lors du dernier congrès sur "*Chlamy*". Je suis très sensible à l'honneur que me font M<sup>TS</sup> Loppes et Matagne d'être examinateurs de ce travail.

Cette thèse était pour moi l'occasion de remercier le Prof. Bernard Fournet pour l'aide que lui-même et son équipe nous ont fournie. Disponible et enthousiaste, je dirais de lui "j'ai la chance de l'avoir connu". Ce travail fait partie de son oeuvre. Nous allons essayer de continuer cette collaboration pour laquelle il montrait tant d'entrain.

Je crains que la liste de toutes les personnes qui y ont participé soit plus longue que ma thèse elle-même ; je pense qu'elles se reconnaîtront si je les remercie sans les nommer à travers la personne qui m'a le plus aidée techniquement, André. Je citerais uniquement Fabienne, Christophe et Eric qui ont fait avec moi les "nuits du labo" pour que ce travail soit fini à temps.

Enfin, je pense à mes parents, Jérôme, J.M. le Maudit et tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de ce travail.

## RESUME

Deux souches mutantes de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ont été isolées après mutagenèse U.V. Ces souches définissent deux allèles récessifs distincts d'un nouveau gène baptisé *ST-2*. Nous avons montré que ce gène est indispensable à la biosynthèse non seulement de l'amylose mais aussi d'une nouvelle fraction de l'amylopectine que nous appelons type II et que nous retrouvons aussi chez les plantes supérieures. L'activité amidon synthétase liée au grain (GBSS) est réduite de 75 à 80% chez les deux souches. La quantité de la protéine majeure du grain de 76kDa se voit réduite de 75% chez les souches porteuses de l'allèle *st-2-2* alors que les souches porteuses de *st-2-1* se caractérisent par l'apparition d'une forme tronquée de la protéine possédant la même séquence N-terminale. Ces propriétés intrinsèques de la protéine sont génétiquement liées aux paramètres cinétiques de la GBSS dans la descendance méiotique. Ceux-ci sont distincts et caractéristiques de chaque allèle, suggérant de ce fait non seulement que la protéine renferme l'activité GBSS, mais aussi que *ST-2* en définit le gène de structure. Une étude structurale fine de l'amidon de *Chlamydomonas* établit que le polysaccharide est en tous points comparable à celui que l'on trouve dans l'endosperme du grain de maïs. De plus, une étude de la structure de l'amidon waxy et sauvage du maïs valide notre conclusion majeure, à savoir que la GBSS n'est pas comme on le pensait une enzyme spécifique de la biosynthèse de l'amylose mais que cette enzyme est responsable de la synthèse de tous les longs glucanes. Afin de savoir si la synthèse des longues chaînes est prérequis à celle des glucanes de longueur intermédiaire de l'amylopectine, nous avons interrompu le gène *ST-2* par recombinaison non homologue avec de l'ADN apporté par transformation. La souche porteuse de l'interruption affiche une activité inférieure à 1% de l'activité de la GBSS sauvage et la protéine majeure n'y est plus détectée. Ce résultat démontre que les longs glucanes ne sont pas nécessaires à la synthèse des chaînes qui y sont greffées et que les synthèses des deux types de chaînes forment deux voies indépendantes se mélangeant naturellement pour la biosynthèse de l'amylopectine.

## SOMMAIRE

page

CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE.

I. DE GREGOR MENDEL AUX ARN ANTISENS.	8
II. BIOCHIMIE COMPAREE DES VOIES DE SYNTHESE ET DE DEGRADATION DU GLYCOGENE ET DE L'AMIDON.	12
II.A. Le glycogène chez les mammifères.	13
II.B. Le glycogène chez la levure.	14
II.C. L'amidon des plantes et le glycogène bactérien.	15
II.C.1. Le donneur de glucose.	15
II.C.2. La régulation.	17
II.C.3. Les amidon et glycogène synthétases.	19
II.C.4. Les enzymes de branchement.	21
II.C.5. La dégradation.	23
II.D. Le problème de l'amorçage de la réaction.	27
II.E. La compartimentation des enzymes et des métabolites dans la biosynthèse de l'amidon.	28
III. L'AMIDON : UNE STRUCTURE QUATERNAIRE COMPLEXE.	33
III.A. Structure du glycogène.	33
III.B. Structure de l'amylopectine	35
III.B.1. Structure globale.	35
III.B.2. Structure fine.	36
III.B.2.a. L' $\alpha$ -dextrine limite.	36
III.B.2.b. Résistance aux traitements par l'acide.	37
III.B.2.c. Distribution des longueurs de chaînes.	38
III.B.2.d. Le modèle "en grappe".	38
III.C. Structure de l'amylose.	39
III.D. Modèles structuraux proposés pour l'amidon.	40
III.E. Propriétés physico-chimiques.	41
III.E.1. La solubilité.	41
III.E.2. La rétrogradation de l'amidon.	42
III.E.3. La colorimétrie à l'iode.	42



IV. L'AMIDON SYNTHETASE LIEE EST-ELLE REELLEMENT RESPONSABLE DE LA SYNTHESE DE L'AMYLOSE ?	44
V. L'ALGUE VERTE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> : UN NOUVEL OUTIL POUR LA SOLUTION D'UN ANCIEN PROBLEME.	48
V.A. Présentation de l'algue.	48
V.B. Le métabolisme de l'amidon chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	51
V.C. Thème général du laboratoire et but du travail.	55
<u>MATERIEL ET METHODES.</u>	57
I. LES MILIEUX ET LES SOUCHES.	57
I.A. Les milieux de culture.	57
I.A.1. Les milieux liquides.	57
I.A.2. Les milieux solides.	57
I.B. Les souches utilisées.	58
II. LES CULTURES ET LA PREPARATION D'EXTRAITS CELLULAIRES.	59
II.A. La préculture et les cultures.	59
II.B. L'extrait cellulaire brut.	59
II.C. La préparation de l'amidon.	60
III. LES DOSAGES.	60
III.A. Le dosage de l'amidon.	60
III.B. Le dosage des protéines.	60
III.C. Le dosage des activités amidon synthétasiques soluble et liée.	61
IV. LA MUTAGENESE ET LA SELECTION PHENOTYPIQUE.	61
IV.A. La mutagenèse U.V.	61
IV.B. La mutagenèse par transformation.	62
IV.C. La sélection phénotypique.	62
V. L'ANALYSE STRUCTURALE DE L'AMIDON.	62
V.A. La spectrophotométrie à l'iode.	62
V.B. La chromatographie de gel filtration.	63
V.C. La méthylation.	63
V.D. L'analyse en RMN du carbone 13.	64

V.E. Le débranchement enzymatique de l'amylose.	65
VI. L'ANALYSE GENETIQUE.	65
VI.A. Les croisements.	65
VI.B. La sélection des diploïdes et l'étude de la complémentation en trans.	65
VI.C. La formation des zygotes et l'analyse de la descendance d'un croisement.	66
VII. L'ANALYSE DES PROTEINES SUR GEL.	66
VIII. L'ANALYSE CYTOLOGIQUE.	67

CHAPITRE II : DES MUTANTS DE L'ALGUE UNICELLULAIRE  
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII DEFECTUEUX POUR L'AMIDON  
SYNTHETASE LIEE AU GRAIN SONT DEPOURVUS D'AMYLOSE ET  
ACCUMULENT UNE AMYLOPECTINE MODIFIEE.

I. MUTAGENESE ET ISOLEMENT DE SOUCHES DEFECTUEUSES POUR LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON.	68
II. CARACTERISATIONS GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES 18B ET 25B : DEFINITION DU LOCUS <i>st-2</i> .	70
III. CARACTERISATION STRUCTURALE DES AMIDONS DES SOUCHES HAPLOIDES ET DIPLOIDES SAUVAGES ET ALTEREES AU LOCUS <i>st-2</i> .	73
III.A. Spectrophotométrie à l'iode.	73
III.B. Chromatographie de tamisage moléculaire.	74
III.C. Structure fine de l'amidon.	78
III.D. Débranchement enzymatique.	80
III.E. Résonance magnétique nucléaire du $^{13}\text{C}$	82
III.F. Microscopie électronique	85
IV. LES SOUCHES PORTEUSES DE <i>st-2-1</i> ET <i>st-2-2</i> FONT PREUVE D'ALTERATIONS SPECIFIQUES DES ALLELES DE L'AMIDON SYNTHETASE LIEE AU GRAIN.	89
IV.A. Les souches porteuses de <i>st-2-1</i> et <i>st-2-2</i> affichent une défautuosité marquée de l'activité amidon synthétase liée au grain.	89

IV.B. Les souches porteuses de <i>st-2-1</i> et <i>st-2-2</i> affichent des modifications qualitatives et quantitatives de la protéine majeure liée au grain d'amidon.	90
V. LE LOCUS <i>ST-2</i> DEFINIT LE GENE DE STRUCTURE DE L'AMIDON SYNTHETASE LIEE AU GRAIN.	92
VI. DISCUSSION : L'AMIDON SYNTHETASE LIEE EST UNE ENZYME INDISPENSABLE A LA BIOSYNTHESE DE L'AMYLOSE ET DE L'AMYLOPECTINE.	94
<u>CHAPITRE III : L'INTERRUPTION DU GENE <i>ST-2</i>, GENE DE STRUCTURE DE L'AMIDON SYNTHETASE LIEE AU GRAIN, CONDUIT A L'ACCUMULATION NORMALE D'AMYLOPECTINE.</u>	
I. DEFINITION DU LOCUS <i>ST-3</i> , UN NOUVEAU GENE ESSENTIEL A LA BIOSYNTHESE DE L'AMYLOPECTINE.	96
II. INTERACTIONS GENIQUES AUX LOCI <i>ST-2</i> ET <i>ST-3</i> : UN MODELE ADDITIF OU EPISTATIQUE POUR LA BIOSYNTHESE DE L'AMYLOPECTINE ?	102
III. MUTAGENESE PAR TRANSFORMATION : SELECTION DE MUTANTS.	106
IV. CARACTERISATIONS GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE LA SOUCHE PORTEUSE DE <i>st-2-Δ1</i> .	108
V. CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUE ET STRUCTURALE DE LA SOUCHE PORTEUSE DE <i>st-2-Δ1</i> .	109
VI. DISCUSSION : VALIDATION DU MODELE ADDITIF.	111
<u>CONCLUSION GENERALE : LES AMYLOPECTINES TYPE I ET II DEFINISSENT-ELLES 2 VOIES POUR LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON CHEZ TOUTES LES PLANTES ?</u>	
	114
<u>BIBLIOGRAPHIE.</u>	117
<u>ANNEXES.</u>	129

CHAPITRE I

*Introduction générale*

## I. DE GREGOR MENDEL AUX ARN ANTISENS.

L'étude du métabolisme de l'amidon débute en 1865 avec les travaux de Gregor Mendel. Dès cette époque en effet, ce dernier décrivait sans le savoir le premier mutant touché dans la biosynthèse de ce polysaccharide. L'étude de l'hérédité du caractère lisse ou ridé du pois, la première que Mendel ait entreprise, devait lui permettre de fonder les lois de la génétique classique. Il fallut attendre plus de cent ans pour que Bhattacharyya *et coll.*(1990) découvrent que ce caractère résulte de l'insertion d'un élément de type transposon dans le gène codant une enzyme essentielle à la biosynthèse du polysaccharide : l'enzyme de branchement.

Un siècle après la mort de Mendel, Barbara MacClintock recevait le Prix Nobel de Médecine pour ses travaux sur le système Ac/Ds et la découverte des transposons. Parmi les gènes marqueurs récessifs qui ont autorisé cette découverte, se trouvent les mutations "waxy" (*wx*) et "shrunken" (*sh*), deux mutations qui concernent le métabolisme de l'amidon. L'étude du locus waxy comme cible de transposition a été particulièrement approfondie par Nelson.

Il peut paraître surprenant qu'après plus de cent ans de recherche, le métabolisme de l'amidon, de même que sa régulation, soient encore si peu connus. Pourtant, l'explication de ce constat est simple ; en fait, Mendel et MacClintock utilisaient des mutants affectés dans la synthèse de l'amidon, non pour l'étude du métabolisme de ce polysaccharide en lui-même, mais comme marqueurs conférant un phénotype aisément identifiable.

Les premiers travaux relatifs à la biosynthèse de l'amidon en tant que telle sont l'oeuvre de biochimistes. Mais ceux-ci se sont très vite heurtés à certains problèmes. Par

exemple, comment, parmi tous les substrats possibles (ADP-Glc, UDP-Glc, Glc-1-P et sucrose), déterminer **LE** (ou les) donneur(s) de glucose *in vivo* ? Plusieurs hypothèses ont été émises, fondées sur la comparaison des  $K_M$  des enzymes concernées par ces réactions aux concentrations physiologiques de leurs substrats. Mais les auteurs, ne négligeant pas la possibilité d'une compartimentation des substrats, n'exclurent aucune enzyme sous prétexte que son  $K_M$  apparent n'était pas en accord avec la concentration supposée des substrats *in vivo*.

Ainsi, si en 1960, De Fekete *et coll.* montrent l'incorporation de Glc dans l'amidon à partir d'UDP-Glc, Recondo et Leloir, à peine un an plus tard, démontrent que l'ADP-Glc est un meilleur substrat de la réaction. Même si l'hypothèse d'une synthèse dictée par les nucléotides-sucres était bien acceptée, un rôle de la phosphorylase (enzyme qui catalyse la réaction  $(\text{Glc } \alpha\text{-1,4 } \text{Glc})_n + \text{Pi} \rightleftharpoons (\text{Glc } \alpha\text{-1,4 } \text{Glc})_{n-1} + \text{Glc-1-P}$ ) dans la synthèse de l'amidon *in vivo* pouvait difficilement être écarté. En effet, en présence de fortes concentrations en Glc-1-P, cette enzyme est capable de synthétiser des liaisons  $\alpha\text{-1,4}$ . Au vu du rapport intracellulaire Glc-1-P/Pi, la phosphorylase est classée parmi les enzymes du catabolisme. La possibilité de l'existence d'un microenvironnement (où les concentrations seraient modifiées), mais surtout, la capacité de cette enzyme à créer des liaisons  $\alpha\text{-1,4}$  en absence d'amorce, en ont fait une candidate potentielle pour l'initiation de la synthèse.

Ce sont à nouveau des études portant sur deux mutants du maïs, *shrunken-2* (*sh-2*) et *brittle-2* (*bt-2*), qui ont apporté les premiers éléments de réponse. Dans ces souches, une activité résiduelle de 10% de l'ADP-Glc pyrophosphorylase (qui catalyse la réaction  $\text{ATP} + \text{Glc-1-P} \rightleftharpoons \text{ADP-Glc} + \text{PPi}$ ) est corrélée à une quantité d'amidon de 25% comparativement à la souche sauvage (Tsai et Nelson, 1966 ; Dickinson et Preiss, 1969). Sans l'établir définitivement, cette constatation laissait raisonnablement supposer un rôle prépondérant de l'ADP-Glc pyrophosphorylase dans le transport et l'activation du glucose pour la synthèse de l'amidon.

La question n'est définitivement tranchée que depuis l'obtention d'un mutant de la crucifère *Arabidopsis thaliana* (Lin *et coll.*, 1988a). Cette fois, une quantité de polysaccha-

ride inférieure à 1% a pu être reliée à une activité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase inférieure aux limites du dosage utilisé.

Les industriels, eux, n'ont pas attendu de certitudes pour s'intéresser à l'amidon. Etant donnés ses rendements de l'ordre de la tonne à l'hectare, l'idée d'en améliorer la faible valeur ajoutée par transformation est séduisante. Les biotechnologies qui s'y appliquent sont déjà bien développées (Darbon, 1988 ; Rajnchapel-Messai, 1990). Pourtant, malgré un savoir-faire établi, les industriels sont conscients que la création de nouvelles structures implique aujourd'hui l'élaboration de nouveaux cultivars, tant pour des raisons de facilité que de coût.

Les cultivars "waxy" et "riche en amylose" sont utilisés depuis des décennies. Ces souches, obtenues par la voie classique, semblent avoir été exploitées aux limites de leurs possibilités. Dans ce contexte, les techniques plus récentes de biologie moléculaire ouvrent de nouveaux horizons. Pour cela, une solide connaissance du métabolisme de l'amidon, ainsi que du rôle exact des enzymes impliquées, est un atout majeur. La création d'une nouvelle souche de pomme de terre, issue d'une transformation par le gène de l'ADP-Glc pyrophosphorylase d'un mutant d'*E.coli* en est une preuve. L'enzyme codée est dans ce cas moins dépendante de l'activation par le fructose 1,6 bisphosphate et moins sensible à l'inhibition par l'AMP (Stark *et coll.*, 1992). Les rendements en amidon de ce cultivar et ses propriétés de conservation, dont sa résistance à l'adoucissement au froid, sont exceptionnels.

Les techniques d'inhibition de fonction par l'utilisation d'ARN antisens ont également été très utilisées, tant dans le domaine fondamental qu'appliqué. Par exemple Müller-Röber *et coll.* (1992) ont pu montrer que la transformation de la pomme de terre par un ADN codant un ARN antisens de l'ADP-Glc pyrophosphorylase conduit non seulement à l'inhibition de cette enzyme, mais aussi à une perturbation de la formation des tubercules, du transport du sucrose et de l'expression des protéines de stockage, modifiant la pomme de terre féculière en sucrière !

Dans un domaine plus appliqué cette fois, une demande de brevet pour la création de cultivars de pomme de terre féculière améliorés par la présence de constructions antisens dirigés contre la GBSS (pour Granule Bound Starch Synthase ou amidon synthétase liée au grain, enzyme qui catalyse la formation des liaisons  $\alpha$ -1,4 entre les résidus de glucose) a déjà été déposée.

Toutefois, les connaissances du métabolisme de l'amidon et les modalités d'édification du grain sont encore très fragmentaires. A la complexité du système lui-même s'ajoute souvent le problème de la multiplicité des formes enzymatiques chez les végétaux supérieurs. Ainsi, pas moins de quatre amidon synthétases, dont deux formes solubles et deux liées au grain, ont été décrites chez le maïs. Pour l'instant, une seule s'est vue attribuer un rôle précis *in vivo* : la GBSS. Il est démontré que cette enzyme est impliquée dans la synthèse de l'amylose. A moins qu'on ne lui trouve un autre rôle...



## II. BIOCHIMIE COMPAREE DES VOIES DE SYNTHÈSE ET DE DEGRADATION DU GLYCOGENE ET DE L'AMIDON.

Amidon et glycogène, longtemps considérés uniquement comme substances de réserve, peuvent être placés au rang des molécules "ubiquitaires" puisqu'ils sont trouvés aussi bien chez les bactéries que chez les eucaryotes supérieurs, ainsi que dans presque tous les tissus des organismes différenciés. Tous deux sont des homopolymères de glucose liés en  $\alpha$ -1,4 et branchés en  $\alpha$ -1,6. La variation de leurs taux de branchement respectifs (1 pour 12 pour le glycogène, 1 pour 20 en ce qui concerne l'amylopectine, fraction branchée de l'amidon), sans être considérable, est la source de leurs principales différences, essentiellement d'ordre physico-chimiques. Toutefois, leurs similitudes sont telles qu'elles laissent logiquement supposer que le glycogène et l'amidon sont sous la dépendance de voies de biosynthèse fort proches. Il s'est avéré que la ressemblance est telle (voir fig.1) que, souvent, les données acquises dans l'un des systèmes ont servi de point de départ fructueux pour l'étude de l'autre.

**Fig.1 : Biosynthèse de l'amidon et du glycogène.**

## II.A. Le glycogène chez les mammifères.

Les premières investigations concernant les polysaccharides de réserve ont été menées sous un angle médical. En conséquence, l'étude du glycogène des mammifères a bien sûr mené aux premières découvertes.

Historiquement, la première enzyme isolée du métabolisme du glycogène fut en 1938 la phosphorylase par Cori *et coll.* A l'époque, cette enzyme était d'ailleurs aussi bien invoquée dans la synthèse que dans la dégradation du polysaccharide. Ce n'est qu'en 1957 que Leloir et Cardini mettent en évidence l'activité glycogène-synthétase et attribuent à l'UDP-Glc le rôle de donneur de sucre pour cette réaction.

La réversibilité de la réaction catalysée par la phosphorylase (Cori et Cori, 1939) n'est peut-être pas étrangère au fait que presque 20 ans se soient écoulés entre ces deux découvertes. Sa capacité à enchaîner le glucose à partir de Glc-1-P à des concentrations relativement peu élevées pouvait, en absence de toute autre activité décrite, satisfaire les besoins en enzyme de synthèse des liaisons  $\alpha$ -1,4 *in vivo*.

Enfin, en 1972, Krisman décrit une protéine capable de s'autoglycosyler : la glycogénine. Cette enzyme est depuis considérée comme la meilleure candidate pour l'amorçage de la synthèse du polysaccharide. Certains auteurs ont attribué à cette protéine un rôle dans la régulation de la biosynthèse dans le muscle squelettique : elle limiterait le nombre de particules de glycogène proportionnellement à la quantité de protéine disponible (Smythe *et coll.*, 1990) puisque chaque particule de glycogène est liée à une protéine.

La régulation de la biosynthèse du glycogène a, elle aussi, été envisagée en premier lieu sous un angle médical. Les effets physiologiques d'hormones telles que l'insuline et l'adrénaline sur la glycogénèse au niveau du foie ont été largement étudiés. C'est justement l'analyse du mode d'action de l'adrénaline sur le métabolisme du glycogène dans les cellules hépatiques qui a débouché sur la découverte de l'activation de la glycogène phosphorylase par phosphorylation. Un peu plus tard, elle devait permettre l'attribution à l'AMP<sub>c</sub> du rôle de médiateur de l'information cellulaire (pour une revue, se référer à Sutherland,

1972). La transduction des signaux cellulaires aboutit, chez les mammifères, à un contrôle par phosphorylation réversible des deux enzymes clés de la biosynthèse, la glycogène-synthétase et la glycogène phosphorylase, via leurs kinases et phosphatases respectives. L'activation et l'inactivation de la glycogène-synthétase et de la glycogène phosphorylase sont ainsi sous la dépendance directe de l'AMP<sub>c</sub>.

## **II.B. Le glycogène chez la levure.**

Si le métabolisme général du glycogène est le même chez *Saccharomyces cerevisiae* que chez les mammifères, sa régulation est loin d'être aussi simple chez la levure. Le rôle de l'AMP<sub>c</sub> n'apparaît ni aussi direct, ni aussi certain que chez les mammifères (Cameron *et coll.*, 1988). De plus, au contrôle post-traductionnel (Rothman-Denes et Cabib, 1970) s'ajoute une induction transcriptionnelle de certaines enzymes lors de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire (François *et coll.*, 1992 ; Farkas *et coll.*, 1991 ; Thon *et coll.*, 1992) ; c'est le cas de la glycogène phosphorylase, de la sous-unité régulatrice de la glycogène-synthétase phosphatase, de l'enzyme de branchement et probablement de l'une des deux formes de glycogène-synthétase.

Un autre élément de contrôle décrit chez *S.cerevisiae* est le glucose lui même. Son rôle est complexe puisqu'il provoque une accumulation de glycogène alors qu'il a aussi pour effet une augmentation transitoire d'AMP<sub>c</sub>, qui se traduit normalement par une activation de la glycogène phosphorylase (François *et coll.*, 1988). Par ailleurs, la quantité, ou plus exactement la proportion de glucose encore disponible dans le milieu extérieur constitue un point de contrôle : il a été démontré que la synthèse du glycogène commence après consommation d'environ la moitié du glucose extérieur, et ce, quelqu'en soit la concentration initiale (François *et coll.*, 1988). Ceci implique un système de contrôle beaucoup plus fin qu'un simple signal intervenant quand la concentration d'un nutriment devient limitante (Lillie et Pringle, 1980).

L'accumulation de glycogène caractérise les levures bloquées en phase G1 du cycle cellulaire. Contrairement à toute attente, lors du cycle de reproduction sexuée, l'arrêt des divisions après fusion n'est pas accompagné de la synthèse du glycogène mais d'une inhibition de celle-ci. Il est démontré que cette inhibition n'est pas la conséquence de l'arrêt des cellules en phase G1 mais est due à l'action directe des phéromones, définissant ainsi une autre voie de contrôle du métabolisme du glycogène (François *et coll.*, 1991).

Etant donnée la conservation des séquences de nombreux gènes entre la plupart des espèces, ces découvertes acquises chez *S. cerevisiae* pourraient, extrapolées aux mammifères et à l'homme en particulier, permettre l'identification de nouvelles voies de contrôle. Ou, à défaut, elles pourraient conduire à la révélation des éléments manquants dans les voies définies antérieurement et, par là, avoir des applications cliniques importantes.

## **II.C. L'amidon des plantes et le glycogène bactérien.**

L'étude du glycogène bactérien est difficilement dissociable de celle de l'amidon tant les données concernant l'un sont souvent transposables à l'autre. L'explication la plus simple est bien sûr le fait que le chloroplaste serait le produit de l'évolution d'une ancienne bactérie symbiotique.

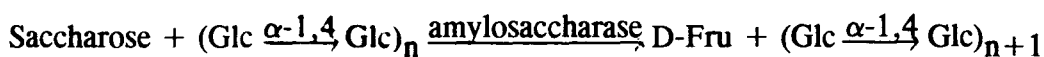
### **II.C.1. Le donneur de glucose.**

C'est certainement la découverte d'une activité susceptible de transférer le Glc de l'UDP-Glc au glycogène qui a amené différents auteurs à rechercher une activité similaire dans les plantes. En dépit du fait que les amidons synthétases solubles soient spécifiques de l'ADP-Glc, une telle activité a pu être détectée. En effet, l'amidon-synthétase liée au grain est capable, comme la glycogène-synthétase (qui est d'ailleurs elle-même liée à la particule

de glycogène), d'utiliser l'UDP-Glc en tant que substrat.

Inspiré par les travaux de Leloir et Cardini (1957), Madsen (1961) met en évidence la capacité de la glycogène-synthétase bactérienne à incorporer le glucose dans le glycogène à partir d'UDP-Glc. C'est par hasard, en étudiant les constituants de l'enveloppe, que Shen *et coll.* (1964) se rendent compte que le Glc transporté par l'ADP-Glc est incorporé dans le glycogène chez les bactéries. L'activité est ensuite retrouvée chez plusieurs bactéries (Greenberg et Preiss, 1964). De plus, une souche d'*Escherichia coli* déficiente pour l'UDP-Glc pyrophosphorylase (ou UTP: $\alpha$ -Glc-1-P uridylyl transférase) accumule le glycogène aussi bien que la souche sauvage (Sigal *et coll.*, 1964).

Par la suite, les enzymes capables de lier un glucose en  $\alpha$ -1,4 sur un  $\alpha$ -glucane linéaire ont été étudiées. Les différentes réactions invoquées sont les suivantes :



Cependant l'amylosaccharase est limitée à quelques espèces bactériennes et n'est induite qu'en présence de saccharose (Lin, 1987).



L'activité de cette amylomaltase est inhibée par le glucose (Schwartz, 1987).

L'activité réversible de la phosphorylase a bien sûr été retrouvée chez les bactéries.

C'est encore une fois la découverte de mutants qui va permettre de déterminer la véritable activité intervenant dans l'élongation des chaînes de poly-glucose *in vivo*. Chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, différents auteurs ont pu mettre en évidence une relation directe entre le taux de glycogène accumulé et l'activité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase (ou ATP:  $\alpha$ -Glc-1-P adenylyl-transférase). Ils ont ainsi prouvé que seule cette enzyme joue un rôle *in vivo* dans la synthèse du glycogène (Govons *et coll.*, 1973).

Les gènes codant les enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène chez *E. coli* sont organisés en deux opérons adjacents appelés *glgBX* et *glgCAP*. Un troisième

opéron monocistronique (*glgS*) a été récemment mis en évidence (Hengge-Aronis et Fischer, 1992). La fonction exacte de ce gène, essentiel à la synthèse du glycogène, reste à déterminer. *glgC* correspond au gène de structure de l'ADP-Glc pyrophosphorylase, *glgA* code la glycogène-synthétase, *glgB* l'enzyme de branchement. Deux autres cadres ouverts de lecture ont été découverts lors du séquençage des opérons : *glgX* et *glgP* qui code la phosphorylase. *glgP* est apparenté aux  $\alpha$ -1,4-glucane hydrolases du type  $\alpha$ -amylase et aux  $\alpha$ -1,4-glucane transférases. La fonction de *glgX* n'est pas encore déterminée. Ces deux gènes ne sont pas indispensables à la synthèse du polysaccharide, ce qui confirme l'idée que ce sont des enzymes du catabolisme (Preiss et Romeo, 1989).

### II.C.2. La régulation.

Les ADP-Glc pyrophosphorylases bactériennes présentent une activation par les intermédiaires glycolytiques et une inhibition par l'AMP, l'ADP et/ou le Pi. De fait, la spécificité quant à l'activateur semble être en relation directe avec la voie d'assimilation du carbone (Preiss et Romeo 1989). Par exemple, une bactérie puisant principalement son énergie de la glycolyse comme *E. coli* possède une enzyme le plus souvent activable par le fructose 1,6 bisphosphate. Le 3PGA (3 phospho-glycérate), produit premier de la photosynthèse, constitue le meilleur activateur des ADP-Glc pyrophosphorylases des cyanobactéries, des feuilles des plantes et, dans une moindre mesure, des tissus non photosynthétiques des végétaux supérieurs.

Chez les bactéries comme chez les plantes, l'action des effecteurs de l'ADP-Glc pyrophosphorylase est de type allostérique. L'activateur augmente le  $V_M$  et l'affinité de l'enzyme pour ses substrats, tout en contrecarrant l'effet de l'inhibiteur. Physiologiquement, c'est le rapport des concentrations de l'activateur et de l'inhibiteur qui influe sur l'activité de l'enzyme. L'ADP-Glc pyrophosphorylase est un hétérotétramère présentant deux sous-unités différentes chez les plantes (Preiss, 1991) et chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Preiss, communication personnelle) alors que c'est un homotétramère chez *E.*

*coli* (Preiss, 1991) et chez l'algue *Dunaliella* (Preiss, communication personnelle).

La relation directe entre le taux de polysaccharide accumulé et le niveau d'activité de cette enzyme a été mise en évidence aussi bien chez les plantes que chez les bactéries (Govons *et coll.*, 1973 ; Lin *et coll.*, 1988a).

La nécessité d'action des effecteurs allostériques *in vivo* est quant à elle suspectée depuis longtemps. Dans la feuille en effet, la synthèse d'amidon se produit en même temps que la photosynthèse alors que la dégradation s'effectue la nuit. Or, si les taux de 3PGA et d'intermédiaires glycolytiques sont à leur maximum le jour, la concentration en Pi diminue lors de la photosynthèse du fait de la photophosphorylation (Santarius et Heber, 1965). La situation s'inverse totalement lors de la transition lumière-obscurité. Ce rôle clef des effecteurs allostériques *in vivo* a pu être mis en évidence dans notre laboratoire (Ball *et coll.*, 1991). Un mutant de l'algue verte *C.reinhardtii*, dont l'enzyme est insensible à l'activation par le 3PGA, ne contient plus que 1% de la quantité d'amidon accumulée par la souche sauvage. C'est le seul mutant de ce type obtenu chez les plantes.

**Ainsi, la régulation des métabolismes de l'amidon et du glycogène se situe exclusivement au niveau de l'ADP-Glc pyrophosphorylase.**

En ce qui concerne les tissus chlorophylliens, en particulier chez *A.thaliana*, deux mutants de l'ADP-Glc pyrophosphorylase ont été isolés. Le mutant *adg1* a perdu les deux sous-unités, ce qui laisse supposer que *adg1* serait un gène de régulation (Lin *et coll.*, 1988a). Le mutant *adg2* semble être défectueux pour la grande sous-unité dont *adg2* serait le gène de structure (Lin *et coll.*, 1988b).

Les mutations *sh-2* et *bt-2*, portant sur les deux sous-unités de l'ADP-Glc pyrophosphorylase de l'endosperme du maïs, prouvent le rôle primordial de cette enzyme dans la synthèse d'amidon, y compris dans les tissus de réserve. En effet, dans ce cas, la réduction à 10% de l'activité enzymatique se traduit par la perte de 75% de la quantité de polysaccharide par rapport au sauvage. L'inverse se vérifie également puisque l'activité ADP-Glc pyrophosphorylase surexprimée conduit à une synthèse accrue du polysaccharide (Stark *et*

*coll.*, 1992).

Notons que des études ont montré une phosphorylation *in vitro* des ADP-Glc pyrophosphorylases de l'endosperme du maïs et de la feuille d'épinard par une protéine kinase du soja  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (Preiss *et coll.* 1987). Il n'est toutefois pas prouvé que cette phosphorylation ait lieu *in vivo*. Son éventuel rôle physiologique n'est pas établi à l'heure actuelle.

Les gènes codant l'ADP-Glc pyrophosphorylase ont été séquencés chez plusieurs organismes. La petite sous-unité est connue pour l'endosperme de riz et de maïs, la feuille d'épinard, *A.thaliana* et le tubercule de pomme de terre. Les gènes correspondant à la grande sous-unité de *Shrunken-2* et de la pomme de terre ont été séquencés. Il existe une nette identité en acides aminés pour une même sous-unité chez les différents organismes. Par contre, il y a très peu de conservation entre les deux sous-unités : par exemple, les sous-unités 51kDa et 54 kDa de l'épinard montrent seulement 40% d'identité. La comparaison de la séquence en acides aminés des sous unités de l'enzyme du riz et d'*E.coli* donne 29% d'homologie. Les régions conservées sont celles qui sont essentielles à la liaison des substrats et à la régulation allostérique chez *E.coli* (Preiss, 1991). Signalons enfin que les ADP-Glc pyrophosphorylases qui s'expriment dans les tissus chlorophylliens et les tissus de réserve sont codées par des gènes différents (Krishnan *et coll.*, 1986).

### II.C.3. Les amidon et glycogène synthétases

#### ou (ADP-Glucose: $\alpha$ -1,4 D-Glucan 4- $\alpha$ Glucosyltransferases).

La glycogène-synthétase bactérienne est spécifique de l'ADP-Glc. Elle ne semble pas être un point de régulation comme c'est le cas pour ses homologues fongique et mammifère. L'enzyme n'est pas activée par le Glc-6-P et ne semble pas être phosphorylée. Elle est ou soluble ou liée à la particule de glycogène (Greenberg et Preiss, 1964).



D'abord mises en évidence par leur capacité à utiliser l'UDP-Glc, les amidon synthétases liées sont en fait beaucoup plus actives avec l'ADP-Glc. Par la suite, Ghosh et Preiss (1965), suivis de Cardini et Frydman (1966) découvrent les amidon synthétases solubles qui sont, elles, spécifiques de l'ADP-Glc. Ces enzymes nécessitent une amorce qui peut être de l'amylose, de l'amylopectine aussi bien que du glycogène (Cardini et Frydman, 1966). L'ADP constitue un inhibiteur compétitif de ces enzymes (Ghosh et Preiss, 1965).

Les amidon synthétases solubles existent sous plusieurs formes (Ozbun *et coll.* 1971), en général deux à quatre, séparables par chromatographie sur DEAE-cellulose. Boyer et Preiss (1979) ont montré que dans l'endosperme du maïs, deux formes pouvaient être ainsi séparées ; la forme I est plus active avec le glycogène comme amorce et est capable d'amorcer seule la réaction en présence de citrate 0,5 M (en fait, l'action du citrate est probablement d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour les amorces endogènes). La forme II a le même  $K_M$  vis-à-vis de l'amylopectine mais pas pour les autres substrats et ne peut amorcer la réaction en présence de citrate 0,5M. Les masses moléculaires de ces deux formes estimées en gradient de saccharose sont respectivement de 70 et 92-95 kDa (Hawker *et coll.* 1974) pour la feuille d'épinard. Enfin, des anticorps dirigés contre la forme I n'inhibent que très peu la forme II (MacDonald et Preiss, 1985).

Ainsi, les amidons synthétases solubles I et II ont des propriétés physiques, cinétiques et immunologiques différentes, et seraient donc le produit de gènes différents. Signalons qu'aucune amidon-synthétase soluble n'a été purifiée jusqu'à homogénéité.

Les amidon synthétases liées ont été solubilisées avec succès par MacDonald et Preiss (1983, 1985). La purification des amidon synthétases du maïs conduit à l'obtention de deux fractions, la première comportant 80% de l'activité. Leur comportement vis-à-vis des substrats rejoint celui des amidon synthétases solubles, et elles perdent alors leur capacité à utiliser l'UDP-Glc. Il est possible que ce soit par perte totale d'une 3<sup>ème</sup> forme enzymatique lors de la solubilisation ou alors par changement des propriétés de l'une des formes solubilisées (ou des deux). Les deux amidon synthétases solubilisées sont actives en

présence de citrate 0,5M et en absence d'amorce. Leurs poids moléculaires respectifs sont de 61 et 93 kDa. Les anticorps dirigés contre l'amidon-synthétase soluble I n'ont aucun effet sur les GBSS solubilisées (MacDonald et Preiss, 1985). Une différence immunologique existe entre les deux formes liées.

La mutation "waxy" s'exprimant dans l'endosperme du grain de maïs conduit à une activité amidon-synthétase liée globalement défectueuse. A cette défectuosité est reliée une perte de la fraction amylose. Ce type de mutant, présentant à la fois le même phénotype et la même défectuosité enzymatique, a été retrouvé chez plusieurs autres organismes. Nous reviendrons sur ce point par la suite, ainsi que sur le clonage du gène correspondant à la protéine waxy de l'orge et du maïs.

#### II.C.4. Les enzymes de branchement.

##### ou $\alpha$ -1,4-Glucan: $\alpha$ -1,4-Glucan 6-Glycosyltransferases.

Unique chez les bactéries, l'enzyme de branchement existe sous plusieurs formes chez les plantes.

Dans l'endosperme du grain de maïs, 3 formes distinctes d'enzyme de branchement sont séparées après chromatographie. Immunologiquement, la forme I est légèrement différente des formes IIa et IIb qui, elles, se comportent de la même manière (Singh et Preiss, 1985). Les peptides obtenus après digestion à la trypsine ou chymotrypsine sont très semblables pour les fractions IIa et IIb, ce qui a amené Boyer et Preiss (1978) à penser qu'il s'agissait peut être de la même enzyme dont les deux formes sont éluées de manière différente en raison de glucanes liés de manière non covalente. Les formes IIb et IIa sont coéluées avec respectivement les amidon synthétases I et II.

Deux mutants déficitaires pour l'enzyme de branchement de l'endosperme du maïs ont pu être isolés : *ae* pour "*amylose extender*" et *du* pour "*dull*". Ce dernier se caractérise par un contenu plus important en amylose que la souche sauvage. Après purification, Boyer et Preiss (1978) ont observé une perte de 60% de l'activité amidon synthétasique II et une

légère diminution de l'activité de branchement de la fraction IIa. Ils ont alors conclu à une régulation simultanée de ces deux enzymes. Or, l'activité de branchement I augmente chez *dull* d'environ 50%. Il est donc possible que l'enzyme de branchement IIa, non liée à l'amidon-synthétase II chez ce mutant, soit élue de la même manière que la forme I.

Le mutant *ae* est quant à lui caractérisé par un taux d'amylose plus important et une amylopectine modifiée, possédant moins de points de branchement que l'amylopectine sauvage. Chez ce mutant, le profil d'élution montre que les activités des amidon synthétases I et II et de l'enzyme de branchement I sont normales. Par contre, l'activité de branchement dans le pic II diminue de 80%, particulièrement pour le pic IIb (Boyer et Preiss, 1978).

Les modalités d'action de l'enzyme de branchement des plantes ne sont pas connues. Toutefois, Borovsky *et coll.* (1976) ont noté un transfert de radioactivité, après action de l'enzyme de branchement de pomme de terre, qui suggère un transfert interchaînes plutôt qu'un réarrangement intrachaine. Praznic *et coll.* (1992) ont montré que les distributions des chaînes débranchées de l'amylopectine de pomme de terre native et de l'amylose branché par l'enzyme de branchement purifiée de ce tubercule sont similaires. Ceci suggère que seule l'enzyme isolée intervient dans le branchement de l'amylopectine. Pourtant, des travaux réalisés dans notre laboratoire en collaboration avec l'équipe du Professeur Willmitzer ont montré que la création chez la pomme de terre de constructions visant la production d'ARN antisens dirigés contre cette enzyme conduit à la synthèse d'un polysaccharide de structure tout à fait conforme au sauvage. Ces souches transformées se caractérisent par contre par l'accumulation d'un polysaccharide soluble.

La séquence du gène de l'enzyme de branchement cloné par Bhattacharyya *et coll.* (1990) n'a pas été publiée. Néanmoins, les auteurs indiquent 51,3% d'homologie entre l'enzyme de branchement du pois et l'enzyme de branchement du glycogène d'*E.coli*. Signalons que la séquence de l'enzyme de branchement du riz a été publiée par Nakamura et Yamanouchi (1992) qui ne détectent que peu de similitudes avec l'enzyme de branchement d'*E.coli* et de *Synechococcus*.

### II.C.5. La dégradation.

Chez *E. coli*, deux phosphorylases ont été isolées qui ont différentes spécificités de substrats. La maltodextrine phosphorylase est plus active avec des dextrans courtes et est induite, alors que la glycogène phosphorylase est constitutive et plus active avec le glycogène (Chen et Segel, 1968).

Les mécanismes de dégradation de l'amidon liés à la germination des graines sont largement étudiés chez les plantes supérieures. Toutefois, nous n'envisagerons pas ces processus ici car la maturation et la mobilisation des réserves sont aussi sous influence hormonale et font intervenir des phénomènes très spécifiques, comme la rupture de la membrane de l'amyloplaste qui a pour effet de rendre l'amidon accessible aux enzymes cytosoliques. De plus, synthèse et dégradation liés à la mobilisation des réserves sont nettement décalés dans le temps. Nous n'évoquerons ici que la dégradation dans les tissus chlorophylliens et dans les tissus de réserve en croissance, dégradation qui peut être considérée comme un processus dynamique allant de pair avec la biosynthèse.

Peu étudiée jusqu'à présent, la dégradation de l'amidon dans les tissus chlorophylliens ou assimilés fait parfois l'objet de rapports contradictoires. Ainsi, Levi et Preiss (1978) invoquaient dans le chloroplaste du pois une dégradation par phosphorolyse et par production directe d'hexoses phosphates plutôt que leur production indirecte par phosphorylation des produits de l'amylolyse. Ils ont pu mettre en évidence dans le chloroplaste toutes les enzymes nécessaires à la phosphorolyse (telles que la phosphorylase et la phosphoglucomutase). N'ayant par contre détecté qu'une activité  $\beta$ -amylasique dans le cytoplasme (et aucune maltase), et puisque le maltose est le produit majeur de la dégradation de l'amidon *in vivo*, ils expliquent sa présence par l'existence d'une maltose phosphorylase chloroplastique. Par contre, en 1986, et toujours dans les feuilles de pois, Kakefuda *et coll.* caractérisent les produits formés lors de la dégradation. Non seulement ils mettent en évidence une  $\alpha$ -amylase cytosolique et deux formes de  $\beta$ -amylase dans le chloroplaste, mais, si ils retrouvent la phosphorylase dans les deux compartiments, ils ne détectent pas la

maltose phosphorylase. Ils concluent donc que le produit majeur, le maltose, est produit par l'hydrolyse de l'amylopectine. Puisqu'il n'y a pas plus de maltase que de maltose phosphorylase, le maltose formé serait réutilisé par une transglucosylase ou enzyme D.

Ce type d'enzyme, caractérisé chez *Arabidopsis* par Lin et Preiss (1988) serait responsable du réarrangement des courtes chaînes linéaires afin qu'elles puissent servir de substrat à la phosphorylase. Si elle est incapable de produire du maltose, elle peut toutefois transférer un groupement maltosyl de l'amylopectine au glucose pour former du maltotriose.

De toutes ces enzymes invoquées dans la dégradation de l'amidon, c'est la phosphorylase qui est la mieux étudiée. Les phosphorylases sont dimériques ou tétramériques et ne sont actives que sous forme oligomérique. Chez *Chlorella vulgaris*, la phosphorylase est inhibée de façon allostérique par l'ADP et l'ATP alors que l'ADP-Glc et l'UDP-Glc constituent des inhibiteurs compétitifs pour l'enzyme (Nakamura et Imamura, 1983 a et b). Notons que l'ADP-Glc serait le plus efficace. Cette inhibition par l'ADP-Glc a été retrouvée chez *C.reinhardtii* (Ball *et coll.*, 1991) et pour une phosphorylase de la jeune feuille de banane (Kumar et Sanwal, 1988). Lee et Braun (1973) ont mis en évidence une inhibition de la phosphorylase de maïs par l'ADP-Glc.

L'UDP-Glc constitue un inhibiteur de la phosphorylase des tissus non chlorophylliens (banane, pois mature). Chez la pomme de terre, la phosphorylase est inhibée par l'UDP-Glc mais pas par l'ADP-Glc (De Fekete et Cardini, 1964). La phosphorylase des feuilles y est peu sensible. Chez l'épinard, deux formes distinctes ont été mises en évidence, l'une spécifique du chloroplaste, l'autre du cytosol (Schächtele et Steup, 1986). La structure primaire de ces deux enzymes est différente (Steup et Schächtele, 1986). La forme cytosolique a été classée avec les phosphorylases de muscle de lapin et *d'E.coli* au vu de leur grande affinité pour les polysaccharides très branchés comme le glycogène. La forme chloroplastique de la phosphorylase d'épinard est classée avec celle de la pomme de terre avec qui elle partage une faible affinité pour ce type de substrats. La localisation subcellulaire et les propriétés de ces différentes enzymes ne sont donc pas corrélées dans ces différents modèles.

Le problème est en réalité plus complexe en ce qui concerne la pomme de terre. En fait, les phosphorylases cytosolique et amyloplastique seraient en apparence une seule et même forme enzymatique. Les différentes formes observées peuvent être obtenues par clivage protéolytique de la phosphorylase en produits encore actifs (Iwata et Fukui, 1973 et 1975). Lorsque le tubercule est jeune, cette enzyme est dans l'amyloplaste. Après clivage, et consécutivement à la disparition tardive de la membrane de l'amyloplaste, elle migre vers le cytoplasme et change de propriétés physico-chimiques (Schneider *et coll.*, 1981). Chez la pomme de terre senescente, seule cette forme cytoplasmique peut être détectée. La conversion protéolytique de la phosphorylase *in vivo* a été proposée pour la pomme de terre.

La séquence en acides aminés de la phosphorylase de pomme de terre montre une homologie de 40% avec l'enzyme d'*E. coli* et de 51% avec celle du muscle de lapin, si on excepte une large insertion de 78 acides aminés dans la phosphorylase de pomme de terre. Cette insertion, située dans la zone correspondant au site de fixation du glycogène chez *E. coli* et chez le lapin explique à la fois le poids moléculaire plus élevé et l'affinité plus faible de l'enzyme de pomme de terre pour ce polysaccharide. Les phosphorylases ayant une grande affinité pour le glycogène ont un poids moléculaire proche de celui de la phosphorylase du muscle de lapin. Les autres ont un poids moléculaire plus important et semblent concernées par l'insertion observée chez la pomme de terre. Le site de phosphorylation (Ser) et les régions conférant la sensibilité aux nucléosides de l'enzyme de lapin ne sont conservés ni chez *E. coli* ni chez la pomme de terre.

Enfin, il faut noter que la dispersion de la phosphorylase dans le chloroplaste d'épinard suggère qu'elle dégraderait des produits d'hydrolyse solubles (Schächtele et Steup, 1986). Par contre, la phosphorylase de pomme de terre est liée à la membrane de l'amyloplaste et détectée sur le grain lui même (Schneider *et coll.*, 1981), ce qui conforte les auteurs dans l'idée que cette enzyme aurait un rôle dans les processus de synthèse. Une autre hypothèse, plus vraisemblable, serait que cette enzyme, gardant ses propriétés de catabolisme, participe à l'épissage de la structure lors de la synthèse.

L'enzyme de débranchement est une enzyme hydrolytique capable uniquement de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,6. Initialement décrit comme un mutant déficient en amylopectine mais contenant du phytoglycogène (polysaccharide hyperbranché), le mutant *su-1* ou *sugary-1*, malgré un profil conforme au sauvage, présente une enzyme de branchement I synthétisant à partir de l'amylose un polysaccharide plus branché que l'amylopectine de type sauvage. Boyer et Preiss (1978) concluaient donc à une modification des propriétés intrinsèques de l'enzyme. Pan et Nelson (1984) montraient pour ce même mutant une défec-tuosité pour l'enzyme de débranchement et proposaient un modèle dans lequel l'amylopectine, hyperbranchée lors de sa synthèse, serait par la suite débranchée par l'enzyme de débranchement.

## II.D. Le problème de l'amorçage de la réaction.

Comme nous l'avons vu précédemment, amidon-synthétase et glycogène-synthétase sont incapables, en absence d'amorce, de polymériser le glucose à partir de leurs substrats respectifs, l'ADP-Glc et l'UDP-Glc. Le mystère concernant l'amorçage de la synthèse du glycogène est partiellement élucidé. En effet, Krisman (1972) a mis en évidence une incorporation de glucose à partir d'UDP-Glc par une enzyme présente dans la fraction précipitée par l'acide trichloro-acétique. Le produit de cette réaction est rendu soluble par action d'une pronase. La protéine en question reste liée au glycogène, permettant ainsi sa purification. Elle est capable de polymériser jusqu'à 8 résidus de glucose, longueur nécessaire et suffisante à l'action de la glycogène-synthétase. Mais il n'est toujours pas démontré qu'elle effectue elle-même la liaison covalente entre le premier glucose et son résidu de Tyrosine 194, d'autant qu'elle n'a jamais été purifiée exempte de tout résidu de Glc. Ceci remet en cause le réel pouvoir de la glycogénine à amorcer *in vivo* une synthèse *de novo* du glycogène. Bien que suspectée, l'existence de la glycogénine chez *S.cerevisiae* reste encore à démontrer.

Le problème est encore plus aigü chez *E.coli*. Si une incorporation de glucose en absence d'amorce a pu être détectée dans les mêmes conditions que dans le muscle squelettique des mammifères (Barengo *et coll.*, 1975), aucune protéine capable d'autoglycosylation n'a été isolée pour l'instant chez les procaryotes. De plus, aucun gène des opérons glycogène de *E.coli* ne code une protéine similaire à la glycogénine. La mise en évidence de *glgS* (Hengge-Aronis et Fischer, 1992) remet peut être en question l'existence de la glycogénine chez *E.coli*.

Chez la pomme de terre, une activité capable de transférer un glucose de l'UDP-Glc sur une protéine a été mise en évidence par Lavintman et Cardini (1973). Ardila et Tandecarz (1992) ont montré que cette protéine catalyse sa propre glucosylation.



## **II.E. La compartimentation des enzymes et des métabolites.**

La synthèse d'amidon est très compartimentée. D'une manière générale, elle a lieu dans le plaste (chloroplaste ou amyloplaste), ce qui pose le problème de la compartimentation des enzymes et métabolites chez les plantes supérieures.

Le génôme chloroplastique est trop petit pour coder toutes les enzymes chloroplastiques. En ce qui concerne l'amidon, toutes les enzymes sont codées par le génôme nucléaire. Elles sont synthétisées dans le cytosol sous forme d'un précurseur contenant un peptide de transit signalant l'exportation vers le chloroplaste

Dans les feuilles, la synthèse d'amidon, comme tous les phénomènes liés à la photosynthèse, a lieu dans le chloroplaste. L'utilisation des trioses phosphate pour la synthèse d'amidon permet un stockage du glucose sans immobilisation du Pi nécessaire à la poursuite de la photosynthèse. En même temps, mais cette fois dans le cytosol, se produit la synthèse du sucrose qui constitue la forme de transport du carbone des feuilles aux organes de stockage. Un transporteur assure l'échange du Pi contre les trioses phosphate entre le cytosol et le chloroplaste (Lilley *et coll.*, 1976). La synthèse du sucrose aboutit, elle aussi, à la libération du Pi qui est réexporté vers le chloroplaste. Outre l'antiport des trioses phosphate et du Pi, la coordination entre la synthèse de sucrose et la fixation du CO<sub>2</sub> est assurée par le fructose 2,6-bisphosphate. Le schéma général de la synthèse de l'amidon dans le chloroplaste et du sucrose dans le cytosol est donné dans la figure 2.

Le sucrose est transporté des feuilles, où il est synthétisé, jusqu'aux tissus de réserve dont il constitue la source essentielle de carbone pour la synthèse d'amidon.

Sous quelle forme le carbone entre-t-il dans l'amyloplaste ? Le sucrose est-il converti en trioses phosphate avant de franchir l'enveloppe, via le transporteur de Pi ?

Au niveau des tissus de réserve, la conversion du sucrose en amidon reste énigmatique. L'amyloplaste étant apparenté au chloroplaste, la première hypothèse a été la réaction

inverse de la synthèse du sucrose dans le cytosol des feuilles. Ici, le carbone passe du cytosol vers l'amyloplaste pour la synthèse d'amidon sous la forme de trioses phosphate (voir figure 3) via un transporteur spécifique indiqué comme étant celui des chloroplastes des feuilles. Dans ce cas, la sucrose synthase catalyse la dégradation du sucrose en fructose et en UDP-Glc dans le cytosol.

Le mutant *sh-1* (*shrunken 1*) isolé chez le maïs accumule moins de 70% (en poids sec) de la quantité d'amidon accumulée par la souche sauvage dans l'endosperme du grain. A ce phénotype est corrélée une déféctuosité de la sucrose synthase qui ne présente que 10% de l'activité trouvée chez le sauvage (Chourey et Nelson, 1976). L'existence de *sh-1* sous entend un rôle de la sucrose synthase *in vivo*, rôle qui semble évident même s'il se révèle indirect.

Depuis peu, la question est revue sous l'angle d'un transport plus direct sans passage par des entités aussi petites que les trioses. Ainsi, un rapport récent (Pozueta-Romero *et coll.*, 1991) fait état d'une sucrose synthase spécifique de l'ADP-Glc et d'un transporteur de ce nucléotide-sucré dans le chloroplaste isolé d'épinard. Le clonage du gène *Bt-1* du maïs, qui coderait une protéine potentielle similaire à l'AACP (ADP/ATP Carrier Protein) ou transporteur d'adénylate de la mitochondrie de la levure, de l'homme, de *Neurospora crassa* et du maïs (Sullivan *et coll.*, 1991), a amené les auteurs à confirmer cette hypothèse puisque ce transporteur serait capable d'échanger l'ADP-Glc entre le cytosol et le chloroplaste. Toutefois, notons que le phénotype de *bt-1* (baisse de 80% de la quantité d'amidon) s'explique au moins aussi aisément si on suppose que le transporteur en question importe l'ATP nécessaire à la synthèse de l'amidon dans les systèmes progressivement non photosynthétiques, ce qui est le cas de l'endosperme du grain. De plus, l'existence dans le cytosol d'ADP-Glc comme donneur de glucose pour la synthèse de l'amidon dans les feuilles se conçoit mal. En effet, différents mutants de la phosphoglucomutase chloroplastique chez *A. thaliana* (Caspar *et coll.*, 1985), *Nicotiana sylvestris* (Hanson et MacHale, 1988) et *C.reinhardtii* (travaux en cours) sont caractérisés par un contenu nul ou très faible en amidon. De plus, chez ce dernier organisme, aucune sucrose synthase n'a été

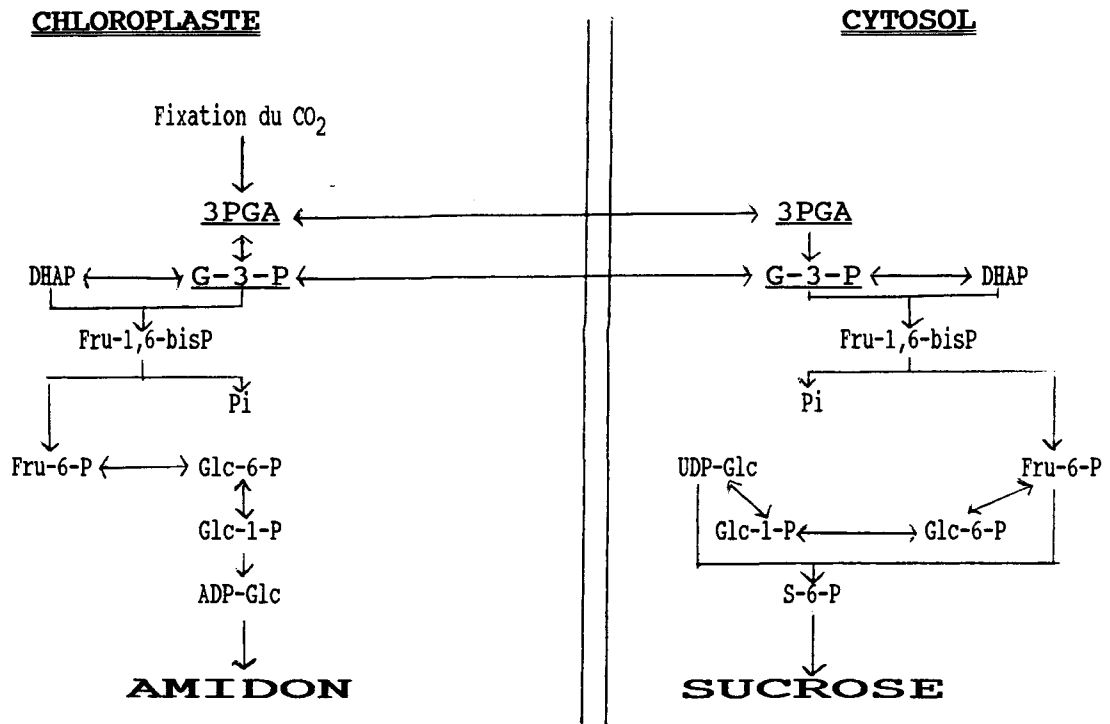


Fig.2 : Schéma proposé pour le métabolisme du carbone dans les tissus photosynthétiques.

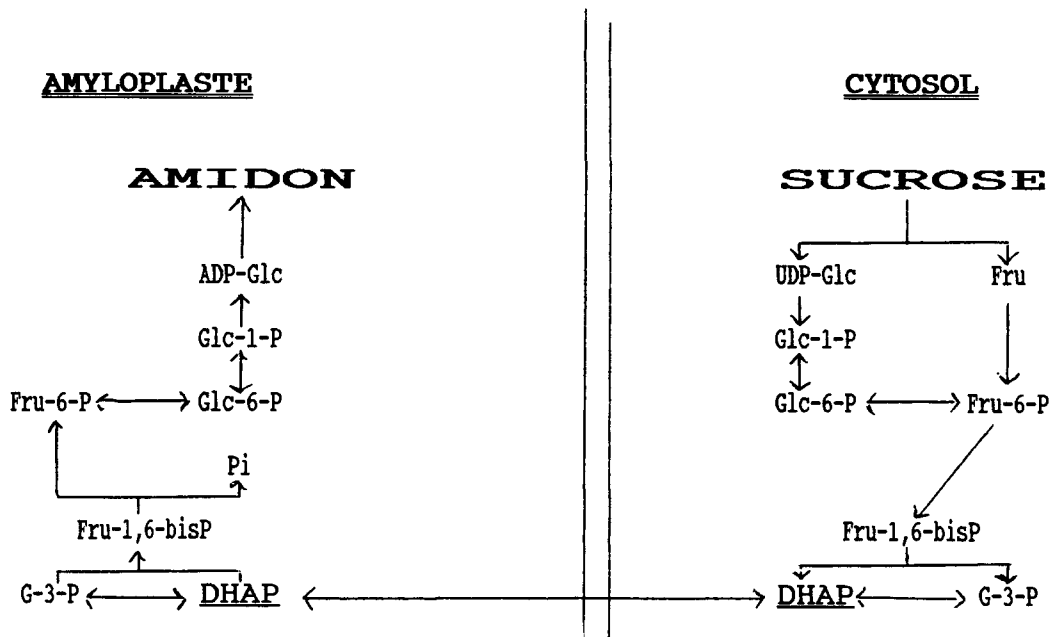
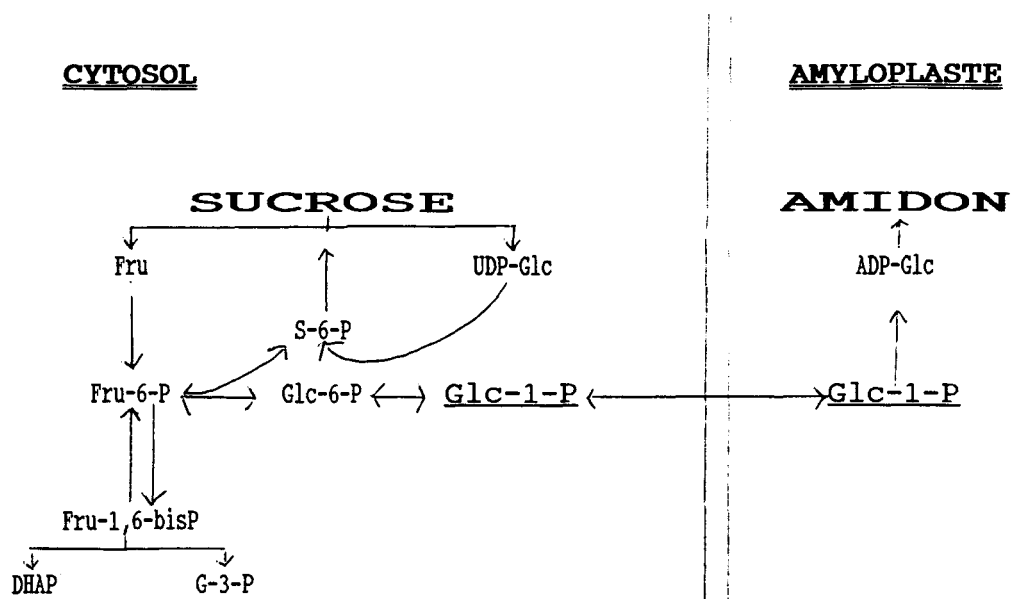


Fig.3 : Schéma proposé pour le métabolisme du carbone dans les tissus de réserve.



**Fig.4 : Nouveau modèle proposé pour le métabolisme du carbone dans les tissus de réserve.**

DHAP	: DiHydroxy-Acétone Phosphate
Fru	: Fructose
F-1,6-bisP	: Fructose-1,6-bisphosphate
Fru-6-P	: Fructose-6-Phosphate
Glc-1-P	: Glucose-1-Phosphate
Glc-6-P	: Glucose-6-Phosphate
3PGA	: 3-phospho-glycérate
Pi	: Phosphate inorganique
S-6-P	: Sucrose-6-phosphate.

mise en évidence à l'heure actuelle. Pour les tissus de réserve, nous pouvons rappeler que chez la pomme de terre, un ARN antisens dirigé contre l'ADP-Glc pyrophosphorylase de l'amyloplaste conduit à une disparition d'amidon, contredisant l'intervention d'un transporteur d'ADP-Glc d'origine cytosolique (via une sucrose synthase spécifique de l'ADP-Glc par exemple).

Des études d'incorporation de glycérol radioactif montrent un transfert de radioactivité dans l'amidon de cellules de soja en culture (MacDonald et ap Rees, 1983). Mais il n'est pas prouvé que c'est sous la forme de triose phosphate que le carbone passe du cytosol à l'amyloplaste. Il a été récemment démontré que, dans l'endosperme de blé, le glucose radioactif non uniformément marqué est retrouvé presque totalement non modifié dans l'amidon (Keeling, 1989). Enfin, des études portant sur des amyloplastes de blé isolés incubés avec différents substrats radioactifs ont montré que le Glc-1-P est le meilleur substrat pour la synthèse d'amidon. Il apparaît donc que la synthèse d'amidon dans les tissus non chlorophylliens pourrait impliquer les hexoses ou les hexoses phosphate selon un schéma proposé par Keeling (1989) (voir figure 4). La contribution des trioses phosphates n'est cependant pas à écarter puisque l'on conçoit mal que l'existence d'une mutation de la phosphoglucomutase chloroplastique aboutisse chez *A.thaliana* à une disparition de l'amidon dans les plastes des racines. Si le Glc-1-P est la source de carbone importée dans le plaste, ce mutant devrait être capable de synthétiser de l'amidon. Ap.Rees et Entwistle (1989) émettent l'hypothèse que la phosphoglucomutase pourrait permettre la glycolyse du Glc-1-P et apporter ainsi l'ATP nécessaire à la synthèse d'amidon. Keeling (1989) quant à lui évoque l'idée que l'hexose passant du cytosol à l'amyloplaste pourrait être autre que le Glc-1-P (Glc-6-P, Fru-6-P ou Fru-1,6-bisphosphate). Cela n'expliquerait pourtant pas que l'ADP-Glc pyrophosphorylase des tissus de réserve soit sensible aux mêmes effecteurs allostériques que celle des feuilles, à savoir le Pi et le 3PGA et qu'un mutant de *C.reinhardtii* désensibilisé à ces effecteurs n'accumule que des traces d'amidon à l'obscurité.

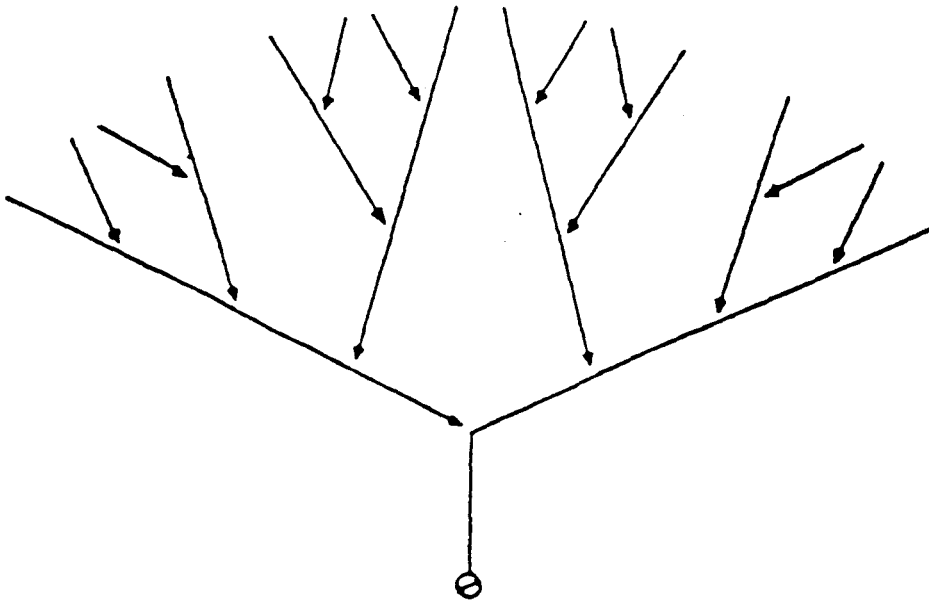
### III. L'AMIDON : UNE STRUCTURE QUATERNAIRE COMPLEXE.

Comme nous l'avons vu précédemment, amidon et glycogène sont tellement semblables qu'il apparaît impossible de les évoquer indépendamment l'un sans l'autre. Mais si leurs métabolismes et leurs structures brutes sont fort proches, il existe une différence essentielle ; le glycogène est relativement homogène alors que l'amidon est hétérogène et constitué d'au moins deux fractions, l'amylose et l'amylopectine. L'amylose représente 20 à 30%, ce pourcentage dépendant de l'espèce d'où provient le polysaccharide et du stade de développement du tissu concerné (Geddes *et coll.*, 1965). L'amylopectine contient environ 5% de liaison  $\alpha$ -1,6 et possède une masse moléculaire très élevée (environ  $10^7$  à  $10^8$  Da). L'amylose est lui aussi branché mais à un taux nettement moindre, ce qui lui confère une masse moléculaire inférieure ( $10^5$  à  $10^6$  Da) (Manners, 1989). Ces différences structurales sont à la base d'importantes différences de propriétés physico-chimiques.

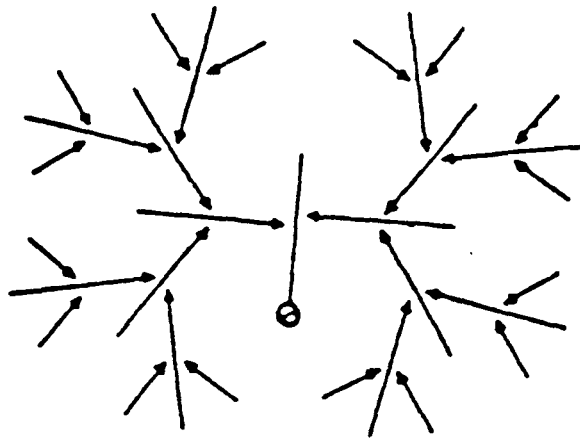
#### III.A. Structure du glycogène.

Le glycogène est une molécule entièrement ramifiée. Le modèle de Meyer (Meyer et Bernfeld, 1940 ; voir figure 5) initialement proposé pour la structure de ce polysaccharide pose le problème de l'encombrement stérique ; très vite, l'encombrement en périphérie s'opposerait à tout nouveau branchement. Ce modèle idéal ne peut donc rendre compte de la taille estimée pour la molécule ( $5$  à  $6 \times 10^6$  Da).

Des études enzymatiques montrent que les chaînes contiennent en moyenne 10 à 14 résidus de glucose. Mais cette distribution ne serait pas homogène et le glycogène serait plus branché au centre de la particule. Un nouveau modèle a donc été publié par Gunja-Smith *et coll.* (1970) (voir la figure 6).



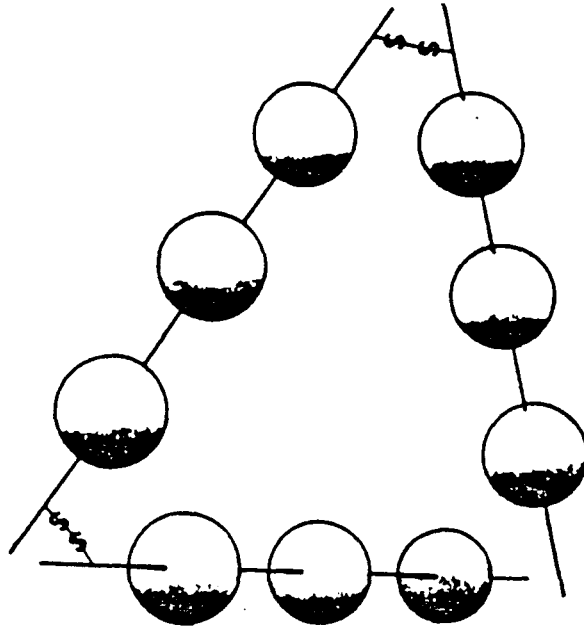
**Fig.5 :** Modèle idéal de Meyer.



**Fig.6 :** Modèle de Meyer modifié.

*In vivo*, des particules de glycogène sphériques animales pourraient être agrégées par des liaisons encore très discutées. Les particules, dites "particules  $\alpha$ ", de 200 nm de diamètre sont clivées en plus petites particules par traitement au mercapto-éthanol : la particule  $\alpha$  serait donc composée de particules unitaires, les particules  $\beta$  (20 à 30 nm), reliées entre elles par des protéines elles mêmes reliées par des ponts disulfure (voir figure 7) plu-

tôt que par des chaînes linéaires de Glc (Geddes *et coll.*, 1977).



**Fig.7 : Schéma représentatif d'une particule de glycogène  $\alpha$ .**

### **III.B. Structure de l'amylopectine.**

Les méthodes de séparation des deux composants de l'amidon, si elles donnent d'excellents résultats pour la purification de l'amylose, ont des rendements nettement moins bons pour l'amylopectine souvent purifiée avec une proportion de contaminations qui est loin d'être négligeable. Pour cette raison, les études de structure de l'amylopectine ont souvent été réalisées sur l'amidon pur des mutants de type "waxy" ; en effet, ces mutants ont la particularité de ne plus synthétiser d'amylose (ou en contiennent des quantités très faibles). L'utilisation de cette amylopectine comme référence de l'amylopectine sauvage peut cependant être contestée.

#### **III.B.1. Structure globale de l'amylopectine.**

L'amylopectine est composée de chaînes courtes, ayant un degré de polymérisation (d.p.) compris entre 12 et 60 résidus, avec une moyenne de 20. Elle est composée de trois

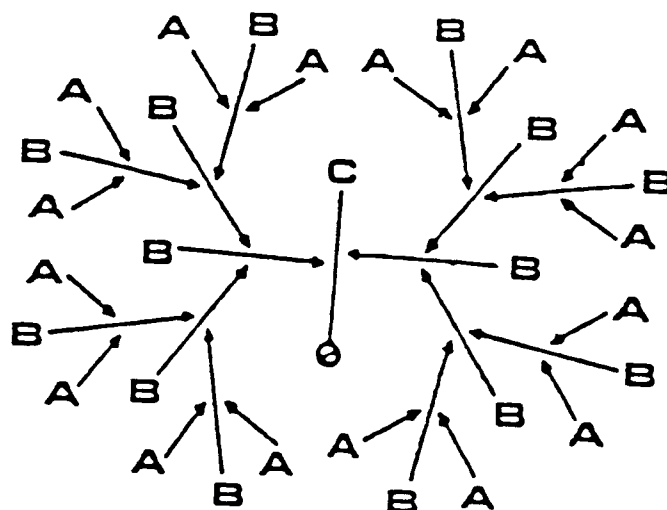


types de chaînes nommées A, B et C (voir figure 8) selon un concept introduit par Peat *et coll.* (1956). Ces différents types sont définis comme suit :

les chaînes A sont liées uniquement par leur extrémité réductrice.

les chaînes B sont substituées sur plusieurs glucoses en C-6-OH par des chaînes A ou B et se lient par leur extrémité réductrice.

les chaînes C sont substituées sur un ou plusieurs glucoses en C-6-OH et possèdent une extrémité réductrice libre. Il n'y a qu'une seule chaîne C par molécule d'amylopectine.



**Fig.8 : Les différentes chaînes constituant l'amylopectine.**

Les rapports chaînes A/ chaînes B rapportés pour l'amylopectine s'échelonnent entre 1/1 et 2.6/1 (Manners, 1989).

### III.B.2. Structure fine de l'amylopectine.

#### III.B.2.a. L' $\alpha$ dextrine limite.

Les premières études ont été réalisées par digestion enzymatique. Après action de l' $\alpha$ -amylase pancréatique porcine, 65% des oligosaccharides isolés (qui correspondent aux

zones des points de branchement) sont monosubstitués, c'est-à dire qu'il contiennent à l'origine une chaîne liée en  $\alpha$ -1,6. Or, l'enzyme concernée est capable de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,4 entre deux chaînes branchées en  $\alpha$ -1,6 si elles sont séparées par plus d'un résidu de glucose. Après digestion complète par l' $\alpha$ -amylase, 35% d'oligosaccharides di ou pluri-substitués isolés contiennent des paires de branchement séparées par un seul résidu de glucose. Ceci exclut donc l'hypothèse du modèle idéal de Meyer pour cette molécule ; comme dans le cas du glycogène, le profil de branchement de l'amylopectine est donc asymétrique.

### III.B.2.b. Résistance aux traitements par l'acide.

L'amylopectine se présente sous deux formes : l'extérieur de la molécule est plutôt amorphe alors que l'intérieur est sous forme cristalline. La zone amorphe est détruite par traitement par un acide comme l'HCl 10% alors que la zone cristalline y résiste après plusieurs mois. La structure restante est hautement ordonnée et les études montrent que les composés ainsi obtenus sont probablement constitués d'oligosaccharides organisés en doubles chaînes (voir figure 9). Les doubles hélices sont en effet plus résistantes au traitement acide et ce modèle est en accord parfait avec les études de diffraction aux rayons X. Les amidons se classent selon trois types de structures caractéristiques des spectres de diffraction aux rayons X. Le type A correspond à une compaction maximale des chaînes de l'amylopectine et à une hydratation faible de la molécule. Il serait caractéristique de l'amidon des graines de céréales. Le type B correspond à une structure plus lâche et par conséquent plus hydratée. Elle semble caractériser l'amidon des tubercules. Le type B peut être transformé irréversiblement en type A par deshydratation (Imberty *et coll.*, 1991). Les types A et B dépendraient de la longueur des chaînes de l'amylopectine (Hizukuri, 1985). Enfin, le type V est observé lors de la formation de complexes entre l'amylose avec l'iode ou des solvants comme le butanol mais ne constituent pas des structures naturelles.

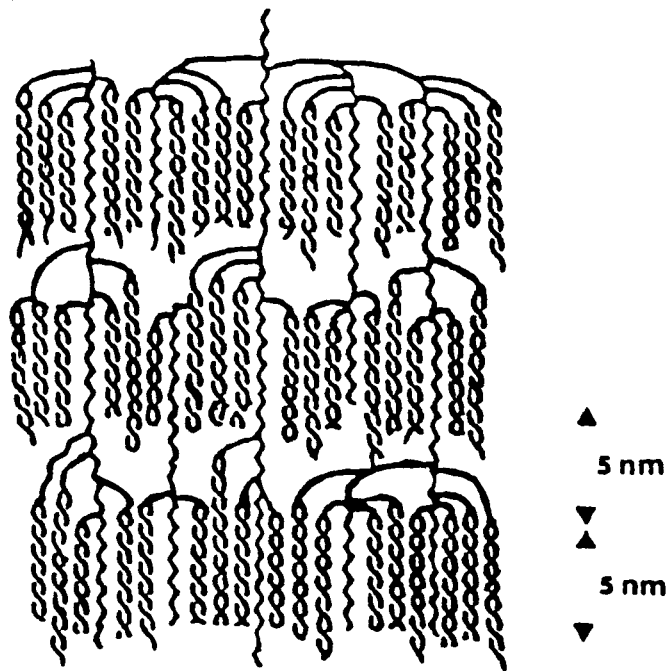


Fig.9 : Modèle schématique de l'amylopectine proposé par Imberty *et coll.* (1991).

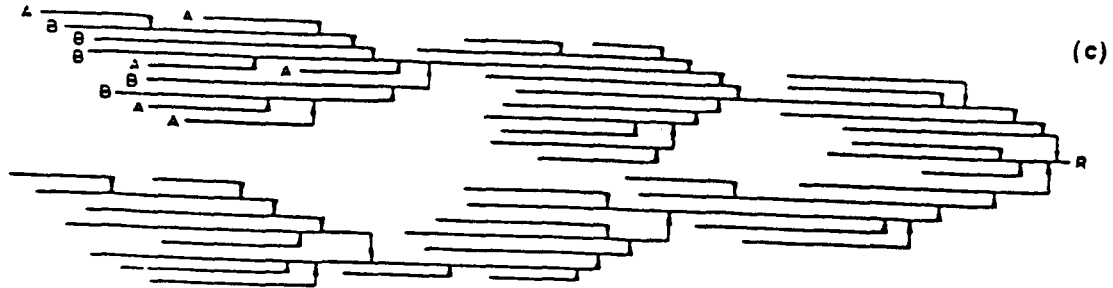
### III.B.2.c. Distribution des longueurs de chaînes.

La découverte des enzymes de débranchement de type pullulanase ou isoamylase ont permis un nouveau type d'investigation. Le débranchement est suivi d'une chromatographie de gel filtration pour séparer les chaînes libérées et estimer leurs longueurs. Le débranchement de l'amidon total ainsi réalisé donne trois populations de longueurs de chaînes. La première correspond aux molécules d'amylose contaminant. Les deux suivantes contiennent les chaînes "longues" (d.p. 40-60) et intermédiaires (d.p. 10-20) de l'amylopectine. Les chaînes de certaines amylopectines montrent une distribution tri- ou même tétramodale (Hizukuri, 1985).

### III.B.2.d. Le modèle "en grappe".

La combinaison de ces résultats, obtenus par traitement enzymatique, a conduit à la proposition du modèle "en grappe" (ou "cluster") par Manners et Matheson en 1981. Les points de branchement de l'amylopectine ne sont pas distribués au hasard mais regroupés en

zones plus denses (voir figure 10).



**Fig.10 : Organisation en "grappe" de l'amylopectine.**

### **III.C. Structure de l'amylose.**

Les premiers rapports font état d'une molécule d'amylose totalement hydrolysée par la  $\beta$ -amylase, enzyme capable de cliver uniquement les liaisons  $\alpha$ -1,4 à partir de l'extrémité non réductrice pour générer du maltose. Cette enzyme est incapable de passer au dessus d'une liaison  $\alpha$ -1,6 et s'arrête donc au premier point de branchement qu'elle rencontre. Ceci signifie donc que la molécule d'amylose est totalement linéaire. En 1952(a) pourtant, Peat *et coll.* montraient que la  $\beta$ -amylase de pomme de terre n'hydrolyse l'amylose que dans la limite de 70% et que donc cette molécule doit être branchée. Ils en concluaient que la préparation de  $\beta$ -amylase utilisée antérieurement contenait un contaminant, appelé Z-Enzyme, capable de passer outre les liaisons  $\alpha$ -1,6. Ce contaminant devait être identifié comme étant l' $\alpha$ -amylase elle-même (Peat *et coll.*, 1952b).

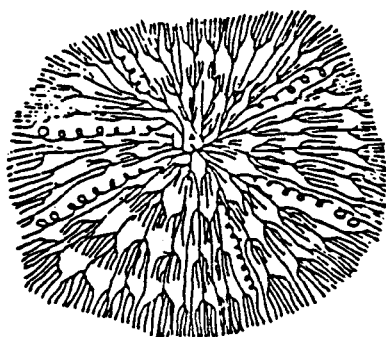
Une étude effectuée sur l'amylose de pomme de terre et du tapioca montre que les longueurs moyennes de ces molécules estimées par rapport à leur extrémité réductrice sont respectivement de 6 340 et 3 390 unités de glucose. Par contre, si on considère les extré-

mités non réductrices, le d.p. moyen atteint la valeur de 520 pour la pomme de terre et 170 pour le tapioca (Hizukuri *et coll.*, 1981). Ceci confirme le fait que l'amylose n'est pas totalement linéaire. Le nombre de chaînes publié par ces mêmes auteurs est d'ailleurs de 20 pour l'amylose de tapioca et 12 pour la pomme de terre. En fait, la structure de l'amylose dépend pour une même source des conditions de culture, de l'âge de la plante (Geddes *et coll.*, 1965), ainsi que des conditions de stockage et de fractionnement. Néanmoins, il est maintenant couramment admis que l'amylose est une macromolécule branchée.

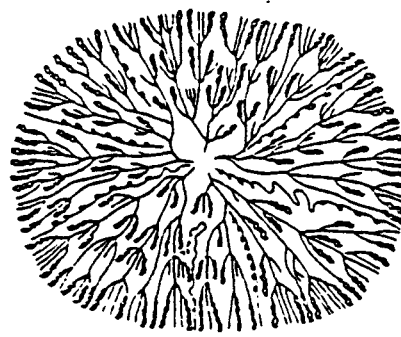
Signalons que les valeurs obtenues par débranchement enzymatique sont certainement en dessous de la réalité ; cette méthode ne permet pas l'isolement de très courtes chaînes, détectées par contre par des méthodes chimiques telles que la méthylation.

#### **III.D. Modèles structuraux proposés pour l'amidon.**

En rassemblant toutes les données les plus récentes, plusieurs modèles sont encore proposés à l'heure actuelle dont deux sont présentés dans la figure 11. Si le profil de branchement de l'amylose et de l'amylopectine, la formation de double hélices dans les zones cristallines de l'amylopectine, ainsi que son organisation en "grappes" sont désormais bien établis, l'arrangement de l'amylose et de l'amylopectine dans le granule d'amidon est encore indéterminé.



**Modèle unitaire**



**Modèle modifié**

**Fig.11 :** Représentation schématique de la molécule d'amidon.

Ces deux modèles sont en fait fort proches. Dans le modèle unitaire, toutes les molécules sont liées de manière covalente et le granule ne contient qu'une unique chaîne de type C. Toutefois, le poids moléculaire estimé sur la base de ce modèle est très supérieur à celui qui peut être calculé par des méthodes physico-chimiques. Ce modèle a donc été légèrement modifié, en gardant l'idée d'une macromolécule à croissance concentrique mais en y incluant le concept de la double hélice pour la chaîne extérieure de l'amylopectine. Dans cette version, les différentes molécules ont une association plus lâche ; l'amylose pourrait exister sous forme non ordonnée ou hélicoïdale et ne serait pas liée à l'amylopectine. Notons que ce modèle nous propose plusieurs chaînes C par granule.

### **III.E. Propriétés physico-chimiques.**

Les différences structurales des polysaccharides cités sont à la base de différences notables de leurs propriétés physico-chimiques.

#### **III.E.1. La solubilité.**

On peut dire qu'en règle générale, plus le polysaccharide est branché, plus il est soluble dans l'eau. Des études de viscosimétrie suggèrent que le glycogène constitue une molécule très hydratée. Il est totalement solubilisé dans les conditions physiologiques, ce qui rend d'ailleurs sa purification très difficile. L'amylopectine est relativement soluble alors que l'amylose ne l'est pas du tout. Les solubilités différentes de ces deux dernières macromolécules dans les solvants organiques permet leur extraction sélective. Le grain d'amidon tel que l'on peut le trouver est quant à lui sous forme particulière dans la cellule et son isolement est d'autant facilité.

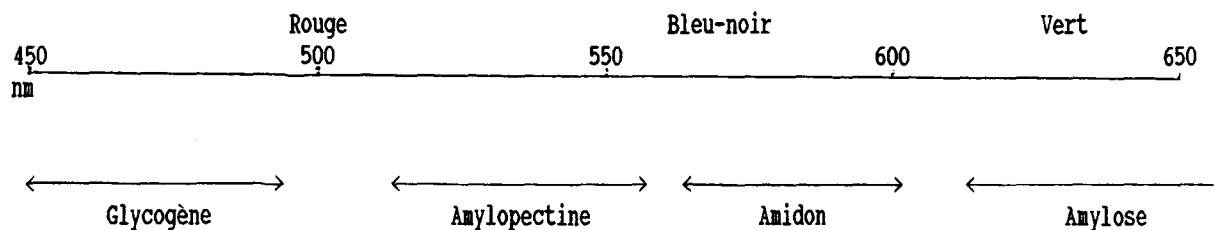
### III.E.2. La rétrogradation de l'amidon.

La rétrogradation est un phénomène connu depuis longtemps et consiste en une modification irréversible de la structure de l'amidon. Les longues chaînes linéaires de la molécule sont responsables de ce processus ; l'organisation parallèle des chaînes de type amylose, suivie de la création de ponts hydrogène ont pour effet une insolubilisation de la molécule.

### III.E.3. La colorimétrie à l'iode.

La capacité de l'amidon à se colorer avec l'iode est utilisée depuis longtemps. La nature réelle de l'association n'est pas encore élucidée. On sait que cette association est lâche et instable, qu'elle existe si le polysaccharide est sous forme solide mais que, en solution liquide, la coloration ne se développe qu'en présence d'eau (Murdoch, 1992).

Cette capacité de ces polysaccharides à se colorer en présence d'iode nous intéresse au plus haut point puisqu'elle est à la base de notre sélection phénotypique. Les complexes formés par le polysaccharide et l'iode absorbent dans le visible, la longueur d'onde du maximum d'absorption (ou  $\lambda_{\max}$ ) étant une caractéristique du polysaccharide étudié (voir figure 12).



**Fig.12 : Domaines d'absorption des complexes polysaccharide-iode.**

En fait, les molécules d'iode s'intercalent dans les hélices formées par les chaînes linéaires de type amylose (Murdoch, 1992). Un récent rapport montre qu'en dessous d'un d.p.12., les oligosaccharides sont incapables de fixer l'iode (Thorn et Mohazzeb, 1990). Des chaînes de d.p. contrôlé ont été synthétisées par Banks *et coll.* (1971) ; leurs  $\lambda_{\max}$  en combinaison avec l'iode sont présentés dans le tableau suivant :

d.p. moyen	22.2	28.9	31.3	36.4	50.7	71	93	105	134	1500
$\lambda_{\max}$	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642

**Tab.1 : Relation entre la longueur de la chaîne et le  $\lambda_{\max}$**

C'est l'association de l'iode aux chaînes linéaires de type amylose qui ferait prendre à ces dernières une conformation hélicoïdale, les doubles hélices étant incapables de fixer l'iode. Cette structure particulière, adoptée par les segments linéaires au contact de l'iode, serait donc tout-à fait artificielle. On ne sait pas à l'heure actuelle dans quelle mesure les points de branchement sont susceptibles de perturber l'association de l'iode et du polysaccharide, en particulier en ce qui concerne l'amylopectine. Toutefois, la relation entre le  $\lambda_{\max}$  observé et la longueur moyenne des chaînes estimée après débranchement de l'amylopectine sont en accord avec les valeurs proposées pour des molécules linéaires en solution (voir tableau 1). La contribution des chaînes de type A, et de manière générale de tous les segments linéaires de l'amylopectine, semble donc largement majoritaire dans la détermination du  $\lambda_{\max}$ . Ainsi, la coloration des colonies sur boîte de Pétri ou de l'amidon extrait est doublement informative ; elle reflète parfaitement la structure du polysaccharide accumulé, son intensité étant en rapport étroit avec la quantité du polysaccharide.



#### IV. L'AMIDON SYNTHETASE LIEE EST-ELLE REELLEMENT RESPONSABLE DE LA SYNTHESE DE L'AMYLOSE ?

Le mutant "waxy" a été initialement décrit par Weatherwax (1922) pour son phénotype particulier de coloration à l'iode. Ce mutant était caractérisé par une couleur rouge, révélateur d'un amidon enrichi en amylopectine. La déficience enzymatique potentielle corrélée à ce phénotype a été découverte par Nelson et Rines en 1962. Ces auteurs ont montré que l'amidon synthétase liée au grain est déficiente dans cette souche. Dès lors, deux hypothèses contradictoires étaient envisagées :

- l'amylose est absent chez waxy parce que l'amidon synthétase liée est déficiente et que c'est cette enzyme qui est responsable de la synthèse de cette sous-structure du polysaccharide. Dans ce cas, le locus waxy correspond au gène de structure de l'amidon synthétase liée au grain.

- l'amidon synthétase est absente du grain parce que l'amylose est responsable de son attachement au grain (rappelons que cette molécule est presque linéaire). Le locus waxy ne code pas l'amidon synthétase liée au grain mais une autre enzyme responsable de la synthèse de l'amylose qui est déficiente dans ce mutant. Dans ce cas, l'amidon synthétase liée est synthétisée mais elle reste sous forme soluble dans le stroma du chloroplaste ou de l'amyloplaste. Puisque les caractéristiques des enzymes solubles sont différentes (notamment par leur non-utilisation de l'UDP-Glc), l'explication la plus simple est que, si elle n'est pas attachée au grain, l'amidon synthétase liée n'a plus les mêmes propriétés. Si une fois solubilisée, l'enzyme sauvage est toujours capable d'utiliser ce substrat, et dans le cas où elle n'est pas codée par le gène waxy, on devrait pouvoir la mettre en évidence dans la fraction soluble.

Différents arguments sont venus confirmer l'une et l'autre de ces hypothèses.

Tsai (1974) démontre que l'activité amidon synthétase liée au grain est corrélée

linéairement au nombre d'allèles sauvages du gène *waxy* présents dans l'endosperme tri- ploïde du grain de maïs. Malheureusement, la quantité d'amylose ne peut y être reliée aussi étroitement. Les niveaux d'incorporation d'UDP-Glc par l'enzyme solubilisée sont de plus trop faibles pour pouvoir conclure que l'enzyme soluble et l'enzyme liée sont réellement distinctes.

Echt et Schwartz (1981) montrent que chez différents mutants du type *waxy* du maïs, la protéine majeure liée au grain d'amidon est le plus souvent absente (dans le cas de 22 allèles sur 26 examinés). La même constatation est faite chez des mutants similaires du riz (Villareal et Juliano, 1986). Cette protéine a une masse moléculaire d'environ 60 kDa dans tous les cas. L'identité entre la protéine et le produit du gène *waxy* est suggérée par l'observation d'une modification du point isoélectrique de la protéine présente chez les 4 mutants (sur 26) encore porteurs d'une protéine. Ces observations ont été confirmées par l'analyse de réversions d'un allèle *wx* particulier engendré par la présence d'un élément Ac (Schwartz et Echt, 1982). En effet, certains révertants présentent une modification de poids moléculaire, légère mais significative, de la protéine majeure. Shure *et coll.* (1983) et Klösgen *et coll.* (1986) montrent par clonage de l'ADNc correspondant à la protéine que, chez le maïs, cette dernière est bien le produit du gène *waxy* ; c'est d'ailleurs le nom qui lui a été alors attribué.

Mais la protéine *waxy* est-elle l'amidon synthétase liée au grain ?

Les différentes protéines *waxy* sont liées immunologiquement. Des anticorps dirigés contre cette protéine inhibent l'activité amidon synthétasique du granule de pomme de terre (Vos-Scheperkeuter *et coll.*, 1986). Il semble donc que protéine *waxy* et amidon synthétase liée au grain soient une seule et même protéine. Mais les auteurs reconnaissent dans cette étude une perte de l'activité allant de 90 à 100% lors de la destruction de la structure du grain, sans laquelle l'enzyme ne pourrait être rendue accessible aux anticorps. De plus, l'inhibition n'est que de 40%.

Deux formes d'amidon synthétases ont été solubilisées à partir de l'amidon du maïs (MacDonald et Preiss, 1983). Aucune n'a une activité significative avec l'UDP-Glc. Les deux formes disparaissent dans le contexte de la mutation *waxy*. L'une de ces deux activités

a un poids moléculaire de 60 kDa, comme le produit de la protéine waxy (l'autre est de 92 kDa). Par contre, le mutant waxy possède lui aussi deux formes liées qui pourraient être des contaminations par les protéines solubles (MacDonald et Preiss, 1985).

Chez la pomme de terre, l'isolement d'un mutant sans amylose (*amf* pour amylose free) a permis d'aller un peu plus loin dans la compréhension de ce système (Hovenkamp-Hermelink *et coll.*, 1987). Ce mutant est déficient pour la GBSS, ne possède pas d'amylose et ne possède plus la protéine majeure de 60 kDa. Cette mutation est monogénique et récessive (Jacobsen *et coll.*, 1989). Un ADNc a été cloné chez la pomme de terre par homologie avec les séquences nucléotidiques de l'ADNc codant la protéine waxy du maïs. Une hybridation moléculaire réalisée à l'aide de cette sonde montre que le mutant *amf* contient 3 fois plus d'ARN correspondant à la protéine waxy (Visser *et coll.*, 1989), suggérant à une inhibition en retour de celle-ci sur la transcription. La présence d'un messager en apparence intact correspondant à la protéine waxy dans le mutant *amf* suggère, d'après les auteurs, soit que le gène a subi une altération inférieure à 50 paires de bases qui n'interfère pas avec la transcription, soit qu'*amf-1* est une mutation dans un autre gène. Cette mutation réverte spontanément ; les 22 révertants isolés montrent un retour de la fraction amylose et de l'activité GBSS (Jacobsen *et coll.*, 1990). En fait, la mutation *amf* concerne une seule paire de bases dans la partie codant le peptide de transit (van der Leij *et coll.*, 1991a). L'introduction du gène correspondant à la protéine waxy via *Agrobacterium rhizogenes* complémente la mutation *amf-1*. Selon ces auteurs, ceci prouverait que cette mutation affecte bien le gène de structure de la GBSS (van der Leij *et coll.*, 1991b). Par contre, les transformants ne montrent pas une corrélation stricte entre l'activité GBSS et la quantité d'amylose, prouvant que cette enzyme n'est pas le seul facteur régulateur de la synthèse d'amylose et expliquant les résultats obtenus par Tsai (1974) quant au dosage d'allèle. Un récent rapport de van der Leij *et coll.* (1992) a montré que la séquence génomique du gène des révertants analysés est tout-à fait identique au gène sauvage, suggérant que le mutant *amf* d'origine était une chimère pour le gène concerné et que les révertants sélectionnés sont constitués de cellules provenant de tissus restés sauvages chez la chimère.

Tous ces résultats, bien qu'indirects, semblent prouver que le gène waxy est bien le

gène de structure de la GBSS. Pourtant, en 1990, Smith montre que chez le pois, des anticorps dirigés contre la protéine majeure du granule (59 kDa) n'inhibent pas l'activité amidon synthétase liée au grain, activité coéluée après solubilisation avec une protéine de 77 kDa. Par contre, les trois pics d'activité amidon synthétase ne sont pas corrélés aux pics d'élution de la protéine de 59 kDa. Des anticorps dirigés contre cette protéine de 77 kDa inhibent à peu près toute l'activité amidon synthétase, qu'elle soit solubilisée ou encore liée au grain. Les protéines de 59 et 60 kDa du grain de pois sont apparentées aux protéines waxy de la pomme de terre et du maïs, à qui différents auteurs ont attribué l'activité amidon synthétase liée au grain. Ici, cette activité est attribuée à une autre protéine de poids moléculaire plus grand et peu reliée immunologiquement aux protéines waxy. Ces résultats vont donc à l'encontre d'une identité entre la protéine waxy et l'amidon synthétase liée au grain. Et Alison Smith de conclure : "I suggest that a re-examination, species by species, of the identity of the granule-bound starch synthase and the role of the "waxy" protein may be required.". Notons que deux ans plus tard, le groupe d'Alison Smith publiait les séquences des ADNc correspondant aux protéines de 59 et 77kDa. Ces deux enzymes sont capables de lier l'ADP-Glc puisque la séquence du site de liaison de ce nucléotide-sucre est conservé dans les deux cas. Mais s'agit-il réellement de deux amidon-synthétase liées ou d'une forme liée et d'une forme soluble fixée au grain ?

Nous voyons donc qu'à l'époque où nous avons abordé notre travail, il n'était nullement établi que la GBSS et la protéine majeure liée au grain soit une seule et même molécule. Ceci remet en question le rôle spécifique de cette enzyme dans la biosynthèse de l'amylose, d'autant que plusieurs auteurs ont rapporté que la GBSS catalyse l'incorporation de glucose dans l'amylose et l'amylopectine *in vitro* (Baba *et coll.*, 1987 ; Leloir *et coll.*, 1961).

## **V. L'ALGUE VERTE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* : UN NOUVEL OUTIL POUR LA SOLUTION D'UN ANCIEN PROBLEME.**

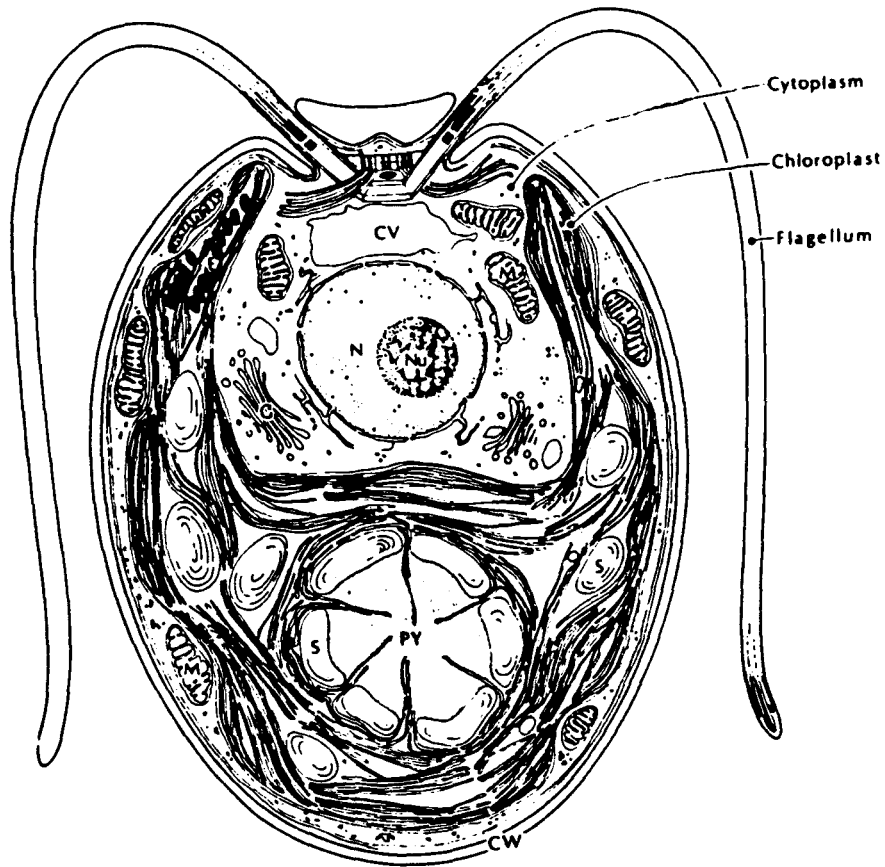
Le cas de la mutation waxy est révélateur des problèmes posés par les organismes supérieurs. En règle générale, la différenciation des cellules, la multiplicité des formes enzymatiques et la spécialisation de certains tissus constituent le premier obstacle aux études entreprises chez ces derniers. Les microorganismes unicellulaires tels que *E.coli* ou *S.cerevisiae* ont souvent été le point de départ des solutions apportées à des problèmes similaires. Mais le métabolisme de l'amidon des plantes ne peut être représenté ni par la bactérie, ni par la levure, même si les enzymes concernées sont proches car les polysaccharides accumulés, amidon et glycogène, sont structurellement trop différents. Le choix d'un autre modèle s'impose donc et c'est une algue verte unicellulaire qui a été retenue dans notre laboratoire.

### **V.A. Présentation de l'algue.**

*C.reinhardtii* est une microalgue unicellulaire d'eau douce. Sa taille n'excède généralement pas 8  $\mu\text{m}$  de longueur, ce qui suffit néanmoins à la rendre bien observable au microscope optique. La cellule est entourée d'une paroi (voir figure 13) composée essentiellement de glycoprotéines. Le chloroplaste, unique chez cette algue, occupe environ les deux tiers du volume. Elle est munie de deux flagelles qui assurent à la fois sa mobilité et son agglutination lors de la reproduction sexuée. Une simple alternance lumière/obscurité permet la synchronisation naturelle et durable d'une culture, et donc l'étude de l'influence éventuelle des différentes phases du cycle cellulaire sur les phénomènes biologiques.

Comme tous les microorganismes unicellulaires, *C.reinhardtii* offre l'avantage de la non différenciation des cellules dans des fonctions distinctes. Elle est capable de former des colonies sur boîte de Pétri et son temps de génération court (doublement en 7 à 8 heures

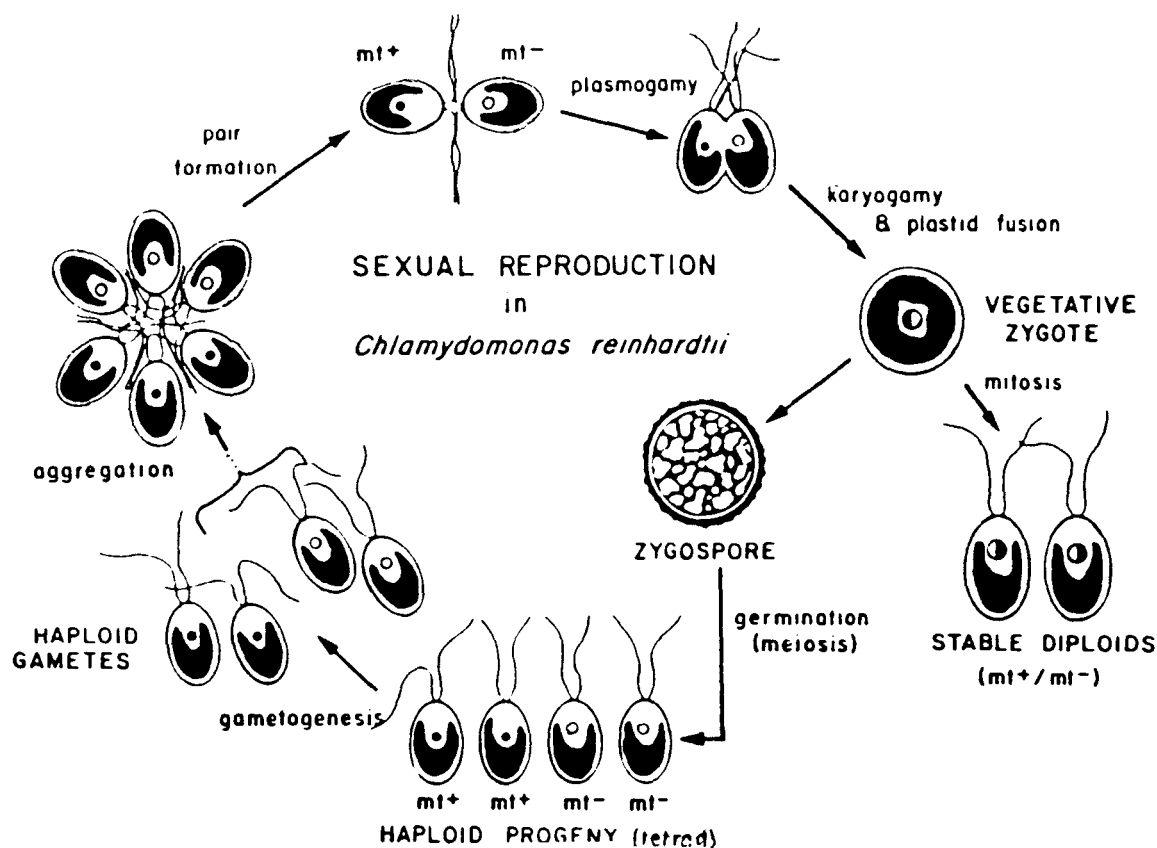
dans les conditions du laboratoire) la rend aisément cultivable en milieu liquide comme en milieu gélosé.



**Fig.13 : Représentation schématique de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*.**

*C.reinhardtii* est essentiellement haploïde et se multiplie par mitoses. Son haploïdie autorise la sélection facile de souches porteuses de mutations le plus souvent récessives. Sa capacité à former des gamètes puis à fusionner pour donner des cellules diploïdes permet une étude génétique des caractères. Son cycle de vie est parfaitement défini et contrôlable, autorisant aussi bien l'étude de cellules haploïdes que de cellules diploïdes, ainsi que l'étude de descendants méiotiques (voir figure 14). La transmission mendélienne du génome nucléaire, la transmission polaire des génomes chloroplastique (transmission maternelle) et

mitochondrial (transmission paternelle) permettent de déterminer quel génôme code les enzymes impliquées dans le métabolisme étudié.



**Fig.14 :** Cycle de vie de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*.

*C.reinhardtii* se cultive aussi bien en présence de  $CO_2$  et de lumière (phototrophie) qu'avec l'acétate comme source de carbone à l'obscurité (hétérotrophie) ; elle se présente donc comme un modèle représentatif des plantes supérieures, aussi bien en ce qui concerne les tissus chlorophylliens (feuilles) que les tissus des organes de réserve (qui sont totalement ou progressivement hétérotrophes). Elle possède en outre la caractéristique d'accumuler l'amidon lors d'une croissance en milieu carencé, tant à la lumière qu'à l'obscurité, notamment lors de la carence en azote (Ball *et coll.*,1990). La mise à l'obscurité

s'accompagne, en absence d'une source de carbone, d'une dégradation prononcée et rapide (quelques heures suffisent) du polysaccharide ; il nous est donc possible de contrôler non seulement la synthèse mais aussi la dégradation de l'amidon à volonté.

La simple coloration directe des clones sur boîte de Pétri par des vapeurs d'iode permet la sélection aisée d'un grand nombre de mutants parmi un très grand nombre de colonies testées. L'existence d'un tel crible phénotypique, aussi simple et rapide, est peut être l'atout majeur de ce système. Un autre avantage pour notre étude est la dispensabilité de l'amidon chez *C.reinhardtii*. Alors que chez les végétaux supérieurs, le polysaccharide est essentiel à la germination des graines et des tubercules (pour les mutations qui s'expriment dans les tissus de réserve) ou à la croissance des plantes dans des conditions normales de photopériode (pour les mutations qui s'expriment dans les tissus chlorophylliens), les mutants de l'algue n'accumulant plus d'amidon ne présentent aucun phénotype particulier lié à la croissance, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité. Ceci autorise non seulement l'isolement de mutant dont la déficience enzymatique est très marquée, mais surtout la caractérisation, s'ils existent, de gène essentiels à la synthèse du polysaccharide de réserve et particulièrement à son initiation.

Enfin, les récentes techniques de transformation du génôme nucléaire par insertion de plasmide ouvrent de nouveaux horizons et rendent encore plus attractive *C.reinhardtii*.

#### **V.B. Le métabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*.**

*C.reinhardtii* a déjà été utilisée avec succès dans de nombreux domaines, en particulier en ce qui concerne l'étude de la photosynthèse. Pour ce qui est du métabolisme de l'amidon, il n'a pas été envisagé en tant que tel mais plutôt en relation avec d'autres phénomènes spécifiques. Ainsi, de nombreuses études portent sur la dégradation et la fermentation de l'amidon (le polysaccharide étant dans ces conditions la principale source d'énergie disponible par la cellule), sur la compartimentation de la glycolyse et sur les relations du métabolisme de l'amidon avec la photosynthèse.

La glycolyse semble compartimentée chez *C.reinhardtii* ; les enzymes concernées



par la première partie de la glycolyse (du fructose au 3PGA) se trouvent exclusivement localisées dans le chloroplaste (Klein, 1986). Les trioses phosphates et le 3PGA passeraient ensuite dans le cytosol via le transporteur de Pi du chloroplaste similaire à celui du chloroplaste de feuille d'épinard. Les enzymes de la fin de la glycolyse (du 3PGA au pyruvate) sont quant à elles entièrement cytoplasmiques. L'enzyme caractéristique de la néoglucogenèse, la fructose biphosphatase, existe sous deux formes chez *C.reinhardtii* ; la forme alcaline est située uniquement dans le chloroplaste, l'autre forme étant exclusivement cytoplasmique. Notons que la forme chloroplastique de l'enzyme est 10 fois plus active que la forme cytosolique, et que la capacité de synthétiser du glucose est prépondérante dans le chloroplaste. Les deux enzymes clefs de la voie oxydative des pentoses phosphates, la Glc-6-P deshydrogénase et la 6-phosphogluconate deshydrogénase sont respectivement à 70 et 80% dans le chloroplaste. La partie cytoplasmique de ces activités pourrait intervenir dans la dégradation des hexoses phosphates provenant soit directement de l'amidon, soit de la faible néoglucogenèse pouvant avoir lieu dans ce compartiment subcellulaire. Les niveaux d'activités enzymatiques rapportées par Klein (1986) le conduisent à supposer que la glycolyse prédomine sur l'oxydation des pentoses phosphates.

La dégradation anaérobie de l'amidon à l'obscurité est plus importante que la dégradation aérobie, phénomène connu sous le nom d'effet Pasteur. La fermentation de l'amidon conduit à la production de deux molécules de pyruvate pour une molécule de glucose, stoechiométrie compatible avec la voie de glycolyse d'Embden-Meyerhof (Gfeller et Gibbs, 1984). Le pyruvate est transformé en formiate, acétate et éthanol dans les proportions 2/1/1, avec un faible relargage de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>. 97% des produits sont excrétés (Kreuzberg, 1984). La lumière inhibe la dégradation même lorsque l'assimilation du carbone via la photosynthèse est bloquée (Gfeller et Gibbs, 1984). Le formiate proviendrait du pyruvate après action de la pyruvate formiate lyase, enzyme que l'on pensait spécifique des procaryotes (Kreuzberg, 1984) et qui est responsable de la synthèse concomittante d'acétyl-coenzyme A.

La fermentation de l'amidon à l'obscurité est un phénomène oscillatoire présentant

une période de 60 minutes environ. Le Glc-6-P, le pyruvate, le formiate, l'acétate, l'éthanol, l'AMP, l'ADP et l'ATP sont concernés par ces fluctuations, avec la même période caractéristique (Kreuzberg et Martin, 1984). Les relations de phase de ces différentes oscillations sont en accord avec la voie de fermentation décrite.

En ce qui concerne les relations entre le métabolisme de l'amidon et la photosynthèse, Bulté et Wollman (1992) ont montré que la déstabilisation du complexe cytochrome  $b_6/f$  induite lors de la gamétogénèse est en relation avec la synthèse d'amidon. La diminution du contenu en ATP d'une cellule conditionne la dégradation de l'amidon. Or, la gamétogénèse en conditions photoautotrophes ou en absence du flux d'électrons mitochondrial prévient la synthèse d'amidon normalement observée lors de la carence en azote. D'autre part, le mutant isolé dans notre laboratoire dont l'ADP-Glc pyrophosphorylase est insensible à l'activation par le 3PGA et à l'inhibition par le Pi (et qui accumule moins de 5% d'amidon par rapport au sauvage) garde son activité photosynthétique 40 heures après gamétogénèse. En revanche, la souche sauvage subit une déstabilisation du cytochrome  $b_6/f$ , accompagnée de la synthèse d'amidon, dès 10 heures après la mise en milieu carencé en azote. Ainsi, la synthèse de l'amidon et la déstabilisation du cytochrome  $b_6/f$  semblent liés par un mécanisme encore inconnu.

Avant les études menées dans notre laboratoire, peu de gens s'étaient tournés vers *C.reinhardtii* pour l'étude du métabolisme propre de l'amidon. En 1984, Levi et Gibbs mettent en évidence les enzymes telles que la maltase, l'hexokinase, l' $\alpha$ -amylase et la phosphorylase chez cette algue. Contrairement aux végétaux supérieurs, ces deux dernières sont exclusivement chloroplastiques (Levi et Gibbs, 1984). Elles paraissent induites lors de la transition lumière-obscurité chez des cellules synchronisées, mais on peut noter que cette induction s'accompagne d'une augmentation du taux de protéines total du même ordre et que les activités spécifiques de ces enzymes ne sont donc peut-être pas modifiées. Une purification partielle de l'enzyme a conduit à la caractérisation d'une activité amylasique de type  $\alpha$ -amylase, sans que les auteurs excluent tout-à fait l'existence d'une  $\beta$ -amylase.

*C.reinhardtii* accumule l'amidon lors de sa croissance à la lumière et le dégrade à l'obscurité. Toutes les enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon chez les plantes supérieures ont été mises en évidence chez *C.reinhardtii* (Ball *et coll.*, 1990). La synthèse ne dépend pas de protéines codées par le génôme chloroplastique.

Contrairement à la situation caractéristique des microorganismes (tels que *E.coli* ou *S.cerevisiae*), cette algue n'accumule pas de polysaccharide lors de la phase stationnaire de croissance. Par contre, elle répond aux carences nutritives en synthétisant de grandes quantités d'amidon, que ce soit en mixotrophie (croissance à la lumière en présence d'acétate et de CO<sub>2</sub>), en hétérotrophie ou en autotrophie (Ball *et coll.*, 1990), comme l'avaient initialement suggéré les expériences menées en carence en phosphore réalisées par Matagne *et coll.* (1976).

Chez *C.reinhardtii* comme chez les plantes supérieures, l'amidon synthétase existe sous deux formes, soluble et liée. Le  $K_M$  pour l'ADP-Glc de la forme liée ( $2,2 \pm 0,6$  mM) est plus élevé que celui de la forme soluble ( $0,6 \pm 0,1$  mM) (Ball *et coll.*, 1991). Par contre, c'est la forme soluble et non la forme liée qui serait capable d'utiliser l'UDP-Glc ( $K_M = 7 \pm 2$  mM).

Situation analogue aux plantes supérieures, l'enzyme clef de la biosynthèse chez *C.reinhardtii* est l'ADP-Glc pyrophosphorylase. Comme nous l'avons vu précédemment, elle répond aux mêmes effecteurs allostériques, le 3PGA et le Pi. Un mutant insensible à ces effecteurs allostériques a prouvé la nécessité d'action de ces effecteurs *in vivo* puisque les niveaux d'activité en leur absence sont identiques à ceux de la souche sauvage (Ball *et coll.*, 1991). La déficience de ce mutant, aussi bien marquée à l'obscurité en présence d'acétate, suggère que la synthèse à la lumière comme à l'obscurité passe par l'activation par le 3PGA chez *C.reinhardtii*. Par ailleurs, comme chez certaines plantes, l'inhibition par le Pi n'est visible que dans le cadre d'une activation par le 3PGA. L'existence d'un tel mutant, dont la déficience très marquée ne se répercute pas au niveau de la croissance ou de la viabilité de la souche, pose le problème du rôle des polysaccharides dits "de réserve" chez les microorganismes (des mutants similaires sont obtenus chez *E.coli*, *S.cerevisiae*...).

Il apparaît clairement que le glycogène ou l'amidon ne sont pas essentiels à la survie ou à la viabilité dans ces cas précis. Outre les conditions de carence, d'autres paramètres tel que la mobilité peuvent affecter sensiblement les quantités de polysaccharide accumulé. En effet, des mutants non mobiles de *C.reinhardtii* contiennent plus d'amidon que la souche sauvage (Hamilton *et coll.*, 1992). L'excès d'énergie semble donc emmagasinée sous forme de polysaccharide de réserve. Toutefois, les niveaux d'induction sont faibles en comparaison de ceux observés lors de la carence en azote (facteurs de 2 et 20 respectivement).

La phosphorylase, enzyme de dégradation, semble être induite lors d'une culture carencée en phosphore (Ball *et coll.*, 1990). Toutefois, il pourrait y avoir une dégradation protéolytique de certaines enzymes lors de la carence et ce phénomène d'induction pourrait être plus général.

La phosphorylase de *C.reinhardtii*, comme celle de *C.vulgaris* et de la jeune feuille de banane, est inhibée par l'ADP-Glc (Ball *et coll.*, 1991) (en présence de 1,3mM de Pi, valeur du  $K_M$  pour le phosphate inorganique de la phosphorylase, on observe 50% d'inhibition pour des concentrations de 7 $\mu$ M en ADP-Glc et 1mM en UDP-Glc).

#### V.C. Thème général du laboratoire et but du travail.

Les activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon sont donc comparables chez *C.reinhardtii* et chez les plantes, confirmant l'idée que cette algue constitue un modèle d'étude tout à fait représentatif de ce point de vue des végétaux supérieurs. Les résultats acquis dans ce domaine chez l'algue pourront de ce fait très certainement être extrapolés aux végétaux supérieurs. Mais ils devraient surtout permettre une investigation plus poussée. Le mutant *st-1-1*, déficient pour l'ADP-Glc pyrophosphorylase, en est la preuve ; en effet, si des mutants de ce type avaient déjà été obtenus chez d'autres organismes, *st-1-1* est le premier mutant isolé dont l'ADP-Glc pyrophosphorylase est insensible aux effecteurs allostériques. L'examen des conséquences physiologiques de cette insensibilité a permis

d'établir l'importance *in vivo* d'un phénomène visualisé jusqu'ici *in vitro*. Etant donnée la similitude des voies de biosynthèse, il est très probable que l'action des effecteurs allostériques *in vivo* soit aussi nécessaire chez les plantes supérieures que chez *C.reinhardtii*.

Ce qui nous intéresse plus particulièrement maintenant est de déterminer les modalités de l'édification d'une structure aussi complexe que le grain d'amidon. La multiplicité des enzymes de branchement et des amidons synthétases solubles et liées rendent très difficilement accessible une telle connaissance chez les végétaux supérieurs et, pour l'instant, peu de conclusions ont pu être dégagées des données acquises depuis plus d'un siècle. Ceci nous conforte dans le choix simplifié qui, à priori, ne serait pas entâché de la duplication des gènes et des fonctions observées chez la plante. Rappelons à ce titre que les gènes principalement transcrits codant les enzymes du métabolisme de l'amidon sont différents dans les feuilles et les organes de réserve d'une même plante. Mais avant d'extrapoler les résultats acquis chez l'algue, encore nous faut-il vérifier que la structure du polysaccharide accumulé par *C.reinhardtii* est identique en tous points à celle des végétaux supérieurs. Si tel est le cas, nous devrions être en mesure d'attribuer un rôle précis aux différentes amidon-synthétases et aux enzymes de branchement dans l'élaboration des sous-structures de l'amidon et de poser ainsi les bases des connaissances quant à la morphogenèse du grain d'amidon chez les plantes en général.

Pour cette raison, nous nous sommes attachée à l'isolement et à la caractérisation de souches porteuses de mutations provoquant des altérations dans la structure même du grain.

MATERIEL ET METHODES

## **I. LES MILIEUX ET LES SOUCHES.**

### **I.A. Les milieux de culture.**

#### **I.A.1. Les milieux liquides.**

Les milieux utilisés sont décrits par E. Harris (1989).

La nomenclature en est :

TAP : pour Tris Minimum Phosphate + Acétate.

TAP-N : idem carencé en azote. Le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.4g) est remplacé par 0.4g de NaCl.

TAP<N : milieu TAP limité en azote. Une quantité dix fois inférieure à la quantité d'azote apportée par le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en milieu complet (TAP) conduit à une accumulation d'amidon semblable à celle observée en milieu carencé. Toutefois, la croissance dans ce milieu étant un peu plus poussée (4 divisions au lieu de 2), la quantité totale d'amidon est plus importante pour un même volume de culture.

#### **I.A.2. Les milieux solides.**

Les milieux solides ont la nomenclature suivante :

- HS : High Salts. Il s'agit d'un milieu minimum (sels minéraux,  $\text{H}_2\text{O}$ , azote sous forme  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pas de source carbonée).
- Ni min : milieu nitrate minimum. La seule source d'azote est dans ce cas le nitrate.
- HSA : milieu minimum + acétate de sodium.
- HS+PAB : milieu minimum + acide para-amino-benzoïque.
- HSA+PAB-N : milieu minimum + acétate +PAB carencé en azote.
- Ni complet : milieu nitrate complet (Ni minimum + acétate + PAB)
- Ri : milieu riche (HSA+PAB + extraits de levure)

Les milieux gélosés contiennent 1,5% d'Agar. Le milieu riche à 4% d'Agar (Ri 4%) est utilisé pour la maturation des zygotes lors des croisements.

Tous les milieux, qu'ils soient liquides ou gélosés, sont stérilisés par autoclavage 20 min à  $120^\circ\text{C}$ . De l'ampicilline leur est ajoutée à froid à raison de  $50 \mu\text{g/ml}$ .

## I.B. Les souches utilisées.

Les souches principalement utilisées ont les génotypes suivants :

- 137C :  $mt^- y^- nit-1 nit-2$ .  
 37 :  $mt^+ y^+ ac-14 pab-2$ .  
 18B :  $mt^- y^- nit-1 nit-2 st-2-1$ .  
 25B :  $mt^- y^- nit-1 nit-2 st-2-2$ .  
 I<sub>152</sub> :  $mt^- y^- nit-1 nit-2 st-3-1$ .  
 I<sub>154</sub> :  $mt^- y^- nit-1 nit-2 st-3-2$ .  
 B20 :  $mt^+ ac-14 pab-2 st-2-1$ .  
 B4 :  $mt^+ ac-14 pab-2 st-2-2$ .  
 B9 :  $mt^+ ac-14 pab-2 st-3-1$ .  
 330 :  $mt^+ nit-1 nit-2 cw-15 arg-7-7$ .  
 BAFR1 :  $mt^+ nit-1 nit-2 cw-15 st-2-\Delta I$ .

*ac-14* : besoin d'acétate pour croître. Cette mutation porte au niveau de la photosynthèse et ne permet pas la croissance en autotrophie. La synthèse des pigments et la fixation du CO<sub>2</sub> sont normales chez ces mutants. Mutation nucléaire induite par U.V.

Groupe de liaison I.

*pab-2* : auxotrophie pour l'acide para-amino-benzoïque. La lésion exacte n'est pas déterminée. Mutation nucléaire induite par U.V.

Groupe de liaison I.

Les loci *pab-2* et *ac-14* sont distants d'environ 14 centimorgans.

*nit-1* : déficit de la diaphorase et l'activité terminale de la nitrate réductase. Mutation nucléaire spontanée.

Groupe de liaison IX.

*nit-2* : mutation nucléaire spontanée dont la localisation exacte est inconnue.

Groupe de liaison III.

*st.* : mutation "starch" ou amidon. Sont ainsi appelées toutes les mutations concernant une étape de la biosynthèse de l'amidon aboutissant à une altération de ce polysaccharide.

*y<sup>-</sup>* : "yellow in the dark" ou jaune à l'obscurité. Cette condition nucléaire récessive conduit à une répression de la synthèse des pigments à l'obscurité. La nature du gène muté est inconnue, de même que l'allèle dont nous disposons.

Groupe de liaison XVII.



*mt*<sup>+</sup> et *mt*<sup>-</sup> : "mating type" ou type de conjugaison. Ces deux allèles nucléaires sauvages sont présents au locus de polarité sexuelle. Une souche *mt*<sup>+</sup> est sensible à la tunicamycine et transmet son génome chloroplastique à la plupart des zygotes. La cellule *mt*<sup>-</sup> est tunicamycine résistante et transmet son génome mitochondrial à sa descendance.

Groupe de liaison VI.

*cw15* : déficience en paroi. La ségrégation de ce caractère est de type nucléaire.

Groupe de liaison inconnu.

*arg-7-7* : déficience en argino-succinate lyase.

groupe de liaison I.

## **II. LES CULTURES ET LA PREPARATION D'EXTRAITS CELLULAIRES.**

Que ce soit pour inoculer ou arrêter une culture, les cellules sont comptées au compteur-coulter et leur état physiologique (mobilité, contaminations) est observé au microscope optique.

### **II.A. La préculture et les cultures.**

La préculture est effectuée en milieu TAP à 20-25°C, pendant 2 à 3 jours et en lumière continue (2000 à 10 000 lux) sous vive agitation.

- Dans le cas d'une croissance en milieu non carencé, la culture principale estensemencée à raison de  $5 \cdot 10^4$  cellules par ml en TAP. Après 2 à 3 jours dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, la culture se trouve à  $2 \cdot 10^6$  cellules/ml.

- Dans le cas d'une préparation d'amidon, la préculture est lavée deux fois par de l'eau stérile. La culture en TAP-N ou en TAP<N est inoculée à raison de  $10^5$  cellules/ml. Les cellules sont cultivées 5 jours, toujours dans les mêmes conditions.

### **II.B. L'extrait cellulaire brut.**

Pour la préparation d'un extrait cellulaire brut, les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance ( $2 \cdot 10^6$  cellules/ml). La culture est concentrée jusque  $2 \cdot 10^8$  cellules/ml. Les cellules sont alors éclatées à la presse de French (10 000 psi). L'extrait cellulaire brut est débarrassé de l'amidon et des débris cellulaires par centrifugation (15 min, 3 000 g). Le surnageant est conservé à 4°C pour 4h au maximum.

## **II.C. La préparation de l'amidon.**

La carence en azote, qu'elle soit totale ou non, provoque très rapidement un arrêt des divisions. Après 5 jours de culture, les cellules présentent un chloroplaste envahi par l'amidon.

L'extraction de l'amidon est effectuée comme la préparation de l'extrait brut. Après récupération du culot, l'amidon est purifié par addition de 9 volumes de Percoll (Pharmacia) et centrifugation 20 min à 10 000g. Il est ensuite lavé trois fois par de l'eau avant son utilisation.

## **III. LES DOSAGES.**

### **III.A. Le dosage de l'amidon.**

Après solubilisation 10 min à 100°C dans l'eau ou dans le DMSO, l'amidon est quantifié grâce au kit de dosage commercialisé par Boehringer Mannheim. Le principe en est le suivant :

Amidon	amyloglucosidase hydrolyse	D-Glc
D-Glc	hexokinase phosphorylation	G-6-P
G-6-P	G-6-P deshydrogénase oxydation	Gluconate-6-P

C'est la réduction du NADP en NADPH, concomittante à l'oxydation du G-6-P qui est suivie au spectrophotomètre (Hitachi, U2000) à 365 nm (Coefficient d'extinction  $\Sigma = 3.51 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

### **III.B. Le dosage des protéines.**

La concentration en protéines des extraits cellulaires bruts est mesurée par la méthode spectrophotométrique au Bleu Brillant de Coomassie dérivée de la méthode décrite par Bradford (Kit Biorad Protein Assay).

La longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe se déplace de 465 à 595 nm. L'absorbance lue à cette longueur d'onde est comparée à une courbe étalon de 0 à

100 $\mu$ g en sérum albumine bovine (SAB).

### **III.C. Le dosage des activités amidon synthétiques soluble et liée.**

L'activité de type amidon synthétase est mesurée par incorporation de (U-<sup>14</sup>C)Glucose à partir d'ADP(U-<sup>14</sup>C)Glucose.

Le mélange réactionnel (100 $\mu$ l final) est composé comme suit :

Glycylglycine NaOH pH = 9	50	mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100	mM
$\beta$ Mercapto-éthanol	5	mM
MgCl <sub>2</sub>	5	mM
SAB	0.5	mg/ml
glycogène	10	mg/ml
ADPG	1	mM
ADP(U- <sup>14</sup> C)Glucose (253 $\mu$ Ci/ $\mu$ mol)	0.25	nM (forme soluble)
	0.75	nM (forme liée)
Extrait cellulaire/amidon	40 $\mu$ l	

Après 15 min (amidon synthétase soluble) ou 1h (forme liée au grain)   30 C, la réaction est arrêtée par addition de 2 ml d'éthanol à 70%. Le précipité est filtré sous vide (Whatmann Glass Fiber) et rincé par 4 x 5 ml d'éthanol 70%. La radioactivité est compt e dans le Lipofluor.

## **IV. MUTAGENESE ET SELECTION PHENOTYPIQUE.**

### **IV.A. La mutagenèse U.V..**

Un tapis cellulaire de la souche sauvage est irradié au transilluminateur U.V. (255 nm, 7 mW/cm<sup>2</sup>) entre 30 et 300 sec puis placé à l'obscurité 12 h. Les cellules sont alors récupérées, compt es et étalées sur un milieu riche. Les cellules ayant subi un temps d'irradiation donnant au maximum 5% de survie sont transférées sur milieu HSA-N afin de tester leur phénotype (caractère) "amidon".

#### **IV.B. La mutagenèse par transformation.**

L'introduction d'un ADN exogène chez *Chlamydomonas reinhardtii* conduit à un insertion de ce dernier dans le génome nucléaire de l'algue. Les mécanismes de cette insertion sont inconnus à l'heure actuelle mais elle paraît se produire au hasard, sans faire intervenir un phénomène de recombinaison homologue. La transformation chez *Chlamydomonas reinhardtii* conduit donc à une mutagenèse de celle-ci.

La souche utilisée pour la transformation est une souche sans paroi (mutation *cw-15* portée par la souche 330). Cette souche est auxotrophe pour l'arginine. L'insertion d'un plasmide portant le gène capable de compléter cette mutation, pArg-7-7, permet de sélectionner aisément des transformants.

Le protocole de transformation utilisé est le suivant :

Une culture de la souche 330 en TAP + Arginine (100 mg/ml) est arrêtée en phase exponentielle de croissance ( $2 \cdot 10^6$  cellules/ml) et concentrée jusque  $2 \cdot 10^8$  cellules/ml. Dans un tube de 10 ml sont mélangés 0.5 ml de cette suspension cellulaire, 0.5 ml de billes de verre de 1 mm de diamètre et l'ADN (1 à 10  $\mu$ g). L'ensemble est vigoureusement agité à l'aide d'un vortex à puissance maximale pendant 10 à 60 sec. Après addition de 10 ml de TAP, la suspension est immédiatement transférée dans un autre tube (les billes restant dans le premier). Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 400  $\mu$ l de TMPA et étalées sur milieu sélectif à raison de 200  $\mu$ l/boîte. Les transformants apparaissent après environ 8 jours d'incubation à 3 000 lux et 24°C.

#### **IV.C. La sélection phénotypique.**

La croissance en milieu carencé en azote ne conduit pas simplement à l'accumulation massive d'amidon. Elle provoque aussi une destruction des chlorophylles, d'autant plus prononcée que le flux lumineux est intense (photoinhibition). Cette dépigmentation permet une coloration directe des colonies sur boîte par des vapeurs d'iode. L'iode, en se complexant à l'amidon contenu dans les souches, confère à celles-ci une coloration spécifique du polysaccharide accumulé ou de sa quantité.

### **V. L'ANALYSE STRUCTURALE DE L'AMIDON.**

#### **V.A. La spectrophotométrie à l'iode.**

Amidon, glycogène, amylopectine et amylose forment avec l'iode un complexe ab-

sorbant dans le visible. Le spectre réalisé entre 400 et 700 nm montre un maximum d'absorption dont la longueur d'onde, ou  $\lambda_{\max}$ , est spécifique de la nature du polysaccharide (Archibald *et coll.*, 1961).

Pour cela, le polysaccharide est solubilisé dans le DMSO ou dans une solution HCl 0.1N 1 min à 100°C . Les concentrations finales sont de 0.2p100 en KI, 0.02p100 en I<sub>2</sub> et 0.01p100 en polysaccharide.

La solution I<sub>2</sub>/KI doit être préparée extemporanément.

### **V.B. La chromatographie de gel filtration.**

5 à 10 mg de d'amidon sont dissous dans 0.5 ml de DMSO 100% à 100°C pendant 10 min. La solution est ensuite diluée à 10% en DMSO puis déposée sur une colonne de fractogel TSK HW75(S) (Merck) (2 x 145 cm) (Takeda *et coll.*, 1984 ; Martel, 1988). L'élution est menée à un débit de 10 ml/h par du DMSO 10% contenant 0.02% d'azide de sodium. La détection est réalisée par spectrophotométrie à l'iode sur 100  $\mu$ l de chaque fraction de 3 ml.

### **V.C. La méthylation.**

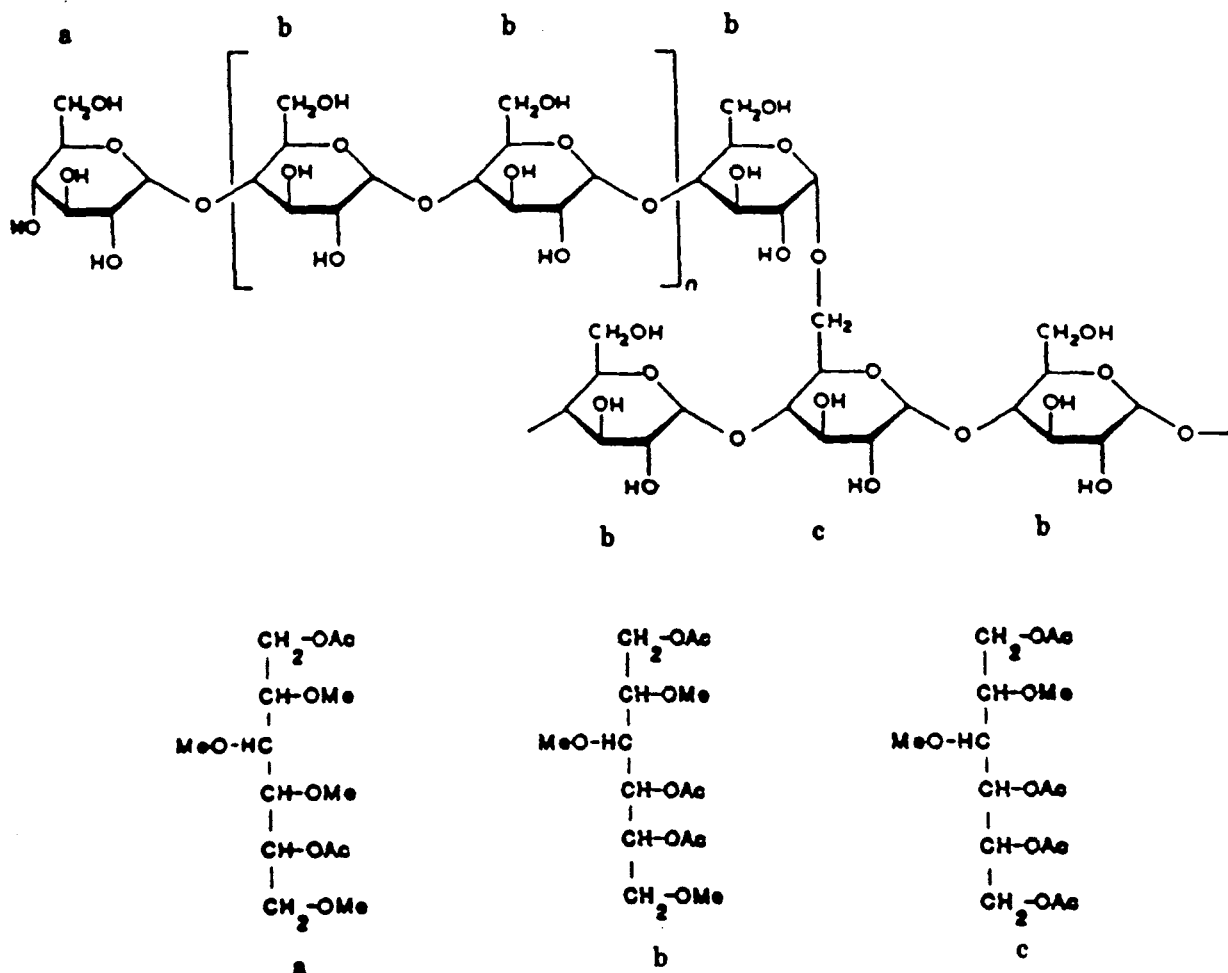
Les expériences de méthylation ont été réalisées en collaboration avec T.Fontaine et F.Routier dans le laboratoire du Professeur Fournet (UMR n°111).

Cette technique consiste en une substitution des hydrogènes de tous les hydroxyles libres par des groupements méthyles. Ainsi, après rupture des liaisons glycosidiques, les hydroxyles engagés dans les liaisons apparaissent.

La méthylation est réalisée selon la méthode de Paz parente *et coll.* (1985) modifiée comme suit :

2 mg de polysaccharide sont dissous dans le DMSO anhydre à 80°C pendant 6h. Après addition de 0.5 ml de lithium méthylsulfinyl carbanion, l'échantillon est laissé 2h dans un bain à ultra-sons puis une nuit à température ambiante. Après congélation et addition de 0.5 ml d'iodure de méthyle, l'échantillon est de nouveau placé dans le bain à ultra-sons pendant 2h. Les éthers méthyliques obtenus après hydrolyse, réduction et acétylation sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Chromatographe Spectra Physics SP 7100; colonne capillaire 25m x 0.2mm imprégnée de silicone OV101; gradient de température de 120 à 140°C à raison de 2°C/min; pression d'hélium 40 kPa).

Les différents éthers méthyliques obtenus par cette méthode sont les suivants :



a : 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-1,5-di-O-acétyl-glucitol

b : 2,3,6-tri-O-méthyl-1,4,5-tri-O-acétyl-glucitol

c : 2,3-di-O-méthyl-1,4,5,6-tétra-O-acétyl-glucitol

#### V.D. L'analyse en RMN du carbone 13.

Les spectres RMN du <sup>13</sup>C ont été réalisés par J.M. Wieruszski au sein de notre laboratoire.

Pour cela, 100 mg de polysaccharide sont dissous à 80°C dans 1,7 ml de DMSO à 90% pendant 3 jours. Ils sont ensuite analysés à 80°C grâce au programme Powgate par un spectromètre Bruker AM-400WB, 100MHz (pour plus de précisions, voir article 2 en annexe).

### **V.E. Le débranchement enzymatique de l'amylopectine.**

Le débranchement enzymatique a été réalisé sur les fractions obtenues après chromatographie de gel filtration sur matrice TSK HW75. Cette technique permet l'analyse fine du d.p. des chaînes de type A.

10 mg de chaque échantillon sont dissous dans 210 $\mu$ l de DMSO (100°C, 10 min). Après ajout de 3.7 ml d'une solution d'acétate de sodium 55 mM pH=3.5 et de 30 unités d'isoamylase (Sigma), l'échantillon est incubé 4 heures à 45°C. L'enzyme est ensuite inactivée par chauffage 10 min à 100°C.

Les échantillons sont alors centrifugés 10 min à 10 000g, et les surnageants (contenant les chaînes de type A et B) sont dessalés sur colonne de gel filtration TSK HW40(S) (50 x 1.6 cm, Merck), éluant : acide acétique 0.5% v/v, débit : 1ml/min.

L'estimation des longueurs de chaînes est réalisée par chromatographie d'échange d'anions à haut pH, système Dionex (colonne CarboPAC PA 100 ; débit : 1 ml/min ; éluant : solvant A=NaOH 0.1M, solvant B= NaOH 0.1M + Acétate de Na 1M).

Le gradient utilisé est : T=0 à 5min A : 95% + B : 5% à

Puis gradient linéaire jusque T=17 min A : 80% + B : 20%

suivi d'un nouveau gradient linéaire jusqu'au temps

T=45 min A : 70% + B : 30%.

La détection est réalisée par ampérométrie pulsée.

## **VI. L'ANALYSE GENETIQUE.**

### **VI.A. Les croisements.**

Les cellules fraîches sont mises en suspension dans un milieu carencé en azote, ou dans de l'eau stérile. La gamétogenèse se produit dans ces conditions après 5h d'exposition à une lumière vive (5 000 lux). Quand les deux suspensions cellulaires de concentrations identiques sont mises en contact, la fusion peut être observée au microscope optique après environ une heure. La formation d'un voile en surface atteste de la formation de zygotes.

### **VI.B. La sélection des diploïdes et l'étude de la complémentation en trans.**

5% environ des diploïdes formés lors d'une fusion se divisent sous forme végétative.

Ils sont sélectionnés par complémentation des génotypes parentaux. Dans notre cas, chaque croisement met en présence des souches de génotype *pab-2 ac-14* et *nit-1 nit-2*. Les diploïdes végétatifs sont donc sélectionnés sur milieu nitrate minimum. Après 3 épuisements successifs afin d'éliminer d'éventuelles cellules parentales, les diploïdes sont inoculés sur milieu carencé en azote. Il est ainsi possible de tester la complémentation ou non-complémentation en trans des gènes étudiés, après s'être assuré par analyse du volume cellulaire moyen qu'il s'agit bien de diploïdes.

### **VI.C. La formation des zygotes et l'analyse de la descendance d'un croisement.**

Après 24h à la lumière et 4 jours à l'obscurité, les zygotes mûrs sont enkystés dans l'agar. Les cellules végétatives en surface sont éliminées par raclage (le milieu à 4% d'agar facilite cette étape) et par traitement par des vapeurs de chloroforme (30 à 45 sec). La méiose est déclenchée par la lumière (12h) et la germination par l'humidité du milieu. Après étalement et 5 jours d'incubation à la lumière, les clones sont purifiés et répliqués sur différents milieux en vue de déterminer leur génotype.

### **VII. L'ANALYSE DES PROTEINES SUR GEL.**

L'extraction des protéines du grain d'amidon est réalisée suivant la méthode de Vos-Scheperkeuter (1986) légèrement modifiée.

Après purification, 3 ou 6 mg d'amidon sont chauffés à 100°C pendant 10 min dans 80µl de solution d'extraction (SDS 2p100, βmercapto-éthanol 5%). Après centrifugation 30 min à 10 000g, le surnageant est prélevé et le culot de nouveau extrait par 40µl de la même solution. Les deux surnageants sont mélangés et déposés sur un gel de SDS-polyacrylamide 10%. La migration dure 12h à 20mA, les conditions et tampons étant ceux décrits par Laemmli (1970). Les protéines sont révélées au nitrate d'argent (J.H.Morrissey, 1981) si la coloration au Bleu de Coomassie ne donne pas un résultat satisfaisant (coloration 1 heure 0.2% Bleu Coomassie R250 contenant 45% de méthanol et 10% d'acide acétique; décoloration dans 10% méthanol + 7% acide acétique).



## **VIII. L'ANALYSE CYTOLOGIQUE.**

L'analyse cytologique en microscopie électronique a été réalisée dans le laboratoire de Cytologie et d'Immunocytochimie de M<sup>r</sup> le Professeur A. Dhainaut (Laboratoire d'Endocrinologie des Vertébrés, CNRS URA 148) avec l'aide de M<sup>me</sup> F. Bonnet et de M<sup>r</sup> J.C. Deremaux.

Pour l'étude en microscopie électronique à transmission, les culots cellulaires ont été préparés suivant la méthode décrite par E. Harris (1989).

Les échantillons d'amidon purifiés ont été métallisés pour l'étude en microscopie électronique à balayage.

## CHAPITRE II

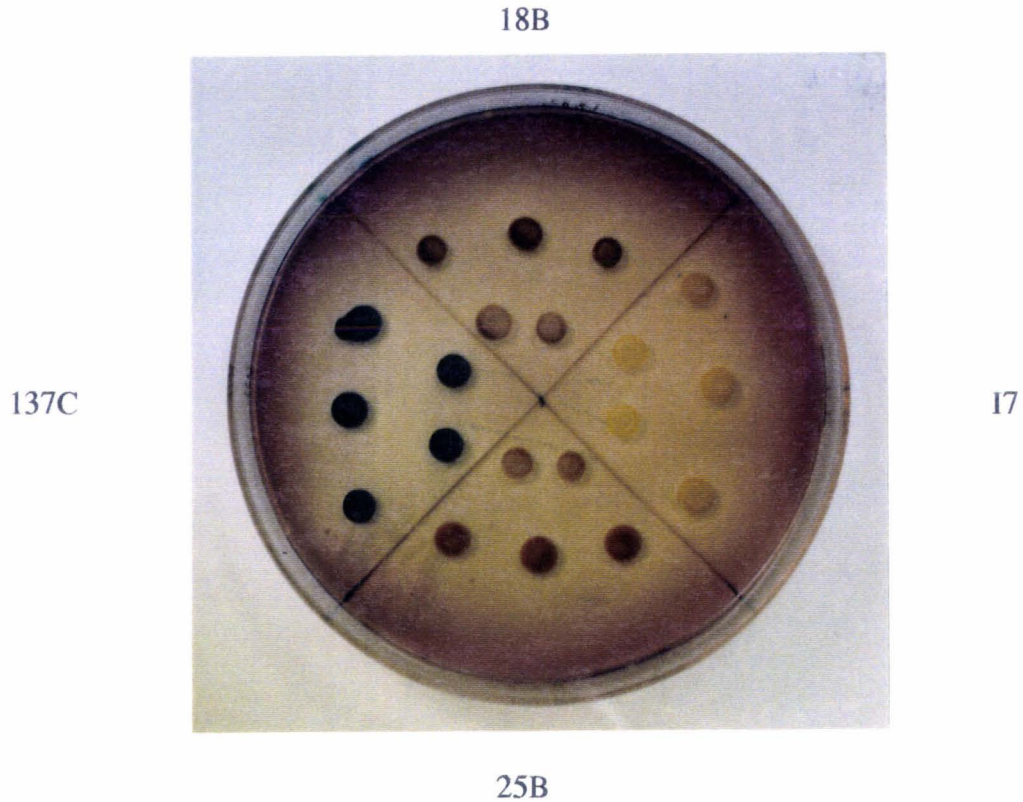
*Des mutants de l'algue unicellulaire  
Chlamydomonas reinhardtii défectueux pour  
l'amidon synthétase liée au grain sont  
dépourvus d'amylose et accumulent  
une amylopectine modifiée*

## **I. MUTAGENESE ET ISOLEMENT DE SOUCHES DEFECTUEUSES POUR LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON.**

Parmi les mutants disponibles au laboratoire (issus d'une mutagenèse aux rayons X), aucun à priori ne suggérait la présence d'un polysaccharide à structure modifiée. Ces souches avaient été initialement isolées comme contenant peu d'amidon et se caractérisent soit par le phénotype jaune (< à 5% de la quantité d'amidon accumulée par la souche sauvage), soit par un phénotype intermédiaire (décrit comme vert-olive) après coloration aux vapeurs d'iode. Espérant isoler de nouveaux mutants présentant uniquement une modification qualitative de l'amidon, nous avons donc entrepris une nouvelle mutagenèse.

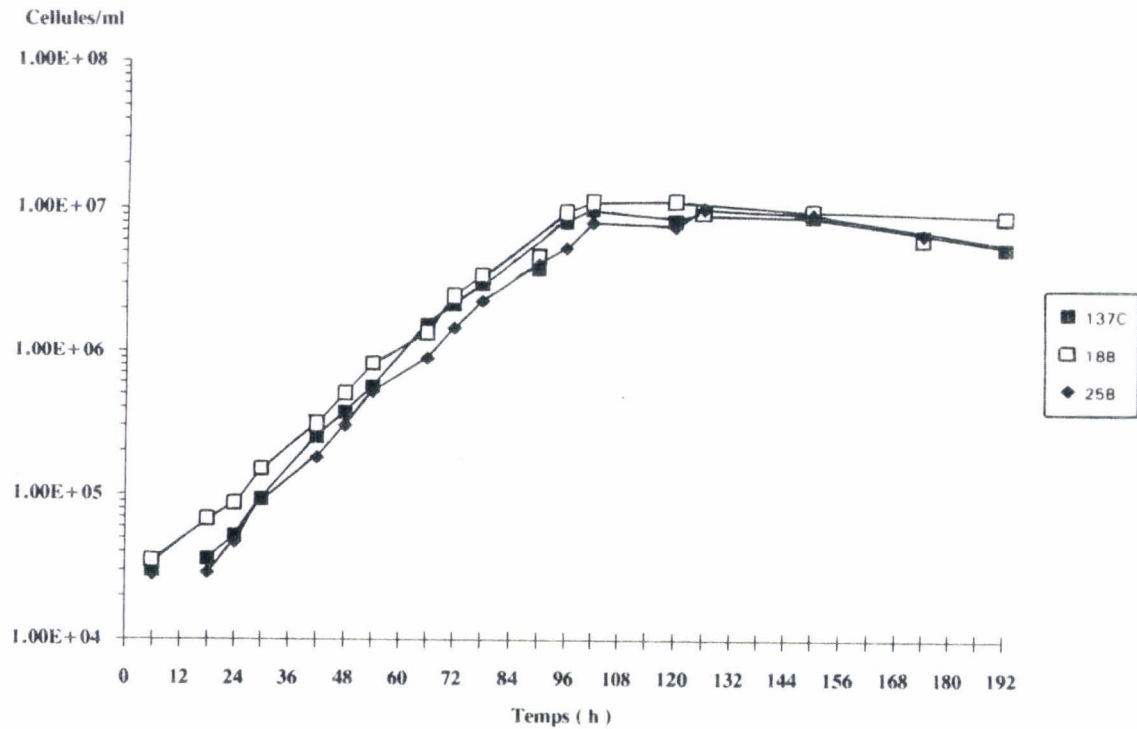
Près de 4 000 clones ont été criblés après mutagenèse U.V. de la souche sauvage 137C. Parmi les 6 mutants sélectionnés, deux sont rouges après coloration (voir photo n°1). Une modification quantitative du polysaccharide se traduisant par une couleur grise, une coloration rouge aussi intense de ces colonies semblait refléter une modification structurale manifeste du polysaccharide accumulé. Notons qu'aucun clone n'a été révélé pour sa couleur vert-olive lors de cette mutagenèse aux U.V.

Nous nous sommes plus spécialement intéressés à ces deux mutants rouges appelés 18B et 25B. Nous avons vérifié que ce phénotype restait stable et net après plusieurs épuisements. Les courbes de croissance des souches montrent que les mutations portées par 18B et 25B n'altèrent pas la croissance des mutants par rapport à la souche sauvage (voir figure 15). Le temps de doublement calculé dans ce cas est de 12 heures pour les trois souches.



**Photo 1** : Phénotype des souches 18B, 25B après coloration directe des colonies sur boîte de Pétri par des vapeurs d'iode.

137C : souche sauvage. I7 : souche accumulant moins de 5% d'amidon comparativement au sauvage.



**Fig.15** : Courbes de croissance des souches 18B, 25B et 137C en mixotrophie.

## II. CARACTERISATIONS GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES 18B ET 25B : DEFINITION DU LOCUS ST-2.

Les souches 18B et 25B ont été croisées avec la souche sauvage 37. Les diploïdes obtenus ont été testés pour leur phénotype de coloration par les vapeurs d'iode, après 3 épaissements successifs sur milieu nitrate minimum. Tous les diploïdes présentent le phénotype de la souche sauvage. La complémentation par l'allèle sauvage prouve que les mutations portées par 18B et 25B sont récessives.

La ségrégation méiotique des mutations portées par 18B et 25B a été analysée sur des spores au hasard après croisement avec la souche sauvage (tableau 2). Les phénotypes de coloration par l'iode des descendants méiotiques sont très clairs (photo 2).

Caractère	Y <sup>a</sup>		Nitrate		Ac		PAB		Amidon	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
18B x 37	44	45	63	173	136	101	140	97	93	127
	50%	50%	27%	73%	57%	43%	59%	41%	42%	58%
25B x 37	137	147	67	216	171	113	176	106	113	140
	48%	52%	24%	76%	60%	40%	62%	38%	45%	55%

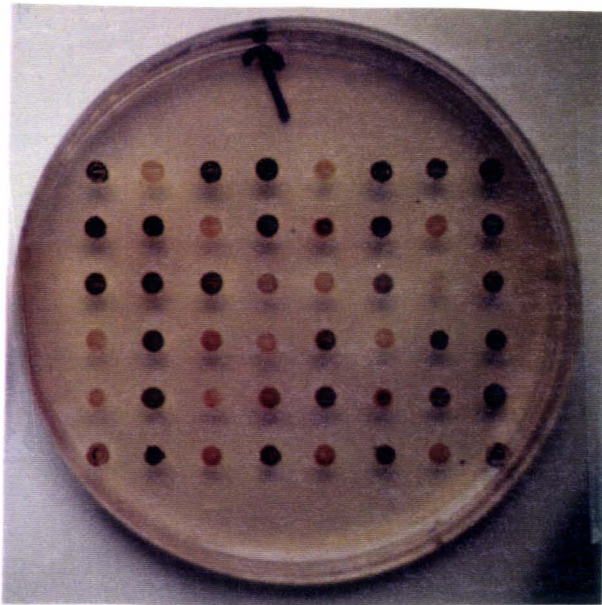
**Tab.2 : Ségrégation méiotique des caractères portés par les souches 18B et 25B.**

a : le nombre de colonies testées pour le croisement 18Bx37 est nettement inférieur et tient à l'observation prématurée des boîtes.

La ségrégation mendélienne des caractères prouve que les mutations portées par les souches 18B et 25B affectent un gène nucléaire et qu'elles sont monogéniques. On peut noter pour les deux croisements une surreprésentation des génotypes parentaux mutés (18B, 25B), certainement due à une élimination partielle de cellules parentales n'ayant pas fusionné, hypothèse confirmée par l'étude de la recombinaison des marqueurs PAB et Ac. En effet, les gènes *pab-2* et *ac-14* sont portés par le même chromosome et sont distants



d'environ 14 unités génome. Or, les pourcentages de recombinaisons de ces caractères sont de 18% (18B x 37) et 19% (25B x 37), au lieu de 14%. Les légères déviations observées par rapport aux proportions attendues pour les marqueurs tiennent à la technique utilisée. Une analyse sur tétrades ordonnées ne donnerait pas ce genre de déviations mais se révèle techniquement plus délicate.



**Photo 2 :** Phénotypes de coloration à l'iode des descendants méiotiques issus du croisement de 18B avec la souche sauvage.

Ces croisements nous ont permis de sélectionner deux descendants méiotiques appelés B4 (descendant du croisement 25B x 37) et B20 (descendant du croisement 18B x 37). Ces souches ont été choisies pour leurs polarités sexuelles opposées et leurs marqueurs trophiques complémentaires à ceux des souches mères (rappelons que les diploïdes sont sélectionnés par complémentarité des génotypes parentaux et que le milieu utilisé ne permet pas la croissance des souches haploïdes que nous utilisons) et parce qu'elles sont porteuses, en ce qui concerne le métabolisme de l'amidon, des mêmes mutations que 18B et 25B. Elles

nous ont permis de réaliser un test de complémentation entre deux souches porteuses des mutations de 18B et 25B. Les diploïdes obtenus se sont révélés rouges après coloration aux vapeurs d'iode, ce qui nous permet de conclure que les mutants 18B et 25B appartiennent au même groupe de complémentation. Une analyse des descendants méiotiques du même croisement a permis d'observer l'absence de recombinant de phénotype sauvage (i-e noir après coloration) sur 204 produits de méiose testés.

**18B et 25B sont donc deux allèles d'un même gène baptisé *ST-2*.** Nous excluons la possibilité qu'il s'agisse d'un seul et même allèle puisque les deux clones proviennent de boîte de mutagenèse différentes. Ainsi, les génotypes des quatre souches que nous avons utilisées se définissent comme suit :

18B :  $mt^- nit-1 nit-2 st-2-1$   
 B20 :  $mt^+ pab-2 ac-14 st-2-1$   
 25B :  $mt^- nit-1 nit-2 st-2-2$   
 B4 :  $mt^+ pab-2 ac-14 st-2-2$

Un dosage de l'amidon accumulé par 18B et 25B en conditions de carence en azote nous a révélé que les deux mutants accumulent la même quantité de polysaccharide que la souche sauvage (voir tableau 3).

SOUCHE	$\mu\text{g}$ d'amidon / $10^6$ cellules	moyenne
137C	24 à 37	$30.25 \pm 4.6$
18B	24 à 38	$32.5 \pm 5.2$
25B	26 à 40	$31.1 \pm 5.3$

**Tab.3 : Quantités d'amidon accumulées en mixotrophie en milieu carencé en azote.** (les valeurs sont issues de 4 expériences).

Les quantités d'amidon accumulées sont très sujettes à des variations en raison des modifications des paramètres de culture. Toutefois, pour une même expérience, les quantités de polysaccharide synthétisé sont similaires chez les trois souches (18B, 25B et 137C).

Le phénotype des mutants 18B et 25B lors de la coloration aux vapeurs d'iode étant manifestement différent de celui de la souche sauvage, le fait qu'aucune modification quantitative du polysaccharide n'apparaisse a renforcé l'idée que 18B et 25B sont des mutants de la structure de l'amidon.

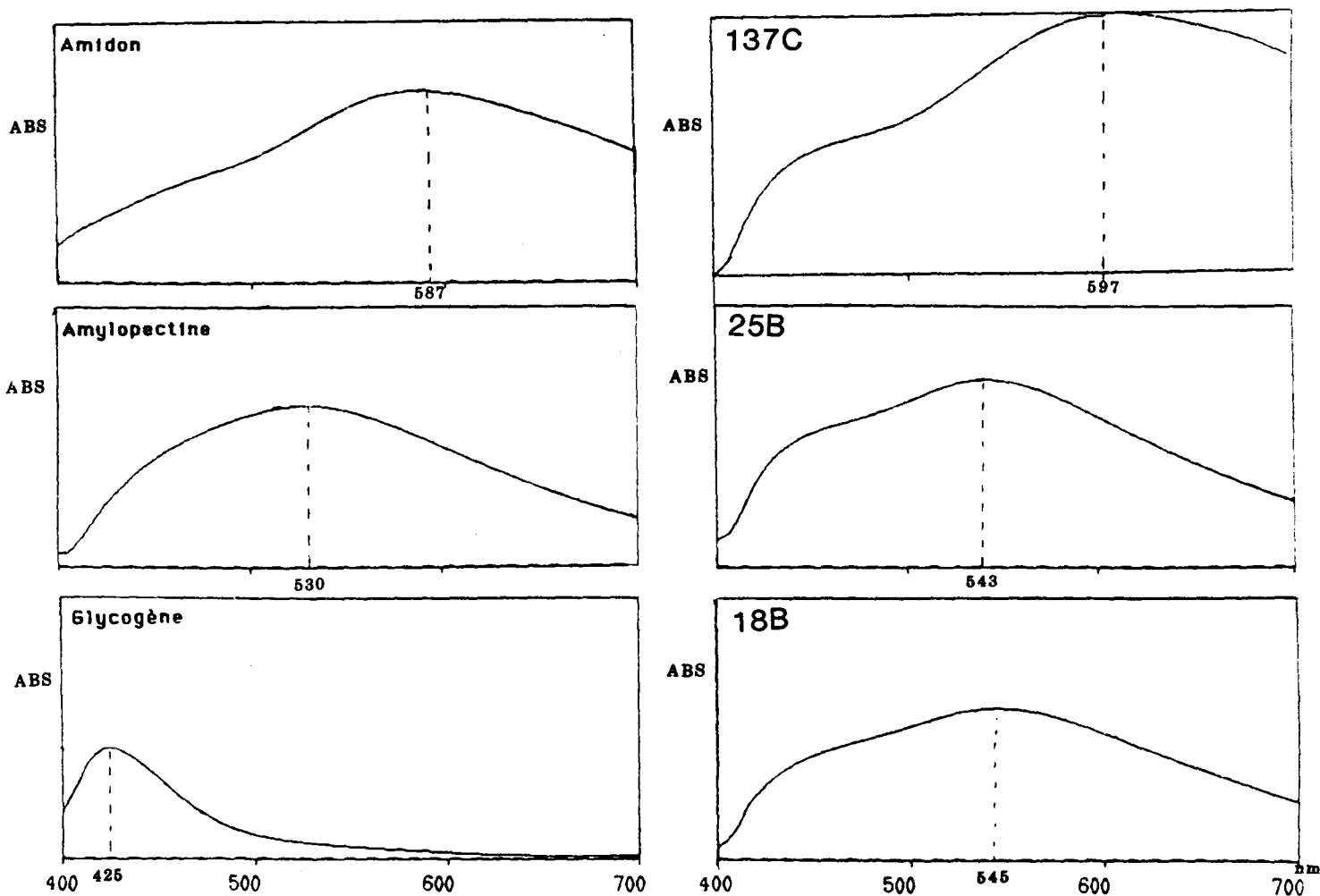
### **III. CARACTERISATION STRUCTURALE DES AMIDONS DES SOUCHES HAPLOIDES ET DIPLOIDES SAUVAGES ALTERÉES AU LOCUS *ST-2*.**

#### **III.A. Spectrophotométrie à l'iode.**

L'examen du spectre dans le visible du complexe polysaccharide-iode en solution reste une technique rapide, simple et informative sur les altérations structurales subies par l'amidon.

L'application de cette technique à nos souches nous montre que le spectre de l'amidon de la souche sauvage de *C.reinhardtii* est similaire à celui de l'amidon de maïs (voir figure 16). Par contre, le  $\lambda_{\max}$  caractéristique du polysaccharide accumulé par nos deux mutants est proche de celui de l'amylopectine de référence. Rappelons (voir chapitre III.E.3) que le déplacement vers les courtes longueurs d'onde du  $\lambda_{\max}$  signifie un enrichissement relatif de l'amidon en glucanes de longueurs intermédiaires (dp 12 à 50) et un appauvrissement prononcé en longs glucanes (dp > 50) et, par voie de conséquence, en amylose.





**Fig.16 :** Caractérisation de l'amidon par spectrophotométrie à l'iode. (Témoins : amidon de riz, amylose de pomme de terre, glycogène de foie de lapin. L'amylose est solubilisé dans le NaOH 0.1N, 1min à 100°C)

### **III.B. Chromatographie de tamisage moléculaire.**

La révélation d'une modification qualitative de l'amidon de nos mutants nous a poussée à aller plus loin dans la caractérisation structurale du polysaccharide accumulé. Nous avons alors envisagé la séparation de l'amylose et de l'amylopectine par tamisage moléculaire par fractionnement sur matrice de gel filtration Sepharose CL2B et TSK HW75.

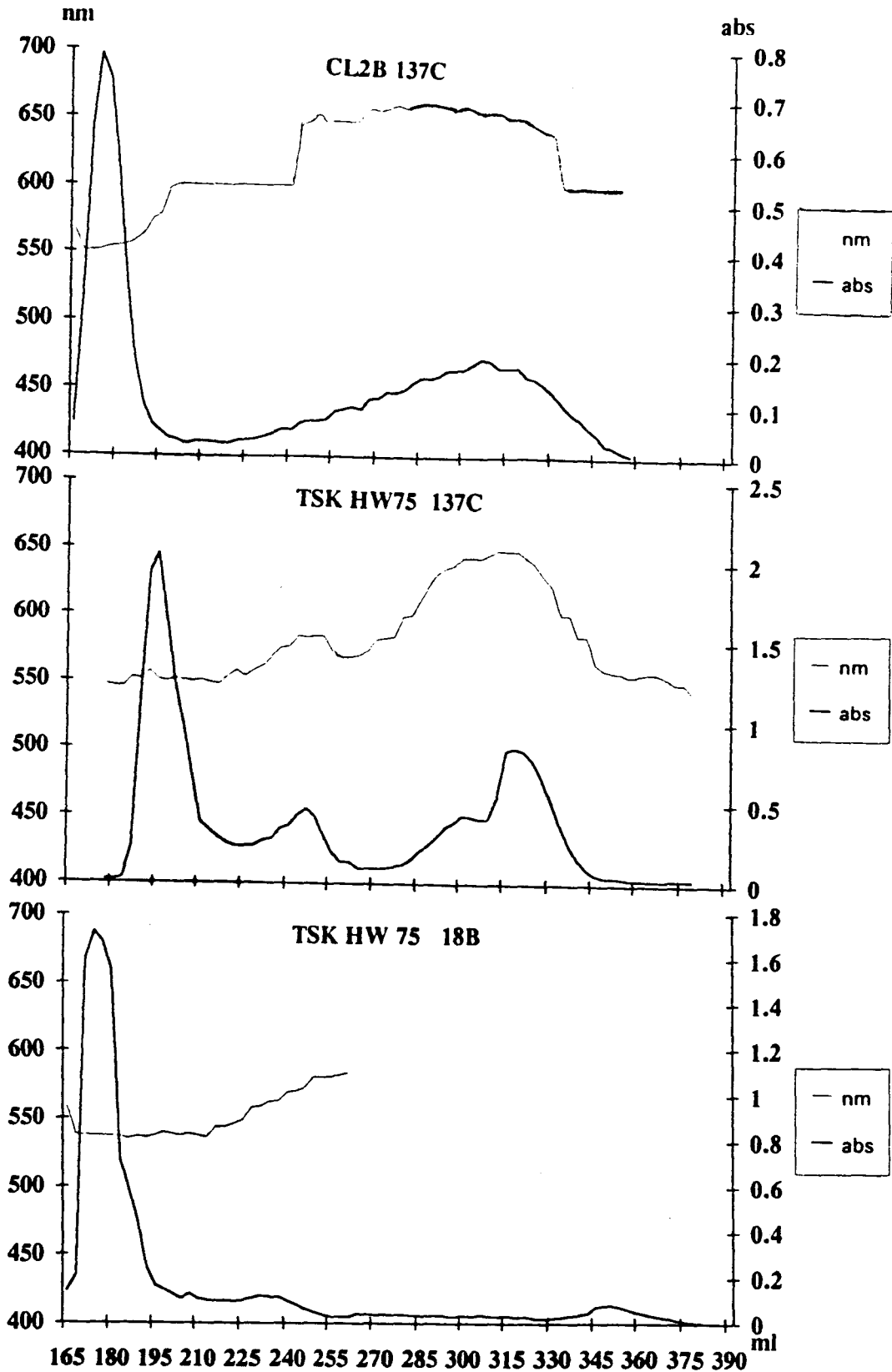
Les résultats obtenus par chromatographie sur Sépharose CL2B, appliquée à

l'amidon de la souche sauvage 137C, sont similaires à ceux qui ont été publiés jusqu'à présent (figure 17). Les longueurs d'onde du maximum d'absorption spécifiques de chaque population observée nous prouvent la séparation de l'amylose et de l'amylopectine. L'amylopectine est éluée en un pic unique peu homogène dont les  $\lambda_{\max}$  sont très dispersés. La résolution semble meilleure en ce qui concerne l'amylose. L'utilisation d'une autre matrice, la matrice TSK HW75, nous donne des résultats similaires avec cependant une différence majeure. Si l'amylose est élué en un pic relativement moins dispersé qu'avec la matrice de Sépharose CL2B, la TSK HW75 permet la séparation de l'amylopectine en deux pics relativement homogènes.

Ces deux polysaccharides ont des tailles mais surtout, comme nous le verrons par la suite, des propriétés structurales différentes (différence se traduisant en première approximation par des  $\lambda_{\max}$  de 555 et 580 nm respectivement). **L'amylopectine est donc composée de deux sous-fractions et n'est pas homogène comme on pouvait le penser jusqu'à présent.** Cette résolution plus fine des sous-structures de l'amidon nous a convaincue d'utiliser cette matrice pour la caractérisation structurale de l'amidon de nos mutants.

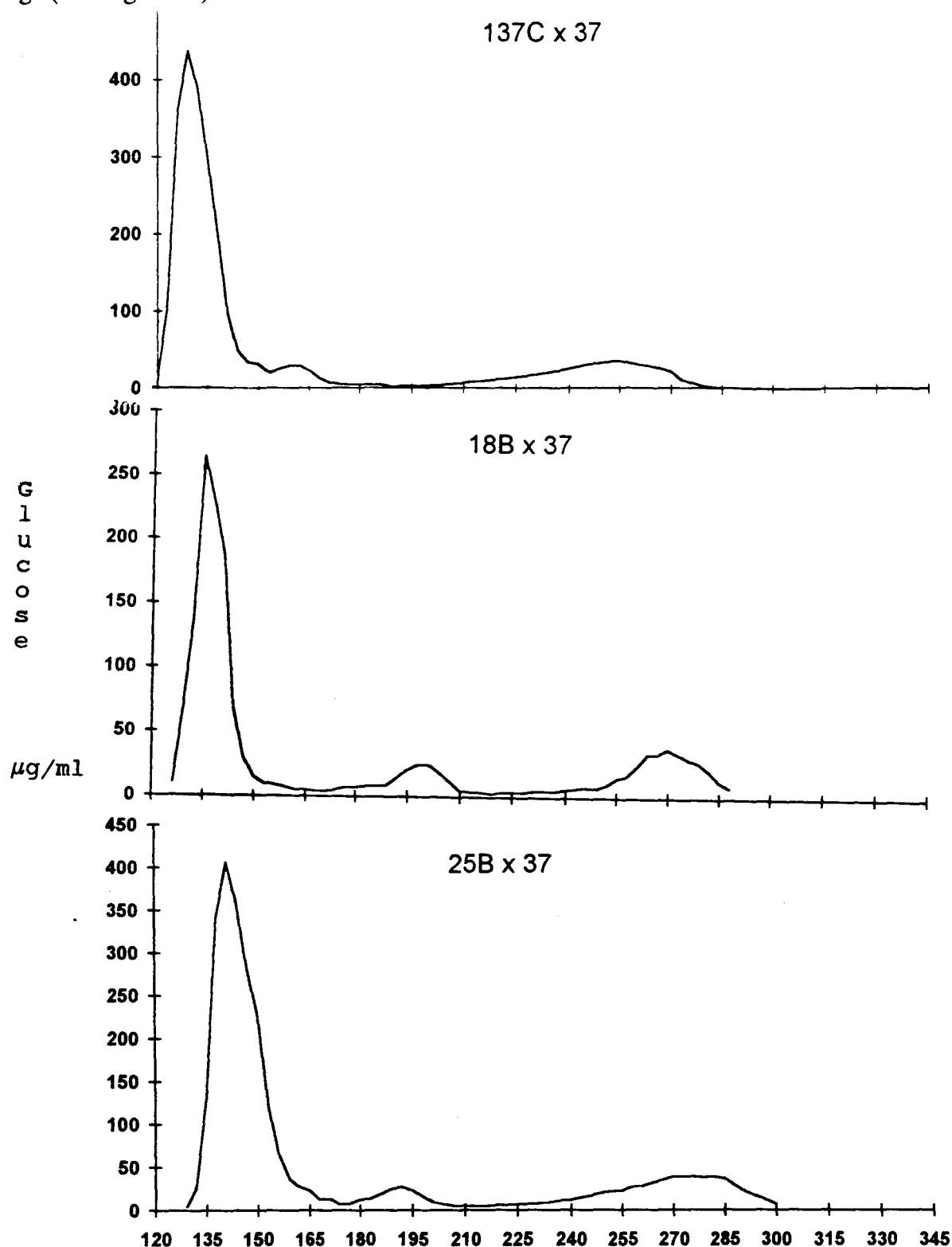
Les profils des souches 18B et 25B sont superposables. Leur analyse nous révèle, comme nous l'attendions, la disparition presque totale de la fraction amylose (1 à 4% du glucose total est contenu dans cette fraction). Cette situation est tout-à fait conforme à celle du mutant *waxy* du maïs et ne fait que conforter l'idée que ces mutants en sont des analogues chez *Chlamydomonas*. Par contre, la disparition du pic II de la fraction de haut poids moléculaire chez ces deux mêmes souches était totalement inattendue et ne correspond à rien de ce qui a été décrit jusqu'à présent. Un dosage du glucose des différentes fractions prouve que l'entièreté de l'amidon déposé est retrouvé dans l'unique pic élué.

**Ainsi, le locus *ST-2* conditionne non seulement la synthèse de l'amylose mais aussi d'une sous-fraction distincte de haut poids moléculaire présente dans le grain d'amidon.**



**Fig.17 : Chromatographie de tamisage moléculaire de l'amidon.** Le trait fin représente la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe polysaccharide-iode de chaque fraction collectée, le trait plus épais la densité optique de ce maximum. L'amylose ( $\lambda_{max} > 610\text{nm}$ ) contient environ 35% du glucose total et est dispersé sur 120ml (la matrice CL2B) ou sur 75ml (matrice TSK HW75). Le matériel dont le  $\lambda_{max}$  est compris entre 590 et 600nm est nommé matériel intermédiaire. Le chromatogramme de 25B (non représenté) est superposable à celui de 18B.

Le tamisage moléculaire sur matrice TSK HW75 a été réalisé sur l'amidon purifié de diploïdes homozygote et hétérozygotes pour la mutation *st-2* et d'un diploïde homozygote sauvage (voir figure 18).



**Fig.18 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur TSK HW75 de l'amidon du diploïde homozygote sauvage et des diploïdes hétérozygotes (*st-2-1/+* et *st-2-2/+*). (Les taux de glucose sont mesurés dans chaque fraction de 3ml. Les chromatogrammes ont été réalisés sur le même type de colonne que ceux présentés dans la figure 17)**

Le profil d'élution de l'amidon du diploïde homozygote sauvage (137C x 37) est très légèrement différent de celui de l'amidon extrait des souches haploïdes. La fraction amylose est relativement moins importante, résultat corrélé par le dosage du glucose contenu dans les différentes fractions. Quant au pic II, il est représenté par ce que nous avons nommé initialement matériel intermédiaire : sa taille est plus petite que le polysaccharide de type II retrouvé chez les haploïdes et son  $\lambda_{\max}$  se situe entre les valeurs caractéristiques du pic I et de l'amylose. Ce pic est lui aussi moins important que le pic II des haploïdes. Il semble donc que l'existence du pic II et de l'amylose soient liés dans tous les cas et qu'une modification de l'un soit toujours accompagnée d'une modification de l'autre. Le changement de position du pic II, significatif d'une taille plus petite, est ainsi corrélé à un taux d'amylose moindre.

Les amidons extraits des diploïdes hétérozygotes pour la mutation *st-2* montrent un profil d'élution sur TSK HW75 tout à fait comparable au diploïde homozygote sauvage. **L'absence de différence notable prouve la dominance totale de l'allèle sauvage sur l'allèle muté au niveau de la structure fine du polysaccharide accumulé** et confirme les résultats de complémentation, d'appréciation plus arbitraire, visualisés sur boîte de Pétri.

Les diploïdes homozygotes mutés montrent par contre un profil d'élution indistinct de la souche haploïde mutée, et ce, quelque soit la construction utilisée (18B x B4, 25B x B4, 18B x B20, 25B x B20) (profils non représentés).

### **III.C. Structure fine de l'amidon.**

Afin de pouvoir les comparer correctement, nous avons réalisé une méthylation de l'amidon et de ses sous-fractions en collaboration avec Françoise Routier et Thierry Fontaine (laboratoire du Prof. Fournet). Cette analyse permet une quantification du nombre de points de branchement dans le polysaccharide et une comparaison de valeurs chiffrées (pour un exposé du principe, voir le matériel et méthodes).

Les valeurs obtenues pour l'amidon brut de 18B et 25B ainsi que de la souche

sauvage confirment l'idée d'une structure très branchée du polysaccharide des mutants (1 point de branchement pour 20 et 30 résidus en moyenne pour 18B et 25B respectivement, contre 1 pour 50 chez la souche sauvage) (voir tableau 4).

Souche	$\lambda_{\max}$	2,3-Glc	2,3,6-Glc	2,3,4,6-Glc
137C	590	1	31	0.6
18B	550	1	19	0.9
25B	550	1	21	0.7

**Tab.4 : Rapports des éthers méthyliques obtenus après méthylation.**

2,3-Glc : 2,3 di-O-méthyl 1,4,5,6 tétra-O-acétyl glucitol  
 2,3,6-Glc : 2,3,6 tri-O-méthyl 1,4,5 tri-O-acétyl glucitol  
 2,3,4,6-Glc : 2,3,4,6 tétra-O-méthyl 1,5 di-O-acétyl glucitol  
 La valeur du 2,3-Glc est amené arbitrairement à 1.

Les résultats de la méthylation des produits séparés par gel filtration sur matrice de TSK HW75 sont présentés dans le tableau 5. L'amylose possède un taux de branchement plus élevé que les valeurs publiées jusqu'à présent. Mais il faut savoir que les techniques d'estimation utilisées sont totalement différentes et que ces résultats ne sont donc pas incompatibles. Nous discuterons de ce point ultérieurement.

Souche	Q	$\lambda_{\max}$	2,3-Glc	2,3,6-Glc	2,3,4,6-Glc
137C I <sup>a</sup>	35	555	1	21	0.9
137C II <sup>a</sup>	21	580	1	19	0.8
137C Am	39	620	1	60	0.8
18B	>95	540	1	16	0.9
25B	>95	540	1	15	0.8

**Tab.5 : Méthylation des sous-fractions obtenues après TSK HW75.**

Am: amylose.

Q : taux de glucose (pourcentage en poids).

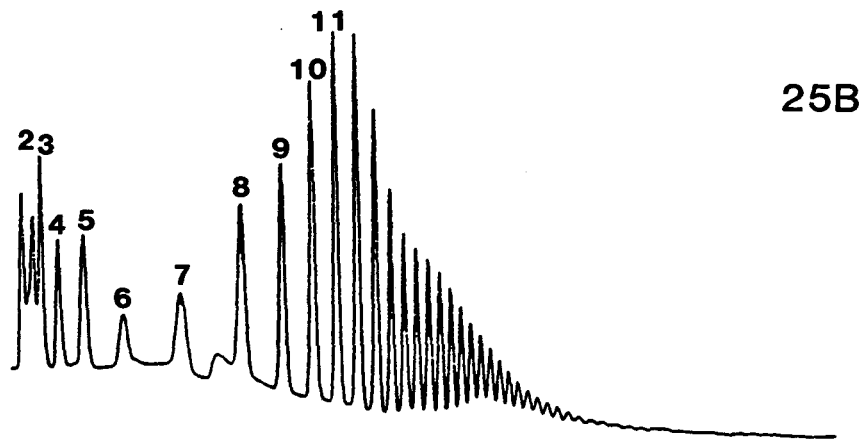
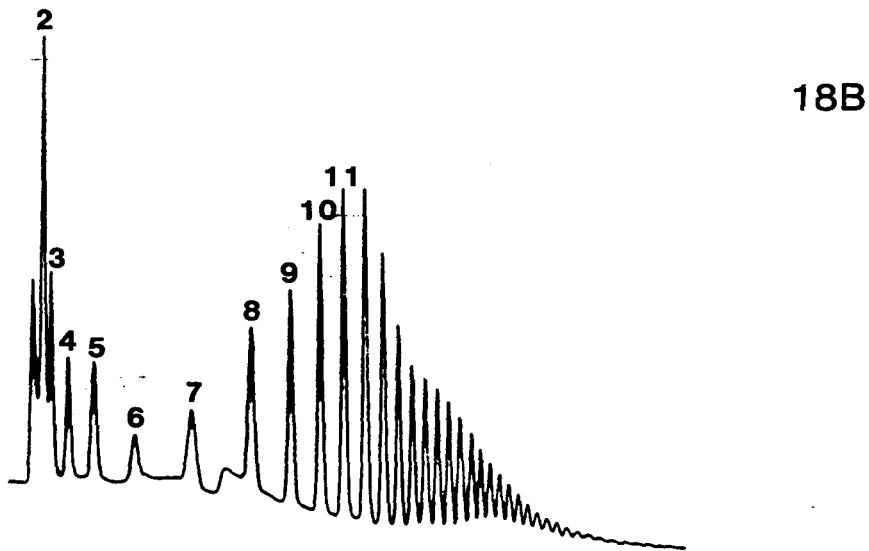
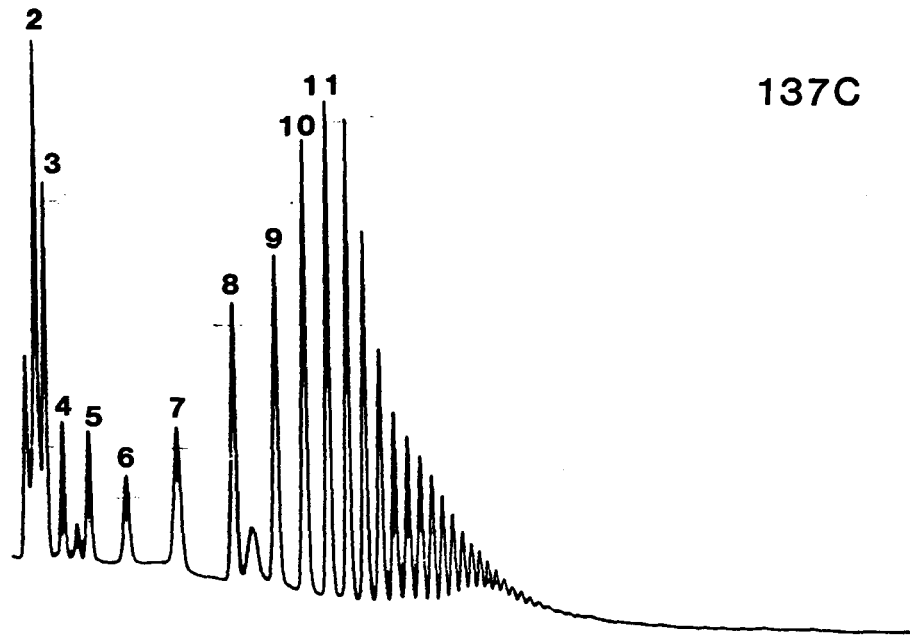
a : I et II représentent les deux fractions de haut poids moléculaire de l'amidon de 137C. (pour la nomenclature des éthers méthyliques, se référer au tableau 4).

La comparaison des résultats de méthylation des pics I et II de l'amidon de 137C est par contre tout-à fait surprenante. Les  $\lambda_{\max}$  caractéristiques de ces deux fractions, 555 et 580 nm respectivement, nous avaient amenée à conclure la présence d'une fraction amylopectine (pic I) et d'une fraction intermédiaire (pic II). Mais leurs poids moléculaires élevés étaient plutôt compatibles avec l'existence de deux types d'amylopectine. Or, les valeurs de méthylation de ces deux sous-fractions sont similaires, signifiant un taux de branchement moyen identique. Ces deux populations constituent donc de l'amylopectine. Toutefois, leurs  $\lambda_{\max}$  respectifs de combinaison à l'iode ne s'expliquent que par une distribution de longueur de chaînes radicalement différente. L'explication la plus simple serait un allongement entre deux points de branchement de certaines chaînes de l'amylopectine de type II (appelées chaînes internes) jusqu'à une valeur proche de 70 résidus de glucose liés en  $\alpha$ -1,4 uniquement, allongement accompagné du raccourcissement d'autres chaînes (rappelons que les chaînes dont le d.p. est inférieur à 12 ne lient pas l'iode et ne contribuent donc pas à la coloration), le taux de branchement moyen global restant identique.

Les deux mutants 18B et 25B possèdent une amylopectine similaire à celle du pic I de l'amylopectine sauvage, avec toutefois un taux de branchement légèrement plus important, qui se répercute par un  $\lambda_{\max}$  un peu plus court.

### **III.D. Débranchement enzymatique.**

Si la méthylation offre de précieux renseignements quant à la structure globale d'un polysaccharide, elle ne donne aucune idée de la distribution des longueurs des chaînes. Nous venons d'évoquer le cas de polysaccharides ayant le même taux de branchement moyen mais des distributions de chaînes différentes se traduisant par un  $\lambda_{\max}$  de combinaison à l'iode modifié. Il est donc légitime de penser que la diminution de  $\lambda_{\max}$  (15 nm) observée pour le pic I de l'amylopectine de 18B et 25B s'explique par une modification de la distribution de la longueur moyenne des chaînes. Un débranchement enzymatique a



**Fig.19 : Chromatographie d'échange d'anions à haut pH des chaînes courtes de l'amylopectine.** Les glucanes différant d'un seul résidu de glucose sont clairement séparés jusqu'à un d.p. de 25 (ces d.p. sont indiqués au dessus de chaque pic). La hauteur des pics est proportionnelle au nombre de molécules détectées et non au taux de glucose qu'elles contiennent.



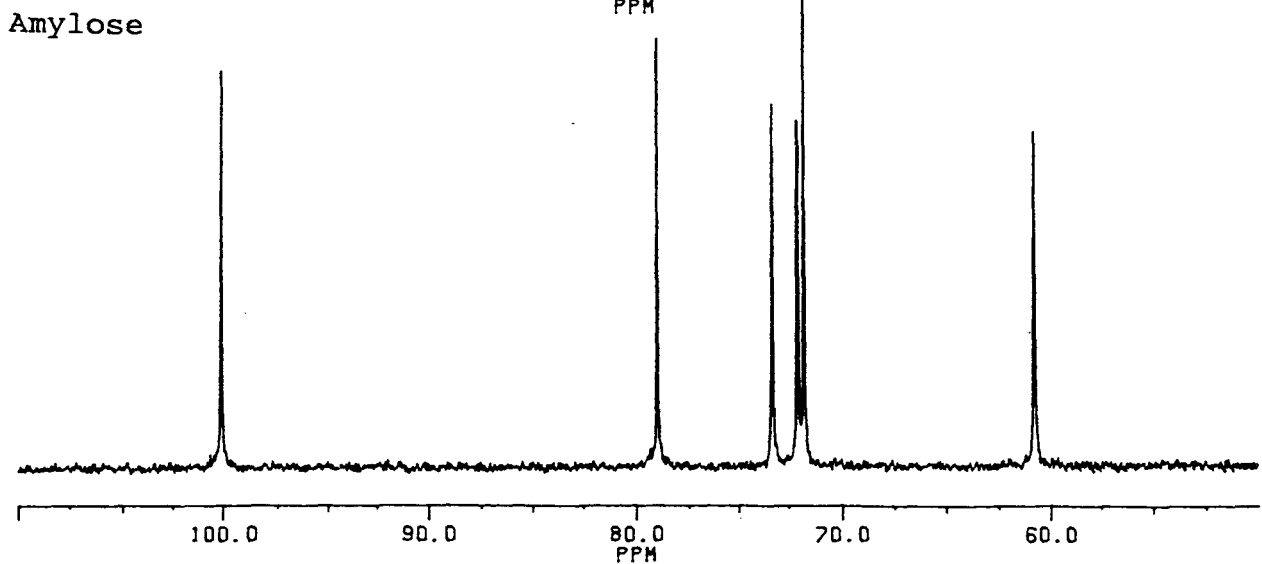
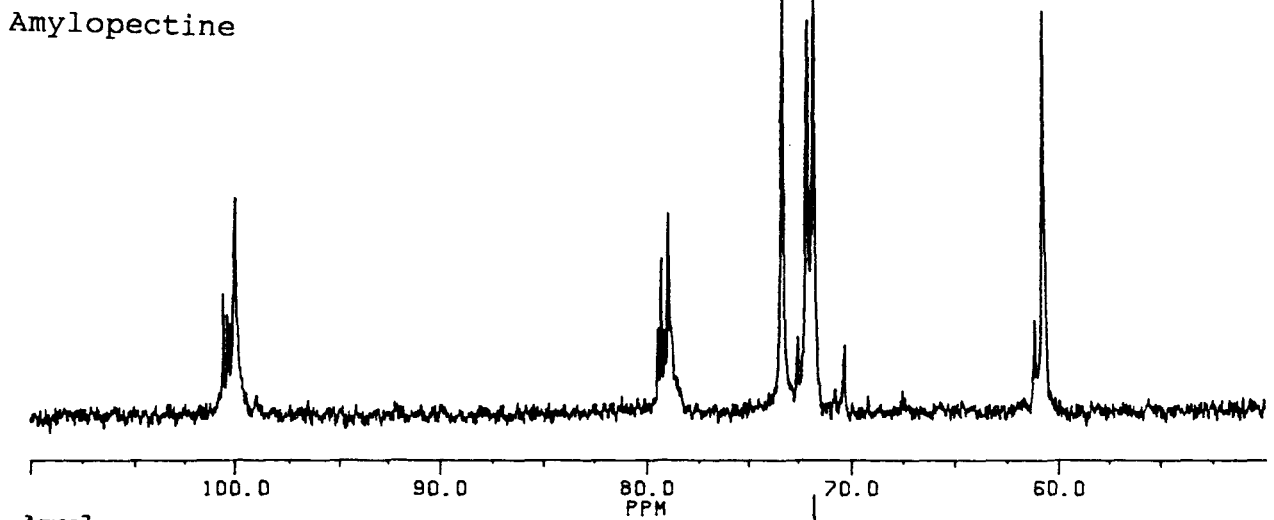
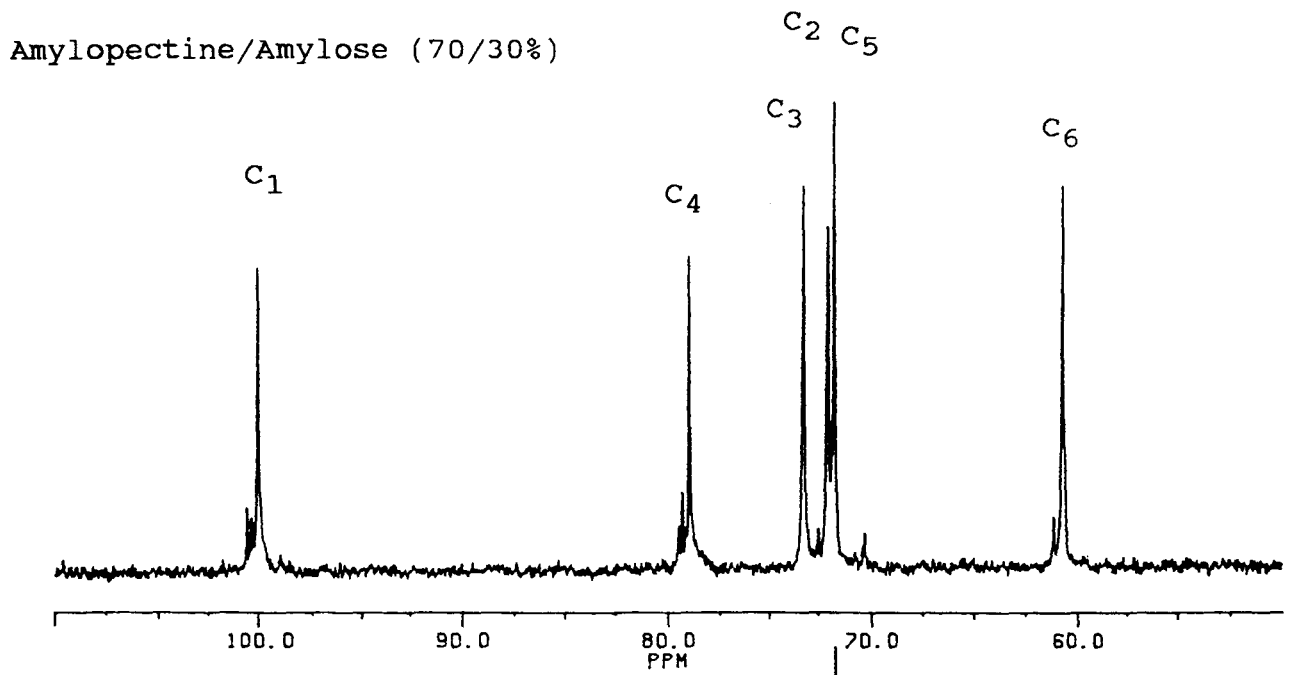
donc été réalisé par F.Routier et T.Fontaine (Laboratoire du Prof. Fournet) grâce à une enzyme spécifique des liaisons  $\alpha$ -1,6, à savoir l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*.

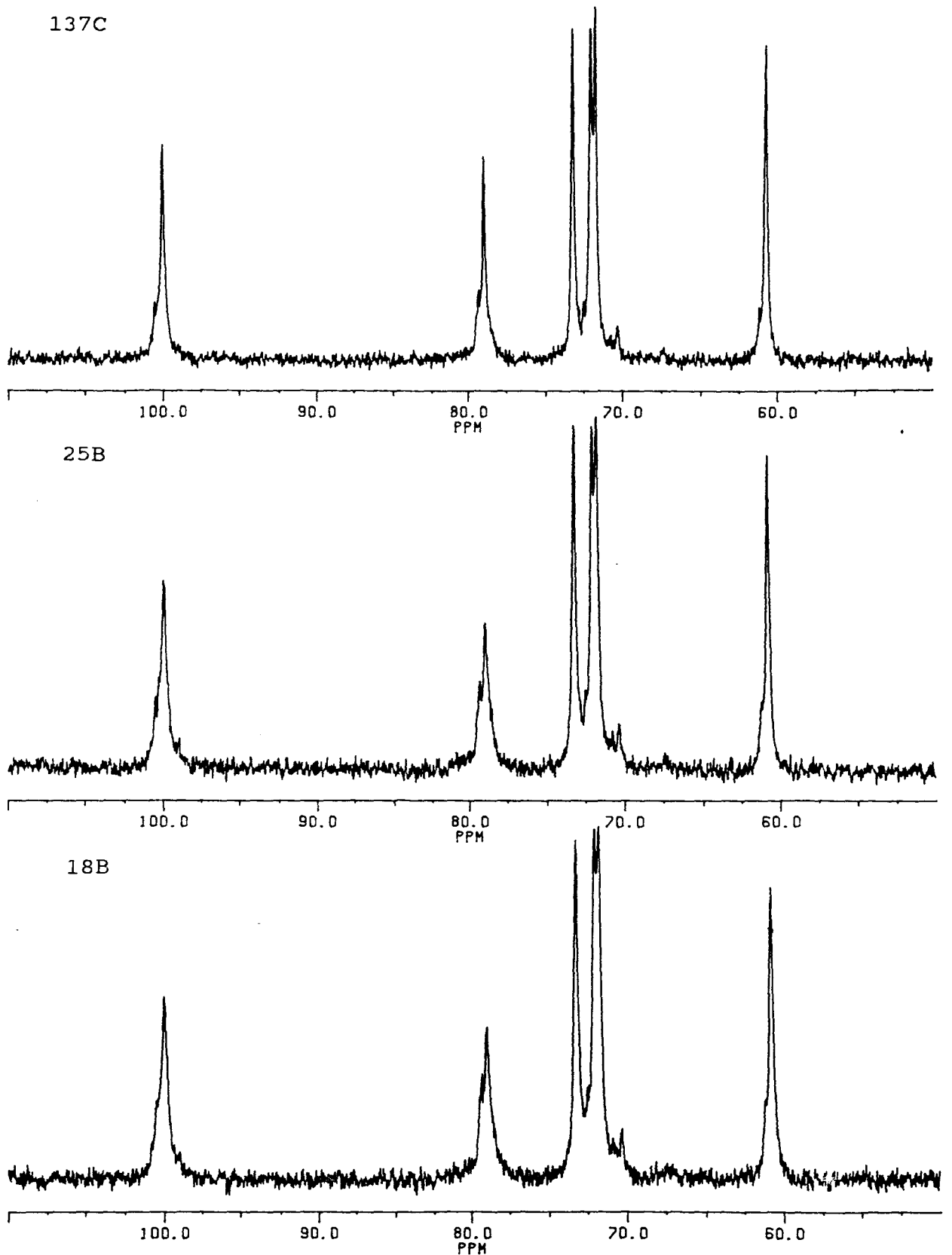
L'enzyme utilisée est incapable de débrancher des chaînes de d.p. inférieur à 2. D'autre part, la technique de détection employée ne permet la caractérisation que des chaînes courtes (d.p. 2 à 25). Mais dans le cas qui nous intéresse, la diminution du  $\lambda_{\max}$  observée ne pourrait s'expliquer que par un raccourcissement de certaines chaînes et pourrait être mis en évidence par cette technique.

La technique utilisée permet la séparation très nette de courtes chaînes ne différant que par un résidu de glucose (figure 19). La distribution globale des chaînes courtes des amylopectines extraites de 18B et 25B est identique à la distribution de ces mêmes chaînes chez le sauvage. L'augmentation du taux de branchement observée pourrait donc être due à de très courtes chaînes non clivées par l'isoamylase. L'explication la plus probable est un raccourcissement des chaînes moyennes ou longues (qui ne sont pas détectées par cette technique), puisque les chaînes de d.p. inférieur à 3 ne lient pas l'iode et auraient une contribution nulle dans le  $\lambda_{\max}$  considéré. Une simple modification de très courtes chaînes ne pourrait donc justifier le décalage de 15 nm observé. Ces expériences ont néanmoins le mérite de montrer que l'amylopectine de *Chlamydomonas reinhardtii* se caractérise par une distribution de chaînes identique à celle décrite récemment pour les plantes supérieures.

### **III.E. La résonance magnétique nucléaire du $^{13}\text{C}$ .**

Tous les résultats obtenus en méthylation ont été confirmés en analyse par RMN du carbone 13 (ces expériences ont été réalisées par J.M. Wieruszski, UMR n°111). Chaque pic peut être attribué à un carbone spécifique de la molécule de glucose. De manière générale, si tous les carbones homologues ont le même environnement, leur pic représentatif sera fin (voir figure 20 et comparer amylose et amylopectine).





**Fig.20** : Spectres de RMN du carbone 13 à 100 MHz et 80°C dans le  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  des amidons de 137C, 18B et 25B. Sur la page de gauche, des témoins commerciaux analysés dans les mêmes conditions. Le mélange amylopectine/amylose 70/30% correspond aux proportions de ces deux constituants dans l'amidon natif.

Le déplacement, l'élargissement et le dédoublement d'un pic reflètent la multiplicité du type d'environnement d'un carbone donné (l'apparition d'un point de branchement par exemple).

Les déplacements à 100.00, 78.9, 73.2, 71.9, 71.6 et 60.6 ppm peuvent être respectivement attribués aux carbones C-1, C-4, C-3, C-2, C-5 et C-6 d'un résidu de glucose lié en  $\alpha$ -1,4 (résidus de l'intérieur des chaînes) alors que les déplacements à 100.66, 75.25 et 61.09 sont caractéristiques des C-1, C-4 et C-6 des glucoses situés aux extrémités non réductrices des chaînes. Les déplacements observés à 100.52 et 79.24 ppm représentent les C-1 et C-4 des glucoses des points de branchement.

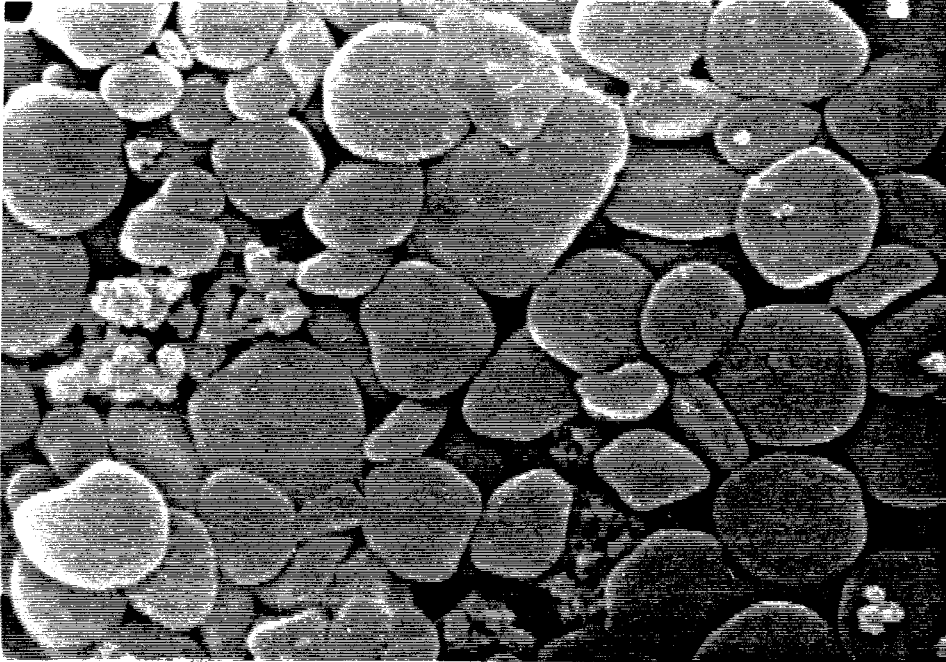
Le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  de l'amidon de la souche sauvage est identique à ceux qui ont été publiés pour l'amidon des plantes supérieures. Les mutants 18B et 25B présentent par contre des spectres essentiellement modifiés au niveau des carbones C-1, C-4 et C-6. L'élargissement des pics concernés traduit la diversité des carbones représentés et donc un taux de branchement supérieur de ces molécules (figure 20D, E et F).

### **III.F. La microscopie électronique.**

Une telle modification structurale de l'amidon chez les mutants 18B et 25B pourrait se traduire par une altération profonde de la morphogénèse du grain d'amidon. Afin d'examiner cette éventuelle répercussion, nous avons étudié l'aspect des grains d'amidon de nos mutants par microscopie électronique (expériences réalisées par l'équipe du Prof. Dhainaut de l'URA 148).

La microscopie électronique à balayage ne montre pas de différence significative entre les amidons extraits de nos deux mutants et la souche sauvage (photo 3). La mutation *st-2-1* n'empêche donc pas la formation d'un granule. D'autre part, la taille de celui-ci semble conforme à la taille des grains d'amidon extraits de la souche sauvage. Notons que cette analyse réalisée chez les plantes supérieures n'a jamais permis la mise en évidence de différence morphologique des grains d'amidon de mutants affectés dans la structure fine du grain, que ce soit des mutants waxy, sugary ou amylose-extender. Dans certains cas, seule

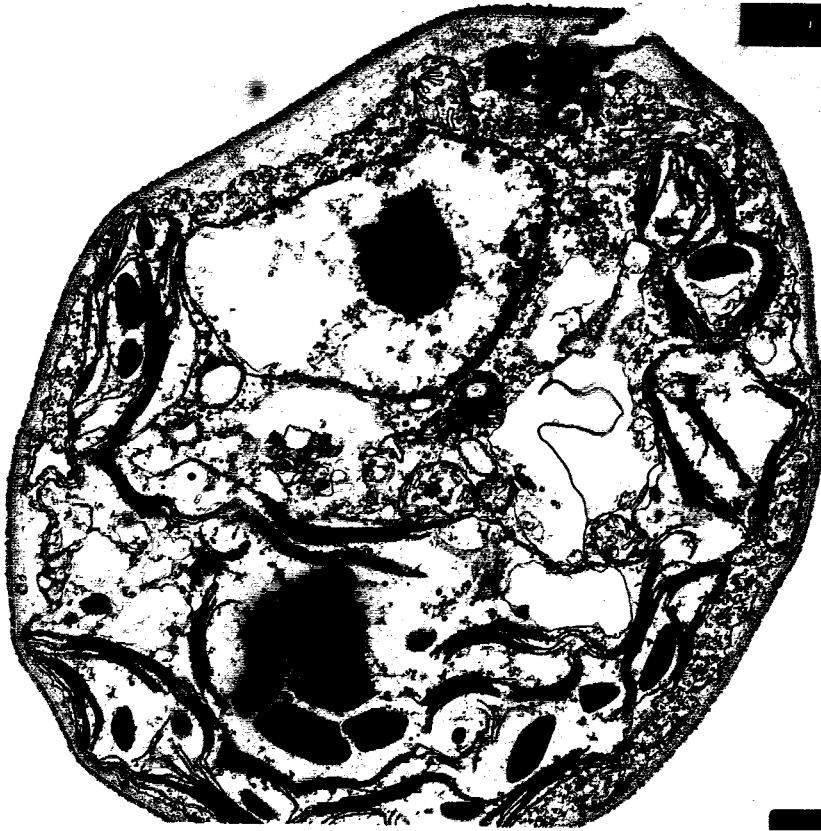
la distribution de la taille des granules est susceptible de varier.



**Photo 3 : Etude de la morphologie des grains d'amidon de 137C en microscopie électronique à balayage.**

Grossissement :  $1 \mu\text{m}$

La microscopie électronique à transmission de la souche sauvage cultivée en mixotrophie nous permet d'observer une répartition des grains d'amidon autour d'une grosse structure appelée pyrénôïde (le pyrénôïde est composé essentiellement de la RUBISCO ou ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase-oxygénase, enzyme responsable de la fixation du  $\text{CO}_2$  en 3PGA lors de la photosynthèse) (photo 4A). Cette disposition particulière n'est pas affectée chez 18B. Il est possible d'observer chez 18B un allongement des grains d'amidon situés autour du pyrénôïde, quoique les quelques grains dispersés dans le chloroplaste ne confirment pas cette particularité. Par contre, les grains d'amidon synthétisés par ce mutant montrent une différence très marquante (photo 4B).



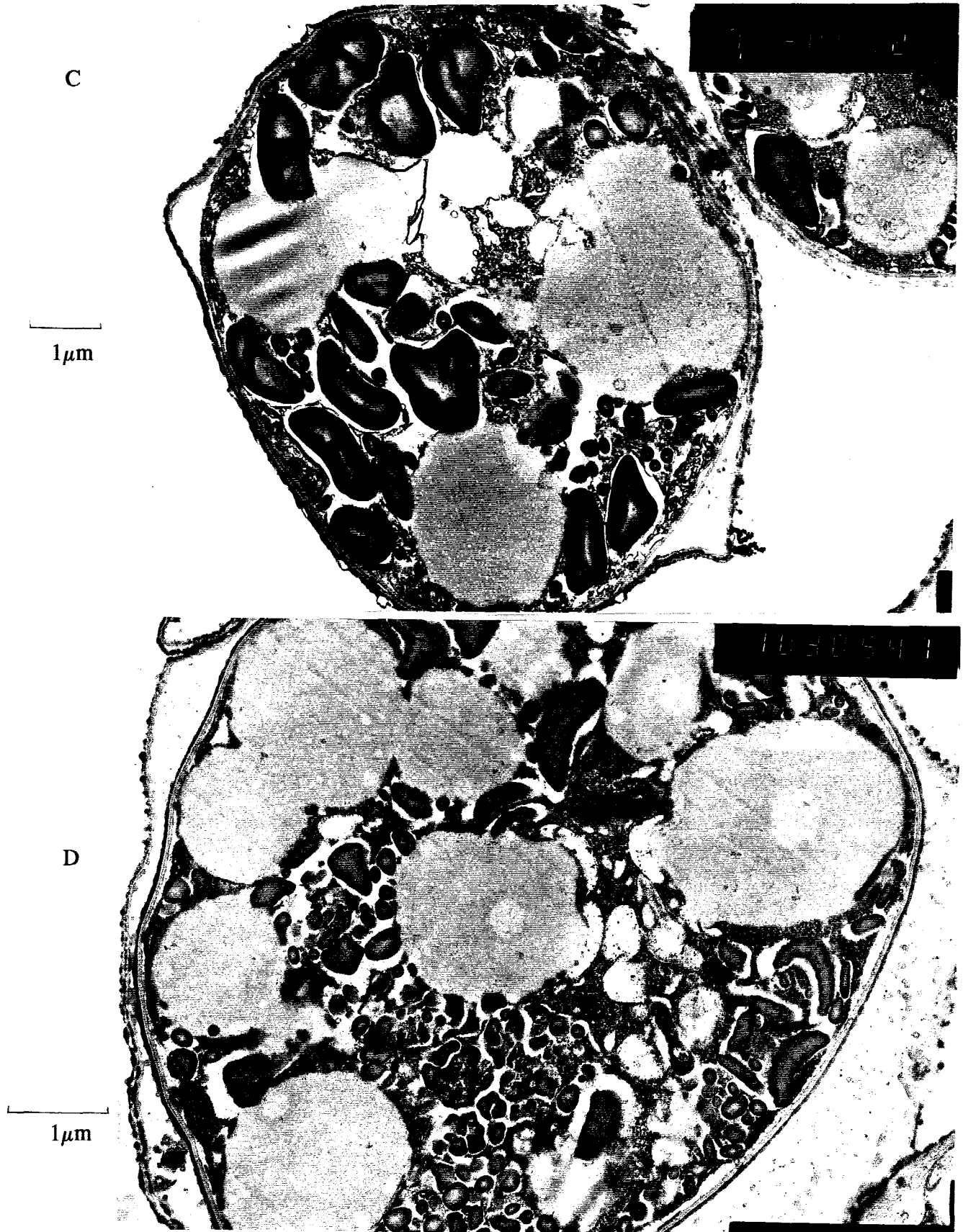
A

1  $\mu$ m



B

1  $\mu$ m



**Photo 4 :** Microscopie électronique à transmission des souches 18B et 137C.  
 A et B : représentent respectivement 137C et 18B après culture en mixotrophie.  
 C et D : idem après culture en milieu carencé en azote.

Leur contour apparait plus diffus et, surtout, leur couleur grisâtre traduit une densité nettement moindre aux électrons.

Après culture en milieu carencé, les micrographies électroniques nous montrent la disparition du pyrénoloïde et une augmentation du nombre de grains d'amidon ainsi que leur dispersion dans le chloroplaste. Ces phénomènes s'accompagnent de l'apparition de très nombreuses gouttelettes lipidiques qui, avec l'amidon, remplissent l'entièreté de la cellule (photo 4C).

Le mutant 18B montre toujours la même modification de la densité des grains (photo 4D).

#### **IV. LES SOUCHES PORTEUSES DE *st-2-1* ET *st-2-2* FONT PREUVE D'ALTERATIONS SPECIFIQUES DES ALLELES DE L'AMIDON SYNTHETASE LIEE AU GRAIN.**

##### **IV.A. Les souches porteuses de *st2-1* et *st-2-2* affichent une déféctuosité marquée de l'activité amidon synthétase liée au grain.**

Le phénotype de coloration à l'iode des mutants 18B et 25B, ainsi que la perte de fractions peu branchées du polysaccharide, notamment l'amylose, rapprochent ces souches du mutant waxy du maïs. Il était donc logique de penser qu'ils seraient porteurs de la même déféctuosité portant sur l'activité de l'amidon synthétase liée au grain d'amidon. Nous avons donc testé cette activité et mis en évidence une très nette altération de cette activité chez les deux mutants (25 à 30%). Soulignons que les autres activités testées (enzyme de branchement, enzyme de débranchement de type pullulanase, amidon synthétase soluble) n'ont pas révélé de différence significative.

Les paramètres cinétiques de l'amidon synthétase liée au grain de nos différentes souches sont décrits dans le tableau 6. Les  $K_M$  et  $V_{max}$  pour l'utilisation de l'ADP-Glc



expliquent les niveaux d'activité décrits précédemment. Le mutant 25B ne montre pas d'altération considérable de son affinité pour le substrat. Mais son phénotype s'explique par contre par une diminution d'un facteur 4 de la vitesse maximale de catalyse comparativement au sauvage. Le mutant 18B montre un changement considérable des deux paramètres cinétiques puisque la vitesse maximale de catalyse de l'amidon synthétase liée est ici aussi diminuée d'un facteur de 4, parallèlement à une diminution de son affinité pour l'ADP-Glc d'un facteur de 7. Cette fois encore, d'importantes différences des caractéristiques cinétiques sont corrélées à un même phénotype et à des structures polysaccharidiques similaires.

Souche	$K_M$ ADP-Glc	$V_{max}$
137C	$3.7 \pm 1.2$	100
18B	$23.2 \pm 1.7$	24
25B	$4.1 \pm 2.3$	25
18Bx37	4.7	90
25Bx37	4.6	90

**Tab.6 : Caractéristiques cinétiques de l'amidon synthétase liée au grain.**

Les valeurs de  $K_M$  sont exprimées en mMol d'ADP-Glc. Les valeurs données pour les souches haploïdes proviennent de 3 expériences. Les  $K_M$  estimés des diploïdes proviennent d'une seule expérience.

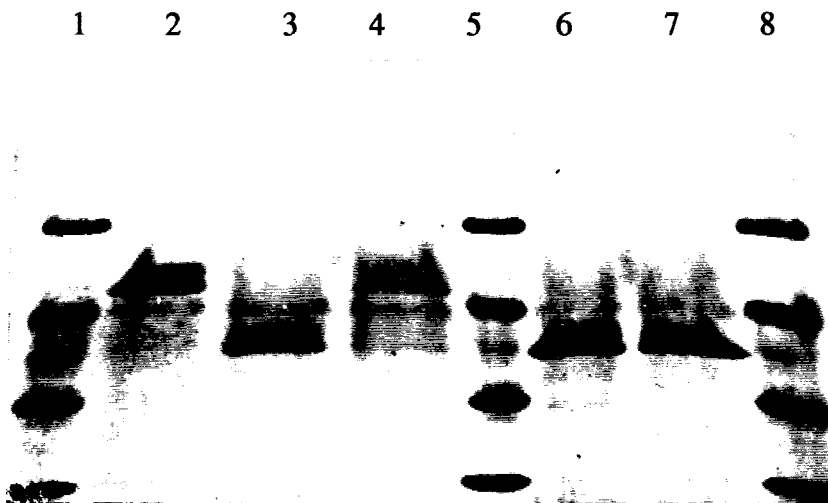
Les  $V_{max}$  sont exprimés en pourcentage relatif à 137C. La valeur pour ce dernier est de 3.7nmol d'ADP-Glc incorporés par min et par mg d'amidon.

#### **IV.B. Les souches porteuses de *st-2-1* et *st-2-2* affichent des modifications qualitatives et quantitatives de la protéine majeure liée au grain d'amidon.**

De nombreux mutants waxy isolés chez différents organismes ont fait l'objet d'une caractérisation des protéines liées au grain d'amidon. Souvent, la protéine majeure du grain

sauvage est absente chez ces mutants. Nous avons réalisé la même caractérisation de nos souches afin de voir si, ici aussi, la mutation se répercute au niveau des protéines liées au grain.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines extraites du grain d'amidon de la souche sauvage (puits 2) révèle 3 bandes dont une, de 76 kDa, est largement majoritaire (photo 5). Deux protéines mineures de 55 et 66 kDa sont aussi révélées par le Bleu de Coomassie. La situation de nos mutants est encore conforme sur ce point à ce qui a été décrit pour les mutants de type waxy puisque, dans les deux cas, une modification manifeste de la protéine majeure du grain est visible. Chez 25B (puits 4), la protéine majeure ne semble pas altérée du point de vue de sa structure mais nettement moins représentée (facteur de 4 environ). La modification de la protéine majeure chez 18B est beaucoup plus spectaculaire : la disparition de la protéine de 76 kDa s'accompagne de l'apparition d'une nouvelle forme de 56 kDa.



**Photo 5** : Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide des protéines liées au grain.

Puits 1,5,8 : témoins de masse. De haut en bas : 94 ; 67 ; 43 ; 30 kDa.  
 Puits 2,3,4 : extraction réalisée sur 3 mg d'amidon. Respectivement 137C, 18B et 25B.  
 Puits 6 et 7 : extraction des protéines sur 10 mg d'amidon de 18B.  
 Révélation au Bleu de Coomassie.

L'apparition chez le mutant 18B de cette nouvelle protéine de masse moléculaire

plus petit que la protéine majeure sauvage nous a bien sûr fait penser que ce mutant est porteur d'une version tronquée de la protéine sauvage. Il fallait donc vérifier que les séquences peptidiques de ces deux protéines sont identiques et nous avons confié la détermination d'une microséquence peptidique à P. Maes du laboratoire du Prof. Tartar (Institut Pasteur de Lille). Les microséquences Nterminales déterminées sont les suivantes :

137C : Ala-Leu-Asp-Ile-Val-Met-Val-Ala-Ala-Glu-Val-Ala-Pro-Gly-Gly

18B : Ala-Leu-Asp-Ile-Val-Met-Val-Ala-Ala-Glu-Val-Ala-Pro

Les microséquences réalisées montrent que les 13 premiers acides aminés en position Nterminale de la protéine majeure sont identiques chez 137C et 18B, suggérant la probable identité des protéines majeures de ces deux souches.

#### **V. LE LOCUS *ST-2* DEFINIT LE GENE DE STRUCTURE DE L'AMIDON SYNTHETASE LIEE AU GRAIN.**

Ces modifications de la protéine majeure liée au grain suffisent à expliquer les modifications des paramètres cinétiques de l'amidon synthétase liée si on admet que la protéine visualisée sur gel de polyacrylamide porte cette activité. Dans ce cas, la diminution de la vitesse maximale de catalyse chez 25B s'explique par une synthèse diminuée de la protéine concernée (ou à une moins bonne attache de celle-ci au granule ou une transcription moindre et/ou une stabilité moindre de l'ARN ou de la protéine, ou encore d'un mauvais transport de la protéine au chloroplaste), cette forme non modifiée de l'enzyme gardant la même affinité que la version sauvage pour le substrat. Chez le mutant 18B, une altération de la structure même de l'enzyme se traduirait par une diminution simultanée de la vitesse et de l'affinité pour l'ADP-Glc.

Afin de vérifier l'hypothèse de l'identité entre la protéine majeure du grain d'amidon et de l'amidon synthétase liée, nous avons observé la coségrégation de ces deux paramètres

chez les descendants du croisement de souches porteuses des mutations *st-2-1* (B20) et *st-2-2* (25B) (voir tableau 7) et chez les souches B4 et B20.

Souche	PM	$K_M$
S1	76	4.2 <sup>b</sup>
S6	56	18.2 <sup>a</sup>
S7	76	5.6 <sup>b</sup>
S12	56	22.2 <sup>b</sup>
S14	76	4.3 <sup>b</sup>
S15	76	4.9 <sup>b</sup>
B4	76	5.3 <sup>b</sup>
B20	56	22.6 <sup>a</sup>

**Tab.7 : Etude de la coségrégation des paramètres cinétiques de l'amidon synthétase liée au grain et du poids moléculaire de la protéine majeure liée au grain.**

PM : poids moléculaire de la protéine majeure liée au grain.

$K_M$  : affinité de l'amidon synthétase liée au grain exprimée en mmol d'ADP-Glc.

a : méthode de Hanes-Woolf ; b : méthode de Lineweaver-Burk.

8 descendants méiotiques ont été ainsi analysés. Les 5 souches porteuses de la version tronquée de la protéine du grain montrent des  $K_M$  pour l'ADP-Glc de l'amidon synthétase liée comprises entre 18.2 et 22.6 mM. Les 5 autres souches, dont les  $K_M$  ADP-Glc de l'activité liée au grain s'échelonnent entre 4.2 et 5.6 mM, ont tous le même profil protéique que la souche mutante 25B et donc une protéine majeure de 76kDa en quantité 4 fois moindre.

**Les paramètres cinétiques de l'enzyme et le poids moléculaire de la protéine majeure sont donc génétiquement liés, et ce, dans un même contexte structural.**

## **VI. DISCUSSION : L'AMIDON SYNTHETASE LIEE EST UNE ENZYME INDISPENSABLE A LA BIOSYNTHESE DE L'AMYLOSE ET L'AMYLOPECTINE.**

L'identité entre la protéine waxy et l'amidon synthétase liée au grain a été longuement discutée dans l'introduction de cette thèse. Or, alors que nos investigations étaient en cours, un rapport de Preiss (1991) faisait état d'une homologie entre les séquences des gènes des protéines waxy du maïs et de l'orge et celle du gène *glgA* (codant la glycogène synthétase) d'*Escherichia coli*. Toutefois, cette homologie est très faible et se trouve localisée dans la partie N terminale de la protéine. Notons que cette homologie concerne la région de liaison de l'ADP-Glc et est donc à ce titre tout-à fait significative (la conservation du site de liaison à l'amidon aurait été beaucoup moins convaincante).

La découverte de nos mutants dont l'enzyme liée au grain présente des modifications spécifiques de l'allèle considéré a permis d'assoir définitivement l'identité de la protéine waxy et de l'amidon synthétase majeure liée au grain. En effet, si on peut envisager une modification des paramètres de l'enzyme due à sa non liaison au grain (par absence d'amylose), on peut difficilement expliquer des variations de ces paramètres chez deux mutants qui synthétisent des polysaccharides de même structure sans admettre que c'est cette protéine elle-même qui est touchée par la mutation. L'absence d'amylose se pose donc comme une conséquence, et non comme la cause, de la déficience de l'activité liée au grain. L'identité de la protéine waxy et de l'amidon synthétase liée au grain est clairement démontrée par leur coségrégation en croisement. Signalons qu'un autre alignement, effectué au laboratoire par J.P. Bohin et S. Ball, des séquences des gènes *glgA* d'*E.coli* et des gènes des protéines waxy du maïs et de l'orge montre jusqu'à 37% d'homologie sur l'entièreté de la séquence peptidique.

L'étude de la structure de l'amidon synthétisé par *Chlamydomonas reinhardtii* a montré la totale analogie de ce polysaccharide avec celui des plantes supérieures. Les différences entre les taux de branchement publiés et ceux que nous avons observés pour

l'amylose s'expliquent relativement facilement. La méthylation de ces produits étant totale, peu d'erreurs peuvent intervenir à ce niveau. Par contre, la détection des produits méthylés en chromatographie de phase gaz donne des pics d'intensités radicalement différentes. L'erreur d'appréciation des glucoses perméthylés et des 2,3-O-Méthyl-1,4,5,6-O-Acétyl glucose (attribués respectivement aux glucoses situés en position terminale non réductrices et aux points de branchement) est donc certainement non négligeable et les valeurs calculées sont de ce fait des valeurs par excès. Les techniques de détermination des points de branchement sont habituellement des méthodes enzymatiques. Dans ce cas, les chaînes de d.p. < 2 ne sont pas clivées et contribuent à l'attribution d'une valeur par défaut. De plus, les extrémités réductrices étant peu nombreuses, leur estimation est très certainement, elle aussi, entachée d'erreur. Nous pensons de ce fait que les valeurs de branchement réelles de l'amylose sont plus proches de celles que nous avons déterminées.

L'existence du 2<sup>ème</sup> pic d'amylopectine que nous avons pu mettre en évidence grâce à la matrice de TSK HW75 peut probablement être généralisée à tous les organismes synthétisant de l'amidon. En fait, la révélation de ce 2<sup>ème</sup> pic tient certainement plus à la matrice utilisée qu'à l'organisme étudié. En effet, les valeurs publiées concernant les  $\lambda_{\max}$  de l'amylopectine de mutants de type waxy (531 nm relativement à 550 nm pour le sauvage) sont tout-à fait compatibles avec la perte dans ce cas aussi d'une fraction de haut poids moléculaire très branchée qui n'aurait pas été aussi clairement mise en évidence. Nous en déduisons donc que l'amidon synthétase liée au grain, produit du gène *ST-2*, conditionne la synthèse de l'amylose mais aussi d'une sous-population importante de l'amylopectine.

## CHAPITRE III

*L'interruption du gène ST-2 , gène de structure de  
l'amidon synthétase liée au grain, conduit à  
l'accumulation normale d'amylopectine*

Au moins 24 nouveaux allèles différents du gène *ST-2* ont été isolés au laboratoire. Ces mutants ont été principalement étudiés dans le cadre d'une interaction avec le gène *ST-3*, dont une mutation provoque une déficience en amidon synthétase soluble.

### I. DEFINITION DU LOCUS *ST-3*, UN NOUVEAU GENE ESSENTIEL A LA BIOSYNTHESE DE L'AMYLOPECTINE.

Les souches *I*<sub>152</sub> et *I*<sub>154</sub>, respectivement porteuses des mutations *st-3-1* et *st-3-2*, sont issues d'une mutagenèse aux rayons X et font partie des mutants dont le phénotype a été décrit initialement comme "vert-olive". A l'époque où sont apparus 18B et 25B, la déficience enzymatique de ces souches était tout juste caractérisée. Ces mutants présentaient une nette déficience de l'amidon synthétase soluble (voir annexe 2).

Nous avons entrepris l'analyse génétique des croisements de *I*<sub>152</sub> et *I*<sub>154</sub> avec la souche sauvage 37. L'observation des diploïdes issus de ces croisements montre que les mutations *st-3-1* et *st-3-2* sont récessives. Une étude des descendants méiotiques des mêmes croisements (voir tableau 8) nous a permis de conclure que les mutations *st-3-1* et *st-3-2* sont nucléaires et monogéniques.

Caractère	Y		PAB		Ac		Nit		Amidon	
Croisement	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>I</i> <sub>152</sub> x 37	90	60	86	67	85	71	38	93	65	93
	60%	40%	56%	44%	54%	46%	24%	76%	41%	59%
<i>I</i> <sub>154</sub> x 37	25	23	31	17	30	18	17	30	23	25
	52%	48%	65%	35%	62.5%	37.5%	36%	64%	48%	52%

Tab.8 : Ségrégation des caractères portés par *I*<sub>152</sub> et *I*<sub>154</sub>.



L'analyse étant réalisée sur spores au hasard, l'excès observé est souvent en faveur du phénotype sauvage pour un caractère considéré et ne sont imputables qu'à la technique utilisée (une analyse sur des tétrades ne donnerait pas ce type de déviation). Les déviations plus importantes dans les ségrégations des caractères dans le croisement I<sub>154</sub> x 37 sont dues au faible échantillonnage. Cette constatation est d'ailleurs corrélée à un taux de recombinants pour les caractères PAB et Ac de 6% qui reflète un excès de souches parentales de phénotype PAB<sup>+</sup> Ac<sup>+</sup>.

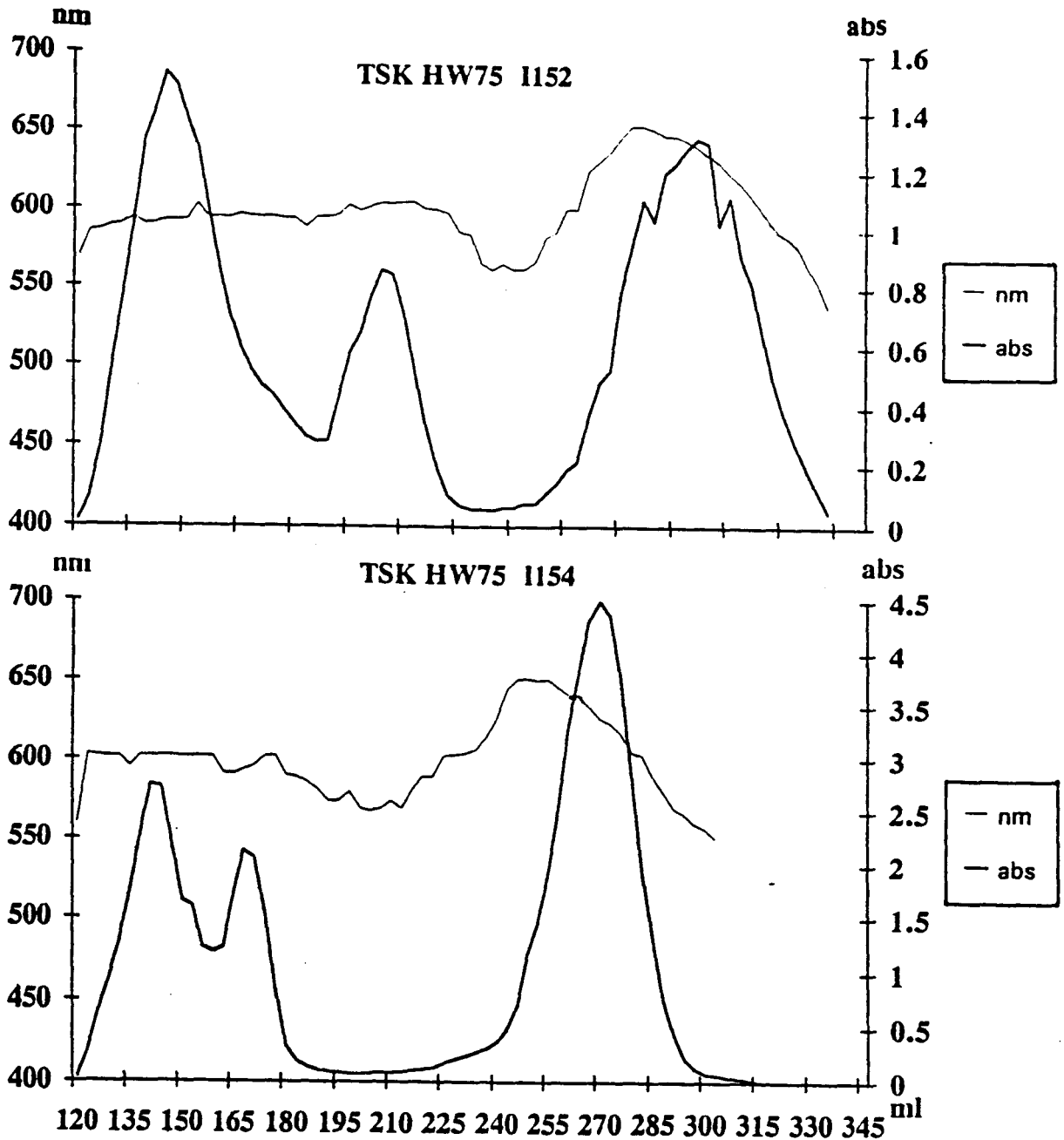
Un dosage d'amidon montre que, en conditions de carence en azote, I<sub>152</sub> et I<sub>154</sub> accumulent entre 20 et 40% de la quantité du sauvage (voir tableau 9). C'est au départ, la seule modification relevée chez ce mutant.

Souche	Amidon/10 <sup>6</sup> cellules	max
137C	34	570
I <sub>152</sub>	8	602
I <sub>154</sub>	8	602

**Tab.9 :** Accumulation d'amidon des mutants I<sub>152</sub> et I<sub>154</sub> en condition de carence en azote et en mixotrophie.

La spectrophotométrie à l'iode a permis de visualiser une altération de la structure même de l'amidon synthétisé par I<sub>152</sub>. La longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe polysaccharide-iode se situe à des valeurs proches de 610 nm. Ces valeurs révèlent la présence d'une proportion accrue de glucanes de grande taille de type amylose chez I<sub>152</sub> et expliquent donc le phénotype VERT observé sur boîte de Pétri. Le même type d'analyse effectué sur l'amidon d'un diploïde issu du croisement I<sub>152</sub> x 37 confirme la récessivité de la mutation *st-3-1* comparativement aux diploïdes homozygotes mutants ou sauvage.

La caractérisation structurale fine du polysaccharide synthétisé par ce mutant (initié dans le laboratoire du Prof.Fournet et reprise par nos soins) nous réservait pourtant une surprise : alors que nous nous attendions seulement à une nette augmentation de la fraction amylose, le profil obtenu par chromatographie de gel filtration sur matrice de TSK HW75



**Fig.21 : Chromatographie de tamisage moléculaire de l'amidon synthétisé par les souches porteuses des mutations *st-3-1* et *st-3-2*. Le trait fin représente le  $\lambda_{max}$  du maximum d'absorption du complexe polysaccharide-iode, le trait épais l'absorption à ce maximum.**

montre en plus une modification structurale importante de l'amylopectine (figure 21). En effet, les  $\lambda_{\max}$  caractérisant les différentes sous-populations de l'amylopectine ainsi séparées sont uniformément déplacés vers de plus grandes longueurs d'onde. Ainsi, les polysaccharides de haut poids moléculaire présentent un  $\lambda_{\max}$  de 590 à 600 nm au lieu de 550 nm pour le pic I de la souche sauvage et révèlent donc un allongement considérable de la longueur moyenne des chaînes. Notons que I<sub>152</sub> montre une remarquable homogénéité de l'amylopectine du point de vue du  $\lambda_{\max}$  de complexation iode même si la taille des 2 pics est manifestement différente et que ce  $\lambda_{\max}$  est très proche de celui du pic II que nous avons caractérisé chez la souche sauvage.

Le même type d'analyse a été effectué sur des diploïdes homozygote et hétérozygote pour la mutation *st-3-1* (figure 22). Le profil chromatographique du diploïde hétérozygote est superposable à celui du diploïde homozygote sauvage (on peut notamment noter le  $\lambda_{\max}$  du pic I de l'amylopectine à 550 nm). Le chromatogramme du diploïde homozygote muté (I<sub>152</sub> x B9) est quant à lui similaire à celui de la souche haploïde mutée.

Du point de vue de l'activité enzymatique, les mutants I<sub>152</sub> et I<sub>154</sub> montrent une très nette déficience de l'amidon synthétase soluble en extrait cellulaire brut (tableau 10). Les diploïdes hétérozygotes pour la mutation portant sur le gène *ST-3* montrent une activité intermédiaire entre celles des diploïdes homozygotes sauvage et muté, résultat synonyme d'une semi-dominance de la mutation. Ce résultat n'est absolument pas en contradiction avec les résultats acquis sur la structure qui montraient une totale récessivité des mutations portant sur le gène *ST-3*. Ce résultat démontre simplement que l'activité amidon synthétase soluble n'est pas limitante *in vivo*. Ceci est confirmé par le zymogramme de l'activité soluble qui révèle parfaitement le niveau d'activité intermédiaire du diploïde hétérozygote, pour des extraits ajustés en quantité de protéines (voir photo 6).

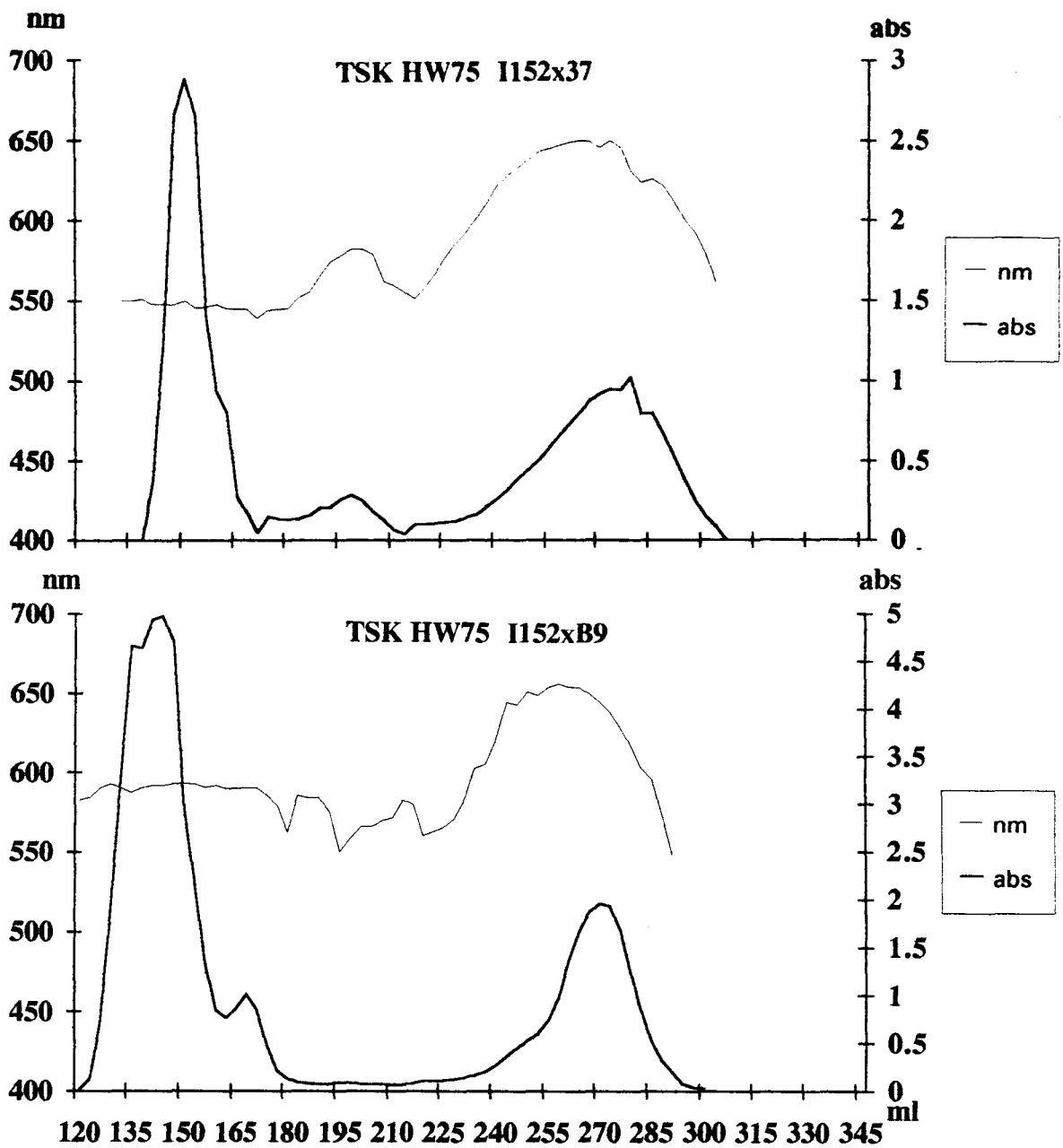
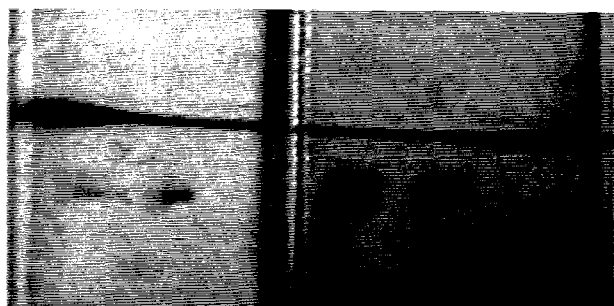


Fig.22 : Chromatographie de l'amidon des diploïdes homozygotes et hétérozygotes pour la mutation *st-3-1*.

Souche	nmol de Glc.min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
137C <sup>a</sup>	33.25±3.25
I152 <sup>a</sup>	16.15±3.1
I154 <sup>a</sup>	19.85±0.6
137C x 37	32.6
I152 x 37	28.4
I154 x B9	7.1

**Tab.10** : Dosage de l'activité amidon synthétase soluble des souches touchées dans le gène *ST-3*. (a : valeurs issues de trois expériences.) Les valeurs sont données en nmoles de glucose incorporées par minute et par mg de protéine.



1 2 3 4 5 6

**Photo 6** : Révélation de l'activité amidon synthétase soluble diploïdes homozygote et hétérozygote pour *st-3-1*. Pistes 1 et 4 : I<sub>137</sub> x I<sub>152</sub> ; pistes 2 et 5 : 137C x 37 ; pistes 3 et 6 : I<sub>152</sub> x B9. Les quantités de protéines sont ajustées à 6,8 mg dans les pistes 1,2 et 3. Elles sont doublées dans les autres pistes.

Les travaux réalisés par la suite sur la structure fine de l'amylopectine de I<sub>152</sub> et sur la purification de l'amidon synthétase sont le fruit d'une collaboration entre les membres de notre équipe et F.Routier et T.Fontaine du laboratoire de Prof. Fournet. En résumé, les conclusions sont les suivantes :

- l'amylopectine des souches porteuses de mutation au locus *ST-3* est considérablement remaniée dans sa structure. Cette dernière montre un appauvrissement en

chaînes de longueurs intermédiaires (d.p. >7 et <50) et un enrichissement considérable en chaînes très courtes ( $2 < d.p. < 7$ ).

- c'est l'amidon synthétase soluble de type II qui est déficiente chez I<sub>152</sub>. Cette activité est éluee en 2 pics différents, appelés SIIa et SIIb, chez la souche sauvage. Ces deux formes sont remplacées chez le mutant par une forme appelée SIIm. Cette forme est plus proche, du point de vue de son comportement en présence de citrate 0.5M ainsi que de ces paramètres cinétiques, de la forme SI du sauvage.

Nous en concluons que l'amidon synthétase soluble II, déficiente chez I<sub>152</sub>, est responsable de la synthèse ou du maintien des glucanes de longueur intermédiaire constituant l'essentiel de ce que l'on a la coutume d'appeler les "clusters" (grappes) de branchement de l'amylopectine (pour plus de détails, voir l'article présenté en annexe 2).

## **II. INTERACTIONS GENIQUES AUX LOCI *ST-2* ET *ST-3* : UN MODELE ADDITIF OU EPISTATIQUE POUR LA BIOSYNTHESE DE L'AMYLOPECTINE ?**

La justification de la suite que nous avons personnellement donnée aux travaux relatifs au gène *ST-2* découle des observations relatives aux travaux menés dans notre laboratoire par M.L. Maddelein. Un résumé de ces travaux encore non publiés nous semble essentiel à la bonne compréhension de notre hypothèse de travail :

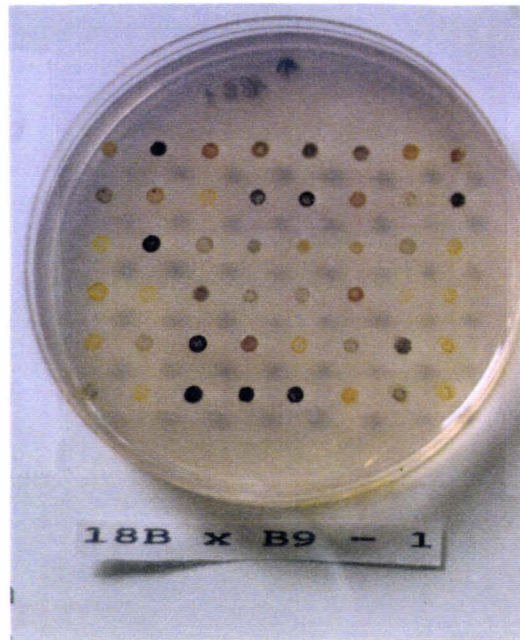
Un deuxième cycle de mutagenèse U.V. a été réalisé sur la souche I<sub>152</sub>. L'idée première était que l'amidon synthétase soluble I (l'activité non modifiée chez le mutant I<sub>152</sub>) n'intervient au maximum que dans la limite de 25% de la synthèse du polysaccharide puisque c'est la quantité résiduelle d'amidon chez ce mutant. Donc, la déficience de l'amidon synthétase soluble I, surtout si elle n'est pas totale, conduirait à une chute d'amidon n'excédant pas 25%. Le phénotype d'une souche portant une mutation du gène codant cette enzyme ne serait donc pas très différent de celui de la souche sauvage. En conséquence, nous sommes dans l'impossibilité de sélectionner un tel mutant sur boîte de

Pétri. Dans le contexte muté de I<sub>152</sub>, une modification de l'amidon synthétase I ferait proportionnellement chuter la quantité d'amidon de façon plus importante. Partant d'un phénotype vert sur boîte, nous attendions un phénotype jaune des éventuels mutants déficients pour les deux formes d'amidon synthétases solubles, dans l'hypothèse où ces deux enzymes sont les seules à intervenir dans la synthèse de l'amylopectine, composante majeure de l'amidon.

Après ce second cycle de mutagenèse, 43 mutants jaunes ont ainsi été isolés par vaporisation d'iode sur boîte de Pétri. Parmi ceux-ci, 35 présentaient un amidon dont le  $\lambda_{\max}$  à l'iode était déplacé vers les longueurs d'onde caractéristiques du rouge. Trente sept de ces souches, dont 24 proviennent de temps ou de boîtes de mutagenèse différents, ne complémentent pas avec B20 (porteur de la mutation *st-2-1*). Il semble donc très probable que ces souches constituent 24 nouveaux allèles du gène *ST-2*. Notons qu'aucun de ces mutants ne présente une déficience plus marquée que I<sub>152</sub> quant à l'activité amidon synthétase soluble.

3 de ces souches, croisées avec la souche sauvage 37 donnent 25% de descendants rouges, phénotype qui correspond à la nouvelle mutation isolée de la mutation de départ *st-3-1*. Ces descendants méiotiques rouges, croisés avec 18B, ne donnent pas de recombinants, confirmant qu'il s'agit bien de 3 nouveaux allèles de *ST-2*.

L'interaction de mutations portant sur les gènes *ST-2* et *ST-3* conduit dans certains cas à l'effondrement de la quantité d'amidon synthétisé. En fait, celle-ci est strictement corrélée à l'expressivité de la mutation touchant le gène *ST-2* et les teneurs en polysaccharide sont alors nettement inférieures à celles qui caractérisent I<sub>152</sub>. Ceci explique leur phénotype jaune, phénotype que l'on retrouve pour les descendants méiotiques porteurs de *st-2-1* et *st-3-1* issus du croisement de 18B avec B9 (voir photo 7). En dessous d'un seuil d'activité d'environ 15%, comparativement au sauvage, de l'amidon synthétase liée au grain, il devient impossible de précipiter un polysaccharide de type amidon. Or, quelque soit son intensité, la mutation portant sur le gène *ST-2* seule (i-e isolée dans un contexte sauvage) n'aboutit jamais à une chute de la quantité du polysaccharide accumulé.



**Photo 7 :** Phénotype de coloration iode des descendants méioïtiques du croisement 18B(*st-2-1*) x B9(*st-3-1*). Les souches noires sont de génotype sauvage ; Les souches rouges sont porteuses de la mutation *st-2-1*, les vertes de *st-3-1* ; les doubles mutants *st-2-1/st-3-1* apparaissent jaunes.

Toutefois, l'existence de doubles mutants incapables de synthétiser un polysaccharide de type amidon si l'allèle de *ST-2* est très marqué suppose un rôle fondamental de l'amidon synthétase liée dans la synthèse de l'amidon résiduel de la souche I<sub>152</sub> et par conséquent de l'amylopectine de cette dernière, confirmant ainsi nos propres conclusions établies dans la première partie de cette thèse. En d'autres termes, dans un contexte génétique où la synthèse des chaînes de longueurs intermédiaires est inhibée, c'est toute l'amylopectine qui est sous le contrôle de la GBSS. Rappelons que cette dernière, chez I<sub>152</sub>, est essentiellement composée de longs glucanes. Cela nous a amenés à supposer que la GBSS serait responsable de la synthèse de tous les longs glucanes que ce soit dans l'amylose ou



l'amylopectine et que l'amidon synthétase soluble serait responsable de la synthèse des chaînes de longueur intermédiaire formant les grappes de l'amylopectine. Deux modèles mutuellement exclusifs peuvent être proposés dans ce contexte (voir figure 23) :

- soit la synthèse des chaînes longues sert de support indispensable à la synthèse des chaînes plus courtes. Dans ce cas, la synthèse des grappes ne se fait que si le squelette de base de l'amylopectine est prêt selon un **modèle épistatique**.

- soit la synthèse des chaînes longues est indépendante de celle des grappes. Dans ce cas, si l'activité de la GBSS est trop basse, les grappes pourraient s'empiler les unes sur les autres sans nécessiter la présence des longues chaînes. Dans le **modèle additif**, la structure finale du polysaccharide synthétisé dépend de l'action concertée ou non de l'une (souche mutante) ou des deux (souche sauvage) amidon synthétases liée et soluble.

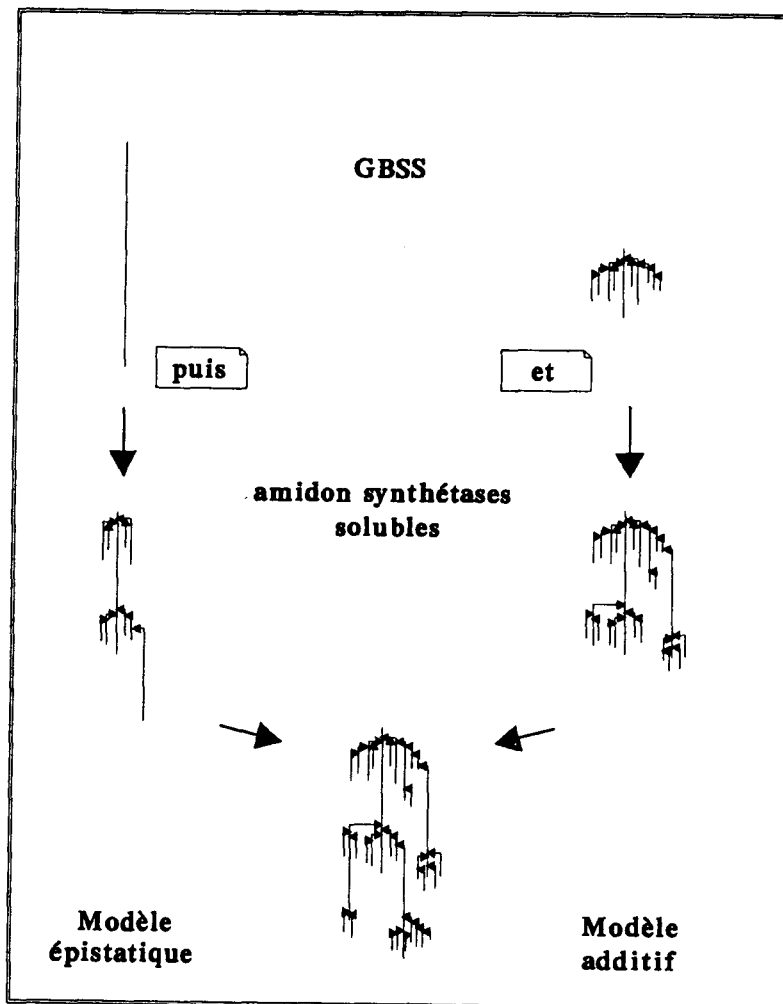


Fig.23 : Représentation schématique des modèles additif et épistatique.

La validation de l'un ou l'autre de ces modèles passe, à notre sens, par l'inactivation totale de la GBSS. En effet, l'interaction de la mutation *st-3-1* avec différents allèles (provoquant une déficience très marquée de l'amidon synthétase liée au grain) aboutit à un effondrement de la synthèse d'amidon. Mais aucun mutant ne présente une activité GBSS nulle et il est donc impossible, tant qu'il y a une activité résiduelle, de déterminer si l'activité de cette enzyme est un prérequis à l'action des amidon synthétases solubles. Notre laboratoire a été confronté à un problème similaire dans l'étude de l'enzyme de branchement du glycogène chez *S.cerevisiae* (Thon *et al.*, 1992). Quatorze allèles mutés au locus *GLC3*, gène de structure de l'enzyme de branchement, présentaient une activité indétectable de cette enzyme. Or, parmi ces 14 mutants obtenus par mutagenèse classique, seule une souche est totalement dépourvue de glycogène, les autres accumulant un glycogène moins branché mais en quantité normale. Par contre, une interruption du gène de structure conduit toujours à l'effondrement de la synthèse du glycogène. Ces résultats indiquent qu'une activité résiduelle, même indétectable, peut suffire à la synthèse d'une structure polysaccharidique en quantité parfaitement normale alors qu'un branchement minimum est requis pour toute synthèse.

Le moyen le plus sûr d'inactiver totalement une enzyme est d'en interrompre le gène de structure. La récente mise au point d'une technique d'interruption génique par simple transformation de *C.reinhardtii* par un ADN exogène nous en a donné l'occasion, puisqu'il a été montré que la transformation était mutagène chez cette algue. L'interruption du gène *ST-2*, gène de structure de la GBSS, nous démontrerait la nécessité ou non d'action *in vivo* de cette enzyme pour la synthèse de toutes les sous-fractions de l'amidon.

### **III. MUTAGENESE PAR TRANSFORMATION : SELECTION DE MUTANTS.**

La mutagenèse a été réalisée par cotransformation avec deux plasmides, le plasmide pArg7-8 et le plasmide PUC18. Il a été démontré que lors d'une telle transformation, une proportion non négligeable des clones positifs (i-e ayant intégré le plasmide complémentant

la mutation arg-7-8) possèdent aussi le plasmide cotransformant (Kindle, 1990). Si la mise au point de cette technique est très récente, des études préliminaires ont d'ores et déjà montré que les insertions sont multiples (Kindle *et coll.*, 1989). Une analyse moléculaire plus poussée a montré que l'insertion n'est pas simple mais s'accompagne d'énormes délétions (Tam et Lefebvre, 1992). Le plasmide pArg7-8 étant très gros (11.675 kbp), son intégration peut être partielle, c'est-à-dire qu'il risque de s'intégrer sous la forme de fragments. Nous avons donc préféré utiliser un plasmide beaucoup plus petit en cotransformation (PUC18 ; 2.69 kbp), pensant que celui-ci pourrait s'intégrer entier si la taille des délétions est en relation la taille de l'ADN concerné. Puisque notre intention est de cloner ce plasmide avec les régions flanquantes de son lieu d'intégration (afin de repérer un fragment de notre gène), nous avons ainsi misé sur une délétion moindre. En effet, nous avons espoir que le plasmide reste entier et garde notamment son origine de répllication.

Selon le modèle considéré, nous attendions deux phénotypes différents de nos mutants nuls pour la GBSS ; le modèle épistatique nous laissait supposer un phénotype jaune après coloration aux vapeurs d'iode, alors que le modèle additif conduit à un phénotype rouge dans ces conditions.

Très peu d'études ayant été réalisées, nous avons donc fait varier plusieurs paramètres (quantités des deux plasmides, temps d'agitation au vortex). La sélection phénotypique a été réalisée sur 40 000 transformants Arg<sup>+</sup> et nous a permis d'isoler 20 mutants touchés dans le métabolisme de l'amidon. Parmi ceux-ci, un clone s'est révélé d'un phénotype tout-à fait similaire à celui de 18B et 25B. Bien sûr, la mise en évidence d'une telle coloration aux vapeurs d'iode nous a décidés à nous focaliser sur cette souche. Les conditions de mutagenèse utilisées pour ce mutant sont les suivantes :

6  $\mu$ g de plasmide PUC par essai.

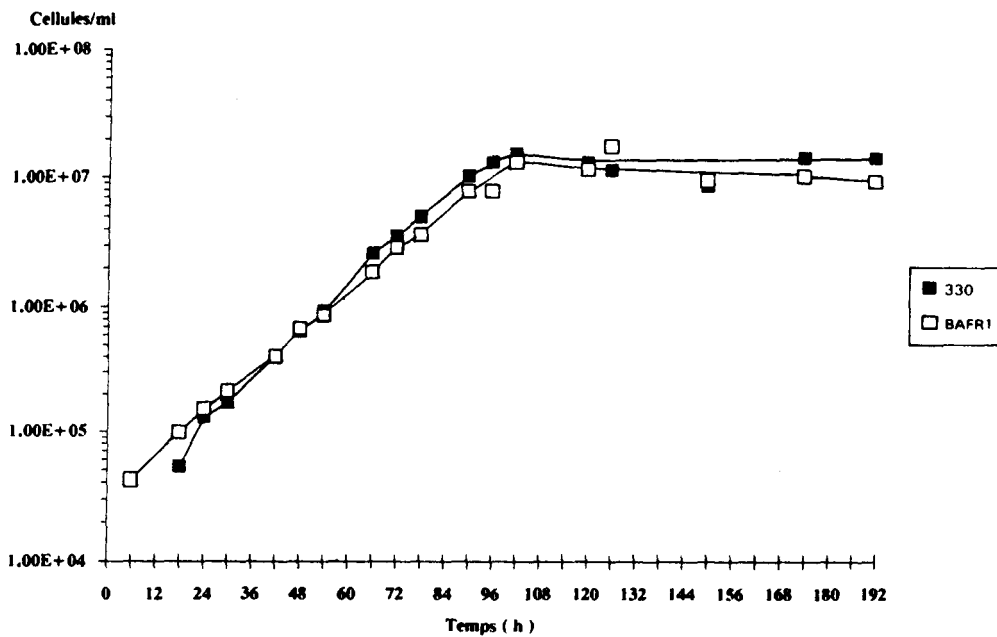
8  $\mu$ g de plasmide pArg-7-8 par essai.

45 sec. d'agitation au vortex à puissance maximale.

taux de survie : < 5%

#### IV. CARACTERISATIONS GENETIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE LA SOUCHE PORTEUSE DE ST-2- $\Delta$ -1.

La (les) mutation(s) engendrée(s) par les plasmides dans la souche n'altèrent pas la croissance de celle-ci (voir figure 24).



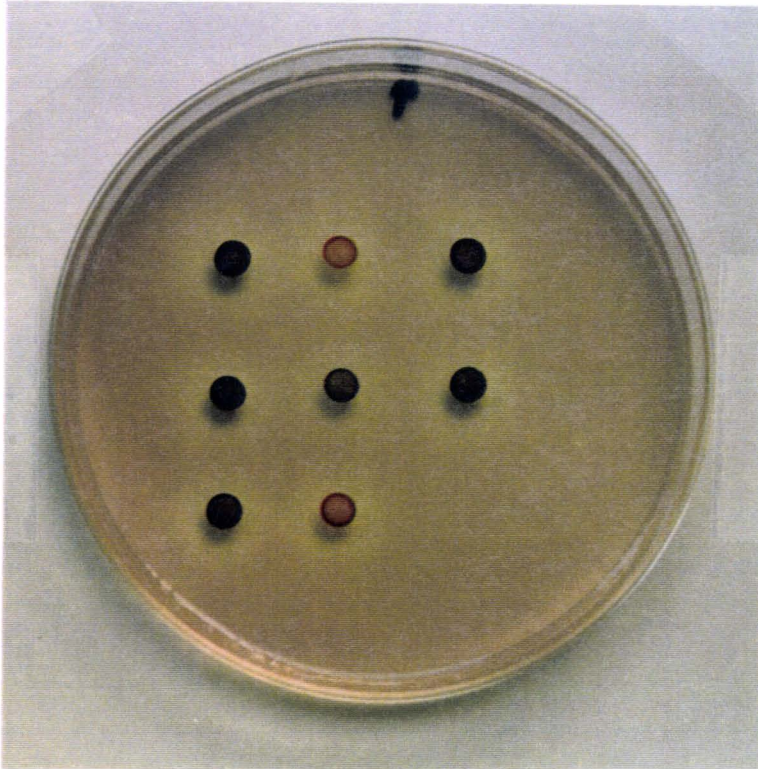
**Fig.24 :** Courbes de croissance des souches 330 et BAF R1 en mixotrophie.

Un dosage de l'amidon accumulé par ce transformant ne montre, comme dans le cas de 18B et 25B, aucune différence quantitative majeure (voir tableau 11).

Souche	$\mu\text{g}$ d'amidon/ $10^6$ cellules
330	$23.3 \pm 7.7$
BAF R1	$27.3 \pm 1.05$

**Tab.11 :** Dosage de l'amidon synthétisé par BAF R1 et 330.  
(valeurs moyennées sur 4 points d'une même expérience)

La caractérisation génétique complète de ce mutant est en cours de réalisation. Toutefois, le test de complémentation en trans avec des descendants méiotiques du croisement de 18B et B4 (donc porteuses de la mutation *st-2-1* ou *st-2-2*) donne 100% de diploïdes rouges (voir photo 8). Les volumes cellulaires confirment qu'il s'agit de diploïdes végétatifs. La souche *st-2-Δ1* appartient donc au même groupe de complémentation que les souches 18B et 25B.



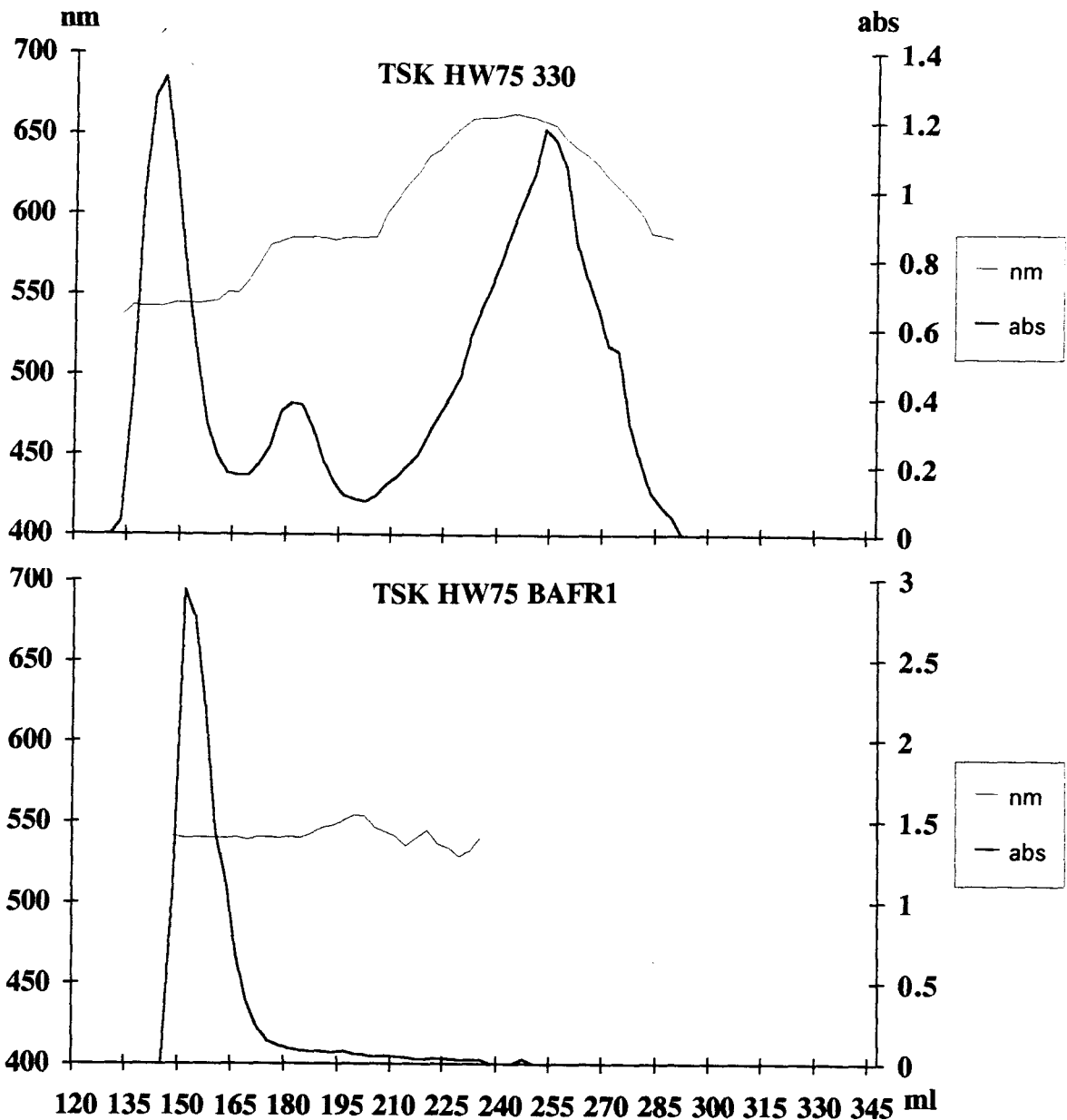
**PHOTO 8 :** Test de complémentation en trans de la souche BAF R1. Les diploïdes révélés rouges sont issus de croisements du transformant BAF R1 avec des descendants du croisement 18BxB4. Les diploïdes noirs sont issus des croisements d'autres transformants (obtenus par le même protocole mais de phénotype vert ou jaune) avec les mêmes descendants.

## V. CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUE ET STRUCTURALE DE LA SOUCHE *st-2-Δ1*.

La non-complémentation en trans entre des souches porteuses de mutations touchant le gène *ST-2* et le transformant *st-2-Δ1* nous a poussé à analyser les caractéristiques structurales de l'amidon et les paramètres cinétiques de l'amidon synthétase

liée au grain de ce mutant.

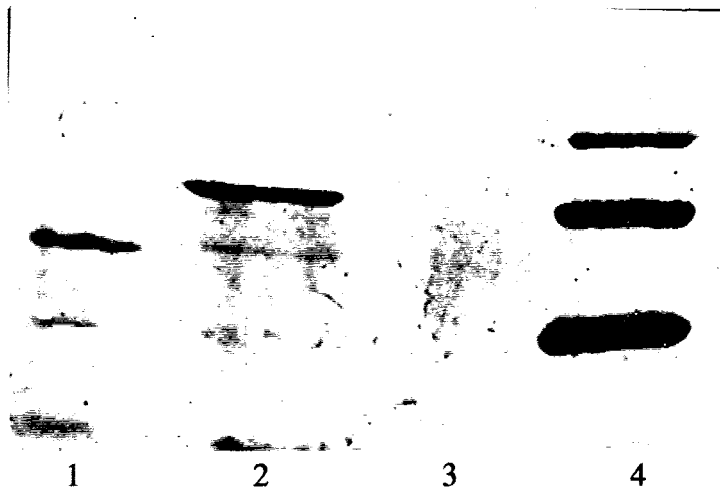
Le chromatogramme en TSK HW75 de l'amidon de la souche 330 est en tous points identique à celui de 137C. De la même manière, le mutant *st-2-ΔI* montre un profil superposable à celui de 18B (figure 25).



**Fig.25 : Caractérisation structurale de l'amidon du mutant BAF R1 par chromatographie de gel filtration sur TSK HW75.**

Les vitesses maximales d'incorporation d'ADP-Glc radioactif sont de 325 nmol/mg d'amidon et heure. La faible activité mesurée pour le transformant BAFR1 est inférieure à 1% par rapport à 330.

La caractérisation des protéines liées aux grain révèle la présence des deux formes mineures, identiques chez 137C et 330, une absence totale de la protéine majeure, non accompagnée de l'apparition d'une autre forme chez BAFR1. La révélation au nitrate d'argent, méthode 10 fois plus sensible, ne met pas en évidence d'autre forme, confirmant la disparition pure et simple de la protéine majeure (voir photo 9).



**Photo 9 : Révélation des protéines liées au grain.** Puits 1 ; 18B. Puits 2 : 330. Puits 3 : BAF R1. Puits 4 : témoins de masses moléculaires. De haut en bas : 94 ; 67 ; 43 kDa.

## **VI. DISCUSSION : VALIDATION DU MODELE ADDITIF.**

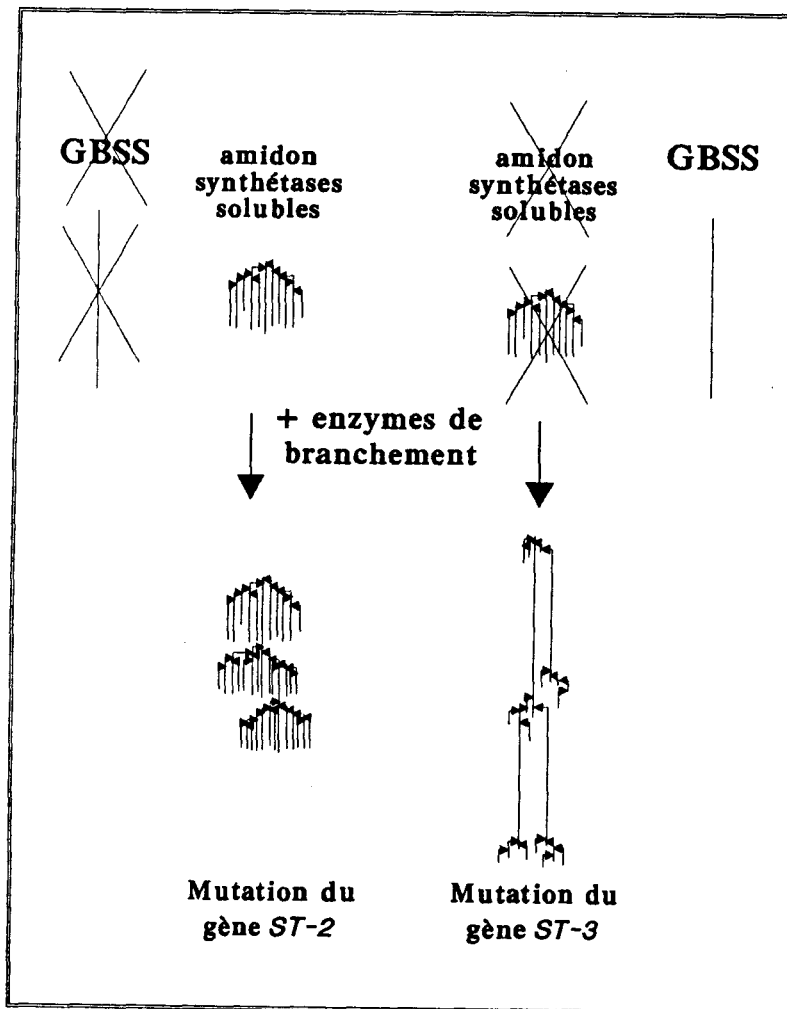
L'obtention trop récente du transformant BAFR1 ne nous a permis, pour l'instant, de réaliser les expériences d'hybridation moléculaire qui confirmerait l'intégration du plasmide et son intervention dans le caractère muté de la souche. Cette hybridation moléculaire ne se justifie d'ailleurs que sur les produits de méiose puisqu'il s'agit d'associer la mutation à un signal particulier du profil répondant à l'hybridation avec les vecteurs bactériens utilisés. Malheureusement, les trois croisements successifs du transformant BAFR1 avec la souche sauvage ne nous ont permis pour l'instant que la sélection de diploïdes. Cette difficulté de croisement des transformants, si elle n'est pas expliquée, semble être un cas général puisqu'elle a déjà été rencontrée dans d'autres équipes (Goldschmidt, Lai Wa Tam, communications personnelles). Toutefois, on peut noter que chaque fois que cette analyse a été possible, elle a montré une coségrégation de l'un des signaux répondant à l'hybridation

avec la mutation engendrée par le traitement.

Il ne semble pas hâtif de déclarer que le mutant BAFR1 valide le modèle additif tel que nous l'avions proposé, même si nous ne sommes pas encore en mesure de savoir si le gène de la GBSS est simplement interrompu ou s'il est délété. Nous pouvons toutefois d'ores et déjà affirmer que l'action de cette enzyme n'est pas un prérequis pour la synthèse d'une molécule de type amylopectine par les amidons synthétases solubles et les enzymes de branchement étant donnée l'absence du produit du gène dans le grain d'amidon chez le transformant BAFR1. Or, l'amylopectine résiduelle synthétisée par ce mutant est identique à celle des 26 allèles du gène *ST-2* isolés dans notre laboratoire. Ces mutants ont toujours gardé un minimum de 12% d'activité GBSS résiduelle, alors que chez BAFR1 l'activité mesurée (en présence d'une concentration importante d'ADP-Glc) est inférieure à 1% de l'activité de la souche sauvage. Par ailleurs, la diminution la plus marquée de la quantité de la protéine majeure liée au grain est observée chez le mutant 25B et n'excède pas 75% alors que la disparition de cette protéine est totale chez BAFR1. Ceci signifie que l'activité résiduelle chez ces mutants n'est pas responsable de la structure de la macromolécule synthétisée. En d'autres termes, la structure de l'amylopectine accumulée par les mutants de type waxy constitue la limite due à l'empilement des grappes synthétisés par des enzymes autres que la GBSS. Les différents schémas correspondants aux situations rencontrées chez les différentes souches mutantes peuvent donc être décrits comme dans la figure 26. En règle générale, la GBSS semble responsable de la synthèse de longues chaînes de glucanes. Seul le premier pic de l'amylopectine ne dépend pas de son action ; ou, plus exactement, l'existence de cette fraction très branchée particulière n'est pas conditionnée par l'activité de cette enzyme. Toutefois, la structure de cette sous-population de l'amylopectine chez la souche sauvage est peut-être sous la dépendance de l'action conjointe des différentes formes d'amidon synthétases liée et solubles. Si la GBSS est absente (cas des mutations *ST-2*), les formes solubles sont capables, avec l'enzyme de branchement, de synthétiser une structure hyperbranchée dont le contenu en glucose est similaire à l'amidon sauvage (figure 26A), par une simple condensation des grappes. Si la forme soluble I est déficiente (cas des



mutations touchant le gène *ST-3*), ce sont par contre les chaînes intermédiaires contenues dans les grappes qui font défaut (figure 26B). Dans le cas où les activités sont normales (cas de la souche sauvage), la situation n'est pas clairement déterminée et il nous est impossible de dire à l'heure actuelle comment les différentes activités sont coordonnées pour donner une structure de l'amidon aussi complexe. Il est possible que l'ensemble des activités concernées entre dans une sorte de "compétition". Chaque sous-fraction serait alors la résultante de l'action simultanée de ces différentes formes enzymatiques dont la contribution serait plus ou moins importante.



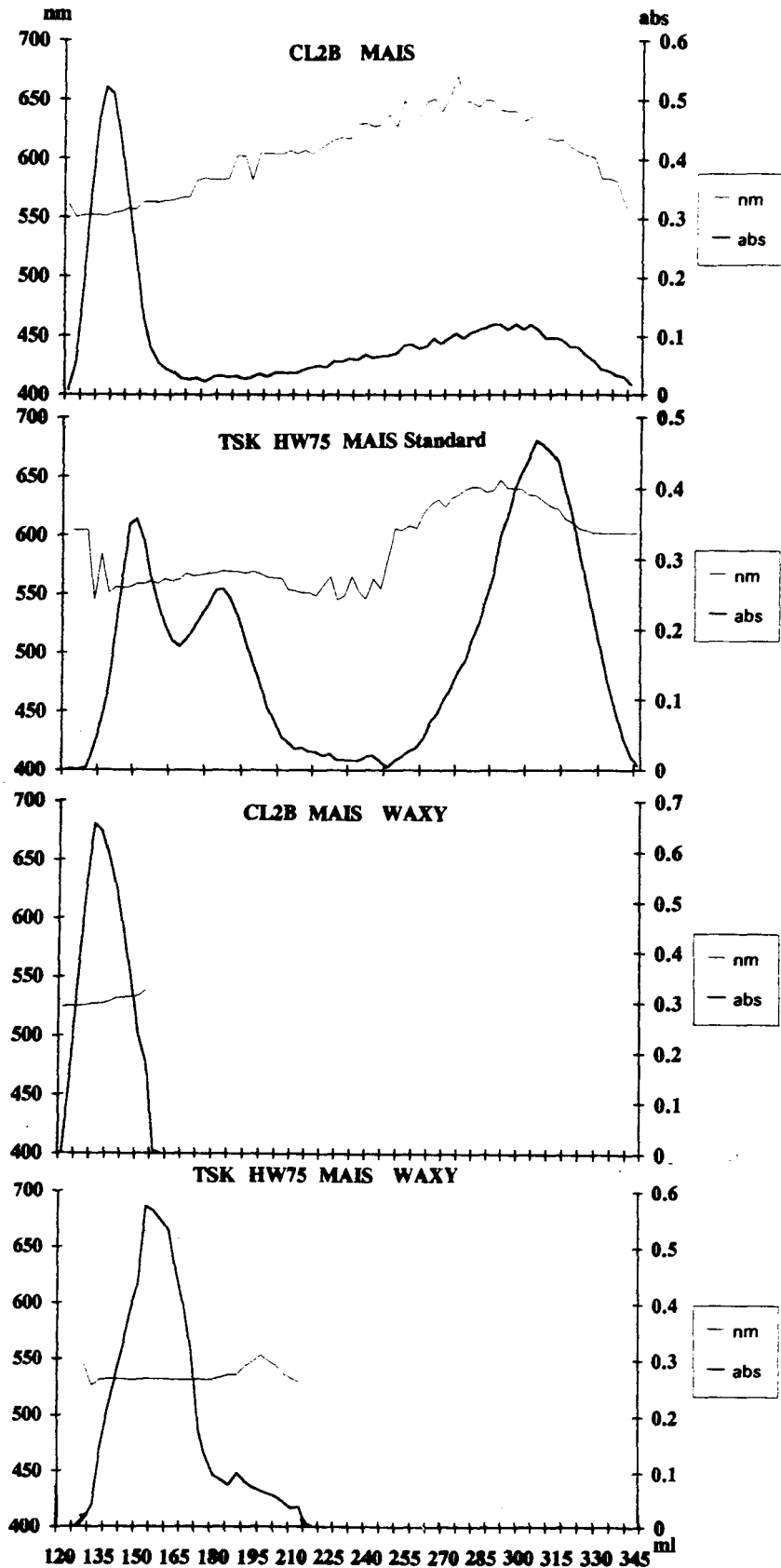
**Fig.26 :** Les différentes voies de synthèse dépendant des mutations affectant les gènes *ST-2* et *ST-3*.

## CONCLUSION GENERALE

*Les amylopectines type I et II définissent-elles  
2 voies pour la biosynthèse de l'amidon  
chez toutes les plantes ?*

Les travaux que nous avons menés sur les mutants de type "waxy" chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, ainsi que sur l'interaction des produits des gènes *ST-2* et *ST-3*, nous ont permis d'établir un rôle précis pour la GBSS *in vivo*. Cette enzyme est impliquée de manière indiscutable dans la synthèse de l'amylose et d'une sous-fraction de l'amylopectine. La situation apparaît bien plus complexe qu'une simple succession de branchements et d'élongations puisqu'il est établi qu'aucune des activités n'est indispensable à la synthèse d'un polysaccharide, même si la structure de celui-ci dépend étroitement de leur action concertée. **Le modèle que nous avons établi chez l'algue peut-il être généralisé à tous les végétaux supérieurs ?**

Nous avons déjà soulevé le problème du profil spécifique que nous avons obtenu par chromatographie de gel filtration de l'amidon de nos différentes souches de *C. reinhardtii*, ainsi que sa probable généralisation à toutes les plantes supérieures. Nous avons par ailleurs évoqué le fait que l'observation de la perte d'une sous-fraction de l'amylopectine chez les mutants du type "waxy" était sans doute imputable à la technique utilisée bien plus qu'à une particularité de l'algue. Cette hypothèse est d'autant plus probable que d'autres techniques permettent de mettre en évidence un déplacement du  $\lambda_{\max}$  de l'amidon extrait de ces souches. De fait, des études menées au laboratoire confirment cette suggestion. La comparaison des profils obtenus par chromatographie de tamisage moléculaire de l'amidon de maïs sur matrice de sépharose CL2B et de TSK HW75 (figure 27) amènent d'ailleurs aux mêmes conclusions que chez l'algue et prouvent l'existence du 2<sup>ème</sup> pic d'amylopectine chez les plantes supérieures. On peut très clairement observer que la matrice de sépharose CL 2B ne permet pas de déceler autre chose que la disparition de l'amylose chez le mutant waxy. Par contre, de la même manière que pour le mutant de l'algue, l'analyse en TSK HW75 établit définitivement qu'il est lui aussi est dépourvu d'amylose ET d'amylopectine.



**Fig.27 : Comparaison des profils de tamisage moléculaire de l'amidon de maïs sauvage et waxy après chromatographie sur TSK HW75 et CL 2B.**

La seule différence que nous pouvons relever se situe au niveau des caractéristiques structurales fines du polysaccharide puisque les  $\lambda_{\max}$  spécifiques des deux fractions de l'amylopectine du maïs restent plus proches, signifiant la présence de sous-fractions moins différentes (10nm contre 30nm chez *C.reinhardtii*). Mais cela ne modifie en rien la modélisation réalisée grâce à l'algue ; les conclusions que nous avons tirées de l'étude de mutants peuvent donc être étendues aux végétaux supérieurs.

Il nous reste donc à déterminer le rôle spécifique de chaque amidon synthétase et leur contribution dans l'élaboration de chaque sous-population de l'amidon dans un contexte sauvage et d'établir le déterminisme génétique de l'hétérogénéité de structure de cette macromolécule.

BIBLIOGRAPHIE

**BIBLIOGRAPHIE.**

**ap Rees T. and G. Entwistle (1989).**

"Entry into amyloplast of carbon for starch synthesis"

In *Physiology, Biochemistry and Genetics of nongreen plastids* C.D.Boyer, J.C.Shanon, R.C. Hardison American Society of Plant Physiologists. vol.2 : pp 49-62.

**Archibald A.R, I.D. Fleming, A.M. Liddle, D.J. Manners, G.A. Mercer and A. Wright. (1961).**

" $\alpha$ -1,4 glucosans. Part XI. The absorption spectra of glycogen and amylopectin-iodin complexes."

*J. Chem.Soc.* p.1183-1190.

**Ardila F.J. and J.S. Tandecarz (1992)**

"Potato tuber UDP-Glucose : protein transglucosylase catalyzes its own glucosylation."

*Plant Physiol.* 99 : 1342-1347.

**Baba T., M. Yoshii and K. Kainuma (1987)**

"Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots"

*Starch/Stärke* 39 : 52-56.

**Ball S.G., L. Dirick, A. Decq, J.C. Martiat and R.F. Matagne.(1990)**

"Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*"

*Plant Sci.* 66 : 1-9.

**Ball S., T. Marianne, L. Dirick, M. Fresnoy, B. Delrue and A. Decq. (1991).**

"A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase."

*Planta* 185 : 17-26.

**Banks W., C.T. Greenwood and K.M. Khan (1971)**

"The interaction of linear, amylose oligomers with iodine"

*Carbohyd.Res.* 17 : 25-33.

**Barengo R., M. Flawia and C.R. Krisman (1975)**

"The initiation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli*"

*FEBS Letters.* 53 : 274-278.

**Bhattacharyya M., A.M. Smith, T.H.N. Hellis, C. Hedley and C. Martin. (1990).**

"The wrinkled-seed character of Pea described by Mendel is caused by a transposon-like Insertion in a gene encoding starch-branching enzyme."

*Cell.* 60 : 115-122.

**Borovsky D., E.E. Smith and W.J. Whelan (1976).**

"On the mechanism of amylose branching by potato Q-Enzyme."

*Eur.J.Biochem.* 62 : 307-312.

**Boyer C.D. and J. Preiss (1978).**

"Multiple forms of starch branching enzyme in Maize : evidence for independent genetic control."

*Biochem.Biophys.Res.Commun.* 80 : 169-175.



**Boyer C.D. and J. Preiss (1979)**

"Properties of citrate-stimulated starch synthesis catalysed by starch synthase I of developing maize kernels"

*Plant Physiol.* 64 : 1039-1042.

**Bulté L. and F.A. Wollman (1992)**

"Evidence for a selective destabilization of an integral membrane protein, the cytochrome *b<sub>6</sub>/f* complex, during gametogenesis in *Chlamydomonas reinhardtii*"

*Eur.J.Biochem.* 204 : 327-336.

**Cameron S., L. Levin, M. Zoller and M. Wigler (1988).**

"cAMP-Independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S.cerevisiae*."

*Cell.* 53 : 555-566.

**Caspar T., S.C. Huber and C. Sommerville (1985)**

"Alterations in growth, photosynthesis and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity."

*Plant Physiol.* 79 : 11-17.

**Cardini C.E. and R.B. Frydman (1966)**

"ADP-Glucose: $\alpha$ -1,4-Glucan Glucosyltransferases. Starch synthetases and related enzymes from plants".

In *Methods in enzymology* (E.F. Neufeld and V. Ginsburg eds) Vol.8 : 387-394 Academic Press New York.

**Chen G.S. and I.H. Segel (1968)**

"*Escherichia coli* polyglucose phosphorylases"

*Arch.Biochem.Biophys.* 127 : 164-174.

**Chourey P.M. and O.E. Nelson (1976).**

"The enzymatic deficiency conditioned by the *Shrunken-1* mutations in Maize."

*Biochem.Genet.* 14 : 1041-1055.

**Cori C.F., S.P. Colowick and G.T. Cori.(1938)**

"The formation of Glucose-1-phosphoric acid in extracts of mammalian tissues and of Yeast."

*J.Biol.Chem* 123 : 375-380.

**Cori C.F. and G.T. Cori. (1939).**

"The activating effects of glycogen on the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate."

*J.Biol.Chem.* 131 : 397-398.

**Darbon P. (1988)**

"Le "roi" amidon."

*Biofutur.* 64 : 23-37.

**De Fekete M.A.R. and C.E. Cardini (1964)**

"Mecanism of glucose transfer from sucrose into the starch granule of sweet corn"

*Arch.Biochem.Biophys.* 104 : 173-184.

**De Fekete M.A.R., L.F. Leloir and C.E. Cardini (1960).**

"Mecanism of starch biosynthesis."

*Nature.* 187 : 918-919.



**Dickinson D.B. and J. Preiss. (1969).**

"Presence of ADP-Glucose pyrophosphorylase in *Shrunken-2* and *Brittle-2* mutants of Maize endosperm."

*Genetics*. 52 : 1058-1062.

**Dry I., A. Smith, A. Edwards, M. Bhattacharyya, P. Dunn and C. Martin (1992)**

"Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato".

*The Plant J.* 2 : 193-202.

**Echt C.S. and D. Schwartz (1981)**

"Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the *waxy* locus in Maize".

*Genetics* 99 : 275-284.

**Farkas I., T.A. Hardy, M.G. Goebel and P.J. Roach. (1991)**

"Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled."

*J.Biol.Chem.* 226 : 15602-15607.

**François J., M.E. Villanueva and H.G. Hers (1988)**

"The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion *in vivo* of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers."

*Eur.J.Biochem.* 174 : 551-559.

**François J., D.L. Higgins, F. Chang and K. Tatchell. (1991)**

"Inhibition of glycogen synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the mating pheromone  $\alpha$ -factor."

*J.Biol.Chem* 266 : 6174-6180.

**François J.M., S. Thompson-Jaeger, J. Skroch, U. Zellenka, W. Spevak and K. Tatchell. (1992)**

"*GAC1* may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*."

*EMBO J.* 11 : 87-96.

**Geddes R., C.T. Greenwood and S. MacKenzie (1965)**

"Studies on the biosynthesis of starch granules. Part III. The properties of the components of starches from growing Potato tuber."

*Carbohydr.Res.* 1 : 71-82.

**Geddes R., J.D. Harvey and P.R. Wills (1977)**

"Hydrodynamic properties of 2-mercaptoethanol-modified glycogen"

*Eur.J.Biochem.* 81 : 465-472.

**Gfeller R.P. and M. Gibbs (1984)**

"Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*"

*Plant Physiol.* 75 : 212-218.

**Ghosh H.P. and J. Preiss (1965)**

"Biosynthesis of starch in spinach chloroplasts"

*Biochemistry* 4 : 1354-1361

**Govons S., N. Gentner, E. Greenberg and J. Preiss (1973)**

"Biosynthesis of bacterial glycogen. XI. Kinetic characterization of an altered adenosine diphosphate-glucose synthase from a "glycogen excess" mutant of *Escherichia coli*"

*J.Biol.Chem* 248 : 1731-1740.

**Greenberg E. and J. Preiss (1964)**

"The occurrence of adenosine diphosphate glucose : glycogen transglucosylase in bacteria."  
*J.Biol. Chem.* 239 : 4314-4315

**Gunja-Smith Z., J.J. Marschall, C. Mercier, E.E. Smith and W.J. Whelan (1970)**

"A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin"  
*FEBS Letters* 12 : 101-104.

**Hamilton B.S., K. Nakamura, D.A.K. Roncari (1992)**

"Accumulation of starch in *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar mutants."  
*Biochem. Cell. Biol.* 70 : 255-258.

**Hanson K.R. and N.A. McHale (1988).**

"A starchless mutant of *Nicotiana sylvestris* containing a modified plastid phosphogluco-  
mutase."

*Plant Physiol.* 88 : 838-844.

**Harris E.H. (1989).**

" Culture and storage methods. The *Chlamydomonas* source book. A comprehensive guide  
to biology and laboratory use"

(E.Harris eds) p 25-63. Academic Press, San Diego, Calif.

**Hawker J.S., J.L. Ozburn, H. Ozaki, E. Greenberg and J. Preiss (1974)**

"Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose  $\alpha$ -1,4-glucan  $\alpha$ -4-glucosyl  
transferase and  $\alpha$ -1,4-glucan,  $\alpha$ -1,4-glucan-6-glycosyl transferase in synthesis of  
branched  $\alpha$ -glucan"

*Arch.Biochem.Biophys.* 160 : 530-551.

**Haworth W.N., S. Peat and E.J. Bourne.(1944).**

"Synthesis of amylopectin"

*Nature* 154 : 236.

**Hengge-Aronis R. and D. Fischer (1992)**

"Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-  
dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*."

*Molecular Microb.* 6 : 1877-1886.

**Hizukuri S. (1985)**

"Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the cristalline  
structure of starch granules"

*Carbohydr.Res.* 141 : 295-306.

**Hizukuri S., Y. Takeda, M. Yasuda and A. Suzuki. (1981).**

"Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes"

*Carbohydr.Res.* 94 : 205-213.

**Hovenkamp-Hermelink J.H.M., E. Jacobsen, A.S. Ponstein, R.G.F. Visser, G.H.  
Vos-Scheperkeuter, E.W. Bijmolt, J.N. de Vries, B. Witholt and W.J. Feenstra (1987)**

"Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.)"

*Theor.Appl.Genet.* 75 : 217-221.

**Imberty A., A. Buléon, V. Tran and S. Pérez (1991)**

"Recent advances in knowledge of starch structure"

*Starch/Stärke* 43 : 375-384.

**Iwata S. and T. Fukui (1973)**

"The subunit structure of  $\alpha$ -glucan phosphorylase from potato"

*FEBS Lett.* 36 : 222-226.

**Iwata S. and T. Fukui (1975)**

"Effect of limited proteolysis of potato phosphorylase on activity and structure"  
*Arch.Biochem.Biophys.* 169 : 58-65.

**Jacobsen E., J.H.M. Hovenkamp-Hermelink, H.T. Krijgsheld, H. Nijdam, L.P. Pijnacker, B. Witholt and W.J. Feenstra (1989)**

"Phenotypic and genotypic characterization of an amylose-free starch mutant of the potato"  
*Euphytica* 44 : 43-48.

**Jacobsen E., H.T. Krijgsheld, J.H.M. Hovenkamp-Hermelink, A.S. Ponstein, B. Witholt and W.J. Feenstra (1990)**

"Revertants of the amylose-free potato clone 86.040 ( $2n=1x=12$ )"  
*Plant Sci.* 67 : 177-182.

**Kakefuda G., S.H. Duke and M.S. Hostak (1986).**

"Chloroplast and extrachloroplastic starch-degrading enzymes in *Pisum sativum* L."  
*Planta* 168 : 175-182.

**Keeling P.L. (1989)**

"Evidence against triose phosphate transport into amyloplast of developing Wheat and Maize grain"

In *Physiology, Biochemistry and Genetics of nongreen plastids* C.D.Boyer, J.C.Shanon, R.C. Hardison American Society of Plant Physiologists. vol.2 : pp 63-77.

**Kindle K.L., A.R. Schnell, E. Fernandez and P.A. Lefebvre (1989)**

"Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase"

*J. Cell.Biology.* 109 : 2589-2601.

**Kindle K.L. (1990)**

"High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*"

*Proc.Natl.Acad.Sci.* 87 : 1228-1232.

**Klein U.(1986)**

"Compartmentation of glycolysis and of the oxydative pentose-phosphate pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*."

*Planta* 167 : 81-86.

**Klösgen R.B., A. Gierl, S. Schwartz-Sommer and H. Saedler (1986)**

"Molecular analysis of the *waxy* locus of *Zea mays*"

*Mol.Gen.Genet.* 203 : 237-244.

**Kreuzberg K. (1984)**

"Starch fermentation via formate producing pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorogonium elongatum* and *Chlorella fusca*"

*Physiol.Plant* 61 : 87-94.

**Kreuzberg K. and W. Martin (1984)**

"Oscillatory starch degradation and fermentation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*"

*Biochim.Biophys.Acta* 799 : 291-297.

**Krishnan H.B., C.D. Reeves and T.W. Okita (1986).**

"ADPglucose pyrophosphorylase is encoded by different mRNA transcripts in leaf and endosperm of cereals"

*Plant Physiol.* 81 : 642-645.

**Krisman C. (1972).**

"A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis."  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46** : 1206-1212.

**Kumar A. and G.G. Sanwal (1988).**

"Kinetics of starch phosphorylase from young banana leaves."  
*Phytochemistry* **27** : 983-988.

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

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

**Lavintman N. and C.E. Cardini (1973)**

"Particulate UDP-Glucose : protein transglucosylase from Potato tuber."  
*FEBS Lett.* **29** : 43-46.

**Lee E.Y.C. and J.J. Braun (1973)**

"Sweet corn phosphorylase : purification and properties"  
*Arch. Biochem. Biophys.* **156** : 276-286.

**Leloir L.F. and C.E. Cardini. (1957).**

"Biosynthesis of glycogen from Uridine diphosphate glucose."  
*J. Am. Chem. Soc.* **79** : 6340-6341.

**Leloir L.F., M.A.R. De Fekete and C.E. Cardini (1961)**

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

**Levi C. and M. Gibbs (1984)**

"Starch degradation in synchronously grown *Chlamydomonas reinhardtii* and characterization of the amylase."  
*Plant Physiol.* **74** : 459-463.

**Levi C. and J. Preiss (1978).**

"Amylopectin degradation in Pea chloroplast extracts."  
*Plant Physiol.* **61** : 218-220.

**Lilley R. McC, C.J. Chon, A.M. Mosbach, H.W. Heldt (1976)**

"The distribution of metabolites between spinach chloroplasts and medium during photosynthesis *in vitro*"  
*Biochim. Biophys. Acta* **460** : 259-272.

**Lillie S.H. and J.R. Pringle (1980)**

"Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* : responses to nutrient limitation."  
*J. Bact.* **143** : 1384-1394.

**Lin E.C.C. (1987).**

"Dissimilatory pathways for sugars, polyols and carbohydrates" In "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular Biology" (F. C. Neidhardt) pp 244-284 American Society for Microbiology, Washington D.C.

**Lin T.P, T. Caspar, C. Sommerville and J. Preiss (1988a).**

"Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity."  
*Plant Physiol.* **86** : 1131-1135.

**Lin T.P., P. Caspar, C. Somerville and J. Preiss (1988b).**

"A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADPglucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme"  
*Plant Physiol.* **88** : 1175-1181.

**Lin T.P. and J. Preiss (1988).**

"Characterization of D-Enzyme (4- $\alpha$ -Glucanotransferase) in *Arabidopsis* leaf."  
*Plant Physiol.* **86** : 260-265.

**MacDonald F.D. and T. ap Rees (1983)**

"Enzymic properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean"  
*Biochim.Biophys.Acta* **755** : 81-89.

**MacDonald F.D. and J. Preiss. (1983)**

"Solubilization of the starch-granule-bound starch synthase of normal Maize kernels."  
*Plant Physiol.* **73** : 175-178.

**MacDonald F.D. and J. Preiss (1985).**

"Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and *Waxy* Maize."  
*Plant Physiol.* **78** : 849-852.

**Madsen N.B. (1961).**

"The occurrence and enzymic synthesis of glycogen in extracts of *Agrobacterium tumefaciens*."  
*Biochim.Biophys.Acta* **50** : 194-195.

**Manners D.J. (1989)**

"Recent developments in our understanding of amylopectin structure"  
*Carbohydr.Polymers* pp : 87-112.

**Manners D.J. and N.K. Matheson (1981)**

"The fine structure of amylopectin"  
*Carbohydr.Res.* **90** : 99-110.

**Martel C. (1988).**

"Etude du caryopse de l'orge au cours du développement, de la maturation et du maltage."  
*Thèse de 3ème cycle. Université de Nancy I.*

**Matagne R.F., R. Loppes and R. Deltour (1976)**

"Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardi* : Biochemical and cytochemical approach with specific mutants"  
*J.Bact.* **126** : 937-950.

**Mendel.G. (1865).**

"Versuche über Pflanzen Hybriden."  
*Verh.Naturforsch.Ver.Brünn.* **4** : 3-47.

**Meyer K.H. et P. Bernfeld (1940)**

"Recherches sur l'amidon V. L'amylopectine"  
*Helv.Chim.Acta* **23** : 875-881.

**Morrissey J.H. (1981).**

"Silver staining for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity."  
*Anal.Biochem.* **117** : 307-310.

**Müller-Röber B., U.Sonnewald and L.Willmitzer. (1992).**

"Inhibition of the ADP-Glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes."

*EMBO J.* 11 : 1229-1238.

**Murdoch A.K. (1992).**

"The amylose-iodine complex."

*Carbohydr.Res.* 233 : 161-174.

**Nakamura Y. and M. Imamura (1983a).**

"Characteristics of  $\alpha$ -glucan phosphorylase from *Chlorella vulgaris*."

*Phytochemistry* 22 : 835-840.

**Nakamura Y. and M. Imamura (1983b).**

"Characterization of *Chlorella* phosphorylase : the glucan specificity and effect of temperature."

*Phytochemistry* 22 : 2395-2399.

**Nakamura Y. and H. Yamanouchi (1992).**

"Nucleotide sequence of a cDNA encoding starch-branching enzyme, or Q-enzyme, from Rice endosperm"

*Plant Physiol.* 99 : 1265-1266.

**Nakano K. and T. Fukui (1986).**

"The complete amino acid sequence of potato  $\alpha$ -glucan phosphorylase."

*J.Biol.Chem.* 261 : 8230-8236.

**Nelson O.E. and H.W. Rines (1962)**

"The enzymatic deficiency in the *waxy* mutant in maize"

*Biochem.Biophys.Res.Comm.* 9 : 297-300.

**Okada G. and E.J. Hehre (1974)**

"New studies on amylosucrase, a bacterial  $\alpha$ -D-Glucosylase that directly converts sucrose to a glycogen-like  $\alpha$ -Glucan."

*J.Biol.Chem.* 249 : 126-135.

**Ozbun J.L., J.S. Hawker and J. Preiss (1971)**

"Soluble adenosine diphosphate glucose- $\alpha$ 1,4-glucan  $\alpha$ -4-glucosyltransferases from spinach leaves"

*Biochem.J.* 126 : 953-963.

**Pan D. and O.E. Nelson (1984).**

"A debranching enzyme deficiency in endosperms of the *Sugary-1* mutants of Maize."

*Plant Physiol.* 74 : 324-328.

**Paz Parente J., P.Cardon, Y.Leroy, J.Montreuil, B.Fournet and G.Ricart (1985).**

"A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methyl-sulfinyl carbanion."

*Carbohydr.Res.* 141 : 41-47.

**Peat S., S.J. Pirt and W.J. Whelan (1952a).**

"Enzymic synthesis and degradation of starch. Part XV.  $\beta$ -amylase and the constitution of amylose."

*J.Chem.Soc.* 1 : 705-713.

**Peat S., G.J. Thomas and W.J. Whelan (1952b).**

"The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XVII. Z-Enzyme."  
*J. Chem. Soc.* 1 : 722-733.

**Peat S., W.J. Whelan and G.J. Thomas (1956)**

"The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XXII. Evidence of multiple branching in waxy-maize starch. A correction"  
*J. Chem. Soc.* 3 : 3025-3030.

**Pozueta-Romero J., F. Ardila and T. Akasawa (1991).**

"ADP-Glucose transport by the chloroplast adenylate translocator is linked to starch biosynthesis."  
*Plant Physiol.* 97 : 1565-1572.

**Praznic W., G. Rammesmayr, T. Spies and A. Huber (1992)**

"Characterisation of the (1->4)- $\alpha$ -D-glucan-branching 6-glycosyltransferase by *in vitro* synthesis of branched starch polysaccharides"  
*Carbohydr. Res.* 227 : 171-182.

**Preiss J. (1991)**

"Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation"  
In *Oxford surveys of plant molecular and cell biology* (Miflin B.J. eds.) vol.7 : 59-114.  
Oxford University Press, Oxford.

**Preiss J. and E. Greenberg (1967)**

"Purification and properties of the adenosine diphosphoglucose :  $\alpha$ -1,4-glucan,  $\alpha$ -4-glucosyl transferase from *Chlorella*."  
*Arch. Biochem. Biophys.* 118 : 702-708.

**Preiss J., M. Bloom, M. Morell, V.L. Knowes, W.C. Plaxton, T.W. Okita, R. Larsen, A.C. Harmon and C. Putnam-Evans (1987)**

"Regulation of starch synthesis : enzymological and genetic studies."  
*Tailoring genes for crop improvement* G. Bruening, J. Harada, T. Kosuge, A; Hollaender eds. New York pp : 133-151.

**Preiss J. and T. Romeo (1989)**

"Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis"  
*Adv. Microb. Physiol.* 30 : 183-238.

**Rajinchapel-Messai (1990).**

"Les plastiques brisent leurs chaînes."  
*Biofutur.* 96 : 31-36.

**Recondo E.F. and L.F. Leloir (1961).**

"Adenosine Diphosphate Glucose and starch synthesis."  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6 : 85-88.

**Rothman-Denes L.B. and E. Cabib (1970)**

"Two forms of yeast glycogen synthetase and their role in glycogen accumulation."  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 68 : 967-974.

**Santarius K.A and U. Heber (1965)**

"Changes in the intracellular levels of ATP, ADP, AMP and Pi and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis."  
*Biochim. Biophys. Acta* 102 : 39-54.

**Schächtele C. and M. Steup (1986).**

" $\alpha$ -1,4-glucan phosphorylase forms from leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.)."  
*Planta* 167 : 444-451.

**Schneider E.M., J.U. Becker and D. Volkmann (1981).**

"Biochemical properties of potato phosphorylase change with its intracellular localization as revealed by immunological methods."

*Planta* 151 : 124-134.

**Schwartz M. (1987)**

"The Maltose regulon" In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. (F.C.Neidhardt, eds) pp 1482-1502. American Society for Microbiology, Washington D.C.

**Schwartz D. and C.S. Echt (1982)**

"The effect of *Ac* dosage on the production of multiple forms of Wx protein by the *wx<sup>m-9</sup>* controlling element mutation in maize"

*Mol.Gen.Genet.* 187 : 410-413.

**Shen L., H. Ghosh, E. Greenberg and J. Preiss. (1964).**

"Adenosine diphosphate Glucose-glycogen transglucosylase in *Arthrobacter* sp.NRRL B 1973."

*Biochim.Biophys.Acta* 89 : 370-372.

**Shure M., S. Wessler and N. Federoff (1983)**

"Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize"

*Cell* 35 : 225-233.

**Sigal N., J. Cattaneo and I.H. Segel (1964)**

"Glycogen accumulation by wild-type and Uridine Diphosphate Glucose pyrophosphorylase-negative strains of *Escherichia coli*."

*Arch.Biochem.Biophys.* 108 : 440-451.

**Singh B.J. and J. Preiss (1985).**

"Starch branching enzymes from Maize. Immunological characterization using polyclonal and monoclonal antibodies."

*Plant Physiol.* 79 : 34-40.

**Smith A.M. (1990)**

"Evidence that the "waxy" protein of pea (*Pisum sativum* L.) is not the major starch-granule-bound starch synthase"

*Planta* 182 : 599-604.

**Smythe C., P. Watt and P. Cohen (1990).**

"Further studies on the role of Glycogenin in glycogen biosynthesis."

*Eur.J.Biochem.* 189 : 199-204.

**Stark D.M., K.P. Timmerman, G.F. Barry, J. Preiss and G.M. Kishore (1992).**

"Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP Glucose pyrophosphorylase."

*Science* 258 : 287-292.

**Steiner K.E. and J. Preiss (1977)**

"Biosynthesis of bacterial glycogen : genetic and allosteric regulation of glycogen biosynthesis in *Salmonella typhimurium* LT-2."

*J.Bact.* 129 : 246-253.

**Steup M and C. Schächtele (1986).**

" $\alpha$ -1,4-glucan phosphorylase forms from leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) II. Peptide patterns and immunological properties. A comparison with other phosphorylase forms."

*Planta* 168 : 222-231.



**Sullivan T.D., L.I. Strelow, C.A. Illingworth, R.L. Phillips and O.E. Nelson Jr.** (1991).

"Analysis of Maize *Brittle-1* alleles and a *Defective Suppressor-Mutator-Induced* mutable allele."

*Plant Cell* **3** : 1337-1348.

**Sutherland E.** (1972).

"Studies on the mechanism of hormone action."

*Science* **177** : 401-408.

**Takeda.Y., K.Shirasaka and S.Hizukuri.** (1984).

"Examination of the purity and structure of amylose by gel-permeation chromatography."

*Carbohydr.Res.* **132** : 83-92.

**Tam L-W and P.A Lefebvre** (1992)

"The use of DNA insertional mutagenesis to clone genes in *Chlamydomonas*"

*Soumis à Science (novembre).*

**Tandecarz J., N. Lavintman and C. Cardini.** (1975).

"Biosynthesis of starch. Formation of a glucoproteic acceptor by a Potato non-sedimentable preparation."

*Biochim. Biophys. Acta* **399** : 345-355.

**Thon V.J., C. Vigneron-Lesens, T. Marianne Pépin, J. Montreuil, A. Decq, C. Rachez, S.G. Ball and F. Cannon.** (1992)

"Coordinate regulation of glycogen metabolism in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of glycogen branching enzyme."

*J.Biol.Chem.* **267** : 15224-15228.

**Thorn W. and S. Mohazzeb** (1990).

" $\alpha$ -D-polyglucan-iodine complexes".

*Starch/Stärke* **42** : 455-459.

**Tsai C.Y.** (1974)

"The function of the *Waxy* locus in starch synthesis in maize endosperm"

*Biochemical Genetics* **11** : 83-96.

**Tsai C.Y. and O.E. Nelson** (1966)

"Starch-deficient Maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity."

*Science* **151** : 341-343.

**van der Leij F.R., R.G.F. Visser, A.S. Ponstein, E. Jacobsen and W.J. Feenstra** (1991a)

"Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the *amf* allele"

*Mol.Gen.Genet.* **228** : 240-248.

**van der Leij F.R., R.G.F. Visser, K. Oosterhaven, D.A.M. van der Kop, E. Jacobsen and W.J. Feenstra** (1991b)

"Complementation of the amylose-free starch mutant of potato (*Solanum tuberosum*.) by the gene encoding granule-bound starch synthase."

*Theor.Appl.Genet.* **82** : 289-295.

**van der Leij F.R., H. Enequist, P. Terpstra and W.J. Feenstra** (1992)

"Chimerism as the basis for the occurrence of amylose synthesizing clones derived from an amylose-free potato mutant"

*Plant Sci.* **81** : 135-139.

**Villareal C.P. and B.O. Juliano (1986)**

"Waxy gene factor and residual protein of rice starch granule"  
*Starch/Stärke* 4 : 118-119.

**Visser R.G.F., M. Hergersberg, F.R. van der Leij, E. Jacobsen, B. Witholt and W.J. Feenstra (1989)**

"Molecular cloning and partial characterization of the gene for granule-bound starch synthase from a wild-type and amylose-free potato (*Solanum tuberosum* L.)"  
*Plant Sci.* 64 : 185-192.

**Vos-Scheperkeuter G.H., W.De Boer, R.G.F.Visser, W.J.Feenstra and B.Witholt. (1986).**

"Identification of granule-bound starch synthase in Potato tubers."  
*Plant Physiol.* 82 : 411-416.

**Weatherwax P. (1922)**

"A rare carbohydrate in waxy maize"  
*Genetics* 7 : 568-572.

ANNEXE 1

## Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: Monocellular Algal Mutants Defective in Amylose Biosynthesis and Granule-Bound Starch Synthase Activity Accumulate a Structurally Modified Amylopectin

BRIGITTE DELRUE, THIERRY FONTAINE, FRANÇOISE ROUTIER, ANDRÉ DECO,  
 JEAN-MICHEL WIERUSZESKI, NATHALIE VAN DEN KOORNHUYSE,  
 MARIE-LISE MADDELEIN, BERNARD FOURNET, AND STEVEN BALL\*

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du Centre National de la Recherche Scientifique no. 111,  
 Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois 59655, Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Received 6 December 1991/Accepted 23 March 1992

Amylose-defective mutants were selected after UV mutagenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* cells. Two recessive nuclear alleles of the *ST-2* gene led to the disappearance not only of amylose but also of a fraction of the amylopectin. Granule-bound starch synthase activities were markedly reduced in strains carrying either *st-2-1* or *st-2-2*, as is the case for amylose-deficient (waxy) endosperm mutants of higher plants. The main 76-kDa protein associated with the starch granule was either missing or greatly diminished in both mutants, while *st-2-1*-carrying strains displayed a novel 56-kDa major protein. Methylation and nuclear magnetic resonance analysis of wild-type algal storage polysaccharide revealed a structure identical to that of higher-plant starch, while amylose-defective mutants retained a modified amylopectin fraction. We thus propose that the waxy gene product conditions not only the synthesis of amylose from endosperm storage tissue in higher-plant amyloplasts but also that of amylose and a fraction of amylopectin in all starch-accumulating plastids. The nature of the *ST-2* (waxy) gene product with respect to the granule-bound starch synthase activities is discussed.

Our knowledge of starch synthesis and degradation, while having developed mostly from observations made in higher-plant storage tissues, has benefited from investigations performed on a number of model microbial systems. *Chlorella pyrenoidosa*, for instance, has been the subject of several of the pioneer studies dealing with the enzymology of starch anabolism (16, 20). Prokaryotic organisms such as *Escherichia coli* have yielded a number of relevant genetic and biochemical studies, mostly because of the parallel that can be drawn between the regulation of plant and bacterial ADP-pyrophosphorylases (reviewed in reference 18). However, the very nature of the storage polysaccharide (glycogen) has prevented the use of model bacterial systems to investigate the biogenesis of the starch granule itself. Thus, our knowledge of the intricate pathways of amylose and amylopectin biosyntheses stems solely from those elegant genetic investigations performed on pea or cereal mutations which express themselves only in the endosperm (reviewed in references 15 and 22). Even in that case, we do not yet know precisely which of the starch synthases and starch branching enzymes are responsible for amylose or amylopectin biosynthesis, let alone how they act coordinately to produce a complex structure such as the starch granule. One of the best and most studied endosperm mutants, waxy maize, seemed until very recently to shed at least some light on the biosynthesis of amylose. Waxy mutations have been identified in most cereals (22, 32) and more recently in storage tissues of dicots such as potato (9) or in the perisperm of the amaranth (11). They all lead to the decrease or absence of both amylose and granule-bound starch synthase. While there is no doubt that one of the main proteins associated with the starch granule is the product of the waxy

gene, the identity of this waxy protein with the major granule-bound starch synthase has been recently questioned (24). Thus, the widespread view that this enzyme is solely responsible for amylose synthesis is, in fact, a matter of controversy. In the hope to bring additional insights in our understanding of the biogenesis of the starch granule, we have embarked in a systematic screen for mutants altered in the structure of starch in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. We report here the isolation and characterization of waxy mutations expressed in photosynthesizing plastids of unicellular green algae. We show that, as in higher-plant endosperm tissue, the absence of amylose is correlated with a marked decrease of granule-bound starch synthase and is accompanied by the decrease or loss of one of the main proteins associated with the starch granule. Allele-specific variation of  $K_m$  for ADP-glucose cosegregates in crosses with molecular weight modifications of the main granule-associated protein, suggesting that granule-bound starch synthase is the product of the waxy (*ST-2*) gene in *C. reinhardtii*. An in-depth structural investigation of mutant and wild-type starch shows that waxy *Chlamydomonas* strains have also lost an important component of the amylopectin fraction. We thus suggest that granule-bound starch synthase controls the biosynthesis not only of amylose but also of amylopectin in all types of photosynthesizing or starch-accumulating plastids.

### MATERIALS AND METHODS

**Materials.** [ $U$ - $^{14}C$ ]ADP-glucose was purchased from Amersham (Amersham, United Kingdom). The starch determination kit was purchased from Boehringer (Mannheim, Germany). Rabbit liver glycogen was supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Percoll was from Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden).

\* Corresponding author.

TABLE 1. Structural properties of wild-type and mutant starch

Strain	$\lambda_{\max}$ (nm <sup>a</sup> )	Relative amt <sup>b</sup>	
		2,3,4,6-Glc	2,3,6-Glc
137C	590	0.6	31
18B	550	0.9	19
25B	550	0.7	21

<sup>a</sup> Rounded to the nearest decimal.

<sup>b</sup> 2,3,4,6-Glc and 2,3,6-Glc represent the methyl ether derivatives of a glucose in terminal nonreducing position and an  $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked glucose, respectively. The amounts were compared by taking 2,3-Glc [a methyl ether derivative of an  $\alpha(1\rightarrow4)$ - and  $\alpha(1\rightarrow6)$ -linked glucose] as an arbitrary standard (assigned a value of 1).

size and starch sample dissolved at the same concentration in 0.01 M NaOH. Samples of 3 ml were collected after addition to the column of 0.01 M NaOH at the same flow rate.

**Purification of granule-bound proteins.** Granule-bound proteins were purified according to Vos-Scheperkeuter et al. (30). Briefly, 2 to 5 mg of pure native starch was suspended in 80  $\mu$ l of 5% (vol/vol)  $\beta$ -mercaptoethanol-2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS) and extracted by boiling for 10 min. The supernatant obtained after a 5-min centrifugation at 10,000  $\times g$  was stored while the pellet was submitted to a second round of extraction. The pooled supernatants were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis.

## RESULTS

**Selection of amylose-defective mutants.** Over 4,000 colonies were isolated on minimal medium after UV mutagenesis of the wild-type *Chlamydomonas* strain 137C. Colonies were then replica plated on nitrogen-free medium with acetate and incubated in the light. *C. reinhardtii* was previously shown to accumulate large amounts of starch when starved for many different essential elements (2). Nitrogen starvation was chosen because it also leads to destruction of chlorophylls, enabling immediate colony staining by iodine vapors. Under these conditions, wild-type colonies were revealed by their typical dark blue color. Mutant phenotypes fell into one of two distinct phenotypic classes (red or yellow). They appeared stable and were defective under all conditions tested whether in phototrophic (light only), mixotrophic (light and acetate), or heterotrophic (dark and acetate) growth conditions. The suspected mutants were further characterized by measuring starch amounts and monitoring their  $\lambda_{\max}$  on absorption spectra after complexation with iodine. Yellow mutants turned out to be extremely low in starch (<5% of wild-type amounts) but displayed a  $\lambda_{\max}$  with iodine similar to that of the wild-type polysaccharide. They were phenotypically very similar to the *st-1-1* mutant (3) and are thus probably either directly or indirectly defective in the supply of ADP-glucose. Red mutants were characterized by, on average, a very small increase in starch amounts (10% of wild-type quantities) and a considerable shift in  $\lambda_{\max}$  of the iodine-starch complex (Table 1) which appeared similar to that described for amylose-defective (waxy) mutants of higher plants (33). The two red mutants selected (18B and 25B) were then crossed to strain 37, and segregants obtained after a random spore type of analysis were subjected to phenotypic characterization. The mutations showed clean Mendelian segregations, with no detectable linkage to other markers included in the cross. Segregants of opposite mating type carrying the starch-defective allele *st-2-1* or *st-2-2*

derived from 18B and 25B, respectively, together with other suitable genetic markers were thus obtained in order to perform complementation tests. Recessivity of the *st-2-1* and *st-2-2* mutations was checked both in the initial cross and by backcrossing with the wild-type strain 137C. The *st-2-1* and *st-2-2* mutations belonged to a single complementation class and showed less than 1% recombination after meiosis.

**Structural characterization of wild-type and mutant starch.** Starch purified from our wild-type reference (137C) and *st-2-1*- and *st-2-2*-carrying strains were subjected to both methylation and gel filtration analysis (Table 1; Fig. 1 and 2; Table 2). Results obtained by using the TSK HW-75 (25) and Sepharose CL2B (33) columns were compared, and the conclusions were essentially the same except that TSK repeatedly (five different experiments were done, two of which are shown in Fig. 1 and 2) resolved the single heterogeneous wild-type amylopectin into two distinct peaks characterized by different sizes (Fig. 1D) and structural properties (Table 2). The polysaccharide recovered from peak 2 obtained by TSK HW-75 chromatography was recovered by a 30-min centrifugation at 40,000  $\times g$  and loaded on a TSK HW-75 column, on which it eluted at the expected position. It is clear that *st-2-1*- and *st-2-2*-carrying strains are characterized not only by a severe defect in amylose biosynthesis (both mutants accumulated between 1 and 4% amylose) but also by a change in the structure of amylopectin, as evidenced by a global shift of the  $\lambda_{\max}$  of the polysaccharide-iodine complex of the amylopectin peak separated by CL2B chromatography ( $\lambda_{\max}$  565 nm). Formally identical but more demonstrative results were obtained by using a TSK column, whereby the amylopectin peak 2 was virtually lost in the mutants. Glucose amounts were measured in each peak by the amyloglucosidase assay (Fig. 2 and Table 3). We thus conclude that *ST-2* controls the biosynthesis not only of amylose but also of a substantial portion of the amylopectin.

Diploids heterozygous for either the *st-2-1* or *st-2-2* mutation displayed a twofold decrease amount of amylose relative to the wild-type haploid (Fig. 2 and Table 3) and were characterized by the replacement of amylopectin peak 2 by a single amylopectin peak ( $\lambda_{\max}$  550 nm).

Smaller-size material that was intermediate between amylose and amylopectin was detected in wild-type haploid ( $\lambda_{\max}$  600 nm) and heterozygous diploid ( $\lambda_{\max}$  585 nm) starch. This fraction amounted to 5% of total starch for the *st-2-2/+* heterozygote and the wild-type haploid and up to 9% in *st-2-1/+* diploids (as estimated by the amyloglucosidase assay).

All possible combinations of homozygous mutant diploids were constructed and yielded structures indistinguishable from the haploid mutants (not shown).

Results obtained by methylation analysis were confirmed by high-field <sup>13</sup>C NMR of the total polysaccharide fraction (Fig. 3). The major chemical shifts at 100.00, 78.9, 73.2, 71.9, 71.6, and 60.6 ppm observed in all samples can be attributed respectively to C-1, C-4, C-3, C-2, C-5, and C-6 of an  $\alpha(1\rightarrow4)$  internal glucose, while the neighboring shifts at 100.66, 70.25, and 61.09 are essentially due to C-1, C-4, and C-6 in terminal nonreducing position (4). Shifts at 100.52 and 79.24 ppm are due to C-1 and C-4, respectively, of glucose residues which are proximal to a branching point. The NMR spectra of strains 18B and 25B clearly confirm the presence of additional branching points by comparison with our wild-type reference (137C), which in turn displayed a spectrum identical to that described for higher-plant starch (4).

To ascertain the consequences of the *st-2-1* mutation on the starch granule shape and size, electron micrographs were

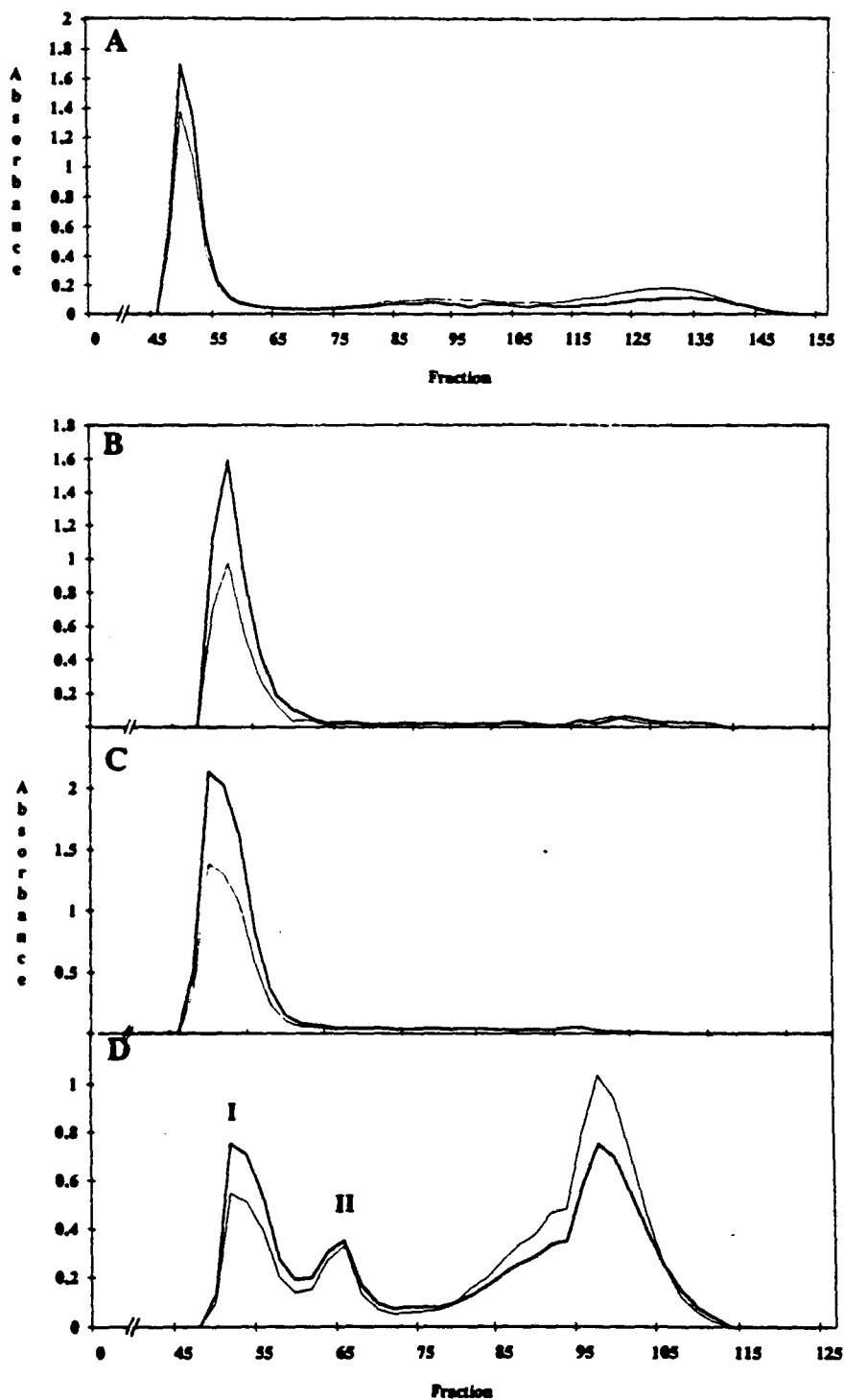


FIG. 1. Sephadex CL2B chromatography of wild-type starch (A) compared with TSK HW-75 (D) chromatography using columns of identical design (see Materials and Methods). The optical density was measured for each 3-ml fraction at 560 (thick line) and 630 nm (thin line) upon complexation with iodine. Amylose ( $\lambda_{max} > 610$  nm) was dispersed on a total of 72 fractions of 3 ml, each using Sephadex CL2B (fractions 76 to 148), and amounted to 35% of the total amyloglucosidase digestible material. This value compares favorably with the 39% that was measured by using TSK HW-75 (Table 3) and that peaked in a total of only 20 fractions (87 to 107). Fractions 75 to 86 ( $\lambda_{max}$  ranging between 590 and 600 nm) cannot be classified as amylose. Experiments depicted in panels B to D were performed on the same TSK HW-75 column and show the chromatographic separation of starch extracted from *st-2-1* (strain 18B [B])- and *st-2-2* (strain 25B [C])-carrying mutants compared with the wild-type reference (strain 137C [D]).

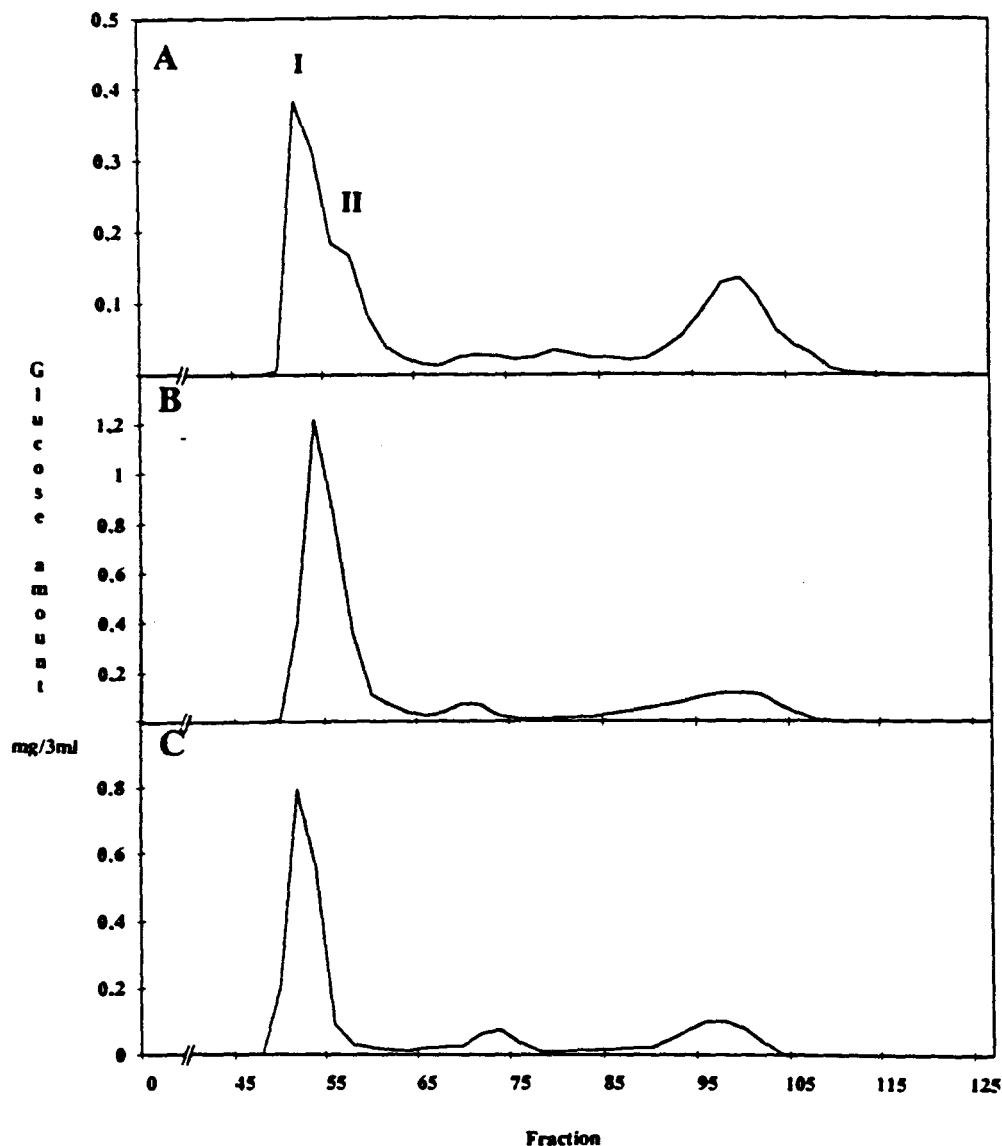


FIG. 2. TSK HW-75 chromatography of wild-type starch (A) compared with that of heterozygous *st-2-1/+* (C) and *st-2-2/+* (B) diploids. Glucose amounts were measured in each 3-ml fraction by the amyloglucosidase assay and are expressed in total milligrams contained per 3-ml fraction. All experiments were performed on the same column, which was different (although of identical design) from those used for the assay shown in Fig. 1.

TABLE 2. Structural properties of amylopectins and amylose purified by TSK HW-75 chromatography

Origin	$Q^a$	$\lambda_{max}$ (nm)	Relative amt <sup>b</sup>	
			2,3,4,6-Glc	2,3,6-Glc
137C I <sup>c</sup>	35	555	0.9	21
137C II <sup>c</sup>	21	580	0.8	19
137C amylose	39	620	0.8	60
18B	>95	540	0.9	16
25B	>95	540	0.8	15

<sup>a</sup> Glucose amounts estimated as a weight percentage after fractionation of the starch by TSK HW-75 chromatography. Glucose was measured by the amyloglucosidase assay.

<sup>b</sup> See Table 1, footnote b.

<sup>c</sup> I and II represent the two amylopectin peaks present in strain 137C.

TABLE 3. Amylose content and characterization of granule-bound starch synthase from haploid and diploid wild-type and mutant strains

Strain	Amylose <sup>a</sup>	$K_m$ ADP-glucose <sup>b</sup> (mM substrate)	$V_{max}$ <sup>c</sup>
137C	39	$3.7 \pm 1.2$	100
18B	<5	$23.2 \pm 1.7$	24
25B	<5	$4.1 \pm 2.3$	25
18B $\times$ 37	21	4.7	90
25B $\times$ 37	21	4.6	90

<sup>a</sup> Estimated as weight percentage from fractionation of the starch by TSK HW-75 chromatography. Glucose was measured by the amyloglucosidase assay.

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  SE from three separate experiments.  $K_m$  estimates from diploids originate from a single experiment.

<sup>c</sup> Percentage relative to the value for strain 137C.  $V_{max}$  of 137C is 3.7 nmol of ADP-glucose incorporated into glucan per min per mg of starch.

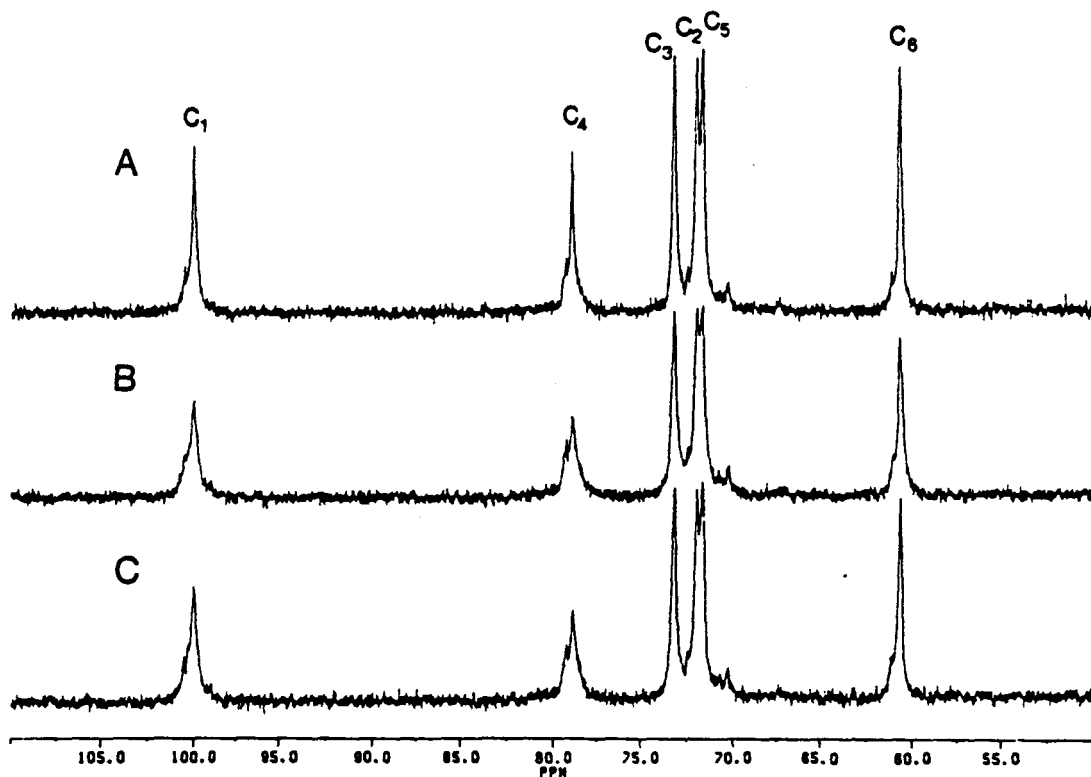


FIG. 3.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra at 100 MHz and  $80^\circ\text{C}$  in 90%  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  of 137C (A), 18B (B), and 25B (C) starches.

taken from the 18B and 137C strains (Fig. 4). Surprisingly, the morphology of pyrenoidal starch seemed to be dramatically affected by the defect, while stromal granules displayed an intermediate phenotype.

*st-2-1*- and *st-2-2*-carrying strains are characterized by a major defect in granule-bound starch synthase. The analogy that could be drawn between *ST-2* and the higher-plant waxy mutants prompted us to assay granule-bound starch synthase in our amylose-defective strains.  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$  values for ADP-glucose listed in Table 3 clearly confirm this analogy. Interestingly, we detect allele-specific variation of  $K_m$  values even for mutants with apparently identical polysaccharide structures. Soluble starch synthases were also assayed in mutant and wild-type cells. We were unable to detect any qualitative (activity in the absence of primer in the presence of 0.5 M citrate) or quantitative differences between the strains.

*st-2-1* and *st-2-2* can be correlated with allele-specific modifications of the main (waxy) 76-kDa protein associated with the starch granule. Waxy mutants in higher plants are often correlated with modifications in the electrophoretic pattern of proteins associated with the starch granule. The major granule-bound protein present in wild-type starch has been named the waxy protein and is usually absent or greatly diminished in waxy mutants (5). In very few cases, minor alterations in molecular weight of the waxy protein have been reported and were taken as initial evidence that the waxy locus encoded this protein (21). Since then, cloning and sequencing of the maize locus (10, 23) have largely confirmed this hypothesis. Our experiments (Fig. 5) show that in *C. reinhardtii*, there is a major 76-kDa protein that is greatly diminished in *st-2-2*-carrying strains and is replaced in *st-2-1* mutants by a 56-kDa polypeptide which is present in

amounts similar to that of the wild-type 76-kDa protein. Both proteins were characterized by identical N-terminal amino acid sequences (unpublished data). By analogy with higher plants, we will call these waxy proteins. Other minor proteins (at 55 and 66 kDa) could also be observed during these experiments and were not affected by the mutations.

Allele-specific  $K_m$  variations of granule-bound starch synthase cosegregate in crosses with the 76- and 56-kDa waxy proteins. Allele-specific variation of  $K_m$  values for mutants with apparently identical polysaccharide structures gives us a unique opportunity to test whether granule-bound starch synthase kinetic parameters and molecular weight of the waxy protein are linked phenotypes. On a total of 10 different meiotic products obtained in a cross between strains B20 and 25B, all five strains carrying the 56-kDa protein were characterized by  $K_m$  values ranging between 25 and 20 mM ADP-glucose, while the five segregants carrying the 76-kDa protein displayed  $K_m$  values ranging between 1.5 and 4 mM ADP-glucose, establishing that both phenotypes are genetically linked. The diminished amount of 76-kDa protein present in the *st-2-2*-carrying segregants (25% of the wild-type) was tightly correlated with the decrease in total granule-bound activity, suggesting that the apparently normal enzyme is present in lesser quantities in the starch of these mutants.

## DISCUSSION

Waxy mutations have been described in higher plants that affect amylose biosynthesis only in starch accumulated in nonphotosynthesizing plastids: the amyloplasts. Only in one well-documented case, in potato, has an effect been scored in microsomes (9), in columella cells of the root cap, and in



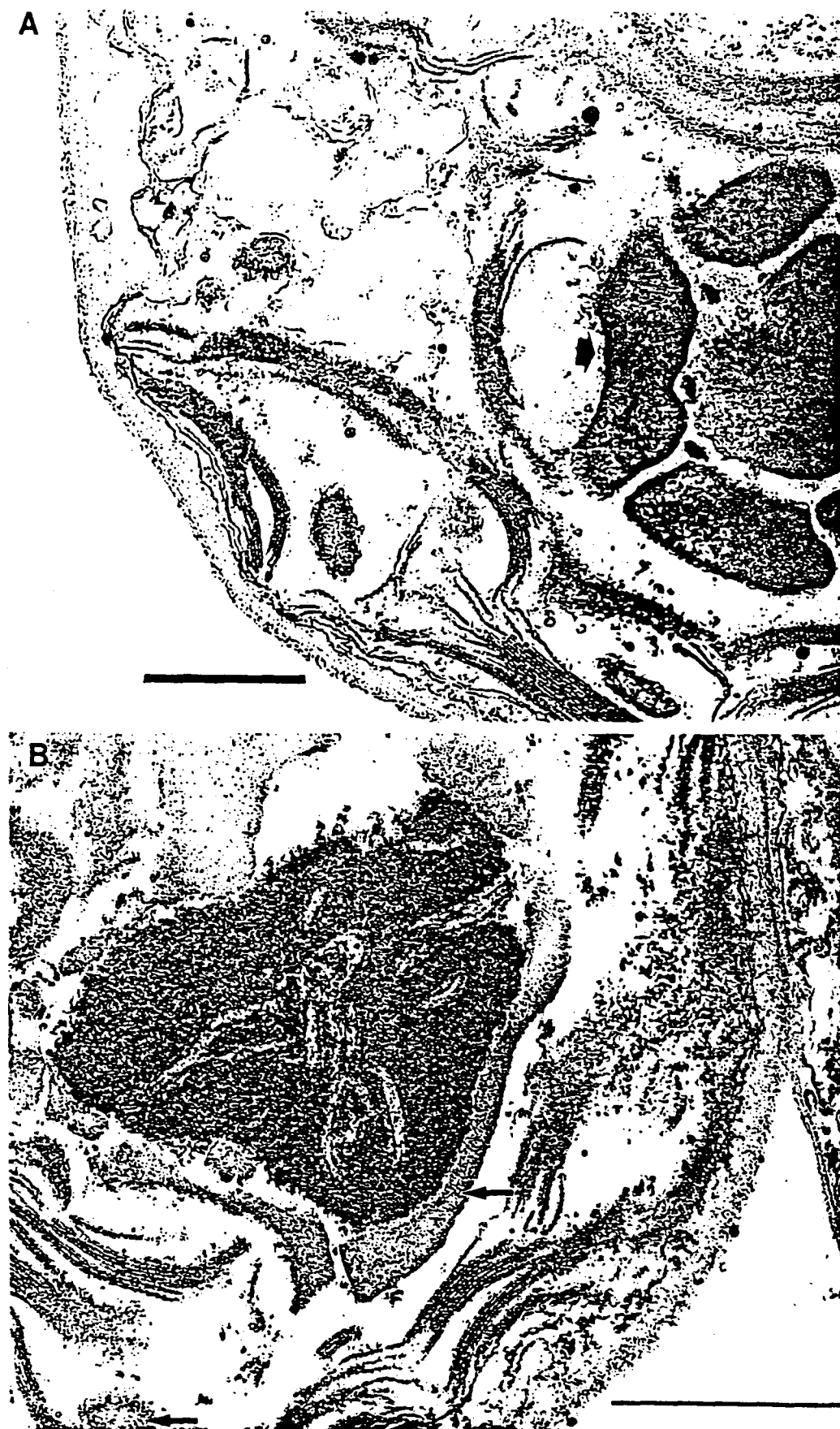


FIG. 4. Typical pyrenoid from wild-type strain 137C (A) compared with that of 18B, an *st-2-1*-carrying strain (B). The latter is surrounded by a highly disorganized crown of starch granules, in sharp contrast to the classical compact structure displayed by *Chlamydomonas* wild-type starch (2). The starch granules are shown by arrows. Bars = 1  $\mu$ m.

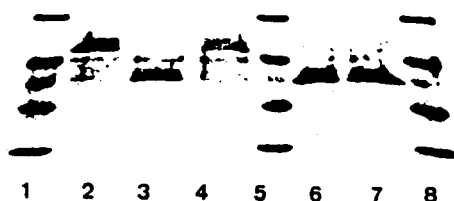


FIG. 5. Coomassie blue stain of an SDS-5 to 15% acrylamide gel of total proteins extracted from 5 (lanes 2 to 4) or 10 (lanes 6 and 7) mg of starch granule preparations. Lane 2 is a wild-type sample; lanes 3 and 6 (strain 18B) and lane 7 (B20) are samples from *st-2-1*-carrying strains; lane 4 (strain 25B) is a sample from an *st-2-2*-carrying strain. Lanes 1, 5, and 8 are molecular size standards (from top to bottom, 94, 67, 43, and 30 kDa).

some leaf cells which was not in all cases correlated with the phenotype present in the tubers (27, 29). However, all of these findings were based on simple cytological observations, with no purification of the starch. Our results for *C. reinhardtii* clearly suggest that waxy-related gene products controls the biosynthesis of amylose in all types of plastids and starch-accumulating eukaryotes during both autotrophic and heterotrophic growth. The absence of amylose which typifies waxy mutants has led to the widespread view that the remaining polysaccharide is pure amylopectin. However, when one takes a closer glance at the  $\lambda_{max}$  of the iodine-polysaccharide complex published for wild-type and waxy maize amylopectin after Sepharose CL2B chromatography (33), a dramatic shift (from 540 to 480 nm) can be seen together with a loss of apparent heterogeneity of the reported values. We have observed an analogous phenomenon in *C. reinhardtii* by using CL2B chromatography. Moreover, we have systematically observed a separation of the single heterogeneous amylopectin peak into two distinct peaks. Both of these peaks can be characterized as amylopectin by their size and number of branching points (as seen by methylation analysis). It is clear that amylopectin peak 2 is missing both in *st-2-1*- and *st-2-2*-carrying strains and in heterozygote diploids. The mutant amylopectin seems also to differ from wild-type peak 1. Thus, it appears that in addition to the synthesis of amylose, the waxy gene product controls, at least in *Chlamydomonas* spp. and more likely in all plants, that of an important fraction of the wild-type amylopectin. The waxy locus has been cloned from barley (19) and completely sequenced in maize (10, 23), and a waxy cDNA has also been obtained from *Solanum tuberosum* (28). All of these sequences have been cloned by using as the starting point the main granule-associated protein that is missing or altered in the mutants. That this waxy protein is the product of the waxy gene and that this locus is responsible for the presence or absence of amylose are thus beyond doubt.

That the waxy protein might harbor ADP-glucose glycosyltransferase activity was recently further suggested by comparing the *E. coli* glycogen synthase protein with the waxy products of maize and barley (15). However, the reported homology is on the whole very weak and confined to the N terminus. That this homology is still significant is suggested by conservation of the putative ADP-glucose binding site (15).

What at this point remains a matter of debate is whether

this protein is or is not the main granule-bound starch synthase. In fact, the absence of activity in the mutants and the proportional increase in activity with respect to the wild-type allele dose in gene dosage experiments (26) can be easily explained if one assumes that the main granule-bound starch synthase binds to amylose without being the product of the waxy gene. This argument, first suggested by Preiss and Levi (17), remains valid even in face of the recently reported complementation of the *amf* (an equivalent of waxy) mutation of potato by the wild-type gene encoding the major granule-bound protein (27). The problem with testing this hypothesis is that even modifications in the kinetics of the activity can be attributed to structural environment modifications in the granule and not necessarily to the enzyme itself. It seemed that the only way to get around this argument would be to solubilize the activity and determine whether it copurifies with the waxy gene product. This has been achieved in only three cases and with uncertain or conflicting results (13, 24, 30). In maize, two starch synthases were solubilized from the granule and displayed distinct immunological and biochemical properties, one of which had a molecular mass (60 kDa) similar to that of the waxy protein. Eighty percent inhibition was scored on this solubilized starch synthase activity with use of an antibody elicited against whole granule-bound proteins (13), while 20 to 40% inhibition was reported on the native soluble enzymes. However, both granule-bound activities appeared diminished in waxy mutants. Results obtained by Vos-Scheperkeuter et al. (30) are even more confusing since these authors were unable to solubilize the activity from potato starch granules and relied on partial inhibition of the amaranth solubilized enzyme by an antibody prepared, this time, against the purified waxy protein from potato (and not whole granule-bound proteins). In the latest report (24), a 59-kDa waxy protein was identified in pea by cross-reaction with the same antibody elicited against the waxy protein of potato. No inhibition of the activity was found with use of this antibody, which recognized the main 59-kDa granule-bound protein from pea. However, an antibody raised against a 77-kDa protein associated with pea starch granules that copurified with the major and possibly only solubilized activity did not recognize any of the waxy proteins.

In this paper, we report allele-specific variation of  $K_m$  for ADP-glucose of granule-bound starch synthase not only between wild-type and mutant granules (which could be accounted for by a modification in structure of the starch) but also between strains carrying mutant alleles, leading to similar starch structures. The latter could be seen to cosegregate in crosses with waxy proteins of distinct molecular weights. Since  $K_m$  for ADP-glucose is an intrinsic property of granule-bound starch synthases and since waxy proteins display some similarity to the *E. coli* enzyme (15), our observations cannot be easily accounted for by any hypothesis other than that stating that the waxy or *ST-2* genes encode the major granule-bound starch synthase.

The absence of the amylopectin peak 2 fractions in our *st-2-1*- and *st-2-2*-carrying mutants suggests that granule-bound starch synthase is able to elongate chains from a nonreducing end available on an amylopectin molecule to generate peak 2. Leloir et al. (12) initially showed that granule-bound starch synthase is able in vitro to incorporate glucose into the amylopectin fraction under high concentrations of the nonphysiological substrate UDP-glucose. These results were confirmed by Baba et al. (1) in their in vitro synthesis experiments using the natural substrate ADP-

glucose at concentrations closer to what is generally thought as physiological.

Our results establish a major role for granule bound starch synthase in vivo in the biosynthesis of what is usually defined as amylopectin either by direct synthesis or by branching of amylose. That all amylose is synthesized directly from amylopectin remains in this respect an interesting working hypothesis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Université des Sciences et Techniques de Lille, by the Ministère de l'Éducation Nationale, and by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS no. 111, Director André Verbert). We thank André Dhainaut (UFR de Biologie, Université des Sciences et Techniques de Lille) for helping with the electron microscopy.

#### REFERENCES

- Baba, T., M. Yoshii, and K. Kainuma. 1987. Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots. *Starch/Stärke* 39:52-56.
- Ball, S. G., L. Dirick, A. Decq, J. C. Martiat, and R. F. Matagne. 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66:1-9.
- Ball, S., T. Marianne, L. Dirick, M. Fresnoy, B. Delrue, and A. Decq. 1991. A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 185:17-26.
- Dais, P., and A. S. Perlin. 1982. High-field,  $^{13}\text{C}$ -N.M.R. spectroscopy of  $\beta$ -D-glucans, amylopectin, and glycogen. *Carbohydr. Res.* 100:103-116.
- Echt, C. S., and D. Schwartz. 1981. Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at the waxy locus in maize. *Genetics* 99:275-284.
- Harris, E. H. 1989. Culture and storage methods, p. 25-63. In E. Harris (ed.), *The Chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use—1989*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Harris, E. H. 1989. Genetic analysis, p. 399-446. In E. Harris (ed.), *The Chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to biology and laboratory use—1989*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Harris, E. H. 1989. Histological techniques for *Chlamydomonas*, p. 581-586. In E. Harris (ed.), *The Chlamydomonas sourcebook. A comprehensive guide to Biology and laboratory use—1989*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., E. Jacobsen, A. S. Ponstein, R. G. F. Visser, G. H. Vos-Scheperkeuter, E. W. Bijmolt, J. N. de Vries, B. Witholt, and W. J. Feenstra. 1987. Isolation of an amylose-free mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 75:217-221.
- Klöggen, R. B., A. Gierl, Z. Schwarz-Sommer, and H. Saedler. 1986. Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*. *Mol. Gen. Genet.* 203:237-244.
- Konishi, Y., H. Nojima, K. Okuno, M. Asaoka, and H. Fuwa. 1985. Characterisation of starch granules from waxy, nonwaxy and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.* 49:1965-1971.
- Leloir, L. F., M. A. Rongine De Fekete, and C. E. Cardini. 1961. Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.* 236:636-641.
- Macdonald, F. D., and J. Preiss. 1985. Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize. *Plant Physiol.* 78:849-852.
- Paz Parente, J., P. Cardon, Y. Leroy, J. Montreuil, B. Fournet, and G. Ricart. 1985. A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfanyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 141:41-47.
- Preiss, J. 1991. Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation, p. 59-114. In B. J. Mifflin (ed.), *Oxford surveys of plant molecular and cell biology*, vol. 7. Oxford University Press, Oxford.
- Preiss, J., and E. Greenberg. 1967. Biosynthesis of starch in *Chlorella pyrenoidosa*. I. Purification and properties of the adenosine diphosphoglucose:  $\alpha$ -1, 4-glucan,  $\alpha$ -4-glucosyl transferase from *Chlorella*. *Arch. Biochem. Biophys.* 118:702-708.
- Preiss, J., and C. Levi. 1976. Starch biosynthesis of and its regulation, p. 371-423. In E. P. K. Stump, and E. E. Conn (ed.), *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*, vol. 3. Academic Press, San Diego, Calif.
- Preiss, J., and T. Romeo. 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv. Microb. Physiol.* 30:183-238.
- Rohde, W., D. Becker, and F. Salamini. 1988. Structural analysis of the waxy locus from *Hordeum vulgare*. *Nucleic Acids Res.* 16:7185-7186.
- Sanwal, G. G., and J. Preiss. 1967. Biosynthesis of starch in *Chlorella pyrenoidosa*. II. Regulation of ATP:  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate adenylyl transferase (ADP-glucose pyrophosphorylase) by inorganic phosphate and 3-phosphoglycerate. *Arch. Biochem. Biophys.* 119:454-469.
- Schwartz, D., and C. S. Echt. 1982. The effect of *Ac* dosage on the production of multiple forms of wx protein by the wx<sup>m-y</sup> controlling element mutation in maize. *Mol. Gen. Genet.* 187:410-413.
- Shannon, J. C., and D. L. Garwood. 1984. Genetics and physiology of starch development, p. 25-86. In R. L. Whistler, J. N. Bemiller, and E. F. Paschall (ed.), *Starch: chemistry and technology*, 2nd ed. Academic Press, Orlando, Fla.
- Shure, M., S. Wessler, and N. Federoff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233.
- Smith, A. M. 1990. Evidence that the "waxy" protein of pea (*Pisum sativum* L.) is not the major starch-granule-bound starch synthase. *Planta* 182:599-604.
- Takeda, Y., and S. Hizukuri. 1986. Purification and structure of amylose from rice starch. *Carbohydr. Res.* 148:299-308.
- Tsai, C. Y. 1974. The function of the Waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem. Genet.* 11:83-96.
- Van der Leij, F. R., R. G. F. Visser, K. Oosterhaven, D. A. M. Van der Kop, E. Jacobsen, and W. J. Feenstra. 1991. Complementation of the amylose-free starch mutant of potato (*Solanum tuberosum*) by the gene encoding granule-bound starch synthase. *Theor. Appl. Genet.* 82:289-295.
- Visser, R. G. F., M. Hegersberg, F. R. Van der Leij, E. Jacobsen, B. Witholt, and W. J. Feenstra. 1989. Molecular cloning and partial analysis of the gene for granule-bound starch synthase from a wild-type and an amylose-free potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Sci.* 64:185-192.
- Visser, R. G. F., I. Somhorst, G. J. Kuipers, N. J. Ruys, W. J. Feenstra, and E. Jacobsen. 1991. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. *Mol. Gen. Genet.* 225:289-296.
- Vos-Scheperkeuter, G. H., W. De Boer, R. G. F. Visser, W. J. Feenstra, and B. Witholt. 1986. Identification of granule-bound starch synthase in potato tubers. *Plant Physiol.* 82:411-416.
- Wang, Z., Z. Wu, Y. Xing, F. Zheng, X. Guo, W. Zhang, and M. Hong. 1990. Nucleotide sequence of rice waxy gene. *Nucleic Acids Res.* 18:5898.
- Weatherwax, P. 1922. A rare carbohydrate in waxy maize. *Genetics* 7:568-572.
- Yeh, J. Y., D. L. Garwood, and J. C. Shannon. 1981. Characterization of starch from maize endosperm mutants. *Starch/Stärke* 33:222-230.

ANNEXE 2

TOWARDS AN UNDERSTANDING OF THE BIOGENESIS OF THE STARCH  
GRANULE : *CHLAMYDOMONAS* SOLUBLE STARCH SYNTHASE II CONTROLS  
THE SYNTHESIS OF INTERMEDIATE SIZE GLUCANS OF AMYLOPECTIN\*

Thierry Fontaine, Christophe D'Hulst, Marie-Lise Maddelein, Françoise Routier, Thérèse Marianne Pépin, André Decq, Jean-Michel Wieruszeski, Brigitte Delrue, Nathalie Van den Koornhuyse, Jean-Pierre Bossu, Bernard Fournet and Steven Ball<sup>+</sup>.

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n°111,  
Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois 59655 VILLENEUVE  
D'ASCQ Cedex  
France

5 figures, 2 tables

+ : To whom correspondance should be addressed

Fax : 20.43.65.55

Tel : 20.43.65.43

Running title: Amylopectin defective mutants of *Chlamydomonas*

## SUMMARY

Low starch mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* were isolated after X-ray mutagenesis of wild-type strain 137C. The mutants accumulated 20 to 40% of the normal amount and displayed a twofold decrease of the total glycogen primed soluble starch synthase activity. 3 different mutant alleles of the *ST-3* gene were isolated that were characterized by similar defects and displayed a net increase in amylose content. Amylose primed synthesis of glucan in native gels revealed a complete wipe out of one of the soluble starch synthases. Zymograms and kinetic analyses performed both in the mutant and in partially purified wild type extracts reveal at least 2 distinct activities that are partly analogous to higher plant soluble starch synthases I and II (SSI and II). The *st-3* mutants were defective for SSII. Methylation and debranching of the purified amylopectin fraction clearly show a decrease in the number of intermediate size glucans (dp8 to 50) and an absolute and relative increase of very short glucans (dp2 to 7). These results strongly suggest that a soluble starch synthase is necessary for the synthesis or maintenance of intermediate size glucans that are the main component of the branched clusters of amylopectin.

Starch the storage carbohydrate of most higher and lower plants occurs as a large complex insoluble granule located both in leaf chloroplasts and in the amyloplasts of storage organs. It contains at least 2 types of polysaccharides : amylopectin can be defined as a very high molecular weight ( $-10^7$  to  $10^8$ )  $\alpha$ -1,4-linked glucan with a significant number (5%) of  $\alpha$ -1,6-linkages giving a moderately branched structure (for a review see Manners, 1989). Amylose is usually defined as a smaller (MW  $-10^5$  to  $10^6$ )  $\alpha$ -1,4-linked glucan with a significantly lower number of branches (<2%). Amylopectin, usually the most abundant of the 2 fractions is considered the backbone of the granule whereas amylose fits in, in some still unknown fashion. Our present limited understanding of the biogenesis of the starch granule's complicated structure stems essentially from genetic and biochemical investigations performed in higher plants of which maize has undoubtedly been the most thoroughly studied (for reviews see Preiss, 1991; Preiss and Levi, 1976; Shannon and Garwood 1984). From a biochemical point of view, 4 ADPglucose:1,4- $\alpha$ -D-Glucosyltransferases (starch synthases) (Ozbun *et al.*, 1971; Macdonald and Preiss, 1983; Macdonald and Preiss, 1985) and at least 2 maybe 3 branching enzymes (1,4- $\alpha$ -D-Glucan:1,4- $\alpha$ -D-Glucan 6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-Glucano)-Transferases) (Boyer and Preiss, 1978; Singh and Preiss, 1985) have been described in the maize endosperm. Two of the reported starch synthases have been shown to be associated with the starch granule and to be different from the two soluble starch synthases (SSI and SSII) (Macdonald and Preiss, 1985). It is reasonable to think that all these enzymes individually or in complexes are specialized in the biosynthesis of specific granule substructures. Five genetic loci have been shown to be directly involved the granule's structure in maize. These include *su-1* and *su-2* (sugary), *ae* (amylose extender), *du* (dull) and *wx* (waxy) (for a review see Shannon and Garwood 1984). The defects have been investigated either on their own or in combination with one another (Creech, 1965). Despite many efforts no clear-cut picture has yet emerged explaining the biosynthesis of the starch granule. As yet only amylose synthesis seems to be partly understood. In fact waxy mutants characterized by the absence of both amylose and the major granule bound starch synthase (GBSS) have been described in many higher plants (Weatherwax, 1922; Konishi *et al.*, 1985; Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987) and more



recently in unicellular green algae (Delrue *et al.*, 1992). It is now well established that GBSS is the main polypeptide associated with the starch granule and that this waxy protein is the product of the *wx* gene (Echt and Schwartz, 1981; Schwartz and Echt 1982; Shure *et al.*, 1983; Van der Leij *et al.*, 1991; Preiss, 1991; Delrue *et al.*, 1992). Granule bound starch synthase is thus responsible for amylose biosynthesis *in vivo*. Moreover GBSS has been shown to be able to add glucose *in vitro* to the amylopectin fraction (Leloir *et al.*, 1961; Baba *et al.*, 1987). We have recently demonstrated that in *Chlamydomonas* at least and perhaps in all plants a substantial portion (20%) of the wild-type amylopectin synthesis is also due to the main granule-bound starch synthase (Delrue *et al.*, 1992). In this paper we report the characterization of low starch mutants defective for the main soluble starch synthase due to mutations in the *ST-3* gene. We show that the mutations all lead to an apparent increase of amylose and considerable modification of the residual amylopectin. The latter displayed an increase in very short (dp 2 to 7) chains and a concomitant decrease of intermediate size (dp 8 to 60) glucan chains. These results strongly suggest that the missing soluble starch synthase is necessary for the synthesis or maintenance of intermediate size amylopectin chains and thus for that of the branched clusters of amylopectin. The significance of the short chain presence with respect to the specificity of amylopectin branching is discussed.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Materials*-[U-<sup>14</sup>C] Glucose 1-phosphate, [D-glucose-U-<sup>14</sup>C] adenosine diphosphate glucose were purchased from Amersham (U.K.). ADP-glucose, maize amylopectin and *Pseudomonas amyloferamosa* isoamylase were from Sigma. Glucose-1-phosphate, rabbit muscle glycogen and rabbit muscle phosphorylase a were obtained from Boehringer (Mannheim, Germany). DEAE Trisacryl type M was from IBF Biotechnics (Villeneuve la Garenne, France)

*Chlamydomonas Strains, Growth Conditions and Media*-The two wild type strains of *C.reinhardtii* were used in this study were 137C (*mt<sup>-</sup> nit-1 nit-2*) and 37 (*mt<sup>+</sup> pab-2 ac-*



14). I152, I154, I39 are independent mutants directly derived from strain 137C by X-ray mutagenesis at  $2.58 \text{ C Rg}^{-1}$  (at 2% cell survival) and carry the *st-3-1* (I152), the *st-3-2* (I154) and the *st-3-3* (I39) mutant alleles. B9 and B5 are meiotic recombinant strains of *mt<sup>+</sup> pab-2 ac-14* genotype carrying respectively the *st-3-1* and *st-3-2* alleles. Genetic techniques are described in Harris (1989b). Standard media are fully detailed in Harris (1989a) while growth conditions, nitrogen starved media and diploid clone selection are described in Ball et al. (1990), Ball et al. (1991) and Delrue et al. (1992).

*Measures of starch levels, starch purification and spectral properties of the iodine-starch complex*-A full account of amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradients and  $\lambda_{\text{max}}$  measures can be found in Delrue et al. (1992).

*Crude extract preparation*-Soluble crude extracts were always prepared from late log phase cells ( $2 \cdot 10^6 \text{ cells.ml}^{-1}$ ) grown in HSA (High Salts Acetate) under continuous light ( $80 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ ). The cell pellet was suspended to a concentration of  $2 \cdot 10^8 \text{ cells.ml}^{-1}$  in 50 mM Tris-acetate (pH7.5), 2.5 mM DTT, 10mM EDTA and was ruptured by mechanical disruption twice (10000 psi) in a French press. The supernatant cleared by a 15 min 10000g centrifugation was further purified by Biogel P2 chromatography. Crude extracts were kept at the most one hour on ice. Proteins were determined according to Lowry.

*Enzyme assays*-Total soluble starch synthase activity was assayed in 0.1 ml final volume of 50 mM glycine NaOH (pH 9), 100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> BSA, 10 mg.ml<sup>-1</sup> rabbit liver glycogen, 4 mM ADP-glucose containing 1 nmol of  $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{ADP-glucose}$  (specific activity :  $200 \mu\text{Ci.}\mu\text{mol}^{-1}$ ). After 15 minute incubation at 30°C, the reaction was stopped by adding 2 ml ice cold ethanol. The resulting precipitate was filtered, rinsed, dried and counted in a liquid scintillation counter. Citrate stimulated activity was monitored as above except that 0.5 M citrate was added prior to incubation. Branching enzyme assays were performed by using branching amplification of unprimed phosphorylase a mediated glucan synthesis (Boyer and Preiss 1978). The procedure adapted for *Chlamydomonas* is described in Ball et al. (1991).

*Soluble starch synthase partial purification*-All steps were carried out at 4°C. Fresh crude extracts prepared as above from a total of  $10^{10}$  cells (300 mg protein) were subjected to precipitation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 35%. The precipitate was redissolved in 2ml of 50 mM Tris-acetate (pH7.5), 2.5 mM DTT, 10mM EDTA and extensively dialysed against the same buffer (fraction A). The first supernatant was concentrated by precipitation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  at 65% and redissolved as before (fraction B). Fraction A and B were further cleared by ultracentrifugation and loaded on a DEAE Trisacryl type M column (2.5 cm i.d., 35 cm long) feeded with 400 ml of a 0-0.5 M KCl linear gradient. 3.5 ml fractions were collected for immediate analysis.

*Zymograms*-5 to 10  $\mu\text{g}$  protein from crude extracts were subjected to separation on a native 7.5 % precasted polyacrylamide gel (Phast System Pharmacia (Uppsala, Sweden)) for 30 to 45 min. Unlabelled enzyme buffers for branching enzyme and starch synthase staining were the same as above with the exception of 0.01 mg per ml amylose which replaced glycogen as a primer for the starch synthase. Gels were incubated 4 and 12 hours respectively for starch synthase and branching enzyme and subsequently stained using a freshly prepared 0.2%  $\text{I}_2$  0.02% KI stock solution.

*Starch Fractionation and Methylation*-Separation of starch fractions on TSK HW-75(S) columns (Merck) was as previously detailed (Delrue et al., 1992). Methylation of total starch and of fractions dialysed and freeze-dried after TSK HW-75 chromatography was performed according to Paz Parente et al.(1985) and adapted to starch analysis (Delrue et al., 1992).

*NMR*-The  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  n.m.r. spectra were obtained on a BRUKER AM-400 WB spectrometer equipped with a 5 mm mixed  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  probehead, operating in the pulsed F.t. mode and controlled by an Aspect 3000 computer with an array processor. The  $^1\text{H}$  spectra were obtained with a spectral width of 3000 Hz for 16K size domain and time domain data points (PW  $90^\circ$  for  $^1\text{H} = 7.2\mu\text{s}$ ) The  $^{13}\text{C}$  n.m.r. experiments were performed with the standard BRUKER pulse-program POWGATE with  $^1\text{H}$  broadband composite pulse decoupling. The products were analyzed in dimethylsulfoxide- $\text{D}_6/\text{D}_2\text{O}$ , 80:20, at  $90^\circ\text{C}$ . ( $\delta\text{-CH}_3$  of DMSO = 2.6 ppm for  $^1\text{H}$  and 39.6 ppm for  $^{13}\text{C}$ ). A  $90^\circ$  pulse (4.8  $\mu\text{s}$ ) and a 1.0

s recycle delay were used in each experiment.

*Debranching analysis*-10 mg of freeze-dried material that was purified by TSK HW-75 chromatography is dissolved by heating (100°C) in 0.21 ml DMSO for 10 min and diluted in 1.7 ml of 55 mM sodium acetate pH 3.5. The mixture is incubated for 4 hours at 45°C with 3 units of isoamylase and the reaction is stopped by heating (100°C) for 10 min. After cooling and centrifugation at 10000g for 10 min the water soluble material was desalted by an additional chromatographic step on a TSK HW-40(S) column ( 1.6 cm i.d., 50 cm long) fed by 0.5 % (v/v) acetic acid. The pooled polysaccharide fractions were evaporated down to 1 ml and subjected both to TSK HW-50(F) chromatography using a 50 cm long column (i.d. 1.6 cm) fed by 0.5 % (v/v) acetic acid and to h.p.a.e.-p.a.d (Carbo PAC PA-100 column (Dionex), 1 ml/min flow, buffer A : 0.1 M NaOH, buffer B : 0.1 M NaOH, 1 M sodium acetate) (gradient : 0 to 5 min: 95% A, 5% B (isocratic); 5 to 17 min: 80% A, 20% B (linear); 17 to 45 min: 70% A, 30% B (linear). Crude separation of small chains could also be monitored prior to desalting by T.L.C. on silica gel 60 (Kieselgel 60, Merck) using butanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O (2:1:1.5, by vol.) and orcinol sulfuric staining.

## RESULTS

*Selection of high amylose mutants*-14000 colonies that had survived the X-ray treatment were replica plated onto nitrogen-free medium supplied with acetate and incubated in the light. *Chlamydomonas reinhardtii* was previously shown to accumulate large amounts of starch when starved for many different essential elements (Ball *et al.*, 1990). Nitrogen starvation is especially suited since it leads to a pronounced destruction of chlorophylls enabling thus immediate staining by spraying iodine vapours onto petri dishes. If ever pigment interference still complicated our observations, the staining was repeated after spontaneous bleaching of the clones. This usually happened in less than 24 hours after the first lethal iodine treatment. We were thus able to distinguish 3 different mutant phenotypes which were clearly distinguishable from the typical dark blue stain due to the interaction between iodine and wild-type starch. In addition to the yellow and red mutants

that both appeared at frequency of  $10^{-4}$  (Ball *et al.*, 1991; Delrue *et al.*, 1992), there was a third mutant class that appeared at high frequency ( $4 \cdot 10^{-4}$ ) during our X-ray mutagenesis experiments. These were the so-called olive mutants that accumulated low amounts of starch (from 20 to 40%). The presence of the greenish color led us to suspect that these mutants accumulated a high amylose starch. This seemed to be confirmed by measuring a  $\lambda_{\max}$  of the iodine polysaccharide complex that was over 600nm. The 3 independently selected mutants were then crossed with the wild-type strain 37 and all displayed classical single gene mendelian inheritance while the phenotypes of the vegetative heterozygous diploids showed complete recessiveness of the defects. Segregants of opposite mating type bearing the nuclear markers from strain 37 and mutations from strains I152 and I154 were used in standard complementation tests both with the olive mutants and with *st-2-1* and *st-1-1* carrying strains. Results obtained with vegetative diploids were confirmed by meiotic analysis performed on the very same crosses. No complementation was observed and no recombinants were scored on a total of 96 segregants in each case where both parents crossed were of the olive phenotype. Moreover the mutations segregated independently from both *st-1-1* and *st-2-1*. Since strains I152, I154, and I39 are all independent mutants, we conclude that they represent 3 different alleles (*st-3-1*, *st-3-2*, *st-3-3*, respectively) of a new *Chlamydomonas* locus conditioning both starch structure and amount.

*Structural characterization of mutant starch.* In order to further investigate the structural modifications undergone by the *st-3* carrying mutants, we subjected their starch to gel filtration analysis and comparison with the wild type 137C strain from which they were derived (Fig. 1). As previously described (Delrue *et al.*, 1992) TSK HW-75 chromatography separated the wild-type amylopectin into two fractions characterized by different structural properties. The overall increase in amylose was always significant in the mutants relative to the wild-type controls (the amylose of which can fluctuate between 20 and 40% of total starch). While relative amounts of wild-type peak I and II with respect to amylose is subject to some variation, the structural properties of both amylopectin peaks are remarkably constant. It is obvious that all 3 mutants retain a single amylopectin species very heterogeneous as far as size is concerned but homogeneous with respect to structure as

witnessed by the constance of the  $\lambda_{\max}$  upon complexation with iodine over the entire size span of the amylopectin. The  $\lambda_{\max}$  of all residual mutant amylopectin peaks were identical to those measured for wild-type peak II (table 1). The increase in  $\lambda_{\max}$  suggested the presence of a loosely branched amylopectin. These results seemed to question those obtained by methylation analysis of both, total starch and the purified amylopectin or amylose fractions (table 1). This analysis repeatedly yielded a similar percentage of  $\alpha$ -1,6-linked residues in the amylopectin of the I152 mutant strain with respect to both wild-type amylopectin peaks. The proton n.m.r data also suggest the presence of abundant branches in the amylopectin of that strain (Fig. 3).

*Debranching of wild-type and mutant amylopectin*- The only way to reconcile our methylation results with those obtained by monitoring the iodine polysaccharide interaction would be to suppose the presence of numerous very short (dp < 12) glucans at branch points that would not interfere with the formation of high  $\lambda_{\max}$  iodine polysaccharide complexes. Purified amylopectin from strains I152 and our wild-type reference 137C was subjected to debranching using isoamylase from *Pseudomonas amyloclavata*. The water soluble linear malto-oligosaccharide yields were reproducible and characteristic for each starch extract. I152 amylopectin constantly yielded around 20% soluble material while 137C soluble debranched amylopectin fraction amounted to 40% of total debranched glucans. The soluble linear malto-oligosaccharide were then subjected to high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (h.p.a.e.-p.a.d.). The results (Fig. 2) clearly show a very significant decrease of intermediate size glucans (8 to at least 25) in the I152 strain. This defect is accompanied in all cases by the presence of abundant very short glucans (DP 2 to 7, with a maximum at 2) which thus resolves the aforementioned paradox. These stubs were also revealed by standard thin layer chromatography on silica gel 60 (not shown). While h.p.a.e.-p.a.d. proved very useful to investigate the distribution of the debranched products up to 25 glucose residues, the analysis was to be completed by TSK-HW 50 gel filtration which showed that the defect is not limited to glucans in the 8 to 25 glucose residue size span but also covers the 25 to 50 dp range which together make up the bulk of the intermediate size chains of amylopectin (Fig.3).

*<sup>13</sup>C and proton NMR analysis of standard and mutant amylopectins and amylose-*

The proton n.m.r spectra of amylopectin from an *st-2-1* carrying strain was compared to that of an *st-3-1* carrying mutant and to that of the amylose fractions, all purified by TSK-HW75 chromatography (Fig 4). The level of branching of the amylopectin was estimated by integration of the same regions of anomeric proton resonances of the mono- and disubstituted glucose (Gidley, 1985) ( $\delta$  around 5.2 and 4.85 ppm respectively). Branching was calculated to be on the order of 1 to 20 for the *st-2-1* standard amylopectin and 1 to 10 for the *st-3-1* amylopectin confirming thus that the latter is at least as branched. The branching of amylose was undetectable and estimated to be inferior to 1 to 50 in the same experiment. The <sup>13</sup>C n.m.r spectrum of the mutant amylopectin differs drastically from that of our *st-2-1* carrying reference strain. Since this strain contains abundant intermediate size glucans of the amylopectin clusters, we conclude that the signals missing at both the C<sub>1</sub> and C<sub>4</sub> resonance regions reflect a selective decrease of these chains leading to a simplification of the <sup>13</sup>C n.m.r spectrum and a relative enhancement of the main signals. On the whole, while the level of branching is at least as high in the *st-3-1* amylopectin, the <sup>13</sup>C n.m.r spectrum places this material as intermediate between classical amylose and amylopectin.

*Investigation of the enzymological defect in st-3 carrying strains-*In order to correlate the defect in intermediate size glucan synthesis with a particular enzyme of starch metabolism, we have assayed in crude extracts all possible enzymes involved in starch biosynthesis or breakdown. A 40 to 60% decrease in total glycogen primed soluble starch synthase activity was found in all *st-3* carrying haploid strains. This was confirmed by similar experiments performed in homozygous mutant and wild-type diploids. Interestingly heterozygous vegetative diploids displayed intermediate activity levels which contrasted with the complete recessiveness displayed by the starch structure phenotype as witnessed by TSK HW-75 chromatography. This suggests that the amount of enzyme activity in wild-type cells is not rate limiting. These first crude experiments were confirmed by analyzing the activities on native gels where a complete wipe out of all amylose primed glucan synthesis was detected for all strains carrying *st-3* alleles (*st-3-1*, *st-3-2*, *st-3-3*).

Heterozygous diploids were characterized by intermediate intensities of the band stains on zymograms confirming thus the crude extract assays. In order to rule out an interference on amplification of the starch synthase mediated glucan synthesis due to the decrease of a particular branching enzyme activity, we decided to assay these enzymes both in crude extracts and in zymograms. No quantitative nor qualitative difference could be scored in the mutants with respect to the wild-type strain. Two very clear bands could be scored on native gels that were unaltered in the mutants.

*Biochemical characterization of soluble starch synthase activities in wild-type and st-3-1 carrying strains*-In addition to the lowering of the glycogen primed starch synthase activity, crude extracts of mutant and wild-type strains could be distinguished by 3 criteria :  $K_m$  for ADP-glucose, stimulation or inhibition (1.4 fold for the mutant, 0.5 fold for the mix of wild-type activities) by 0.5M citrate in the presence of glycogen and the presence of a stain on amylose primed zymograms. This enabled us to follow and separate in wild-type strains 2 distinct activities by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation, one of which (which precipitated at 65%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (fraction B)) was clearly related to the activity remaining in the mutant. In order to further characterize the soluble starch synthase activities, the 35% (fraction A) (Fig.5) and 65% (fraction B) precipitates were subjected separately to DEAE Trisacryl chromatography using a linear 0 to 0.5M KCl gradient. The fraction A activities eluted in 2 major peaks ( $\text{SII}_a$  and  $\text{SII}_b$ ) that could be essentially distinguished by their  $K_m$  for ADP-glucose (Fig.5 and table 2). Both of these were stable at  $-20^\circ\text{C}$  for over 4 weeks and gave clear-cut comigrating bands on amylose primed zymograms.  $\text{SII}_a$  and  $\text{SII}_b$  disappeared in fraction A of the mutant to be replaced by a small peak of activity that we have named  $\text{SII}_m$ . This residual activity is clearly much more related to the SI of fraction B than to that of both  $\text{SII}_a$  and  $\text{SII}_b$  (table 2). It does not yield a stain on amylose primed zymograms and is unstable upon freezing.  $\text{SII}_a$  and  $\text{SII}_b$  are thus most probably 2 forms depending on the same *ST-3* gene product. Whether these forms are generated by the purification procedure or are present as such *in vivo* remains to be determined.

Fraction B in the wild-type was characterized by the presence of a unique activity peak eluting earlier in the gradient that we have thus called soluble starch synthase I. This

activity is clearly different from both  $SII_a$  and  $SII_b$  and somehow more related to  $SII_m$  and  $SI_m$  (table 2). It does not give a stain on amylose primed zymograms.

Fraction B in both strains was essentially devoid of branching enzyme activity. Fraction A branching enzymes from the mutant and the wild-type eluted in 2 major peaks at the same position in the gradient with the same specific activities (as measured by the phosphorylase assay) confirming thus that the *st-3-1* mutation does not affect the branching enzyme activities.

## DISCUSSION

While a number of models have been proposed for the structure of amylopectin, the main component of the starch granule, all of the recent evidence now favor the so-called cluster models (for a review see Manners, 1989). According to the investigators, the plant species and to the nature (waxy or wild-type) of the amylopectin examined the detailed organization of the clusters may be subject to some variation. However the general features are essentially the same. Intermediate size glucans (dp5 to 50) are packed together in highly ordered clusters that are linked to one another by much longer chains. These clusters make up the bulk of the amylopectin fraction. The relatively small chain lengths of the packed glucans also explains part of the interaction of amylopectin with iodine. The development of colour is known to start with maltododecaosis at 500 nm. The  $\lambda_{max}$  progressively increases up to 550 nm for 40 glucoside residues, the general colour being purple. The rich blue tone which typifies starch starts developing above 50 glucoside residues (Thorn and Mohazzeb, 1990). The abundance of the intermediate size chains explains thus the  $\lambda_{max}$  of both amylopectin peak I (555 nm) and waxy amylopectin (540 nm). However peak II (580 nm) and the amylopectin of the *st-3* mutations (ranging from 575 to 595 nm depending on the *st-3* allele present) are seemingly impoverished of standard branched clusters. This was largely confirmed by our debranching analysis. The presence of numerous very short chains



explains neatly our methylation results. It is very tempting at this stage to infer that these branched stubs are the cluster roots that were not elongated by a defective starch synthase. However the length of the chains are smaller than what one would expect if they were the direct products of the branching reaction which produces chains ranging from dp-8 to over 200 (Takeda *et al.*, 1992). This holds of course if this reaction turns out to be similar to that described for higher plants. An equally viable hypothesis is that a soluble starch synthase is needed to resynthesize chains that have been recessed by starch phosphorylase. This would suggest that the clusters are first synthesized then trimmed down and rebuild by the soluble starch synthase. *In vivo* evidence that some trimming does indeed take place comes from studies performed on sugary maize (Pan and Nelson, 1984) where it was shown that a deficiency in  $\alpha$ -1,6-glucosidase leads to the appearance of a water soluble polysaccharide similar to animal glycogen (phytoglycogen) together with a reduction in starch granule size and an apparent heterogeneity in amylose content.

High amylose mutants have been scored in maize barley, rice and pea. In the latter, it has been recently shown that the *r* (rugosus) locus that was identified by Mendel is the structural gene of one of the pea's branching enzyme (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Wrinkled peas display a 30% reduction in starch and a twofold increase in amylose content. The little amylopectin left does not seem to be much modified. However wrinkled peas accumulate a novel fraction known as intermediate material which seems smaller than amylose but more branched. They are thus not close to the phenotype of our *st-3* carrying mutants. An analogous situation has been described in *ae* maize (amylose extender) which displays a phenotype a little closer to our *st-3* carrying mutants. In that well documented case an overall 10 to 20 nm increase in  $\lambda_{max}$  of the amylopectin fraction was indeed reported (Yeh *et al.*, 1981) that was correlated with a twofold increase in amylose content and a substantial reduction in total starch synthesis. However the amylose extender phenotype is not due to a defect in starch synthase but as in the previous case due to a mutation of what appears to be the structural gene of maize branching enzyme II (Boyer and Preiss, 1978; Boyer *et al.*, 1980; Preiss and Boyer, 1980; Singh and Preiss, 1985). Despite many efforts we found no defects in branching enzyme activities whether in crude extracts,

in zymograms or in partially purified extracts. In addition the number of  $\alpha$ -1,6-linkages has not decreased the slightest, on the contrary, in *st-3-1* carrying strains confirming thus our enzyme assays. It is obvious that all *st-3* carrying mutants are specifically defective for a subset of soluble starch synthase activities that can be compared to higher plant soluble starch synthase II. In addition the activity responds proportionally to the number of wild-type alleles in vegetative diploids, suggesting that *ST-3* is the structural gene for SSII. It could also be that of at least one of the subunits of this enzyme if the protein in *Chlamydomonas* happens to be multimeric as is the case for the *Saccharomyces cerevisiae* glycogen synthases. In yeast glycogen synthase is a 310 kDa heterotetramer made of two 85 and 77 kDa subunits encoded by *GSY1* and *GSY2* respectively (Peng *et al.*, 1990; Farkas *et al.*, 1990; Farkas *et al.*, 1991). Both of these can function on their own in strains carrying disruptions for either *GSY1* or *GSY2*. Our partial purification results could also be easily interpreted along similar lines.

The only other mutant that has been shown to be defective for a soluble starch synthase is the maize *du* (dull) mutant. This mutant that displays as *ae* a 30% reduction in starch accumulation and a net increase in amylose content was not reported to have an increase in the  $\lambda_{max}$  of the amylopectin iodine complex (Yeh *et al.*, 1981). Debranching and gel filtration of dull amylopectin, yielded a profile that was close but not identical to wild-type, having a small but detectable increase of very short glucans and a slight decrease of intermediate size chains (Inouchi *et al.*, 1987). The picture is further complicated by the fact that both SSII and branching enzyme II are defective in that mutant (Boyer and Preiss, 1978; Preiss and Boyer, 1980). For this reason it was inferred that *du* is a regulatory gene affecting both enzymes. However branching enzymes and starch synthases may act as complexes in the biosynthesis of starch and *du* might very well be the structural gene of one of the subunits of such a complex. Finally, the presence of the *su-2* mutation in maize has been very recently shown (Takeda and Preiss, 1992) to yield an increase in both amylose content and  $\lambda_{max}$  of the amylopectin iodine complex. In this case the amylopectin also displayed the increase in very short chains and the relative decrease in intermediate size glucans. The enzymological defect due to *su-2* remains at present unknown.

It is generally believed and rightly so that the branching enzymes are essential in determining the specificity of starch versus glycogen synthesis. This is confirmed *in vivo* by the genetic and molecular analysis of both the pea *r* and the maize *ae* loci. Furthermore it has been recently shown that the potato branching enzyme gene complements mutations in the *E.coli* branching enzyme structural gene (Kossmann *et al.*, 1991). The polysaccharide accumulated by *E.coli* under these circumstances shares some of plant amylopectin properties nailing down on a molecular basis that the *E.coli* glycogen synthase merely assists the potato enzyme in the synthesis of an amylopectin like molecule. Thus one would be tempted to think that the specificity of amylopectin synthesis relies solely on the branching enzymes. However our results establish that SSII in *Chlamydomonas* at least and more likely in all plants controls the biosynthesis or maintenance of the amylopectin clusters. Taken together with our recent finding that granule-bound starch synthase controls the synthesis of a substantial portion of amylopectin they show that in the plant cell any starch synthase is not just polymerising glucose under the structural dictate of the branching enzymes. The specificity of the structure is equally dependent on the very nature of the starch synthases, probably both by their ability or inability to synthesize glucans of particular length and also to work as complexes with particular branching enzymes.

