gen 20104008

S

Thèse De Doctorat

présentée à

l'Université des Sciences et Technologies de Lille

UFR de Biologie

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences de Lille

spécialité:

Sciences de la Vie et de la Santé

par

Marie-Lise Maddelein

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE

"Vers la compréhension de la biogenèse du grain d'amidon chez l'algue unicellulaire verte Chlamydomonas reinhardtii"

présentée le 9 mai 1995 devant la Commission d'Examen:

Président:	A.VERBERT
Rapporteurs:	P.COLONNA
	F.A.WOLLMAN
Examinateurs:	R.LOPPES
	S.BALL

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. Je suis reconnaissante à Mr. le Directeur A. Verbert de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions en me permettant de disposer de tous les moyens techniques du labo.

Je remercie "Le Chef" pour son entrain et la passion qu'il met à faire avancer les recherches. Je n'oublie pas les nombreuses discussions scientifiques dans lesquelles sa clairvoyance à permis de faire progresser mes idées.

Je remercie sincèrement Mr. P. Colonna et Mr. F.A. Wollman d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteur.

Je suis également reconnaissante à Mr. R. Loppes de bien vouloir être examinateur de ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Nathalie pour avoir participé activement à la confection de ce mémoire.

Je remercie tout autant André, pour sa disponibilité et ses compétences inestimables. Merci également aux deux Christophe ainsi que le Christophe en exil pour leur compréhension et leur aide spontanée. Je suis reconnaissante à Brigitte et Fabienne pour avoir lu et relu ce mémoire afin de corriger les innombrables fautes, ainsi qu'à Eric pour son secours informatique.

Merci à Thierry pour le soutient qu'il a toujours apporté à notre laboratoire.

Je n'oublie pas tous ceux., (et ils se reconnaîtront) qui, par leur entrain et leur bonne humeur, assurent la joie de vivre du labo.

Résumé

Dans un contexte génétique où la production des glucanes de longueur intermédiaire de l'amylopectine est fortement inhibée, nous avons montré que chez *Chlamydomonas,* la synthèse d'amylopectine devient fortement dépendante de la présence de l'amidon synthétase liée (GBSS), l'enzyme supposée responsable uniquement de la synthèse d'amylose. Dans ce contexte, nous avons montré que la structure de l'amylopectine évoque celle d'une sous fraction de l'amylopectine (amylopectine type II) présente dans l'amidon de la souche sauvage de *Chlamydomonas.* La présence de cette sous-fraction dépend également de l'amidon synthétase liée.

Les souches dépourvues des activités de la GBSS et de l'amidon synthétase soluble majeure accumulent simultanément une fraction principale de polysaccharides solubles (WSP) et une infime quantité d'un type nouveau de matériel granulaire fortement branché, dont la structure est intermédiaire entre celles du glycogène et de l'amylopectine. L'interruption du gène de structure de la GBSS chez *Chlamydomonas*, à permis d'établir que les synthèses d'amylopectine I et II sont indépendantes l'une de l'autre, et définissent deux voies alternatives naturellement mélangées dans l'élaboration du grain d'amidon.

Sommaire

Résumé 2

Abréviations

Généralités 9

Structure et propriétés des constituants de l'amidon:

L'amylose 10

L'amylopectine 13

L'interaction-iode 16

La séparation des constituants et le matériel intermédiaire 19

Le polysaccharide soluble 22

Le grain d'amidon: une organisation élaborée:

La structure granulaire 23

La structure cristalline 24

Le métabolisme de l'amidon:

Les enzymes de biosynthèse de l'amidon: 27

- L'ADP-Glc-pyrophosphorylase 28
- Les amidon synthétases: 31

l'amidon synthétase liée 32

les amidon synthétases solubles 34

- Les enzymes de branchement 35

Les enzymes de dégradation de l'amidon: 36

- L'α-amylase 37
- La β-amylase 37
- Les enzymes de débranchement 37
- Les a glucane phosphorylases 38

La compartimentation: 39

- Le flux de carbone dans les tissus photosynthétiques 39
- Le flux de carbone dans les tissus de réserve 40
- La voie alternative ou voie de la sucrose synthase 40

Les principaux mutants décrits chez le maïs:

brittle-1 42

brittle-2 et *shrunken-2* 42

shrunken-1 42

shrunken-4 42

waxy 43

dull 44

amylose extender 45

sugary-1 46

sugary-2 47

Les conséquences structurales des interactions génétiques 48

Chlamydomonas reinhardtii:

Le modèle 51

Le métabolisme de l'amidon 53

Matériels et Méthodes

Lexique des souches utilisées: **56**

Phénotypes et lésions associés aux mutations dans les gènes marqueurs nucléaires *58*

Phénotypes et lésions associés aux mutations affectant la voie de biosynthèse de l'amidon *59*

Composition des milieux de culture: **61**

Les milieux liquides

Les milieux gélosés

Mutagenèse et sélection phénotypique **63**

Analyses génétique:

La réalisation d'un croisement 63

L'obtention des diploïdes 63

L'analyse de la descendance d'un croisement 64

Analyses enzymologiques:

La préparation des extraits 65

Le dosage des protéines 65

Le dosage de l'activité amidon synthétase 65

L'étude cinétique 66

Le zymogramme d'activité soluble 66

Techniques biochimiques:

L'extraction et la purification de l'amidon et du polysaccharide soluble 67

Le dosage d'amidon 67

Le dosage du polysaccharide soluble 68

L'électrophorèse SDS des protéines liées au grain 68

La spectrophotométrie du complexe polysaccharide-iode 68

Les chromatographies de gel filtration:

Fractionnement par une colonne de gel filtration HW75 *69*

Fractionnement par une colonne de gel filtration CL2B *70*

Fractionnement par une colonne de gel filtration HW50 *70*

Analyses structurales:

Le dosage des sucres réducteurs au DNS 71

Le débranchement d'un polysaccharide 71

L'analyse des produits débranchés: 72

La chromatographie de gel filtration HW50

La chromatographie d'échange d'anions à haut pH

L'analyse en RMN 73

La méthylation 73

La digestion d'un polysaccharide par des enzymes de dégradation:

La digestion par les amylases *74*

La digestion par l'amyloglucosidase *75*

La chromatographie couche mince 75

Microscopie électronique **75**

Résultats

Hypothèse de départ 76

Sélection et caractérisation préliminaire des mutants 78

Analyse génétique des mutants 83

Conséquences biochimiques de l'interaction entre des mutations aux loci *STA-2* et *STA-3* 91

Caractérisation structurale d'une nouvelle sous fraction de l'amylopectine 101

Les modèles de biosynthèse de l'amylopectine 106

Expériences consécutives à l'isolement d'un transformant portant une interruption dans le gène STA-2 108

Détermination de la structure d'un nouveau polysaccharide synthétisé sous le contrôle de la SSSI 115

Analyse structurale du WSP présent dans le double mutant IJ2 121

Conclusions 125

Discussion

La GBSS est une enzyme intervenant dans la synthèse de l'amylopectine. 128

L'origine de la fraction amylosique. 133

Vers une compréhension de la synthèse de l'amylopectine *in vivo*. 137

Annexe 1 : Vers l'établissement d'un système de synthèse *in vitro* d'amidon à partir de grains natifs:

Détermination des conditions optimales de synthèse *in vitro* chez la souche sauvage de *Chlamydomonas*. 144

Mise en évidence de l'effet du pH sur la synthèse *in vitro*. 147

Localisation des chaînes néosynthètisées dans les fractions de l'amidon par l'incorporation d'ADP-Glc marqué. 148

Références bibliographiques 151

Annexe 2 165

Abréviations

Abs	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ADP-Glc	Adénosine diphospho-glucose
AM	Amylose
AMP	Adénosine monophosphate
AP	Amylopectine
ARNm	Acide ribonucléique messager
ASL	Argino-succinate lyase
ATP	Adénosine triphosphate
CL	Longueur de chaîne
DEAE	Diéthyl amino-éthyl
DHAP	Di-hydroxy acétone phosphate
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DO	Densité optique
d.p.	Degré de polymérisation
BE	Enzyme de branchement
EDTA	Acide éthylène di-amine tétra acétique
Fru-6-P	Fructose-6-phosphate
GBSS	Amidon synthétase liée
Glc	Glucose
Glc-1-P	Glucose-1-phosphate
Glc-6-P	Glucose-6-phosphate
G-3-P	Glycéraldéhyde-3-phosphate
HPAE	Chromatographie échangeuse d'anion à haut pH
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HW	Haute poids
IA	Affinité pour l'iode
IBC	Capacité de fixation d'iode
Km	constante d'affinité
λ max	Longueur d'onde du maximum d'absorption
NADP	Nicotinamine adénosine diphosphate
PAB	Acide para-amino-benzoïque
3-PGA	3-phosphoglycérate
PGI	Phospho-gluco-isomérase
PGM	Phospho-gluco-mutase
Pi	Phosphate inorganique
PPi	Ortho-phosphate
RMN	Rayonnement magnétique nucléaire
RUBISCO	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxigénase
RX	Rayons X
SDS	Sodium dodécylsulfate
SSS	Amidon synthétase soluble
TCA	Trichloro acétique
UDP-Glc	Uridine di-phospho-glucose
UV	Ultra-violet
Vm	vitesse maximale

Généralités

L'amidon est le polysaccharide de réserve universel des plantes vertes et le produit final de la fixation du carbone lors de la photosynthèse.
A l'intérieur du plaste, l'amidon constitue un grain quasi-cristallin et insoluble dans l'eau. Il possède un faible degré d'hydratation permettant le stockage d'une quantité importante de glucanes dans un faible volume. Malgré son insolubilité, l'amidon peut être rapidement dégradé par les enzymes de catabolisme pour fournir de l'énergie par la respiration ou des substrats nécessaires à la croissance.
On distingue deux types d'amidon: l'*amidon transitoire,* synthétisé dans les organes photosynthétiques (feuilles) et dégradé la nuit et l'*amidon de réserve,* accumulé dans les amyloplastes des organes non photosynthétiques (tubercules de pomme de terre, albumen de maïs). Dans ce mémoire, nous avons porté notre attention uniquement sur ce deuxième type d'amidon.

L'amidon est un homopolymère d'α-D-Glc Cette composition d'une simplicité extrême est cependant, susceptible de donner une variété d'édifices macroscopiques.
Globalement, la formation du grain d'amidon résulte de l'arrangement de ses deux principaux composants: l'**amylose** et l'**amylopectine**. Mais cette organisation varie énormément en fonction des proportions relatives et de la structure de ces deux constituants.

La participation respective des enzymes de biosynthèse dans l'élaboration de ces deux constituants est bien loin d'être élucidée. Par notre étude, nous espérons apporter des éléments neufs permettant de formuler des hypothèses fondées concernant le mécanisme de biosynthèse de l'amylopectine.

Structure Et Propriétés Des Constituants De L'amidon

Les proportions en amylose et en amylopectine citées dans la littérature varient selon l'espèce et l'origine du tissu (feuille, graine, racine). Elles sont sous l'influence de facteurs physiologiques comme l'age de la plante (Shannon et Gardwood, 1984, Blanshard, 1987, Banks et Muir, 1980). Toutefois, les taux évalués dans des conditions définies, pour une même espèce sauvage, sont constants.

Généralement, la teneur en amylose des souches sauvages représente environ 25% en poids de la quantité d'amidon.

L'amylose et l'amylopectine extraites de l'amidon ne sont pas homogènes et les caractéristiques générales de ces deux polysaccharides sont des valeurs moyennes (*tableau 1*) (Morrison et Karkarlas, 1990).

En plus de ces deux composants majeurs, une troisième fraction appelée matériel intermédiaire est souvent isolée (Banks et Greenwood 1975, Yeh et coll., 1981, Colonna et Mercier, 1984, Shannon et Gardwood, 1984).

L'amylose:

L'amylose est principalement trouvée sous forme de chaînes linéaires de 800 à 22000 unités de glucose liés en α-1,4 (*figure 1 et tableau 1*). Sa masse moléculaire se situe entre 1,4 10^5 et 3,5$10^6$ Da (Takeda et Mohazzeb, 1990).

L'amylose serait constituée de 2 à 7 chaînes principales (Hizukuri et coll., 1986, Takeda et Preiss, 1992, Takeda et coll., 1984, 1993) dont le degré de polymérisation moyen (d.p.) est de 940 chez le maïs, de 980 à 1180 chez le riz, de 1850 chez l'orge, de 1540 chez le kuzu, de 2660 chez le tapioca et de 3200 à 4920 pour la pomme de terre (Blanshard, 1987, Hizukuri et coll., 1986, 1993, Takeda et coll., 1984, Takeda et Preiss, 1992, Inouchi et coll., 1984).

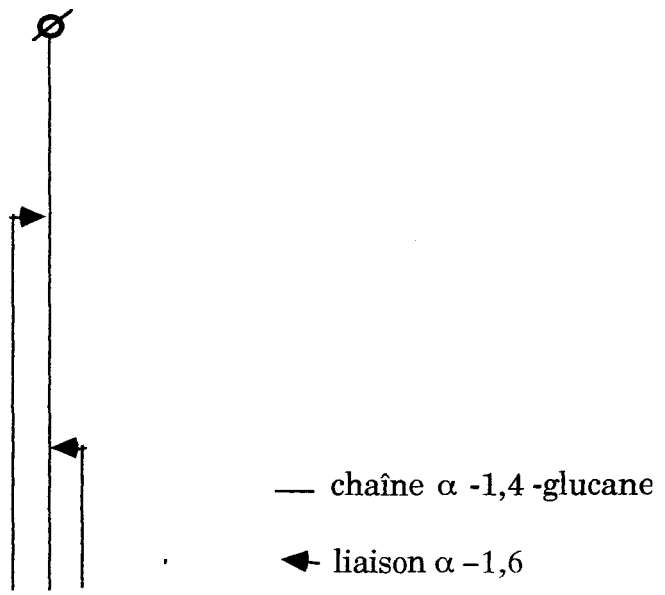


Figure 1: Représentation schématique de l'amylose (Shewmaker et Stalker, 1992).

de 3200 à 4920 pour la pomme de terre (Blanshard, 1987, Hizukuri et coll., 1986, 1993, Takeda et coll., 1984, Takeda et Preiss, 1992, Inouchi et coll., 1984).

L'amylose est essentiellement constituée de très longues chaînes. La taille des chaînes branchée est très diverse et donne une valeur moyenne de 12 à 21 unités de glucose (Thorn et Mohazzeb, 1990, Hizukuri et coll., 1993, Takeda et coll., 1984). L'ensemble des chaînes d'amylose présente une longueur moyenne de 250 à 370 chez le riz (Hizukuri et coll., 1986) et de 340 chez maïs (Takeda et Preiss, 1992).

La détermination de sa limite de β-amylolyse fut à l'origine de la découverte du branchement de cette macromolécule jusqu'alors considérée comme linéaire (Peat et coll., 1952, Hizukuri et coll., 1981, 1986). Le taux de ramification en α–1, 6 est évalué à 1 pour 170 à 500 glucoses.

La limite de β-amylolyse quant à elle, est estimée entre 70 % et 85% (Morrison et Karkalas, 1990, Hizukuri et coll., 1986).

La structure fine de l'amylose, et plus particulièrement l'arrangement et la position des ramifications, reste encore mal connue.

Les propriétés générales de l'amylose sont celles d'un long glucane essentiellement linéaire (*tableau 1*).

En solution dans le DMSO ou en solution alcaline, l'amylose a probablement une configuration expansée, tandis qu'en solution acide ou proche de la neutralité, sa structure est plus condensée pouvant présenter des courts segments en hélice (Banks et Greenwood,1975, Murdoch, 1992). Concentrée en solution aqueuse, elle forme rapidement un gel, alors qu'à faible concentration l'amylose rétrograde formant des véritables cristaux insolubles. Ce phénomène est appelé la rétrogradation et peut parfois conduire à sous-évaluer la fraction amylosique de l'amidon (Banks et Greenwood, 1975).

	Amylose	Amylopectine
Représentation au sein de l'amidon	20 à 30%	70 à 80%
Structure générale	Essentiellement linéaire	Ramifié
Masse moléculaire (kDa)	0.2 à 1.3 10^3	4 à 5 10^5
Longueur moyenne de chaînes	100 à 10 000	10 à 50
Degré de polymérisation	500 à 5 000	3 à 30 10^5
Digestibilité par la β-amylase	> 80%	60%
Solubilité dans l'eau	variable	soluble
Stabilité en solution aqueuse	rétrograde	stable
Réaction à l'iode : Coloration λ max	 verte > 600 nm	 rouge environ 540 nm

Tableau 1: Caractéristiques et propriétés générales de l'amylose et de l'amylopectine

L'amylose est susceptible de complexer des molécules hydrophobes. La formation du complexe est fondée sur une conformation hélicoïdale de l'amylose dans laquelle tous les éléments hydrophiles sont tournés vers l'extérieur et les groupements hydrophobes vers l'intérieur. La cavité ainsi formée peut accueillir de nombreux composés (iode, acide gras, chaînes hydrocarbonées).

L'amidon renferme également des lipides pour 0,6 à 1 % de son poids. Ces lipides internes sont complexés avec la fraction en hélice de l'amylose (Morrison et Milligan, 1982, Galliard, 1983). Ces complexes d'inclusion sont insolubles et dissociés dans l'eau par la chaleur (90-120°C) (Morrison et Karkalas, 1990).

South et coll. (1991) ont observé une relation linéaire entre le contenu apparent en amylose et la quantité de lipides totaux de l'amidon.

L'amylose complexe aisément l'iode en solution. La couleur et la longueur d'onde du maximum d'absorption (appelée λ max) de cette interaction varient avec la longueur des chaînes impliquées et les conditions analytiques (Morrison et Karkalas, 1990, Banks et coll., 1971, Murdoch, 1992).

Cette réaction est à la base de la caractérisation biochimique de l'amylose et constitue un critère de pureté. L'amylose dite "pure" fixe 20 mg d'iode par 100 mg.

L'amylose peut former des complexes similaires avec plusieurs autres substances encore appelés " V-amylose complexes ". L'agent complexant peut être éliminé en laissant l'hélice d'amylose intacte et asséchée. L'amylose V anhydre ainsi produite présente un profil de diffraction aux rayons X caractéristique (Murdoch, 1992).

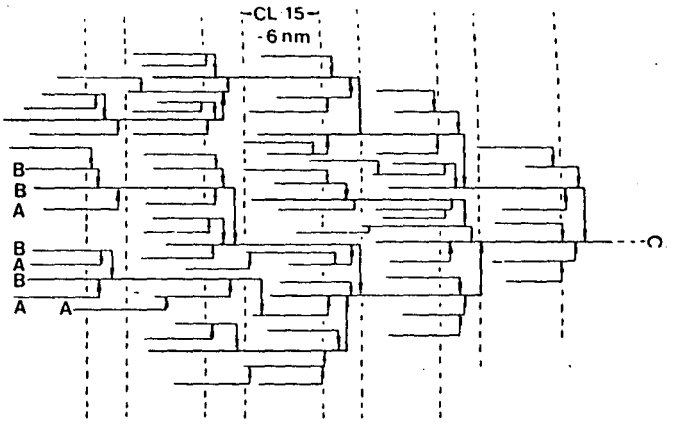


Figure 2: Représentation hypothétique définissant les chaînes A, B et C de l'amylopectine (Manners et Matheson).

L'amylopectine:

Les molécules d'amylopectine présentent une structure complexe composée de chaînes d'α-1,4-glucanes reliées par de nombreux points de branchement en α-1, 6. Le taux de ramification est de 5 à 6% (*tableau 1*) (Banks et Greenwood, 1975, Manners, 1985).
La limite de β-amylolyse se situe généralement autour de 55% de la molécule (Morrison et Karkalas, 1990).
L'amylopectine présente un degré de polymérisation de 5.10^3 à 10^5 unités de glucose, donnant une masse moléculaire d'environ 10^7 Da (Blanshard, 1987, Takeda et Preiss, 1992, Colonna et Mercier, 1984).

L'estimation de la longueur moyenne des chaînes de l'amylopectine varie selon la technique utilisée. Toutefois, elle est toujours proche de 20 unités de glucose (Morrisson et Karkalas, 1990, Banks et Muir, 1980).
Cette moyenne ne reflète en rien la structure particulièrement élaborée de ce polysaccharide. En effet, le perfectionnement des techniques analytiques révèle une structure beaucoup plus complexe que l'on pouvait imaginer.

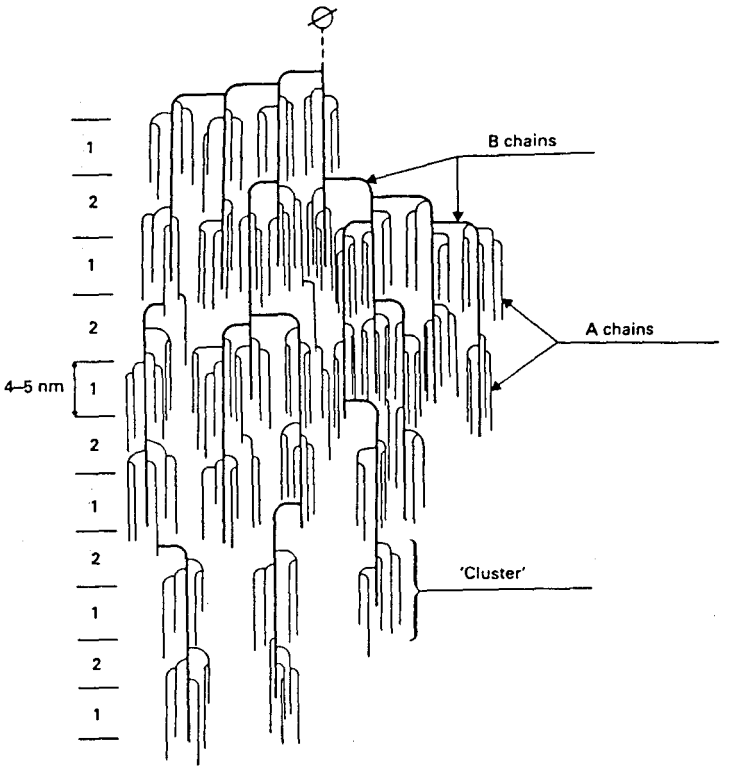
Les α-1,4-glucanes linéaires constituant la molécule d'amylopectine sont classés en trois catégories de chaînes: les chaînes A, B et C (*figure 2*). Selon cette terminologie, introduite par Peat et coll. (1952, 1956):

- ***les chaînes A,*** externes, sont liées par leur extrémité réductrice aux chaînes B.

- ***les chaînes B*** supportent un ou plusieurs points de branchement et sont liées par leur groupement réducteur à d'autres chaînes B ou à la chaîne C.

- ***la chaîne C*** *(souvent assimilée à une longue chaîne B)* relie plusieurs chaînes B et se caractérise par son extrémité réductrice libre (Manners, 1989).

A



B

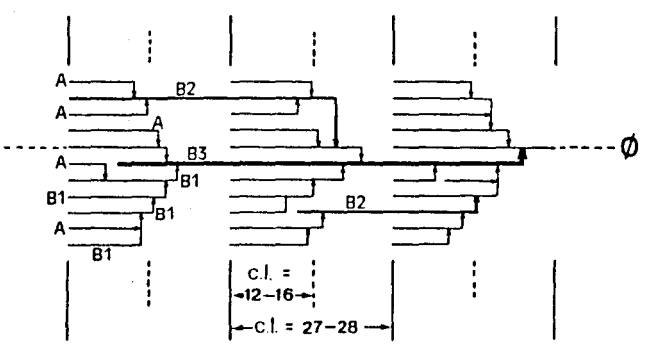


Figure 3: *Les modèles représentant l'arrangement des chaînes dans la structure en grappe de l'amylopectine (Manners, 1989):*
(A) Robin et coll., (B) Hizukuri.

Le taux de chaînes A par rapport aux chaînes B, bien que spécifique de l'espèce, est sujet à certaines variations (Morrison et Karkalas, 1990). En effet, la quantification des chaînes nécessite l'action préalable d'enzymes de débranchement (et notamment l'isoamylase). Mais l'inaccessibilité plus ou moins importante des chaînes les plus internes engendre une diversité de résultats. Sur base molaire, le taux de chaînes A par rapport aux chaînes B s'étend de 0,8 à 2,2 (Morrison et Karkalas, 1990, Manners et Mathéson, 1981, Yuan et coll., 1993a,b).

Parmi les nombreux modèles représentant la structure de l'amylopectine, les plus satisfaisants qui soient, compatibles avec les résultats expérimentaux actuels, sont ceux proposés par Robin et coll. (1974), Manners et Matheson (1981) et Hizukuri (1986) (*figures 3*).

Le modèle de Hizukuri est souvent référé car il intègre la distribution des chaînes linéaires observée après digestion par l'isoamylase (Grégor et Morgan, 1984, Takeda et Hizukuri, 1987, 1989). Selon ce modèle, les chaînes B se différencient par le nombre de grappes auxquelles elles participent (*figure 3c*):

- ***les chaînes B1*** ont un d.p. moyen de 20 à 24 et participent, comme les chaînes A, à la formation d'une grappe élémentaire,
- ***les chaînes B2*** ont un d.p. moyen de 42 à 48 et relient deux grappes élémentaires,
- ***les chaînes B3*** ont un d.p. moyen de 69 à 75 et soutiennent trois grappes élémentaires,
- ***les chaînes B4***, de d.p. moyen 101 à 119, s'étendent sur 4 grappes élémentaires.

La chaîne C correspond à une chaîne B4 dont l'extrémité réductrice est libre (Manners, 1989). Les chaînes A sont constituées de 10 à 16 résidus de glucose (Manners, 1989, Hizukuri et coll., 1986b).

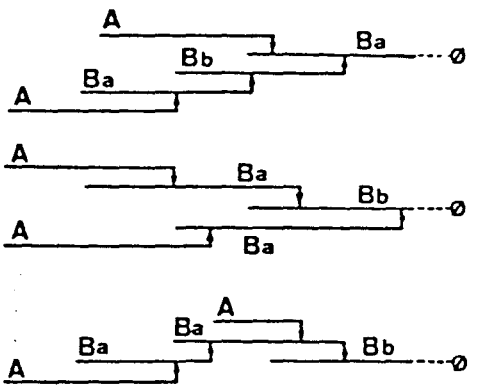


Figure 4: *Définition des chaînes Ba et Bb et chaînes A (Hizukuri et Maehera, 1993).*

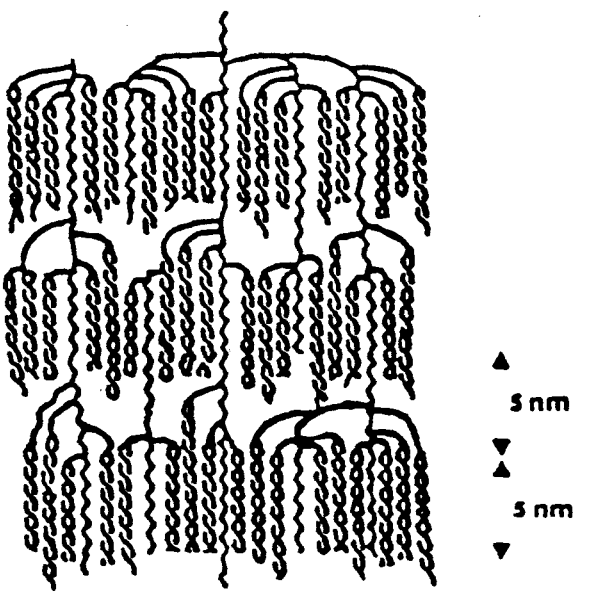


Figure 5: *Le modèle en double hélice de l'amylopectine (Imberty et coll., 1991).*

Les différences entre les tailles moyennes rapportées pour les chaînes A et B semblent spécifiques de l'espèce étudiée (Banks et Greenwood, 1975, Takeda et coll., 1986b, Morrison et Karkarlas, 1990).

Les chaînes A et B1 représentent 80 à 90% du total des chaînes de la molécule d'amylopectine et constituent les grappes élémentaires. Les 10 à 20% restants sont les chaînes principalement impliquées dans les connexions entre ces grappes (Manners, 1989).

Hizukuri et Maehara (1990) classifient également les chaînes B définies par Peat et coll. (1952) en chaînes Ba et Bb selon la fixation de chaînes A (Ba) ou non (Bb) (*figure 4*). Une chaîne Ba porte en moyenne 2,1 chaînes A et sa longueur augmente avec le nombre de chaînes A fixées (maximum 4). Les taux de chaînes A:B et Ba:Bb trouvés indiquent qu'environ 40% des chaînes B portent non pas des chaînes A mais des chaînes B.

Le modèle d'Hizukuri (1986) traduit parfaitement l'alternance des régions cristallines (au niveau des grappes élémentaires) et des régions amorphes (au niveau des jonctions entre les grappes) observée par la diffraction aux rayons X dans les domaines cristallins de l'amidon.

La cristallinité des grappes élémentaires semble dépendre principalement de la taille et de la quantité de chaînes très courtes (A et B1) (Hizukuri et coll., 1986, 1985, Asaoka, 1986).

La cristallinité de l'amylopectine serait due à l'enroulement en double hélice des courtes chaînes linéaires modélisé par Imberty et coll. (1991) (*figure 5*).

L'étude des conformations pouvant être adoptées par les glucoses impliqués dans la liaison α-1,6 a déterminé que la conformation la plus stable vient d'un minimum de déformation des liaisons α-1,4 adjacentes (Buléon et Tran, 1990). Cette stabilité s'accorde plus particulièrement avec la configuration proposée par Imberty et Perez (1991). Selon cette configuration, la structure en double hélice pourrait s'établir à partir du second monomère après le point de branchement de chacun des brins (Buléon et Tran, 1990).

La structure en grappe de l'amylopectine contrarie fortement son association avec d'autres composés empêchant la création de structures secondaires. Aussi, l'amylopectine se lie peu avec l'iode ou les petites molécules hydrophobes.

L'interaction des chaînes linéaires de l'amylopectine avec l'iode produit des complexes rouges en solution dont la λ max se situe entre 530 et 585 nm. La présence d'impuretés amylosiques (1 à 2%) peut augmenter ces valeurs de 20 à 30 nm.

Contrairement à l'amylose, l'amylopectine d'une souche sauvage interagit peu avec les alcools et les lipides monoéthylèniques (Morrison et Karkalas, 1990). Cette propriété fut souvent utilisée pour séparer ces deux constituants (Kamath et coll., 1989, Colonna et Mercier, 1984, Takeda et coll., 1984, Morrison et Karkalas, 1990).

L'interaction-iode:

La réaction de complexation avec l'iode est à la base de la distinction entre l'amylose et l'amylopectine (Banks et Greenwood, 1975).

La nature du complexe bleu que l'iode forme avec l'amylose est bien déterminée (Murdoch, 1992).

En présence d'iode, les chaînes linéaires d'amylose s'organisent en une structure hélicoïdale. Des ions I^- se logent dans les cavités hydrophobes, stabilisant la structure en hélice et conduisant à la création d'une structure artificielle appelée V-amylose. La nature du complexe amylose-iode est instable et ses propriétés sont en accord avec un modèle dans lequel les hélices d'environ 50 résidus d'α-D-glucopyranoside contenant l'iode alternent avec des segments de chaîne d'amylose enroulés de façon aléatoire (Murdoch, 1992).

Ce complexe présente un maximum d'absorption dont la λ max est située entre 630 et 680 nm (*figure 6*) (Morrison et Karkalas, 1990).

échantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	amylose
λ max à 20°C (nm)	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642
IBC à 20,4°C	-	-	1,3	3,6	11,1	n.d.	16,2	16,4	17,3	19,5
D.P.	22,2	28,9	31,3	36,4	50,7	71	93	105	134	1500

Tableau 2: Interaction d'oligomères linéaires de degrés de polymérisation différents avec l'iode (Banks et coll., 1971).

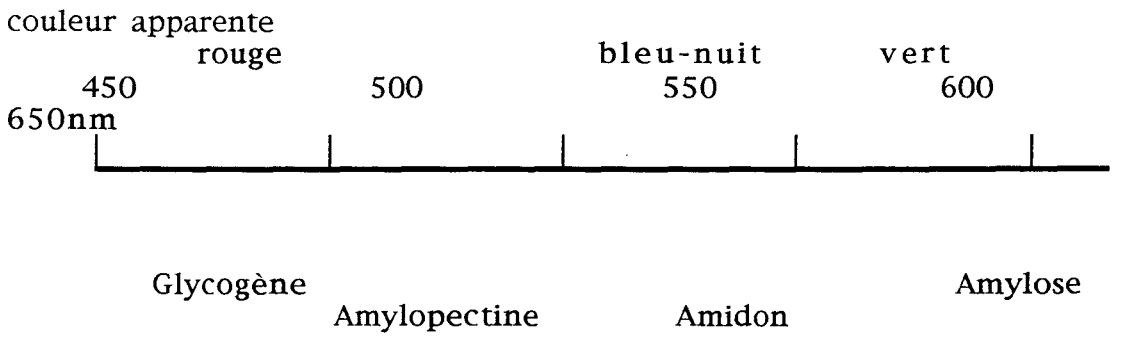


Figure 6: Les domaines d'absorption des interactions polysaccharide-iode.

Plusieurs études ont montré l'influence de la taille des chaînes et du taux de ramification des α-glucanes sur leur interaction avec l'iode (Thorn et Mohazzeb, 1990, Banks et coll., 1970, 1971).

Le développement de la couleur, d'une teinte rose pâle, commence avec le maltodécaose pour une température comprise entre 20 et 25°C (Thorn et Mohazzeb, 1990). La teinte bleu foncé (verte à l'oeil) est obtenue avec des amyloses pures et requiert au moins 50 résidus de glucose liés dans une chaîne non ramifiée.

La présence de courtes chaînes et de points de branchement empêche la formation d'hélices nécessaires à la fixation de l'iode. Les polysaccharides branchés complexés avec l'iode présentent des λ max plus basses (*figure 6*) (Archibald et coll., 1961). Les spectres d'absorption de l'amylopectine de pomme de terre et du maïs donnent, respectivement un maximum de 575 - 580 nm et de 535 nm. Ces valeurs indiquent que les chaînes susceptibles d'interagir avec l'iode sont plus longues dans l'amylopectine de pomme de terre (Thorn et Mohazzeb, 1990). L'iode s'associe de manière diffuse avec le glycogène sans former de véritable complexe et le spectre d'absorption montre alors, un maximum entre 400 et 500 nm.

Initialement, Banks et coll. (1970) ont proposé une relation théorique entre la longueur des chaînes externes de β-dextrines et leur capacité à fixer l'iode. Lorsque la longueur de ces chaînes externes est inférieure à 15 unités de glucose, aucune interaction avec l'iode n'est détectée. Au-delà d'un d.p. de 20, la fixation de l'iode augmente progressivement avec la taille des chaînes externes, et ce jusqu'à 100 unités de glucose, où la fixation de l'iode devient similaire à celle de l'amylose.

Banks et coll. (1971) ont ensuite étudié l'interaction avec l'iode d'une série d'oligomères linéaires de type amylose dont les d.p. moyens étaient compris entre 22 à 134 unités de glucose. La capacité de fixation d'iode était proportionnelle au d.p. moyen et à l'abaissement de la température, pour des valeurs de d.p. comprises entre 22 et 200 (*tableau 2*).

Expérimentalement, deux types de techniques peuvent être utilisées:

- les techniques photométriques qui mesurent la λ max (nm).
- les techniques ampéromètriques qui mesurent la capacité de fixation d'iode (IBC pour Iodine Binding Capacity) ou l'affinité pour l'iode (IA pour Iode Affinity) en mg d'iode fixée par mg de polysaccharide.

Le dosage photométrique a l'avantage d'être facile a réaliser, et beaucoup plus sensible. Effet, l'interaction faible entre le glycogène et l'iode n'est pas détectée par potentiomètrie et le complexe amylopectine-iode donne une mesure très faible (IBC de 0,1 à 0,15 au lieu de 20 pour l'amylose à 20°C).

Alors que, ces deux polysaccharides possèdent un spectre-iode dont les λ max ont été clairement délimitées (Thorn et Mohazzeb, 1990).

Même si ces deux techniques diffèrent dans leur principe, la relation linéaire entre les valeurs (λ max ou IBC) caractérisant le complexe polysaccharide-iode en fonction du d.p. moyen des α-1,4-glucanes impliqués s'observe dans les deux cas (*tableau 2*) (Banks et Greenwood, 1975).

Le contenu en amylose de l'amidon peut être déterminé à partir de son interaction-iode donnant une teneur approximative appelée "amylose apparente" (Montgomery et coll., 1961).

En réalité, les valeurs obtenues sur l'amidon natif dépendent essentiellement de son contenu en moyennes et longues chaînes d'α 1,4 glucanes.

Or, dans plusieurs amidons de céréales et légumineuses, appelés riches en amylose, les chaînes de l'amylopectine ont une longueur moyenne plus élevée que la normale et fixent plus l'iode, induisant un contenu apparemment élevé en amylose (Morisson et Karkalas, 1990, Baba et coll., 1987, Hizukuri, 1986, Takeda et coll., 1986, 1987, Krisman et Alfredo, 1991).

De même, certains amidons de maïs, de pois, de pomme de terre et de riz mutants (*amylose-extender, sugary*) ont des composants branchés d'amidon avec de longues chaînes externes qui remettent en question cette méthode directe pour estimer l'amylose (Takeda et Preiss, 1992, Colonna et Mercier, 1984, Yeh et coll., 1981, Takeda et Hizukuri, 1987, 1989, Boyer et Liu, 1985).

Inversement, la présence de lipides dans la fraction amylosique diminue sa capacité à fixer l'iode, et la quantité d'amylose de l'amidon semble faussement réduite (Banks et coll., 1974).

La séparation des constituants de l'amidon et le matériel intermédiaire:

La méthode classiquement utilisée pour séparer l'amylose de l'amylopectine est basée sur la précipitation sélective et la recristallisation de l'amylose par complexation avec le 1-butanol ou le thymol (Banks et Greendwood, 1975, Hizukuri et coll., 1981, Colonna et Mercier, 1984, Takeda et coll., 1987,).

Le complexe amylose-butanol pur est rapidement isolé de l'amidon de pomme de terre, mais six cycles de recristallisations (voire plus) et une ultracentrifugation sont nécessaires avec certains amidons pour ôter les traces d'amylopectine (Takeda et coll., 1986a). Un matériel intermédiaire (le plus souvent une amylopectine anormale) complique fortement cette méthode de fractionnement (Banks et Greenwood, 1975, Boyer et Liu, 1985, Banks et coll., 1971b).

Une approche alternative fut d'utiliser la concanavaline-A (con-A) pour précipiter l'amylopectine (Matheson et Welsh, 1988, Yun et Matheson, 1993). Cette protéine fixe l'extrémité non réductrice des α-glucanes. Chaque molécule d'amylopectine lie plusieurs molécules de ligand et précipite, alors que l'amylose fixe très peu la con-A et reste en solution. Cette méthode n'a cependant pas été largement testée.

L'ultracentrifugation est encore utilisée occasionnellement mais la présence de polysaccharides appelés amylose et amylopectine "anormales" (pouvant être une séparation incomplète des deux composants) contamine souvent les fractions principales (Banks et Greenwood, 1975).

Avec l'évolution des gels d'agarose et dextran, il est maintenant possible d'obtenir de bonnes séparations de toute la gamme des saccharides dérivés de l'amidon par chromatographie de gel filtration préparative ou analytique (Suortti et Pessa, 1991, Takeda et coll., 1984, 1986a, 1987, Hizukuri, 1986). Elle est utilisée en conjonction avec la précipitation au butanol pour étudier des mélanges complexes (Kamath et coll., 1989, Baba et coll., 1987a, b).
La meilleure dissolution de l'amidon est obtenue dans le DMSO 5 à 15% (v/v) eau. De plus, ce solvant évite la rétrogradation, c'est pourquoi il est préférentiellement utilisé dans certaines analyses chromatographiques (French, 1984, Takeda, 1986a, Morrison et Karkalas, 1990).
La distinction entre amylose et amylopectine s'effectue par l'analyse de l'absorbance des complexes polysaccharide-iode entre 620 et 650 nm en parallèle avec un dosage de glucanes totaux sur les fractions d'élution. Cependant, l'existence de matériel intermédiaire rend préférable l'analyse du spectre-iode sur la région comprise entre 530 et 680 nm (Morrison et Karkalas, 1990).

Dans la plupart des analyses, de nombreux composants qualifiés de matériels "anormaux" sont mentionnés (Shannon et Gardwood, 1984, Morrison et Karkalas, 1990, Banks et Greenwood, 1975).
Cependant un matériel intermédiaire majoritairement présent semble commun aux amidons sauvages de diverses origines. Ce matériel est qualifié d'amylopectine de type II est extrait de l'amidon de la souche *Chlamydomonas reinhardtii* sauvage (Delrue et coll., 1992, Fontaine et coll., 1993).

La quantité de ce matériel intermédiaire varie de 5 à 20% selon les procédures de séparation et de détection utilisées ainsi que de l'espèce sauvage considérée (Lansky, et coll., 1949, Inouchi et coll. 1987 , Banks et Greenwood, 1975, Takeda et Preiss, 1993).

Cette fraction intermédiaire délipidée présente globalement les caractéristiques suivantes.

En chromatographie de gel filtration de l'amidon natif, ce polysaccharide est élué entre les fractions amylose amylopectine (Takeda et coll., 1993a, Delrue et coll., 1992). Ce matériel intermédiaire présente un d.p de 200 à 4900 unités de glucose chez le maïs (200 à 2400 pour l'amylose) (Takeda et coll., 1993).

Ce matériel est constitué de chaînes 30 à 40% plus longues que celles de l'amylopectine. Leur longueur moyenne de chaînes est d'environ 50 glucoses (Banks et Greenwood, 1975). Son affinité pour l'iode est élevée (λ max supérieure à 600 nm) mais moindre que celle de l'amylose (Inouchi et coll., 1987, Banks et Greenwood, 1975). La limite de β-amylolyse de ce matériel est proche de celle de l'amylopectine et se situe autour de 57% (Banks et Greenwood, 1975).

Le matériel intermédiaire majoritaire présent dans les souches sauvages semble présenter une structure se rapprochant plus de celle de l'amylopectine "classique" que de celle de l'amylose.

Certaines mutations modifient la structure et/ou la proportion des différents constituants de l'amidon sauvage. L'apparition de fractions dites "anormales" supplémentaires dans l'amidon de souches mutantes augmente encore la diversité des matériels intermédiaires.

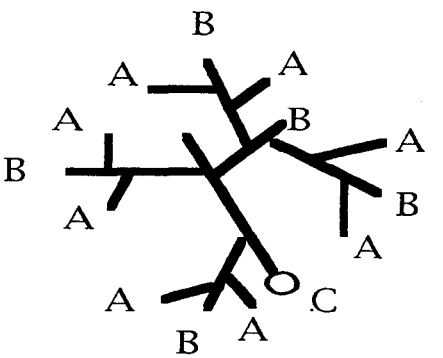


Figure 7: *Représentation du phytoglycogène du mutant su-1.*

Localisation des chaînes internes (B), des chaînes externes (A) et de la chaîne C portant une extrémité réductrice. *(Inouchi et coll., 1987).*

Les polysaccharides solubles dans l'eau (WSP):

Parallèlement à la fraction granulaire, des polysaccharides solubles dans l'eau (**WSP** pour Water Soluble Polysaccharides) peuvent être dosés en forte concentration dans les souches de certains génotypes (plus de 35% dans le maïs *sugary* contre 2% chez le sauvage) (Asaoka et coll., 1985a, Yeh et coll., 1981).

Parmi ceux-ci, un polysaccharide de structure hautement ramifiée a été défini comme **phytoglycogène**. La présence de ce matériel est surtout liée à la mutation *su* (*sugary*) dans les souches de diverses origines (Shannon et Gardwood, 1984).

Le phytoglycogène est un polymère de D-glc liés en α–1,4 et α–1,6 dont le taux de ramification (9,7%) (Inouchi et coll., 1987) est similaire à celui du glycogène animal. Sa limite de β–amylolyse se situe entre 30% et 40% (Yun et Matheson, 1993, Inouchi et coll., 1987).

Ce polysaccharide est constitué de courtes chaînes α–1,4 dont le degré moyen de polymérisation est de 8 à 12 unités de glucose (*figure 7*) (Yun et Matheson.,1993, Asaoka et coll., 1985a).

Le Grain D'amidon: Une Organisation Élaborée

L'amylose, l'amylopectine et le matériel intermédiaire s'associent de façon étroite pour former les grains d'amidon. Cette association ne semble pas se faire au hasard. L'organisation du grain d'amidon vient de la répétition de motifs structuraux constitués par un arrangement particulier de ses constituants.

La structure granulaire:

Dans les grains d'amidon, les molécules d'amylose et d'amylopectine sont orientées radialement avec leur extrémité réductrice vers le centre, et la synthèse se fait par apposition aux extrémités non réductrices (Blanshard, 1987, French, 1984, Kassenbeck, 1978, Yamagushi et coll., 1979).

Les grains visualisés au microscope optique, après digestion partielle à l'acide, montrent une organisation en "anneaux de croissance". Ces anneaux sont des couches concentriques d'indice de réfraction, de densité, de cristallinité, de résistance aux attaques acides et enzymatiques alternativement faibles et élevées.

Chez le blé, le nombre de cercles de croissance apparaît correspondre au nombre de jours de développement, suggérant un rôle fondamental du rythme physiologique sur cette organisation. Au centre du grain se situe le point d'origine de croissance, ou hile, lequel est généralement moins organisé que le reste du grain (Blanshard, 1987).

Le pourcentage en amylose augmente avec l'âge de la plante (Shannon et Gardwood, 1984). Il y a un gradient croissant d'amylose et de lipides du hile vers la périphérie (Boyer et coll., 1976, Wolf et coll., 1948).

L'amylose peut être libérée du grain dans l'eau chaude indiquant une faible association entre l'amylose et l'amylopectine.

La structure cristalline:

Les grains natifs ont une cristallinité comprise entre 15 et 45 % et donnent des profils de diffraction aux rayons X de type A pour l'amidon des céréales et de type B pour l'amidon de tubercules (Morrison et Karkalas, 1990). Les profils A et B sont considérés comme caractéristiques de l'amidon natif. Le profil C est probablement un mélange des profils A et B (Hizukuri et coll., 1983).

Les complexes d'inclusion entre l'amylose et les lipides donnent un profil V par diffraction aux rayons X. Ces profils ne sont généralement pas observés dans les grains d'amidon natifs mais seulement après gélatinisation (dissociation puis ré-association des complexes lipides-amylose) (Morrison et Karkalas, 1990). Par comparaison entre amidons natifs et délipidés, il a été possible de montrer l'existence d'une périodicité de 14 à 16 nm dans l'amidon due aux lipides. Ceux-ci seraient disposés tangentiellement comme l'amylose, confirmant l'existence de V-amylose dans les grains de certains amidons natifs (Blanshard, 1987).

L'hypothèse d'une implication de l'amylopectine dans les lamelles cristallines (ou cristallites) initialement proposée par Meyer (1942), est étayée non seulement par le fait que l'amidon de maïs *waxy* (ne contenant pas d'amylose) est semi-cristallin, mais aussi par le fait que l'amylose peut être enlevée des grains d'amidon, sous conditions appropriées, sans sérieusement modifier la cristallinité du grain (Lineback, 1984).

L'hydrolyse acide et l'oxydation sélective des sections ultrafines ont révélé que les anneaux de croissance des grains d'amidon correspondent à une succession de régions cristallines et amorphes (Kassenbeck, 1978, Yamaguchi et coll., 1979).

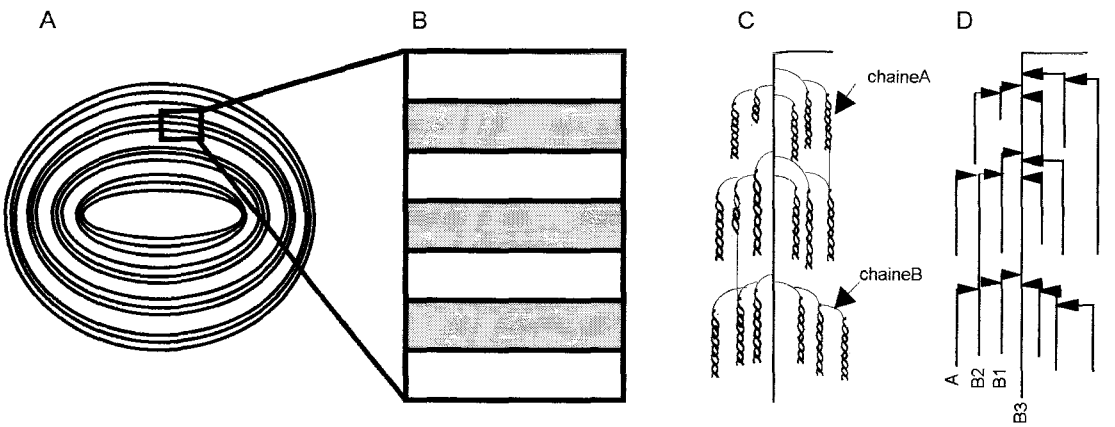


Figure 8: La figure A montre une vue schématique du grain avec les cercles de croissance amorphes et cristallins. la figure B montre l'organisation d'une section du grain représentée figure C par l'association en double hélice des courtes chaînes de l'amylopectine. La figure D reflète la structure primaire de la molécule.

A l'intérieur des régions cristallines, l'amylopectine est organisée en lamelles: cristallines alternant avec des lamelles amorphes (*figure 8*) (Yamaguchi et coll., 1979, Hizukuri et coll., 1985).

Les lamelles cristallines de 5 à 10 nm correspondent à la juxtaposition des courtes chaînes externes A et B1 associées en doubles hélices parallèles (Imberty et coll., 1991, Hizukuri et coll., 1985).

Les points de branchement α–1,6, localisés dans les régions amorphes entre les cristallites, ne doivent pas induire des défauts extensifs dans la structure en double hélice, mais serviraient plutôt à initier l'arrangement cristallin (Imberty et coll., 1991, Buléon et Tran, 1990).

La relation entre le profil de distribution des chaînes de l'amylopectine et la structure cristalline des grains d'amidon a été établie par Hizukuri (1983, 1985). Les amylopectines de l'amidon de type A (des céréales et légumineuses) ont des chaînes plus courtes que les amylopectines de l'amidon de type B (des tubercules). L'amidon de type C présente des valeurs intermédiaires.

Hizukuri (1985) a montré que la longueur et la distribution des chaînes de l'amylopectine étaient des facteurs intrinsèques déterminants dans la structure cristalline de l'amidon.

En fait, la cristallisation du type polymorphe A est favorisée par rapport au type B par des chaînes en moyenne plus courtes, mais également par d'autres facteurs (Asaoka et coll., 1985), notamment le degré d'hydratation (Imberty et coll., 1991). Dans l'amidon de type A, les doubles hélices de l'amylopectine sont associées en un édifice compact, tandis que dans l'amidon de type B, la structure est plus ouverte, avec une plus grande quantité d'eau inter-hélices (Manners, 1989, Imberty et coll., 1991).

Une transition de l'amidon de la forme B à la forme A peut être accomplie par réarrangement des paires de doubles hélices et perte de molécules d'eau.

La transition inverse nécessiterait une gélatinisation pour rompre l'architecture cristalline dense de la forme A (Imberty et coll., 1991).

Jenkins et coll. (1993) ont observé que les amylopectines de différentes sources présentent la même périodicité de 9 nm du motif de base (ou grappe élémentaire) en dépit des variations de cristallinité à l'intérieur de cette fraction. Le caractère apparemment universel de cet espacement peut s'expliquer par l'existence de certaines étapes de la synthèse de l'amidon communes chez différentes espèces (Jenkins et coll., 1993).
Les récentes études de Jenkins et Mc Donald (1994) suggèrent que l'amylose soit entremêlée avec les molécules d'amylopectine et localisée dans les régions amorphes et cristallines du grain.

D'importants aspects de la structure de l'amidon restent sans réponse, y compris l'apparente faculté des longues molécules d'amylose à former des hélices, leur localisation et leur rôle dans l'architecture du grain d'amidon.

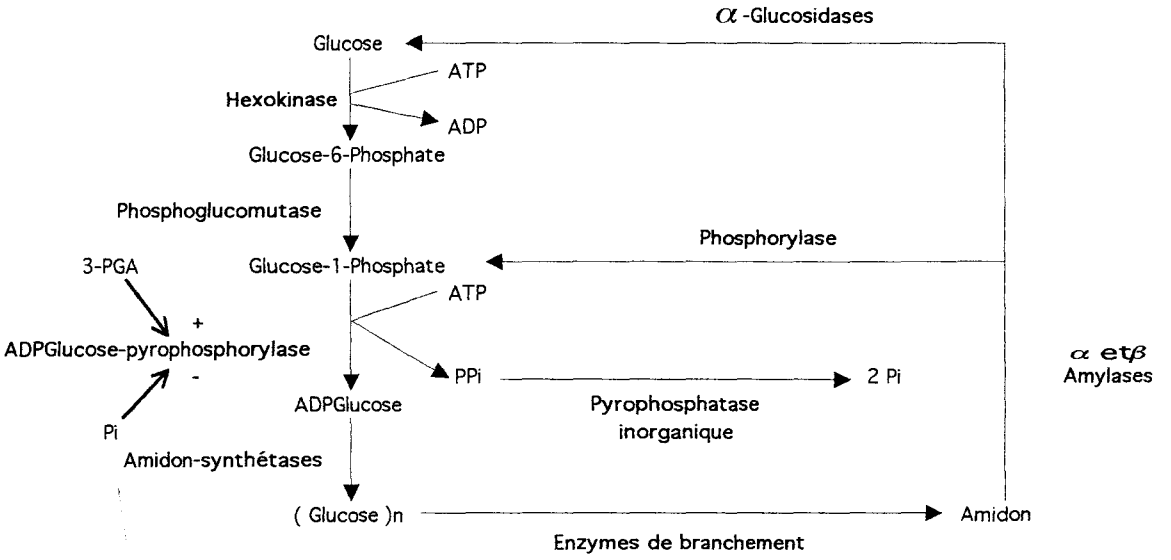


Figure 10: schéma général de biosynthèse de l'amidon.

Le Métabolisme De L'amidon

La biosynthèse de l'amidon s'effectue dans le plaste: à partir du CO_2 dans les tissus chlorophylliens et à partir du saccharose dans les tissus non chlorophylliens et organes de réserve.

Les enzymes de synthèse de l'amidon sont exclusivement actives dans le plaste alors que les enzymes de catabolisme sont réparties entre le plaste et le cytosol (Preiss et Levi, 1980, Preiss, 1991).

Les enzymes clés de cette synthèse sont principalement (*figure 10*) :

- l'ADP-Glc pyrophosphorylase qui catalyse la formation d'ADP-Glc à partir de Glc-1-P et d'ATP.
- les amidon synthétases qui transfèrent le glucose de l'ADP-Glc à l'extrémité non réductrice d'une amorce d'α–1,4–glucane (Recondo et Leloir, 1961, MacDonald et Preiss, 1985).
- les enzymes de branchement qui fixent des chaînes d'α–1,4–glucanes sur d'autres chaînes par l'intermédiaire d'une liaison α–1,6. Elles agissent par hydrolyse et transfert de chaînes préexistantes.

Le mécanisme d'initiation de cette synthèse reste hypothétique.

Plusieurs études ont révélé la présence d'une transglucosylase spécifique de l'UDP-Glc et d'un polypeptide glycosylé de 38 kDa (Tandecartz et coll., 1975, Lavitman et Cardini, 1973). Des rapports ultérieurs ont démontré que le polypeptide de 38 kDa n'est autre que la transglucosylase elle-même qui serait capable de s'autoglucosyler (Moreno et coll., 1986, 1987). Cette glycosylation servirait d'amorce à l'activité amidon synthétase et déclencherait la synthèse du polysaccharide (Lavitman et coll., 1974). L'initiation semble également dépendre de l'activité phosphorylase et amidon synthétase. Elle serait régulée par le rapport des concentrations en UDP-Glc et ADP-Glc (Moreno et coll., 1987, Fernando et Tandecarz, 1992).

Jusqu'à ce jour, aucun mutant affecté dans l'initiation n'a été isolé, alors que de multiples mutants défectueux dans les différentes activités de synthèse ont été caractérisés. Il ne serait pas surprenant de constater que cette fonction d'initiation est le fait d'une, voire de plusieurs enzymes redondantes de la voie de biosynthèse.

Les enzymes de biosynthèse de l'amidon:

L'hypothèse définissant la voie de l'ADP-Glc phosphorylase (ADP-Glc pyrophosphorylase) comme la principale, voire l'unique voie menant à l'amidon est confirmée par d'abondantes études (Preiss et Sivak, 1994).

L'ADP-Glc pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27):

(ATP: α-Glc-1-P-adenyl transférase)

Chez les végétaux supérieurs, les ADP-Glc pyrophosphorylases isolées des tissus photosynthétiques ou des tissus de réserve présentent la même conformation. Ce sont des hétérotétramères de deux sous-unités distinctes (α_2 et β_2) de masse moléculaire de 50 kDa environ (Preiss, 1988, 1991, Morell et coll., 1987).

Bien que voisines, ces deux sous-unités présentent des propriétés immunologiques différentes. En effet, leurs anticorps respectifs montrent très peu de réactions croisées (Morel et coll., 1987). De plus, leur profil de digestion à la trypsine et leur composition en acides aminés divergent. Par conséquent, Preiss (1991) propose que les deux sous-unités de l'ADP-Glc pyrophosphorylase soient codées par des gènes distincts.

Les petites et grandes sous-unités de l'ADP-Glc pyrophosphorylase sont phylogénétiquement bien conservées. Le degré d'homologie entre les petites sous-unités de diverses origines est néanmoins plus élevé et confirmé par la similarité des séquences codantes. Les grandes sous-unités peuvent être séparées en deux catégories selon l'origine photosynthétique ou non du tissu concerné (Smith-White et Preiss, 1992).

Les ADP-Glc pyrophosphorylases bactériennes sont des homotétramères (Kumar et coll., 1986). La séquence de l'enzyme de *Escherichia. coli* présente une homologie avec celle de la petite sous-unité d'ADP-Glc pyrophosphorylase isolée de plusieurs végétaux supérieurs (Smith-White et Preiss, 1992).
Les homologies entre les enzymes bactériennes et végétales concernent principalement les régions codant les sites de reconnaissance des substrats et les sites de fixation des effecteurs allostériques.
Preiss et Sivak (1994) suposent que le gène codant la petite sous-unité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase des végétaux supérieurs descend du gène bactérien. Au cours de l'évolution, ce gène se serait dupliqué et une copie aurait évolué secondairement pour coder la grande sous-unité.

Chez *C. reinhardtii*, l'immunogénicité de la grande sous-unité se rapproche de celle des petites sous-unités de l'ADP-Glc pyrophosphorylase des végétaux supérieurs (Iglesias et coll., 1994). L'ADNc codant la grande sous-unité a été cloné et complétement séquencé par Nathalie Van Den Koornhuyse. Des homologies à la fois avec la sous-unité des cyanobactéries et celles des plantes supérieures ont été mises en évidence.

La prépondérance de la voie de l'ADP-Glc pyrophosphorylase dans la synthèse de l'amidon est dorénavant bien établie (Sivak et Preiss, 1994).
L'utilisation possible de l'UDP-Glc comme substrat par les amidon synthétases avait conduit, dans un premier temps, à l'hypothèse d'une seconde voie de départ pour la synthèse de l'amidon (De Fekete et coll., 1960).
Or, les propriétés cinétiques des amidon synthétases, en comparaison avec la concentration physiologique plastidique en UDP-Glc, restreignent fortement l'utilisation de cette voie dans la synthèse de l'amidon (Sivak et Preiss, 1994, Preiss, 1988, 1991, Preiss et Levi, 1980).

L'isolement et la caractérisation de mutants affectés dans l'activité ADP-Glc pyrophosphorylase ont entériné la voie de l'ADP-Glc (Tsai et Nelson, 1966, Dickinson et Preiss, 1969, Lin et coll., 1988, Ball et coll., 1991).
Les mutants déficients en activité ADP-Glc pyrophosphorylase, isolés chez le maïs ou chez le pois, présentent un contenu en d'amidon proportionnellement réduit (Tsai et Nelson, 1966, Dickinson et Preiss, 1969, Smith et coll., 1989).
Chez *Arabidopsis thaliana*, une souche mutante caractérisée par l'absence d'activité ADP-Glc pyrophosphorylase, accumule moins de 1% de la quantité d'amidon du sauvage (Lin et coll., 1988 a, b).
De même, un mutant de *C. reinhardtii* dont l'activité ADPGlc n'est plus régulée par ses effecteurs allostériques naturels de l'enzyme, possède un contenu en amidon restreint (Ball et coll., 1991).

Par ailleurs, Müller-Robert et coll. (1992) ont inhibé l'activité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase du tubercule de pomme de terre par expression d'un ARNm anti-sens: les tubercules transgéniques n'accumulent plus de l'amidon mais du sucrose.
Stark et coll. (1992) ont démontré qu'inversement, l'augmentation de l'activité ADP-Glc pyrophosphorylase provoquait une accumulation massive d'amidon. Ce résultat a été obtenu par transformation de plants de pomme de terre avec un gène muté de *E. coli* codant une ADP-Glc pyrophosphorylase insensible aux régulateurs de la plante. Les tubercules transformés produisent alors 30 à 60% plus d'amidon, que la normale.

L'ensemble de ces études a permis de conclure définitivement que l'ADP-Glc pyrophosphorylase est l'étape clé de la voie de biosynthèse de l'amidon.

- La régulation de l'activité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase:

Chez la majorité des plantes étudiées, l'activateur et l'inhibiteur les plus efficaces de l'ADP-Glc pyrophosphorylase sont respectivement le 3-phosphoglycérate (3-PGA) et le phosphate inorganique (Pi) (Preiss, 1982).
Le 3-PGA augmente la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme. Il agit en élevant l'affinité de l'enzyme pour l'amorce et s'oppose à l'effet inhibiteur du Pi.

Chez *Chlamydomonas*, Ball et coll. (1991) ont isolé une souche mutante dont l'ADP-Glc pyrophosphorylase est insensible aux activateurs allostériques confirmant l'effet du 3-PGA *in vivo*. La synthèse de l'amidon peut donc être régulée par l'intermédiaire du rapport des concentrations en 3-PGA et en Pi.
Des sites de liaisons au 3-PGA sont présents sur les deux types de sous-unités de l'ADP-Glc pyrophosphorylase de la feuille d'épinard (Preiss, 1991).
La régulation par le 3-PGA et le Pi a également été démontrée dans les tissus de réserve (Preiss et Sivak, 1994).

Les amidon synthétases (EC 2.4.1.21):

ADP-Glc: α-1,4 D-glucan 4–α –D-glucosyltransférases

L'activité amidon synthétase peut être mesurée par l'incorporation de ^{14}C-Glc dans une amorce telle que le glycogène ou l'amylopectine, à partir d'ADP-Glc marqué (MacDonald et Preiss, 1983, 1985).

Les deux catégories d'amidon synthétases (soluble et liée au grain) présentent des caractéristiques physiques et cinétiques distinctes (***tableaux 4 et 5***). Contrairement aux amidons synthétases solubles (ou SSS pour Soluble Starch Synthase), l'amidon synthétase liée (ou GBSS pour Granule Bound Starch Synthase) est capable d'utiliser l'UDP-Glc comme substrat, mais avec une affinité moindre qu'avec ADP-Glc (MacDonald et Preiss, 1983).
Toutefois, l'hypothèse d'un rôle de l'UDP-Glc dans l'initiation de la synthèse reste envisageable (Ardila et Tandecarz, 1992).

	GBSS I	GBSS II
Masse moléculaire	61000 Da	93000 Da
Km :		
ADPglucose	0,14 mM	0,11 mM
Amylopectine	1,2 mg/ml	0,26 mg/ml
Amylopectine + citrate 0,5 M	---------	0,04 mg/ml
Activités relatives selon l'amorce :		
Amylopectine	1,0	1,0
Glycogène de foie de lapin	1,6	0,8
Amylopectine + citrate 0,5 M	2,5	0,48
Sans amorce + citrate 0,5 M	5,7	1,9
Maltose 1 M	2,9	0,51
Maltotriose 0,1 M	1,6	1,4
Activité relative	80 %	20 %

Tableau 3: Caractéristiques des amidon synthétases liées (GBSS).

L'amidon synthétase liée ou GBSS (Granule Bound Starch Synthase):

Les méthodes drastiques, souvent indispensables pour extraire les protéines du grain, n'épargnent pas les activités enzymatiques; l'isolement de l'activité GBSS n'a donc pas été chose aisée.

Malgré les difficultés rencontrées, MacDonald et Preiss (1985) parvinrent à solubiliser les protéines liées et à purifier partiellement cette activité. Deux -voire trois- amidon synthétases liées furent isolées (Preiss et Sivak, 1994)-.

La GBSS I et la GBSS II ont les caractéristiques enzymologiques (*tableau 3*) et immunologiques distinctes et sont probablement codées par des gènes différents (Preiss, 1991).

Une fois solubilisée, l'activité GBSS perd sa capacité à utiliser l'UDP-Glc, et son affinité pour l'ADP-Glc devient alors dix fois supérieure, son *Km* (ADP-Glc) s'approchant alors de celui des amidon synthétases solubles.

La GBSS I exprime 80% de l'activité amidon synthétase liée totale (MacDonald et Preiss, 1985). La protéine est généralement assimilée à la protéine Waxy extraite du grain d'amidon par des méthodes dénaturantes (Preiss et Sivak, 1994).

- L'identification du locus Waxy comme gène de structure de l'amidon synthétase liée:

L'idée que la protéine Waxy et la GBSS I (activité majoritaire) ne forment qu'une seule et même entité repose sur de nombreux résultats (Preiss et Sivak, 1994).

Dans les mutants *waxy*, la protéine Waxy est souvent absente ou modifiée. Ces mutants n'ont virtuellement pas d'amylose et leur activité GBSS est très basse (Nelson et Rines, 1962, Tsai, 1974, Shure et coll., 1983, Nelson et coll., 1978).

Le produit du gène *Wx* possède une masse moléculaire de 55 à 60 kDa et représente 90 % des protéines extraites du grain d'amidon (Vos-Scheperkeuter et coll., 1986). Les anticorps dirigés contre la protéine Waxy pure reconnaissent la GBSS I (Preiss et Sivak, 1994).

La séquence nucléotidique du locus *Wx* du maïs a été déterminée (Klösgen et coll., 1986) et le locus *Wx* de l'orge a été identifié et cloné (Rohde et coll., 1988). La séquence protéique a été établie chez le riz, la pomme de terre, le manioc, le blé et le pois (Wang et coll., 1990, van der Leij et coll., 1991, Saleahuzzaman et coll., 1993, Ainsworth et coll., 1993, Dry et coll., 1992).
La comparaison de ces séquences avec celle de la glycogène synthétase d'*E. coli* (Kumar et coll., 1986) révèle des similarités notamment dans la région de fixation du substrat (ADP-Glc).

Chez *C. reinhardtii*, où la GBSS semble exister sous une seule forme, Delrue et coll. (1992) ont isolé deux mutants (18B et 25B) dont l'activité liée est fortement altérée. La protéine Waxy visualisée en électrophorèse SDS montre chez le mutant 18B une modification de masse moléculaire et cette proteine est faiblement représentée chez le mutant 25B.
La coségrégation entre la défectuosité GBSS et le profil électrophorétique de la protéine Waxy dans la descendance de ces deux souches mutantes a permis d'identifier la GBSS comme étant la protéine Waxy.

- Le rôle de l'amidon synthétase liée dans la synthèse d'amylose:

Chez les mutants *waxy* de diverses origines, la décroissance de l'activité amidon synthétase liée est corrélée au faible taux d'amylose (Shannon et Gardwood, 1984). Tsai (1974) a observé que le déficit en amylose était lié à la dose de gène *wx* dans les souches.
Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'ARN messagers anti-sens (Visser et coll., 1991, Shimada et coll., 1993) et ont conduit à définir la GBSS comme l'enzyme responsable de la synthèse d'amylose.

Chez *C. reinhardtii*, Delrue et coll. (1992) ont démontré que cette activité contribuait également à l'élaboration d'une fraction de l'amylopectine.

	SSS I	SSS II
Masse moléculaire	72000 Da	95000 Da
Km :		
ADPglucose	0,1 mM	0,1 mM
Amylopectine	0,16 mg/ml	1,5 mg/ml
Amylopectine + citrate 0,5 M	< 1 µg/ml	0,09 mg/ml
Activités relatives selon l'amorce :		
Amylopectine	1	1
Amylopectine + citrate 0,5 M	4,4	1,8
Sans amorce + citrate 0,5 M	5,8	< 0,02
Glycogène de foie de lapin	2,1	0,6
Maltose 1 M	1,6	1,2
Maltotriose 0,1 M	0,9	0,5

Tableau 4: Caractéristiques des amidon synthétases solubles (SSS).

Les amidon synthétases solubles ou SSS (Soluble Starch Synthases):

Les caractérisations réalisées sur une variété de végétaux révèlent la présence d'au moins deux formes majeures d'amidon synthétases solubles (Preiss, 1988, 1991, Preiss et Levi, 1980) appelées communément de type I et de type II. Dans la plupart des cas, la SSSI élue à une plus faible concentration en sels que la SSSII en chromatographie échangeuse d'anions.

Les amidon synthétases I et II diffèrent par leur masse moléculaire, respectivement d'environ 72 et 95 kDa dans l'albumen du maïs (Preiss, 1991) et de 70 et 92-96 kDa dans les feuilles d'épinard (Hawker et coll., 1974).
Les formes isolées de l'albumen du maïs sont immunologiquement distinctes (Macdonald et Preiss, 1985).

La SSSI et la SSSII partiellement purifiées des graines de maïs (Boyer et Preiss, 1979, Pollock et Preiss, 1980) présentent des propriétés cinétiques distinctes (*tableau 4*).
L'affinité apparente pour l'ADP-Glc est similaire pour les deux formes. La SSSI présente une activité plus élevée avec le glycogène, tandis que la SSSII préfère l'amylopectine comme substrat.
La SSSI est plus sensible à la stimulation par le citrate en présence d'amorce exogène, et reste seule active en absence d'amorce et en présence de citrate 0,5 M. Une petite quantité de glucanes restant fixés à l'amidon synthétase isolée suffit à amorcer la réaction (Ozbun et coll., 1971, 1972, Boyer et Preiss, 1979, Polock et Preiss, 1980). Le citrate agit en augmentant l'affinité apparente de l'enzyme envers son substrat (Boyer et Preiss, 1979, Pollock et Preiss, 1980).

Les propriétés cinétiques de ces amidon synthétases solubles semblent indiquer que la forme I serait plus affine envers les chaînes très courtes (c-a-d les chaînes A) alors que la forme II préférerait les chaînes B d'au moins 20 résidus de glucose (Preiss et Sivak, 1994).

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'isolement de la souche mutante I152 a permis d'associer l'activité de la SSSII et la présence des chaînes de longueur intermédiaire de d.p. 8 à 50 (supposées être des chaînes B) de l'amylopectine (Fontaine et coll., 1993).

Les disparités entre les caractéristiques physiques, cinétiques et immunologiques des amidon synthétases solubles I et II ont amené à les considérer comme le produit de deux gènes différents.
La souche mutante de *C. reinhardtii* déficiente dans l'activité SSSII montre une activité SSSI inaltérée qui laisse également supposer l'existence de deux gènes de structure (Fontaine et coll., 1993).

Les enzymes de branchement (EC 2.4.1.18):

α-1-4-**D-glucane**: α-1,4-**D-glucane** 6-α-**D-(1,4-α-D-glucano)transférases**

Plusieurs formes d'enzymes de branchement ont été mises en évidence quelque soit l'origine du tissu (Smith et coll., 1988, Mizuno et coll., 1992, Yamanouchi et Nakamura, 1992). Trois isoformes ont été isolées de l'albumen du maïs (Boyer et Preiss, 1978a b, Singh et Preiss, 1985).

La purification de ces enzymes, appelées BEI (pour Branching Enzyme I), BEIIa et BEIIb chez le maïs nécessite une précipitation au sulfate d'ammonium et différentes chromatographies (Boyer et Preiss 1978a b,). Les formes I et II ont respectivement des masses moléculaires de 82 et 80 kDa.
Bien que certaines homologies existent entre les trois enzymes de branchement, la forme I diffère de la forme II par certaines spécificités immunologiques et sa composition en acides aminés (Singh et Preiss, 1985).
Les enzymes BEIIa et BEIIb sont fortement similaires et sont supposées être les produits d'un même gène.

Takeda et coll. (1993a) ont analysé le type de branchement effectué par chacune des trois isoformes purifiées sur l'amylose

Les trois enzymes ont une plus grande affinité pour les plus longues chaînes d'amylose (longeur moyenne de 405 résidus de glucose). Cependant, l'enzyme BEI peut encore catalyser efficacement le branchement de chaînes d'amylose d'une longueur de 197 alors que les activités BEII s'effondrent lorsque la taille des chaînes diminue.

L'analyse des produits branchés a indiqué que les formes BEII transfèrent de plus courtes chaînes que la forme BEI.

De plus, Takeda et coll. (1993a) ont montré que l'enzyme BEI ramifie préférentiellement l'amylose, alors que les formes BEII sont plus actives dans le branchement de l'amylopectine.

Ces particularités suggèrent que l'enzyme de branchement BEI soit impliquée dans la construction des chaînes internes (B) et que les enzymes de branchement BEII interviennent plutôt dans la formation des courtes chaînes externes (A) de l'amylopectine (Preiss et Sivak, 1994).

Les enzymes de dégradation de l'amidon:

Les α-amylases ont souvent un grand intérêt industriel et commercial, notamment dans la saccharification de l'amidon.

En dehors de la dégradation, processus largement étudié ayant lieu durant les étapes de germination, le mécanisme de dégradation de l'amidon est loin d'être connu *in planta*. L'hétérogénéité des enzymes qui en sont responsables et surtout l'absence de mutants décrits jusqu'à présent freinent la compréhension de ce phénomène.

La dégradation de l'amidon dans les tissus de réserve résulterait de l'action des α-amylases qui désorganiserait le grain et libéreraient de longues chaînes servant de substrat aux autres enzymes d'hydrolyse (Steup, 1988).

La libération de Glc-1-P proviendrait des activités concertées des transglycosylases et des phosphorylases (Levi et Preiss, 1978).

L' α-amylase (EC 3.2.1.1):

Cette enzyme est largement présente chez les végétaux et joue un rôle primordial dans la dégradation de l'amidon.

L'α-amylase est une endoenzyme: son hydrolyse débute sur une liaison α-1,4 interne des glucanes linéaires. Son action peut concerner plusieurs chaînes en même temps (MacGregor et coll., 1983). La présence de liaisons α-1,6 l'empêche d'agir et ceci à une distance d'au moins 5 résidus de glucose du point de branchement (Manners, 1985).

L'action des α-amylases se traduit par une dépolymérisation rapide du polysaccharide, sauf si la structure initiale est hautement ramifiée (Steup, 1988). La digestion α-amylasique de l'amylose résulte en une série d'oligomères de d.p. inférieur à 7. La dégradation de l'amylopectine produit en plus, des α-dextrines (au minimum un pentasaccharide) (Manners, 1985).

La β-amylase (EC 3.2.1.2):

La β-amylase est une exoenzyme présente chez les végétaux supérieurs et chez certains micro-organismes. L'hydrolyse des liaisons α-1,4 s'effectue ici, de manière récurrente, à partir de l'extrémité non réductrice d'un α-1,4-glucane. L'activité β-amylasique libère principalement du maltose, elle est arrêtée par la présence des liaisons α-1,6. L'action de la β-amylase sur un polysaccharide ramifié se limite aux extrémités accessibles de la molécule (Steup, 1988).

Les enzymes de débranchement (EC 3.2.1.10):

Des enzymes de débranchement ont été purifiées des graines et des feuilles de plantes supérieures (Steup, 1988). Elles clivent spécifiquement les liaisons α-1,6 d'un α-1,4-glucane ramifié (les glucoamylases quant à elles hydrolysent également les liaisons α-1,4). La présence des liaisons α-1,4 est indispensable à l'activité de débranchement.

Deux types d'enzymes se différencient selon leur mode d'action direct ou indirect. Le débranchement direct consiste en un clivage des liaisons α–1,6 d'un polysaccharide libérant les chaînes α–1,4 linéaires intègres. Les enzymes de débranchement direct appartiennent au métabolisme de l'amidon des plantes (Steup, 1988). L'activité des enzymes de débranchement indirect nécessite une coopération avec une glucane transférase et une amylo-1,6-glucosidase et concerne le métabolisme du glycogène animal et bactérien.

Les α -glucane phosphorylases (EC 2.4.1.1):

Elles catalysent la réaction suivante:

α–D-Glc-1-P + (α–1, 4–D-Glc) n <----> Pi + (α–1, 4–D-Glc) n+1

Cette réaction est réversible *in vitro*. Toutefois, la voie de l'ADP-Glc pyrophosphorylase définie comme voie principale conduisant la synthèse d'amidon cantonne les phosphorylases à une activité de catabolisme *in vivo*.

Deux types de phosphorylases ont été décrites dans la feuille d'épinard (Schächtele et Steup, 1986). Ces deux enzymes se différencient par leur localisation (chloroplastique ou non) et par leurs caractéristiques cinétiques et immunologiques. Les deux isoformes mises en évidences dans les tubercules de pomme de terre sont également distinctes (Nakano et Fukui, 1986).

La phosphorylase la plus active est la forme I, cytosolique (Monroe et Preiss, 1990). Chez les algues vertes aucune activité cytosolique n'a été détectée.

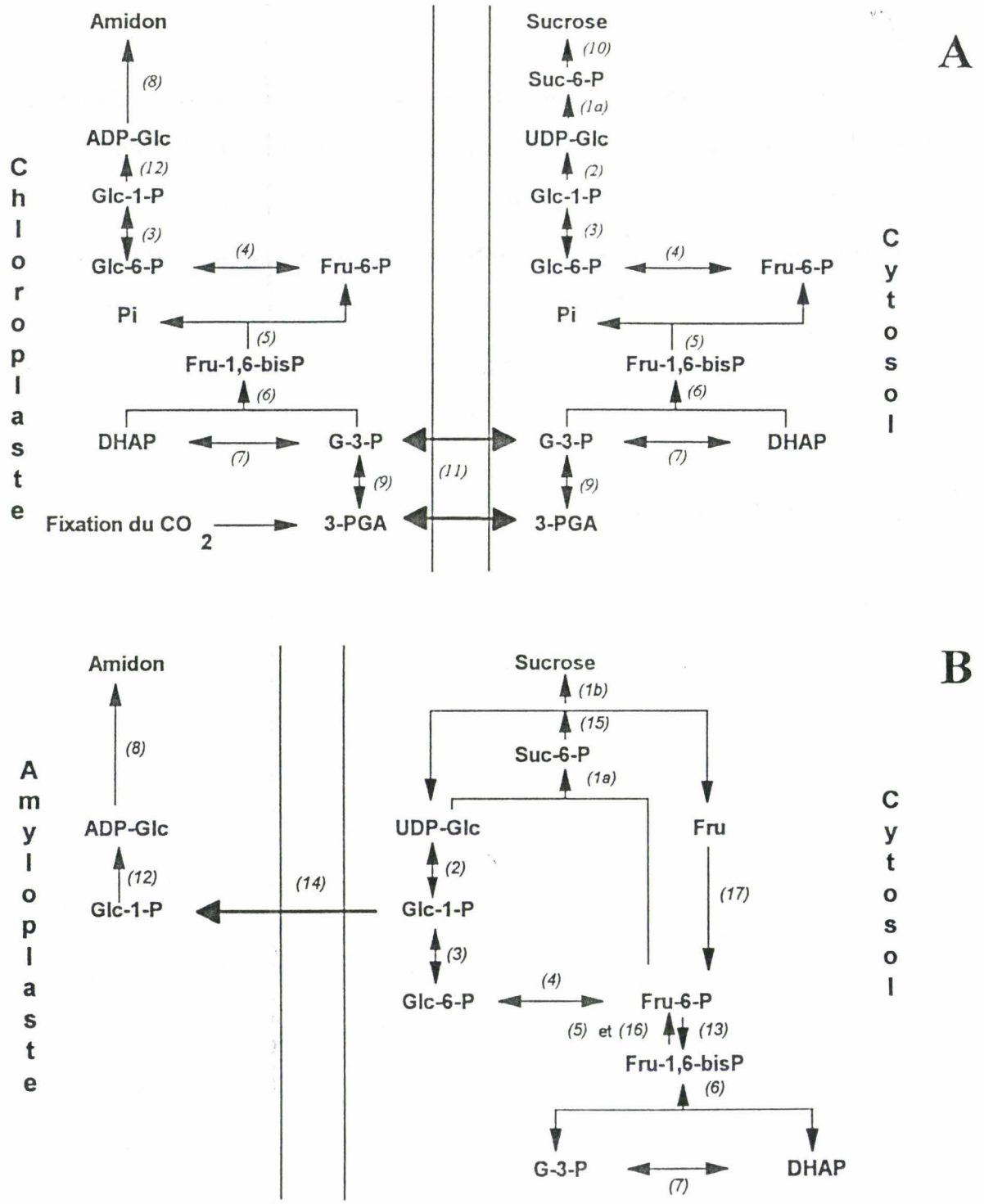


Figure 11: Schéma proposées pour le métabolisme du carbone:

A- dans les tissus photosynthétiques.

B- dans les tissus de reserve.

(1a) Sucrose-P-synthétase
(1b) Sucrose-synthétase
(2) UDP-Glc pyrophosphorylase
(3) Phosphoglucomutase
(4) Hexose-P isomérase
(5) Fructose-1,6-bisphosphatase
(6) Aldolase
(7) Triose-P-isomérase
(8) Amidon-synthétases
(9) Glycéraldéhyde-3-P-deshydrogénase/phosphoglycérate kinase
(10) Sucrose-P-phosphatase
(11) Transporteur de triose-P
(12) ADP-Glc pyrophosphorylase
(13) Phospho-fructo kinase ATP-dépendante
(14) Transporteur d'hexoses
(15) Sucrose phosphatase
(16) Phospho-fructo kinase PPi-dépendante
(17) Hexokinase

La compartimentation:

Bien que les plastes possèdent leur propre génome, toutes les enzymes de synthèse de l'amidon isolées jusqu'à présent sont codées par le noyau. Les formes immatures synthétisées dans le cytosol se caractérisent par un peptide de transit N-terminal qui guide le transfert de la protéine vers le plaste (Sullivan et coll., 1991).

Les cellules des tissus photosynthétiques produisent et accumulent des réserves de manière transitoire dans le chloroplaste pendant la phase claire de la photosynthèse. Dès que le flux de carbone ne suffit plus à assurer les besoins énergétiques de la plante, l'amidon est catabolisé. L'excédent carboné transite sous forme de sucrose jusqu'aux tissus de réserve.

Le flux de carbone dans les tissus photosynthétiques:

Dans le chloroplaste, la fixation du CO_2 par la photosynthèse conduit à la formation de molécules de 3-PGA par l'intermédiaire du cycle de Calvin.
La membrane externe des chloroplastes est relativement perméable contrairement à la membrane interne, où le passage est sous la dépendance de transporteurs spécifiques. Akazawa et coll. (1989) ont mis en évidence un translocateur de triose-phosphates dans la membrane interne. Ce translocateur permet d'échanger le 3-PGA chloroplastique avec le phosphate inorganique cytosolique. Les trioses-phosphates importés dans le cytoplasme sont utilisés pour la synthèse du sucrose, sous l'action combinée des enzymes de la néoglucogenèse et de la synthèse du sucrose (*figure 11*).

Les enzymes assurant la synthèse de fructose-6-phosphate (Fru-6-P) à partir de 3-PGA sont présentes à la fois dans le chloroplaste et le cytosol. La phospho-glucose isomérase (PGI) qui transforme le Fru-6-P en Glc-6-P et la phosphoglucomutase (PGM) qui produit le Glc-1-P à partir du Glc-6-P sont également présentes dans les deux compartiments. L'UDP-Glc pyrophosphorylase, la sucrose-phosphate synthase et la sucrose-phosphate-phosphatase conduisant à la formation de sucrose sont uniquement cytosoliques.

Le flux de carbone dans les tissus de réserve:

Bien qu'il soit possible que certaines réactions effectuées au niveau les chloroplastes se produisent également dans les amyloplastes, une extrapolation n'est pas concevable. En effet, Entwistle et coll. (1988) ont démontré l'absence de la Fru-1-6-bisphosphatase dans les amyloplastes de l'albumen de blé. La membrane de l'amyloplaste étant pratiquement imperméable au sucrose, celui-ci doit être converti en un autre produit pour permettre l'accumulation d'amidon.

Keeling (1989) a montré que la majorité du carbone entrait dans l'amyloplaste sous forme d'hexoses phosphates (*figure 11*). Le Glc-1-P apparaît comme le seul précurseur chez l'albumen de blé, alors que le transport s'effectue par l'intermédiaire du Glc-6-P chez l'embryon de pois (Hill et Smith, 1991).

La voie alternative:

Les hypothèses concernant cette voie résultent de l'isolement d'un transporteur d'adénylate à partir des amyloplastes de cellules de sycomore (Akazawa et coll., 1989). Pozueta-Romeo et coll. (1991) ont également isolé ce transporteur des feuilles d'épinard et ont postulé que le flux de carbone dans le plaste se faisait sous forme d'ADP-Glc via ce transporteur.

Dans les tissus de réserve, l'ADP-Glc cytosolique proviendrait de l'hydrolyse du sucrose par une pyrophosphorylase cytosolique (Kleczkowski et coll., 1991).

Sullivan et coll. (1991) ont cloné le gène *Bt-1* (*brittle-1*) du maïs et ont défini une similarité entre le produit de ce gène et les transporteurs d'adénylates. Shannon et coll. (1992) ont dosé une quantité considérable d'ADP-Glc dans les mutants *brittle-1* du maïs.

Cette accumulation d'ADP-Glc, liée au déficit en amidon dans ces mutants *bt-1* , peut s'expliquer par l'inactivité des transporteurs apportant l'ATP nécessaire à la synthèse d'amidon dans les amyloplastes.

Génotype	modifications biochimiques majeures	enzyme concernée
sh-1	↑sucres ↓amidon	↓sucrose synthase
sh-2	↑sucres ↓amidon	↓ADP-Glc pyrophosphorylase ↑hexokinase
bt-2	↑sucres ↓amidon	↓ADP-Glc pyrophosphorylase
sh-4	↑sucres ↓amidon	↓phosphate de pyridoxal
su-1	↑sucres ↓amidon ↑phytoglycogène	inconnue
wx	environ 100% d'amylopectine	↓GBSS
ae	↑polysaccharide peu branché ↑ pourcentage apparent d'amylose	↓BEIIb
du	↑ pourcentage apparent d'amylose	↓SSSII et BEII

Tableau 5: *Défectuosités liées aux mutations dans la voie de biosynthèse de l'amidon chez le maïs.*

Les Principaux Mutants Décrits Chez Le Maïs

Parmi les espèces végétales étudiées à ce jour, le maïs, par son importance économique et le modèle génétique qu'il représente, a fait l'objet de recherches les plus approfondies. Ce système constituera donc la référence essentielle pour la description des principales mutations affectant la synthèse de l'amidon (*tableau 5*).

Dans cette voie de biosynthèse, les mutations *shrunken-1 (sh-1)*, *shrunken-2 (sh-2)*, *shrunken-4 (sh-4)* et *brittle-1 (bt-1)*, *brittle-2 (bt-2)* affectent l'accumulation d'amidon et entraînent l'augmentation en sucres solubles et en saccharose (*tableau 6*).

L'effet majeur des mutations *amylose extender (ae)*, *dull (du)*, *sugary (su-1)*, *sugary-2 (su-2)* et *waxy (wx)* est un remaniement structural du polysaccharide accumulé (*tableau 6*).

Ces mutants ayant un rapport direct avec notre étude, nous leur avons porté un intérêt plus marqué.

L'amidon de maïs sauvage est composé d'environ 25% d'amylose, 70% d'amylopectine et 5 à 10% de matériel dit "intermédiaire". Les premières études estimaient la proportion apparente en amylose en fonction du complexe-iode de l'amidon natif. Depuis, il fut maintes fois démontré que les valeurs obtenues par ces méthodes sont faussées par la présence de matériel de structure "anormale" et notamment dans les mutants dits "riches en amylose" (Shannon et Gardwood, 1984).

Génotype	WSP (10 % éthanol) % du poids sec	Amylose %	Type de profil aux rayons X
Sauvage	4	29	A
wx	7	0	A
ae	6	33	B
su	19	65	A
su-2	4	nd	A
du	5	55	A
ae wx	5	0	B
ae su	5	28	B
ae su-2	6	nd	B
ae du	5	47	B
du su	18	70	A
du su-2	4	nd	A
du wx	8	0	A
su wx	17	0	nd
su-2 wx	5	nd	nd
su su-2	19	nd	nd

Tableau 6: *Conséquences de certaines mutations sur la nature des polysaccharides accumulés.*

Brittle-1

Les mutants *brittle-1* présentent un déficit en amidon et une accumulation de l'ADP-Glc dans l'amyloplaste (***tableaux 5 et 6***) (Shannon et coll., 1992). L'analyse des séquences codantes du gène *Bt-1* a permis d'établir une homologie avec les protéines de type transporteur des enveloppes mitochondriales. Rappelons que dans l'albumen, le plaste est essentiellement non photosynthétique et l'ATP nécessaire à la synthèse d'amidon doit donc provenir d'une autre source. Aussi, le produit du gène *Bt-1* pourrait être un transporteur d'ATP au niveau de la membrane de l'amyloplaste (Sullivan et coll., 1991).

Brittle-2 et Shrunken-2

Les mutants *brittle-2* et *shrunken-2* sont fortement défectueux dans l'activité ADP-Glc pyrophosphorylase et accumulent 25% de la quantité d'amidon du sauvage (***tableaux 6 et 7***). Grâce à l'utilisation d'anticorps, Preiss et coll. (1992) ont établi que les gènes *Bt-1* et *Sh-2* codent respectivement pour la petite et la grande sous-unité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase.

Shrunken-1

La mutation *sh-1* fut caractérisée initialement par Chourey et Nelson (1976). La souche *shrunken-1* est déficiente dans la forme 1, la plus active, de la sucrose-synthase. L'activité résiduelle dans le mutant *sh-1* est attribuée à la sucrose synthase 2.

Shruken-4

Les mutants *sh-4* accumulent moins d'amidon que la souche sauvage. La mutation *sh-4* a des effets multiples: les activités ADP-Glc pyrophosphorylase, amidon synthétase et UDP-Glc pyrophosphorylase sont de 20 à 40% des activités mesurées chez les souches sauvages (Ozbun et coll., 1973). La mutation *sh-4* semble engendrer une diminution générale du taux de protéines. La défectuosité liée à cette mutation reste à définir.

Waxy

Les mutants *waxy* sont défectueux dans l'activité GBSS et se caractérisent par une forte réduction de la quantité d'amylose (*tableaux 5 et 6*). Comme nous l'avons mentionné précédemment, la corrélation entre l'absence de la protéine majeure liée au grain et la perte d'activité GBSS, les comparaisons de séquences et la reconnaissance immunologique des anticorps respectifs ont permis de dire que cette protéine majeure constitue le support de l'activité GBSS (Preiss et Sivak, 1994). Cette protéine a alors été appelée protéine Waxy.

Les locus *Wx* du maïs (Klösgen et coll., 1986) et de l'orge (Rohde et coll., 1988) ont été clonés et séquencés.

Le plus souvent, l'amidon *waxy* de diverses origines est constitué uniquement d'amylopectine et se colore typiquement en rouge par complexation avec l'iode. Un phénotype plus atténué a parfois été décrit (Shannon et Gardwood, 1984).

Quel que soit l'approche expérimentale, la production de l'amylose est toujours dépendante de la présence d'activité amidon synthétase liée. Le rôle de la GBSS fut longtemps confiné à la synthèse de ce constituant de l'amidon.

C'est ainsi que de nombreuses études se réfèrent à l'amylopectine *waxy* comme amylopectine normale pure.

Or, des différences entre ces deux amylopectines ont été observées et notamment l'absence de longues chaînes B dans l'amylopectine mutante (Takeda et coll., 1993a, Inouchi et coll., 1987).

La CL moyenne des chaînes rapportée est constamment plus élevée pour l'amylopectine sauvage (20 à 22) que pour l'amylopectine waxy (15 à 18) (Yun et Matheson, 1993, Inouchi et coll., 1987, Takeda et Preiss, 1992, Banks et Greenwood, 1975).

De plus, Delrue et coll. (1992) ont montré qu'une sous-fraction de l'amylopectine (appelée amylopectine de type II) disparaît chez les mutants de *Chlamydomonas* 18B et 25B de type *waxy*.

Ainsi, l'amylopectine waxy ne peut être assimilée à de l'amylopectine sauvage pure. La GBSS semble également impliquée dans synthèse de l'amylopectine.

Alors que l'amylose représente environ 25% de la quantité d'amidon du maïs sauvage, les mutants *wx* ont une quantité d'amidon normale.

Ce phénomène inexpliqué est source de nombreuses hypothèses sur l'intervention respective des amidon synthétases dans l'élaboration de l'amylopectine (Preiss et Sivak, 1994).

Dull

Les mutants *du* se caractérisent par un taux d'amylose communément élevé et la présence de sucres solubles (***tableau 6***) (Yeh et coll., 1971, Shannon et Gardwood, 1984).

Toutefois, l'amylose du mutant *du* a été rapportée comme possédant une structure similaire à l'amylose normale et, chez ce mutant, les sucres solubles ne constituent pas une structure organisée comme le phytoglycogène de *su-1* (Shannon et Gardwood, 1984,).

L'effet de la mutation *du* semble concerner essentiellement l'amylopectine. Elle est en proportion réduite, et le nombre de chaînes d'un d.p. moyen de 45 est réduit par rapport à celui des courtes chaînes d'un d.p. moyen de 15 (Inouchi et coll., 1987).

Ces caractéristiques ne sont pas sans rappeler celles du mutant de *Chlamydomonas*, défectueux dans l'amidon synthétase soluble II.

Les études enzymologiques réalisées sur les mutants *du* indiquent une diminution de l'activité SSSII (Boyer et Preiss, 1978a b), peut être par l'intermédiaire d'un gène régulateur.

Amylose extender

L'amidon des mutants *amylose extender* (ou amylomaïs) se caractérisent par leur richesse relative en amylose (de 33 à 66%) et par la présence d'une fraction intermédiaire (jusqu'à 20%) constituée de longues chaînes faiblement ramifiées (***tableau 6***) (Takeda et coll., 1993a, Yun et Matheson, 1993, Baba et coll., 1983, Ikawa et coll., 1981, Yeh et coll., 1981, Mercier, 1973).
Les mutations *r* du pois ridé (Colonna et Mercier, 1984) et *ae* du riz (Takada et coll., 1989, Yano et coll., 1985, Takeda et Hizukuri, 1987, Juliano et coll., 1990) ont également été caractérisées et présentent des effets similaires.

Dans la majorité des études réalisées sur les mutants amylomaïs, au moins trois fractions sont séparées de l'amidon et certains auteurs rapportent la présence d'une quatrième fraction de masse moléculaire beaucoup plus faible (Colonna et Mercier, 1984, Inouchi et coll., 1987, Takeda et coll., 1993).
Sans vouloir trancher sur la nomenclature utilisée, l'ensemble de ces descriptions indique l'existence de deux fractions distinctes dans ce qui est nommé matériel "anormal": une fraction de masse moléculaire plus faible que l'amylose essentiellement linéaire et une fraction de masse moléculaire intermédiaire entre celle de l'amylose et celle de l'amylopectine modérément branchée.
Cet enrichissement en longues chaînes se traduit par une valeur de CL moyenne plus élevée (de 5 résidus de glucose environ) (Inouchi et coll., 1987, Yun et Matheson, 1993,) et le profil de diffraction RX de type B de l'amidon (Asaoka et coll., 1985, Hizukuri, 1985).

Chez la pomme de terre sauvage l'amylopectine renferme des chaînes plus longues responsables du profil de diffraction RX de type B (Hizukuri, 1985). Or, il semble établi aujord'hui, que seule l'enzyme de branchement de type I (BEI) soit présente dans les tubercules de pomme de terre (J. Kössmann, communication personnelle).

L'allèle sauvage *Ae* n'est pas complètement dominant sur l'allèle *ae*. En effet, la proportion en amylose augmente chez les mutants de l'albumen du maïs de génotype *Ae ae ae* (Shannon et Gardwood, 1984).

Les mutants homozygotes pour l'allèle récessif *ae* du maïs montrent une activité de branchement BEII restreinte (Boyer et Preiss, 1978b, 1981). Hedman et Boyer (1982) ont observé une relation presque linéaire entre l'activité BEII et l'augmentation de la dose d'allèle *Ae* dominant.

Le locus *Ae-1* du mutant *amylose extender* dominant a été cloné et caractérisé (Stinard et coll., 1993). Le mutant dominant *Ae* ne contient pas d'activité de branchement BEII. Les enzymes de branchement de type II ont été définies comme les produits du gène *Ae* (Preiss et Sivak, 1994).

Cette défectuosité dans les activités BEII des mutants *amylose extender* est corrélée à la structure altérée de leur amylopectine. Globalement, les fractions amylopectidiques des mutants *ae* montrent une proportion réduite en courtes chaînes. Or, les activités BEII transfèrent préférentiellement des courtes chaînes *in vitro* (Takeda et coll., 1993).

Sugary-1

La caractéristique principale des mutants *sugary* est la présence de phytoglycogène (***tableau 7***). Ce polysaccharide soluble est uniquement constitué de très courtes chaînes (CL moyen de 11) et son taux de branchement est élevé (9,7 au lieu de 5,4 pour l'amylopectine) (***figure 7***) (Inouchi et coll., 1987, Yun et Matheson, 1993).

La quantité de sucres totaux chez le mutant *sugary* est du même ordre que chez le sauvage mais les proportions rapportées en amylose (0 à 65%) et en matériel anormal sont très variables (Boyer et Liu, 1985, Ikawa et coll., 1981 Yeh et Gardwood, 1981, Juliano et coll., 1990).

L'amylopectine de *su* est de masse moléculaire faible et la proportion en chaînes de d.p. 15 et de d.p. 45 est élevé (Ikawa et coll., 1981, Asaoka et coll., 1985, Yeh et coll., 1981).

En réalité, les différents constituants polysaccharidiques du mutants *su* doivent être considérés comme un continuum de molécules qui résulterait d'une désorganisation du grain d'amidon en phytoglycogène (Shannon et Gardwood, 1985, Yeh et coll., 1981, Asaoka et coll., 1985a).

Boyer et Preiss (1978b) ont mesuré une activité anormale de l'enzyme de branchement BEI extraite des mutants *sugary-1*.

Les expériences de dosage de gène (Pan et Nelson, 1984) ont suggéré que le gène *Su-1* soit le gène de structure d'un enzyme de débranchement. Une hypothèse serait que le branchement de l'amylopectine résulterait d'un équilibre entre les activités de branchement et de débranchement.

Gardwood et Vanderslice (1982) ont supposé un rôle régulateur du locus *su*.

La défectuosité engendrée par la mutation *su* n'est toujours pas établie.

Sugary-2

Les mutants *su-2* sont indéniablement enrichis en amylose (*tableau 6*) (Shannon et Gardwood, 1984).

La présence de matériel intermédiaire est également une caractéristique de ces mutants et bien que la quantité relevée soit variable (3 à 7% pour Ikawa et coll., 1981, Inouchi et coll., 1987, et 35% d'après Takeda et Preiss, 1992), elle se situe généralement entre celle de l'amidon sauvage et celle de l'amidon *ae* extraits dans les même conditions. Certains auteurs détectent également une sous-fraction amylosique branchée (Takeda et Preiss, 1992).

L'amylopectine des mutants *sugary-2* est faiblement branchée et enrichie en longues chaînes, plus grandes que les longues chaînes B de l'amylopectine sauvage alors que les chaînes B intermédiaires sont plus courtes (Takeda et Preiss, 1992, Inouchi et coll., 1987).

La fonction affectée chez les mutants *sugary-2* n'est toujours pas caractérisée. Takeda et Preiss (1992) ont suggéré que la structure de l'amylopectine du mutant *su-2* pouvait résulter d'une diminution du rapport des activités de branchement BEI / BEII.

Les conséquences structurales des interactions génétiques:

(*tableau 6*)

La quantité d'amidon dans le mutant ***ae wx*** (*amylose extender-waxy*) est estimée à 50% de celle du sauvage. Cet amidon est composé uniquement d'amylopectine et d'un matériel intermédiaire faiblement branché possédant de longues chaînes externes (Yeh et coll., 1981, Boyer et Liu, 1985). L'amidon du mutant *ae wx* présente un profil de diffraction aux rayons X de type B.
La présence de polysaccharide soluble dans les mutants *ae wx* a été rapportée mais sa nature demeure inconnue (Shannon et Gardwood, 1985).

Les mutants ***ae su*** (*amylose extender sugary-1*) présentent une quantité d'amidon réduite et contiennent du phytoglycogène (Yeh et Shannon, 1981, Boyer et Liu, 1985). La proportion en phytoglycogène diminue avec la dose de gène *ae* indiquant l'épistasie du gène *ae* sur le gène *su* pour la production de phytoglycogène (Shannon et Gardwood, 1985).
L'amidon du mutant *ae su* est enrichi en amylose, conséquence de la mutation *su* (*tableau*). L'amylopectine et le matériel intermédiaire sont ceux décrits dans le mutant *ae*. L'amidon présente un profil de diffraction RX de type B.
Les effets des deux mutations se retrouvent dans la souche *ae su*.

L'amidon du mutant ***ae du*** (*amylose extender dull*) a une proportion en amylose élevée (Yeh et coll., 1981). L'amylopectine de ce double mutant a des propriétés similaires à celle du mutant *ae*.
Le profil de diffraction RX de l'amidon du mutant *ae du* est de type B.
Dans ce double mutant, la mutation *ae* interfère avec le branchement de l'amylopectine et se traduit par l'accumulation de polymères faiblement branchés (Shannon et Gardwood, 1984). L'effet de chacune de deux mutations semble s'additionner indépendamment l'une de l'autre.
Preiss et Boyer (1980) ont rapporté des activités de branchement BEII et l'activité SSSII considérablement faibles chez le mutant *ae du*.

Le contenu en amidon du mutant ***ae su-2*** (*amylose extender sugary-2*) est similaire à celui du mutant *ae,* mais la quantité en sucres solubles est élevée. Les grains présentent un profil de diffraction rayons X de type B comme ceux du mutant *ae*. Toutefois, aucun effet d'épistasie ne fut observé selon la dose de l'un ou l'autre gène muté (Shannon et Gardwood, 1984).

L'accumulation de phytoglycogène dans les mutants ***du su*** (*dull sugary*) est comparable à celle des mutants *su-1*, mais la quantité d'amidon est plus faible. Celui-ci présente une fraction amylosique élevée, de structure similaire à celle des simples mutants. A une fraction amylopectidique fortement branchée s'ajoute un matériel faiblement ramifié comportant de longues chaînes externes (Yeh et Gardwood, 1981, Boyer et Liu, 1985).

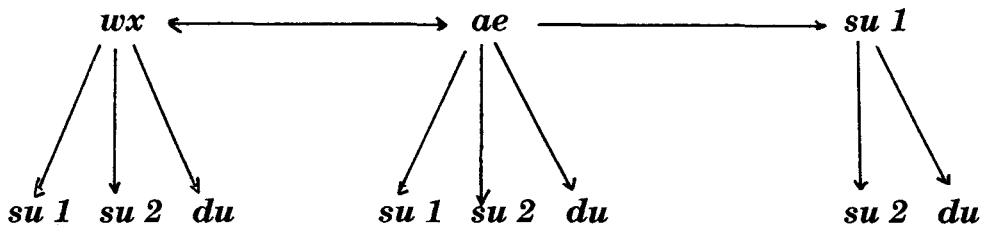
Chez les doubles mutants ***du su-2*** (*dull sugary-2*) la quantité d'amidon est plus faible et le contenu en amylose plus élevé que dans les simples mutants. L'amylose et l'amylopectine ont des propriétés de type sauvage. Une fraction supplémentaire d'amylopectine peu branchée a également été isolée de l'amidon du mutant *du su-2* (Shannon et Gardwood, 1984).

Dans les mutants ***su su-2*** (*sugary sugary-2*) le contenu en amidon est réduit. La proportion en amylose augmente avec la dose de gène *su-2*. La mutation *su-2* est épistatique sur la mutation *su* dans ses divers effets (Shannon et Gardwood, 1984).

Les amidons ***du wx*** (*dull waxy*), ***su wx*** (*sugary waxy*) et ***su-2 wx*** (*sugary-2 waxy*) sont constitués uniquement d'amylopectine (Yeh et coll., 1981).

Des quantités variables de polysaccharide soluble ont été rapportées dans le mutant *du wx* (Shannon et Gardwood, 1984).

Le phytoglycogène est présent dans le double mutant *su wx*, conséquence de l'épistasie du gène *su* dans cette accumulation (Yeh et coll., 1981).



diminution de l'amylose

présence d'un matériel constitué de longues chaînes peu branchées amidon de profil B aux RX

accumulation de phytoglycogène

Figure 12: *Représentation schématique des épistasies contrôlant la synthèse des différents polyssacharides.*

Un schéma global résume les épistasies influençant la présence des différents polysaccharides (*figure 12*).

La mutation *waxy* est épistatique sur toutes les autres mutations pour la production de l'amylose.

L'épistasie de la mutation *su-1* dans la production de phytoglycogène s'applique à toutes les mutations sauf la mutation *ae*.

Dans les combinaisons avec les mutations *wx*, *su* et *su-2*, la mutation *ae* est responsable de la présence d'un matériel intermédiaire constitué de longues chaînes, peu ramifiées. L'épistasie de la mutation *ae* sur la mutation *du* est discutable, le matériel intermédiaire accumulé ne présente pas d'aussi longues chaînes que dans le mutant *ae* (Ikawa et coll., 1981). Cependant le profil de diffraction aux RX de l'amidon du double mutant est de type B (Shannon et Gardwood, 1984).

Dans le mutant *ae wx*, la mutation *wx* empêche la production d'amylose et la mutation *ae* altère le degré de branchement. Il en résulte l'accumulation d'un matériel intermédiaire faiblement branché. Il est évident que cette fraction n'est pas sous le contrôle de la GBSS puisqu'elle existe dans le double mutant *ae wx*.

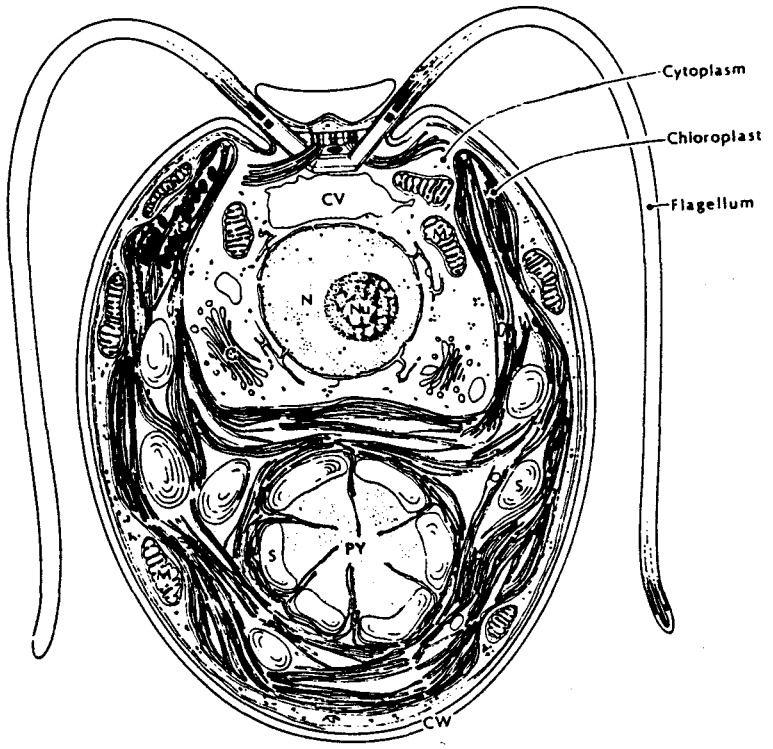


Figure 13: *Représentation schématique de l'algue verte Chlamydomonas reinhardtii.*

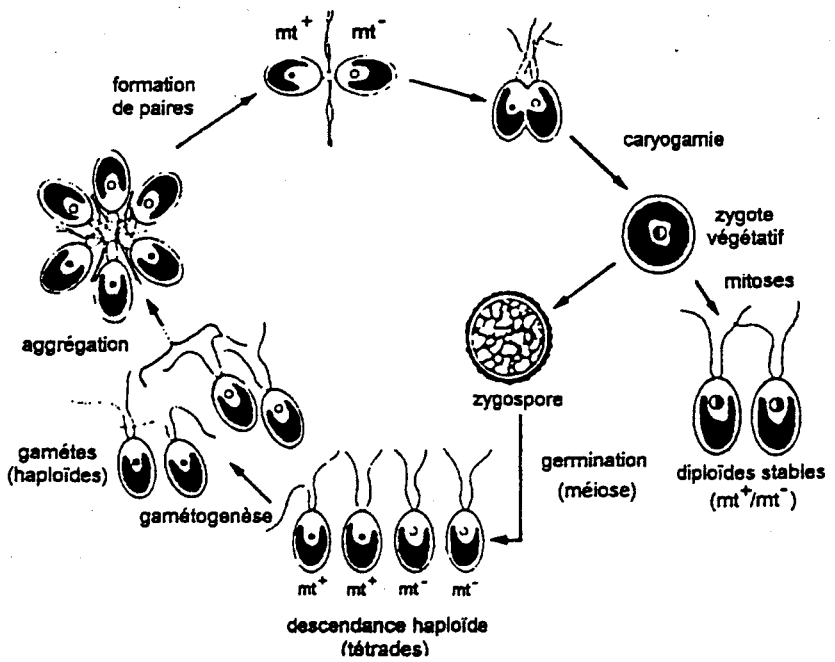


Figure 14: *Cycle de vie de Chlamydomonas reinhardtii.*

Chlamydomonas reinhardtii

L'espèce *Chlamydomonas* est présente dans tous les milieux aquatiques du globe et sous tous les types de climat. Des centaines de genres ont été répertoriées et cinq sont particulièrement utilisés en laboratoire: *Chlamydomonas reinhardtii*, *monoïca*, *smithsii*, *eugametos* et *moewusii*.
C. eugametos et *C. moewusii* ont servi de modèle pour l'étude de la reproduction sexuée. Cependant, *C reinhardtii* est le modèle de prédilection pour la majorité des études génétiques et c'est chez cet organisme que de nombreux loci ont été identifiés et cartographiés.

Le modèle:

C. reinhardtii est une algue verte d'eau douce. La cellule possède un double flagelle assurant le déplacement et la reconnaissance sexuée (*figure 13*). Un organite particulier, ou "eye-spot", oriente sa migration vers les zones lumineuses.
Le chloroplaste unique occupe jusqu'à deux tiers du volume cellulaire. Il renferme un pyrénoide constitué essentiellement par la RUBISCO, enzyme responsable de la fixation du CO_2 lors de la photosynthèse. L'amidon est principalement localisé autour de ce pyrénoide.

C. reinhardtii se reproduit essentiellement par division asexuée (*figure 14*). La reproduction sexuée est favorisée lors des conditions de carence. Les gamètes de polarité opposée fusionnent et forment des zygotes (2n). La plus grande partie d'entre eux (95%) entrent en méiose permettant de rétablir l'haploïdie.
Cette haploïdie facilite la sélection des souches mutantes récessives. Par opposition, les végétaux supérieurs sont généralement polyploïdes ce qui limite la détection directe des mutants.

C. reinhardtii peut croître à la lumière, en phototrophie. Elle se développe également en hétérotrophie (à l'obscurité en présence d'acétate) et en mixotrophie (en présence d'acétate et à la lumière).

Les cellules peuvent être synchronisées en culture par une alternance des périodes lumineuses et obscures.

C. reinhardtii possède un temps de génération court (8 heures dans les conditions optimales de culture) facilitant la rapidité de caractérisation des souches.

Les cellules sont mobiles en milieu liquide. En milieu gélosé, elles perdent rapidement leurs flagelles et forment des colonies permettant de les isoler.

Ainsi, *C. reinhardtii* présente globalement les caractéristiques d'une cellule végétale isolée sans les inconvénients liés à la culture des végétaux supérieurs. C'est pourquoi *C. reinhardtii* a été retenue par notre laboratoire comme support pour l'étude des mécanismes de biosynthèse de l'amidon.

Outre les techniques de mutagenèse classique (par rayonnement UV ou RX) les récentes applications des techniques d'interruption géniques facilitent l'identification et l'isolement des gènes impliqués dans diverses fonctions du métabolisme (Tan et Lefevre, 1993).

Chez *C. reinhardtii,* l'intégration d'ADN exogène s'effectue de façon aléatoire par recombinaison non homologue. Aussi, la complémentation de fonction peut également être observée lorsque le gène introduit s'exprime (Kindle et coll., 1989).

Le métabolisme de l'amidon:

Chez *C. reinhardtii*, le rôle de l'amidon n'est pas encore clairement défini. L'isolement de mutants totalement déficients semble indiquer que l'absence de ce polysaccharide n'altère pas leur croissance.

Initialement, Matagne et coll. (1976) ont mis en évidence que l'accumulation d'amidon est accentuée lorsque les cellules subissent une carence en phosphate. Cet accroissement de la synthèse de polysaccharide a été par la suite observée comme influencée par d'autres carences nutritives (Ball et coll., 1990).

Dans nos expériences, la culture des cellules sauvages en milieu limité en azote conduit à une production d'amidon d'environ 40 µg /10^6 cellules. En condition active de croissance (milieu non carencé) cette accumulation est d'environ de 1µg /10^6 cellules.

Le crible de sélection des souches affectées dans le métabolisme de l'amidon mis au point par notre laboratoire est des plus simples à réaliser. Les cellules sont cultivées sur milieu gélosé sans azote. Cette carence induit l'accumulation massive d'amidon.

Les colonies "subissent" ensuite des vapeurs d'iode. L'iode amplifie la dégradation des pigments chlorophylliens initiée par la carence, et se complexe avec l'amidon. La coloration résultante nous permet d'apprécier des modifications importantes du polysaccharide accumulé et de déceler ainsi les souches affectées dans sa synthèse.

Les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon chez les végétaux supérieurs ont également été mises en évidence chez *C. reinhardtii* (Ball et coll., 1990). Le nombre d'isoformes enzymatiques semble cependant restreint chez l'algue, facilitant l'identification de leurs rôles respectifs.

Toutes les enzymes de biosynthèse de l'amidon sont codées par le génome nucléaire (Ball et coll., 1990). Les études structurales du polysaccharide accumulé en parallèle avec les caractérisations enzymologiques des souches ont permis de définir plusieurs fonctions.

Comme chez les végétaux supérieurs, la voie de l'ADP-Glc pyrophosphorylase est la voie principale de biosynthèse de l'amidon chez *C. reinhardtii*. L'enzyme a été purifiée à homogénéité et présente des propriétés similaires à celles des plantes (Ball et coll., 1991).

L'ADP-Glc pyrophosphorylase est un hétérotétramère composé d'une petite et d'une grande sous unité dont les masses moléculaires sont respectivement, de 51 et 56 kDa (Iglesias et coll., 1994).

L'enzyme est activée de manière allostérique par le 3-PGA et inhibée par le Pi (Ball et coll., 1991). La présence de 3-PGA est cependant indispensable à l'inhibition par le Pi. C'est d'ailleurs chez *Chlamydomonas* que les premiers mutants de ce genre ont été identifiés, et ils ont permis de confirmer l'effet du 3-PGA *in vivo*.

Deux amidon synthétases solubles (I et II) ont été caractérisées chez *C. reinhardtii*. Le rôle de la SSSII a été révélé pour la première fois chez les végétaux grâce aux expériences réalisées sur un mutant déficient en SSSII. L'amidon synthétase soluble II est impliquée dans la formation des chaînes de longueur intermédiaire de l'amylopectine (Fontaine et coll., 1993).

Chez *C. reinhardtii*, les deux activités de branchement partiellement purifiées par Christophe D'Hulst lors de son travail de DEA présentent des spécificités de substrat différentes. Les propriétés cinétiques de ces deux enzymes de ramification correspondent à celles décrites respectivement pour les enzymes BEI et BEII du maïs.

Mutation	Souche	Origine	Phénotype Iode	Amidon Quantité	Amidon Structure	Enzymes
sta-1-1	I7	R. X	Jaune	< 5%	n.d.	ADPG pyrophosphorylase insensible au 3-PGA
sta-2-1	18B	U.V.	Rouge	normale	100 % Ap	GBSS tronquée (Nt intact) Activité = 25%
sta-2-2	25B	U.V.	Rouge	normale	100% Ap	Quantité GBSS = 25% Activité = 25%
sta-3-1	I152	R. X	Vert olive	50% Polysaccharide soluble	Ap dp 8-50 < Ap dp 2-8 >	ASS II
sta-3-2	I154	R. X	Vert olive	50%	n.d.	
sta-3-3	I39	R. X	Vert olive	n.d.	n.d.	
sta-4-1	I73	R. X	Vert olive	10%	Am 30 à 50%	Phosphorylase < Enzyme de Branchement II
sta-4-2	I97	R. X	Vert olive	x 1.5 à 12	Ap dp 8-50 < (- marquée que I152)	
sta-5	GST	U.V.	Jaune	n.d.	n.d.	PGM 35%
sta-80	A	U.V. sur	Noir	n.d.	n.d.	Toutes les enzymes de synthèse sont activées
	B	18B	Noir	n.d.	n.d.	(x 1.1 à 3.5)

Tableau 7: *Les loci identifiés chez Chlamydomonas reinhardtii dans la voie de biosynthèse de l'amidon.*

Une seule activité amidon synthétase liée a été mise en évidence chez *C. reinhardtii.* Elle semble correspondre à la GBSSI du maïs (Delrue et coll., 1992).

Les techniques de mutagenèse par transformation, également mises au point dans notre laboratoire, par Brigitte Delrue et Fabienne Bellanger, ont déjà permis l'isolement de nombreuses souches défectueuses dans le métabolisme de l'amidon (Bellanger, 1994). Parmi eux, les transformants BAFR1 et BAFR2 ont été caractérisés et présentent une interruption du locus *STA-2.* Ces expériences ont permis, entres autres, de confirmer l'identité de la GBSS et de la protéine Waxy.

Les nombreux loci déjà identifiés chez cette algue (***tableau 7***) confirment l'intérêt du modèle que représente *C. reinhardtii* dans l'étude de la biosynthèse de l'amidon. Les caractérisations en cours sur les transformants sélectionnés après mutagenèse par interruption génique permettent d'envisager l'identification imminente de nouvelles fonctions impliquées dans cette voie métabolique.

Matériels et Méthodes

Lexique Des Souches Utilisées

Le génotype des souches citées dans ce mémoire est le suivant:

Les souches sauvages:

137C	*mt⁻ nit-1 nit-2.*
37	*mt⁺ ac-14 pab-2.*
330	*mt⁺ nit-1 nit-2 cw-15 arg-7-7.*

La souche mutante obtenue par mutation spontanée:

GST	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-5-1.*

Les souches mutantes obtenues par mutagenèse RX de la souche sauvage 137C:

I7	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-1-1.*
I152	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-3-1.*
I154	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-3-2.*
I39ts	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-3-3.*
I73	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-4-1.*
I97	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-4-2.*

Les souches mutantes obtenues par mutagenèse UV de la souche sauvage 137C:

18B	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-2-1.*
25B	*mt⁻ nit-1 nit-2 sta-2-2.*

Les transformants mutants obtenus par mutagenèse par insertion de la souche sauvage 330:

BAFR1	*mt⁺ nit-1 nit-2 cw-15 arg-7-7 sta-2-Δ1 (pARG7)⁺.*
BAFR2	*mt⁺ nit-1 nit-2 cw-15 sta-2-Δ2 (pARG7)⁺.*

Les souches mutantes obtenues par mutagenèse UV de la souche mutante 1152:

Toutes les souches mutantes ML possèdent le génotype suivant:

mt - nit-1 nit-2 sta-3-1 sta-2-x , et diffèrent par leur allèle *sta-2* soit;

ML1 *sta-2-3 (85 sec.)*	ML17 *(75 sec.)**	ML32 *sta-2-21 (85 sec.)*
ML2 *sta-2-7 (85 sec.)*	ML18 *sta-2-14 (60 sec.)*	ML33 *sta-2-21 (85 sec.)*
ML3 *sta-2-8 (85 sec.)*	ML19 *sta-2-15 (60 sec.)*	ML34 *sta-2-21 (85 sec.)*
ML4 *sta-2-3 (85 sec.)*	ML20 *sta-2-16 (60 sec.)*	ML35 *sta-2-21 (85 sec.)*
ML5 *sta-2-3 (85 sec.)*	ML21 *sta-2-16 (60 sec.)*	ML36 *sta-2-6 (85 sec.)*
ML6 *sta-2-9 (85 sec.)*	ML22 *(20 sec.)**	ML37 *sta-2-6 (85 sec.)*
ML7 *sta-2-3 (85 sec.)*	ML23 *(10 sec.)**	ML38 *sta-2-22 (85 sec.)*
ML8 *sta-2-3 (85 sec.)*	ML24 *sta-2-17 (10 sec.)*	ML39 *sta-2-23 (85 sec.)*
ML10 *sta-2-3 (85 sec.)*	ML25 *sta-2-18 (25 sec.)*	ML40 *(40 sec.)*
ML11 *sta-2-10 (40 sec.)*	ML26 *sta-2-5 (40 sec.)*	ML41 *sta-2-24 (10 sec.)*
ML12 *sta-2-11 (20 sec.)*	ML27 *(75 sec.)**	ML42 *sta-2-25 (10 sec.)*
ML13 *sta-2-12 (20 sec.)*	ML28 *(75 sec.)**	ML75 *sta-2-26 (75 sec.)*
ML14 *sta-2-13 (75 sec.)*	ML29 *sta-2-19 (75 sec.)*	ML85 *(85 sec.)**
ML15 *sta-2-4 (55 sec.)*	ML30 *sta-2-20 (75 sec.)*	
ML16 *sta-2-4 (55 sec.)*	ML31 *sta-2-21 (60 sec.)*	

-* non muté dans le gène *STA-2* - *(temps de mutagenèse UV)*-.

Les différents génotypes recombinants obtenus après croisement:

37E17	*mt* $^{+}$ *ac-14 pab-2 sta-3-1.*
B9	*mt* $^{+}$ *ac-14 pab-2 sta-3-1.*
B5	*mt* $^{+}$ *ac-14 pab-2 sta-3-2.*
B20	*mt* $^{+}$ *ac-14 pab-2 sta-2-1.*
IJ2	*mt* $^{-}$ *sta-2-δ1 sta-3-1*, (NIT^{-}).
IN24	*mt* $^{?}$ *ac-14*, (NIT^{-}).
IR4	*mt* $^{?}$ *sta-2-Δ1*, (NIT^{-}).

IV33	*mt* $^{?}$ *ac-14 pab-2 sta-3-1.*
K37B41	*mt* $^{-}$ *sta-2-6 sta-3-3.*
T1J	*mt* $^{-}$ *pab-2 sta-2-3 sta-3-1.*
T1N	*mt* $^{+}$, (NIT^{-}).
T1R	*mt* $^{-}$ *ac-14 sta-2-3*, (NIT^{-}).
T1V	*mt* $^{+}$ *ac-14 pab-2 sta-3-1.*
R15	*mt* $^{-}$ *sta-2-4*, (NIT^{-}).
R26	*mt* $^{-}$ *sta-2-5*, (NIT^{-}).
R37	*mt* $^{-}$ *sta-2-6*, (NIT^{-}).
S8	*mt* $^{+}$ *sta-2-2 sta-3-1*, (NIT^{-}).
42J	*mt* $^{-}$ *sta-2-1 sta-3-1*, (NIT^{-}).

Les phénotypes et lésions associés aux mutations dans les gènes marqueurs nucléaires:

***mt*$^{+}$ *et mt*$^{-}$: "mating type"** **Groupe de liaison VI.**

Ces deux allèles du même locus définissent la polarité sexuelle. La souche *mt* $^{+}$ transmet le génome chloroplastique. La souche *mt* $^{-}$ transmet le génome mitochondrial à la descendance.

***pab-2*:** **Groupe de liaison I.**

La mutation est responsable d'une auxotrophie pour l'acide para-aminobenzoïque. La nature exacte de la lésion n'est pas établie.

***ac-14*:** **Groupe de liaison I.**

La mutation se situe dans un gène contrôlant la photosynthèse, elle engendre un besoin d'acétate pour croître. La fixation du CO_2 est normale chez ce mutant. Les loci *pab-2* et *ac-14* sont distants de 14 cM.

***nit-1*:** **Groupe de liaison IX.**

Le gène *NIT-1* code pour la sous-unité catalytique du complexe de la nitrate réductase. Le mutant est incapable de réduire les nitrates en nitrites, première étape de l'assimilation des nitrates.
L'expression du gène *NIT-1* est sous la dépendance du produit du gène *NIT-2*.

***nit-2*:** **Groupe de liaison III.**

Le gène *NIT-2* code pour un trans-activateur contrôlant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du nitrate dont le gène *NIT-1*. Le mutant est incapable d'utiliser le nitrate comme source d'azote.

***cw15*:** **Groupe de liaison inconnu.**

La mutation conduit à l'absence de paroi.

***arg-7-7*:** **Groupe de liaison I.**

La mutation cible le gène de structure de l'argino-succinate lyase (ASL), dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'arginine. Le mutant est auxotrophe pour l'arginine.

Les phénotypes et lésions associés aux mutations affectant la voie de biosynthèse de l'amidon (tableau):

***sta-1*:** **obtenue par mutagenèse RX**

La mutation affecte l'ADP-Glc pyrophosphorylase. L'enzyme de la souche I7 portant la mutation *sta-1-1* est insensible à la régulation par le 3-phosphoglycérate (Ball et coll., 1990). Le mutant I7 présente une quantité d'amidon d'environ 5% de la quantité sauvage. Cette souche cultivée sur milieu limité en azote donne une coloration jaune après vaporisation d'iode.

***sta-2-1 et sta-2-2*: obtenues par mutagenèse UV.**

Ces mutations se situent dans le gène de structure de la GBSS. L'enzyme mutée des souches 18B (*sta-2-1*) et 25B (*sta-2-2*) conserve une activité de 20 à 25% de l'activité sauvage. Bien que la quantité d'amidon de ces mutants soit normale il est uniquement constitué d'amylopectine. Ces mutants se caractérisent par une coloration rouge après vaporisation d'iode (Delrue et coll., 1992).

***sta-3-1, sta-3-2 et sta-3-3*: obtenues par mutagenèse RX.**

Mutations qui engendrent la disparition de l'activité SSSII en dosage comme en zymogramme. L'activité mesurée de l'enzyme semi-purifiée est fortement altérée (Fontaine et D'Hulst, 1993). Les souches portant une mutation dans le gène *STA-3* ont une quantité d'amylopectine réduite et celle-ci est fortement modifiée. Ces mutants dit "riches en amylose" présentent une coloration "vert-olive" après vaporisation d'iode.

***sta-4-1 et sta-4-2*: obtenues par mutagenèse UV.**

Mutations dont la lésion n'est pas encore déterminée. Leurs effets sont conditionnels (phénotype observable que lorsque les cellules sont cultivées en milieu limité en azote). Ces mutants dont la quantité d'amidon se situe aux environs de 20% de la quantité sauvage ont une amylopectine altérée, et sont également qualifiés de mutants "riches en amylose".
Les souches I73 et I97 portant respectivement les mutations *sta-4-1* et *sta-4-2* donnent une coloration verte après vaporisation d'iode.

***sta-5-1*: mutation spontanée.**

La mutation *sta-5-1* conduit à une activité phosphoglucomutase (PGM) réduite à 35% de l'activité sauvage. Le mutant PGM possède une faible quantité d'amidon se traduisant par une coloration jaune de la souche après vaporisation d'iode.

Composition Des Milieux De Culture

(E. Harris, 1989)

Les Milieux Liquides

Le milieu TAP (Tris Acétate Phosphate):

Composition pour 1 litre:

NH_4Cl	0,40 g	$ZnSO_4.7H_2O$	22 mg
Tris	2,40 g	H_3BO_3	11,4 mg
KH_2PO_4	0,32 g	$MnCl_2.4H_20$	5,1 mg
K_2HPO_4	1,47 g	$FeSO_4.7H_20$	4,2 mg
$CaCl_2.2H_20$	0,05 g	MoO_3	1,8 mg
$MgSO_4.7H_2O$	0,30 g	$CoCl_2.6H_2O$	1,6 mg
EDTA	50 mg	$CuSO_4.5H_2O$	1,6 mg

le pH est ajusté à 7 par l'acide acétique.

Le milieu limité en azote:

Le milieu TAP où le NH_4Cl est à 4 g / l. La carence en azote stimule l'accumulation d'amidon et provoque l'arrêt des divisions cellulaires.

Le milieu carencé en azote:

Le milieu TAP où le NH_4Cl est remplacé par du NaCl à 0,4 g / l. Ce milieu est utilisé pour induire la gamétogenèse.

Les Milieux Gélosés

Le milieu minimum ou HS (High Salt):

Le milieu TAP sans le tris dont les concentrations en KH_2PO_4 et K_2HPO_4 sont respectivement de 0,18 et 0,36 g / l avec de l'agar à 15 g / l.

Le milieu minimum + acétate ou HSA:

Le milieu minimum avec de l'acétate de sodium à 1 g / l permet de déterminer si les souches ont besoin d'acétate pour croître (caractère Ac).

Le milieu minimum + PAB ou HSP:

Le milieu minimum avec de l'acide para-aminobenzoïque à 1 g / l permet de déterminer si les souches ont besoin d'acide para-aminobenzoïque pour croître (caractère Pab). L'ajout de cet élément ne modifie en rien les conséquences d'une carence ou d'une limitation en azote.

Le milieu complet ou MAP:

Le milieu minimum avec de l'acétate et du PAB à 1 g / l est utilisé pour la croissance des cellules.

Le milieu nitrate minimum:

Le milieu minimum avec du KNO_3 à 0,4 g / l (seule source d'azote) est utilisé pour la sélection de diploïdes.

Le milieu nitrate complet:

Le milieu complet avec du KNO_3 à 0,4 g / l permet de déterminer si les souches sont capables d'utiliser le nitrate (caractère Nit).

Le milieu riche:

Le milieu complet avec de l'extrait de levure à 4 g / l est utilisé pour l'amplification des descendants.

Les milieux liquides ou gélosés sont autoclavés 20 min à 121°C à 1 bar. L'ampicilline stérile est additionnée aux milieux à raison de 50µg/ml et 100µg/l d'arginine ajoutée aux milieux destinés à la culture de souches Arg^-. Signalons que l'arginine est absente dans les recettes de milieu carencé en azote.

Préculture-Culture

Les souches sont conservées en collection sur milieu gélosé. La mise en culture liquide nécessite une pré-culture dans un faible volume de milieu TAP. Les cultures liquides sont sous agitation vive et exposées à une lumière de 2000 à 4000 lux, à 22 +/-2 °C. Les cultures en milieu limité ou carencé sont maintenues 5 jours, au lieu de 3 jours pour les cultures en milieu TAP. La densité cellulaire est estimée par comptage au compteur-coulter et l'état physiologique des cellules est observé au microscope optique.

Mutagenèse Et Sélection Phénotypique

Un tapis cellulaire du mutant I152 fut irradié au transilluminateur UV (255 nm, 7 mW / cm^2) entre 10 et 90 sec puis placé à l'obscurité pendant 12 h. Les cellules, ayant subi un temps d'irradiation laissant au maximum 5% de survie, ont été transférées par réplique sur milieu carencé en azote.

La carence en azote stimule l'accumulation d'amidon et la dégradation des pigments chlorophylliens (Ball et coll., 1990). Le crible de sélection des souches mutantes est la coloration à l'iode des colonies cultivées sur le milieu carencé en azote. L'iode se complexe à l'amidon accumulé dans les souches donnant une coloration différente selon la nature ou la quantité de polysaccharide.

Analyses Génétiques

(E. Harris, 1989)

La réalisation d'un croisement:

Les cellules sont mises en suspension dans de l'eau stérile. La gamétogenèse se réalise en moins de 6 h sous les conditions de carence et de lumière vive (5000 lux). Les deux suspensions de gamètes à une même concentration sont mises en contact. Une heure après, la fusion est visible au microscope optique.

L'obtention des diploïdes:

Environ 5% des diploïdes formés lors d'un croisement se maintiennent sous forme végétative. Les souches parentales portent soit les mutations *nit-1* et *nit-2*, soit les mutations *pab-2* et *ac-14*. La complémentation de ces génotypes permet de sélectionner les diploïdes sur milieu nitrate minimum. Les cellules parentales sont éliminées au bout de trois épuisements.

Les diploïdes sont transférés sur un milieu carencé en azote afin tester la récessivité ou la complémentation des mutations affectant la voie de biosynthèse de l'amidon. La nature diploïde des clones sélectionnés est confirmée par: leur apparition aprés cinq jours sur milieu sélectif, la mesure du volume cellulaire et la détermination de la polarité.

L'analyse de la descendance d'un croisement

Après fusion, les suspensions sont étalées sur milieu riche à 4% d'agar. Les boites sont exposées 24 h à la lumière atténuée, puis mises à l'obscurité. Après 5 jours minimum, les zygotes sont enkystés dans l'agar. Les cellules végétatives sont éliminées par raclage de la surface gélosée avec une lame de rasoir et par des vapeurs de chloroforme (30 à 45 sec).

L'analyse des spores au hasard:

Les zygotes exposés à la lumière entrent en méiose, leur germination est induite par l'humidité du milieu. Après 12 heures, les cellules sont étalées et incubées 5 jours à la lumière. Environs 200 clones isolés sont repiqués, épuisés puis analysés sur différents milieux sélectifs.

L'obtention de tétrades désordonnées:

De 20 à 40 zygotes sont alignés à la loupe binoculaire. Ces cellules entrent en division et donnent 4 (ou 8) produits de méiose (+ mitose) 24 à 48 h après. Les produits de méiose sont séparés et alignés, l'ensemble constituant une tétrade. Les tétrades sont amplifiées puis testées sur des milieux sélectifs. La proportion de tétrades tétratypes, de ditypes parentaux et de ditypes recombinés permet de déterminer si des loci son liés entre eux, et/ou liés mutuellement au centromère (E. Harris, 1989).

ANALYSES ENZYMOLOGIQUES

La préparation des extraits:

Lorsque la culture en milieu TAP atteint une densité de 2 10^6 cellules / ml, les cellules sont récupérées par une centrifugation à 3000 g pendant 15 min à 4°C. Les cellules sont éclatées à la presse de French à 14000 psi. Une centrifugation à 10000 g, 15 min à 4°C élimine les débris cellulaires et l'amidon. Le surnageant est conservé à 4°C pendant 4 heures au maximum.

Le dosage des protéines:

La concentration en protéines est mesurée selon la méthode de Bradford (Kit Biorad). A 800 µl d'extrait sont ajoutés 200 µl de la solution de dosage. L'absorbance du mélange est lue à 595 nm et la concentration est estimée par l'intermédiaire de la courbe étalon réalisée avec de la sérum albumine bovine (de 0 à 20 µg / ml).

Le dosage de l'activité amidon synthétase:

L'activité amidon synthétase est mesurée par l'incorporation de (U-^{14}C) Glc à partir de l' (U-^{14}C) ADP-Glc. Le mélange réactionnel est le suivant:

Glycylglycine (NaOH pH 9)	50 mM
$(NH_4)_2SO_4$	100 mM
ADP-Glc	1 mM
(U-^{14}C) ADP-Glc	2,7 µM
B-mercapto-éthanol	5 mM
$MgCl_2$	5 mM
SAB	50 µg/ml
Glycogène de foie de lapin	1 mg/ml

A 60 µl de ce mélange réactionnel sont ajoutés 40 µl d'extrait.

Le mélange est incubé 15 min (pour le dosage de l'activité soluble) ou 45 min (pour le dosage de l'activité liée) à 30°C. L'addition de 2 ml d'éthanol à 70% arrête la réaction. Le précipité est filtré sous vide sur Whatman GF/A et rincé par 20 ml d'éthanol à 70%. La radioactivité retenue sur les filtres est mesurée par un compteur à scintillation liquide.

L'étude cinétique:

L'activité amidon synthétase est dosée en faisant varier la concentration en ADP-Glc froid de 0 à 20 mM. L'incorporation radioactive est déterminée pour dix concentrations en substrat graduelles. L'experience est répétée trois fois. Les paramètres cinétiques sont déterminés selon le diagramme de Hanes et Woolf à l'aide du logiciel Enzpack version 3.0 (Biosoft, 1989).

Le zymogramme d'activité soluble:

Un volume d'extrait brut comprenant 50 µg de protéines est ajusté à 36µl par une solution composée à 50% d'un tampon Tris 25 mM, Glycine 190 mM, pH 8,3 et à 50% de Glycérol, Bleu de bromophénol. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide 30,1 - 7,5 % contenant 0,45% de glycogène dans un tampon Tris 250 mM / HCl pH 8,8. La migration s'effectue dans un tampon Tris 25 mM, Glycine 190 mM, pH 8,3 à 4°C, pendant 3 h sous 1,5 V / cm^2 (électrophorèse en mini-gel Biorad System).

Le gel est ensuite incubé 24 à 48 h dans le mélange réactionnel suivant:

Glycylglycine (NaOH, pH 9)	50 mM
$(NH_4)2SO_4$	100 mM
ADP-Glc	5 mM
β-mercapto-éthanol	5 mM
$MgCl_2$	5 mM
SAB	50 µg/ml

La synthèse de polysaccharide est révélée par une solution d'iode comprenant de l'I_2 à 0,2%, IK à 2% et de l'HCl 0,01N.

Techniques Biochimiques

L'extraction et la purification de l'amidon et du polysaccharide soluble:

La croissance des cellules en milieu limité s'arrête à une densité de 2 10^6 cellules / ml environ. Après 5 jours de culture en milieu limité en azote, les cellules sont récupérées par une centrifugation à 3000 g pendant 15 min à 4°C. Les cellules sont éclatées à la presse de French à 14000 psi. Le lysat est centrifugé à 10000 g pendant 30 min à 4°C.

Les deux catégories de polysaccharides alors séparés sont purifiées comme suit:

- **Le culot d'amidon** obtenu est repris par une solution de Percoll (Pharmacia) à 9 v / 1 v d'eau, puis centrifugé de nouveau 30 min à 10000 g et 4°C. Le culot est ensuite lavé 3 fois par de l'eau.

- **Le surnageant contient le polysaccharide soluble**. Celui-ci est débarrassé d'une partie des protéines par congélation et décongélation suivie d'une centrifugation à 10000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est ensuite concentré à l'évaporateur rotatif et repris par 200 µl de DMSO 100%. Après une incubation de 20 min au bain-marie à 100°C, la concentration en DMSO est ajustée à 10% par de l'eau.

Le dosage d'amidon:

L'amidon dispersé par une ébullition de 10 min est dosé à l'aide du kit commercialisé par Boehringer Mannheim. Le dosage est basé sur l'hydrolyse de l'amidon en glucose par l'amyloglucosidase. Une hexokinase phosphoryle le glucose en Glc-6-P. Le Glc-6-P est oxydé en gluconate-6-P et le NADP est réduit en NADPH par une Glc-6-P-deshydrogenase. Cette dernière réaction est suivie à 365 nm. Le coefficient d'extinction du NADPH à cette longueur d'onde est de 3,51 $nmol^{-1}$, cm^{-1}.

Le dosage des polysaccharides solubles (WSP):

Un dosage identique à celui de l'amidon est effectué. Cette mesure détermine la concentration en sucres totaux du surnageant aprés centrifugation. Un deuxième dosage sans l'action de l'amyloglucosidase permet de d'évaluer la quantité d'hexoses libres et d'en déduire la présence éventuelle de polysaccharides solubles.

Electrophorèse SDS des protéines liées au grain:

Les protéines sont extraites du grain d'amidon selon la méthode de Vos-Scheperkeuter (1986) légèrement modifiée.

En présence de 80 µl d'une solution à 5% en β-mercapto-éthanol et à 2% en SDS, 5 mg d'amidon purifié sont chauffés 10 min à 100°C. Après centrifugation à 10000 g pendant 15 min, le surnageant est déposé en gel SDS-polyacrylamide 5-10%. La migration s'effectue dans un tampon tris 3,03 g / l, SDS 1 g / l et glycine 14,42 g / l, pH 8,8 à 15°C pendant 1 h sous 2,7 V / cm^2 (électrophorèse en mini-gel Biorad System).

Les protéines sont révélées par une solution de Bleu Brillant de Coomassie contenant: le Blue R250 (Sigma) à 2%, du méthanol à 45% et de l'acide acétique à 10%. Le gel est décoloré par deux bains d'une solution de méthanol à 40% et d'acide acétique 8%.

La spectrophotométrie du complexe polysaccharide-iode:

Les polysaccharides dont le d.p. est supérieur à 12 résidus de glucose forment un complexe avec l'iode qui absorbe dans le visible (Thorn et Mohazzeb, 1990). La λ max de cette interaction est caractéristique du polysaccharide étudié. Le polysaccharide est solubilisé dans le DMSO 10%, ou par ébullition pendant 1 min en présence d'HCL 0,1N. Le spectre d'absorption est réalisé entre 400 et 700 nm sur 100 µl de polysaccharide à 0,01% dissous, additionné à 400 µl de solution iodo-iodurée. Cette dernière solution est à 0,2% en KI et à 0,02% en I_2.

Les chromatographies de gel filtration:

- *Fractionnement par une colonne de gel filtration HW75:*

(domaine de fractionnement: 8 10^4 à 10^7)

Dix milligrammes d'amidon sont dissous dans 500 µl de DMSO 90% (en tenant compte de l'hydratation du culot) et porté à 100°C pendant 20 min. L'échantillon est ensuite dilué à 10% et déposé sur une colonne (1,8 x 200) de fractogel TSK HW75 (S) (Merck). L'élution est effectuée par une solution de DMSO 10% contenant 0,02% d'azide de sodium à un débit de 10 ml / h. Les fractions éluées sont calibrées sur un volume de 3 ml. Le chromatogramme est réalisé à partir du spectre d'absorption à l'iode de chacune des fractions. Les quantifications sont menées par dosage à l'amyloglucosidase.

Remarque:

les profils de chromatographie HW75 obtenus à partir de l'amidon non délipidé sont identiques à ceux obtenus aprés délipidation de l'amidon. Toutefois, l'extraction des lipides internes de l'amidon augmente l'interaction entre l'amylopectine II et l'iode car son λ max de 585 nm devient supérieur à 600 nm après délipidation.

Cette observation intervient dans la compréhension de l'inclusion des lipides dans les hélices d'amylose, car l'amylose de masse moléculaire classique semble moins concernée par cette variation. Une étude comparative de l'influence de la délipidation et de la nature du solvant sur les profils d'élution des deux systèmes chromatographiques basse pression a été réalisée par Nathalie Libessart et sera exposée lors de sa thèse.

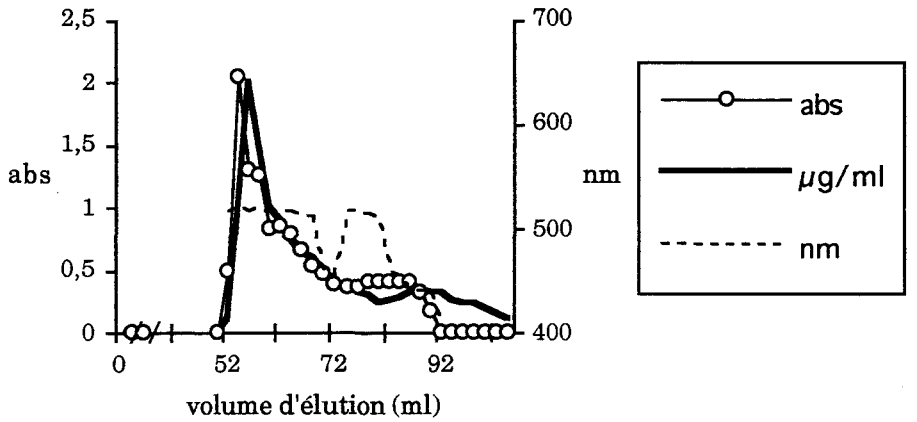


Figure 15: *Profil obtenu par chromatographie de gel filtration HW50 du Glucidex 6.*

d.p.moyen	glucose	d.p.2	d.p.3	d.p.4	d.p.5	d.p. 6	d.p.7	d.p.8	d.p. 9	d.p.10 à 20	d.p. > 20
Glucidex 6	0,3	1,1	1,9	1,3	1,4	2,2	2,0	1,8	1,7	17,0	69,3
Glucidex 19	1,1	5,2	8,0	6,1	6,5	8,1	7,8	3,6	3,1	21,5	29

Tableau 8: *Répartition des oligo et polysaccharides du Glucidex 6 et du Glucidex 19 (Roquette Frères).*

- *Fractionnement par une colonne de gel filtration Sépharose 2B:*

(domaine de fractionnement: 10^5 à 2 10^7)

Dix milligrammes d'amidon sont dissous dans 500 µl de DMSO 100% par incubation à 100°C pendant 20 min. Le polysaccharide est ensuite précipité par addition de 5 volumes d'éthanol. Le culot est resolubilisé dans 5 ml d'une solution de soude 0,01N et déposé sur une colonne (1,6 x 160 cm) de gel Sépharose 2B (Pharmacia). L'élution par la soude 0,01N contenant de l'azide de sodium à 0,02% est menée à un débit de 10 ml / h. Les fractions collectées de 3 ml sont analysées par un spectre d'absorption à l'iode permettant d'établir le profil chromatographique de l'amidon. Les quantifications sont menées par dosage à l'amyloglucosidase.

- *Fractionnement par une colonne de gel filtration HW50:*

(Domaine de fractionnement: 5 10^2 à 10^4)

De 3 à 6 mg de polysaccharide sont dissous dans 100 µl de DMSO 100% comme décrit pour la gel filtration HW75. Le dépôt est effectué sur une colonne (1,6 x 54 cm) de fractogel TSK HW50 (F) (Merck). L'éluant est une solution de DMSO 10% contenant 0,02% d'azide de sodium. L'élution se réalise à un débit de 30 ml / h et les fractions collectées sont ici de 2 ml. Chaque fraction est caractérisée par une spectrophotométrie à l'iode et un dosage d'amidon.

L'étalonnage de la colonne est réalisé par la chromatographie de gel filtration du Glucidex 6 (Roquette Frères) dont la composition en dextrines est répertoriée (*tableau 8*). Le profil d'élution de ce standard permet de déterminer le volume mort et le volume total de la colonne ainsi que le volume d'élution des dextrines de d.p. supérieur à 20 (*figure 15*).

Analyses Structurales

Le dosage des sucres réducteurs au DNS:

Le mélange contenant 50 µl de la solution de sucre à doser et 150 µl de la solution de DNS est incubé 10 min à 100°C. L'échantillon est ensuite refroidi par l'ajout de 800 µl d'eau et l'absorbance est lue à 540 nm. La solution standard de glucose est à 10 mM. Une D.O. de 0,4 correspond à 1 µmole de sucre réducteur.

La solution de DNS est préparée comme suit. A 5 g de 3, 5 dinitrosalicylate dissous à chaud dans 100 ml de soude 2 M sont ajoutés 150 g de tartrate double de sodium préalablement dilués dans 250 ml d'eau. Le volume est ajusté à 500 ml par de l'eau.

Le débranchement d'un polysaccharide:

De 5 à 10 mg de polysaccharide sont dissous à 100°C dans 180 µl de DMSO 100% et 20 µl de tampon acétate de sodium 55 mM, pH 3,5. Après l'ajout de 1,8 ml de tampon acétate de sodium l'échantillon est placé à 45 °C pendant au moins 5 min.

L'enzyme étant très fragile sa dilution s'effectue comme suit. Un faible volume de la solution concentrée (500 u / 100 µl) d'isoamylase de *Pseudonomas amyloderamosa* (ICN) est mis à température ambiante 10 min environ avant sa dilution. Pour obtenir une concentration de 50 u / ml, 10 µl de la solution commerciale sont mélangés à 990 µl de tampon acétate de sodium 55 mM, pH 3,5 également à température ambiante. L'enzyme diluée est placée 5 min au bain-marie à 45°C. Un volume correspondant à 4 u d'enzyme / mg de substrat est ensuite additionné au polysaccharide dissout.

Le débranchement du polysaccharide est suivi par l'augmentation du pouvoir réducteur dosé au DNS. Le débranchement total est atteint après 5 h d'incubation. L'échantillon est alors porté à 100°C et conservé à 80°C pour éviter la rétrogradation.

L'analyse des produits débranchés:

L'échantillon débranché est soumis à deux types d'analyses: la chromatographie de gel filtration et la chromatographie haute pression échangeuse d'anion (HPAE).

La détection des glucanes en sortie de gel filtration est réalisée par un spectre-iode et un dosage de glucose sur chaque fraction. Or, les petits glucanes se complexent faiblement avec l'iode, les chaînes de d.p. inférieur à 12 ne sont plus détectées par cette méthode. La chromatographie HPAE quantifie très clairement les chaînes de d.p. 1 à 25. Cette technique est donc utilisée dans l'analyse des petits glucanes de d.p. inférieur à 20.

- La chromatographie de gel filtration HW50:

La gel filtration est réalisée comme décrit précédemment (voir page 69). Le degré de polymérisation moyen (d.p.) des chaînes séparées par gel filtration est déterminé par leur spectre d'absorption à l'iode selon l'échelle publiée par Banks et coll. (1971) (*tableau 8 page 69*). Le dosage de glucose permet alors d'établir la composition du polysaccharide débranché en chaînes de glucanes de taille différente.

L'étalonnage de la colonne est réalisé par la chromatographie du Glucidex 6 (voir page 69). La séparation des dextrines du Glucidex 6 est analysée par un spectre-iode et un dosage de glucose sur chaque fraction. Cette séparation permet d'évaluer le d.p. des glucanes débranchés dans les différentes fractions collectées.

- La chromatographie d'échange d'anions à haut pH (HPAE):

L'échantillon est préalablement dessalé par gel filtration sur colonne (50 x 1,6 cm) de fractogel TSK HW40 (S) (Merck). L'élution est menée par l'acide acétique à 0,5% à un débit de 1 ml / min. Les glucanes sont ensuite concentrés à l'évaporateur rotatif. La séparation est effectuée sur une colonne CarboPAC-Pa (système Dionex) à 1 ml / min par la soude 0,1 M et un gradient de 0,05 à 0,4 M en acétate de sodium.

L'étalonnage de la colonne est établit par le profil de séparation des dextrines du Glucidex 19 (*tableau 19*) (Roquette Frères). L'intensité relative des chaînes de d.p. 1 à 25 détectées par ampérométrie pulsée est proportionnelle à leur concentration.

L'analyse en RMN:

Les spectres RMN du proton et du C^{13} ont été déterminés par J.M. Wieruszeski. Cette technique nécessite la dissolution à 80°C de 10 mg de polysaccharide dans 1,7 ml de DMSO D_2O- (80: 20). L'analyse s'effectue à 80°C par le programme Powgate d'un spectrophotomètre Bruker AM- 400 WB, 100 MHz. La résonance en C^{13} de tous les carbones des glucoses dépend de leur environnement et notamment de la présence de points de branchement.
La résonance du proton est seulement utilisée pour estimer le taux de branchement.

La méthylation:

Les expériences de méthylation ont été réalisées par T. Fontaine.
La méthylation de tous les hydroxyles libres est suivie de la coupure des liaisons glucosidiques libérant des O-méthyl-O-acétyl-glucitols. Une version modifiée de la méthode de Paz et coll. (1985) est utilisée.
Deux milligrammes de polysaccharide sont dissous dans 500 µl de DMSO anhydre à 80°C pendant 6 h. Après refroidissement et sous argon, 500 µl de lithium méthyl sulfinyl carbanion sont ajoutés. Après 2h au bain ultrasonique et une nuit à température ambiante l'échantillon est congelé puis additionné de 500 µl d'iodure de méthyle et placé de nouveau 1h au bain ultrasonique. Les produits méthylés sont extraits par trois lavages avec 500 µl de chloroforme et 15 lavages à l'eau.

Les éthers méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Chromatographe Spectra Physic SP 7100, colonne capillaire 0,2 mm x 25 m, gradient de température de 120 à 140°C, pression d'hélium 40 kPa).

Trois types d'éthers méthyliques sont obtenus: le 2,3,4,6-tétra-O-méthyl-1,5-di-O-acétyl-glucitol, le 2,3,6-tri-O-méthyl-1,4,5-tri-O-acétyl-glucitol et le 2,3-di-O-méthyl-1,4,5,6-tétra-O-acétyl-glucitol.

La proportion relative de ces différents produits méthylés permet de déterminer le taux de branchement du polysaccharide.

La digestion d'un polysaccharide par des enzymes de dégradation:

Nous avons déterminé les conditions optimales de concentration en enzyme, de concentration en substrat et de temps d'incubation pour obtenir une digestion totale du glycogène de foie de lapin.

La quantité de polysaccharide avant l'action des enzymes de dégradation est précisée par un dosage à l'amyloglucosidase (voir dosage d'amidon, page 66).

La digestion est suivie par l'augmentation du pouvoir réducteur dosé au DNS (voir page 70).

- digestion d'un polysaccharide par les amylases:

La digestion par l'α-**amylase** (α-1,4-D-Glucan glucanohydrolase) de pancréas de porc Type IA (Sigma) à une concentration de 1u/5 mg de substrat/ ml, à 25°C atteint son maximum après 2 h 30 d'incubation.

L'enzyme commercialisée à 34 000 u / ml est diluée 1000 fois dans le tampon acétate de sodium, acide acétique 10 mM, pH 6 à 4°C. Aux 5 mg de polysaccharide dissous dans 970 µl de tampon acétate à 4°C sont ajoutés 30 µl de l'α-amylase diluée.

L'action de la β-**amylase** (α-1,4-D-Glucan maltohydrolase) de pomme de terre (Merck) à 0,5u/ 5 mg de glycogène/ ml est complète après 3 h d'incubation à 25°C. Pour 5 mg de polysaccharide dissous dans 990 µl de tampon acétate de sodium , acide acétique 10 mM, pH 6 sont additionnés 10 µl de l'enzyme non diluée (à 100 u / ml).

L'évolution de la digestion α ou β-amylasique est contrôlée comme suit. Le premier prélèvement de 50 µl est prélevé immédiatement et bouilli 5 min.

L'échantillon est placé au bain thermostaté à 25°C. Les prélèvements suivants sont effectués toutes les 30 min et immédiatement bouillis. Un dosage au DNS est effectué sur ces prélèvements. Le pouvoir réducteur se stabilise après 3 h d'incubation. L'échantillon et alors bouilli et conservé à 4°C.

- digestion d'un polysaccharide par l'amyloglucosidase:

L'amyloglucosidase dégrade le polysaccharide en glucose par coupure des liaisons α-1,4 et α-1,6. Un dosage identique à celui de l'amidon est appliqué à l'aide du kit Boeringher Mannheim. Une mesure effectuée avant l'action de l'enzyme permet d'en déduire les hexoses libres initialement présents.

La chromatographie couche mince:

Les produits de digestion obtenus par l'action des enzymes de dégradation sont ensuite analysés en chromatographie couche mince Silicagel 60 5553 (Merck). Des dépôts de 10 et 20 µl de polysaccharide digéré sont effectués. Les témoins de migration tels que le glucose, le maltose, le maltoheptaose et le glucidex 19 (Roquette Frères) sont déposés aux quantités de 10 et 20 µg. La séparation des glucanes de d.p. 1 à 20 est réalisée par le solvant dit "lent-rapide" composé de 2 volumes de butanol pour 1 volume d'acide acétique et 1,5 volume d'eau. La migration dure environ 6 h. La couche mince est ensuite séchée. Les sucres sont révélés par une vaporisation d'orcinol sulfurique et la mise à l'étuve à 100°C.

La Microscopie Électronique

L'analyse cytologique des cellules carencées en azote a été réalisée dans le laboratoire de Cytologie et d'Immunocytochimie de M. le Professeur Dhainaut (laboratoire d'Endocrinologie des Vertébrés, CNRS URA 148).

Après 4 jours d'incubation en milieu limité en azote, les cellules sauvages, observées en microscopie électronique à transmission sont typiquement remplies d'amidon et de gouttelettes de galactolipides.

Résultats

Hypothèse De Départ

Jusqu'alors, des deux constituants de l'amidon, seule la synthèse de l'amylose par l'amidon synthétase liée (GBSS) avait été établie. Dans l'élaboration de la molécule complexe d'amylopectine le rôle évident de l'amidon synthétase soluble II (SSSII) dans la présence des chaînes de longueur intermédiaire avait été déterminé. La synthèse des longues chaînes, comme la présence des courtes chaînes restait encore à élucider. Du point de vue enzymologique, la fonction de l'amidon synthétase soluble I (SSSI) n'a jamais été mise à jour, que ce soit chez *Chlamydomonas* ou chez les plantes supérieures.

Il nous semblait logique de supposer que les longues chaînes constituant l'armature de l'amylopectine résultaient de l'activité de l'amidon synthétase soluble I. Nous avions donc envisagé de cibler cette activité par mutagenèse aux rayons UV.

Alors que des mutations associées à la disparition de l'amylose ont été maintes fois décrites chez les plantes supérieures, aucun mutant dont l'amidon est uniquement constitué d'amylose n'a été relevé. Cette observation semblait indiquer qu'une synthèse minimum d'amylopectine est indispensable à la présence d'amylose.

Dans cette perspective, l'inactivation de l'amidon synthétase soluble I dans une souche où l'amidon synthase soluble II est indétectable devrait conduire à une chute de la quantité d'amylopectine et par conséquent, de l'amidon. Nous avons donc choisi la souche I152 portant la mutation *sta-3-1* pour réaliser la mutagenèse aux rayons UV.

Dans ce contexte génétique particulier, une mutation additionnelle ciblant la synthèse des longues chaînes de l'amylopectine devait alors engendrer le phénotype particulier des mutants dits "sans amidon". Ce phénotype est une coloration jaune après vaporisation d'iode des souches cultivées sur milieu carencé en azote dont la quantité d'amidon est inférieure à 5 % de la quantité sauvage (Ball et coll. 1991).

Ainsi ce phénotype jaune constituait notre critère de sélection des nouvelles souches mutantes, sachant que ce critère n'était pas d'une spécificité absolue.

En effet, toutes les mutations provoquant une chute de la quantité d'amidon pouvaient être isolées, notamment les mutations liées à une défectuosité des enzymes situées en amont de la voie de biosynthèse.

Les mutants de phénotype jaune précédemment sélectionnés au laboratoire étaient représentés par la souche I7 portant la mutation *sta-1-1*, déficiente dans l'ADP-Glc pyrophosphorylase (Ball et col. 1991) et la souche GST portant la mutation *sta-5-1*, déficiente en phosphoglucomutase (figure 6).

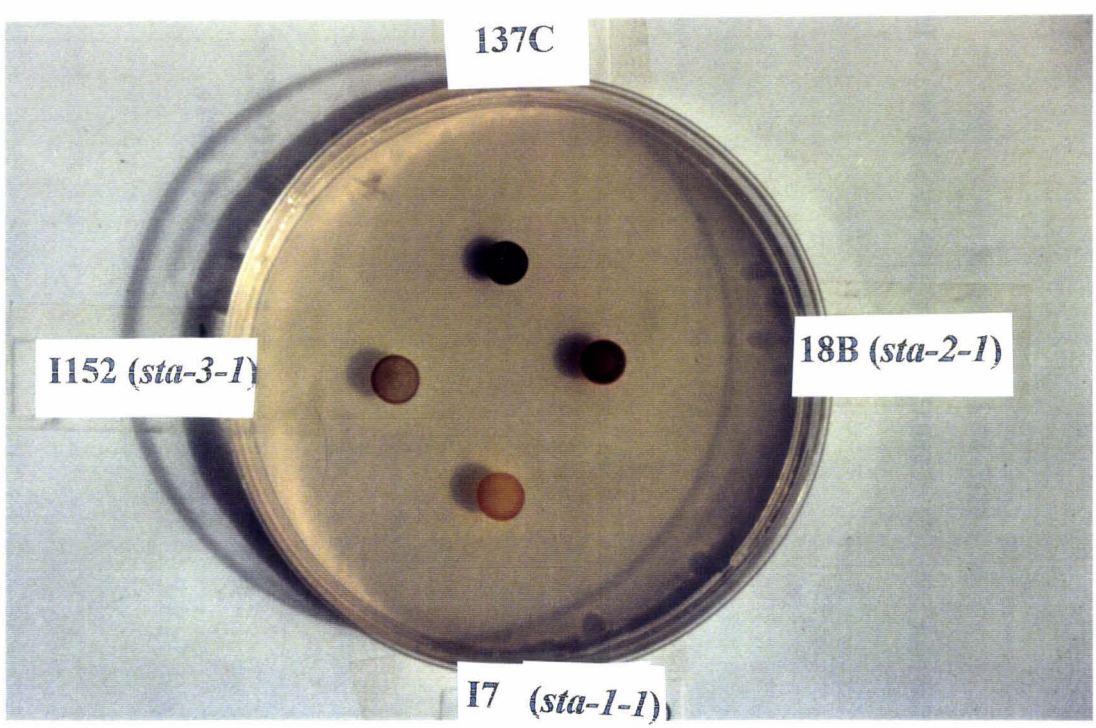


Figure 6: Coloration après vaporisation d'iode des souches mutantes et de la souche sauvage cultivées en milieu carencé en azote.

Sélection et Caractérisation Préliminaire des Mutants

La souche I152 portant la mutation *sta-3-1* présente une coloration dite "vert-olive" après vaporisation d'iode des cellules cultivées sur milieu carencé en azote. Cette coloration est due à l'accumulation d'un polysaccharide dont la longueur d'onde du maximum d'absorption (λ max) du complexe-iode dépasse les 610 nm. Sur 50 000 clones criblés après mutagenèse aux rayons UV de la souche I152, 43 mutants de phénotype jaune ont été isolés. Ces 43 mutants ont été appelés souches mutantes ML.

Nous avons réalisé une caractérisation biochimique préliminaire de ces nouveaux mutants. Le dosage d'amidon et la mesure du λ max de l'interaction polysaccharide-iode ont été effectués sur des cellules cultivées sur milieu carencé en azote (*tableau 10*).

souches	amidon µg/10^6cellules	λ max nm	souches	amidon µg/10^6cellules	λ max nm
137C	**43**	**590**	ML22	4,0	625
I152	**8,5**	**615**	ML23	2,7	620
			ML24	0,4	520
ML1	0,6	530	ML25	0,9	535
ML2	0,4	580	ML26	0,7	530
ML3	0,3	500	ML27	12,3	625
ML4	0,2	520	ML28	9,6	625
ML5	0,1	520	ML29	0,8	555
ML6	0,5	605	ML30	0,9	535
ML7	1,1	520	ML31	0,5	530
ML8	2,7	530	ML32	0,4	530
ML10	3,3	530	ML33	1,4	525
ML11	4,5	550	ML34	0,6	520
ML12	0,8	520	ML35	1,2	520
ML13	0,7	540	ML36	0,6	540
ML14	3,5	530	ML37	0,9	540
ML15	0,9	530	ML38	1,7	530
ML16	0,1	520	ML39	2,4	540
ML17	6,4	605	ML40	1,4	610
ML18	0,4	525	ML41	0,4	510
ML19	0,5	535	ML42	0,5	530
ML20	0,2	525	ML75	5,2	530
ML21	0,6	525	ML85	5,6	610

Tableau 10: Caractérisation biochimique préliminaire des souches mutantes ML.

Comme nous le laissait supposer le critère de sélection, les souches mutantes ML présentaient une quantité d'amidon réduite allant de 20 à 2 % de la quantité d'amidon sauvage. Deux types d'interaction polysaccharide-iode pouvaient être différenciées par un λ max aux environs de 540 nm ou supérieur à 600 nm.

La faible quantité d'amidon relevée dans certaines souches mutantes ML nous a amené à doser les sucres solubles (*tableau 11*).

souches	I37C	I152	GST	I7	I73	I97	I39ts	I154	ML1	ML2
WSP µg/10^{6}cellules	< 0,1	0,8	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,10	< 0,1	< 0,1	3,4	2,7

souches	ML3	ML4	ML6	ML17	ML24	ML26	ML29	ML37	ML41	ML42
WSP µg/10^{6}cellules	1,3	1,9	1,1	0,5	1,8	1,8	1,6	1,5	1,6	1,1

Tableau 11: *Dosage du polysaccharide soluble.*

Un polysaccharide soluble ou WSP (Water Soluble Polysaccharide), en quantité significative a été mis en évidence dans la souche mutante I152 et dans les souches mutantes ML testées.

Ce polysaccharide soluble paraît spécifique de la mutation *sta-3-1*.

Il n'a pu être détecté ni dans la souche sauvage, ni dans les souches GST, I7, I73, I97, I154 et I39ts portant respectivement les mutations *sta-1-1*, *sta-5-1*, *sta-4-1*, *sta-4-2*, *sta-3-2* et *sta-3-3*.

Les dosages d'activité amidon synthétase soluble montraient une réduction d'au moins 50% de l'activité sauvage dans le mutant I152 comme décrit précédemment par Fontaine et D'Hulst (1993). Aucune souche mutante ML ne présentait une baisse significative de l'activité soluble par rapport à la souche mutante de départ I152 (*tableau 12*).

souches	% activité soluble	souches	% activité soluble	souches	% activité soluble
I152	**100**				
ML1	60	ML15	85	ML31	70
ML2	70	ML16	100	ML32	120
ML3	80	ML17	80	ML33	60
ML4	80	ML18	90	ML34	120
ML5	100	ML19	100	ML35	65
ML6	110	ML20	75	ML36	90
ML7	100	ML21	100	ML37	65
ML8	100	ML23	85	ML38	70
ML9	80	ML24	80	ML39	100
ML11	110	ML25	100	ML40	100
ML12	80	ML26	65	ML41	80
ML13	120	ML29	100	ML42	85
ML14	95	ML30	70	ML75	70

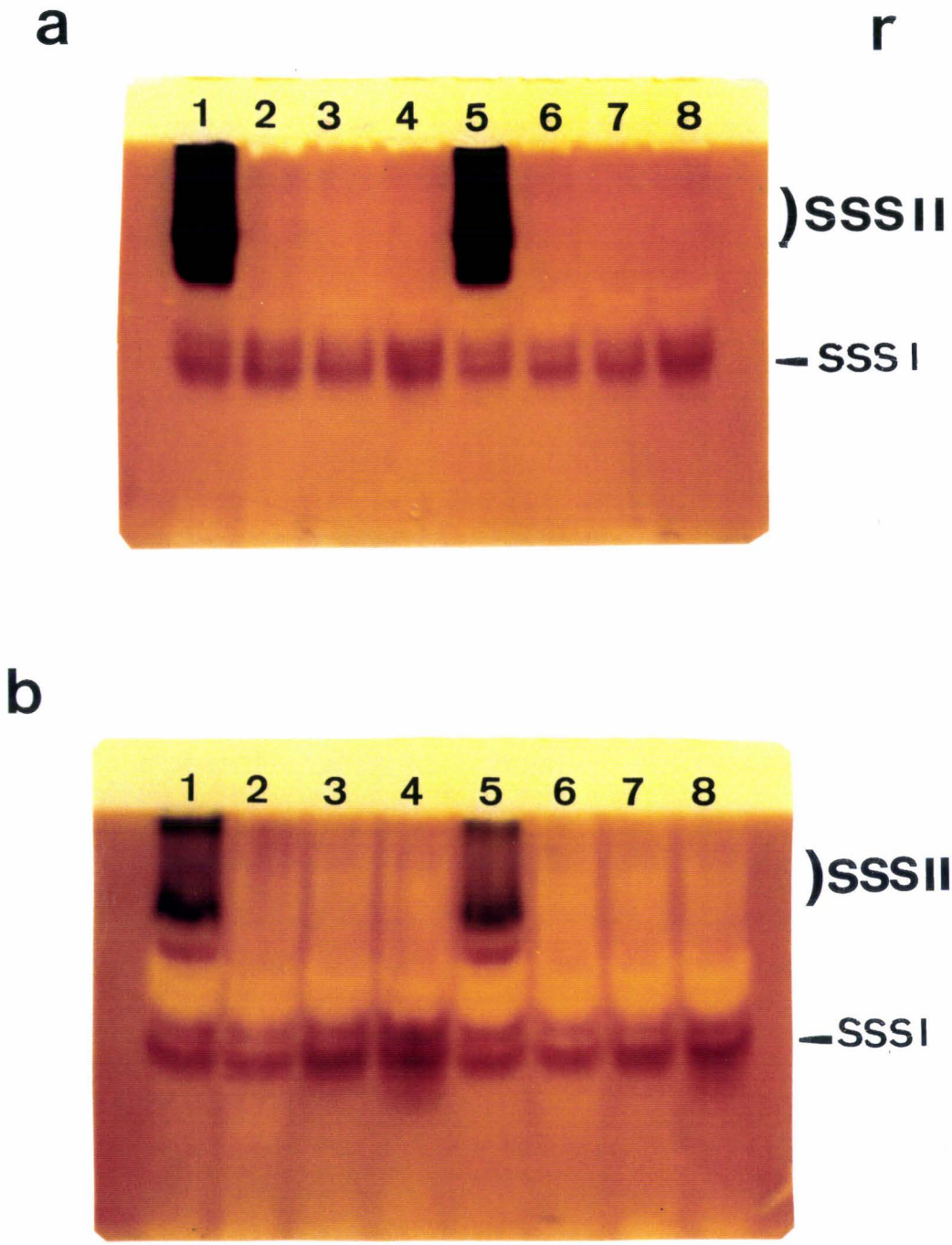
Tableau 12: Dosage d'activité amidon synthétase soluble.

La souche mutante ML1 qui, dans ces premières expériences semblait montrer une activité plus faible, fut choisie pour la caractérisation cinétique de l'activité amidon synthétase soluble (*tableau 13*).

souches	*Km*(ADP-Glc)	*Vm**(ADP-Glc)
sauvage 137C	**2**	**104**
I152 (*sta-3.1*)	**0,7**	**28**
ML1(*sta-3-1, sta-?*)	**1,3**	**41**
42J(*sta-2.1, sta-3-1*)	**0,7**	**32**

Tableau 13: Cinétiques des activités solubles.

** Exprimé en nmoles d'ADP-Glc incorporé / mg de protéine / min.*



Figures 17: Zymogrammes d'activité soluble réalisés en absence (a) et en présence (b) de citrate de la souche sauvage 137C (puits 1 et 5) et des souches mutantes 9152 (puit 2), ML1 (puit 3), 42J (puit 4), ML15 (puit 6), ML26 (puit 7) et ML37 (puit 8).

Les souches ML1, 42J et I152 présentaient des paramètres cinétiques similaires, caractéristiques de la mutation *sta-3-1* et corrélés à l'absence d'activité amidon synthétase soluble II détectable en zymogramme (*figure 17a*). Cette enzyme est inhibée par le citrate et l'amidon synthétase soluble I reste seule active.

Toutes les souches mutantes ML testées présentée une activité amidon synthétase soluble en présence de citrate (*figure 17b*).

Nous avons donc conclu que la ou les nouvelle(s) mutations portée(s) par les souches ML ne modifiait(ent) pas l'activité de l'amidon synthétase soluble I. Le crible utilisé ne permettait donc pas d'isoler des souches défectueuses pour cette enzyme. Il nous restait à comprendre le support génétique des défectuosités que nous avons ainsi sélectionnées.

Analyse génétique des Mutants

Nous avons utilisé deux techniques de croisement: l'analyse des spores au hasard et l'analyse de tétrades désordonnées (voir Matériels et Méthodes).

La validité des croisements a été contrôlée par la ségrégation des marqueurs Pab (auxotrophie pour l'acide para-aminobenzoïque), Ac (besoin d'acétate pour croître) et Nit (capacité d'assimiler les nitrates).
Le caractère Nit est contrôlé par deux gènes nucléaires, les mutations *nit-1* et *nit-2* sont récessives (E. Harris, 1989). La ségrégation de ces deux mutations se traduit par 75% de clones Nit^- et 25% de clones Nit^+ (voir Matériels et Méthodes). Les marqueurs d'auxotrophie pour l'acétate (Ac) ou pour le para-aminobenzoate (Pab) sont présents dans 50% des descendants. Les gènes *PAB-2* et *AC-14* se situent sur le même chromosome à 14 cM, les phénotypes recombinés entre les marqueurs Pab et Ac sont observés dans 14% des descendants (E. Harris, 1989). Le caractère amidon est visualisé après vaporisation d'iode sur les clones cultivés en milieu carencé en azote (Ball et coll., 1990).

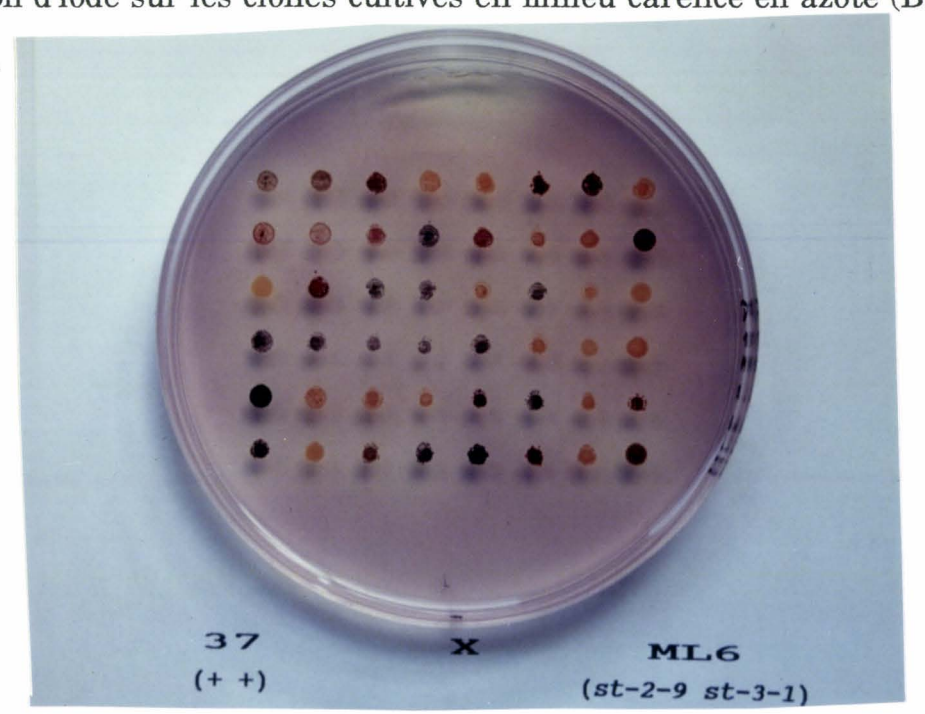


Figure 18: Coloration à l'iode de ségrégeants issus du croisement entre la souche ML6 et la souche sauvage 37.

croisement		ML1 x 37		ML6 x 37		ML11 x 37		ML26 x 37		ML37 x 37		ML75 x 37	
descendants		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones	
phénotypes marqueurs	Ac +	66/137	48%	48/93	52%	48/77	62%	57/107	53%	59/111	53%	44/82	54%
	Ac --	71/137	52%	45/93	48%	29/77	37%	50/107	47%	52/111	47%	38/82	46%
	Pab +	83/137	60%	52/93	56%	41/77	52%	56/107	52%	60/111	54%	43/82	52%
	Pab --	54/137	40%	41/93	44%	36/77	48%	51/107	48%	51/111	46%	39/82	48%
	Nit +	31/137	23%	27/93	29%	17/77	22%	25/107	23%	24/111	22%	18/82	22%
	Nit --	106/137	77%	66/93	71%	60/77	78%	82/107	77%	87/111	78%	59/82	78%
recombinés	Pab/Ac	33/137	24%	9/93	10%	12/77	16%	25/107	23%	24/111	22%	11/82	13%
coloration de l'amidon	noirs	31/135	23%	34/93	37%	12/77	16%	33/107	31%	30/111	27%	22/82	27%
	jaunes	38/135	28%	33/93	35%	15/77	19%	29/107	27%	29/111	26%	29/82	35%
	verts	31/135	23%	18/93	19%	27/77	35%	22/107	21%	26/111	24%	17/82	21%
	rouges	35/135	26%	8/93	9%	23/77	30%	23/107	21%	26/111	23%	14/82	17%

Tableau 14: Résultat de l'analyse des croisements entre des souches mutantes ML et la souche sauvage adéquate 37.

Neufs souches mutantes ML ont été soumises à l'analyse des spores au hasard après croisement avec la souche sauvage 37 possédant les marqueurs opposés (*figure 18 et tableau 14*).

Les croisements entre les souches mutantes ML2, ML15, ML29 et la souche sauvage contaminés par les haploïdes parentaux n'ont pas donné une ségrégation des caractères satisfaisante. Néanmoins, nous avons pu isoler des colonies recombinantes intéressantes.

L'analyse des tétrades, plus difficile à réaliser (voir Matériels et Méthodes), fut appliquée au croisement entre le mutant ML1 et le sauvage 37 (*figure 19*).

Les 17 tétrades obtenues se répartissaient en 3 ditypes parentaux, 2 ditypes recombinés et 12 tétratypes. Cette répartition n'était compatible qu'avec la ségrégation indépendante de deux gènes, non liés mutuellement à leur centromère (E. Harris, 1989).

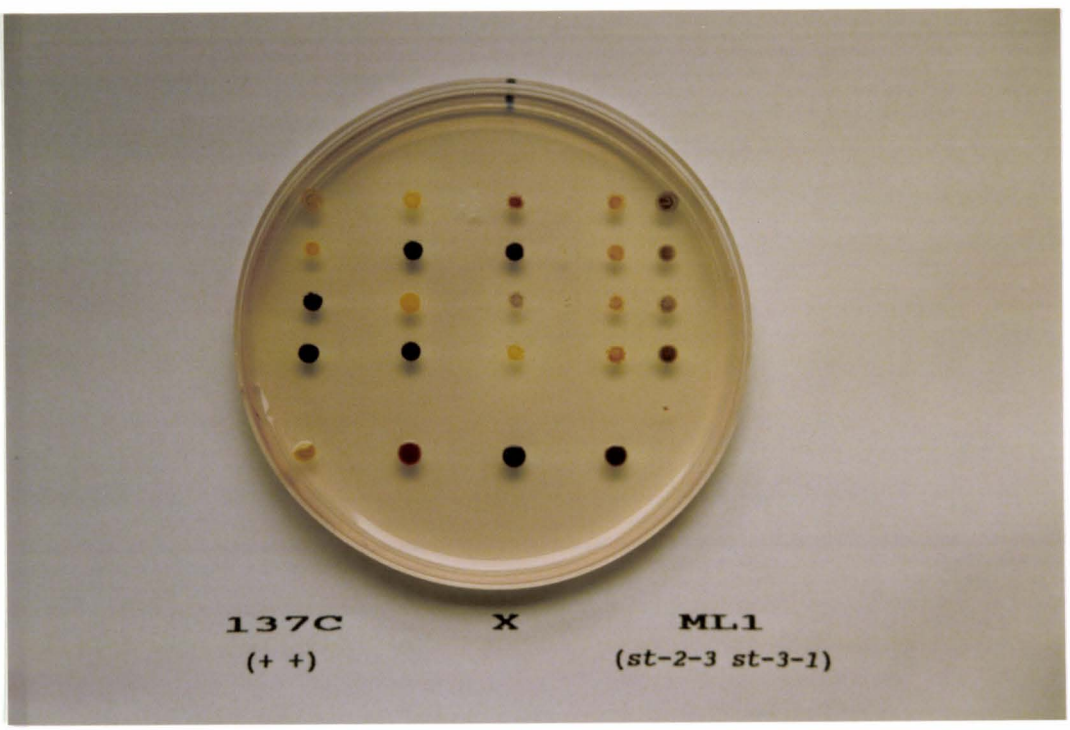


Figure 19: Coloration à l'iode des spores constituant les tétrades issues du croisement entre la souche ML1 et la souche sauvage 37.

La ségrégation mendélienne du caractère "amidon" dans la descendance de ces croisements a indiqué que la nouvelle mutation était monogénique et nucléaire, indépendante de la mutation *sta-3-1*.

Dans tous les cas, la nouvelle mutation portée par les souches ML, replacée dans le contexte sauvage engendre un amidon qui se colore en rouge avec l'iode.

Or, ce phénotype rouge est celui des souches portant une mutation au locus *STA-2*, le gène de structure, non pas d'une amidon synthétase soluble mais bien celui de l'amidon synthétase liée au grain (Delrue et coll.,1992).

Nos souches mutantes ML étaient-elles touchées dans le gène de structure de la GBSS ?

La récessivité des mutations fut contrôlée par le phénotype des diploïdes issus des croisements entre les souches mutantes ML et la souche sauvage 37.

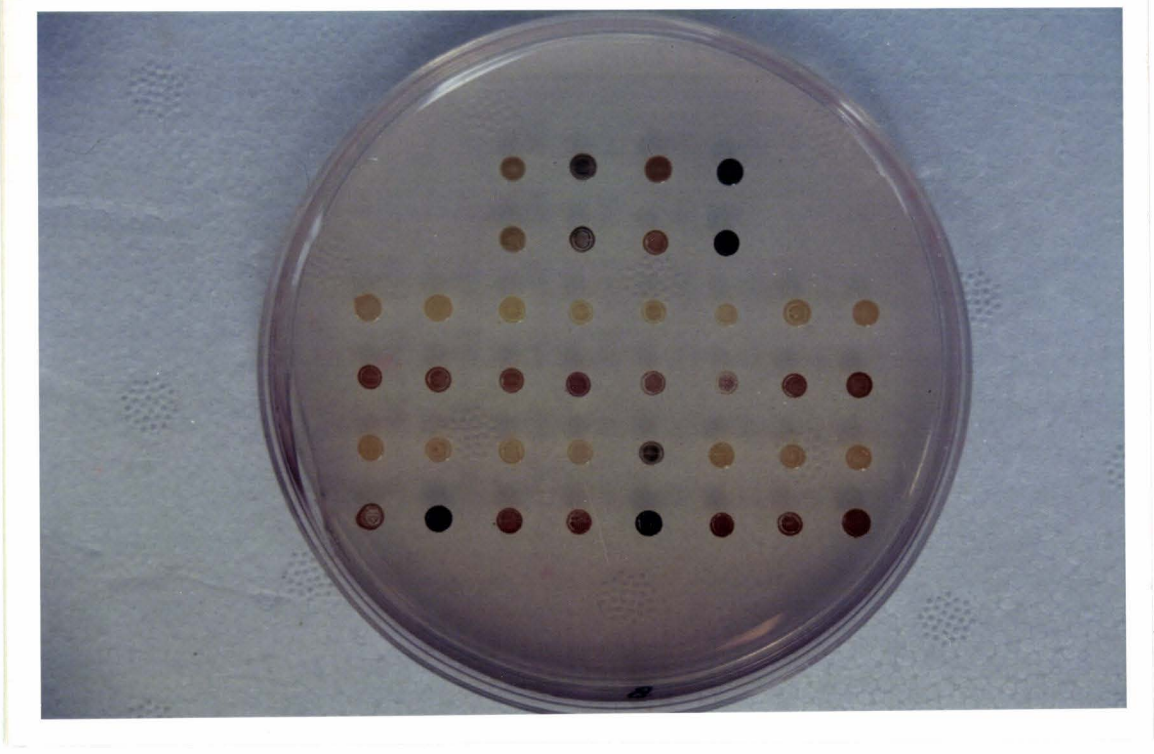


Figure 20: Coloration à l'iode des diploïdes issus de différents croisements entre une souche ML et la souche B20 portant la mutation sta-2-1.

Nous avons ensuite réalisé les tests de complémentation entre les 43 mutants ML et la souche adéquate B20 portant la mutation *sta-2-1*. Sur les 43 diploïdes représentatifs issus de ces tests, 36 ont donné une coloration rouge après vaporisation d'iode (*figure 20 et tableau 15*).

Parmi les 36 mutants ML ne complémentant pas en trans avec la souche B20, 24 provenaient de boites de mutagenèse différentes.

Ces souches ML constituaient 24 nouveaux mutants du gène *STA-2*.

Certains de ces tests de complémentation ont été complétés par un test de recombinaison. Les souches T1R, R26 et R37 sont issues des croisements des souches mutantes ML1, ML26, ML37 avec la souche sauvage 37. Ces descendants portent la nouvelle mutation replacée dans le contexte sauvage. Ces mutants T1R, R26 et R37 ont été croisés avec la souche 18B ou B20 (selon la polarité et les marqueurs) portant la mutation *sta-2-1*

croisement		T1R x B20		R26 x 18B		R37 x B20	
descendants		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones	
phénotypes marqueurs	Ac +	100 /172	58%	62 /100	62%	112 /192	58%
	Ac -	72 /172	42%	38 /100	38%	80 /192	42%
	Pab +	89 /172	52%	55 /100	55%	109 /192	57%
	Pab -	83 /172	48%	45 /100	45%	83 /192	43%
	Nit +	48 /172	28%	22 /100	22%	46 /192	24%
	Nit -	124 /172	72%	78 /100	78%	146 /192	76%
recombinés	Pab/Ac	30 /172	17%	25/ 100	25%	32/ 192	17%
coloration de l'amidon	rouges	172 /172	100%	100 /100	1 00%	192 /192	100%

Tableau 15: *Résultats de l'analyse des croisements entre les souches mutantes T1R, R26 et R37 et la souche compatible 18B ou B20 portant la mutation sta-2-1.*

Les clones issus de ces croisements se coloraient tous en rouge après vaporisation d'iode, confirmant que les souches T1R, R26 et R37 portent une mutation dans le gène *STA-2*.

Ces 24 nouveaux mutants ne complémentant pas avec la mutation *sta-2-1* en phase diploïde définissaient bel et bien 24 nouveaux allèles au locus *STA-2*.

Nous nous sommes donc tournés vers la caractérisation de la GBSS, produit du gène *STA-2*.

Les recombinants T1R, R15, R26 et R37 portent respectivement les mutations *sta-2-3*, *sta-2-4*, *sta-2-5* et *sta-2-6* provenant des souches mutantes ML1, ML15, ML26 et ML37. Les souches T1R, T1N, T1V et T1J sont des ségrégeants du croisement entre le mutant ML1 et le sauvage, et représentent les 4 combinaisons du caractère amidon.

La souche 18B portant la mutation *sta-2-1* possède une activité liée cinq fois plus faible que l'activité sauvage (Delrue et coll., 1992).

L'activité amidon synthétase liée des souches portant une nouvelle mutation *sta-2* était du même ordre que l'activité résiduelle du mutant 18B (*tableau 16*).

Les paramètres cinétiques de l'activité liée du mutant 18B avaient été déterminés par Delrue et coll. (1992).

Nous remarquons que l'activité spécifique de l'amidon synthétase liée exprimée par milligramme d'amidon augmente lorsque que la quantité de polysaccharide baisse significativement. Cette observation est clairement illustrée par les activités relevées pour les descendants T1N, T1R, T1V et T1J (*tableau 17*).

Les nouvelles mutations dans le gène *STA-2* se caractérisaient par une cinétique de l'activité amidon synthétase liée altérée.

Les *Km* (ADP-Glc) et *Vm* (ADP-Glc) relevés dans les nouveaux mutants *sta-2* et avoisinaient ceux de la souche mutante 18B (*tableau 17*).

souches	activité*/ 10^6cellules	/activité sauvage	activité*/ mg d'amidon	/activité sauvage
sauvage 137C	34	100%	1370	100%
18B (*sta-2-1*)	9	27%	270	20%
R15 (*sta-2-4*)	8	23%	200	15%
R26 (*sta-2-5*)	3	9%	170	12%
R37 (*sta-2-6*)	6	17%	290	21%
T1R (*sta-2-3*)	11	32%	270	20%
T1N sauvage	45	125%	2080	90%
T1V (*sta-3-1*)	37.5	110%	2080	150%
T1J (*sta-2-1*, *sta-3-1*)	0,5	1,5%	1240	90%

Tableau 16: *Dosage d'activité amidon synthétase liée.*

**Exprimée en pmoles d'ADP-Glc incorporé / min.*

souches	*Km* (ADP-Glc)	*Vm* *(ADP-Glc)
sauvage 137C	5,6	13,00
18B (*sta-2-1*)	26,2	2,80
T1R (*sta-2-3*)	18,1	1,70
R15 (*sta-2-4*)	15,7	2,20
R26 (*sta-2-5*)	42,9	1,50
R37 (*sta-2-6*)	19,0	1,60

Tableau 17: *Cinétique d'activité G.B.S.S.*

**exprimé en nmoles d'ADP-Glc incorporé / mg d'amidon / min.*

L'amidon synthétase liée représente 90% des protéines extraites du grain d'amidon (Preiss et coll., 1991).

Chez *Chlamydomonas*, cette protéine majeure sauvage possède une masse moléculaire de 76 KDa et peut être visualisée en gel d'électrophorèse SDS. L'amidon synthétase liée (de même séquence N-terminale) de la souche 18B portant la mutation *sta-2-1* a une masse moléculaire altérée de 56 KDa. Dans la souche 25B portant la mutation *sta-2-2*, la protéine est en quantité 4 fois plus faible que dans la souche sauvage (Delrue et coll., 1992).

La protéine liée des souches portant une nouvelle mutation dans le gène *STA-2*, ne semblait pas modifiée en gel d'électrophorèse SDS (*figure 21*).

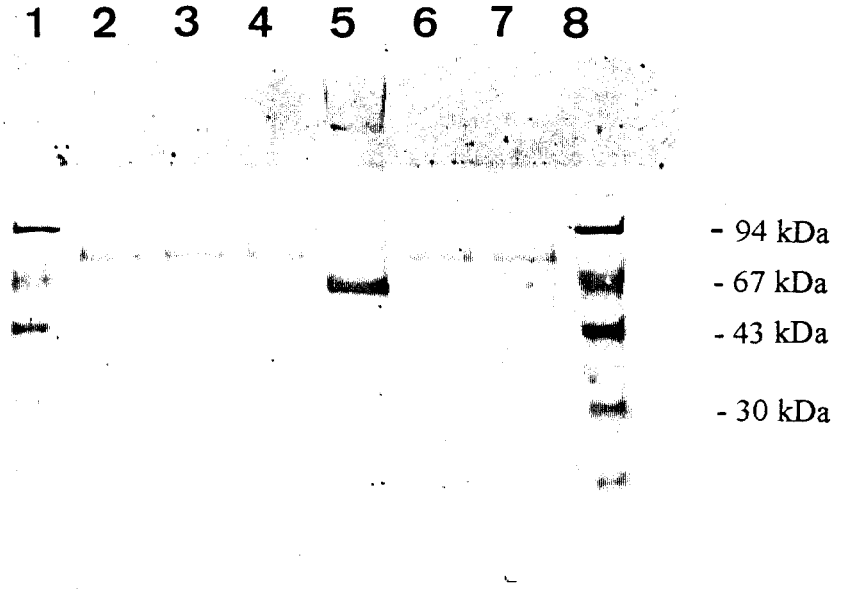


Figure 21: *Gel d'électrophorèse S.D.S. des protéines extraites de l'amidon de la souche sauvage (puit 2) et des souches mutantes 71R (puit 3), R26 (puit 4), 18B (puit 5), R37 (puit 6) et R15 (puit 7), témoins de masse moléculaire (puits 1 et 8)*

Ces nouveaux mutants du gène *STA-2* ont une activité GBSS altérée, confirmant ainsi nos résultats génétiques.

Cette défectuosité additionnelle à une déficience de l'amidon synthétase soluble II entraîne un effondrement de la quantité d'amidon dans les souches mutantes ML. Quelles étaient les conséquences des mutations *sta-2* et *sta-3* sur la structure et la quantité de polysaccharide des recombinants ?

Conséquences Biochimiques de l'Interaction aux Loci STA-2 et STA-3

Nous avons réalisé des dosages d'amidon sur 16 descendants de chacun des croisements précédemment cités. La quantité d'amidon a été moyennée sur 4 recombinants pour les 4 catégories phénotypiques de l'amidon (*tableau 18*).

descendants du croisement		ML1 x 37	ML2 x 37	ML6 x 37	ML11 x 37	ML26 x 37	ML29 x 37	ML37 x 37
quantité	noirs	37,1 +/- 5,6	18,3 +/- 3	31,5 +/- 3,7	26,2 +/- 0,2	32,1 +/- 5,5	28 +/- 5,1	23,4 +/- 1,3
moyenne	rouges	38,6 +/- 4,6	20,4 +/- 1,3	37,2 +/- 5,6	26 +/- 1,7	24,7 +/- 4,3	26,7 +/- 4	27,8 +/- 2,6
d'amidon	verts	12,1 +/- 3,6	9 +/- 3,7	19,1 +/- 3,5	13,5 +/- 2	11,4 +/- 2,6	13,7 +/- 2,8	11 +/- 2,2
µg/10^6cellules	jaunes	2,7 +/- 0,7	2,1 +/- 0,3	1,7 +/- 0,2	1,2 +/- 0,2	2 +/- 0,4	1,4 +/- 0,5	2,3 +/- 0,3
par rapport aux souches sauvages		7,3 %	11,7 %	5 %	4,7 %	6,2 %	4,8%	9,7 %
par rapport aux mutants *st-3*		22,2%	23,8%	8,8%	9 %	17,5%	9,9%	20,7%
λ max (nm)	noirs	590 +/- 4	597 +/- 8	598 +/- 5	594 +/- 1	589 +/- 5	598 +/- 4	590 +/- 4
moyen de	rouges	542 +/- 5	534 +/- 2	537 +/- 5	536 +/- 3	535 +/- 4	542 +/- 3	542 +/- 5
l'interaction	verts	610 +/- 5	616 +/- 4	615 +/- 4	618 +/- 4	618 +/- 5	612 +/- 3	615 +/- 5
avec l'iode	jaunes	529 +/- 5	531 +/- 5	525 +/- 7	522 +/- 5	521 +/- 3	532 +/- 3	528 +/- 5

Tableau 18: *Détermination de la quantité moyenne d'amidon dans les descendants mutants et rapportée à la moyenne obtenue pour les descendants sauvages issus du même croisement. Détermination de la λ max moyen du complexe polysaccharide-iode sur ces mêmes descendants.*

Les valeurs les plus basses, jamais enregistrées chez *Chlamydomonas* en milieu limité en azote ont été obtenues pour les descendants de phénotype jaune. La quantité d'amidon résiduelle dans ces doubles mutants s'effondre jusqu'à 5% de la quantité d'amidon de la souche sauvage.

Or, les souches défectueuses dans la SSS II renferment encore au moins 40% d'amylopectine. La chute de la quantité d'amidon en présence d'une déficience supplémentaire en activité GBSS ne pouvait s'expliquer par la seule disparition de l'amylose.

Nous en venions naturellement à proposer que l'amidon synthétase liée intervienne aussi dans la synthèse de l'amylopectine.

Des doubles mutants portant différentes mutations *sta-2* et *sta-3* ont été construits. Pour cela, nous avons croisé les souches B20, R26 et R37 portant la mutation *sta-2-1*, *sta-2-5* ou *sta-2-6* avec les souches I152, I154 et I39ts portant la mutation *sta-3-1*, *sta-3-2* ou *sta-3-3* (*figure 22 et tableau 19*).

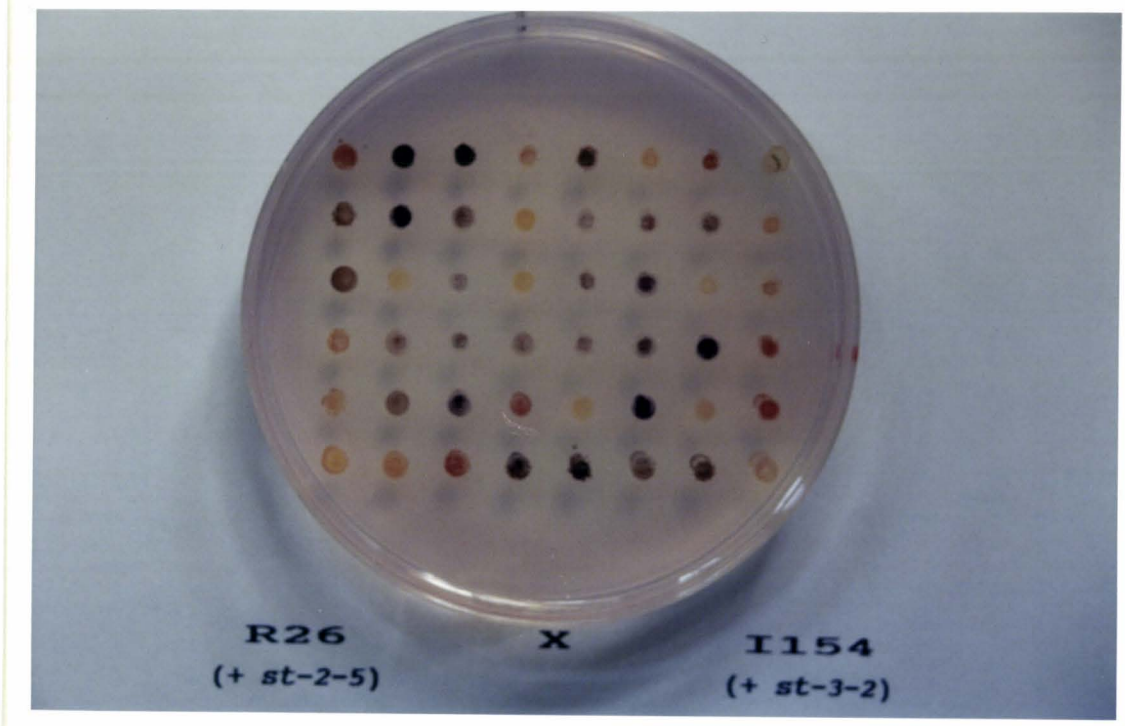


Figure 22: Coloration à l'iode de descendants issus du croisement entre la souche I154 et la souche R26.

croisement		B20 x I152		B20 x I154		B20 x I39ts	
descendants		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones	
phénotypes	Ac +	40/94	43%	36/80	45%	48/96	50%
	--	54/94	57%	44/80	55%	48/96	50%
marqueurs	Pab +	41/94	43%	37/80	46%	55/96	57%
	--	53/94	57%	42/80	54%	41/96	43%
	Nit +	32/94	34%	21/80	32%	25/96	26%
	--	62/94	66%	49/80	61%	71/96	74%
recombinés	Pab/Ac	9/94	10%	14/80	31%	14/96	15%
coloration de l'amidon	verts	25/96	26%	20/80	25%	26/96	27%
	rouges	17/96	18%	36/80	45%	23/96	24%
	noirs	33/96	34%	11/80	14%	24/96	25%
	jaunes	21/96	22%	13/80	16%	23/96	24%

croisement		R26 x I154		R26 x I39ts		R37 x I154		R37 x I39ts	
descendants		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones		nombre de clones	
phénotypes	Ac +	48/80	60%	33/60	55%	47/96	49%	55/96	57%
	--	32/80	40%	27/60	45%	49/96	51%	41/96	43%
marqueurs	Pab +	41/80	51%	32/60	53%	44/96	54%	51/96	53%
	--	39/80	49%	28/60	47%	52/96	46%	45/96	47%
	Nit +	19/80	24%	14/60	23%	34/96	35%	30/96	31%
	--	61/80	76%	46/60	77%	62/96	65%	66/96	69%
recombinés	Pab/Ac	7/80	9%	7/60	12%	17/96	18%	17/96	18%
coloration de l'amidon	verts	23/80	29%	24/60	40%	24/96	25%	28/96	29%
	rouges	21/80	26%	20/60	33%	33/96	34%	26/96	27%
	noirs	16/80	20%	7/60	12%	14/96	15%	25/96	26%
	jaunes	20/80	25%	9/60	15%	25/96	26%	17/96	18%

bleaux 19: Résultats de l'analyse des croisements entre des souches portant différentes dations sto-2 et les mutants sto-3.

descendants du croisement		18B x B9	R26 x I154	R26 x I39ts	R37 x I154	R37 x I39ts
quantité	noirs	27,1 +/- 5,4	28,4 +/- 5	19 +/- 5,7	23,4 +/- 4,5	24,6 +/- 6
moyenne	rouges	23,5 +/- 3,6	22,5 +/- 3,7	17,1 +/- 5	21,4 +/- 1,7	29,8 +/- 5,3
d'amidon	verts	10,7 +/- 1,2	11,1 +/- 2,6	6,7 +/- 2	11 +/- 3	9,7 +/- 2,1
µg/10^6cellules	jaunes	3,3 +/- 0,5	2,1 +/- 0,4	1,8 +/- 0,3	3,9 +/- 0,6	3,6 +/- 0,4
par rapport aux souches sauvages		12,2 %	7,4 %	9,4 %	16,7 %	14,8 %
par rapport aux mutants *sta-3*		30,8 %	18,7 %	24,8 %	35,5 %	37,5 %
λ max	noirs	589 +/- 3	598 +/- 4	591 +/- 2	590 +/- 2	589 +/- 3
moyen de	rouges	544 +/- 4	542 +/- 2	535 +/- 3	535 +/- 3	536 +/- 2
l'interaction	verts	622 +/- 4	626 +/- 4	618 +/- 4	621 +/- 2	617 +/- 5
avec l'iode (nm)	jaunes	560 +/- 10	550 +/- 5	530 +/- 8	540 +/- 10	526 +/- 5

Tableau 20: *Détermination de la quantité moyenne d'amidon des descendants mutants et rapportée à la moyenne obtenue pour les descendants sauvages issus du même croisement. Détermination de la λ max moyen du complexe polysaccharide-iode sur ces mêmes descendants.*

Les dosages d'amidon réalisés sur ces recombinants confirmaient le résultat précédemment obtenu (*tableau 20*).

Dans tous les cas, le double mutant de phénotype jaune affiche une chute spectaculaire de la quantité d'amidon.

L'amidon de ces descendants a été analysé, après sa dispersion dans le DMSO, par une chromatographie de gel filtration TSK HW75.

Le profil obtenu par gel filtration de l'amidon des recombinants portant la nouvelle mutation *sta-2* est similaire à celui décrit pour l'amidon de la souche 18B (*figures 24 a*) (Delrue et coll., 1992).

L'amidon de ces mutants est dépourvu d'amylose et d'un matériel de haut poids moléculaire nommé amylopectine de type II (*figures 24c,d,e*). L'interaction-iode de l'amylopectine résiduelle affiche une λ max plus basse que celui du pic I de l'amylopectine sauvage.

La structure de l'amidon des souches portant les mutations *sta-2* et *sta-3,* par l'absence de la fraction d'amylose est analogue à celle des simples mutants *sta-2* (*figures 25*).

A cet égard, nous disons que les mutations *sta-2* sont épistatiques sur les mutations *sta-3*. Toutefois, la λ max varie fortement selon les combinaisons d'allèles mis en présence (*tableaux 18 et 20*).

La sévérité de la décroissance de la quantité d'amidon est corrélée à une baisse importante de la λ max de l'intéraction-iode et en fonction de l'activité GBSS encore présente dans les doubles mutants (*figure 23*).

Cette observation argumente très fortement pour un rôle de l'amidon synthétase liée dans la synthèse des longs glucanes de l'amylopectine.

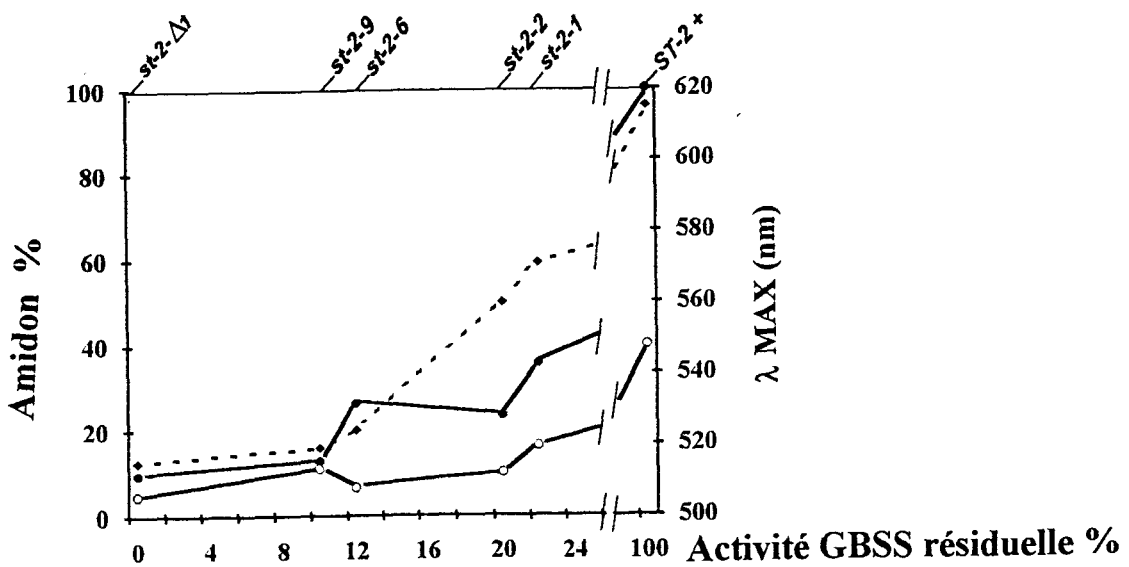
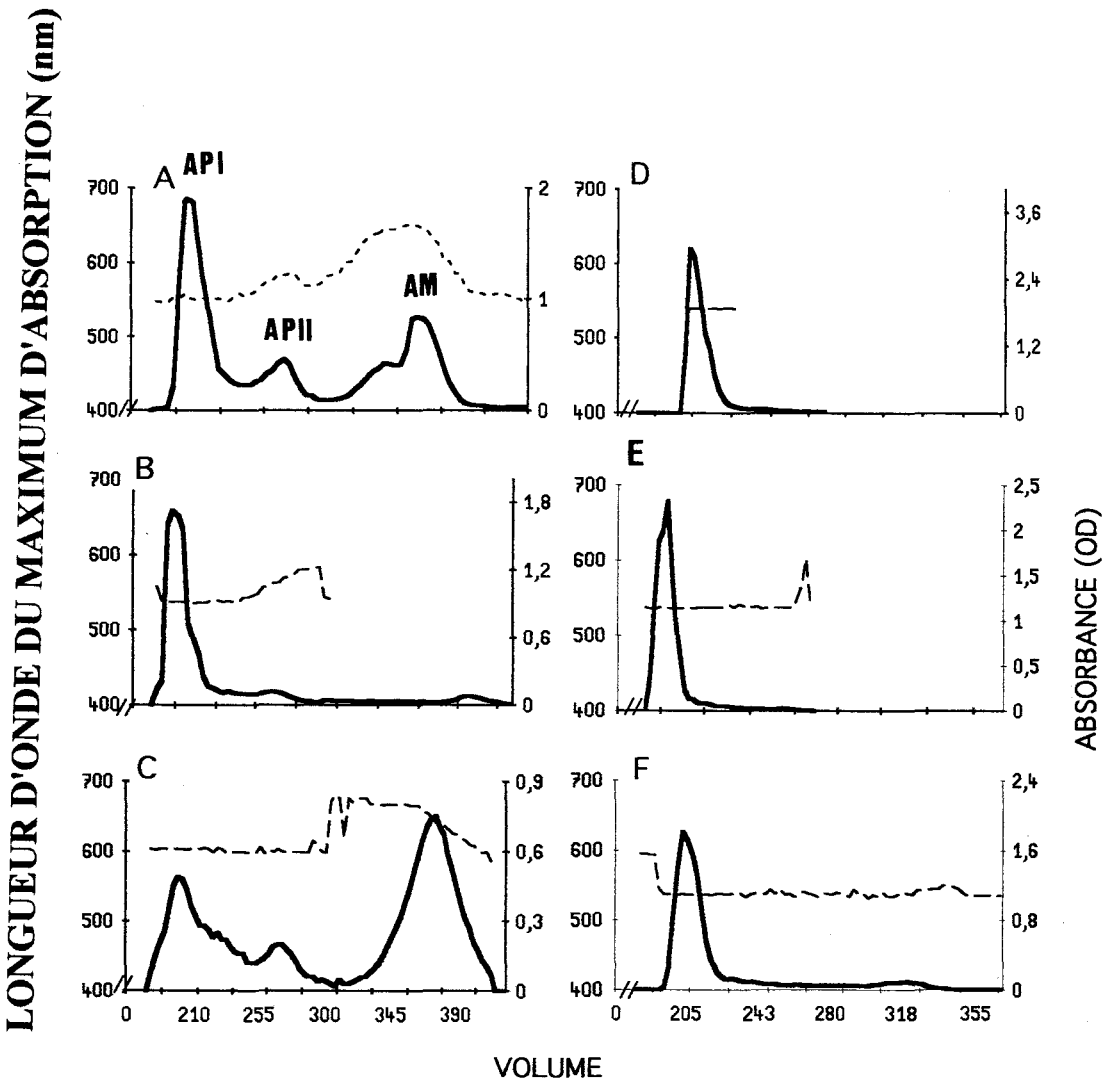


Figure 23: Relation entre d'activité GBSS résiduelle, la quantité d'amidon et le λ max du complexe polysaccharide-iode des doubles mutants.



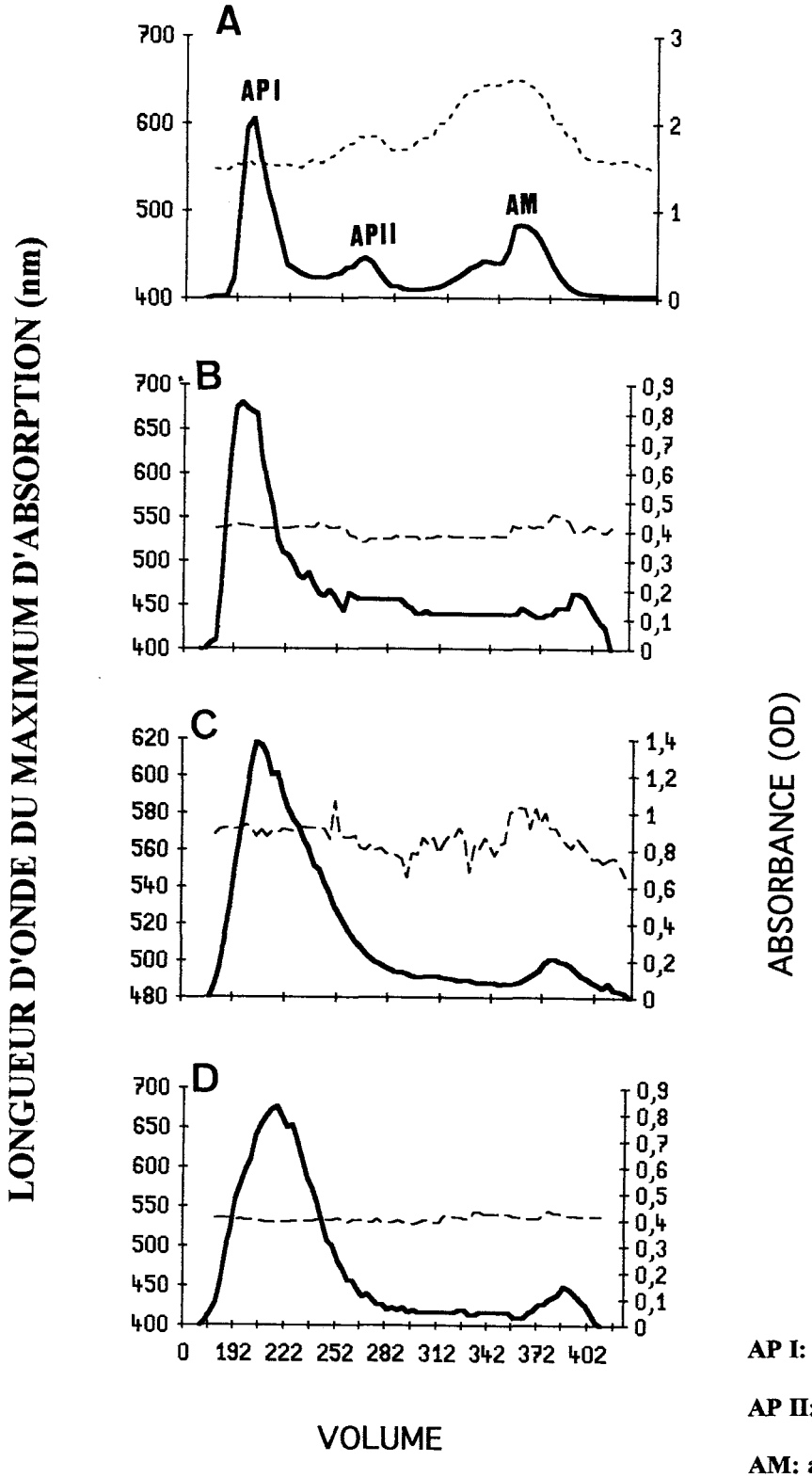
AP I: amylopectine de type I.

AP II: amylopectine de type II.

AM: amylose

*** L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde du maximum d'absorption.**

Figures 24: *Profils obtenus par gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche sauvage (A) et des souches 9152 portant la mutation sta-3-1 (B), 71R portant la mutation sta-2-3 (C), R15 portant la mutation sta-2-4 (D), R26 portant la mutation sta-2-5 (E) et R37 portant la mutation sta-3-6 (F).*



AP I: amylopectine de type I.

AP II: amylopectine de type II.

AM: amylose

Figures 25: *Profils obtenus par gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche sauvage (A) et des souches 71J portant les mutations sta-2-3 et sta-3-1 (B), S8 portant les mutations sta-2-1 et sta-3-1 (C), K37B43 portant les mutations sta-2-6 et sta-3-3 (D).*

Delrue et coll.(1992) ont montré que l'amidon synthétase liée intervient dans la synthèse d'amylose et d'une partie de l'amylopectine dite de type II. Par ailleurs, chez les plantes supérieures, Leloir (1961) et Baba (1987) ont montré que la GBSS était capable d'ajouter du glucose *in vitro* à la fraction amylopectine.

La synthèse *in vitro* appliquée à *Chlamydomonas* (voir Annexe) montrait que les mutations sélectionnées dans le gène *STA-2* permettaient encore une synthèse faible de longs glucanes (*figure 26*).

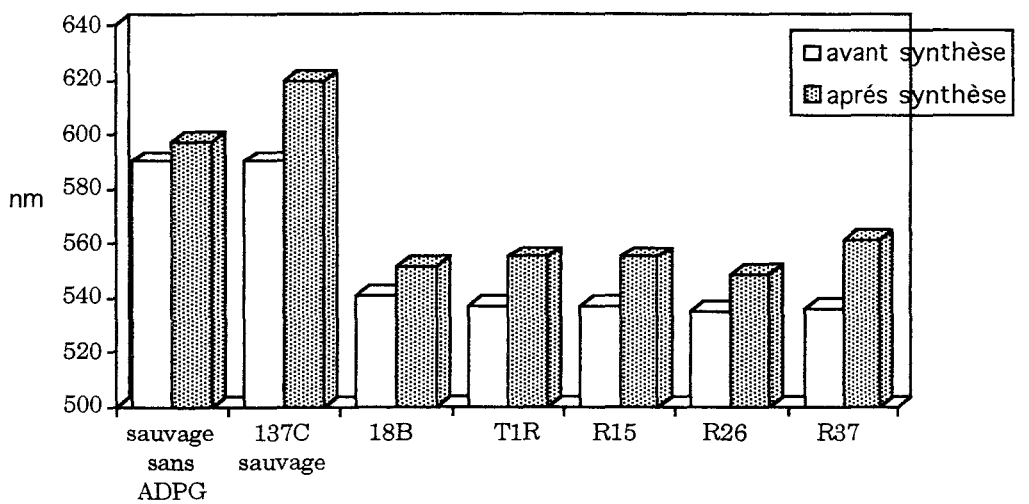
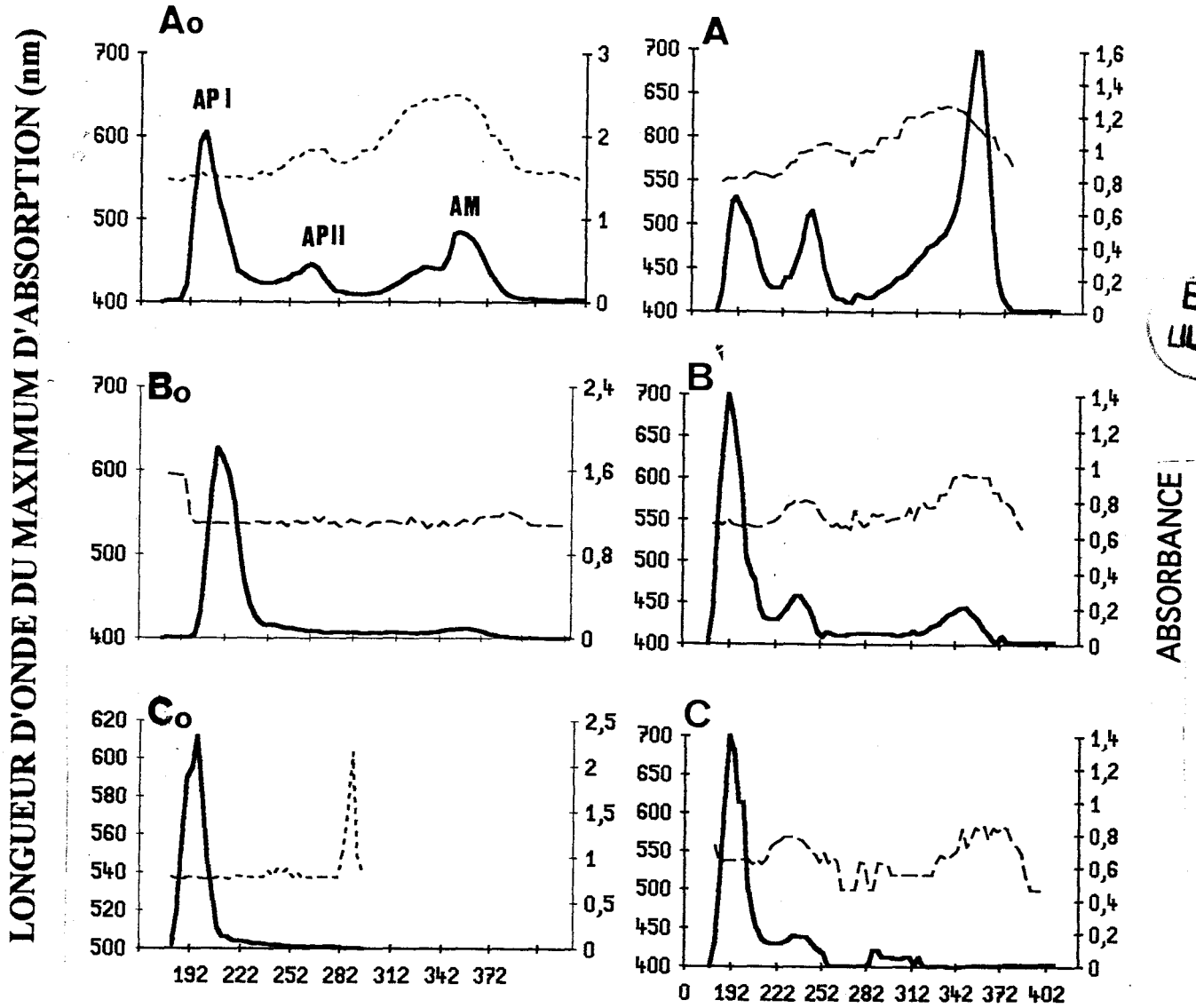


Figure 26: *Evolution du λ max (nm) du complexe polysaccharide-iode des amidons mutants et de l'amidon sauvage soumis à la synthèse in vitro. Les souches 18B, T1R, R15, R26 et R37 portent respectivement les mutations sta-2-1, sta-2-3, sta-2-6, sta-2-4 et sta-2-5*



BU LILLE 1

AP I: amylopectine de type I.

AP II: amylopectine de type II.

AM: amylose

Figures 26: *Profils obtenus par gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche sauvage (A) et des souches 71R portant la mutation sta-2-3 (B) et R26 portant la mutation sta-2-5 (E) avant et après synthèse in vitro.*

Le profil obtenu par gel filtration de l'amidon sauvage après synthèse *in vitro* montre un enrichissement en amylose et en amylopectine de type II (*figure 27 a*).

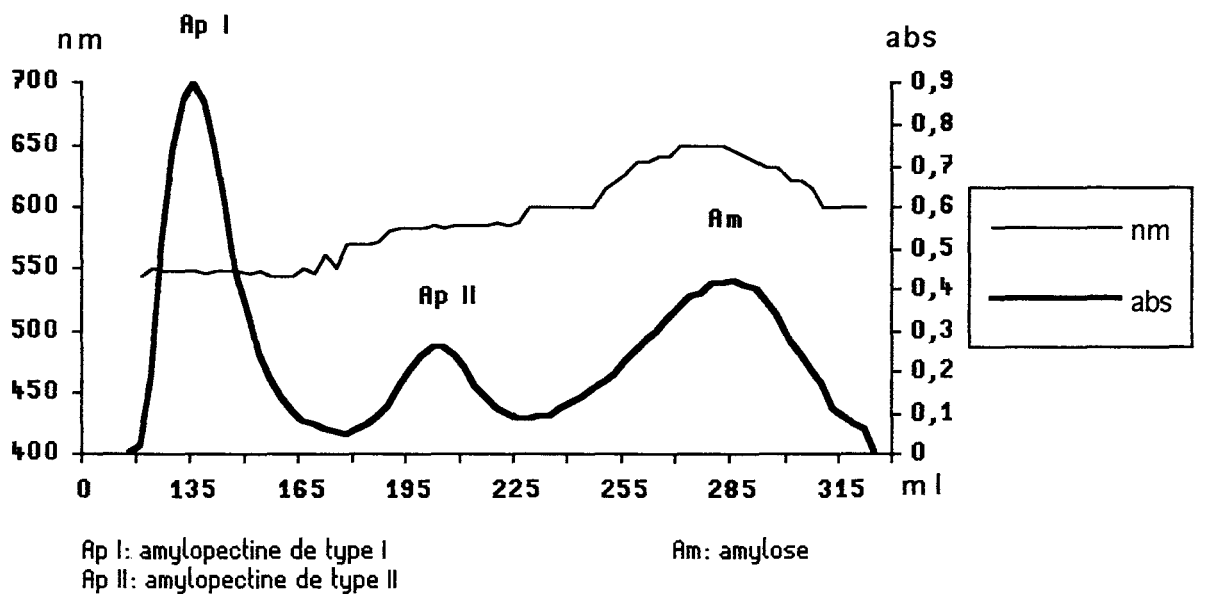
L'augmentation du λ max de l'interaction-iode s'observe sur toutes les fractions indiquant une synthèse nette en longs glucanes, dans l'amylose mais aussi dans les fractions d'amylopectine (*figures 27*).

La structure de l'amylopectine de type I et de l'amylose avait été détaillée par T. Fontaine (1993). Cependant, la nature de l'amylopectine II montrée sous le contrôle de la GBSS (Delrue et coll., 1992) n'était pas définie.
Nous nous sommes donc intéressés à la structure de ce matériel.

Caractérisation Structurale d'une Nouvelle Sous Fraction De l'Amylopectine

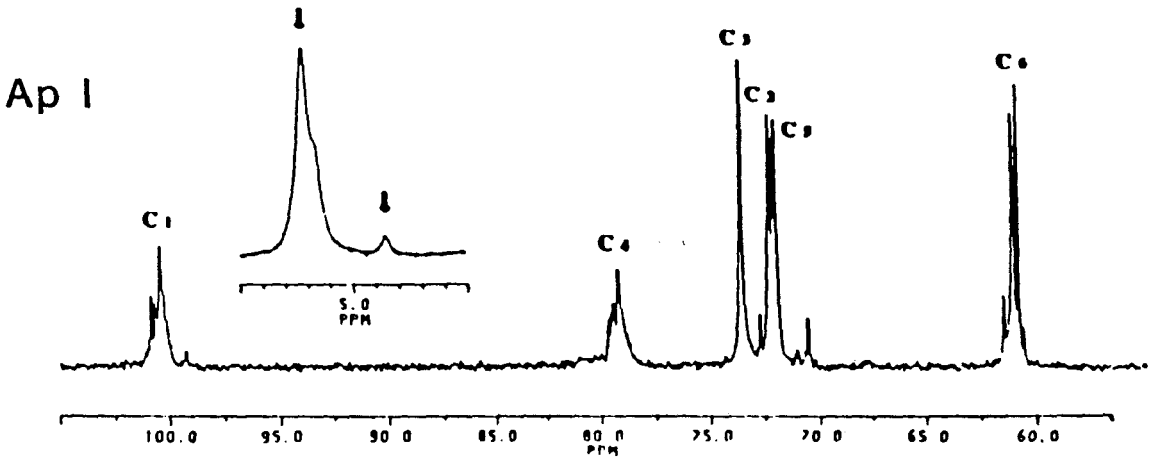
L'amylopectine dite de type II (Ap II) représente 2 à 10% de l'amidon total, selon les conditions de culture, chez une souche sauvage.
Chez *Chlamydomonas*, nous avons observé que la séparation de ce matériel est spécifique de la gel filtration par une colonne TSK HW75 en DMSO 10% (voir Matériels et Méthodes) (*figure 28*).

Nous avons purifié séparément ces deux populations d'amylopectine par gel filtration HW75 pour les soumettre ensuite à une analyse structurale.

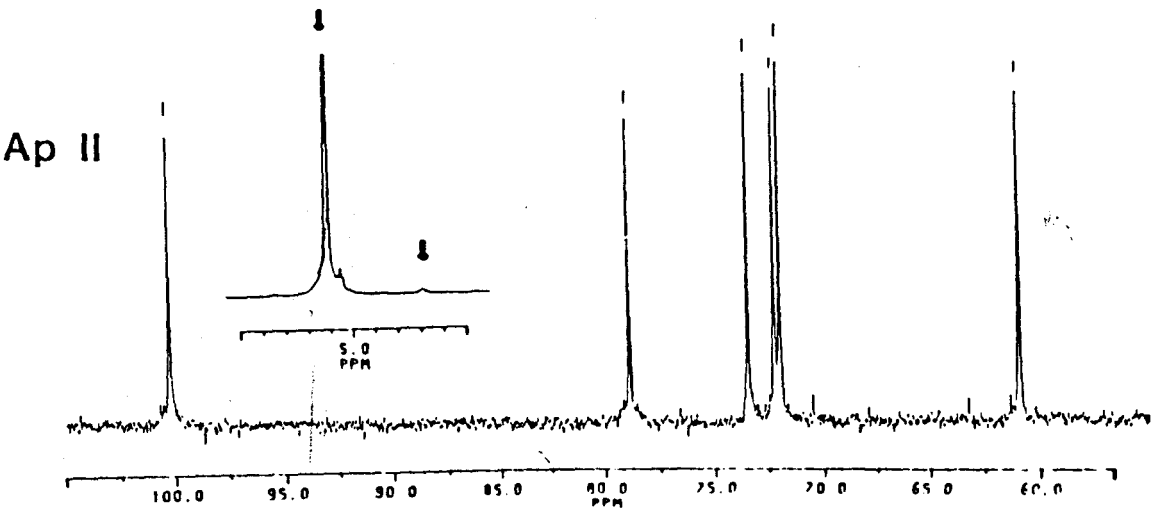


Figures 28: *Séparation des constituants de l'amidon sauvage en chromatographie de gel filtration TSK HW75.*

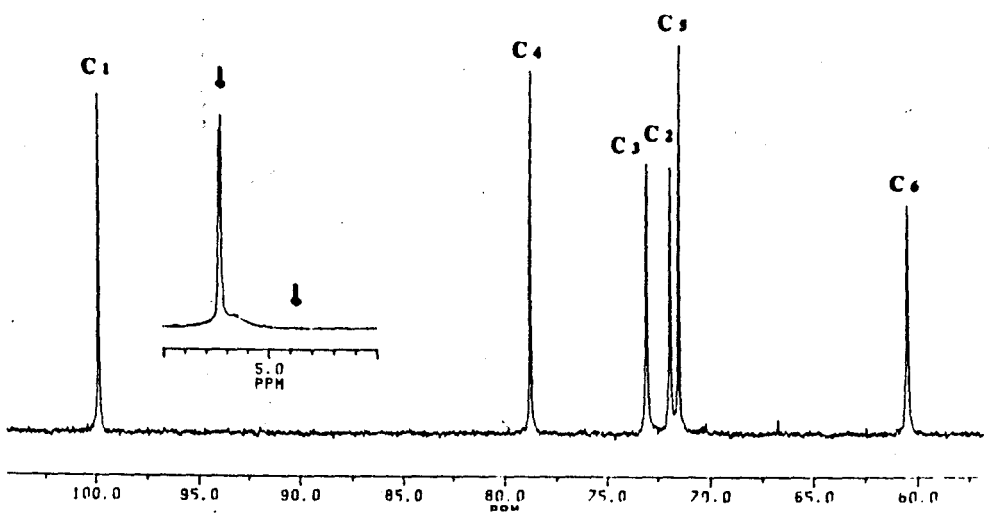
A



B



C



Figures 29: *Analyse par RMN des deux types d'amylopectines purifiées par gel filtration TSK HW75:*

- *spectres du proton et du carbone 13 de l'amylopectine de type I (A),*
- *spectres du proton et du carbone 13 de l'amylopectine de type II (B),*
- *Amylopectine I152 (C).*

L'analyse en RMN du proton et du C^{13} sur les fractions purifiées a été effectuée par JM Wierujeski.

La RMN du C^{13} indique que la structure de l'amylopectine de type II est proche de l'amylopectine précédemment caractérisée des souches défectueuses dans l'amidon synthétase soluble II (Fontaine et D'Hulst, 1993).

Le taux de branchement de l'amylopectine II est de 3,6%, alors qu'il est de 5,8% pour l'amylopectine I, celui de l'amylose est indétectable par la RMN du proton (*figures 29*).

Les différentes sous fractions de l'amidon préalablement purifiées ont été débranchées par l'isoamylase de *Pseudonomas* (voir Matériels et Méthodes).

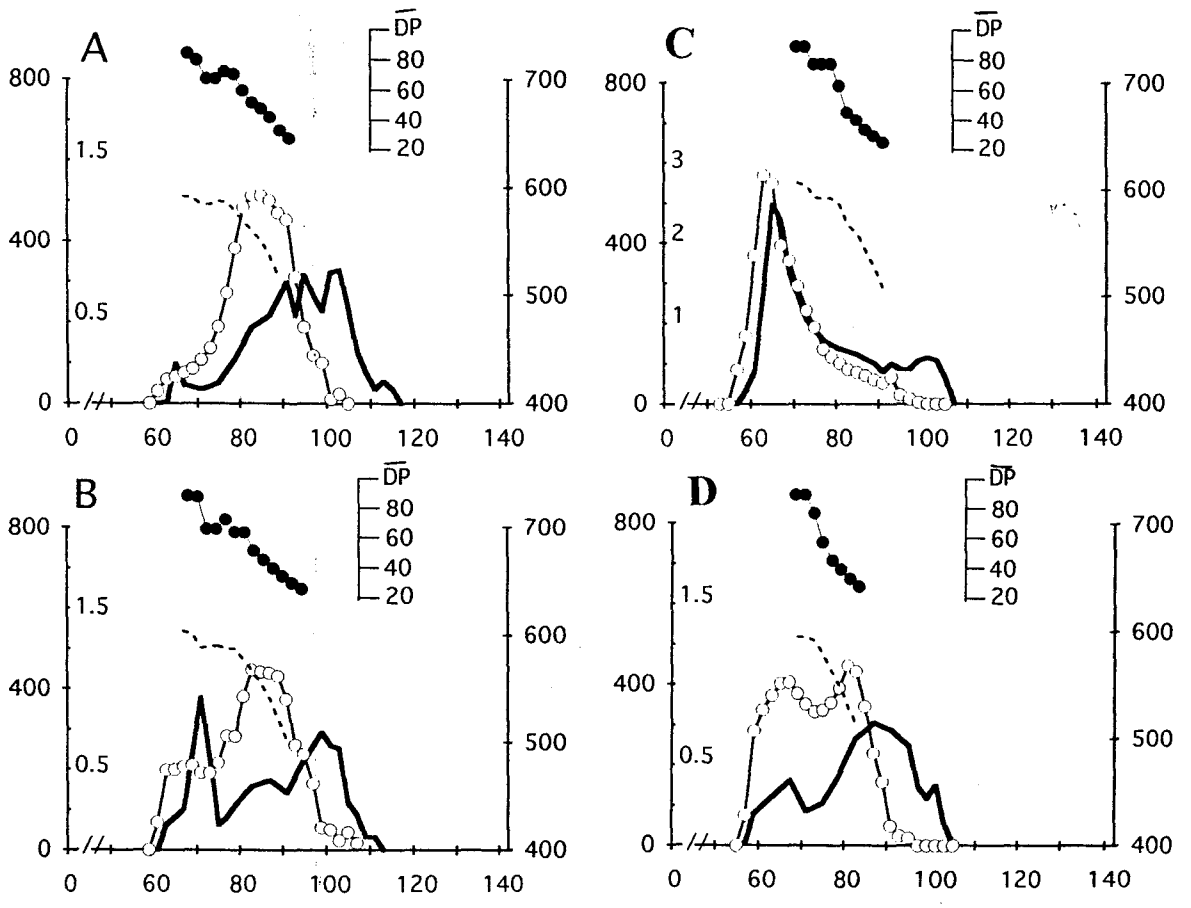
Les produits de débranchement ont été analysés par gel filtration TSK HW50 (*figures 30*).

Le profil obtenu de la séparation des chaînes de l'amylopectine II montre une composition en très longs glucanes de type amylose et en chaînes de longueur intermédiaire (*tableau 21*).

La chromatographie HPAE-PAD de ce matériel débranché relève une abondance en chaînes très courtes (d.p.< 8) par rapport à l'amylopectine de type I ou à l'amylopectine du mutant défectueux dans la GBSS (*figures 31*).

Ces petits glucanes se retrouvent également dans l'amylose et dans l'amylopectine du mutant *sta-3*, déficient dans la SSSII et présentent tous un pic de d.p. 6.

L'amylopectine de type II possède donc des caractéristiques structurales propres qui en font un matériel <u>intermédiaire mais bien distinct</u> de l'amylopectine de type I et de l'amylose.



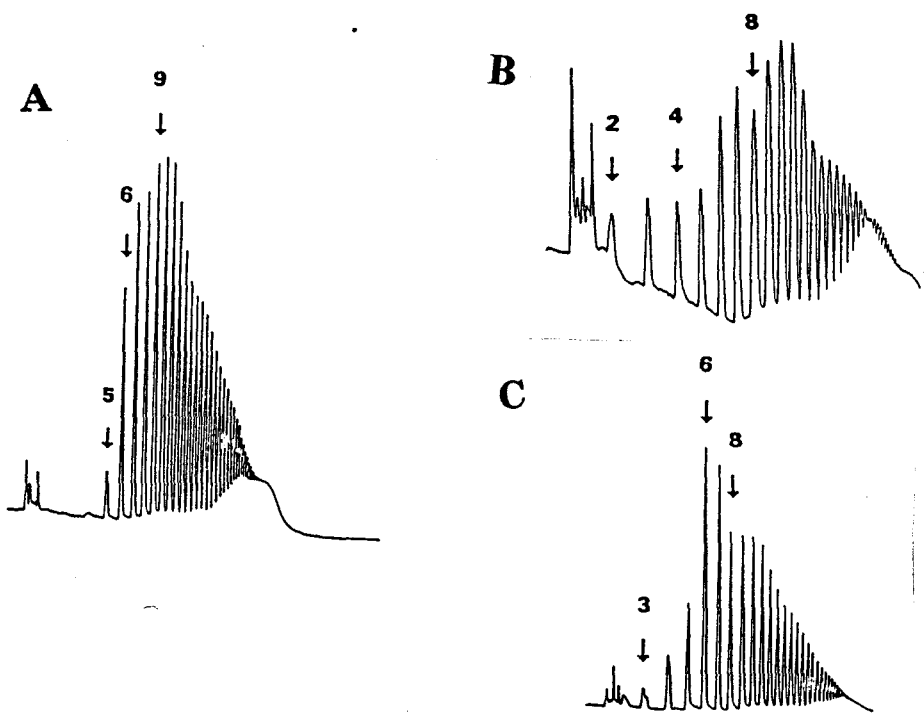
Figures 30: *Profils obtenus par chromatographie de gel filtration TSK HW50 des sous fractions débranchées:*

- *amylopectine de type 1 sauvage (A),*
- *amylopectine de type 2 sauvage (B),*
- *amylose sauvage (C)*
- *amylopectine de la souche 1152 portant la mutation sta-3-1(D),*

d.p.moyen	supérieur à 90	90 à 70	70 à 50	50 à 30	30 à 22	inférieur à 22
137C Ap I	1%	2%	8%	19%	14%	55%
137C ApII	32%	5%	5%	12%	14%	32%
137C Am	53%	12%	3%	12%	4%	16%
I152 Ap	59%	6%	9%	10%	7%	9%

* Ap : amylopectine, Am: amylose

Tableau 21: *Distribution (en pourcentage de glucose) selon leur taille des chaînes débranchées par l'isoamylase des sous fractions purifiées de l'amidon de la souche sauvage 137C et de la souche mutante 1152.*



Figures 31: *Profils obtenus par chromatographie HPAE des chaînes débranchées de courte taille (séparation des chaînes de d.p. 2 à 25);*

- *de l'amylopectine de type 1 sauvage (A),*
- *de l'amylopectine de type 2 sauvage (B),*
- *de l'amylopectine de la souche 1152 portant la mutation st-3-1 (C),*

Les Modèles de Biosynthèse de l'Amylopectine

La disparition de l'amylopectine II dans les mutants *sta-2* coïncide avec l'absence d'amylose or, ces deux fractions sont constituées d'une part importante de longues chaînes.

Dans le mutant I152 de départ, l'amylopectine est essentiellement constituée de longues chaînes. C'est uniquement dans ce contexte qu'une défectuosité dans la GBSS entraîne une chute de la quantité d'amidon associée à l'abaissement de la λ max de l'interaction avec l'iode.

Ces résultats déterminent le rôle de la GBSS dans la synthèse des longues chaînes représentant l'armature de l'amylopectine.
Sur ces longues chaînes sont fixées des grappes formées par le branchement des chaînes courtes et des chaînes de longueur intermédiaire.

Nous en avons déduit deux modèles mutuellement exclusifs schématisant l'élaboration de la molécule d'amylopectine (*figure 32*) :

Le modèle dit "séquentiel" où la présence des longs glucanes est requise pour la synthèse des grappes de branchement. Selon ce modèle l'activité amidon synthétase liée est indispensable à toute la synthèse d'amidon.

Le modèle dit "additif" où la présence des longues chaînes n'intervient pas sur la formation des grappes de l'amylopectine. Dans ce cas, l'absence d'activité amidon synthétase liée entraînerait la formation d'un polysaccharide hyper ramifié.

L'inactivation de la GBSS permettait de définir le modèle en application dans la synthèse de l'amylopectine.

Malgré le nombre de mutants *sta-2* engendrés par notre mutagenèse UV, le plus défectueux présente encore une activité amidon synthétase liée résiduelle pouvant être suffisante à la présence d'amylopectine.

La mutagenèse par interruption génique récemment développée chez *Chlamydomonas* (Tam et Lefevre, 1993) nous sembla être le moyen d'obtenir un mutant totalement dépourvu d'activité amidon synthétase liée.

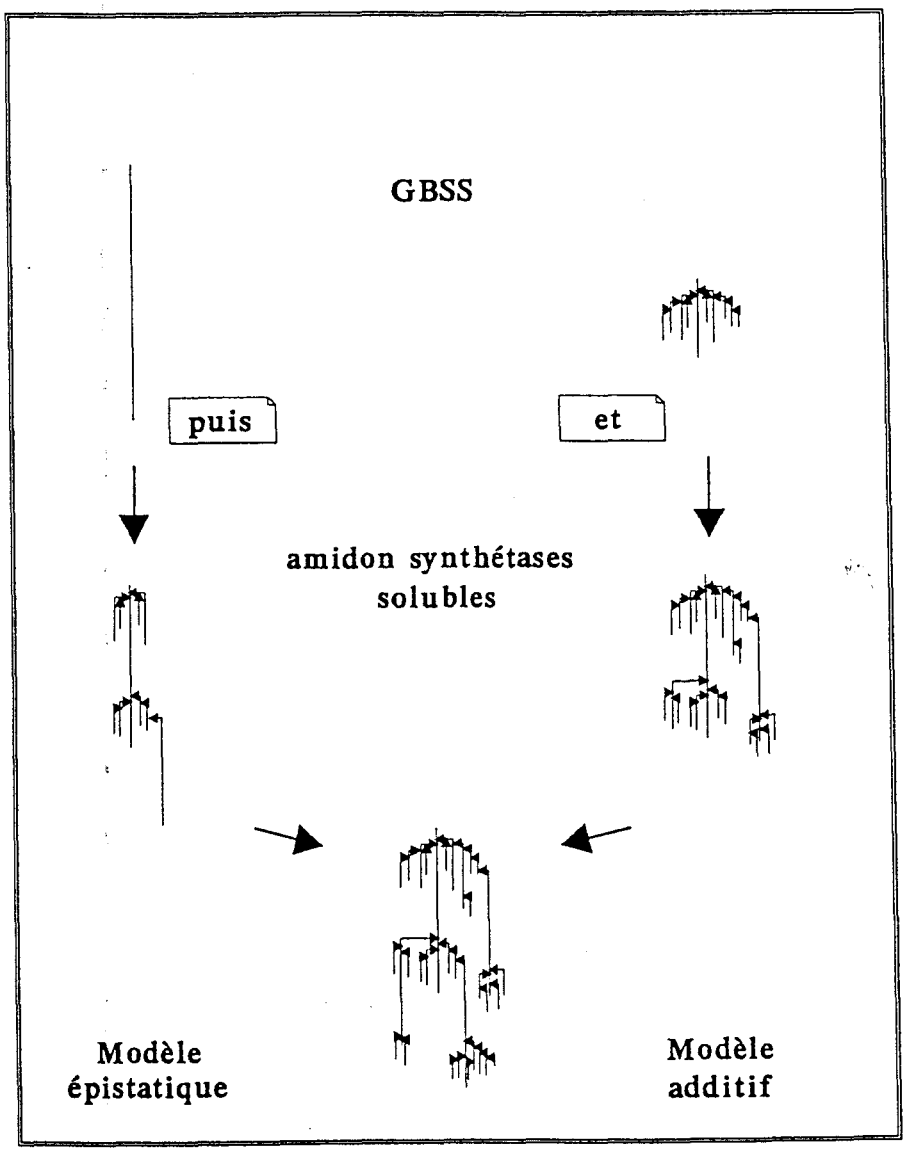


Figure 32: Les modèles mutuellement exclusifs de l'élaboration de la molécule d'amylopectine.

Expériences D'interruption Génique

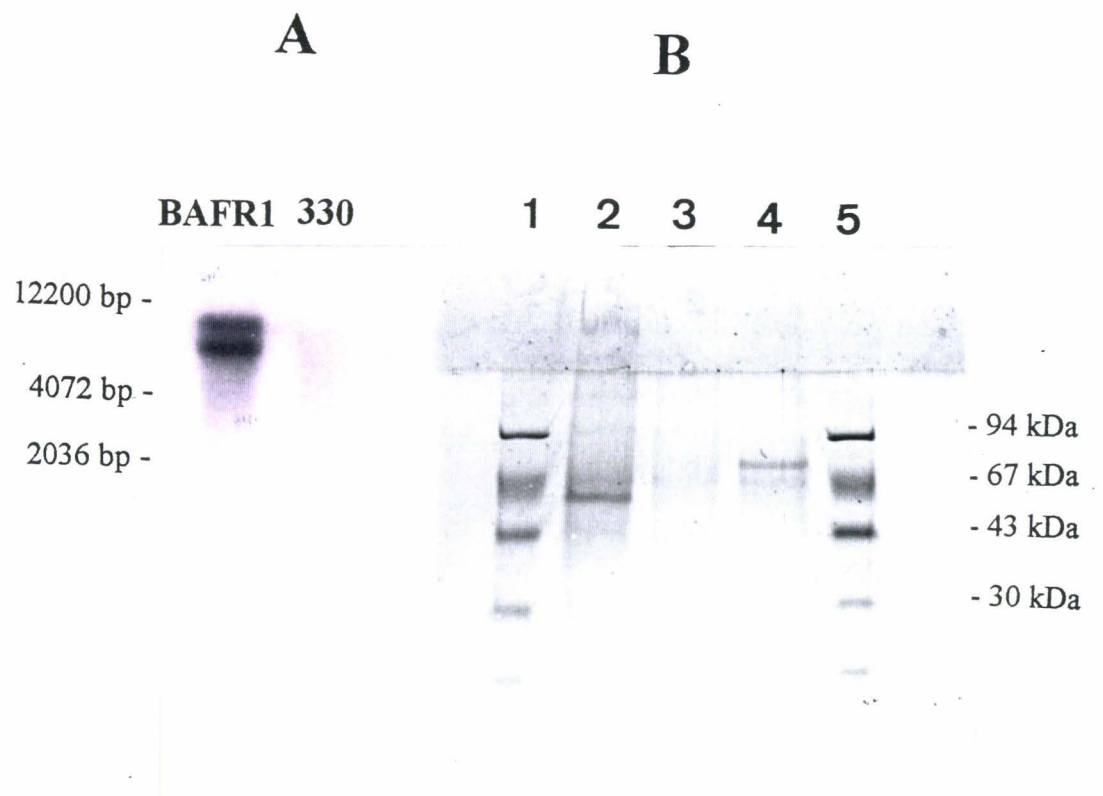
Les transformations précédentes du génome de *Chlamydomonas* ont révélé que les insertions de l'ADN exogène sont multiples (Kindle et coll., 1989, 1990) et s'accompagnent d'énormes délétions (Tan et Lefevre, 1992).
La mise au point de cette mutagenèse et la caractérisation de transformants touchés dans la synthèse de l'amidon sont l'oeuvre et le sujet de thèse de Fabienne Bellanger (1994).

La cotransformation par le plasmide pArg7.8 et PUC18 réalisée par F. Bellanger et B. Delrue a produit 15 mutants affectés dans la synthèse de l'amidon pour 11 000 événements d'intégration indépendants.

Parmi ces transformants sélectionnés, deux souches appelées BAFR1 et BAFR2 présentaient le phénotype rouge caractéristique des mutants *sta-2*. Le test de complémentation avec une souche portant la mutation *sta-2-1* confirma que la souche BAFR1 est touchée dans le gène de structure de la GBSS.

Contrairement à l'ensemble des souches isolées par la voie classique (après mutagenèse UV) l'activité amidon synthétase du mutant BAFR1 est indétectable et associée à la disparition de la protéine majeure du grain d'amidon (*figure 33 a*). L'analyse en southern révéla la présence de fragments correspondant à des intégrations partielles du plasmide pArg7.8 dans l'ADN de la souche BAFR1 (*figure 33b*).

Ces expériences ont conclu à l'absence d'activité amidon synthétase liée dans le transformant BAFR1 portant l'interruption génique *sta-2-Δ1*.



Figures 33:

A: Gel d'électrophorèse SDS des protéines liées au grain extraites de l'amidon de la souche 18B portant la mutation sta-2-1 (ligne 2) de la souche BAFR1 portant l'interruption sta-2-Δ1 (ligne 3) et de l'amidon de la souche sauvage 330 (ligne 4), marqueurs de différente masse moléculaire (lignes 1 et 5).

B: Caractérisation moléculaire de l'interruption sta-2-Δ1.
L'ADN de Chlamydomonas (10 µg) digéré par BamH1 fut hybridé avec un fragment Nru1/Sal1 de 321 pdb couvrant une partie du gène bactérien de résistance à la tétracycline contenu dans le plasmide pARG7.8 lequel est proximal au gène ARG7. BamH1 possède un site de coupure dans le plasmide pARG7.8 utilisé dans nos expériences de mutagenèse.

- *ligne 1: hybridation de l'ADN digéré de la souche BAFR1;*
  ligne 2: hybridation de l'ADN digéré de la souche sauvage 330.

Nous avons entrepris le croisement de la souche BAFR1 portant l'interruption *sta-2-δ1* avec la souche compatible 37E17 portant la mutation *sta-3-1.*

L'analyse de la descendance a été effectuée sur 153 produits de méiose. Les marqueurs Pab, Ac et Nit ont donné une ségrégation correcte (*tableau 22 et figure 34*).

phénotypes marqueurs	Ac +	83/200	42%
	--	117/200	58%
	Pab +	86/200	43%
	--	114/200	57%
	Nit +	73/200	36%
	--	127/200	64%
	Arg +	22/178	12%
	--	178/178	88%
recombinés	Pab/Ac	33/200	16%
coloration de l'amidon	verts	43/178	24,%
	rouges	52/178	29%
	noirs	34/178	19%
	jaunes	49/178	28%

Tableau 22: *Résultats de l'analyse du croisement entre la souche BAFR1 et la souche 37E17 portant la mutation sta-3-1.*

Nous n'avons pas observé de recombinaison entre le caractère Arg+ et les phénotypes rouge et jaune de l'amidon; tous les descendants portant la mutation *sta-2-δ1* sont auxotrophes pour l'arginine.

L'interruption du gène *STA-2* était bien due à l'insertion au locus d'un fragment plasmidique contenant le gène *ARG7* fonctionnel.

De plus, la proportion du phénotype Arg+ dans la descendance signalait au moins une deuxième insertion fonctionnelle du gène *ARG7* (*tableau 22*). Ces insertions ont été visualisées en analyse Southern par les signaux d'hybridation obtenus sur l'ADN extrait de la souche BAFR1 (travaux effectués par F. Bellanger).

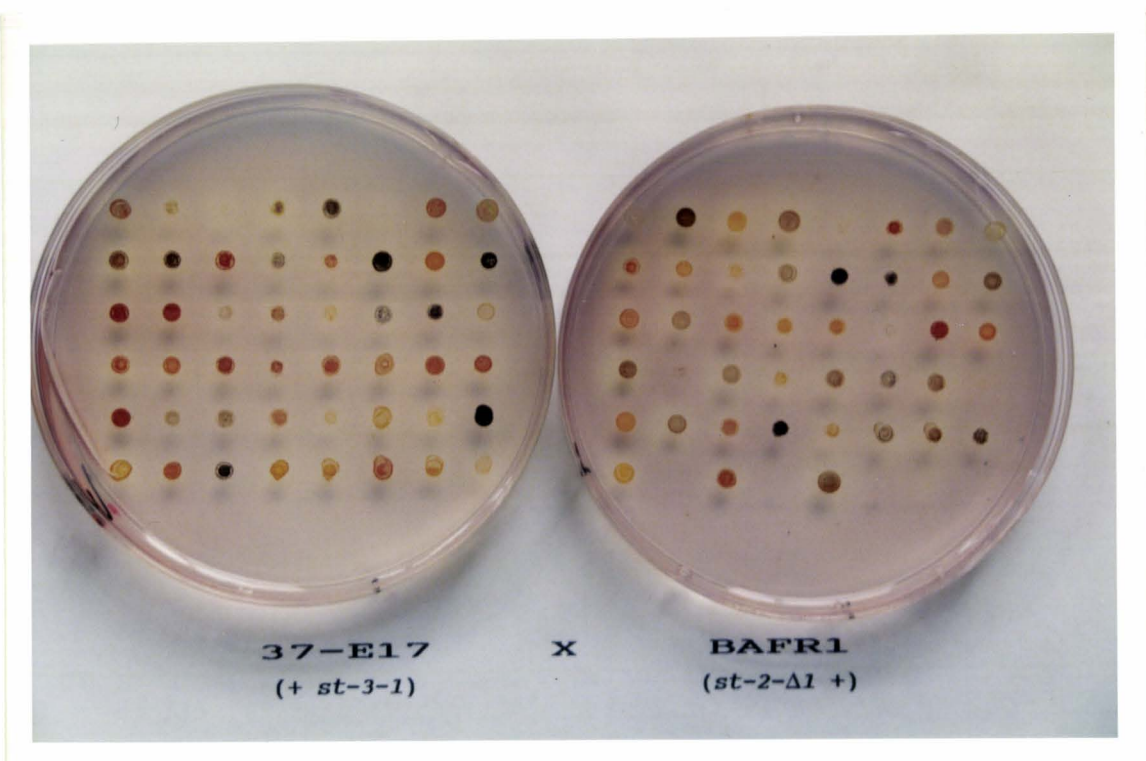


Figure 34: *Coloration à l'iode de descendants issus du croisement de la souche BAFR1 et de la souche mutante 37E17.*

Comme pour les croisements précédents, nous avons effectué une caractérisation biochimique préliminaire de l'amidon des descendants.
La quantité d'amidon et la λ max de l'intéraction-iode ont été moyennés sur 4 recombinants pour les 4 catégories phénotypiques de l'amidon (*tableau 23*).

quantité	**noirs**	**19,1 +/- 5**	**λ max**	**noirs**	**597 +/- 5**
moyenne	**rouges**	**19,1 +/- 0,7**	**moyen de**	**rouges**	**535 +/- 2**
d'amidon	**verts**	**9,5 +/- 2**	**l'interaction**	**verts**	**620 +/- 3**
µg/10^6cellules	**jaunes**	**0,9 +/- 0,2**	**avec l'iode** (nm)	**jaunes**	**515 +/- 5**
par rapport aux sauv ages		**4,7 %**			
par rapport aux mutants *st-3*		**9,1 %**			

Tableau 23: *Détermination de la quantité moyenne d'amidon dans les descendants mutants rapportée à la moyenne obtenue pour les descendants sauvages issus du croisement entre la souche BAJR1 et la souche 37E17. Détermination du λ max moyen du complexe polysaccharide-iode de ces mêmes descendants.*

La présence des mutations *sta-2-Δ 1* et *sta-3-1* dans les recombinants de phénotype jaune provoque une diminution de plus de 95% de l'amidon.

La λ max de l'intéraction-iode du polysaccharide résiduel atteint des valeurs extrêmement basses (*tableau 23*). Ces valeurs sont intermédiaires entre celles qui caractérisent le glycogène et les amylopectines les plus ramifiées rapportées dans la littérature.

Les recombinants ne portant que l'interruption *sta-2-δ1* présentent une quantité d'amidon normale. Toutefois, la λ max de l'intéraction polysaccharide-iode est légèrement plus faible que celle des mutants porteurs d'allèles *sta-2* précédemment caractérisés.

La distribution des poids moléculaires de cet amidon analysé par chromatographie de gel filtration est similaire à celle des mutants *sta-2* possédant encore une activité GBSS résiduelle (*figure 35*).

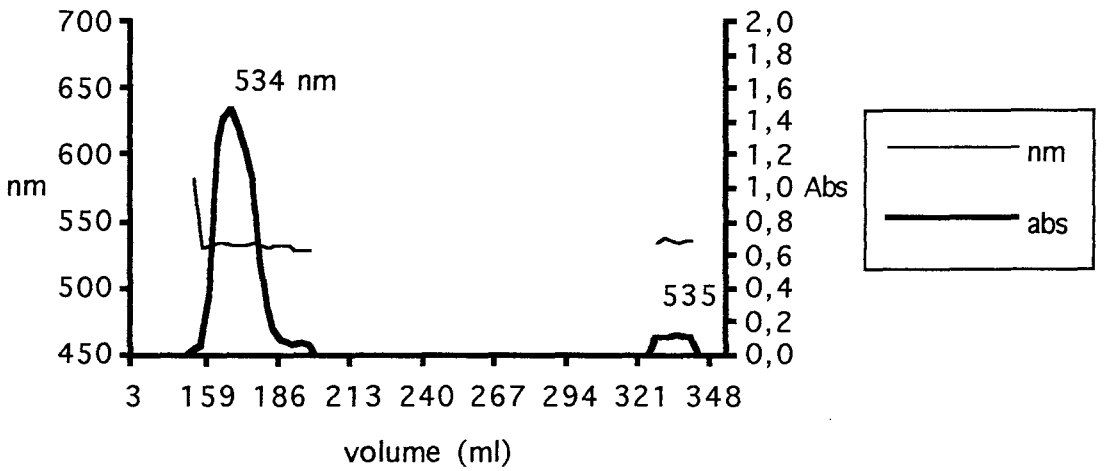


Figure 35: *Profil obtenu par chromatographie de gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche BAFR1 portant l'interruption sta-2-Δ 1.*

En conclusion, la synthèse de l'amylopectine de type II et de l'amylose nécessitent la présence des longs glucanes produits par la GBSS. Mais l'absence de cette activité permet toujours la synthèse d'un polysaccharide de type amylopectine en quantité normale.

L'hypothèse du modèle séquentiel, telle que nous l'avons formulée peut donc être rejetée.

La synthèse des sous populations de l'amidon résulterait de l'addition, voire de la compétition entre les amidon synthétases pour les amorces produites par les enzymes de branchement.

L'absence d'activité amidon synthétase liée ajoutée à une défectuosité de la SSS II conduit à une quasi-disparition de polysaccharide.

Ainsi, la synthèse du polysaccharide présent dans la souche mutante *sta-3*, soit 40 à 50% de l'amidon, est sous le contrôle de la GBSS.

Détermination De La Structure D'un Nouveau Polysaccharide Sous Le Contrôle De La SSS I

Le polysaccharide granulaire de la souche IJ2 portant les mutations *sta-2-Δ1* et *sta-3-1* représente moins de 5% de la quantité d'amidon de la souche sauvage (*tableau 18*).

Les activités GBSS et SSSII étant indétectables dans ce double mutant, la synthèse de ce polysaccharide résiduel doit être attribuée à l'activité amidon synthétase soluble I (SSSI). Nous avons entrepris d'accumuler les infimes quantités de ce matériel afin de déterminer sa structure.

La nature de ce polysaccharide analysée par gel filtration HW75 est de type amylopectine (*figure 36*). Comme observé dans les doubles mutants précédents, l'épistasie de la mutation *sta-2* entraîne la disparition de l'amylopectine II et de l'amylose.

Toutefois, l'élution de ce polysaccharide s'étale sur un grand nombre de fractions traduisant une hétérogénéité de masse moléculaire. De plus, la λ max de l'interaction-iode ne semble plus caractéristique d'une amylopectine (520 nm au lieu de 555 nm pour l'amylopectine I de la souche sauvage).

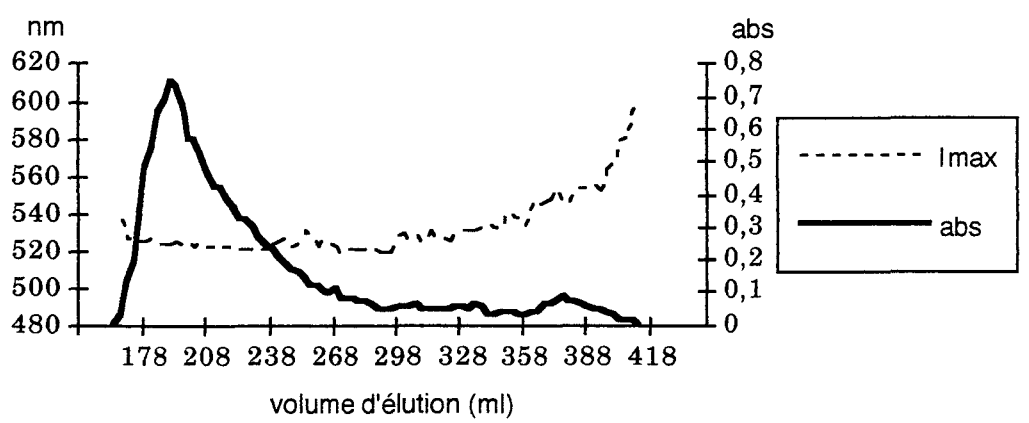
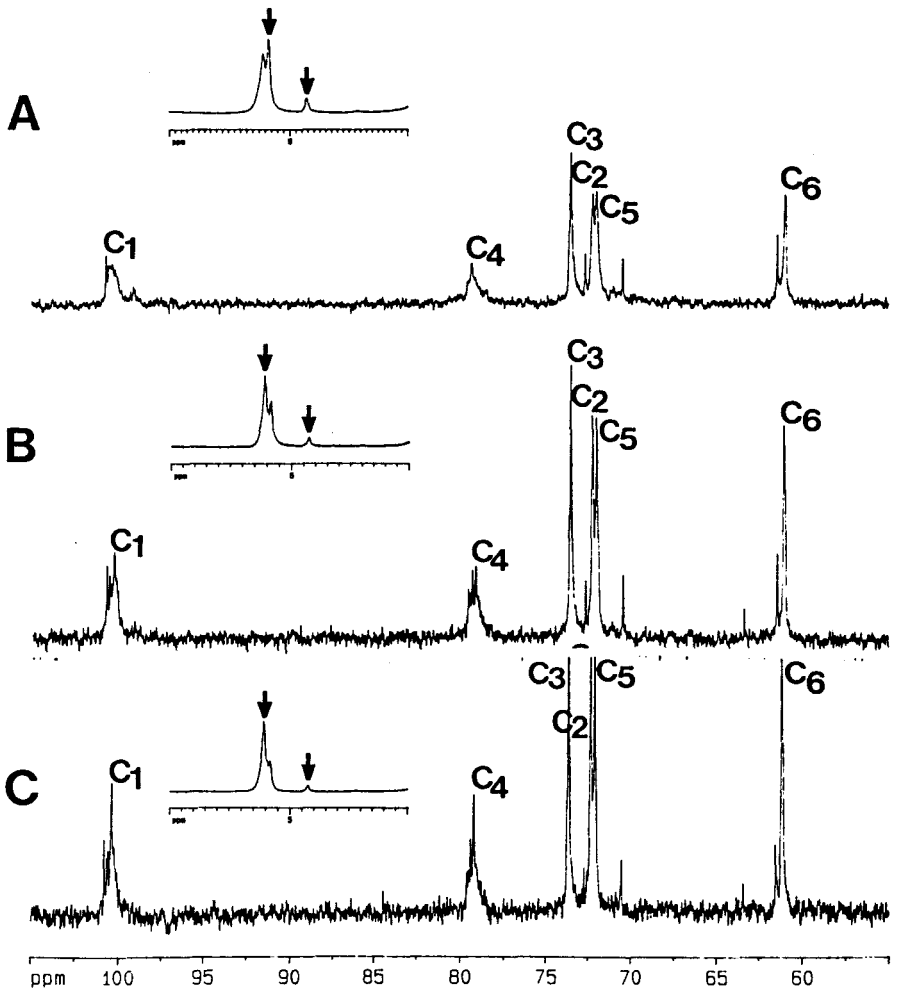


Figure 36: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche IJ2 portant les mutations sta-2-Δ1 et sta-3-1.



Figures 37: *Spectres RMN de l'amidon de la souche BAFR1(C) et du double mutant 1J2 (B) purifiés par gel filtration TSK HW75 et du glycogène de foie de lapin (A). La résonance en C^{13} de tous carbones des glucoses (numérotés de 1 à 6). La résonance du proton H^1 figurée dans l'encart permet d'estimer le taux de branchement (indiqué par les flèches).*

Les spectres RMN du C^{13} et du proton ont été réalisés par JM Wierujeski.

Les fractions purifiées par gel filtration montrent une structure hyperbranchée, intermédiaire entre celle de l'amylopectine du mutant *sta-2-δ1* et le glycogène (*figure 37*).

Le polysaccharide du double mutant IJ2 possède un taux de branchement de 9,3% alors qu'il est de 9,7% pour le glycogène et de 6,1% pour l'amylopectine du mutant BAFR1. Les mêmes rapports entre les niveaux de branchement ont été observés par l'analyse de méthylation effectuée par T. Fontaine (*tableau 24*).

Polysaccharide	λ max du complexe-iode	2,3-Glc	2,3,6-Glc	2,3,4,6-Glc	branchement
BAFR1 amylopectine	535 nm	1	16	0,9	**1/18**
IJ2 amylopectine	520 nm	1	12,6	0,83	**1/14**
Glycogène	485 nm	1	9,1	0,55	**1/10**

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

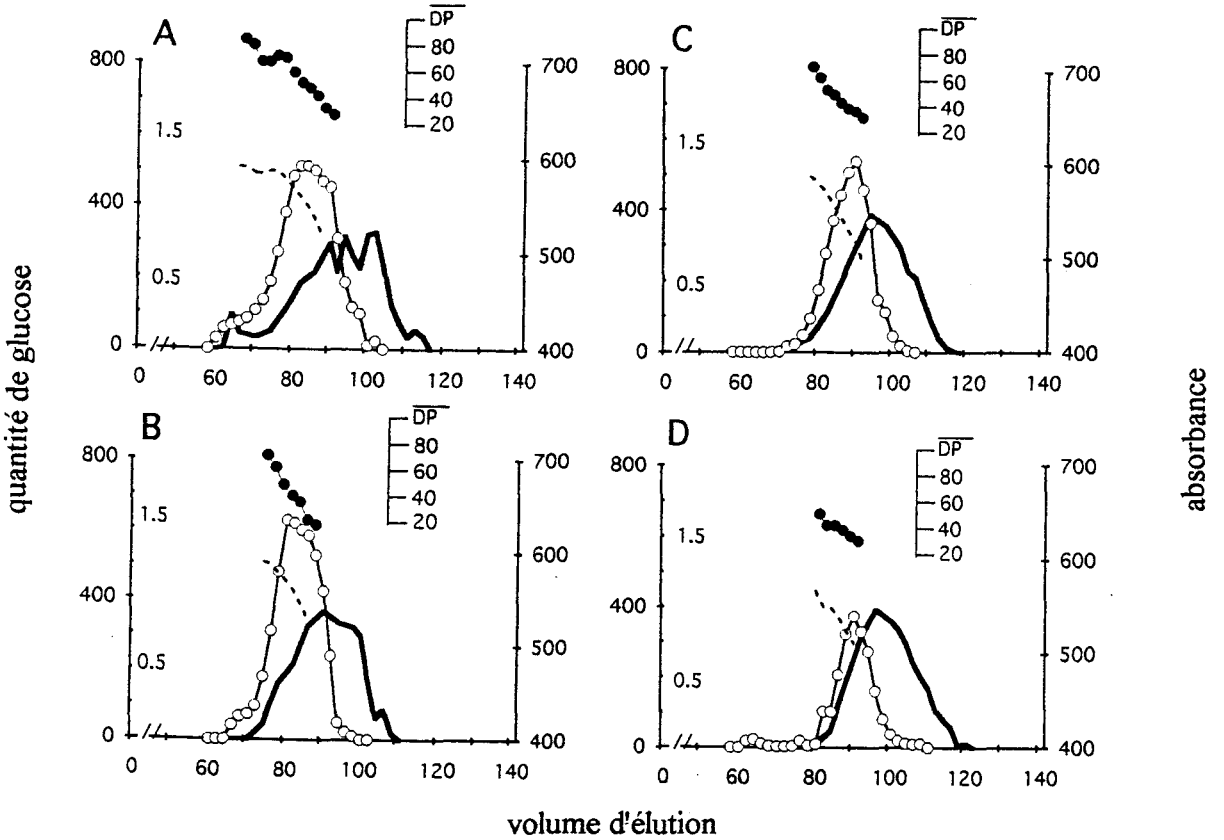
2,3,6-Glc: 2,3,6 tri-O-méthyl 1,4,5 tri-O-acétyl glucitol

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

Tableau 24: *Rapports molaires des éthers méthyliques obtenus après méthylation de l'amidon de la souche BAFR1 et du double mutant IJ2 purifiés par gel filtration TSK HW75 et du glycogène de foie de lapin.*

Les expériences de débranchement par l'isoamylase ont été menées sur les amidons purifiés par gel filtration des mutants IJ2 et BAFR1 ainsi que sur l'amylopectine I sauvage et le glycogène de foie de lapin.

Le profil obtenu par chromatographie HW50 de l'amidon débranché du double mutant IJ2 est intermédiaire entre les profils obtenus après débranchement de l'amylopectine du mutant BAFR1 et du glycogène (*figure 38*).



Figures 38: *Profils obtenus par chromatographie de gel filtration TSK HW50 des polysaccharides débranchés purifiés par gel filtration de l'amylopectine de type I sauvage (A), de l'amidon des souches mutantes BAFR1(B) et IJ2 (C) et du glycogène de foie de lapin (D).*

d.p.moyen	supérieur à 90	90 à 70	70 à 50	50 à 30	30 à 22	inférieur à 22
137C Ap I	1%	2%	8%	19%	14%	55%
BAFR1 Ap (*sta-2-Δ1*)	0%	3%	4%	22%	17%	54%
IJ2 Ap (*sta-2-Δ1,sta-3-1*)	0%	0%	3%	18%	16%	72%
glycogène	0%	0%	0%	11%	7%	82%

Tableau 25: *Distribution (en pourcentage de glucose) selon leur taille des chaînes débranchées par l'isoamylase des fractions purifiées de l'amylopectine I (ApI) de la souche sauvage 137C et de l'amidon des souches mutantes BAFR1 et IJ2 et du glycogène de foie de lapin.*

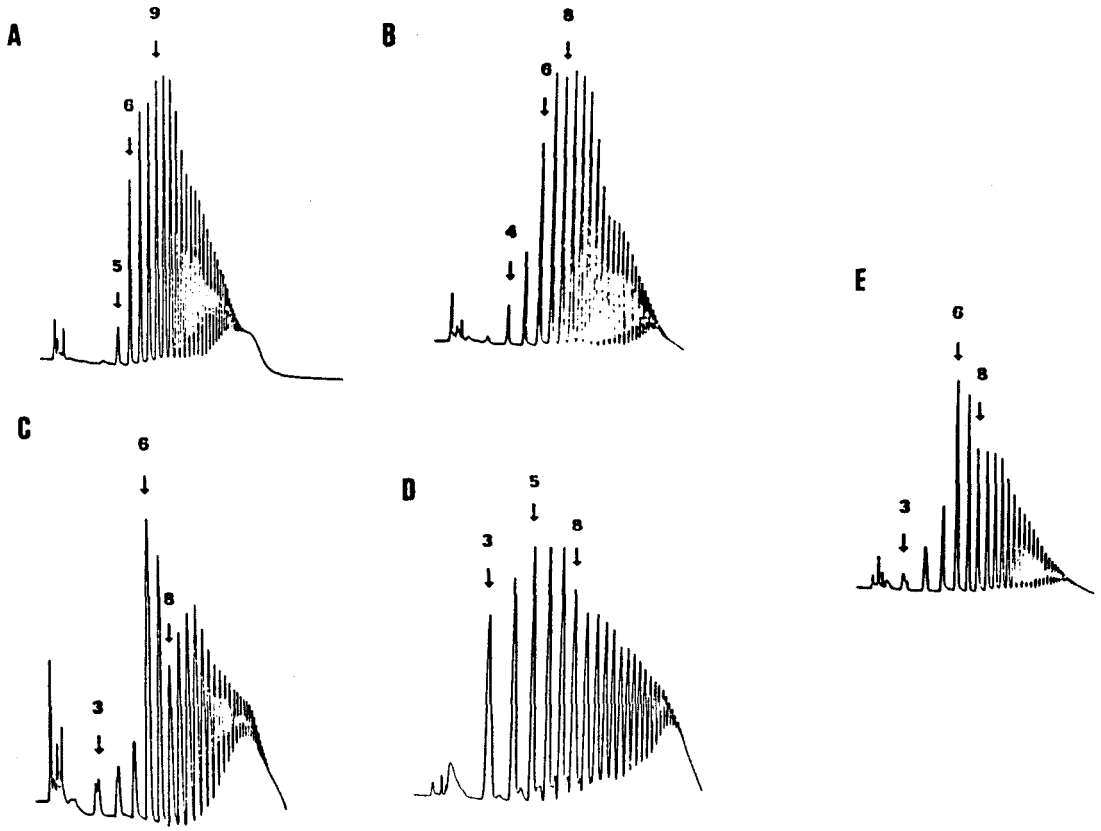


Figure 39: Profils obtenus par chromatographie HPAE des chaînes débranchées de courte taille (séparation des chaînes de d.p. 2 à 25);
- Amylopectine de type ? sauvage (A), Amylopectine de la souche ?152,(E)
- amidon de la souche BAFR1(B), amidon de la souche ?J2 (C),
- glycogène de foie de lapin (D).

La répartition des chaînes constituant ce polysaccharide se rapproche fortement de celle du glycogène, essentiellement constitué de courtes chaînes (*tableau 25*).

Ces courtes chaînes de l'amidon du double mutant visualisées par chromatographie haute performance présentent une distribution similaire à celle observée pour l'amylopectine du simple mutant *sta-3-1* avec un pic de d.p. 6 (*figure 25*).

Nous avons voulu savoir si ce matériel de masse moléculaire élevée mais en quantité infime dans la souche IJ2 pouvait encore former des grains *in vivo*.

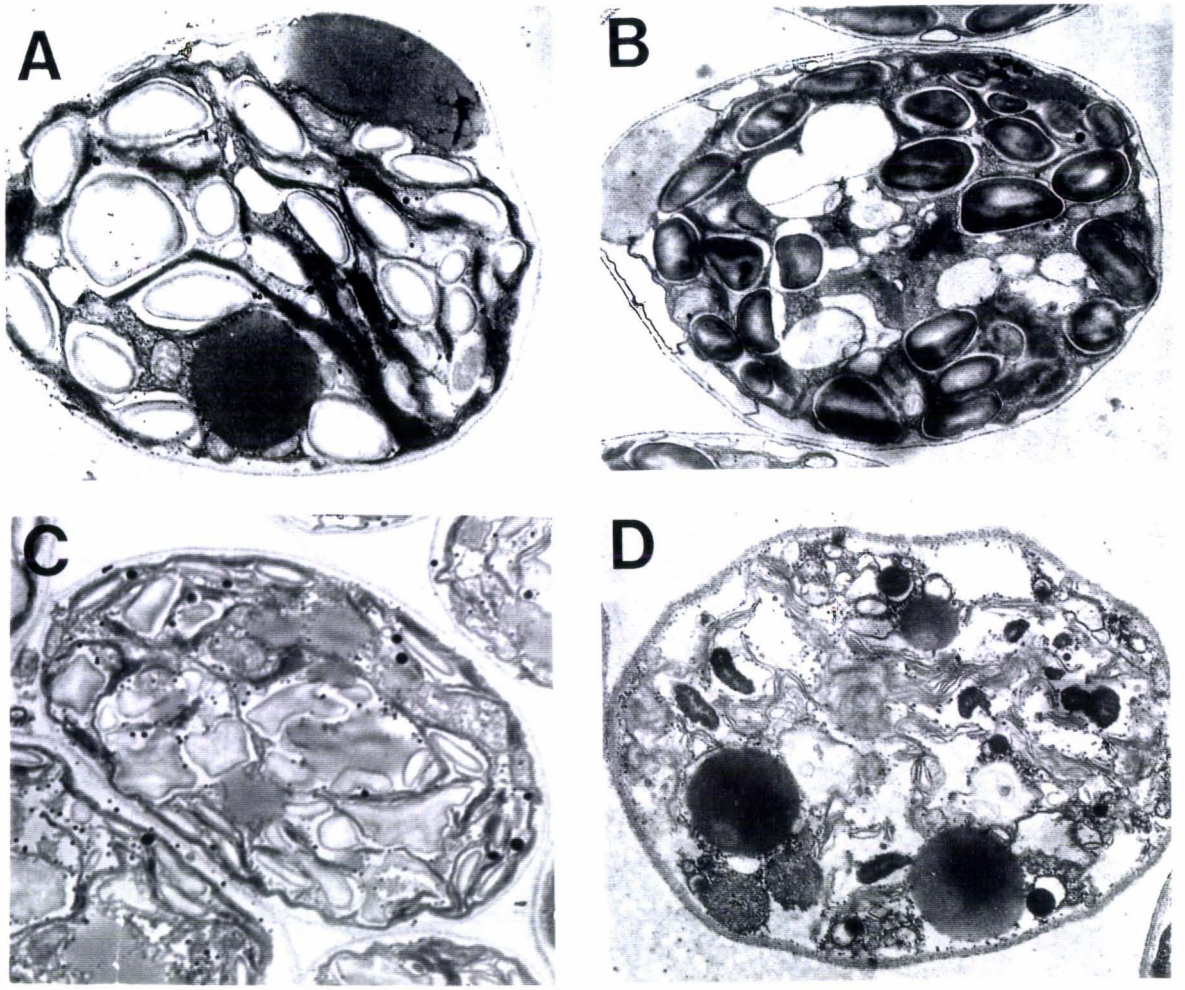
Les micrographies électroniques des cellules carencées en azote montrent des grains d'amidon normaux dans la souche IR16 portant l'interruption *sta-2-δ1*, dont l'activité GBSS est indétectable (*figure 40b*). Les grains d'amidon de la souche IV33 portant la mutation *sta-3-1,* déficiente dans l'activité SSSII sont de forme moins régulière (*figure 40c*).
Le double mutant IJ2 contient de nombreux petits grains d'amidon de taille et de forme variables (*figure 40d*).

En dépit de l'hétérogénéité de masse moléculaire observée en chromatographie de gel filtration, le polysaccharide résiduel du double mutant IJ2 conserve une structure granulaire.

Les purifications partielles des enzymes solubles ont montré que seule l'activité SSSII est altérée dans la souche mutante I152 (Fontaine et D'Hulst, 1993).
La mutation *sta-3-1*, présente dans le mutant I152 et dans le double mutant IJ2, ne modifie pas les propriétés des enzymes branchement.

L'activité amidon synthétase soluble I du double mutant IJ2 visualisée en zymogramme ne semble pas non plus modifiée par rapport aux souches simples mutantes I152 ou à la souche sauvage (*figure 41*).
Comme pour toutes les souches portant une mutation *sta-3*, aucune activité amidon synthétase soluble II n'est détectée.

La synthèse de ce polysaccharide granulaire hyperbranché présent dans le double mutant IJ2 ne peut s'expliquer ni par une modification des activités de branchement, ni par une activité anormale de la SSSI.



Figures 40: Microscopie électronique des cellules en carence en azote de la souche sauvage et des souches mutantes (micrographies au grossissement x11000); L'allure typique des grains d'amidon est observée sur les coupes de cellules de la souche sauvage PN24 (A) et de la souche PR16 (B) portant l'interruption sta-2δ 1, souche PU33 (C) portant la mutation sta-3-1 et le double mutant 992 (D) portant les mutations sta-2δ 1 et sta-3-1.

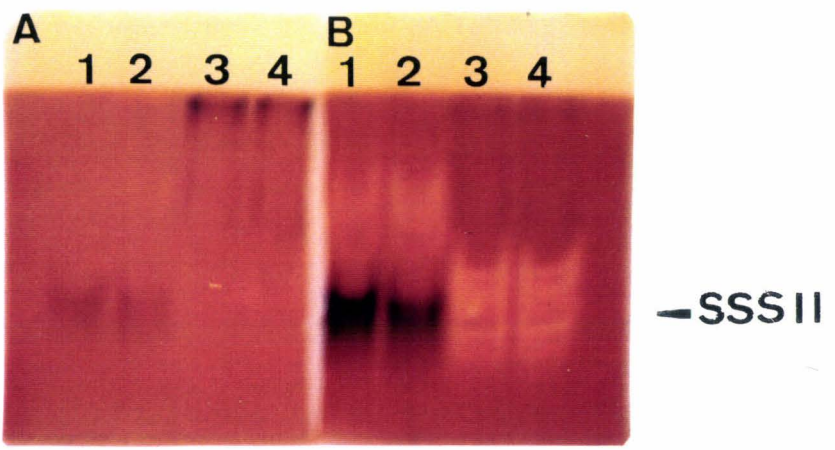


Figure 41: Zymogramme d'activité soluble réalisé en présence (A) et en absence de citrate (B) de la souche sauvage (puits 1 et 2) et de la souche mutante 992 (puits 3 et 4).

Analyse Structurale Du WSP Présent Dans Le Double Mutant IJ2

Ce matériel granulaire n'est cependant pas la forme principalement accumulée chez le double mutant *sta-2-δ1*, *sta-3-1*.

En effet, la quantité de polysaccharide soluble ou WSP (Water Soluble Polysaccharide) dans cette souche devient prédominante et représente deux à trois fois la quantité de matériel granulaire.

Ce polysaccharide soluble détecté uniquement dans les simples et doubles mutants *sta-3-1* a été analysé en chromatographie de gel filtration HW50.

Le profil d'élution indique qu'il est de faible masse moléculaire et plus de 50% en poids de ce matériel ne peut se complexer avec l'iode (*figure 42*).

L'analyse du WSP en gel filtration suggère une structure formée uniquement de courtes voire de très courtes chaînes de glucose (d.p. 5 à 20).

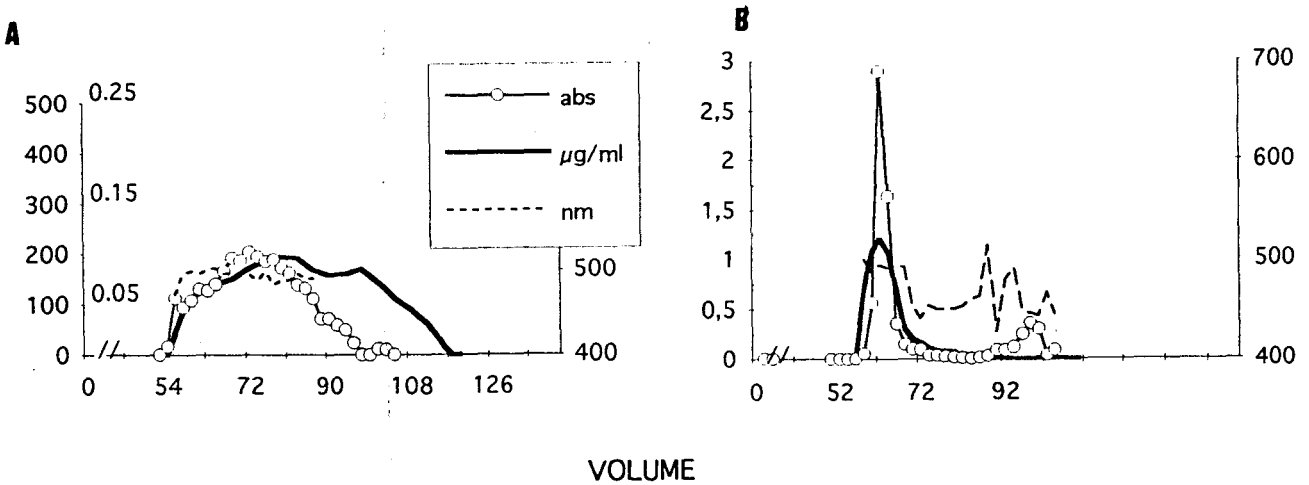


Figure 42: Profils obtenus par chromatographie de gel filtration TSK HW50 du polysaccharide soluble du double mutant IJ2 (A) et du glycogène (B).

Nous avons ensuite testé la sensibilité de ce WSP purifié, en comparaison avec celle du glycogène à différentes enzymes de dégradation.
Les deux polysaccharides sont totalement digérés par l'amyloglucosidase. Les α et β amylases ont peu d'effet sur le WSP alors qu'elles digèrent significativement le glycogène (*tableau 26 et figure 43*).
Cette sensibilité sélective du polysaccharide soluble aux enzymes de dégradation traduit qu'il est principalement constitué de dextrines branchées.

Nous rappelons que la présence de ce polysaccharide soluble est liée à la défectuosité de la SSSII dans les souches portant la mutation *sta-3-1*.
L'inactivation d'une deuxième amidon synthétase dans le double mutant IJ2 (la mutation *sta-2-δ1* provoquant l'absence d'activité GBSS) augmente la quantité de WSP de 0,6 à 1,7 µg / 10^6 cellules.

Nous rappelons également que ce polysaccharide n'est détecté ni chez la souche sauvage, ni chez les mutants testés autres que les souches portant la mutation *sta-3-1* (voir page). Les mutations *sta-3-2* et *sta-3-3* ne conduisent pas non plus à la formation de ce matériel.
La spécificité d'allèle liée à la présence de ce WSP est un des phénomènes le plus étonnant qu'il soit donné d'observé chez ces mutants.
Il serait tentant de rapprocher l'accumulation de ce polysaccharide de l'existence d'une interaction spécifique entre une enzyme de ramification et le produit du gène *sta-3* (voir Discussion).

Le WSP purifié du double mutant IJ2 est essentiellement constitué de dextrines branchées indiquant que ce polysaccharide est plus la conséquence d'un manque d'activité amidon synthétase dans les simples et doubles mutants qu'un produit de l'activité SSSI.
Nous supposons que la présence de ce polysaccharide soluble provient d'une lésion particulière de la SSSII dans les souches portant la mutation *sta-3-1*.

Polysaccharide	dosage à l'amyloglucosidase (mg/ml)	dosage des sucres réduct eurs au DNS D.O. à 540 nm (mg /ml) avant digestion	aprés digestion de l' α-amylase	la β-amylase
Glycogène	2,5	0	0,875 (2,2)	0,592 (1,4)
mélange glycogène WSP IJ2	1,25 1,25	0,189 (1,6)	0,642 (1,6)	0,447 (1,1)
WSP IJ2	2,5	0,414 (1)	0,388 (1)	0,368 (0,9)

Tableau 26: *Sensibilité du polysaccharide soluble purifié par gel filtration du double mutant IJ2 et du glycogène de foie de lapin à différentes enzymes de dégradation.*

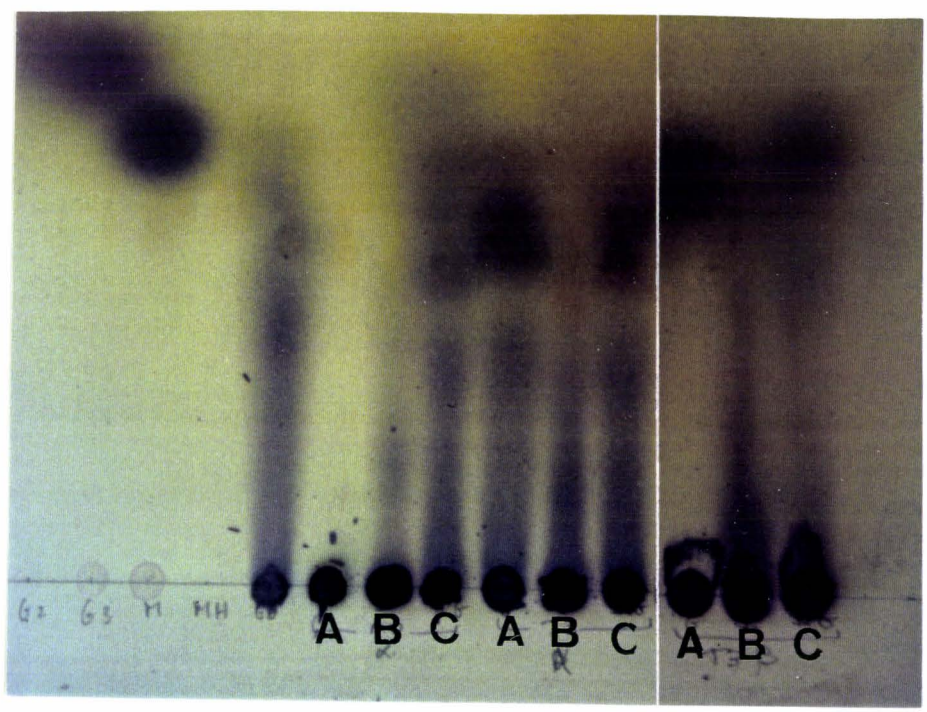


Figure 43: *Chromatographie couche mince en gel de silice des produits de digestion par l'α-amylase (1) et la β-amylase (2) du polysaccharide soluble du mutant IJ2 (C) et du glycogène de foie de lapin (A).*

Conclusions

Chez *Chlamydomonas*, Delrue et coll. (1992) ont établi que la synthèse de l'amylose dépend de l'activité GBSS.
La SSSII quant à elle fut montré responsable du maintient des glucanes de taille intermédiaires de l'amylopectine pouvant correspondre aux chaînes B3, B4 et B5 du modèle d'Hizukuri (Fontaine et D'Hulst, 1993).

Selon ce modèle, les courtes chaînes ou chaînes A sont externes et liées par leur extrémité réductrice aux chaînes B pour former les grappes de l'amylopectine (*figure 44*) . Les chaînes B et la chaîne C sont plus longues, internes et supportent plusieurs liaisons α-1,6.
Chez *Chlamydomonas*, nous nous rapportons à la nomenclature des chaînes détaillée dans le modèle de Hizukuri bien qu'aucune étude localisant les chaînes externes ou internes de l'amylopectine n'ai été réalisée.

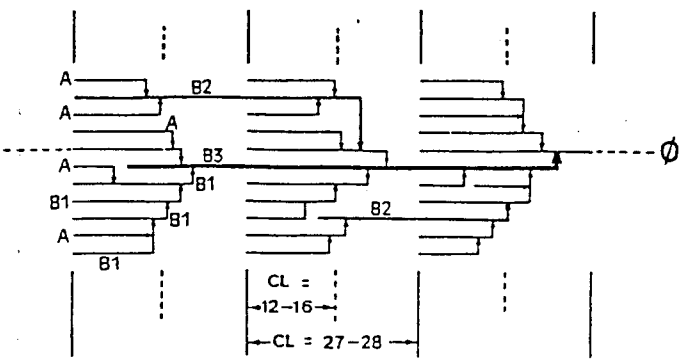


Figure 44: La nomenclature des chaînes de l'amylopectine selon le modèle de Hizukuri.

Nos résultats établissent que chaque amidon synthétase produit spécifiquement des glucanes dont la distribution en taille est bien définie et n'est que partiellement redondante.

Nous avons montré que la GBSS synthétise les longs glucanes de l'amylopectine assimilables en taille aux chaînes C et B5 du modèle d'Hizukuri.

La SSSI, seule activité amidon synthétase décelable dans le double mutant IJ2, serait spécialisée dans l'élaboration de chaînes très courtes correspondantes aux chaînes A définies par Hizukuri.

Cette enzyme est peu efficace en milieu limité en azote et jusqu'à présent, aucun mutant défectueux pour cette activité n'a été isolé.

Dans ces conditions de culture, la quantité de polysaccharide produit par la SSSI seule semble négligeable par rapport à la quantité produite par la GBSS et la SSSII.

Nous avons montré que l'absence des longs glucanes produits par la GBSS ou l'absence des glucanes de longueur intermédiaire produits par la SSSII, n'empêche pas la synthèse d'amylopectine.

L'intervention de la GBSS et de la SSSII dans l'élaboration de l'amylopectine s'effectue selon un modèle dit "additif". Ces deux amidon synthétases agissent de façon concomitante et indépendante dans la production des deux catégories d'amylopectines présentes chez la souche sauvage.

Ces deux types d'amylopectines sauvages ne sont pas sans rappeler les deux catégories d'amylopectines trouvées dans les souches mutantes.

La mutation *sta-2-Δ1* conduisant à l'absence d'activité GBSS engendre une amylopectine mutante dont les caractéristiques structurales sont analogues à l'amylopectine I sauvage.

De la mutation *sta-3-1* responsable d'une défectuosité dans la SSSII, il résulte une amylopectine mutante dont la structure décrite par Fontaine et D'Hulst (1994) est similaire à celle que nous avons détaillée pour l'amylopectine II.

Toutefois des différences importantes subsistent entre ces amylopectines mutantes et les amylopectine de type I et II sauvages.
Notamment, l'amylopectine du mutant *sta-2-δ1* est légèrement plus ramifiée que l'amylopectine I sauvage. L'amylopectine du mutant *sta-3-1* est constituée de glucanes dont la distribution en taille est différente de celle des glucanes de l'amylopectine II sauvage.
Ces différences relèvent de la participation de la GBSS et de la SSSII dans l'élaboration des deux catégories d'amylopectines sauvages.

Comment s'organise la synthèse de ces deux types d'amylopectines chez la souche sauvage?
Il est toujours possible de considérer l'amylopectine II comme un intermédiaire de synthèse et non comme un produit fini, ou comme le résultat d'une inclusion de longues chaînes dans l'amylopectine I.

Mais il est maintenant évident, que les 3 amidon synthétases sont impliquées dans la synthèse de l'amylopectine.
Le fait qu'aucune différence entre les amyloses mutantes et l'amylose sauvage n'ai été relevée indique que les amidon synthétases solubles n'interviennent pas dans la production de l'amylose.

Discussion

Les perspectives ouvertes par notre travail sont multiples, nous avons choisi d'analyser dans la discussion, l'implication de la GBSS dans la synthèse de l'amylopectine d'une part, l'origine de la fraction amylosique d'autre part et enfin la relation privilégiée susceptible d'exister entre certaines enzymes d'élongation et les enzymes de branchement.

La GBSS Est Une Enzyme Intervenant dans La Biosynthèse De L'amylopectine

La cristallinité du grain d'amidon a été associée à la présence de l'amylopectine (Montgomery et coll., 1958, Meyer, 1942, Yamaguchi, 1979, Hizukuri, 1985).

La microscopie électronique du grain d'amidon distingue une succession concentrique de cercles de croissance amorphes et semi-cristallins.

A l'intérieur d'un cercle de croissance semi-cristallin, l'amylopectine montre une alternance de lamelles amorphes et cristallines (*figure 45*).

La structure en grappe communément admise pour l'amylopectine implique que les courtes chaînes externes sont fixées sur des chaînes internes plus longues (Imberty et coll., 1991). Ces courtes chaînes s'associent en double hélices parallèles, et sont responsables de la cristallinité des grappes. Les régions organisées en doubles hélices correspondent aux lamelles cristallines et les points de branchement sont situés dans les lamelles amorphes des grappes de l'amylopectine.

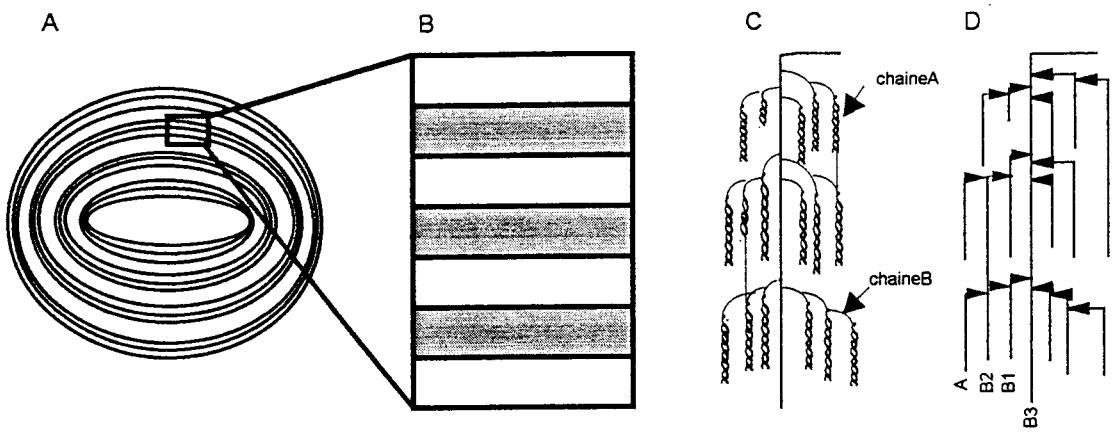


Figure 45: *Représentation schématique de l'arrangement des molécules d'amylopectine à l'intérieur d'un cercle de croissance semi-cristallin.*

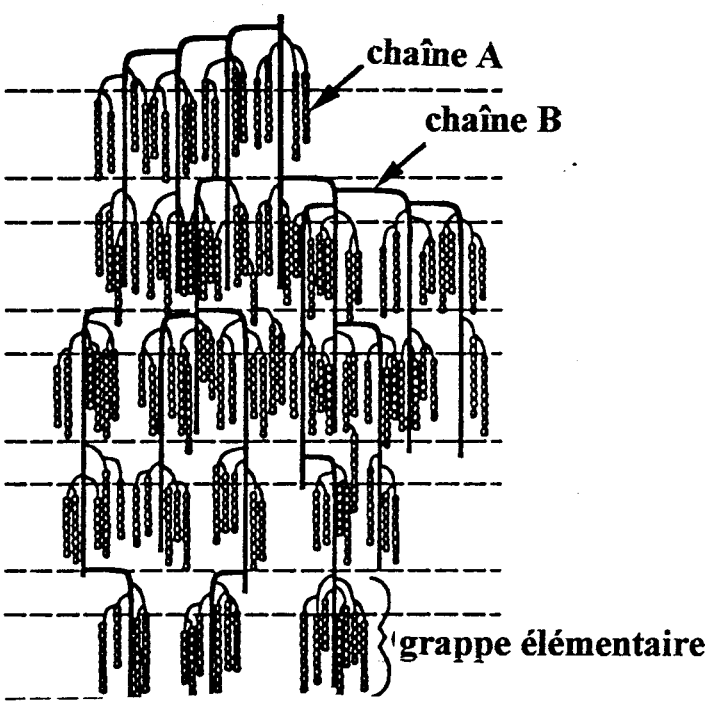


Figure 46: *La structure en grappe de l'amylopectine:*

Les chaînes A forment des doubles hélices régulièrement empaquetées dans les lamelles cristallines, les chaînes B relient les grappes. Les points de branchement sont localisés dans les lamelles amorphes.

Jenkins, Cameron et M. Donald (1993) ont démontré à l'aide de la diffraction aux RX, que dans toutes les espèces étudiées (l'orge, le blé, le maïs, le riz, la pomme de terre et le tapioca) **la taille d'une grappe de l'amylopectine est rigoureusement constante et mesure 9 nm** (*figure 46*).

Cette invariance dans la taille de la grappe est d'autant plus frappante qu'elle est également observée chez les mutants Waxy et les mutants riches en amylose du maïs, de l'orge et du pois (Jenkins et M. Donald, 1994).

Or, cette constance ne peut être attribuée à la seule spécificité des amidon synthétases ou des enzymes de branchement.

En effet, les amidon synthétases peuvent allonger davantage, de même les enzymes de branchement transfèrent des chaînes plus longues *in vitro* (Takeda et coll., 1993a, Preiss et Sivak, 1994).

Cette constance suggère que des mécanismes régulateurs définissent la taille des grappes de l'amylopectine durant sa biosynthèse.

D'autre part, Jenkins et M. Donald (1994) observent qu'à l'intérieur de cette distance répétée, au sein même de la grappe, la fraction allouée aux lamelles cristallines augmente systématiquement avec le contenu en amylose.

Il semble contradictoire de constater, alors que l'amylopectine est connue comme seule responsable de la cristallinité du grain, l'augmentation du contenu en amylose à pour effet d'augmenter la taille de la région cristalline à l'intérieur même d'une grappe d'amylopectine.

Chez tous les mutants Waxy étudiés, où l'amidon est uniquement constitué d'amylopectine, l'absence de GBSS coïncide avec un raccourcissement de la portion cristalline des grappes de l'amylopectine.

L'activité GBSS, bien qu'elle soit prédominante n'est pas capable de compenser le manque d'activité SSSII dans la production d'amylopectine.

L'efficacité de la SSSII dans la synthèse de l'amylopectine doit donc être attribué à son interaction privilégiée avec une (des) enzyme(s) de branchement.

La spécificité de l'association entre les activités amidon synthétases et les activités de branchement pourrait être responsable d'un mécanisme séquentiel dans la biosynthèse de l'amylopectine.

Cette interaction privilégiée peut s'imaginer sous la forme d'un complexe multi-enzymatique et plus particulièrement entre les enzymes BEII et SSSII.

Le mécanisme séquentiel peut également venir de l'affinité de ces deux enzymes pour les amorces produites.

Nous proposons un modèle qui tient compte de l'avancement des données génétiques et biochimiques actuelles mais qui ne peut être considéré que comme spéculatif (*figure 51*):

1) Après un mécanisme d'initiation encore mystérieux, un long glucane est produit par la GBSS ou par la SSS II.

2) Ce long glucane est modérément branché par la BE I pour donner une amylopectine faiblement ramifiée (Ap II).

3) Ce polysaccharide sert d'amorce pour la synthèse de grappes par la SSS II.

Dans les amidons, dont la cristallinité est de type A, cette synthèse est réalisée par un complexe BE II - SSS II.

La synthèse est terminée par l'élongation de chaînes très courtes (A) par la SSS I.

L'aspect séquentiel de ce modèle se situe dans l'intervention de l'enzyme BEI au départ de la synthèse de l'amylopectine.

L'amylose et l'amylopectine de type II n'apparaîtrons dans cette chaîne métabolique que si la conversion de l'ApII en Ap I est ralentie.

En effet, le raccourcissement de la portion cristalline des grappes de l'amylopectine en absence de la GBSS s'explique aisément si on admet sa participation à la synthèse même de l'amylopectine (*figure 48*).

La GBSS en allongeant la taille des longues chaînes supportant les grappes de l'amylopectine modifierait la taille moyenne des chaînes impliquées dans la fraction cristalline.

Les résultats de Jenkins et M. Donald s'interprètent aisément si l'on suppose l'intervention directe de la GBSS dans la synthèse de l'amylopectine, comme nous l'avons démontré par la voie génétique.

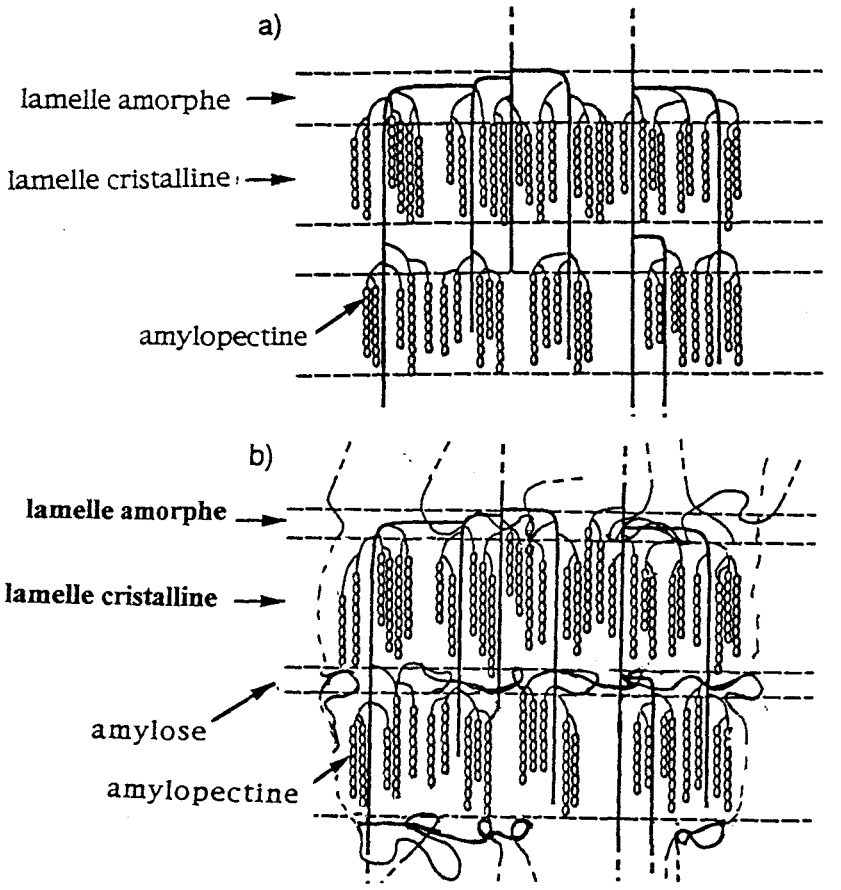


Figure 48: *Modèle proposé relatif à l'intervention de la GBSS sur la cristallinité des grappes élémentaires de l'amylopectine:*
(a) la structure de l'amylopectine Waxy dont la taille des lamelles cristallines est restreinte.
(b) l'augmentation de la fraction cristalline de l'amylopectine sauvage due à l'action directe de la GBSS par l'élongation des longues chaînes de l'amylopectine. Dans ce schéma l'amylose est indépendante de l'amylopectine et nous l'avons arbitrairement localisée dans les lamelles amorphes.

L'intervention à la fois de l'enzyme liée (la GBSS) et des enzymes solubles (SSSI, SSSII, enzymes de branchement...) dans l'élaboration de la molécule d'amylopectine suppose que cette synthèse se réalise en surface du grain d'amidon.
Indépendamment de cette synthèse, nous pensons que la production de l'amylose par la GBSS pourrait résulter d'une activité de branchement insuffisante.

En effet, la GBSS représente plus de 90% des protéines liées au grain (REF). L'adsorption des amidon synthétases essentiellement solubles peut être évaluée d'après nos essais, à moins de 1% des amidon synthétases présentes à la surface du grain d'amidon.
La chute de la quantité d'amidon dans le double mutant IJ2 indique que cette activité amidon synthétase soluble est principalement représentée par l'activité de la SSSII.
De même, Morell et Preiss n'ont détecté que 5% de l'activité totale des enzymes de branchement associées au grain après digestion amylasique (Preiss et coll., 1994).
La prédominance de l'activité GBSS sur toutes les autres activités intervenant dans la synthèse d'amidon permettrait à cette enzyme d'être la seule à élaborer l'amylose.

Pourquoi dans un contexte sauvage, la SSSII ne synthétise pas de plus longues chaînes, voire de l'amylose?

En absence de la GBSS, comme dans le cas d'un mutant waxy, les chaînes élaborées par la SSSII paraissent immédiatement branchées.
L'efficacité de ce branchement, du fait de l'activité comparativement faible de cette enzyme à la surface du grain, pourrait refléter une association préférentielle avec les enzymes de ramification.
Nous pouvons également envisager que les glucanes produits par la SSSII soient plus de nature à favoriser leur branchement que les glucanes allongés par la GBSS.

Chez le maïs, le mutant *ae wx* (*amylose extender waxy*) est déficient dans l'activité de branchement BEII et dans l'activité GBSS.
L'amidon du mutant *ae wx*, analysé en chromatographie de gel filtration est constitué d'amylopectine et d'un matériel intermédiaire de masse moléculaire plus élevée que l'amylose (Yeh, Gardwood et Shannon, 1981).
Ce matériel est constitué de longues chaînes faiblement branchées, caractéristiques structurales d'un polysaccharide de type amylosique.
Dans ce contexte mutant, le déficit en activité de branchement BEII permet à la SSSII de synthétiser un matériel proche de l'amylose.

De plus, les mutants simples défectueux en enzyme de branchement BEII (les mutants *ae* du maïs et du riz ou les mutants *r* du pois) présentent une quantité d'amidon réduite et celui-ci est principalement constitué d'amylose (Takeda et coll., 1993, Mizuno et coll., 1993, Edwards et coll., 1988, Colonna et Mercier, 1984).

Ces observations semblent indiquer l'existence d'un équilibre entre les activités de branchement et d'élongation qui conditionnerait la présence de l'amylose.
Chez la souche sauvage ou lorsque la GBSS et la SSSII sont présentes, l'importance de l'activité amidon synthétase par rapport à l'activité de branchement permet l'existence de l'amylose.
Chez un mutant Waxy ou lorsque la SSSII est en présence d'un excès

d'enzymes de branchement, l'amylose disparaît.
Et lorsque l'activité de branchement est réduite, dans les mutants *ae* du maïs et du riz ou les mutants *r* du pois, la proportion en amylose augmente.

La présence de l'amylose serait donc liée au rapport entre l'activité amidon synthétase et l'activité de branchement. Et la prédominance de l'activité GBSS sur les autres amidon synthétases conduirait celle-ci à paraître exclusivement responsable de cette synthèse.

Deux explications peuvent être avancées pour tenter d'élucider la production d'amylose par la GBSS chez la souche sauvage:

1 - La synthèse de l'amylose résulte de la séquestration de la GBSS à la périphérie du grain d'amidon.

Preiss et coll. (1994) expliquent comment la synthèse d'amylose est possible alors que la GBSS est capable d'allonger à la fois des glucanes linéaires et branchés. La séparation spatiale ou la cristallisation de l'amidon empêcherait l'augmentation du branchement des glucanes élaborés par cette enzyme.
Selon cette hypothèse la GBSS produit l'amylose exclusivement au niveau du pourtour interne du grain.
Cette synthèse est alors conditionnée par la concentration en ADP-Glc *in situ* et de la diffusion du nucléotide-sucre dans la phase amidon.

2 - La synthèse d'amylose se réalise en surface du grain.

Cette synthèse résulterait de l'excès d'activité GBSS mais également d'une relation privilégiée entre certaines activités amidon synthétases et les activités de branchement.
Lorsque la SSSII est défectueuse la synthèse d'amylopectine est réduite et la quantité d'amidon diminue. Or, l'abondance d'activité GBSS à la surface du grain devrait suffire aux activités de branchement pour produire de l'amylopectine en quantité normale.

En supposant que toutes les synthèses se réalisent en surface du grain, l'efficacité de la SSSII reflète une relation préférentielle avec les activités de branchement.
Le déséquilibre entre la quantité d'activité GBSS et la quantité d'activité de branchement disponible en surface, ajouté à une certaine spécificité de ces enzymes, permettrait l'élaboration de l'amylose à la surface.

La modification de la concentration en ADP-Glc au cours d'expériences de synthèse *in vitro* à partir de grains purifiés, nous permettrait de localiser la synthèse d'amylose *in vivo*:

Si l'existence de l'amylose est liée à la séquestration de la GBSS dans le grain, cette synthèse est alors modifiable in vitro.
L'activité GBSS en présence d'une forte concentration en ADP-Glc conduira à une synthèse massive d'amylose *in vitro*.

Par contre, si la production de l'amylose est due à un manque d'activité de branchement en surface du grain, elle ne pourra être modifiée in vitro.
Les balances enzymatiques pré définies n'autoriserait pas une synthèse accrue d'amylose *in vitro,* même sous l'influence d'une forte concentration en ADP-Glc.

La mise au point préalable d'un système de synthèse *in vitro* performant nous semble indispensable (voir Annexe).

Vers Une Compréhension De La Synthèse De L'amylopectine *in vivo*

Pour affecter un rôle précis à chacune des enzymes intervenant dans la synthèse de l'amidon, deux approches sont généralement utilisées: la caractérisation des enzymes purifiées *in vitro* et l'approche génétique. Si l'étude *in vitro* permet d'avoir un aperçu sur le fonctionnement d'une enzyme, les résultats sont parfois bien loin de la réalité, c'est à dire *in vivo*.

Récemment, Guan et coll. (1994) ont analysé la structure du polysaccharide produit par *E. coli* AC71 (*glgB*-) transformée avec les gènes *MBEI* et *MBEII* ensembles et séparément, codant les enzymes de branchement BEI et BEII de l'albumen du maïs.
La restauration de l'activité de branchement de *E. coli* (*glgB*-) transformée par le gène *MBEI* et/ ou le gène *MBEII* se traduit dans tous les cas par une surabondance en chaînes de d.p. 6 dans le glucane produit (*figure 49b*).
Or, les enzymes de branchement BEI et BEII caractérisées *in vitro* présentent des spécificités de transfert distinctes et pour des chaînes préférentiellement plus longues (Tadeka et coll., 1993)

La structure du glucane produit par l'association de la glycogène synthase de *E. coli* et les enzymes de branchement du maïs est différente de la structure de glycogène de la souche *E. coli* sauvage (*figure 49a, b*).
Par contre, la distribution des chaînes du glucane produit par *E. coli* (*glgB*-) transformée est similaire à celle que nous avons obtenu du polysaccharide du double mutant IJ2, défectueux dans la SSSII et la GBSS (*figure 50*).
La SSSI de *Chlamydomonas* synthétise, *in vivo*, un polysaccharide dont la structure est donc fort proche de celle du glucane synthétisé dans *E. coli* par la glycogène synthase, en présence des enzymes de branchement du maïs.

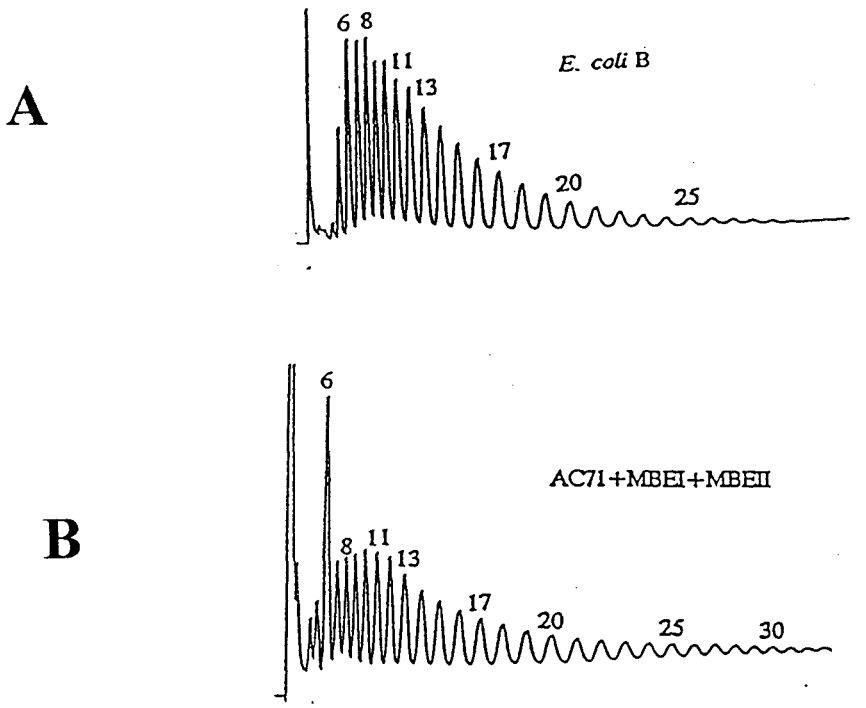


Figure 49: Distribution des courtes chaînes débranchées des α-glucanes isolés de E coli AC71 (glgB) (A) et AC71 transformée avec les gènes codant pour les enzymes de branchement BI et BII du maïs (B) (Guan et coll., 1994).

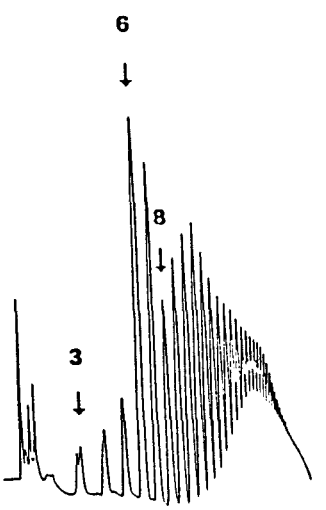


Figure 50: Distribution des courtes chaînes débranchées du polysaccharide granulaire du double mutant IJ2.

La glycogène synthase de *E. coli* et la SSSI de *Chlamydomonas* ont donc le même comportement *in vivo* en présence d'un excès d'activité de branchement non spécifique.

Les caractéristiques de l'activité d'une enzyme isolée *in vitro* ne sont pas reproductibles *in vivo* où cette activité se conjugue aux actions concertées de toutes les autres enzymes.

C'est pourquoi, il est indispensable de compléter les études *in vitro* par des expériences génétiques. L'étude de mutants permet de conserver le contexte où évolue normalement une enzyme et ainsi d'en déduire son rôle effectif *in vivo*.

L'étude de mutants *Waxy* a permis d'associer la GBSS à la protéine Waxy et à la synthèse de l'amylose (Preiss et coll., 1991, Delrue et coll., 1992).

La biosynthèse de l'amylopectine, par la multiplicité des enzymes qui interviennent, semble plus complexe. L'isolement de nouveaux mutants permet progressivement de découvrir l'intervention précise de chacune de ces enzymes et d'élucider le mécanisme de biosynthèse de l'amylopectine.

Chez *Chlamydomonas*, la caractérisation d'un mutant défectueux dans la SSSII a associé la présence de cette activité au maintien des chaînes de longueur intermédiaire de l'amylopectine (Fontaine et D'Hulst, 1993).

De même notre étude du double mutant IJ2 a mis en évidence le rôle de la GBSS dans la synthèse des longues chaînes de l'amylopectine.

Cette étude suggère également que la SSSII et la GBSS doivent être partiellement redondantes dans la synthèse des chaînes constituant l'armature de l'amylopectine.

En effet, dans les simples mutants l'amylopectine est produite en absence de la GBSS comme en absence de la SSSII. Et ce n'est que dans le double mutant où ces deux enzymes sont défectueuses que la synthèse d'amylopectine décroît de manière très importante.

Ce résultat nous a conduit à valider le modèle alternatif où la GBSS et la

SSSII interviennent indépendamment l'une de l'autre dans l'élongation des longues chaînes de l'amylopectine.
Dans notre esprit, un modèle alternatif ou indépendant implique que les enzymes catalysant une même réaction chimique interviennent indépendamment l'une de l'autre.

Toutefois, l'aspect séquentiel dans la biosynthèse de l'amylopectine ne peut être totalement écarté.
Pour nous, la structure de l'amylopectine peut résulter d'une séquence d'événements tels qu'une première enzyme d'élongation soit capable de synthétiser un glucane pris en charge par une enzyme de branchement particulière. Le motif structural ainsi créé sert ensuite d'amorce à une deuxième enzyme d'élongation distincte, le produit résultant constitue le substrat d'une seconde enzyme de ramification et ainsi de suite.
L'hypothèse d'une succession d'étapes dans l'élaboration de l'amylopectine nécessite l'existence d'interaction(s) spécifique(s) entre les enzymes concernées, comme le suggèrent les phénotypes des mutants défectueux dans l'activité GBSS ou dans l'activité SSSII.

Le mutant Waxy déficient en activité GBSS a une quantité d'amidon normale. Cette enzyme, largement prédominante sur le grain d'amidon sauvage, n'est donc pas indispensable à l'accumulation d'amidon.
Chez le mutant Waxy toutes les activités de branchement seraient alors concentrées sur les glucanes produits par la SSSII. L'amylopectine produite en absence de la GBSS est plus ramifiée et compense quantitativement l'absence d'amylose. Or, bien que la SSSII soit fortement minoritaire à la surface du grain, une défectuosité dans la SSSII provoque une baisse de la quantité d'amidon et celui-ci est enrichi en amylose (Fontaine et D'Hulst, 1993).
L'activité GBSS, bien qu'elle soit prédominante n'est pas capable de compenser

le manque d'activité SSSII dans la production d'amylopectine.

L'efficacité de la SSSII dans la synthèse de l'amylopectine doit donc être attribué à son interaction privilégiée avec une (des) enzyme(s) de branchement.

La spécificité de l'association entre les activités amidon synthétases et les activités de branchement pourrait être responsable d'un mécanisme séquentiel dans la biosynthèse de l'amylopectine.

Cette interaction privilégiée peut s'imaginer sous la forme d'un complexe multi-enzymatique et plus particulièrement entre les enzymes BEII et SSSII.

Le mécanisme séquentiel peut également venir de l'affinité de ces deux enzymes pour les amorces produites.

Nous proposons un modèle qui tient compte de l'avancement des données génétiques et biochimiques actuelles mais qui ne peut être considéré que comme spéculatif (*figure 51*):

1) Après un mécanisme d'initiation encore mystérieux, un long glucane est produit par la GBSS ou par la SSS II.

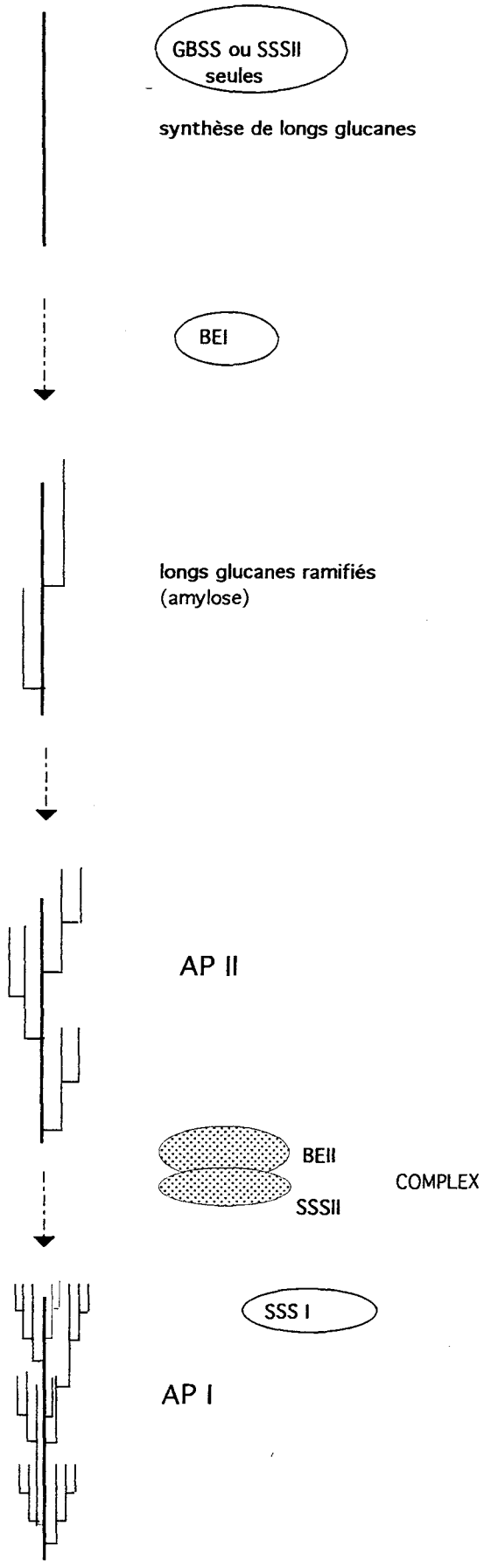
2) Ce long glucane est modérément branché par la BE I pour donner une amylopectine faiblement ramifiée (Ap II).

3) Ce polysaccharide sert d'amorce pour la synthèse de grappes par la SSS II. Dans les amidons, dont la cristallinité est de type A, cette synthèse est réalisée par un complexe BE II - SSS II.

La synthèse est terminée par l'élongation de chaînes très courtes (A) par la SSS I.

L'aspect séquentiel de ce modèle se situe dans l'intervention de l'enzyme BEI au départ de la synthèse de l'amylopectine.

L'amylose et l'amylopectine de type II n'apparaîtrons dans cette chaîne métabolique que si la conversion de l'ApII en Ap I est ralentie.


GBSS ou SSSII
seules
synthèse de longs glucanes
BEI
longs glucanes ramifiés
(amylose)
AP II
BEII
SSSII
COMPLEX
SSS I
AP I

L'isolement de mutants défectueux en activité de branchement BEI semble indispensable à la compréhension complète du mécanisme de biosynthèse de l'amylopectine. Selon le modèle proposé, de tels mutants devraient voir s'effondrer la quantité de polysaccharide synthétisé.

Vers L'établissement D'un Système De Synthèse in vitro D'amidon A Partir De Grains Natifs

Leloir et coll. (1961) ont initialement montré que la GBSS est capable d'incorporer *in vitro* du glucose dans l'amylopectine à partir de l'UDP-Glc. Ce substrat était alors à une concentration élevée, non compatible avec la physiologique de la cellule. Depuis, il fut établi que le substrat naturel des amidon synthétases est sans ambiguïté l'ADP-Glc (Preiss, 1985 .).

Ces premiers résultats de synthèse *in vitro* furent confirmés par Baba et coll. (1987) qui en utilisèrent l'ADP-Glc comme substrat, à une concentration physiologique concevable.

Nous nous sommes inspirés de ces expériences chez la patate douce pour situer les conditions favorables de synthèse *in vitro*. Nous avons appliqué ces conditions à l'amidon de la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*, en faisant varier les paramètres susceptibles de modifier l'activité amidon synthétase.

Détermination des conditions optimales de synthèse *in vitro* chez la souche sauvage de *Chlamydomonas*:

L'amidon purifié de la souche sauvage cultivée en milieu limité en azote a été incubé à 30°C, à différentes concentrations, avec et sans agitation, avec et sans le tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 8,2, et à des concentrations en ADP-Glc variables.

L'activité GBSS *in vitro* de ces échantillons fut évaluée par la mesure du λ max de l'interaction polysaccharide-iode et un dosage d'amidon effectués sur plusieurs temps d'incubation.

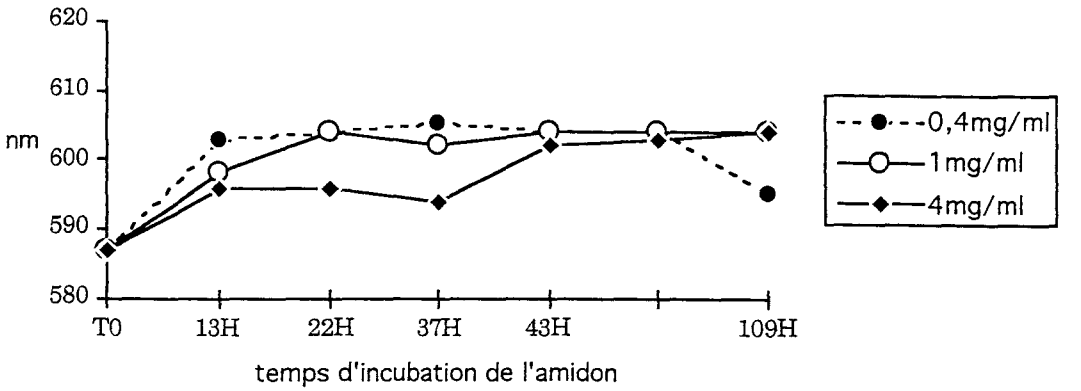


Figure 1: *Effet de la concentration en amidon sur la synthèse in vitro en présence d'ADP-Glc 5 mM*

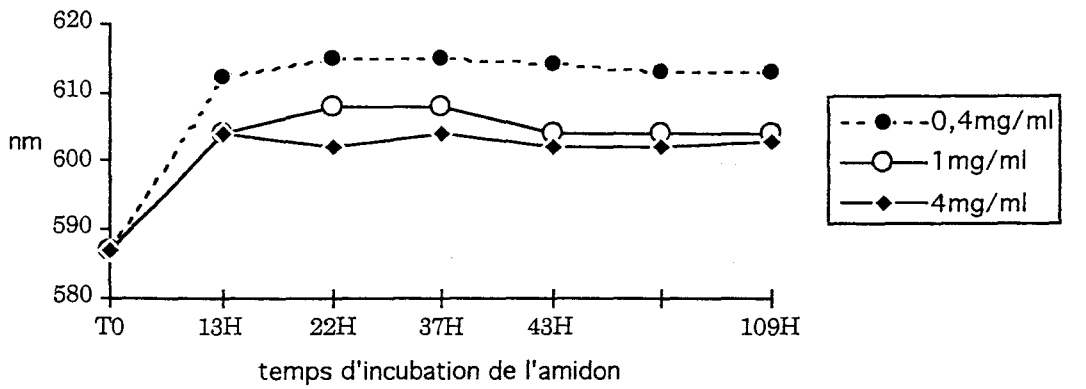


Figure 2: *Effet de la concentration en amidon sur la synthèse in vitro en présence du tampon Glycylglycine, NaOH 50 mM et d'ADP-Glc 5 mM.*

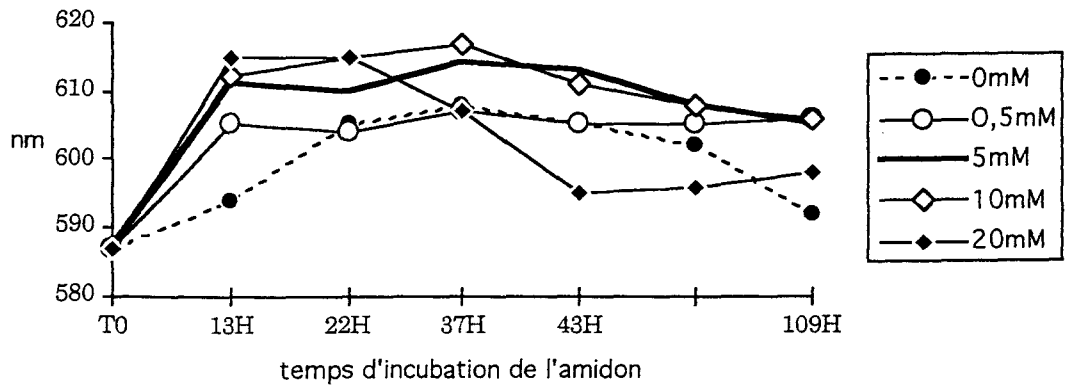


Figure 3: *Effet de la concentration en ADP-Glc sur la synthèse in vitro*

L'effet de la variation de la concentration en amidon a été analysé en présence du tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 8,2 avec l'ADP-Glc à 5mM (*figure 1*) et en présence uniquement d'ADP-Glc à 5 mM (*figure 2*).

L'effet de la variation en substrat sur l'activité GBSS *in vitro* a été observé sur l'amidon à 0,1 mg / ml dans le tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 8,2 (*figure 3*).

L'influence de l'agitation (à l'aide d'un barreau magnétique) sur la synthèse a été observée sur l'amidon à 4 mg pour 10 ml dans le tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 8,2 avec l'ADP-Glc à 5 mM (*figure 4*).

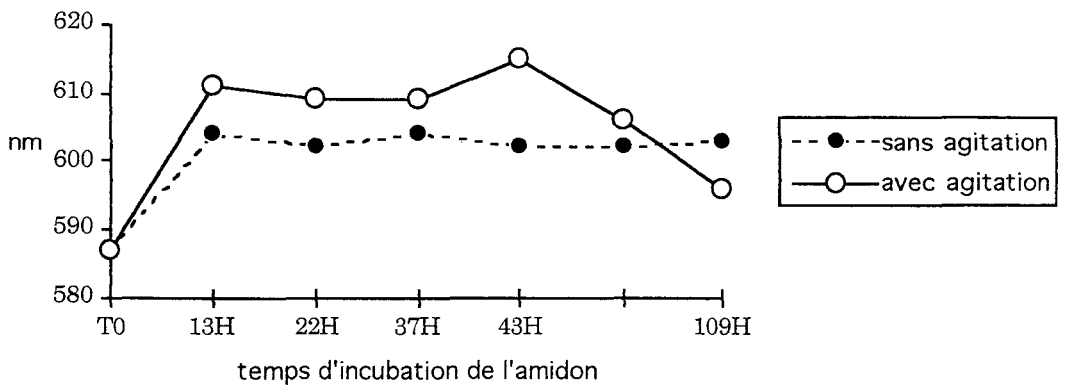


***Figure 4:** Influence de l'agitation sur la synthèse in vitro*

Ces expériences montrent que l'activité GBSS est optimale dans les conditions où la concentration en ADPG est de 5 à 10 mM et où la concentration en amidon est la plus faible (0,4 mg / ml).

La présence du tampon Glycylglycine 50 mM améliore indiscutablement la synthèse, par contre l'influence de l'agitation n'est pas évidente.

Bien qu'une faible concentration en amidon améliorait visiblement l'activité *in vitro*, les conditions matérielles nécessaires à l'analyse du polysaccharide par gel filtration nous empêchaient de diminuer la concentration en amidon en dessous de 5 mg / ml.

Les expériences suivantes de synthèse *in vitro* chez *Chlamydomonas* furent donc réalisées en incubant 8 à 10 mg d'amidon dans 1 ml de tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 8,2 à 5 mM d'ADP-Glc et sans agitation.

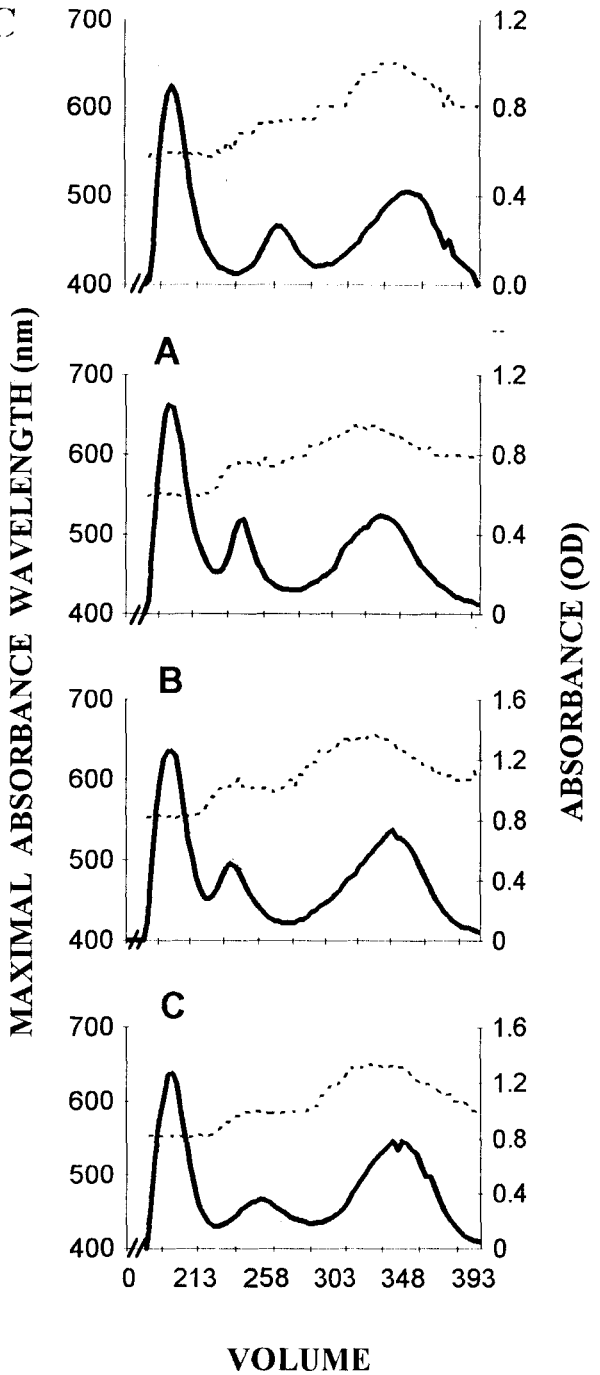


Figure 6: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration HW75 de l'amidon incubé à pH 8,2: après 1h (a), après 17 h (b), après 24h (c).

Mise en évidence de l'effet du pH du milieu réactionnel sur la synthèse *in vitro:*

La GBSS est capable d'allonger un glucane *in vitro* sous une gamme de pH très large (Mac Donald et Preiss, 1985).
Nous avons voulu observer l'effet de la basicité du milieu d'incubation sur la synthèse *in vitro*.

L'amidon fut extrait de la souche sauvage cultivée en milieu carencé en azote, puis purifié par un gradient de Percoll (voir Matériels et Méthodes).
Dans les trois expériences, plusieurs échantillons contenant 8,5 mg d'amidon furent incubés à 30°C, dans un tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH à un pH différent et avec l'ADP-Glc à 5 mM.
Nous avons caractérisé la synthèse *in vitro* réalisée à pH 8,2, à pH 9,2 et à pH 9,8 par chromatographie de gel filtration HW75 de l'amidon (voir Matériels et Méthodes).
L'évolution de cette synthèse été suivie en effectuant les chromatographies de gel filtration de l'amidon après 1 h, 17 h et 24 h d'incubation (*figures 5, 6, 7 et 8*).

Pour les trois valeurs de pH du milieu, nous observons une modification du polysaccharide après synthèse *in vitro*. Les proportions en amylose et en amylopectine de type II augmentent avec le temps de d'incubation de l'amidon. Cette néosynthèse d'amylose et d'amylopectine II est d'autant plus flagrante que le pH du milieu réactionnel est élevé (*figures 8*).
L'augmentation de la λ max de l'interaction polysaccharide iode s'étale sur toutes les fractions de l'amidon et traduit l'élongation de longues chaînes par la GBSS.
L'amylopectine de type I dont la λ max évolue, est également modifiée par l'activité GBSS *in vitro*. Nous pouvons d'ailleurs observer que les deux types d'amylopectines sont de moins en moins bien séparées par la gel filtration, avec l'augmentation de la durée d'incubation de l'amidon à pH 9,8 (*figure 8c*).

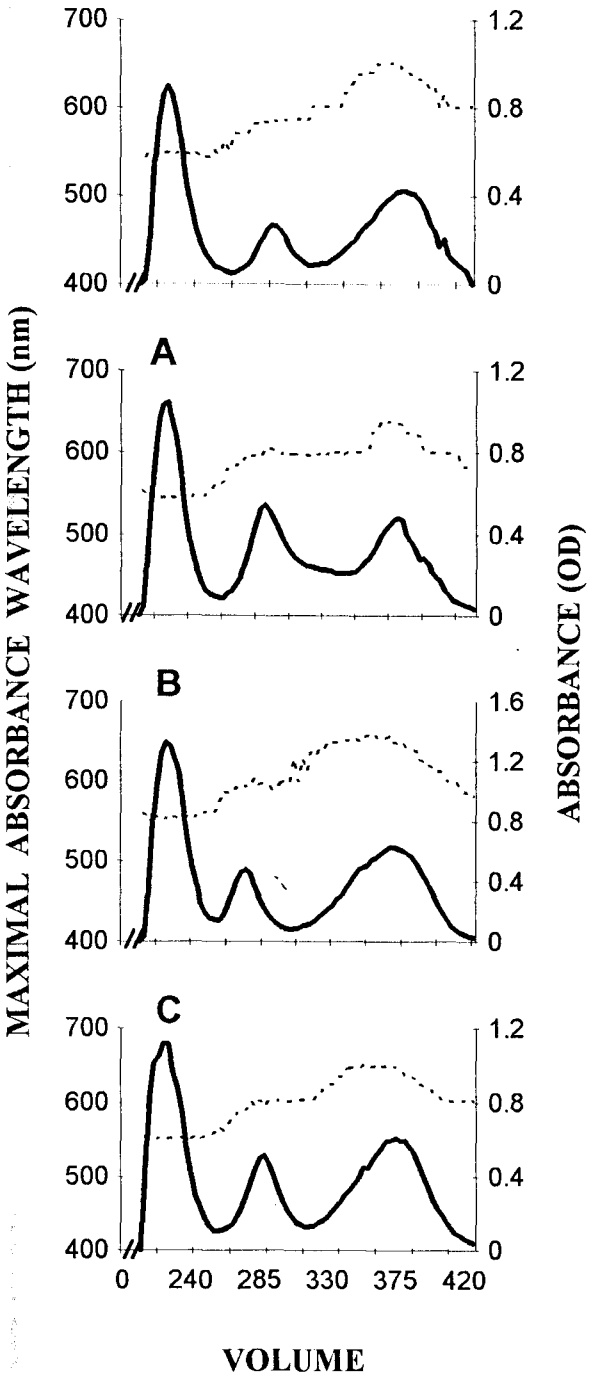


Figure 7: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration HW75 de l'amidon incubé à pH 9,2: après 1h (a), après 17 h (b), après 24h (c).

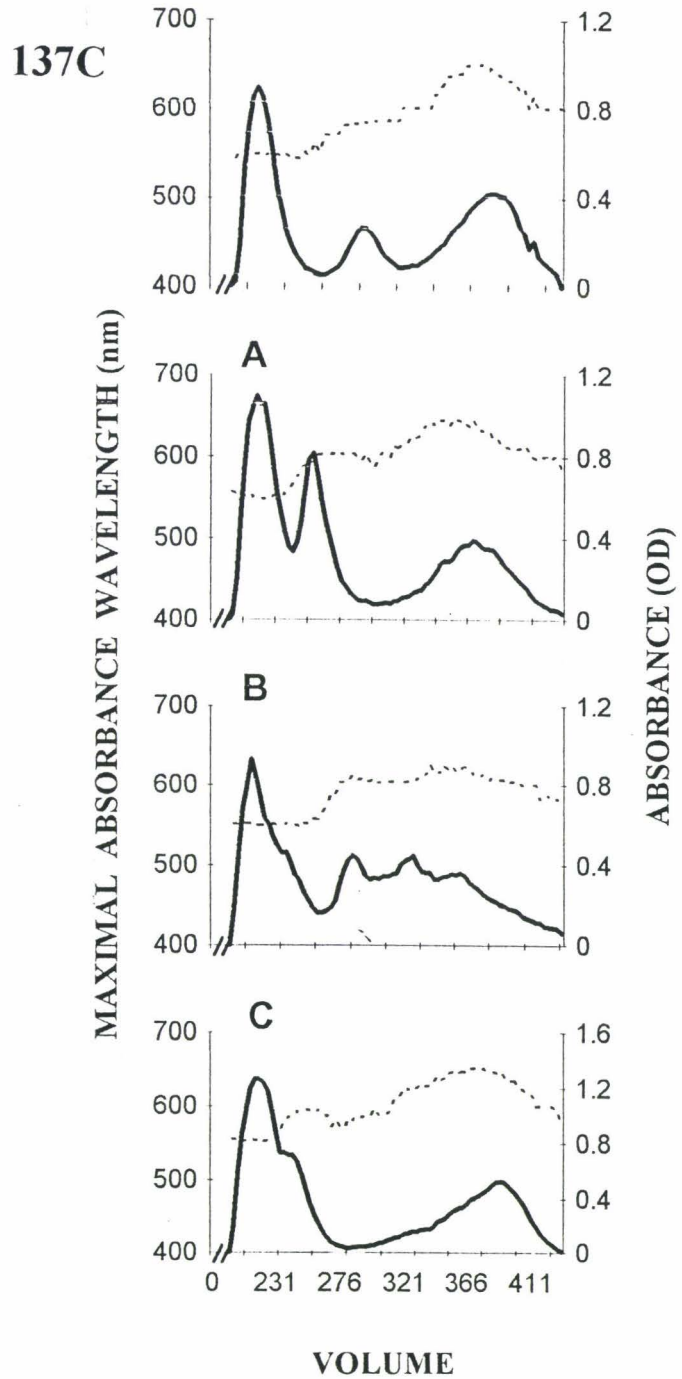


Figure 8: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration HW75 de l'amidon incubé à pH 9,8: après 1h (a), après 17 h (b), après 24h (c).

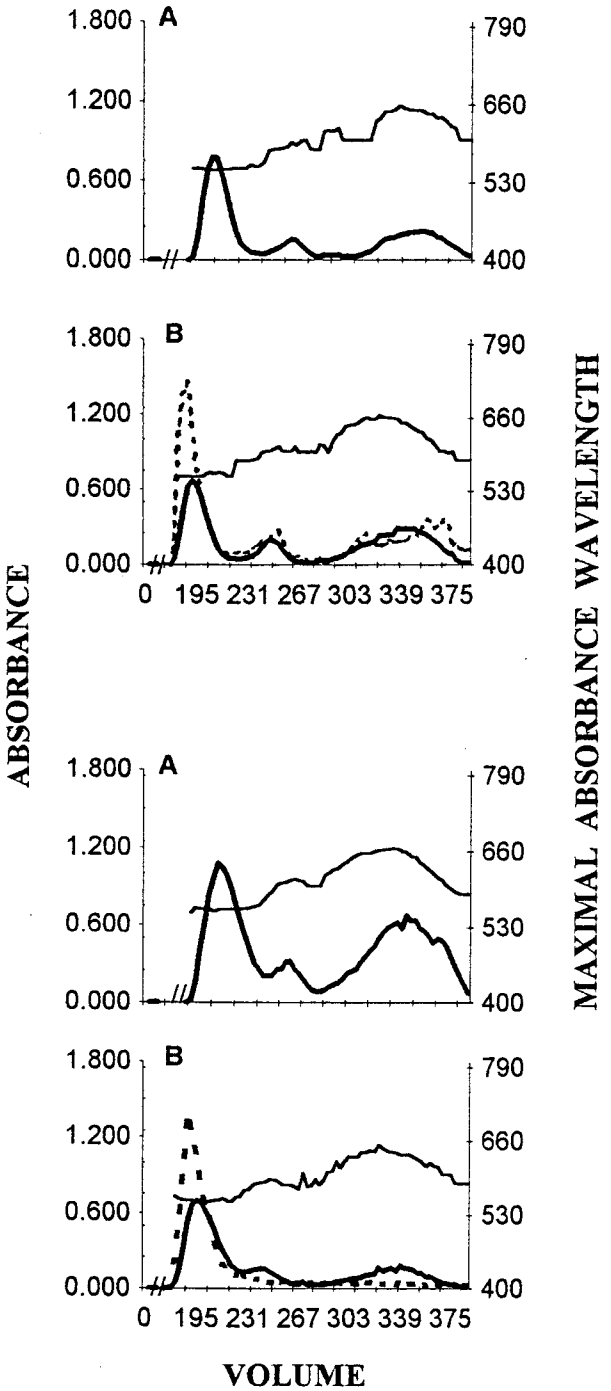
Dans ces conditions de pH extrême, nous pouvons supposer que la majorité des enzymes de catabolisme -dont l'optimum de pH est acide- sont inhibées et que la GBSS reste active. C'est d'ailleurs après l'incubation de l'amidon à pH 9,8 que la chromatographie de gel filtration traduit la synthèse maximale de longues chaînes.

Localisation des chaînes néosynthétisées dans les fractions de l'amidon par l'incorporation d'ADPG C^{14}:

Afin de déterminer quels sont les constituants de l'amidon remaniés en synthèse *in vitro*, l'amidon purifié fut incubé en présence d'ADP-Glc C^{14}.
Deux expériences d'incorporation distinctes ont été menées sur l'amidon purifié extrait de la souche sauvage et incubé selon les conditions décrites ci-après.
Le témoin négatif correspond à l'amidon incubé dans les mêmes conditions mais sans ADP-Glc.

Après incubation au bain marie à 30°C, l'amidon est récupéré par centrifugation 5 min à 10000 g et dissous dans du DMSO 100% par 20 min au bain-marie à 100°C. L'échantillon est ensuite dilué pour ajuster la concentration en DMSO à 10%, puis déposé sur une colonne de gel filtration HW75 (voir Matériels et Méthodes). Dans chaque expérience, un même échantillon d'amidon, l'analyse par chromatographie de gel filtration HW75 fut répétée.
Les fractions issues de la gel filtration de l'amidon incubé en présence d'ADP-Glc marqué furent filtrées. La radioactivité présente sur les filtres fut mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (voir Matériels et Méthodes).

Dans une première expérience, l'amidon fut incubé à 30°C, à raison de 10 mg / ml dans le tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 9,2 contenant de l'ADP-Glc à une concentration de 30 mM et l'ADP-Glc C^{14} à une concentration de 10 µM.



Figures 9 et 10: *Répartition de la radioactivité incorporée dans les fractions issues de la chromatographie de gel filtration HW75 de l'amidon incubé en présence d'ADP-Glc C14*

Dans une première expérience d'incorporation(*figure 9*) et dans une deuxième expérience d'incorporation (*figure 10*) sur l'amidon de la souche sauvage avant (**A**) et après (**B**) synthèse *in vitro*.

La synthèse *in vitro* fut suivie par la mesure de la λ max de l'interaction-iode réalisée sur des prélèvements effectués après différents temps d'incubation.
Après incubation, les différents constituants de l'amidon ont été séparés par chromatographie de gel filtration HW75 (*figures 9*).
L'incorporation radioactive se localise essentiellement dans l'amylopectine de haut poids moléculaire (*figures 9b*).

Dans une deuxième expérience, l'amidon fut incubé à 30°C dans des fioles, à raison de 0,5 mg / ml en présence du tampon Glycylglycine 50 mM, NaOH pH 8,5 , en présence de 2,5 mM d'ADP-Glc froid et de (400µl) mM d'ADP-Glc C^{14}.
Le profil obtenu par chromatographie de l'amidon incubé en présence d'ADP-Glc marqué montre une forte incorporation radioactive au niveau du premier pic d'amylopectine (*figures 10*).
La radioactivité détectée dans les autres fractions est quant à elle trop faible pour être significative.

Ces deux séries d'expérience montrent une incorporation radioactive massive dans le premier pic d'amylopectine après incubation de l'amidon en présence d'ADP-Glc C^{14}. Or, toutes les expériences précédentes non marquées montrent une production nette d'amylose après synthèse *in vitro*, que nous n'avons pas obtenu ici.
Une néosynthèse faible d'amylose peut s'observer à la suite du premier essai, se traduisant d'ailleurs par une légère augmentation de la radioactivité dans ces fractions.

Alors que la GBSS fortement majoritaire sur le grain d'amidon est connue pour produire l'amylose, le polysaccharide principalement remanié à la suite de ces expériences de synthèse *in vitro* est l'amylopectine de haut poids moléculaire

Ce résultat révèle la présence d'une activité(s) autre(s) que celle de la GBSS sur les grains d'amidon purifiés. Une enzyme(s) intervient sur les longues chaînes produites par la GBSS *in vitro*, et les transfère dans l'amylopectine de type I.

Ces caractéristiques suggèrent au moins l'action d'une activité de branchement *in vitro*, adsorbée sur le grain natif.

Conclusions:

Nous avons pu déterminer les conditions favorables à un optimal optimum d'amylose *in vitro* par la GBSS.

Nous avons également montré que l'activité de cette enzyme favorisée par un pH alcalin.

Cependant, la GBSS n'est pas la seule activité présente sur les grains d'amidon purifiés.

La sensibilité de ces différentes enzymes aux méthodes de purification du grain et aux conditions d'incubation est susceptible d'engendrer une certaine variabilité dans les résultats de synthèse *in vitro*.

Nous pensons que cette variabilité dans les résultats s'explique par la quantité fluctuante des enzymes associées de manière lâche à la surface du grain. L'approche mérite cependant d'être poursuivie puisque ces fluctuations pourraient refléter des modifications biologiquement significatives des enzymes d'élongation et de ramification.

Bibliographie

Archibald, A.R., Flemin, I.D., Liddle, M.A., Manners, D.J., Mercier, G.A. and Wright, A. 1961. α-1,4-glucosans. Part XI. The absorption spectra of glycogen- and amylopectin-iodine complexes. *J. Chem. Soc.* 1183-1190.

Ainsworth, C., Clark, J. and Balsdon, J. 1993. Epression, organization and structure of the genes encoding the *Waxy* protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Molec. Biol.* **22**, 67-82.

Akazawa, T., Pozuerta, J., and Ngernprasirtsiri, J. 1989. Adenylate translocator in envelope membranes of amyloplasts. Physiology, biochemistry and genetics of nongreen plastids. 79-86. Byer, C.D., Shannon, J.C. and Hardison, R.C. (eds.). American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Ardila, F.J. and Tandecarz, J.S. 1992. Potato tuber UDP-Glc: protein transglucosidase catalyzes its own glucosylation. *Plant Physiol.* **99**, 1342-1347.

Asaoka, M., Okuno, K., Sugimoto, M., Yano, M., Omura, T. and Fuwa, H. 1985a. Structure ansd properties of endosperm starch and water soluble olysaccharides from mutant of rice (*Oryza sativa L.*). *Starch / stärke* **37**, 364-366.

Asaoka, M., Okuno and Fuwa, H. 1985b. Effect of environmental temperature at the milky stage on amylose content and fine structure of amylopectin of *waxy* and non*waxy* endosperm starches of rice (*Oryza sativa L.*). *Agric. Biol. Chem.* **49**, 373-379.

Asaoka, M., Okuno, K., Sugimoto, M., Yano, M., Omura, T. and Fuwa, H. 1986. Characterization of endosperm starch from high-amylose mutants of rice (*Oryza sativa L.*). *Starch / stärke* **38**, 114-117.

Baba, T., Kim, J.S. and Arai., Y. 1983. Treatment of amylomaize starch granules with urea: comparison with normal maize starch. *Carbohydr. Res.* **124**, 344-348.

Baba, T., Yoshii, M. and Kainuma, K. 1987. Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots. *Starch / stärke* **39**, 52-56.

Ball, S., Dirick, L., Deck, A., Martiat, J.C. and Matagne 1990. Physiology of starch storage in the mono*Cell*ular alga *Chlamydomonas reinhardtii. Plant Sci.* **66**, 1-9.

Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. and Deck, A. 1991. A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17-26.

Banks, W., Greenwood, C.T. and Khan, K.M. 1970. The properties of synthetic amylopectin with long external-chains. *Die Stärke* **9**, 292-295.

Banks, W., Greenwood, C.T. and Khan, K.M. 1971a. The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydr. Res.* **17**, 25-33.

Banks, W., Greenwood, C.T. and Muir, D. D. 1971b. Studies on starches of hight amylose-content. Part 14. The fractination of amylomaize starch by aqueous leaching. *Die Stärke* **6**, 199-201.

Banks, W., Greenwood, C.T. and Muir D. D. 1974. The characterization of starch and its components. VI. A critical comparaison of the estimation of amylose content by colorimetric determination and potentiometric titration of the iodine complex. *Die Stärke* **26**, 73.

Banks, W. and Greenwood, C.T. 1975. Fractionation of the strarch granule and the fine structure of its components. Starch and its components , 5-66. Edinburgh University Press, Edinburgh.

Bellanger, F. 1994. La mutagenèse par insertion d'ADN chez *Chlamydomonas reinhardtii:* une nouvelle voie pour l'élucidation de la biosynthèse de l'amidon. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Compiègne.

Buléon, A. and Tran, V. 1990. Systematic conformational search for the branching point of amylopectin. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**, 345-352.

Blanshard, J. 1987. Starch granule structure and fonction: a physicochemical approach. Starch: properties and potential, 16-54. T. Galliard, J. Wiley and S. Michester (eds.).

Banks, W. and Muir, D.D. 1980. Structure of the starch granule. The Biochemistry of plants. **3**, 321-417. Academic Press, Inc.

Boyer, C. and Liu, K.C. 1985. The interaction of endosperm genotype and genetic background. *Starch / stärke* **37**, 73-79.

Boyer, C., Shannon J., Garwood, D. and Creech R. 1976. Changes in starch granule size and amylose percentage during kernels development in several Zea mays L. genotypes., *Cereal Chem.* **53**, 327.

Boyer, C.D. and Preiss, J. 1978a. Multiple forms of (1->4)-α-D-glucan 6-glycosyl transferase from developing Zea mays L. kernels. *Carbohydr. Res.* **61**, 321.

Boyer, C.D. and Preiss, J. 1978b. Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**,169.

Boyer, C.D. and Preiss, J. 1979. Properties of citrate stimulated starch synthesis catalysed by starch synthase I of developing maize kernels. *Plant Physiol.* **64**, 1039.

Boyer, C.D. and Preiss, J. 1981. Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzyme and starch synthases. *Plant Physiol.* **67**, 1141.

Chourey, P.S. and Nelson, O.E. 1976. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize. *Biochemical Genetics* **14**, 1041-1055.

Colonna, P. and Mercier, C. 1984. Macromolecular structure of *wrinkled-* and *smooth*-pea starch components. *Carbohydr. Res.* **126**, 233-247.

De Fekete, M., Leloir, L. and Cardini, C. 1960. Mecanism of starch biosynthesis. *Nature* **187**, 918-919.

Delrue, B., Fontaine, Routier, F., Deck, A., Wieruszeski, J.M., Van den Koornhuyse, N., Maddelein, M.L., Fournet, B. and Ball, S. 1992. *Waxy Chlamydomonas reinhardtii:* mono*Cell*ular alga mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**, 3612-3620.

Delrue, B. 1993. Les amidon synthétases liée et solubles définissent deux nouvelles voies indépendantes pour la synthèse de l'amylopectine chez l'algue uni*Cell*ulaire *Chlamydomonas reinhartii.* Thèse de doctorat. Université des *Sciences* et Techniques de Lille.

Dickinson, D.B. and Preiss, J. 1969. Presence of ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunken-2* and *brittle-2* mutants of maize endosperm. *Plant Physiol.* **44,** 1058-1062.

Dry, I., Smith, A., Edwards, A., Bhattarcharcharyya, M., Dunn, P. and Martin, C. 1992. characterization of cDNAs encoding isoforms of granule-bound starch synthase which show differencial expression in developing storage organs of pea and potato. *The Plant Journal* **2**, 193-202.

Entwistle, G., Tyson, R.H. and Rees, A.P. 1988. Isolation of amyloplasts from wheat endosperm. *Phytochemistry* **25**, 2033-2039.

French, D. 1984. VII.Organisation of starch granules. Starch: chemistry and technology. 183-247. Whistler, R.L., Bemiller, J.N. and Paschall, E.D. (eds.). Academic Press, Orlando, Florida.

Fontaine, T., D'Hust, C. Maddelein, M.L., Routier, F., Marianne-Pépin, T., Deck, A., Wieruszeski, J.M., Delrue, B., Van den Koornhuyse, N., Bossu, J.P., Fournet, B. and Ball, S. 1993. Towards an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268,** 16223-16230.

Galliard, T. 1983. Starch lipid complexes and another non-starch components of starch granules in cereal grains. Mobilization of reserves in germination, 111-136. Nozzolillo ., Lea P.J., Loewus F.A. (eds.). Plenum Press, New York.

Garwood, D.L., Vanderslice, S.F. 1982. Carbohydrate coposition of alleles at the *sugary* locus of maize. *Crop Sci.* **22**, 367.

Hawker, J.S., Ozbun, J.L., Ozaki, H., Greenberg, E. and Preiss, J. 1974. Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose α-1,4-glucan α-4-glucosyl transferase and α-1,4-glucan, α-1,4-glucan-6-glucosyl transferase in the synthesis of branched a-glucan. *Archives Biochemistry Biophysics* **160**, 530-551.

Hedman, K.D. and Boyer, C.D. 1982. Gene dosage at the *amylose-extender* locus of maize: efects on the levels of starch branching enzymes. *Biochemical Genetics.* **20**, 483-492.

Hill, L.M. and Smith, A.M. 1991. Evidence that glucose-6-phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* **185**, 91-96.

Hizukuri, S., Kaneko, T. and Takeda, Y. 1993. Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of cristalline polymorphism of starch granules. *BBA Report* **760**, 188-191.

Hizukuri, S. and Maehara, Y. 1990b. Fine structure of wheat amylopectin: the mode of A to B chain binding. *Carbohydr. Res.* **206**, 145-159.

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. 1986. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* **147**, 342.

Hizukuri, S., Takeda Y., Yasuda M. and Suzuki, A. 1981. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydr. Res.* **94**, 205-213.

Iglesias, A.A., Charng, Y., Ball, S. and Preiss, J. 1994. Characterization of the kinetic, regulatory, and structural properties of ADP-Glucose pyrophosphorylase from *Chlamydomonas reinhardtii. Plant Physiol.* **104,** 1287-1294.

Ikawa, Y., Glover, D.V., Sugimoto, Y. and Fuwa, H. 1981. Some structural characeristics of starches of maize having a specific genetic background. *Starch / stärke* **33**, 9-13.

Imberty, A. Buléon, A., Tran, V. and Pérez, S. 1991. Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch / stärke* 43, 375-384.

Inouchi, N., Glover, D. and Fuwa, H. 1987. Chain length distribution of amylopectin of several mutants and the *normal* counterpart, and *sugary-1* phytoglycogen in maize. *Starch/Staerke* **39**, 259-266.

Jenkins, P., Cameron, R. and M.Donald, A. 1993. A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch / stärke* **45**, 417-420.

Jenkins, P. and Donald, M.A. 1994. The influence of amylose on starch granule structure. 4th International Workshop on Oligo and Polysaccharides, Aussois.

Juliano, B.O., Perez, C.M., Kaushik, R. and Khush G.S. 1990. Some grain properties of IR36-based starch mutants. *Starch / stärke* **42**, 256-260.

Kassenbeck, P.1978: Beitrag zur kenntnis der verteilung von amulose und amylopektin in stärkekörnern. *Starch / stärke* **30**, 40-46.

Kamath, N., Bhide, S. and Kale N. 1989. Separation of the components of starch based on the adsorption of the 1-butanol-amylose complex during column chromatography on *Cell*ulose. *Carbohydr. Res.* **186**, 131-139.

Keeling, P.L., Wood, J.R., Tyson, R.H. and Bridges, I.G. 1988. Starch biosynthesis in developing weat grain. Evidence against the direct involvement of the triosephophates in the metabolic pathway. *Plant Physiol.* **87**, 311-319.

Kindle, K.L. 1990. Hight- frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii. Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 1228-1232.

Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernandez, E. and Lefevre, P.A. 1989. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhartii* using the *Chlamydomonas reinhardtii* gene for the nitrate reductase. *The Journal of Cell Biology.* **109**, 2589-2601.

Klösgen, R.B., Gierl, A., Scwartz-Sommer, Z. and Saedler, H. 1986. Molecular analysis of the *waxy* locus of maize. *Molecular General Genetics* **203**, 237-244.

Krisman, C. and Alfredo, C. 1991. Corn starch (α1,4-α1,6) glucoplolysaccharides-correlation between amylo:amylopectine ratios and physical properties of the grains. *Starch / stärke* **43**, 291-294.

Kumar, A., Larse, C.F. and Preiss, J. 1986. Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose:α-1,4-glucan, 4-glucosyl transferase from the nucleotide sequence of the *glg A* gene. *Journal Biological Chemistry* **261**, 16256-16259.

Lansky, S., Kooli, M. and Schoch, T.J. 1949. Properties of the fractions and linear subfractions from various starches. *J. An. Chem. Soc.* **71**, 4066.

Lavitman N. and Cardini, C.E. 1973. Particulate UDP-Glucuse:protein transglucosilase from potato tuber. *F.E.B.S. Lett.* **29**, 43-46.

Lavitman N., Tandecarz, J.S., Car*Cell*ar, M., Mendiara, S. and Cardini, C.E. 1974. role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch. Mechanism of formation and enlargement of glucoproteic acceptor. *Eur. J. Biochem.* **50**, 145-155.

van der Leij, R.R., Visser, R.G.F., Ponstein, A.S., Jacobsen, E. and Feenstra, W.J. 1991. Sequence of the structural gene for granule bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum L.*) an evidence of a single point deletion in the *amf* allele. *Molecular General Genetics.* **228**, 240-248.

Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C. and Preiss, J. 1988a. Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana (L.) Heynh* lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant. Physiol.* **86**, 1131-1135.

Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C. and Preiss, J. 1988b. A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant. Physiol.* **88**, 1175-1181.

Lineback, D.R. 1984. The starch granule organization and properties. Bakers Digest. 17-21.

Montgomery, E.M., Sexson, K.R. and Senti, F.R. 1961. High amylose corn starch fractions. *Staerke* **6**, 215.

MacDonald, F. and Preiss, J. 1983. Solubilization of the starch-granule-bound starch synthase of *normal* maize kernels. *Plant Physiol.* **73**, 175-178.

MacDonald, F. and Preiss, J. 1985. Partial purification and characterization of granules-bound starch synthases from *normal* and *waxy* maize. *Plant Physiol.* **78**, 849-852.

Manners, D.J. 1989. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers* **11**, 87-112.

Matagne, R.F., Loppes, R. and Deltour, R. 1976. Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii:* biochemical and cytochemical approach with specific mutants. *J. Bact.* **126**, 937-950.

Matheson, K.N. and Welsh, L.A. 1988. Estimation and fractionation of the essentially unbranched (amylose) and branched (amylopectin) components of starches with concanavalin A. *Carbohydr. Res.* **180**, 301-313.

Meyer, K.H. 1942. Adv. Recent Developments in starch chemistry. *Adv. Colloid Sci.* **1**, 143-183.

Mayfield, S.P. and Kindle, K. 1990. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 2087-2091.

MacGrégor, A.W. and Morgan, J.E. 1984. Structure of amylopectins isolated from large and small strarch granules of *normal* and *waxy* barley. *Cereal Chem.* **61**, 222-228.

Manners, D.J. 1985. Starch. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. 575-591. PM Dey, RA Dixon (eds.). Academic Press, Orlando.

Manners, D.J. and Mathéson, N.K. 1981. The fine structure of amylopectin. *Carbohydr. Res.* 90-99.

Manners D.J. 1989. Recents developpments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers.* **11**, 87-112.

Mercier C. 1973. The fine structure of corn starches of various amylose-percentage: waxy, normal and amylomaize. *Staerke* **3**,78.

Mizuno, K., Kimura, K., Arai, Y., Kawasaki, T., Shimada, H. and Baba, T. 1992. Starch branching enzymes from immature rice seeds. *Journal Biochemistry* **112**, 643-651.

Morrison, W.R. and Karkarlas, J. 1990. Starch. Methods in plant biochemistry, **2**, 323-352. P.M. Dey (ed.). Academic Press, San Diego.

Morrison, W.R and Milligan, T.P. 1982. Lipids in maize starch. Maize: recent progress in chemistry and technology, 1-18. Inglett G.E. (ed.). Academic Press, New York.

Morell, M.K., Bloom, M., Knowles, V. and Preiss, J. 1987. Subunit structure of spinach leaf ADP-glucose pyrophophorylase. *Plant Physiol.* **85**, 185-187.

Montgomery, E.M., Sexson, K.R. and Senti, F.R. 1961. Hight amylose corn starch fractions. *Staerke* **6**, 215.

Monroe, J.D. and Preiss, J. 1990. Purification of b-amylase that accumulates in *Arabidopsis thaliana* mutants defective in starch metabolism. *Plant Physiol.* **94.** 1033-1039

Moreno, S., Cardini, C.E. and Tandecarz, J.S. 1987. α-glucan synthesis on a protein primer, uridine diphosphoglucose:protein transglucosidase. I-Separation from starch synthetase and phosphorylase and a study of its properties. *Eur. J. Biochem.* **157**, 539-545.

Müller-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L. 1992. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tubers formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO Journal* **11**, 1229-1238.

Murdoch, K.A. 1992. The amylose iodine complexe. *Carbohydr. Res.* **233,** 161-174.

Nelson, O.E. and Rines, H.W. 1962. The enzymatic deficiency in the *waxy* mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 297-300.

Nelson, O.E., Chourey, P.S. and Chang, M.T. 1978. Nucleoside diphosphate sugar-starch glucosyl transferase activity of *wx* starch granules. *Plant Physiology* **62**, 383-386.

Nakano, K. and Fukui, T. 1986. The complete amino-acid sequence of potato α-glucan phophorylase. *J. Biol. Chem.* **261**, 8230-8236.

Ozbun, J.L., Hawker, J.S. and Preiss, J. 1971. Multiple forms of α-1,4-glucan synthetase from spinach leaves. *Biochemical Biophysical Res. Comm.* **43**, 631-636.

Ozbun, J.L., Hawker, J.S. and Preiss, J. 1972. Soluble adenosine diphophate glucose-α-1,4-glucan α-4-glucosyl transferases from spinach leaves. *Biochemical Biophysical Res. Comm.* **43**, 631-636.

Ozbun, J.L., Hawker, J.S., Greenberg, E., Lammel, C. and Preiss, J. 1973. Starch synthetase, phosphorylase, ADPglucose pyrophosphorylase and UDPglucose pyrophosphorylase in developing maize kernels. *Plant Physiol.* **74**, 324-328.

Peat, S., Whelan, W.J. and Thomas, G.J. 1952. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XVII. Z-Enzyme. *J. Chem. Soc.* **1**, 722-733.

Peat, S., Whelan, W.J. and Thomas, G.J. 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., Ardila, F. and Akasawa, T. 1991. ADP-Glucose transport by the chloroplaste adenylate translocator is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiol.* **97**, 1565-1572.

Preiss, J. 1982. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. Annual Review of *Plant Physiology*. **54**, 431-454.

Preiss, J. 1988. Biosynthesis of starch and its regulation. The biochemistry of plants **3**, 371-423. Preiss (ed.), Academic Press.

Preiss, J. 1991. Starch: biosynthesis and its regulation. Oxford Surveys of Plant Molecular and *Cell* Biology, **7**, 59-114. J. Miflin (ed.).

Preiss, J; and Boyer, C.D. 1980. Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzyme and starch synthases. Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization. 161-174. Marshall, JJ (eds). Academic Press, New York.

Preiss, J. and Levi, C. 1980. Starch biosynthesis and degradation. The biochemistry of plants. **3**, 371-423.

Preiss, J. and Sivack, M. 1994. Starch synthesis in sinks and sources. Photoassimilate distribution in plants and crops: source-sink relation-ships.

Section A. E. Zamski and A. Schaffer (eds.)

Pollock, C.J. and Preiss, J. 1980. The citrate stimulated starch synthase of starchy maize kernels. *Arch. Biochemistry Biophysics* **204**, 578-588.

Recondo, E.F. and Leloir, L.F. 1961. Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 85-88.

Rhode, W., Becker, D. and Salamini, F. 1988. Structural analysis of the *waxy* locus from *Hordeum vulgare*. *Nucleic Acids Research.* **16**, 7185-7186.

Robin, J.P., Mercier, C., Charbonniere, R. and Guilbot, A. 1974. Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residue from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal. Chem.* **51**, 389.

Salehuzzaman, S.N.I.M., Jacobsen, E. and Visser, R.G.F. 1993. Isolation and characterization of cDNA encoding granule-bound starch synthase in cassava (Manihot esculenta Crantz) and its antisense expression in potato. Plant Molecular Biol. **23**, 947-962.

Schächtele and Steup 1986. α–1,4 glucan phosphorylase forms from leaves of spinach (*Spinacea oleracea L.*). I.-In situ localization by indirect immunoflurescence. *Planta* **167**, 444-451.

Shannon, J. and Gardwood, D. 1984. III. Genetics and physiology of starch development. Starch: chemistry and physiology, 25-85. R. Whistler, J. Bemiller and E. Paschall (eds.). Academic Press, Orlando, Florida.

Shannon, J. 1992. Compartimentation of carbohydrates intermediates in the endosperme of starch deficient maize genotypes. Inter. Meeting ASSP Mineapolis. Minnesota.

Shimada, H., Tada, Y., Kawasaki, T. and Fujimura, T. 1993. Antisense regulation of the rice *waxy* gene expression using a PCR-amplified fragment of the rice genome reduces the amylose content in grain starch. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 665-672.

Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N. 1983. Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. *Cell* **35**, 235-242.

Sivak, N.M. and Preiss, J. 1994. Starch synthesis in seeds. Seed development and germination. M. Negbi, J. Kigel and G. Galili (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York.

Sivak, M.N., Wagner, M. and Preiss, J. 1993. Biochemical evidence for the role of the *Waxy* protein from pea (*Pisum sativum L.*) as a granule bound starch synthase. *Plant Physiol.* **103**, 1355-1359.

Smith, D.A. 1988. Some properties of starch branching enzyme from indica rice endosperm (*Oriza sativa L.*) *Plant Sci.* **57**, 1-8.

Smith, A.M., Bettey, M. and Bedford, I.D. 1989. Evidence that the rb locus alters the starch content of developing pea embryos through an effect on ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology*. **89**, 1279-1284.

Smith-White, B.J. and Preiss, J. 1992. Comparaison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Mol. Ev.* **34**, 449-464.

South, J.B., Morrison, W.R. and Nelso, O.E. 1991. A relationship between the amylose and lipids contents of starches from various mutants for amylose content in maize. *J. Cereal Sci.* 14, 267.

Stark, D.A., Timmerman, K.P., Barry, G.F. Preiss, J. and Kishore, G.M. 1992. Role of ADP-glucose pyrophosphorylase in regulating starch levels in plant tissues. *Science* **57**, 1-8.

Stinard, P.S., Robertson, D.S. and Schnable, P.S. 1993. Genetic isolation, cloning, and analysis of a mutator-induced, dominant antimorph of the maize *amylose-extender 1* locus. *Plant Cell* **5**, 1555-1566.

Sullivan, T., Strelow, L; Illingworth, C., Phillips, R. and Nelson, O. 1991. Analysis of maize *Brittle-1* alleles and a defective suppressor-mutator-induced mutable allele. *Plant Cell* **3**, 1337-1348.

Steup, M. 1988. Starch degradation. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. **14**, 255-296. J. Preiss (ed). Academic Press, San Diego, California.

Takeda, Y., Guan, H.P. and Preiss, J. 1993. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* **240**, 253-263.

Takeda, Y. and Hizukuri, S. 1987. Structures of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydr. Res.* **168**, 79-88.

Takeda, Y. and Hizukuri, S. 1989. Structures of indica rice starches (IR48 and IR64) having intermediate affinities for iodine. *Carbohydr. Res.* **187**, 287-294.

Takeda, C., Takeda, Y. and Hizukuri, S. 1993. Structure of the amylopectin fraction of the amylomaize. *Carbohydr. Res.* **246**, 273-281.

Takeda, C., Tomooka,S. and Hizukuri, S. 1993. Structure of branched and linear molecules of rice. *Carbohydr. Res.* **246**, 267-272.

Takeda, Y. and Preiss, J. 1992. Structure of B90 (*sugary*) and W64A (*normal*) maize starches. *Carbohydr. Res.* **240**, 265-275.

Takeda, Y., Shirasaka, K. and Hizukuri, S. 1984. Examination of the purity and structure of amylose by gel-permeation chromatography. *Carbohydr. Res.* **132**, 83-92.

Takeda, Y. and Hizukuri, S. 1986. Purification and structure of amylose from rice starch. *Carbohydr. Res.* **148**, 299-308.

Tam L.W and Lefevre 1993. Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhartii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics* **135**, 375-384.

Tandecarz, J., Lavitman N. and Cardini C. 1975. Biosynthesis of starch. Formation of a glucoproteic acceptor by a Potato non-sedimentable preparation. *Biochim. Biophys. Acta.* **399**, 345-355.

Thorn, W. and Mohazzeb, S. 1990. α-D-polyglucan-iodine complexes. *Starch/Staerke* **42**, 455-459.

Thorn, W. and Mohazzeb, S. 1990. Molecular weights, lengths, and distribution of side-chain in a-D-polyglucanes. *Starch/Staerke* **42**, 373-376.

Tsai, C.Y. 1974. The fonction of the *waxy* locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical Genetics.* **11**, 83-96.

Tsai, C.Y. and Nelson, O.E. 1966. Starch deficient mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* **151**, 341-343

Vos-Spcheperkeuter, G.H., DeBoer, W. Visser, R.G.F., Feenstra, W.J. and Witholt, B. 1986. Identification of granule-bound starch synthase in potato tubers. *Plant Sci.* **64**, 185-192.

Whistler, R.L. and Daniel, J.R. 1984. Molecular structure of starch. Starch: chemistry and technology 153-182. RL Whistler, JN BE Miller, EF Paschall (eds.). Academic Press, New York.

Wolf, M.J., MacMasters, M.M., Hubbard, J.E. and Rist, C.E. 1948. Comparaison of corn starches at various stages of kernel maturity. *Cereal Chem.* **25**, 312-315.

Yamaguchi, M., Kainuma, K. and French, D. 1979. Electron Microscopic observations of *waxy* maize starch. *Ultrastr. Res.* **69**, 249-261.

Yamanouchi, H. and Nakamura, Y. 1992. Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-enzyme) in rice. *Plant Cell Physiol.* **33**, 985-981.

Yano, M., Okuno, J., Kawakami, J., Satoh, H. and Omura, T. 1985. High amylose mutants of rice, *Oryza sativa L. Theor. Appl. Genet.* **69**, 253-257.

Yeh, J.Y., Gardwood, D.L. and Shannon, J.C. 1981. Characterization of starch from maize endosperm mutants. *Starch / stärke* **33**, 222-230.

Yuan, R.C., Thompson, D.B., and Boyer, C.D. 1993. Fine structure of amylopectin in relation to gelatinisation and retrogradation behaviour of maize starches from three *wx*-containing genotypes in two inbred lines. *Cereal. Chem.* **70** (1), 81-89.

Yun, S.H. and Matheson, N.K. 1993. Structures of the amylopectins of *waxy*, *normal, amylose-extender,* and *wx:ae* genotypes and of the phytoglycogen of maize. *Carbohydr. Res.* **243**, 307-321.

Liste des illustrations:

Figure 1: Représentation schématique de l'amylose. **10**

Tableau 1: Caractéristiques et propriétés générales de l'amylose et de **l'amylopectine** **11**

Figure 2: Représentation hypothétique définissant les chaînes A, B et C de **l'amylopectine** **12**

Figure 3: Les modèles représentant l'arrangement des chaînes dans la structure en grappe de l'amylopectine; **13**

Figure 4: Définition des chaînes Ba et Bb selon Hizukuri. **14**

Figure 5: Le modèle en double hélice de l'amylopectine (Imberty et coll., 1991). **14**

Tableau 2: Interaction d'oligomères linéaires de degrés de polymérisation différents avec l'iode (Banks et coll., 1971). **16**

Figure 6: Les domaines d'absorption des interactions polysaccharide-iode. **16**

Figure 7: Représentation du phytoglycogène du mutant *su-1*. **21**

Figure 8: L'alternance des régions amorphes et cristallines au sein du grain d'amidon. **24**

Figure 10: Schéma général du métabolisme de l'amidon. **26**

Tableau 3: Caractéristiques des amidon synthétases liées (GBSS). **31**

Tableau 4: Caractéristiques des amidon synthétases solubles (SSS). **33**

Figure 11: Schéma proposé pour le métabolisme du carbone; dans les tissus photosynthétiques et dans les tissus de réserve. **38**

Tableau 5: Défectuosités liées aux mutations dans la voie de biosynthèse de l'amidon chez le maïs. **40**

Tableau 6: Conséquences de certaines mutations sur la nature des polysaccharides accumulés. **41**

Figure 12: Représentation schématique des épistasies contrôlant la synthèse des différents polysaccharides. **49**

Figure 13: Représentation schématique de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. **50**

Figure 14: Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii*. **50**

Tableau 7: Les loci identifiés chez *Chlamydomonas reinhardtii* dans la voie de biosynthèse de l'amidon. **54**

Figure 15: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration HW50 du glucidex 6. **69**

Tableau 8: Répartition des oligo et polysaccharides du Glucidex 6 et du Glucidex 19 (Roquette Frères). **69**

Figure 16: Coloration après vaporisation d'iode des souches mutantes et de la souche sauvage cultivées en milieu carencé en azote. **77**

Tableau 10: Caractérisation biochimique préliminaire des souches mutantes ML. **78**

Tableau 11: Dosage du polysaccharide soluble. **79**

Tableau 12: Dosage d'activité amidon synthétase soluble. **80**

Tableau 13: Cinétiques des activités solubles. **80**

Figures 17: Zymogrammes d'activité soluble en présence et en absence de citrate. **81**

Figure 18: Coloration à l'iode de ségrégeants issus du croisement entre la souche ML6 et la souche sauvage 37. **83**

Tableau 14: Résultats de l'analyse des croisements entre des souches mutantes ML et la souche sauvage 37. **84**

Figure 19: Coloration à l'iode des spores constituant les tétrades issues du croisement entre la souche ML1 et la souche sauvage 37. **85**

Figure 20: Coloration à l'iode des diploïdes issus de différents croisements entre une souche ML et la souche B20 portant la mutation *sta-2-1*. **86**

Tableau 15: Résultats de l'analyse des croisements entre les souches mutantes T1R, R26 et R37 et la souche compatible 18B ou B20 portant la mutation *sta-2-1*. **87**

Tableau 16: Dosage d'activité amidon synthétase liée. **89**

Tableau 17: Cinétique d'activité amidon synthétase liée. **89**

Figure 21: Gel d'électrophorèse SDS des protéines extraites de l'amidon de la souche sauvage et des souches mutantes T1R, R26, 18B, R37 et R15. **90**

Tableau 18: Détermination de la quantité moyenne d'amidon dans les descendants mutants et rapportée à la moyenne obtenue pour les descendants sauvages issus du même croisement. Détermination de la λ max moyen du complexe polysaccharide-iode sur ces mêmes descendants. **91**

Figure 22: Coloration à l'iode des descendants issus du croisement entre la souche I154 et la souche R26. **92**

Tableaux 19: Résultats de l'analyse des croisements entre des souches portant différentes mutations *sta-2* et les mutants *sta-3*. **93**

Tableau 20: Détermination de la quantité moyenne d'amidon des descendants mutants et rapportée à la moyenne obtenue pour les descendants sauvages issus du même croisement. Détermination de la λ max moyen du complexe polysaccharide-iode sur ces mêmes descendants. **94**

Figure 23: Relation entre l'activité GBSS résiduelle, la quantité d'amidon et la λ max du complexe polysaccharide-iode des doubles mutants. **95**

Figures 24: Profils obtenus par gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche sauvage et des souches I152, T1R, R15, R26 et R37. **96**

Figures 25: Profils obtenus par gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche sauvage et des souches T1J, S8 et K37B43. **97**

Figure 26: Evolution de la λ max du complexe polysaccharide-iode des amidons mutants et de l'amidon sauvage soumis à la synthèse *in vitro*. **98**

Figure 27: Profils obtenus par gel filtration TSK HW75 de l'amidon de la souche sauvage et des souches T1R et R26 avant et après synthèse *in vitro*. **99**

Figure 28: Séparation des constituants de l'amidon sauvage par chromatographie de gel filtration HW75. **101**

Figures 29: Analyse par RMN des deux types d'amylopectines purifiées par gel filtration TSKHW75: amylopectine 1, amylopectine 2 et amylopectine de la souche I152. **102**

Figures 30: Profils obtenus par chromatographie de gel filtration TSKHW50 des sous fractions débranchées: amylopectine 1, amylopectine 2, amylose sauvage et amylopectine de la souche I152. **104**

Figures 31: Profils obtenus par chromatographie HPAE des chaînes débranchées de courte taille; de l'amylopectine 1, de l'amylopectine 2 et de l'amylopectine de la souche I152. **105**

Figure 32: Les modèles mutuellement exclusifs de l'élaboration de la molécule d'amylopectine. **107**

Figures 33: Gel d'électrophorèse SDS des protéines liées au grain et caractérisation moléculaire de l'interruption *sta-2-Δ1*. **109**

Tableau 22: Résultats de l'analyse du croisement entre la souche BAFR1 et la souche 37E17 portant la mutation *sta-3-1*. **110**

Figure 34: Coloration à l'iode des descendants issus du croisement entre la souche BAFR1 et la souche 37E17. **111**

Tableau 23: Détermination de la quantité moyenne d'amidon des descendants mutants et rapportée à la moyenne obtenue pour les descendants sauvages issus du croisement entre la souche BAFR1 et la souche 37E17. Détermination de la λ max moyen du complexe polysaccharide-iode sur ces mêmes descendants. **112**

Figure 35: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration TSKHW75 de l'amidon de la souche BAFR1 portant l'interruption *sta-2-Δ1*. **113**

Figure 36: Profil obtenu par chromatographie de gel filtration TSKHW75 de l'amidon de la souche IJ2 portant les mutations *sta-2-Δ1 et sta-3-1.* **115**

Figures 37: Spectres RMN de l'amidon de la souche BAFR1 et du double mutant IJ2 purifiés par gel filtration TSKHW75 et du glycogène de foie de lapin. **116**

Tableau 24: Rapports molaires des éthers méthyliques obtenus après méthylation de l'amidon de la souche BAFR1 et du double mutant IJ2 purifiés par gel filtration TSKHW75 et du glycogène de foie de lapin. **117**

Figures 38: Profils obtenus par chromatographie de gel filtration TSKHW50 des polysaccharides débranchés purifiés par gel filtration de l'amylopectine de type 1 sauvage, de l'amidon des souches mutantes BAFR1 et IJ2 et du glycogène de foie de lapin. **118**

Tableau 25: Distribution (en % de glucose) selon leur taille des chaînes débranchées par l'isoamylase des fractions purifiées de l'amylopectine 1 sauvage et de l'amidon des souches mutantes BAFR1, IJ2 et du glycogène de foie de lapin. **118**

Figure 39: Profils obtenus par chromatographie HPAE des chaînes débranchées de courte taille de l'amylopectine 1 sauvage, de l'amylopectine de la souche I152, de l'amidon des souches BAFR1 et IJ2 et du glycogène de foie de lapin. **119**

Figures 40: Microscopie électronique des cellules en carence en azote de la souche sauvage et des souches mutantes IR16, IV33 et IJ2; **121**

Figure 41: Zymogramme d'activité soluble réalisé en absence et en présence de citrate. **121**

Figure 42: Profils obtenus par gel filtration HW50 de l'amidon du double mutant IJ2 et du glycogène. **122**

Tableau 26: Sensibilité du polysaccharide soluble purifié par gel filtration du double mutant IJ2 et du glycogène de foie de lapin à différentes enzymes de dégradation. **124**

Figure 43: Chromatographie couche mince en gel de silice des produits de digestion par l'α-amylase et la β-amylase du polysaccharide soluble du double mutant IJ2 et du glycogène de foie de lapin. **124**

Figure 44: La nomenclature des chaînes de l'amylopectine selon le modèle de Hizukuri. **125**

Figure 45: Représentation schématique de l'arrangement des molécules d'amylopectine à l'intérieur d'un cercle de croissance semi-cristallin. **129**

Figure 46: La structure en grappe de l'amylopectine. **129**

Figure 47: Le mécanisme proposé par Jenkins et coll. (1994) relatif à l'intervention de la GBSS sur la fraction cristalline des grappes de l'amylopectine. **131**

Figure 48: Modèle proposé relatif à l'intervention de la GBSS sur la cristallinité des grappes de l'amylopectine. **132**

Figure 49: Distribution des courtes chaînes débranchées des α-glucanes isolés de *E. coli* (Guan et coll., 1994). **138**

Figure 50: Distribution des courtes chaînes débranchées du polysaccharide granulaire du mutant IJ2. **138**

Figure 51: Modèle représentant les différentes étapes de l'élaboration de la structure en grappe de l'amylopectine. **142**

Annexe: Synthèse *in vitro*:

Figure 1: Effet de la concentration en amidon sur la synthèse *in vitro* en présence d'ADP-Glc. **145**

Figure 2: Effet de la concentration en amidon sur la synthèse *in vitro* en présence du tampon Glycylglycine et d'ADP-Glc. **145**

Figure 3: Effet de la concentration en ADP-Glc sur la synthèse *in vitro*; **145**

Figure 4: Influence de l'agitation sur la synthèse *in vitro*. **146**

Figure 6: Profil obtenu par chromatographie gel filtration HW75 de l'amidon incubé à pH 8,2; **146**

Figure 7: Profil obtenu par chromatographie gel filtration HW75 de l'amidon incubé à pH 9,2; **147**

Figure 8: Profil obtenu par chromatographie gel filtration HW75 de l'amidon incubé à pH 9,8; **147**

Figures 9 et 10: Répartition de la radioactivité incorporée dans les fractions issues de la chromatographie gel filtration HW75 de l'amidon incubé en présence d'ADP-Glc C^{14}. **148**

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
© 1994 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Vol. 269, No. 40, Issue of October 7, pp. 25150–25157, 1994
Printed in U.S.A.

Toward an Understanding of the Biogenesis of the Starch Granule

DETERMINATION OF GRANULE-BOUND AND SOLUBLE STARCH SYNTHASE FUNCTIONS IN AMYLOPECTIN SYNTHESIS*

(Received for publication, May 11, 1994, and in revised form, July 19, 1994)

Marie-Lise Maddelein, Nathalie Libessart‡, Fabienne Bellanger, Brigitte Delrue, Christophe D'Hulst, Nathalie Van den Koornhuyse, Thierry Fontaine, Jean-Michel Wieruszeski, André Decq, and Steven Ball§

From the Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS 111, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France and ‡Roquette Frères, F62136 Lestrem, France

Plant starch synthesis can be distinguished from those of bacterial, fungal, and animal glycogen by the presence of multiple elongation (starch synthases) and branching enzymes. This complexity has precluded genetic assignment of functions to the various soluble starch synthases in the building of amylopectin. In *Chlamydomonas*, we have recently shown that defects in the major soluble starch synthase lead to a specific decrease in the amount of a subset of amylopectin chains whose length ranges between 8 and 40 glucose residues (Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Delrue, B., Van Den Koornhuyse, N., Bossu, J.-P., Fournet, B., and Ball, S. G. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 16223–16230). We now demonstrate that granule-bound starch synthase, the enzyme that was thought to be solely responsible for amylose synthesis, is involved in amylopectin synthesis. Disruption of the *Chlamydomonas* granule-bound starch synthase structural gene establishes that synthesis of long chains by this enzyme can become an absolute requirement for amylopectin synthesis in particular mutant backgrounds. In the sole presence of soluble starch synthase I, *Chlamydomonas* directs the synthesis of a major water-soluble polysaccharide fraction and minute amounts of a new type of highly branched granular material, whose structure is intermediate between those of glycogen and amylopectin. These results lead us to propose that the nature of the elongation enzyme conditions the synthesis of distinct size classes of glucans in all starch fractions.

Starch is a huge complex quaternary structure made of α glucans that accumulate in the chloroplast of the leaf (transient starch) or the amyloplast of the plant storage tissue cell. The polysaccharide is usually defined as a mix of two distinct fractions: amylopectin and amylose. Amylopectin, the major compound, is composed of intermediate size α(1→4)-linked glucans (the A and B1 chains) that are clustered together and hooked to longer spacer glucans (the B2, B3, and B4 chains) by α(1→6) linkages (Hizukuri, 1986). Amylose is often referred to as a smaller linear molecule with very few α(1→6) branches (for review, see Manners (1989)). ADP-glucose is now firmly established as the sole precursor for starch synthesis and ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27) as the rate-limiting step in the pathway (Tsai and Nelson, 1966; Lin *et al.*, 1988; Müller-Röber *et al.*, 1992). The finding of enzyme activities in plants capable either of transferring glucose from the nucleotide sugar to the non reducing end of glucans in α(1→4) position (starch synthases) (EC 2.4.1.21) or of enzymes capable of transferring whole segments of the linear molecules in α(1→6) position (branching enzymes) (EC 2.4.1.18) is another historical landmark in the study of starch biosynthesis (for review, see Preiss (1991)). In all plant systems analyzed to date, from *Chlamydomonas* to maize, the synthesis of amylose has been shown both *in vivo* (Nelson and Rines, 1962; Visser *et al.*, 1991; Delrue *et al.*, 1992) and *in vitro* (Leloir, 1961; Baba *et al.*, 1987) to rely on the action of granule-bound starch synthase (GBSS),[1] the major protein associated with the granule. Waxy mutants defective for this activity lack the amylose fraction, and by default the remaining polysaccharide was assumed to be pure wild-type amylopectin. In *Chlamydomonas* we have shown that mutants carrying defects in the *ST-2* (waxy) gene lack not only amylose but also a fraction of high molecular weight material that displays a level of branching approaching that of the wild-type amylopectin (Delrue *et al.*, 1992). Meanwhile, biochemical and genetic studies performed on *st-3*-carrying mutants defective in one of the two *Chlamydomonas* soluble starch synthases showed that this enzyme (SSII) is necessary for the maintenance of the intermediate size glucans of the amylopectin clustered chains (Fontaine *et al.*, 1993). In absence of this activity the amylopectin is enriched in long glucans and in very short glucose stubs (chain length < 9). In this paper we report that GBSS is responsible for the building of the long glucan backbone in this amylopectin. This backbone includes a substantial number of B4 and B3 chains, according to the nomenclature adopted by Hizukuri (1986) further demonstrate that these long chains are not necessary to obtain full amylopectin synthesis. We show that in absence of the two other synthases, the residual activity (soluble starch synthase I) builds a new type of granular structure intermediate between glycogen and starch.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—[U-^{14}C]Glucose 1-phosphate and [*D-glucose*-U-^{14}C]adenosine diphosphate glucose were purchased from Amersham Corp.

* This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Education Nationale, by the CNRS (Unité Mixte de Recherche du CNRS 111; Director André Verbert), and by a special grant from the starch processing company Roquette Frères (Lestrem-France). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 20-43-65-43; Fax: 20-43-65-55.

[1] The abbreviations used are: GBSS, granule-bound starch synthase; SSII; soluble starch synthase II; SSI soluble starch synthase I; DP, degree of polymerization; HPAE-PAD, high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection; λ_{max}, maximal absorbance wavelength of the iodine polysaccharide complex; WSP, water-soluble polysaccharide; GPC, gel permeation chromatography.

ADP-glucose, maize amylopectin, and *Pseudomonas amyloderamosa* 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 reference strains of *Chlamydomonas reinhardtii* used in this study wild-type with respect to starch were 137C (*mt⁻ nit-1 nit-2*), 37 (*mt⁺ pab-2 ac-14*), and 330 (*mt⁺ cw-15 arg-7-7 nit-1 nit-2*), which was used for transformation. I152, 18B, and 25B are independent mutants directly derived from strain 137C by mutagenesis and carry the *st-3-1* (I152), the *st-2-1* (18B), and the *st-2-2* (25B) mutant alleles. B9 is a meiotic recombinant strain of *mt⁺ pab-2 ac-14 st-3-1* genotype. 44 low starch mutant strains (ML1–ML44) out of 80,000 colonies screened were selected using the iodine stain after mutagenizing strain I152 with UV light (5% survival) as described in Delrue *et al.* (1992). Genetic techniques used have been described by Harris (1989a). All the strains used to generate Fig. 2 are meiotic products obtained by crossing the various strains listed above. Quantifications and structural analyses were always performed on this progeny in order to avoid interference of background mutations. Standard media have been fully detailed by Harris (1989b), while growth conditions, nitrogen-starved media, and diploid clone selection have been described by Ball *et al.* (1990, 1991) and Delrue *et al.* (1992).

Electron Microscopy—Fixation and embedding protocols are those described by Harris (1989c).

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 λ_{max} measures can be found in Delrue *et al.* (1992).

Crude Extract Preparation, Enzyme Assays, Partial Purification of Enzyme Activities, and Zymograms—Soluble crude extracts were always prepared from late log phase cells ($2 \cdot 10^6$ cells·ml^{-1}) grown in HSA (High Salts Acetate) under continuous light (80 microeinsteins·m^{-2}·s^{-1}). The detailed description of the differential $(NH4)_2SO_4$ precipitation of SSI and SSII together with the anion exchange purification on DEAE-Trisacryl type M of those enzyme activities can be found in Fontaine *et al.* (1993). Soluble starch synthase activity was assayed in a 0.1-ml final volume of 50 mM glycine NaOH (pH 9), 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM β-mercaptoethanol, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mg of bovine serum albumin·ml^{-1}, 10 mg of rabbit liver glycogen·ml^{-1}, 4 mM ADP-glucose containing 1 nmol of [U-^{14}C]ADP-glucose (specific activity 200 μCi·μmol^{-1}). After 15 min of incubation at 30 °C, the reaction was stopped by adding 2 ml of ice-cold ethanol. GBSS was assayed as described by Delrue *et al.* (1992). Branching enzymes were always assayed on the same DEAE chromatograms by incubating up to 40 μl of sample in a 0.2-ml final volume of 0.1 M sodium citrate (pH 7.0), 1 mM AMP, 40 μg of rabbit liver phosphorylase containing 50 mM [U-^{14}C]glucose 1-phosphate (final specific activity 0.22 μCi·μmol^{-1}). After a 30-min incubation at 30 °C, the reaction was stopped by 10% trichloroacetic acid precipitation on ice. The resulting precipitate was filtered, rinsed, dried, and counted in a liquid scintillation counter (assay A) as described by Thon *et al.* (1992). The two partially (from 35- to 80-fold) purified branching enzyme peak fractions were further characterized by monitoring the branching of amylose (1 mg·ml^{-1}) in 0.1 M sodium citrate (pH 7), after adjusting the amount of enzyme activity to equal amounts using assay A (Krisman *et al.* (1985)). Under these conditions, the first peak eluting from the column decreased the amylose λ_{max} from over 620 nm down to 570 nm in 18 h of incubation, while the second peak branched the polysaccharide down to a λ_{max} of 530 nm. None of these properties were altered in strains IJ2 and I152 relative to the wild-type 137C strain. The absence of amylase activity in the peak BE fractions was checked by using the standard assay described by Ball *et al.* (1991). For zymograms, soluble crude extracts were prepared as described above and were further cleared by centrifugation at 20,000 × *g* for 30 min at 4 °C. Proteins were measured immediately using the Bio-Rad protein assay kit. From 20 to 60 μg of total proteins were loaded on a 30:1, 7.5%, 0.75-mm-thick, native polyacrylamide gel containing 4 mg of rabbit liver glycogen·ml^{-1}. Electrophoresis was carried out in the cold (4 °C) at 30 V/cm for 90 min, using the Mini-PROTEAN II cell (Bio-Rad) and 2.5 mM Tris-glycine (pH 8.3) buffer. The gel was incubated between 4 and 12 h at room temperature in a minimal volume of the starch synthase assay mixture described above but without glycogen and with 2 mM final cold ADP-glucose. An equally sensitive zymogram assay can be performed by using amylose as external primer and extra thin Phast-System native gels as described by Fontaine *et al.* (1993). However, amylose-primed zymograms allow the detection of SSII only.

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 dialyzed 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). The branching percentage was assayed as the ratio of methyl ether derivatives of α(1→4)-linked Glc either to those of α(1→4) and α(1→6)-linked Glc or to those of Glc in terminal non-reducing position (Delrue *et al.*, 1992; Fontaine *et al.*, 1993).

NMR—NMR analysis was performed as described by Fontaine *et al.* (1993). The level of branching was estimated by integration of the same regions of proton resonances of the mono- and disubstituted glucose (δ ~5.2 and 4.85 parts/million, respectively) (Gidley, 1985).

Debranching Analysis—Isoamylase-mediated debranching of GPC-purified fractions was achieved as described previously (Fontaine *et al.*, 1993) with the following modifications. After completion of the debranching reaction, samples were kept at 80 °C in 10% Me_2SO to avoid retrogradation of the long glucans into insoluble material. Half of the debranched polysaccharide was subjected to TSK HW-50(F) chromatography using a 50-cm-long column (inner diameter, 1.6 cm) fed by 10% Me_2SO (30 ml/h flow rate). The other sample half was subjected to desalting using a TSK-HW-40(S) chromatographic step as described previously (Fontaine *et al.*, 1993). The pooled fractions were subjected to high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD) on a Carbo-Pac PA-100 column as fully described by Fontaine *et al.* (1993).

Water-soluble Polysaccharide: Assays and Sizing—As for starch purification, WSP was prepared from nitrogen-limited (8 mg of $(NH_4)_2SO_4$·liter^{-1}) cultures, inoculated at 10^5 cells·ml^{-1}, harvested after 5 days of growth under continuous light (80 microeinsteins·m^{-2}·s^{-1}) in otherwise HSA medium. Algae were ruptured by sonication at a density of 10^8 cells·ml^{-1} in 10 mM Tris (pH 7.5). A crude starch pellet was obtained by spinning the lysate at 2000 × *g* for 20 min. The pellet could then be further purified as described by Delrue *et al.* (1992) to yield pure starch while the supernatant was further cleared by spinning at 10,000 × *g* for 30 min at 4 °C. The crude soluble extract was immediately frozen and thawed after 24 h of storage. This treatment yielded an abundant membrane, chlorophyll, and cellular debris precipitate that could be conveniently spun out by two high speed (20,000 × *g*) centrifugations without loss of WSP. This supernatant was assayed with the starch determination kit from Boehringer after taking the hexose levels into account. In order to size this material, the crude soluble fraction yielded by 5 liters of culture was evaporated down to 1 ml, adjusted to 10% Me_2SO, and loaded on a TSK HW-50 column as described above. A DP scale was generated on the column by using the glucan ladders Glucidex 12, 19, and 6. The controlled α-dextrins Glucidex were a gift from Roquette Frères (Lestrem, France). Tables describing the amount and size distribution of the dextrin mixtures can be obtained from Roquette Frères (Lestrem, France). The glucan ladder scale was in perfect accordance with that generated by the λ_{max} of the debranched glucans described above. The amount of glucan in each fraction was determined using the amyloglucosidase assay.

Transformation-mediated Gene Disruption—Standard glass bead-mediated transformation (Kindle, 1990) was performed on the cell wall-deficient, arginine-requiring strain 330 with 1 μg of pARG7.8 carrying the wild-type arginosuccinate lyase gene. Transformants were selected by complementation of the arginine auxotrophy present in the recipient strain. The transformants were screened for starch structure and amount by spraying iodine directly on replica plates (Fontaine *et al.*, 1993). The frequency of mutant selection in the starch pathway was in the order of 10^{-3}.

Genetic Analysis of the Disrupted Strains—Strain BAFR1 (*mt⁺ cw-15 arg-7-7 st-2-Δ1 nit-1 nit-2*), containing an unknown number of functional *ARG7⁺* copies due to pARG7.8 integration, was crossed with 37E17 (*mt⁻ pab-2 ac-14 st-3-1*). The segregants were picked at random and checked for all markers included in the cross. Only those crosses that yield impeccable segregations of all known markers are used. In such a cross the presence of one, two, or three functional unlinked *ARG⁺* loci of plasmid integration would lead, respectively, to 25, 12.5, or 6.25% *ARG⁻* recombinants.

RESULTS

Selection of Starch-defective Mutants—In an attempt to identify the genes responsible for amylopectin synthesis in a background where the major soluble starch synthase is defective, 44 strains were selected that accumulated less than 8 μg of starch·10^{-6} cells after UV mutagenesis of an *st-3-1*-carrying

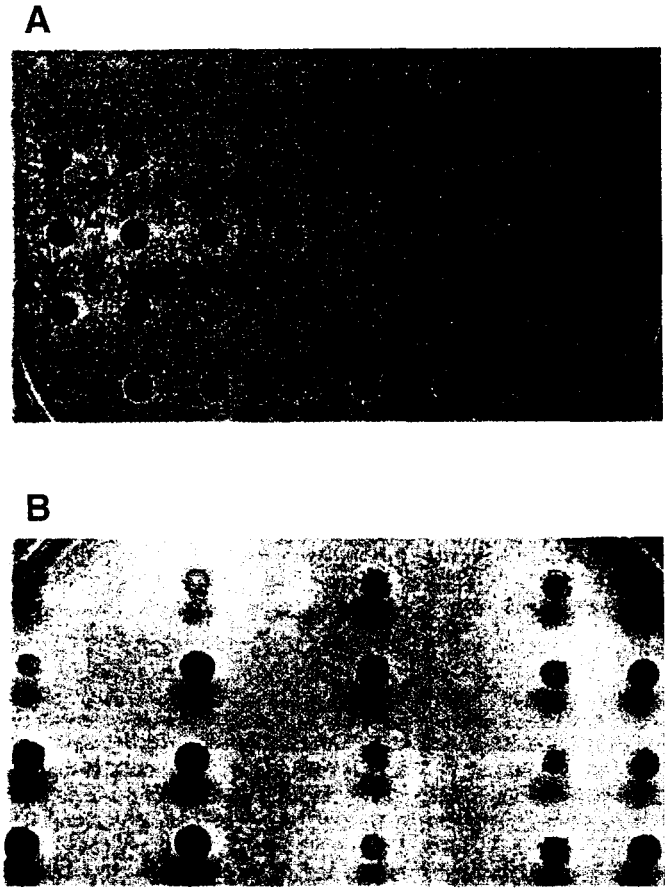


FIG. 1. **Genetic analysis of *Chlamydomonas* double mutants.** Iodine stain of cell patches incubated for 5 days in –N medium in the presence of acetate and light. *A*, *row 1* displays our reference strains with (from *left* to *right*): I7, a low starch (5%) mutant with defective ADP-glucose pyrophosphorylase (Ball *et al.*, 1991); I152, the high amylose (*olive staining*) mutant with defective soluble starch synthase, the amyloseless 18B (*red staining*) carrying a defect in the GBSS structural gene and the wild-type *blue staining* 137C reference. *Rows 2* and *4* represent the phenotype of 16 (ML1–ML16) of the 44 mutants selected after UV mutagenesis of the high amylose I152 strain. *Rows 3* and *5* display the diploids obtained after crossing the same 16 mutants with a suitable strain carrying the *st-2-1* mutation. This complementation test clearly shows that 14 out of 16 strains carry a defect in the *ST-2* gene. *B*, a cross was made between ML1 and wild-type strain 37. From *left* to *right*, *columns 1* (tetrad 1), *2* (tetrad 2), and *3* are four-spore tetrads; *columns 4* and *5* display a single eight-spore tetrad. Tetrads 1 and 2 are parental ditypes, while tetrads 3 and 4 represent, respectively, a tetratype and a non-parental ditype. The phenotype due to the new defect can thus be seen as the red staining colonies in a haploid wild-type background in tetrads 3 and 4.

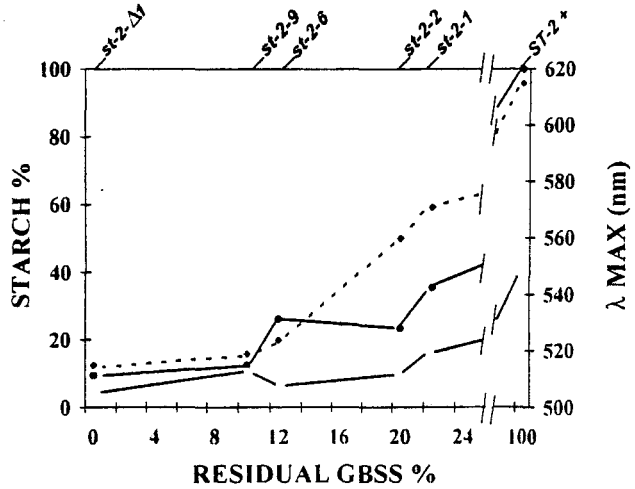
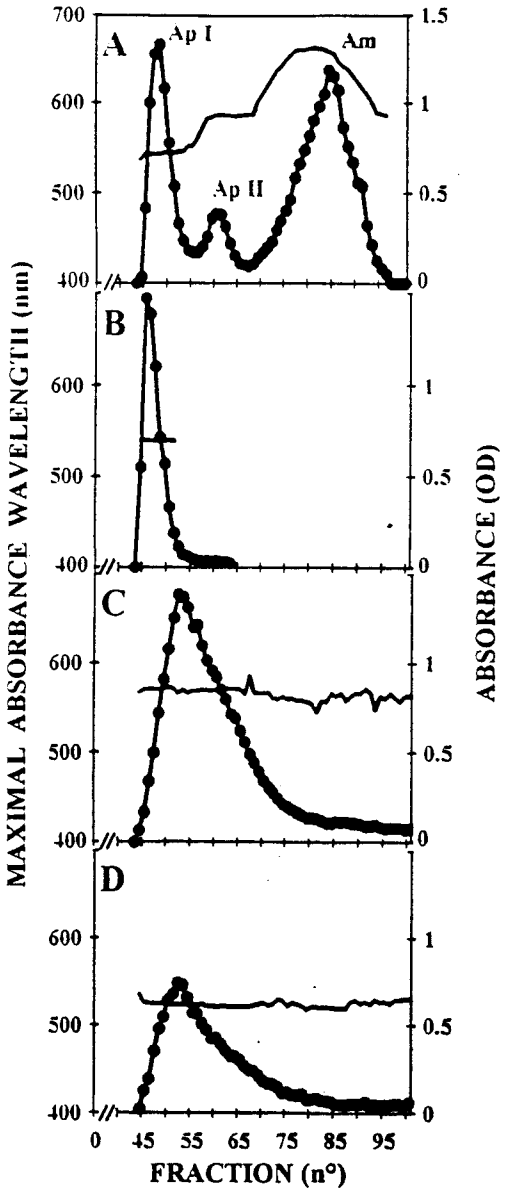


FIG. 2. **Starch content and amylopectin λ_{max} of mutants defective for both granule-bound and soluble starch synthase II.** Figure displays starch amounts and amylopectin λ_{max} of double mutants with the same *st-3-1* defect (leading to the absence of SSII activity) and with different *st-2* alleles leading to progressively more severe GBSS defects. Severity of the GBSS defect was reflected by the residual GBSS activity measured for each mutant allele. These residual activities are expressed as percentages of the wild-type GBSS V_m on the *x* axis. The position of each mutant allele on the V_m axis is indicated at the *top* of the figure. Starch levels and amylopectin λ_{max} were averaged in each case from four different strains of identical genotype. These are expressed as percentages both of the wild-type (○) and of the SSII-defective strain containing *st-3-1* (●). Amylopectin λ_{max} of double mutants is displayed as a *broken line* (◆). V_m and of K_m of GBSS were measured for each of the mutant *st-2* alleles in an *ST-3*$^+$ background. V_m is expressed as percentage of strain 137C (4 nmol of ADP-glucose incorporated into glucan/min/mg of starch). The wild-type K_m is 4 mM ADP-glucose (Delrue *et al.*, 1992). The K_m measured in the *st-2-1*, *st-2-2*, *st-2-6*, and *st-2-9* were found, respectively, at 24, 6, 19, and 43 mM.

strain (I152). We were surprised to find (Fig. 1) that 36 out of the 44 selected strains carried a single additional defect in the previously characterized GBSS structural gene (*ST-2*). Since 26 of these are independent mutants, we had thus defined a minimum of 26 new *st-2* alleles. Moreover we constructed strains carrying both *st-3-1* and the previously characterized *st-2-1* or *st-2-2* mutations by crosses (Fig. 2). In all cases the double mutants had less than 20% of wild-type starch amounts (Fig. 2), in most cases the downfall was spectacular (<10%), and in some cases we recorded the lowest values ever observed for *Chlamydomonas* in nitrogen-limited cells (0.9 ± 0.4 $\mu g \cdot 10^{-6}$ cells). We then subjected the starch of strains carrying either the single new *st-2* alleles or, in a few cases, the double *st-3 st-2* mutations to fractionating by gel filtration (Fig. 3). All recombinants tested carrying only the new *st-2* defects displayed analogous if not identical starch structures, that is, absence of both amylose and a high molecular weight branched material that we have named amylopectin type II (Fig. 3, *A* and *B*). The double mutants displayed no detectable amylose and an amylopectin of variable structure (as witnessed by the λ_{max}) ranging over a wide size range (Fig. 3, *C* and *D*). This epistasis of waxy-like mutations over other defects has also been observed in maize (Creech, 1965) (for review, see Shannon and Garwood (1984)). All of the new *st-2*-defective strains were impaired in granule-bound starch synthase, thus confirming our genetic data. However, the most defective strain isolated by UV mutagenesis still had 10% of the wild-type activity. This prompted us to use molecular techniques to disrupt the GBSS structural gene (see below). We thus obtained strains carrying the *st-2-Δ1* allele yielding no residual enzyme activity. Water-soluble glucans (WSP) were also assayed in wild-type and single or double mutant *Chlamydomonas* strains. Significant amounts (0.5 $\mu g \cdot 10^{-6}$ cells) of WSP accumulated in all *st-3-1*-carrying strains. Interestingly, this level rose to 1.5 $\mu g \cdot 10^{-6}$ cells in strains carrying an additional defect in the GBSS gene. Wild-type strains accumulated less than 0.1 $\mu g \cdot 10^{-6}$ cells. It is worth stressing that Fig. 2 shows a clear correlation between the decrease in residual GBSS activity displayed by strains carrying distinct *st-2* alleles and that of the λ_{max} of the double mutant starch. The latter is in all double mutants composed solely of amylopectin. This result thus suggests that the amount of GBSS activity correlates with that of the long glucan content in the amylopectin fraction.

Structural Characterization of a Novel Amylopectin Subfraction—Type II amylopectin accounts for 2–10% of the total wild-type starch. It is significantly branched and has been shown to be under GBSS control (Delrue *et al.*, 1992). We investigated the fine structure of this material both by NMR and by debranching the polysaccharide using *P. amyloderamosa*



3. **Separation of amylopectin and amylose on TSK-HW75 atography.** The optical density (●) was measured for each 3-ml ı at λ_{max}, while λ_{max} (expressed in nm) is displayed as an *unbro-n line*. All samples were loaded on the same column set-up as ed previously (Delrue *et al.*, 1992). The wild-type haploid 137C *panel A*) can be seen to carry the standard type I (*ApI*) and type ') amylopectins and amylose (*Am*). *Panel B* displays starch from BAFR1 disrupted for the GBSS structural gene (*ST-2*). *Panels C* re starch chromatograms from double mutant strains S8 (*st-2-2* and IJ2 (*st-2-Δ1 st-3-1*). The starch from these two strains dis-marked difference in its iodine interaction (λ_{max} of 560 and 520 pectively).

lase (Table I; Figs. 4*C* and 5*B*). Proton and ^{13}C NMR ı the presence of abundant branches typical of amylo-hat we had initially detected using methylation analy-the other hand, the ^{13}C spectrum places this material ser to amylose than that of the previously characterized tant amylopectin (Fontaine *et al.*, 1993). The level of ng detected by proton NMR is higher (5.8%) in type I haride than in type II amylopectin (3.6%). High per-e anion exchange chromatography and gel filtration of anched chains (Table I) show that amylopectin type II both very long amylose-like glucans and intermediate ain length 8–40) chains. Moreover, type II material abundant small glucans (chain length < 8), which are

TABLE I
Distribution of glucose weight percentages with respect to size of the isoamylase debranched chains prepared from GPC-purified starch fractions

Polysaccharide[a]	>90[b]	90–70	70–50	50–30	30–22	<22[c]
137C ApI	1	2	8	19	14	55
137C ApII	32	5	5	12	14	32
1152 (+ *st-3-1*) Ap	15	8	3	14	7	53
137C Am	53	12	3	12	4	16
1152 (+ *st-3-1*) Am	59	6	9	10	7	9
BAFR1 (*st-2-Δ1* +) Ap	0	3	4	22	17	54
IJ2 (*st-2-Δ1 st-3-1*) Ap	0	0	3	18	7	72
Rabbit liver glycogen	0	0	0	11	7	82

[a] Ap (amylopectin) and Am (amylose) were separately pooled after TSK-HW75 GPC, dialyzed, and freeze-dried. They were then debranched and subjected to TSK-HW50 GPC as described under "Experimental Procedures." The genotypes of the starting strains are listed between brackets. Starch was extracted from nitrogen-limited cells as described by Delrue *et al.* (1992). The chromatograms that enabled us to compute this table are shown in Fig. 7.

[b] >90 stands for all chains with DP over 90. 90–70 stands for chains whose DP are inferior to 90 and superior to 70. The values listed in the table are glucose weight percentages estimated by the amyloglucosidase assay.

[c] A more detailed chain length distribution for the small glucans can be seen in Fig. 5.

typically decreased in the major amylopectin species (Fontaine *et al.*, 1993) or in the amylopectin from granule-bound starch synthase-defective mutants (Fig. 5*D*). These small glucans are very similar to those found in single or double mutants defective for the *Chlamydomonas* soluble starch synthase II (Fig. 5, *C* and *H*) and can also be clearly seen in amylose (Fig. 5, *A* and *F*). It is worth stressing that they all have a characteristic peak at DP 6. It is obvious, however, that the amylose branching pattern in wild-type and soluble starch synthase-defective strains remains very similar (Fig. 5, *A* and *F*) (see also Table I and Fig. 7, *panels E* and *F*). In our debranching experiments, the amount of reducing ends generated by amylose purified by GPC is a mere 3-fold inferior to that generated by type II material and 5-fold less than type I amylopectin. These indirect estimates confirm the direct measures that we had made previously using starch methylation (Fontaine *et al.* 1993).

Gene Disruption Experiments—Results obtained to date in *Chlamydomonas* can be interpreted in terms of two sequential steps in a single pathway. One can assume, for instance, that the long chains of amylopectin synthesized by GBSS are absolutely required in order to branch, then elongate, the intermediate size glucans. In fact we can speculate that the residual GBSS activity seen in all our mutants might be sufficient to fulfill this function for amylopectin synthesis. This seems to contradict observations made in higher plants, where insertion or point mutations leading to the absence of GBSS do not lead to a decrease in the quantity of starch. However, it is now known that plants have duplicate genes, often under different tissue-specific controls, for at least some if not most of the enzymes of the starch pathway. Moreover, in maize two distinct granule-bound starch synthases have been reported (Macdonald and Preiss, 1985). The absence in our 28 UV-generated mutations of a single null allele prompted us to solve this problem in *Chlamydomonas* by creating deletions in the GBSS structural gene. We have used the plasmid tagging technique that was recently developed for *Chlamydomonas* in an effort to generate a tagged *st-2* mutant. Non-homologous recombination events leading to integration of plasmids in the alga are now known to generate deletions several kilobase pairs long (Tam and Lefebvre, 1993). On a total of 11,000 independent integration events, 15 mutants affected in the starch pathway were selected; two of these turned out to carry new *st-2* alleles as was initially shown by complementation analysis and then by stan-

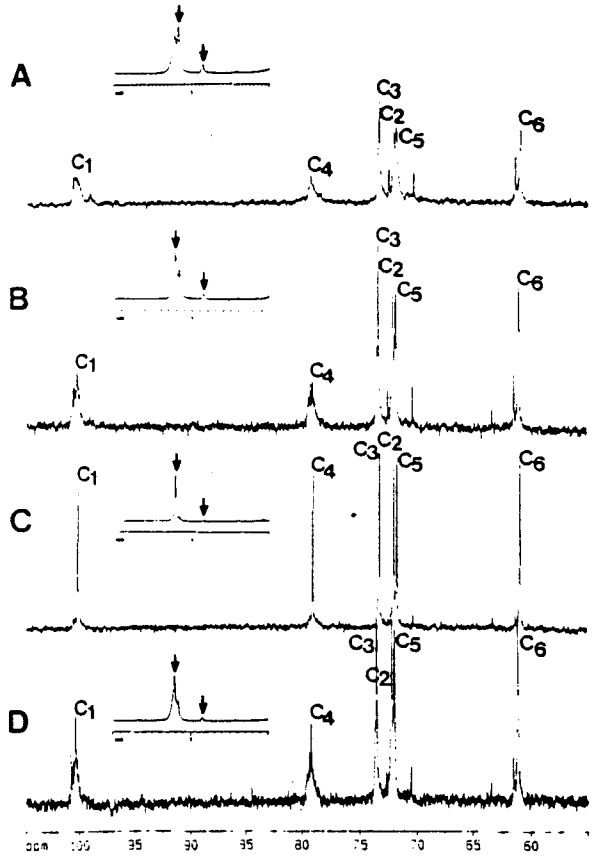


FIG. 4. **NMR analysis of wild-type and mutant polysaccharide.** ^1H and ^{13}C spectra of purified wild-type and mutant amylopectins in dimethyl sulfoxide-d_6/D_2O (80:20). The ^{13}C resonances of all Glc carbons are displayed and numbered from 1 to 6, while only those proton resonances that were used to estimate the amount of branching are boxed and shown by *arrows*. *Panels A* and *B* display, respectively, the rabbit liver glycogen and the amylopectin from the IJ2 double mutant (*st-2-Δ1 st-3-1*). *Panels C* and *D* show wild-type (strain 137C) amylopectin II and I. The broadening of the signals that are clearly seen in *panels A* and *B* and, to a lesser extent, in *panel D* reflects a greater heterogeneity of the carbon environments due to an increase in branching. The NMR spectra from *Chlamydomonas* amylose and from the amylopectins from the single *st-2-* or *st-3*-containing mutants were previously displayed (Fontaine *et al.*, 1994).

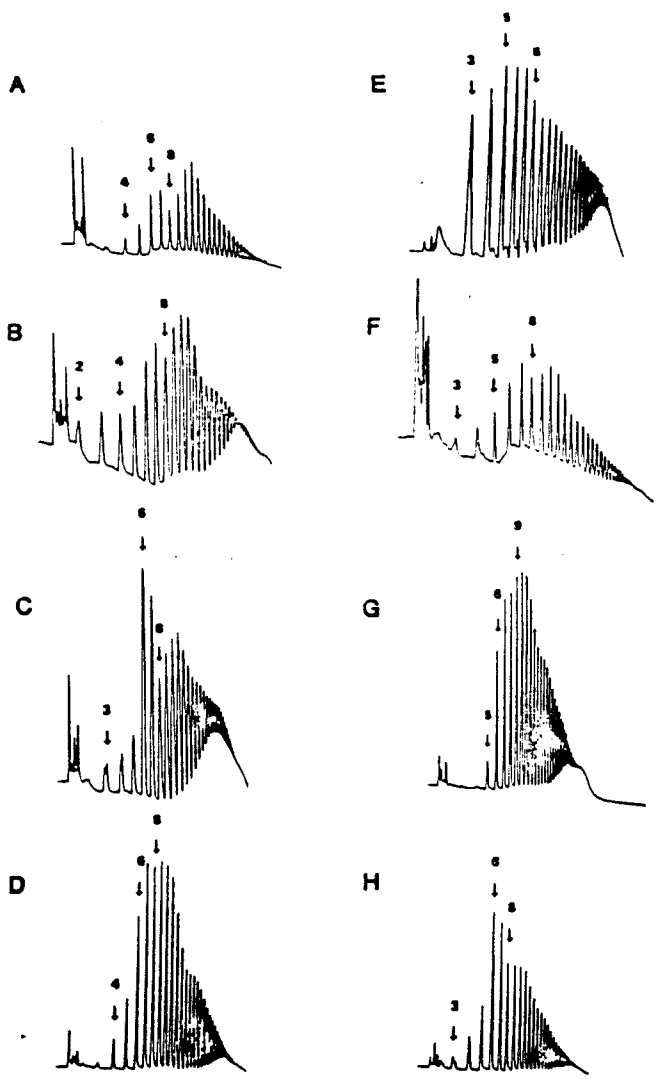


FIG. 5. **HPAE-PAD chromatography of water-soluble debranched glucans from wild-type and mutant GPC-purified polysaccharide fractions.** TSK-HW75-purified starch fractions are shown. Glucans differing by only one Glc residue are clearly separated up to DP 25. The DP of some of the chains are given on top of each chromatogram. The figure can be directly read as an histogram of amylopectin chain size since the detection procedure is proportional to the number of molecules and not to the amount of Glc present. *Panel A* displays wild-type amylose (stain 137C). *Panels C* and *D* are amylopectin from mutants carrying the gene disruption *st-2-Δ1* in a wild-type (strain BAFR1) (*panel D*) and in an *st-3-1* mutant background (strain IJ2) (*panel C*). *Panel B* displays amylopectin type II from the wild-type strain 137C, while *panel G* shows amylopectin type I from the same strain. *Panel E* displays rabbit liver glycogen. *Panels F* and *H* show, respectively, amylose and amylopectin from an *st-3-1* mutant strain (I152).

dard crosses. Both displayed identical phenotypes. Strain BAFR1 was chosen for further investigations because it readily gave fertile crosses. While all genetic markers involved segregated as expected, no recombination between the defective starch and the *ARG*$^+$ phenotypes could be observed in these crosses (153 meiotic products observed). None of the 17 *ARG*$^-$ recombinants harbored the *st-2-Δ1* mutation. This result establishes linkage between the mutation and one of the functional pARG7.8 loci of integration. In addition Southern analysis clearly witnesses two integration loci (Fig. 6*A*), which coincides with the most probable theoretical distribution fitting the observed segregation for the arginine requirement (see methods). It is worth noting that both loci harbor truncated versions of the original plasmid. In contrast with results obtained on all mutants obtained by UV mutagenesis, there was a complete loss of both the major granule-bound 76-kDa protein (Fig. 6*B*) and of all detectable enzyme activity. We therefore conclude that we have isolated *bona fide* null alleles of *st-2*. We then characterized the starch of the mutants and found the levels to be normal. The structure of this polysaccharide closely resembled that of the starches from GBSS-defective strains and contained only type I-like amylopectin (Fig. 3*D*, Table I). We therefore conclude that despite the obvious involvement of GBSS in the building of long glucans in normal amylopectin (Figs. 2 and 3), the latter is not required for full mutant amylopectin synthesis. The single "pathway" hypothesis can thus be rejected. The interaction between the GBSS disruption and our tightest soluble synthase defects (*st-3-1*) yields over a 90% decrease in granular starch with respect to the already low levels (40% of wild-type) of the reference *st-3-1*-containing strains. Since these high amylose strains still contain 40–60% amylopectin, one cannot escape the conclusion that GBSS controls *in vivo* most of amylopectin synthesis in this particular background.

Determination of the Structure of a New Polysaccharide under SSI Control—The little (<2% of the wild-type) granular polysaccharide left in the *st-2-Δ1 st-3-1*-carrying strain was

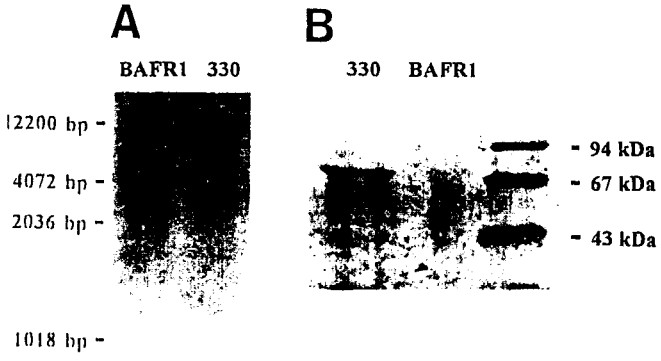


FIG. 6. **Molecular characterization of the *st-2-Δ1* disruption.** *Panel A*, 10 μg of *Bam*HI-digested *Chlamydomonas* DNA were hybridized with an *Nru*I/*Sal*I 321-base pair fragment covering a small part of the bacterial tetracycline resistance gene contained in pARG7.8, which is proximal to the *ARG7* gene. *Bam*HI does not cleave pARG7.8, which was used in our mutagenesis experiments. Both *Bam*HI bands seen in BAFR1 display molecular weights of 9.6 and 7.2 kilobase pairs, consistent with a deletion of part of the 11.6-kilobase pair pARG7.8 plasmid at the site of integration. The untransformed strain 330, as expected, does not show any hybridization with the probe. *Panel B*, silver stain of a ~15% SDS-acrylamide gel of total protein extracted from 3 mg of purified starch by the SDS-boiling procedure described by Delrue *et al.* 1992). *Lane 1* displays the wild-type 76 kDa GBSS, *lane 2* is from strain BAFR1, and *lane 3* displays molecular weight standards.

ubjected to analysis by gel filtration on TSK-HW75 (Fig. 3*D*) olumns followed by NMR (Fig. 4*B*) and methylation analysis. he pooled polysaccharide fractions were further debranched, nd the size distribution of the chains was determined (Figs. 5*C* nd 7*C* and Table I). The overall picture emerging from these udies is that of a very highly branched polysaccharide (9.3% anching according to NMR, 6.5% according to methylation nalysis) whose structure is intermediate (Fig. 7*C*) between ose displayed by both standard type I (Fig. 7*A*) or waxy ylopectin (6.1% branching according to NMR, 5.2% accordg to methylation analysis) and that of glycogen (Fig. 7*D*) 7% branching according to NMR, 6.7% according to methyion analysis). While this polysaccharide remains overall of y high molecular weight, it spans an unusually dispersed e range (Fig. 3*D*). It is worth noting that electron microphs clearly show (Fig. 8) that this material still adopts a nular structure *in vivo*. In order to check that changes in nching enzyme activities due to complex regulatory feedk mechanisms could not explain the observed phenomena partially purified the branching enzymes from the single l double mutants and compared them to the wild-type. The on exchange chromatograms obtained were identical to se that we have previously displayed (Fontaine *et al.*, 1993) wild-type and *st-3*-carrying strains with no evidence for nching enzyme alterations in the mutants using both assays branching enzyme (see "Materials"). By comparison, the ogen-primed soluble starch synthase zymograms display a plete wipe out of the major soluble starch synthase form in *t-3-1*-carrying strains.

the strains containing defects for both granule-bound and ble synthases the WSP exceeded the amount of granular h by 2–3-fold. The size of this fraction was further esti-d by GPC on TSK-HW50 columns. The material was of l size and a significant fraction did not stain at all with e. The bulk (over 50% in weight) of the fraction was estid to be in a range of DP 5–20. The sensitivity of this rial to amyloglucosidase and its relative insensitivity and ensitivity to, respectively, β and α amylase suggest the nce of a branched dextrin.

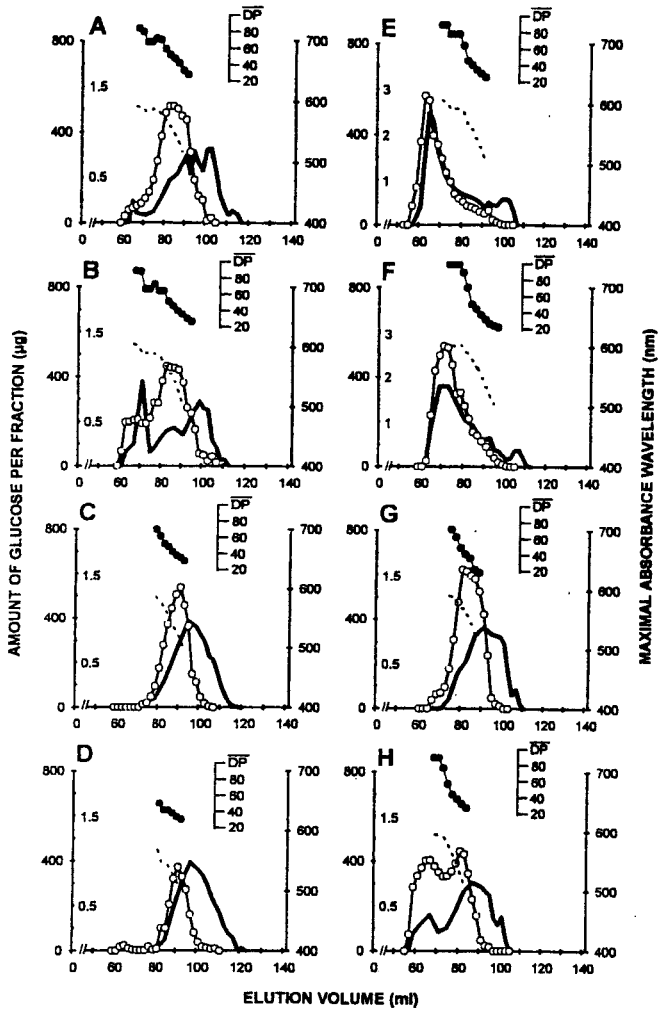


FIG. 7. **Separation of isoamylase debranched glucans by TSK-HW50 chromatography.** 4 mg of GPC-purified starch fractions were loaded on each column after debranching. The optical density (○) of the iodine polysaccharide complex was measured for each 2 ml fraction at λ_{max}. The OD scale is shown on the left *y* axis at the inner side and was adjusted in *panels E* and *D* to accommodate for the high absorbance due to the long glucans of amylose. The total amount (μg) of glucose per 2-ml fraction is scaled on the outer side of the *left y* axis, while the *right y* axis represents the wavelength (nm) scale. The *x* axis shows the elution volume scale (ml). λ_{max} values are displayed for all fractions where they could be determined (*broken line*). The column set-up and debranching conditions are described under "Experimental Procedures." The DP scale (●) was generated by using the λ_{max} of the debranched glucans as internal standards according to Banks *et al.* (1971). The accuracy of the scale and column set-up was double-checked by loading the defined glucan α dextrin ladder Glucidex. The amount of glucose (*thick unbroken line*) was used to generate Table I. *Panels A* and *B* display ApI and ApII from the wild-type reference strain 137C. *Panel C* shows the chromatogram of debranched amylopectin purified from the double mutant strain LJ2 (*st-2-Δ1 st-3-1*), while *panel D* shows that of debranched rabbit liver glycogen. *Panels E* and *F* show the chromatograms of debranched GPC-purified amylose from, respectively, the wild-type 137C reference and the mutant I152 (*st-3-1*). *Panel G* displays the debranched amylopectin chromatogram from BAFR1 carrying the *st-2-Δ1* disruption. *Panel H* displays the debranched amylopectin chromatogram from I152.

DISCUSSION

We have shown that in *Chlamydomonas* the granule-bound and the major soluble starch synthases carry out partly redundant functions for incorporation of glucose into high molecular weight branched α glucans. Both of these can function in complete absence of the other leading to two distinct mutant amylopectin structures. These mutant structures are analogous, although not identical, to the two types of amylopectin that can

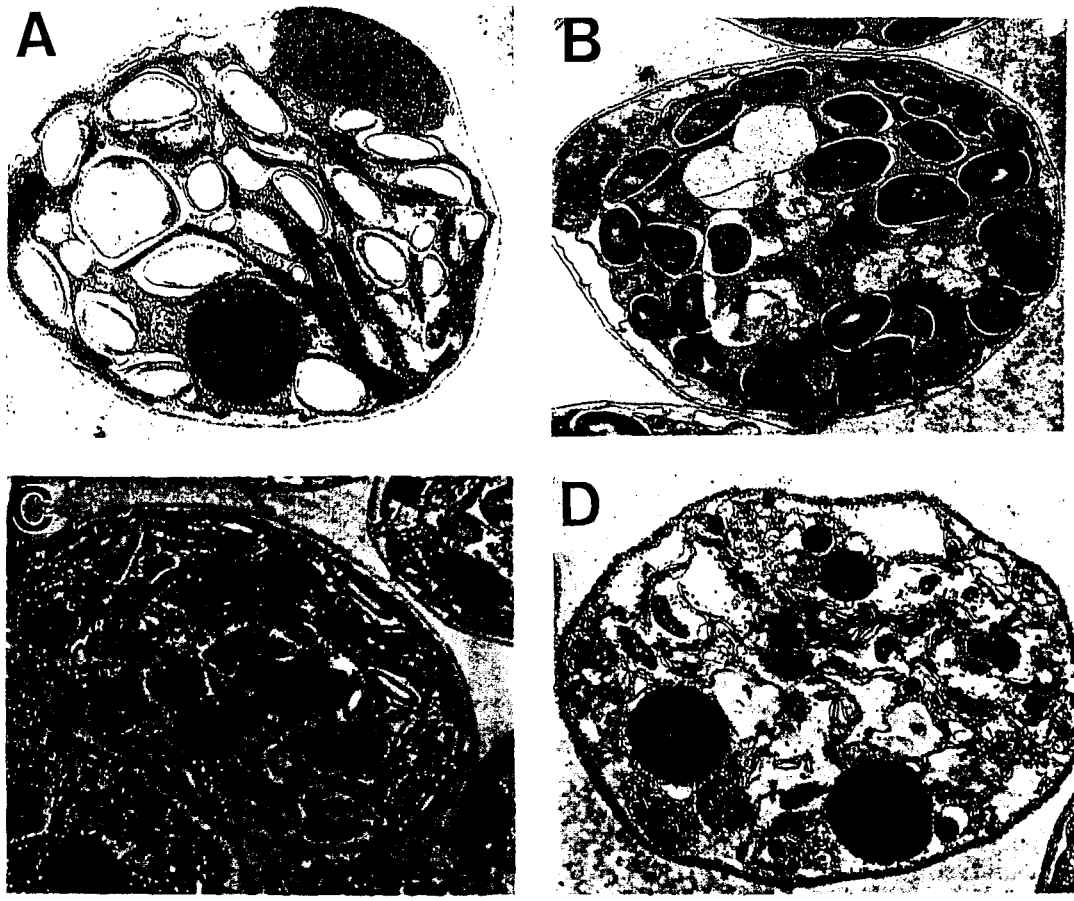


FIG. 8. **Electron microscopy of wild-type and nitrogen-starved cells.** Typical nitrogen-starved cells are virtually filled with starch and galactolipid droplets after 4 days incubation in –N medium in the presence of acetate and light. Typical full-size starch granules can be seen in *panels A* and *B* displaying the wild-type strain IN24 and the mutant IR16 harboring the *st-2-Δ1* disruption for the GBSS structural gene. Strain IV33 (*panel C*), carrying a defect (*st-3-1*) for the major soluble starch synthase activity, harbors 40% of wild-type amounts and shows less regularly shaped starch granules. The double mutant strain LJ2 (*panel D*) (*st-2-Δ1 st-3-1*) shows a strong reduction in starch amounts (2% of wild-type amounts) and contains numerous smaller starch granules of various altered shapes and size (electron micrographs are of the same magnitude (× 11,000)).

be found in wild-type algae. However, in that case, amylopectin type II can also be viewed as an intermediate toward normal (type I) amylopectin synthesis. We do not know at present exactly how both syntheses mix in wild-type cells. It seems very likely that some long chains synthesized by GBSS are embedded in type I amylopectin. Our data indeed imply that all three starch synthases are involved in amylopectin synthesis. On the other hand, the structure of wild-type amylose and from amylose purified from soluble starch synthase-defective strains do not differ significantly, confirming that this enzyme has no role to play in the synthesis of this starch fraction. The existence of amylose in this respect might be simply explained by the inaccessibility of the glucan synthesized inside the granule by GBSS to important soluble enzymes present at the surface. Thus GBSS at the surface of the granule would have access to the full set of enzymes necessary to obtain amylopectin, while the enzyme inside the starch granule would be missing some crucial component (such as a specific branching enzyme).

On its own *in vivo*, *Chlamydomonas* soluble starch synthase I seems to be quite inefficient in synthesizing granular starch in growth arrested cells (<2% of the wild-type levels). It is interesting to note that the increase in WSP recorded in the double mutants parallels that reported for the "waxy dull" double mutant of maize (Creech, 1965; Shannon and Garwood, 1984). To our knowledge no structural analyses of the water-soluble material contained in *du wx* maize have been reported. The high amylose dull mutant was reported to be defective for both soluble starch synthase II and branching enzyme IIa (Preiss and Boyer, 1980). The double maize mutants also display a decrease in the level of granular starch. However, in *du* and *du wx* mutants the severity of the defects do not come near those that we report here for *Chlamydomonas*. One can speculate that in higher plants this might in turn be due to the presence of duplicated genes and functions.

In *Chlamydomonas* double mutants, despite the presence of normal amounts of both types of branching enzymes, the branching level of the polysaccharide synthesized by soluble starch synthase I becomes exceedingly high and yields a granular material that does not truly qualify as starch. The granular and soluble material are also very different from the structure and physical properties of both glycogen or phytoglycogen. Although one might argue that this is a mere reflection of a modification in the ratio of branching to synthase and debranching activities, we believe that the very nature of the starch synthase is responsible in establishing a particular size distribution of the glucan chains. There are at present two equally viable mechanisms through which this can be explained. One would be that the production of characteristic glucan lengths is an intrinsic property of the starch synthase. The second would be that granule-bound and soluble starch synthases all have distinct abilities to interact directly or indirectly with the starch branching enzymes. Direct interaction could be mediated through physical contact in the building of a multisubunit complex. Indirect specific interaction could be achieved

either by both the selective use (as primers) or the production of structural motives which are, respectively, products or selective substrates of distinct starch branching enzymes.

REFERENCES

Baba, T., Yoshii, M., and Kainuma, K. (1987) *Starch/Stärke* **39,** 52–56

Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J. C., and Matagne, R. F. (1990) *Plant Sci.* **66,** 1–9

Ball, S., Marianne, T., Dirick, L. Fresnoy, M., Delrue, B., and Decq, A. (1991) *Planta* **185,** 17–26

Banks, W., Greenwood, C. T., and Khan, K. M. (1971) *Carbohydr. Res.* **17,** 25–33

Creech, R. G. (1965) *Genetics* **52,** 1175–1186

Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M. L., Fournet, B., and Ball, S. (1992) *J. Bacteriol.* **174,** 3612–3620

Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Delrue, B., Van Den Koornhuyse, N., Bossu, J.-P., Fournet, B., and Ball, S. G.(1993) *J. Biol. Chem.* **268,** 16223–16230

Gidley, M. J. (1985) *Carbohydr. Res* **139,** 85–93

Harris, E. H. (ed) (1989a) *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, pp. 25–63, Academic Press, San Diego

Harris, E. H. (ed) (1989b) *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, pp. 399–446, Academic Press, San Diego

Harris, E. H. (ed) (1989c) *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, pp. 581–586, Academic Press, San Diego

Hizukuri, S. (1986) *Carbohydr. Res.* **147,** 342–347

Kindle, K. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87,** 1228–1232

Krisman, C. R., Tolmasky, D. S., and Raffo, S. (1985) *Anal. Biochem.* **147,** 491–496

Kuipers, A. G. J., Jacobsen, E., and Visser, R. G. F. (1994) *Plant Cell* **6,** 43–52

Leloir, L. F, Rongine De Fekete, M. A., and Cardini, C. E. (1961) *J. Biol. Chem.* **236,** 636–641

Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988) *Plant Physiol.* **88,** 1175–1181

Macdonald, F. D., and Preiss, J. (1985) *Plant Physiol.* **78,** 849–852

Manners, D. J. (1989) *Carbohydr. Polymers* **11,** 87–112

Müller-Röber, B. T., Sonnewald, U., and Willmitzer, L. (1992) *EMBO. J.* **11,** 1229–1238

Nelson, O. E., and Rines, H. W. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9,** 297–300

Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., and Ricart, G. (1985) *Carbohydr. Res* **141,** 41–47

Preiss, J. (1991) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* (Miflin, B. J., ed) Vol. 7, pp. 59–114., Oxford University Press, Oxford

Preiss, J., and Boyer, C. D. (1980) *Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerisation* (Marshall, J. J., ed) pp. 161–174, Academic Press, New York

Shannon, J. C., and Garwood, D. L. (1984) *Starch: Chemistry and Technology* (Whistler, R. L., Bemiller, J. N., and Paschall, E. F., eds), 2nd Ed., pp. 25–86, Academic Press, Orlando, FL

Tam, L. W., and Lefebvre, P. A. (1993) *Genetics* **135,** 375–384

Thon, V. J., Vigneron-Lesens, C., Marianne-Pepin, T., Montreuil, J., Decq, A., Rachez, C., Ball, S. G., and Cannon, J. F. (1992) *J. Biol. Chem* **267,** 15224–15228

Tsai, C. Y., and Nelson, O. E. (1966) *Science* **151,** 341–343

Visser, R. G. F., Somhorst, I., Kuipers, G. J., Ruys, N. J., Feenstra, W. J., and Jacobsen, E. (1991) *Mol. & Gen. Genet.* **225,** 289–296

UNIVERSITÉ DES SC. ET TECHN. BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE LILLE