

S

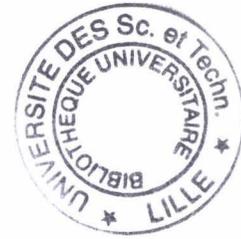
gen 200 000 65

50376
1996
33

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génétique Microbienne



présentée par

Nathalie VANDENKOORNHUYSE

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

**Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'approvisionnement en
substrat par l'ADP-glucose pyrophosphorylase
conditionne à la fois la quantité et la structure de l'amidon**

Présentée le 19 janvier 1996, devant la commission d'examen composée de :

Président : A Verbert
Rapporteurs : J.-L. Prioul
F.A. Wollman
Examineurs : A. Heysen
J. Preiss
S. Ball

Notre travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Biologique de Lille , (UMR n°111 du CNRS), dirigé par monsieur le Professeur André Verbert, dans le groupe de Génétique Microbienne du Professeur Steven Ball.

J'exprime ma reconnaissance à André Verbert pour m'avoir donné les moyens de réaliser une thèse dans les conditions les plus favorables.

J'exprime toute ma reconnaissance au "Chef " qui, par son enthousiasme, m'a transmis le "virus" de la recherche. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir convaincue d'aller "manipuler" quelques mois aux Etats-Unis.

I would like to thank Dr Preiss for giving me the opportunity to discover "flat" Michigan and for giving me the possibility to perform many interesting experiments. I would like to thank people in his lab., particularly Yee-Yung, Brian and Mirta for their advice and support.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à messieurs Heysen, Prioul et Wollman ainsi qu'à messieurs Verbert et Preiss pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier chaque membre du groupe de Chimie Biologique pour leur bonne humeur et leur soutien sans faille.

Je remercie mes "collègues" du 002 pour leurs conseils et pour avoir supporté mes intrusions, peut être trop nombreuses, lors du séquençage et autres manips. de Bio. Mol.

Je remercie André, Christophe, Marie-Lise, Nathalie et les autres membres du labo pour leur présence, leur aide et leur entrain.

Je désire tout particulièrement remercier Fabienne qui a accepté de replonger dans l'"Univers Chlamy." pour apporter des corrections, et non les moindres, à mon mémoire de thèse.

J'exprime toute ma reconnaissance à Guittie pour l'aide qu'elle m'a apporté depuis mon DEA jusqu'à la rédaction de ce manuscrit. J'admire sa disponibilité, son énergie, toujours à l'écoute des autres et toujours prête à donner "un coup de main".

Un grand merci à mes parents, entre autres pour avoir veillé sur Nicolas pendant cette dure période de rédaction.

Enfin, merci à Yaya pour la patience dont il a su faire preuve et pour son soutien moral qui m'a été indispensable.

RESUME

La synthèse d'ADP-glucose par l'ADP-glucose pyrophosphorylase constitue l'étape limitante de l'édification du grain d'amidon.

Trois souches mutantes défectueuses pour cette activité enzymatique ont été isolées chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

La mutation *sta6-1::ARG7* conduit à la chute de l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase sous le seuil de détection en même temps qu'à un effondrement de la quantité d'amidon à 0,1% de la quantité dosée chez la souche sauvage.

Les mutations dans le gène *STAI* (mutation RX *sta1-1* et insertion *sta1-2::ARG7*) aboutissent elles aussi à la déficience de l'ADP-glucose pyrophosphorylase. Les souches concernées présentent un phénotype beaucoup moins marqué. L'activité résiduelle est équivalente à celle de l'enzyme sauvage mesurée *in vitro* en absence de 3-phosphoglycérate, son activateur allostérique. L'étude des propriétés cinétiques de l'enzyme purifiée chez la souche porteuse de la mutation *sta1-1* montre que l'enzyme est insensible à l'activation par le 3-phosphoglycérate ; elle reste cependant inhibée par l'orthophosphate. Ces caractéristiques expliquent le faible niveau d'accumulation d'amidon, estimé à 10% de celui de la souche sauvage.

Le clonage de l'ADN complémentaire du gène codant la grande sous-unité a permis de déterminer que les loci *STA6* et *STAI* correspondent aux gènes codant respectivement la grande et la petite sous-unité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase.

En l'absence de la petite sous-unité, la grande reste fonctionnelle. Son activité conduit à la synthèse de l'amidon résiduel des souches porteuses des mutations *sta1-1* et *sta1-2::ARG7*. Par contre, la petite sous-unité seule semble inactive.

L'étude de la structure de ces amidons résiduels montre que l'altération de la synthèse de l'ADP-Glc se traduit par la disparition de la fraction linéaire (amylose) et par un enrichissement de l'amylopectine en chaînes très courtes.

La disponibilité en nucléotide-sucres (l'ADP-glucose) contrôle donc non seulement la quantité mais également la structure de l'amidon synthétisé.

SUMMARY

In *Chlamydomonas*, as in higher plants, synthesis of ADP-glucose catalyzed by ADP-glucose pyrophosphorylase is rate-limiting for the building of starch in the chloroplast. We have isolated disruptions of the *STAI* ADP-glucose pyrophosphorylase structural gene that rendered the enzyme less responsive to the allosteric activator 3PGA. The structure and composition of the residual starch synthesized by all mutants of the *STAI* locus is dramatically altered. The residual polysaccharide is shown to be devoid of amylose despite the presence of GBSS, the amylose biosynthetic enzyme. In addition, the fine structure of the mutant amylopectin revealed the presence of an altered chain length distribution. This distribution mimicks that which is observed during growth and photosynthesis and differs markedly from that observed during storage. We therefore propose that low nucleotide-sugar concentrations are either directly or indirectly responsible for the major differences observed in the composition or structure of starch during storage and photosynthesis. A full-length cDNA encoding the *Chlamydomonas* large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase has been cloned and sequenced. Disruptions in the heterotetramer structural genes have been obtained by random integration of the *ARG7* gene. The *sta6-1::ARG7* gene disruption leads to a collapse in all conditions tested of both starch (<0.05% of wild-type amounts) and enzyme activity. This defect complemented the previously characterized *stal-1* mutation. *Stal* gene disruptions lead to the accumulation of 5% of the wild-type starch amounts. Evidence is presented that suggest tight linkage between both structural genes. The disappearance of starch in the *sta6-1::ARG7* mutant and the plastidic localization of the large subunit argue that in *Chlamydomonas* ADP-glucose synthesis is confined to the chloroplast. These conclusions hold both for the polysaccharide synthesized around the pyrenoid during photosynthesis and for the starch accumulated during storage.

ABREVIATIONS

<u>A_{0.5}</u>	Constante d'affinité
<u>ADN</u>	Acide désoxyribonucléique
<u>ADNc</u>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<u>ADP</u>	Adénosine diphosphate
<u>ADP-Glc</u>	Adénosine diphospho-glucose
<u>AMP</u>	Adénosine monophosphate
<u>ARNm</u>	Acide ribonucléique messenger
<u>ASL</u>	Argino-succinate lyase
<u>ATP</u>	Adénosine triphosphate
<u>BET</u>	Bromure d'éthidium
<u>DEAE</u>	Diéthyl amino éthyl
<u>DHAP</u>	Di-hydroxy acétone phosphate
<u>DMSO</u>	Diméthyl sulfoxide
<u>DNS</u>	Acide dinitro salicylique
<u>DP</u>	Degré de polymérisation
<u>EB</u>	Enzyme de branchement
<u>EDTA</u>	Ethylène diamine tétra acétate
<u>Fru-1,6-P₂</u>	Fructose-1,6-bisphosphate
<u>Fru-6-P</u>	Fructose-6-P
<u>GBSS</u>	Granule bound starch synthase (ou amidon synthétase liée au grain)
<u>Glc</u>	Glucose
<u>Glc-1-P</u>	Glucose-1-phosphate
<u>Glc-6-P</u>	Glucose-6-phosphate
<u>G-3-P</u>	Glycéraldéhyde-3-phosphate
<u>HPLC</u>	High performance liquid chromatography
<u>HS</u>	High salt
<u>Kb</u>	kilo base
<u>kDa</u>	kilo Dalton
<u>K_m</u>	Constante d'affinité
<u>λ_{max}</u>	longueur d'onde au maximum d'absorption
<u>NAD(P)</u>	Nicotinamide adénosine (di)phosphate

<u>n_H</u>	Nombre de Hill
<u>PAB</u>	Acide para-amino benzoïque
<u>PEP</u>	Phosphoénol pyruvate
<u>3PGA</u>	3-phosphoglycérate
<u>PGI</u>	phosphoglucoisomérase
<u>PGM</u>	phosphoglucomutase
<u>Pi</u>	Phosphate inorganique
<u>PPi</u>	Pyrophosphate
<u>Rbu-1,5-P₂</u>	Ribulose-1,5-bisphosphate
<u>Rubisco</u>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
<u>RX</u>	Rayons X
<u>SDS</u>	Sodium dodécyl sulfate
<u>SSS</u>	Soluble starch synthase (ou amidon synthétase soluble)
<u>UV</u>	Ultra violet
<u>V_m</u>	Vitesse maximale

SOMMAIRE

RESUME	3
ABREVIATIONS	4
AVANT-PROPOS	14

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1 - L'AMIDON : SA COMPOSITION, SES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES, SA STRUCTURE

1.1 - L'amylose et l'amylopectine : les deux fractions glucidiques principales composant les grains d'amidon	17
1.2 - Le grain d'amidon	19
1.2.1 - Sa morphologie	19
1.2.2 - La contribution de l'amylose et de l'amylopectine dans la structure cristalline du grain	19
1.3 - Comparaison des structures de l'amidon transitoire et de l'amidon de réserve	21
1.3.1 - L'amidon contenu dans les organes de réserve	21
1.3.2 - L'amidon des organes photosynthétiques	22
1.3.3 - L'amidon de l'algue unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	22
1.4 - Un moyen d'étude de la structure de l'amidon : l'analyse des interactions des α-glucanes avec l'iode.	23
1.4.1 - Le phénomène d'interaction	23
1.4.2 - L'utilisation de l'interaction polysaccharide/iode pour les études de structure des polysaccharides	25
1.4.3 - Les applications de l'interaction de l'iode avec l'amidon	25

2 - VUE GENERALE SUR LE METABOLISME DE L'AMIDON

2.1 - La synthèse de l'amidon	27
2.2 - L'initiation de la synthèse de l'amidon	27
2.3 - L'action concertée des amidon synthétases et enzymes de branchement dans la synthèse d'amidon	29
2.3.1 - Les amidon-synthétases	29
2.3.1.1 - Les amidon synthétases solubles (SSS)	29
2.3.1.2 - Les amidon synthétases liées (GBSS)	29
2.3.2 - Les enzymes de branchement	31
2.3.3 - Vers une compréhension de l'édification du grain d'amidon	32
2.3.3.1 - Etude de souches affectées dans le métabolisme de l'amidon	35
2.3.3.2 - Modèles d'édification du grain d'amidon	39

2.4 - L'association des enzymes au grain d'amidon	41
2.5 - La dégradation de l'amidon	42
2.6 - Conclusion	43
3 - A L'ORIGINE DE LA SYNTHÈSE DE L'AMIDON TRANSITOIRE : LA FIXATION DU CARBONE INORGANIQUE.	45
3.1 - La photosynthèse	45
3.1.1 - Les différentes voies de fixation du dioxyde de carbone	45
3.1.1.1 - Le cycle de Calvin (cycle de réduction photosynthétique du CO ₂ ou cycle réducteur des pentoses phosphate)	45
3.1.2 - La régulation de la fixation du CO ₂	
3.2 - Devenir du CO ₂ dans le métabolisme carboné	46
3.2.1 - Rôle des hexoses phosphate	48
3.2.2 - Métabolisme du saccharose	48
3.2.2.1 - L'importance du saccharose	48
3.2.2.2 - La synthèse du saccharose	49
3.2.2.3 - La dégradation du saccharose	49
3.2.3 - L'influence de la synthèse et de la dégradation de l'amidon sur le métabolisme carboné	51
3.2.3.1 - La place de l'amidon dans le métabolisme carboné	51
3.2.3.2 - La synthèse de l'amidon	51
3.2.3.3 - La dégradation de l'amidon	57
3.3 - La compartimentation cellulaire, un moyen de contrôle du métabolisme carboné et de la photosynthèse.	57
3.3.1 - La translocation du Pi et des trioses phosphate	57
3.3.2 - Rôle du Fru-2,6-P ₂ dans le contrôle du devenir du carbone fixé par photosynthèse.	58
3.3.3 - Conclusion	58
4 - LE METABOLISME CARBONE CHEZ LES MICRO-ORGANISMES PHOTOSYNTHETIQUES	63
4.1 - Le mécanisme de concentration du carbone inorganique	63
4.1.1 - Des organismes photosynthétiques capables de se développer lorsque la concentration en CO ₂ est faible	63
4.1.2 - Comment le CO ₂ est-il concentré ?	63
4.1.3 - La présence du pyrénoloïde est corrélée à l'activation du CCM	64
4.2 - Le devenir du CO ₂ chez <i>C. reinhardtii</i>	64
4.2.1 - La compartimentation chloroplaste/cytosol	64
4.2.1.1 - Les enzymes de la glycolyse	65
4.2.1.2 - Les enzymes de la voie oxydative des pentoses phosphate	65
4.2.1.3 - Conclusion	65
4.2.2 - L'utilisation du carbone chez <i>C. reinhardtii</i>	67
4.2.2.1 - L'utilisation du carbone fixé chez les plantes et chez les organismes unicellulaires	67
4.2.2.2 - Les variations du niveau d'accumulation d'amidon au cours du cycle cellulaire chez <i>C. reinhardtii</i>	67
4.2.2.3 - Conclusion	67
5.- COMPARAISON DES METABOLISMES DE L'AMIDON ET DU GLYCOGENE BACTERIEN	70

5.1 - Le glycogène bactérien	70
5.1.1 - Sa structure, son rôle	70
5.1.2 - Sa synthèse	72
5.2 - Le contrôle de la synthèse du glycogène et de l'amidon	73
5.3 - Le contrôle génétique de la synthèse du glycogène bactérien	74
5.3.1 - Caractérisation des gènes de structure codant des protéines impliquées dans le métabolisme du glycogène	74
5.3.2 - Les facteurs de contrôle de l'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme du glycogène	75
6 - L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE	78
6.1 - Le rôle de l'ADP-glucose pyrophosphorylase dans la synthèse de l'amidon	79
6.1.1 - La synthèse du précurseur de l'amidon : l'ADP-Glc	79
6.1.2 - L'enzyme du contrôle de la synthèse de l'amidon	81
6.1.2.1 - L'ADP-glucose pyrophosphorylase : enzyme propre à la synthèse de l'amidon	81
6.1.2.2 - Comment s'opère le contrôle de l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase?	82
6.1.2.3 - L'ADP-glucose pyrophosphorylase des tissus de réserve	83
6.2 - L'ADP-glucose pyrophosphorylase bactérienne	84
6.2.1 - L'ADP- glucose pyrophosphorylase bactérienne et la synthèse de glycogène	84
6.2.2 - Les effecteurs de l'ADP-glucose pyrophosphorylase bactérienne	84
6.3 - La structure de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	85
6.3.1 - La structure quaternaire : l'ADP-glucose pyrophosphorylase possède une structure tétramérique	85
6.3.2 - La structure primaire de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de divers organismes	86
6.3.3 - Les sites de fixation des substrats et des effecteurs	88
6.3.3.1 - La nature des sites d'interaction de la protéine de <i>E. coli</i> avec les substrats et les effecteurs	88
6.3.3.2 - La structure primaire des sites actifs	89
6.4 - Le rôle respectif de chacune des sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	91
6.4.1 - Expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase du tubercule de pomme de terre dans <i>E. coli</i>	91
6.4.2 - L'activité résiduelle de la petite sous-unité	92
6.4.3 - Les souches de maïs porteuses des mutations <i>sh2</i> et <i>bt2</i> sont-elles des contre-exemples ?	92
6.4.4 - La multiplicité des isoformes de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	93
6.5 - La localisation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	94
6.6 - Les perspectives liées à l'étude et à l'utilisation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase en vue d'augmenter l'accumulation d'amidon chez les végétaux supérieurs	95
7 - CONTROLE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DE L'AMIDON	97
7.1 - Existe-t-il un contrôle de l'expression de l'ADP-glucose	97
7.2 - L'expression de l'ADP-Glc PPase, son activité et le taux d'accumulation de l'amidon	98
7.3 - Le contrôle de l'expression des enzymes de la voie de synthèse de l'amidon autres que l'ADP-glucose pyrophosphorylase	100
7.3.1 - La coordination de l'expression des gènes <i>Bt2</i> , <i>Sh2</i> et <i>Wx1</i> chez le maïs	101

7.3.2 - L'expression différentielle des isoformes de l'enzyme de branchement (BE)	101
8 - LE MODELE D'ETUDE : <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	103
8.1 - Présentation générale de l'algue	103
8.2 - Son métabolisme carboné	105
8.2.1 - La fixation du CO ₂	106
8.2.2 - La photorespiration	106
8.2.3 - La glycolyse	106
8.2.4 - La synthèse et la dégradation de l'amidon	106
8.3 - La validité du modèle	108
8.4 - Les atouts de <i>C. reinhardtii</i>	110
<u>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</u>	
1. LES SOUCHES UTILISEES	112
2. LES MILIEUX DE CULTURE	114
2.1. Les milieux liquides	114
2.2. Les milieux solides	115
3. LA PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES	116
3.1. Préparation d'extraits brut pour le dosage d'activités enzymatiques	116
3.2. Préparation de l'amidon	116
3.3. Analyses cytologiques	117
4. LA MUTAGENESE	119
4.1. Mutagenèse par insertion d'ADN exogène	119
4.2. Mutagenèse par exposition aux rayons UV et aux rayons X	119
5. LES ANALYSES GENETIQUES	120
5.1. Croisements	120
5.2. Etude des souches diploïdes	120
5.3. Analyse des descendants méiotiques	120
5.4. Fusion cellulaire	121
5.4.1. Préparation de l'autolysine	
5.4.2. Traitement lytique	

6. ANALYSES BIOCHIMIQUES	123
6.1. Purification de l'amidon synthétase liée au grain d'amidon	123
6.2. Analyse de l'amidon	123
6.2.1. Dosage	
6.2.2. Spectrophotométrie à l'iode	
6.2.3. Chromatographie de gel filtration	
6.2.4. Détermination de la taille des chaînes branchées de l'amylopectine	124
6.2.4.1. Débranchement	
6.2.4.2. Séparation des petits polysaccharides	
6.2.4.3. Séparation des fragments de plus de 20 résidus de glucose	125
6.2.5. La méthylation	126
6.3. Analyse des activités enzymatiques	126
6.3.1. Dosage des activités en extrait brut	
6.3.1.1. L'amidon synthétase liée au grain	
6.3.1.2. La phosphoglucoisomérase (EC 1.3.1.9)	
6.3.1.3. l'ADP-glucose pyrophosphorylase ou ADP-glucose synthétase (ATP: α -glucose-1-phosphate-adényl-transférase : EC 2.7.7.27)	
6.3.2. Analyses par zymogramme	128
6.3.2.1. Activité Phosphoglucomutase	128
6.3.2.2. Activité amidon synthétase soluble	129
6.3.2.3. Autres activités visualisées par zymogramme	129
6.4. Purification de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	130
6.4.1. Précipitation sélective au sulfate d'ammonium	
6.4.2. Chromatographie DEAE-Sepharose	
6.4.3. Chromatographie monoQ	
6.5. Etude des propriétés cinétiques de l'enzyme semi-purifiée	130
7. TECHNIQUES D'ANALYSES MOLECULAIRES	131
7.1. Préparation de l'ADN génomique	131
7.2. Préparation de l'ARN	132
7.3. Hybridations moléculaires	133
7.3.1. Digestion, migration et traitement du gel	
7.3.2. Préparation de la membrane	
7.3.3. Conditions d'hybridations	
7.4. Préparation de la sonde	134
7.4.1. Extraction d'ADN plasmidique, préparation d'un fragment d'ADN	
7.4.2. Marquage radioactif de la sonde	
7.5. Criblage de la banque	135
7.5.1. Préparation de la sonde par PCR	
7.5.2. Criblage et excision du fragment	

7.6. Séquençage nucléotidique	135
7.7. Clonage de l'extrémité 5'	137
7.8. La PCR à partir d'ARN totaux	137

CHAPITRE III : RESULTATS

1 - L'ISOLEMENT ET LA CARACTERISATION DE SOUCHES ACCUMULANT DE FAIBLES QUANTITES D'AMIDON

1.1 - La mutagenèse et la sélection des souches	139
1.1.1 - Les souches mutantes issues de l'insertion aléatoire d'ADN	139
1.1.2 - Présentation de la souche I7 porteuse de la mutation <i>stal-1</i>	140
1.2 - La physiologie des souches défectueuses pour l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase	142
1.2.1 - Quantités d'amidon accumulé	
1.2.2 - Temps de génération	143
1.2.3 - Structure générale de la cellule	145
1.2.3.1 - Comportement et aspect général	
1.2.3.2 - Observation microscopique	
1.2.4 - Activités enzymatiques liées au métabolisme de l'amidon	148
1.2.4.1 - La Phosphoglucoisomérase et la Phosphoglucomutase	
1.2.4.2 - Activité amidon synthétase soluble (SSS)	151
1.2.4.3 - Activité amidon synthétase liée (GBSS)	153
1.2.4.4 - Les activités de branchement et de débranchement	155
1.2.4.5 - Les capacités photosynthétiques des cellules	
1.2.4.6 - L'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	157
1.2.4.7 - Conclusion	
1.3 - Analyse génétique des mutations portées par les souches I7, BAF J5 et BAF J3	159
1.3.1 - Construction des souches	160
1.3.2 - Contrôle de la diploïdie	161
1.3.3 - Caractérisation phénotypique des souches diploïdes	
1.3.4 - Caractérisation des souches diploïdes	165
1.3.4.1 - Activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	
1.3.4.2 - Les quantités d'amidon accumulé	166
1.3.4.3 - Analyse moléculaire du génome des souches mutantes	

2 - PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE

2.1 - Purification de l'enzyme de la souche sauvage	168
2.2 - Purification de l'enzyme de la souche mutante	170
2.3 - Propriétés cinétiques de l'ADP-glucose pyrophosphorylase purifiée	172
2.3.1 - Contrôle de l'activité par le 3-phosphoglycérate et le phosphate inorganique	172
2.3.2 - Propriétés catalytiques	176
2.3.3 - Conclusion	177

3 - CLONAGE DE L'ADNc CORRESPONDANT AU GENE DE STRUCTURE DE LA GRANDE SOUS-UNITE DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE DE <i>C. REINHARDTII</i>	178
3.1 - Stratégie de clonage	
3.2 - Synthèse d'une sonde	179
3.2.1 - Pureté des fragments de PCR	
3.2.2 - Le séquençage direct du produit de PCR	
3.3 - Criblage de la banque d'ADNc	180
3.4 - Séquençage des ADN complémentaires	183
3.5 - Clonage de l'extrémité 5'	
3.6 - L'ADNc cloné correspond au gène de structure de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	186
3.6.1 - Nature du produit de l'ADNc cloné	
3.6.2 - Analyse de la "pré-séquence"	192
3.6.3 - Analyse des séquences nucléotidique et peptidique de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de <i>C. reinhardtii</i>	192
4 - CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES SAUVAGE ET MUTANTES	196
4.1 - Analyse de l'hybridation ADN/ADN génomique	
4.2- Amplification d'ARNm	197
5 - ANALYSE STRUCTURALE DE L'AMIDON RESIDUEL DES SOUCHES MUTANTES I7, BAF J3 ET BAF J5.	201
5.1 - Structure de l'amidon de réserve	201
5.1.1 - Séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie de tamisage moléculaire	203
5.1.2 - Confirmation de l'absence d'amylose dans les souches mutantes I7, BAF J3 et BAF J5	
5.2 - Caractérisation de la structure fine de l'amylopectine	207
5.2.1 - Séparation des chaînes courtes de l'amidon résiduel des souches mutantes I7, et GST	
5.2.2 - Séparation des chaînes de plus de 20 résidus de glucose de l'amidon de la souche BAF J3	209
5.3 - Conclusion	209
6 - CARACTERISATION DE LA STRUCTURE DE L'AMIDON D'UNE SOUCHE "SUR-PRODUCTRICE" D'AMIDON	213
6.1 - Présentation de la souche N52, porteuse de la mutation <i>sta80</i>	213
6.2 - Quantification et analyses structurales de l'amidon accumulé	213
6.2.1 - Extraction d'amidon photosynthétique et d'amidon de réserve	
6.2.2 - L'amidon photosynthétique de la souche super-productrice contient-il de l'amylose ?	215
6.3 - Conclusion	215

CHAPITRE IV : DISCUSSION

1 - QUELQUES ELEMENTS DU MECANISME DE SYNTHESE DE L'AMIDON	217
2 - LES AMIDONS DEPOURVUS D'AMYLOSE	218
2.1 - Les conditions génétiques et physiologiques qui aboutissent à la synthèse d'un amidon dépourvu d'amylose	218
2.1.1 - Le début de la mise en réserve de l'amidon chez les végétaux supérieurs	218
2.1.2 - La croissance active et la photosynthèse	218
2.1.3 - Les souches affectées dans l'activité de la GBSS	219
2.1.4 - Les souches affectées dans les activités de la phosphoglucomutase et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase	219
2.1.5 - Conclusion	219
2.2 - Les mécanismes de la synthèse de l'amylose	221
2.3 - Comment une diminution de la synthèse d'ADP-glucose peut-elle affecter la structure de l'amidon ?	221
2.4 - Différentes approches pour la compréhension du mécanisme de synthèse de l'amylose	224
2.4.1 - La synthèse in vitro	224
2.4.2 - L'étude de la surface développée	224
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	226
ANNEXE	

AVANT-PROPOS

L'amidon constitue la forme sous laquelle les différents organes des plantes mettent en réserve le carbone. De par l'ampleur et la diversité de son utilisation, l'amidon présente un intérêt économique très important. L'amidon et ses dérivés intéressent de nombreux secteurs d'activité tels que l'alimentation humaine, l'alimentation animale, les industries du textile, du papier, du carton, des colles. En biotechnologie, on l'utilise comme substrat de fermentation par exemple pour la production de polyols, d'acides aminés, de cyclodextrines, d'antibiotiques etc.... Les procédés de production nécessitent souvent des étapes de transformation réalisées par voie chimique ou biologique. Afin de poursuivre le développement du champ d'utilisation de l'amidon et d'en maîtriser l'utilisation, une connaissance plus approfondie à la fois de sa structure et de sa synthèse est indispensable. Ajoutons qu'au delà de l'intérêt économique, la compréhension des mécanismes donnant naissance à une structure aussi complexe que celle de l'amidon constitue un défi.

La détermination de la structure fine de l'amidon a fait, et fait encore, l'objet de nombreux travaux de recherche. Sans détailler les connaissances actuelles sur ce sujet, nous ferons le point sur les données décrivant l'architecture et l'agencement des molécules composant le grain d'amidon. Nous nous intéresserons par la suite au métabolisme du polysaccharide, en particulier à sa biosynthèse.

Les mécanismes de synthèse du glycogène, l'équivalent de l'amidon chez les bactéries, les cellules animales ou les cellules fongiques, sont mieux compris. Chez les plantes supérieures, la complexité du mécanisme provient principalement de la multiplicité des formes enzymatiques intervenant dans l'élaboration du polysaccharide. Notons pourtant que l'amidon se différencie du glycogène uniquement par l'agencement des résidus de glucose qui le composent. Nous effectuerons donc une étude comparée des métabolismes carbonés des bactéries et des plantes. Cette comparaison est d'autant plus intéressante que nous utilisons comme modèle de recherche un eucaryote inférieur : l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

En plus du mécanisme de synthèse proprement dit, les mécanismes de contrôle de cette synthèse sont eux-aussi incomplètement définis. C'est à cet aspect du métabolisme que nous nous sommes plus particulièrement intéressés, en étudiant les effets de l'altération de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, enzyme limitante de la synthèse. L'activité de cette enzyme est contrôlée par des effecteurs métaboliques, en particulier le 3-phosphoglycérate (produit du cycle de Calvin) et

le phosphate inorganique. Il nous a donc semblé approprié de faire un bref rappel sur les modalités de fixation du carbone au cours de la photosynthèse ainsi que sur son devenir dans la plante.

Nous passerons en revue les nombreuses informations disponibles sur l'ADP-glucose pyrophosphorylase, l'enzyme au coeur de notre travail.

Un bref chapitre sera consacré à la régulation de l'expression des activités enzymatiques impliquées dans la synthèse de l'amidon. Nous tenterons de montrer que l'ADP-glucose pyrophosphorylase n'est pas la seule enzyme dont l'expression est soumise à régulation.

Enfin, une brève présentation de notre modèle d'étude *Chlamydomonas reinhardtii* nous permettra de rappeler les avantages liés à son utilisation pour l'étude du métabolisme de l'amidon.

I - INTRODUCTION

	AMYLOSE	AMYLOPECTINE
Proportion au sein de l'amidon	20 à 30%	70 à 80%
Structure générale	essentiellement linéaire	ramifiée
Masse moléculaire (kDa)	0,2 à 1,3.10 ³	4 à 5.10 ⁵
Degré de polymérisation	100 à 10 000	3 à 30.10 ⁵
Longueur moyenne des chaînes	500 à 5 000 résidus de glucose	10 à 50
Digestibilité par la β-amylase	> 90%	60%
Solubilité dans l'eau	variable	soluble
Stabilité en solution aqueuse	rétrograde	stable
Coloration en présence d'iode	verte (> 600 nm)	rouge (~ 540 nm)

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques des deux principaux composants de l'amidon: l'amylose et l'amylopectine.

Notons que les valeurs indiquées dans le tableau sont représentatives d'un amidon accumulé par les organes de réserve des plantes supérieures.

1 - L'AMIDON : SA COMPOSITION, SES PROPRIETES

PHYSICO-CHIMIQUES, SA STRUCTURE

Dans la plupart des organismes vivants, les polymères de glucose constituent la principale forme de réserve de carbone. Il s'agit de glycogène chez les bactéries et les cellules animales ou fongiques, d'amidon chez les organismes eucaryotes photosynthétiques.

La plupart des organes des plantes accumulent de l'amidon. Dans les feuilles, il est synthétisé pendant la journée à partir du carbone fixé par photosynthèse et dégradé la nuit. On parle alors d'amidon transitoire. Dans les organes non chlorophylliens, le carbone servant à la synthèse de l'amidon de réserve provient de la dégradation du saccharose importé depuis les feuilles.

Etant données les quantités accessibles, il n'est pas étonnant que la structure fine de l'amidon des organes de réserve soit beaucoup plus documentée que celle de l'amidon transitoire. Nous évoquerons donc ici essentiellement la structure du polysaccharide de réserve bien que celle de l'amidon accumulé dans les feuilles soit aussi d'un grand intérêt scientifique.

1.1 - L'amylose et l'amylopectine : les deux fractions glucidiques principales composant les grains d'amidon

L'amidon de réserve se présente sous forme de grains insolubles dans l'eau. La taille et la forme de ces grains dépend de l'organisme, mais également de l'âge et du stade de développement de ce dernier. L'amidon de réserve est constitué d'un mélange d'amylopectine et d'amylose. Bien qu'ayant la même formule brute, ces deux fractions se distinguent en particulier par leurs masses moléculaires, par la fréquence des chaînes branchées et la longueur de celles-ci. Les propriétés physico-chimiques qui découlent de ces arrangements particuliers sont énumérées dans le **tableau 1**.

L'amylopectine constitue la fraction majoritaire ; elle est composée d' α -1,4-glucanes de taille intermédiaire (les chaînes A et B1) regroupés et répartis régulièrement le long de chaînes plus longues (les chaînes B2, B3 et B4) par des liaisons α -1,6 (Hizukuri, 1985 ; Robin *et al.*, 1974). Les chaînes de type A et B1, par leur agencement en doubles hélices, confèrent à l'amylopectine une structure cristalline, spécifique de l'organe dont l'amidon est issu (Manners, 1989, Imberty *et al.*, 1991), (**Figures 1A, 1B, 3**).

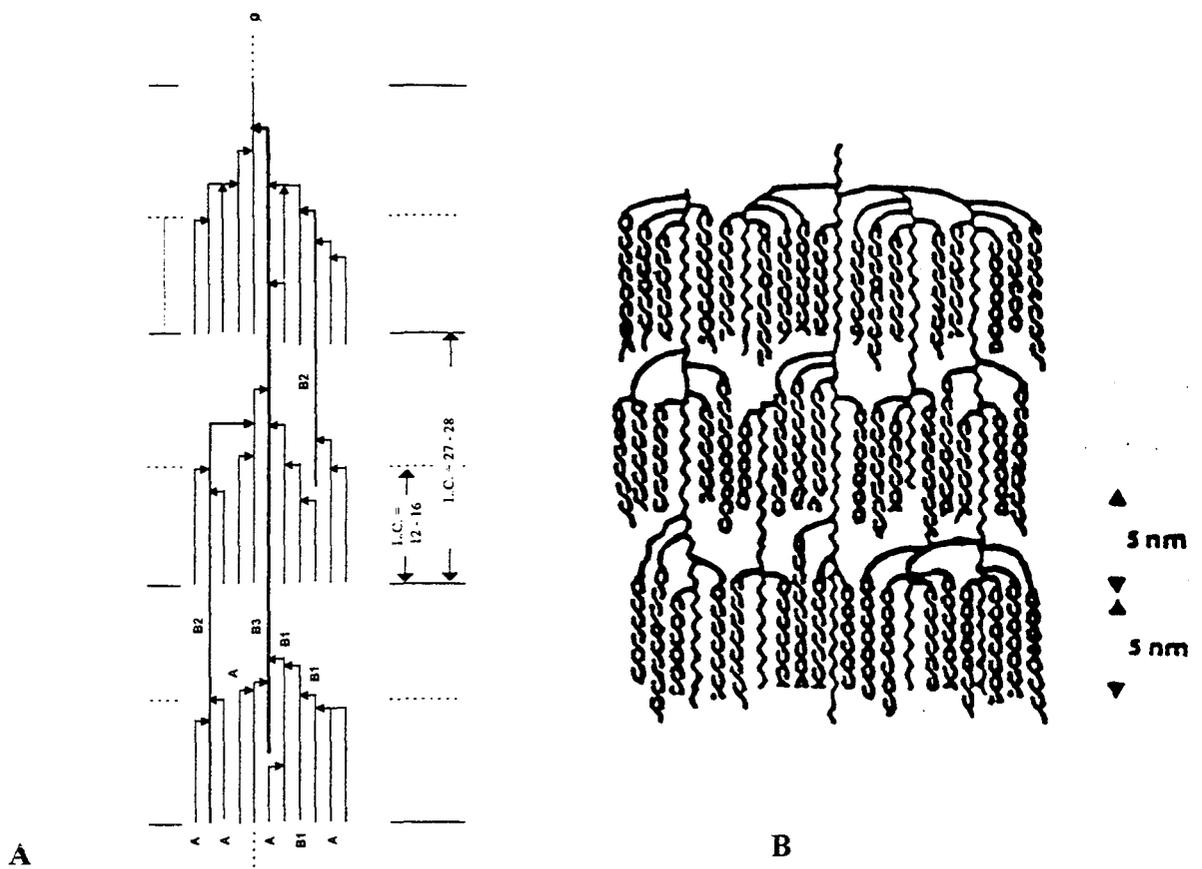


Figure 1 : (A) Modélisation de la structure de l'amylopectine

(Hizukuri, 1995)

(B) Enroulement en double hélice des courtes chaînes de l'amylopectine

(Imberty et al., 1991)

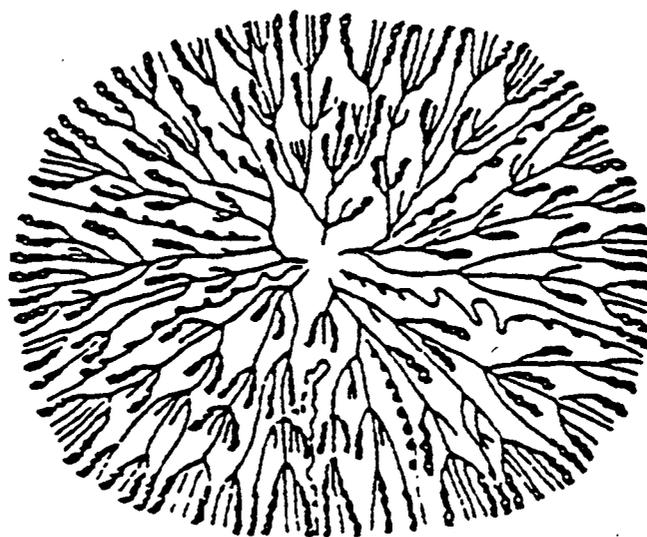


Figure 2 : Représentation schématique du grain d'amidon

La seconde fraction de l'amidon, l'amylose, possède une masse moléculaire plus faible. Il est moins branché et moins organisé que l'amylopectine et ne présente de ce fait aucune structure cristalline.

1.2 - Le grain d'amidon

1.2.1 - Sa morphologie

Il semble acquis que les molécules d'amylose et d'amylopectine sont orientées radialement (perpendiculairement à la surface du grain). Leur extrémité réductrice est dirigée vers le centre du grain d'amidon, laissant ainsi accessibles les extrémités non réductrices sur lesquelles peuvent s'ajouter les unités de glucose (Blanshard, 1987 ; French, 1984) (**Figure 2**). Après digestion partielle à l'acide, les grains visualisés au microscope électronique montrent une succession "d'anneaux de croissance" (**Figure 3**). Il s'agit de couches concentriques dont l'indice de réfraction, la densité, la cristallinité, la résistance aux attaques acides sont alternativement faibles et élevées. Dans l'amidon de l'albumen du blé, il existe une corrélation entre le nombre de cercles de croissance et l'âge de la plante en jours qui traduit l'effet du rythme physiologique sur la synthèse d'amidon (Blanshard, 1987). Le déterminisme de la taille, de la forme des grains, ainsi que de leur nombre au sein de la cellule, sont tout à fait inconnus à l'heure actuelle.

1.2.2 - La contribution de l'amylose et de l'amylopectine dans la structure cristalline du grain

Les informations concernant la répartition précise des molécules d'amylose et d'amylopectine dans le grain proviennent essentiellement des données physico-chimiques.

L'amylose ne participe qu'indirectement à la structure cristalline du polysaccharide. Seule une partie de l'amylopectine, à l'exclusion des points de branchement, y contribue (Thorn & Mohazzeb, 1990 ; **Figure 4**). Près de 70 % de l'amidon se présentent sous forme amorphe. Cette phase amorphe, sensible à l'hydrolyse acide ou enzymatique, est accessible aux composés chimiques (French, 1984). Nous détaillerons ultérieurement les interactions de l'amylose et d'autres polysaccharides avec l'iode.

A l'intérieur de chaque région cristalline du grain d'amidon, les molécules d'amylopectine forment des lamelles cristallines et des lamelles amorphes (**Figure 3**). Cette succession de zones amorphes et cristallines résulte de la répartition ordonnée des chaînes, qui forment ce que l'on

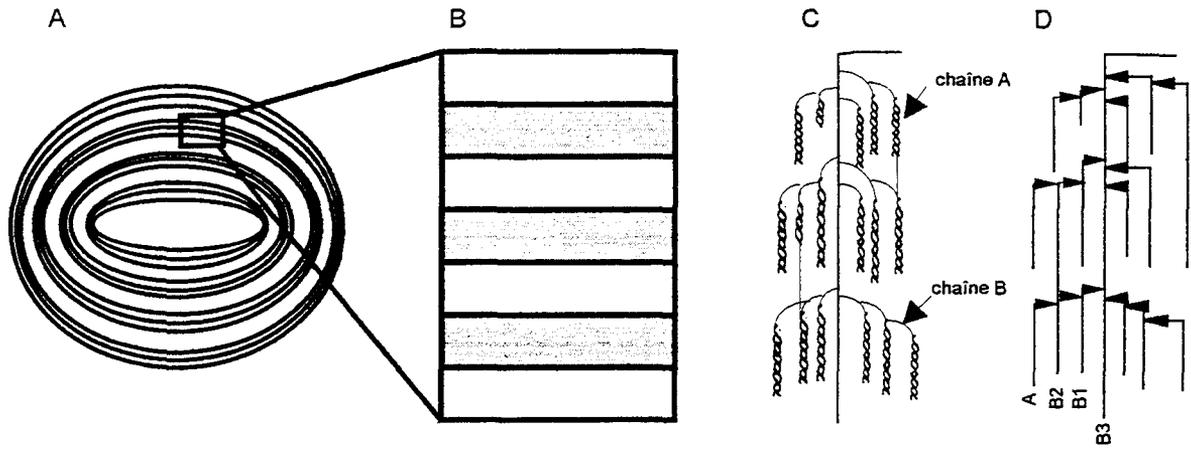


Figure 3 : *Vue schématique du grain d'amidon*
Succession d'anneaux de croissance (A)
Section du grain agrandie :
Visualisation des lamelles amorphes et cristallines (B)
Structure secondaire (C) et primaire (D) des grappes de l'amylopectine

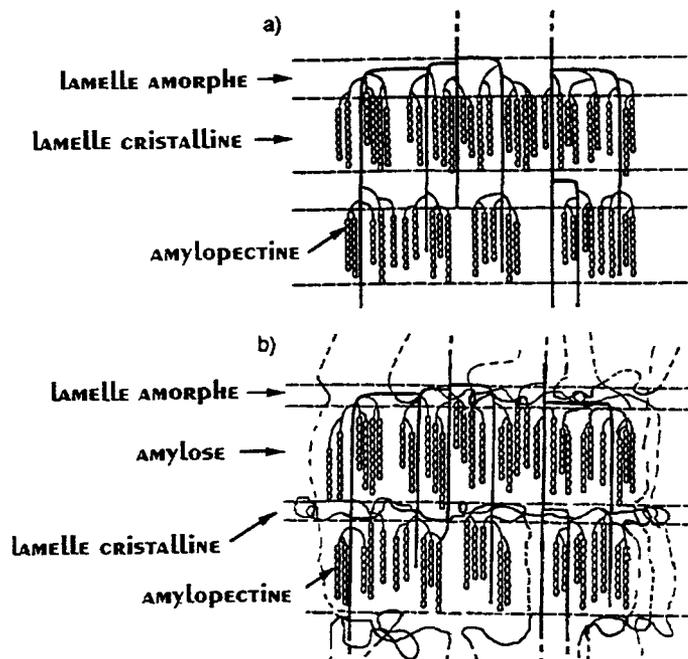


Figure 4 : *Participation de s molécules d'amylose à la structure cristalline de l'amidon*
(Jenkins & Donald, 1994).
Dans ce schéma, l'amylose est arbitrairement placé, il est indépendant de
l'amylopectine

appelle "les grappes élémentaires", le long des chaînes glucosidiques. Notons que, quelle que soit l'origine de l'amylopectine, la longueur de ces grappes est très précisément de 9 nm (Jenkins *et al.*, 1993). Les mécanismes enzymatiques à l'origine d'une telle régularité dans l'organisation de l'amylopectine restent à ce jour inconnus.

D'après Gidley et Bociék (1988), les molécules d'amylose seraient disposées de manière aléatoire dans la partie amorphe du grain d'amidon. Des résultats plus récents confirment la localisation aléatoire mais proposent une répartition à la fois dans la phase amorphe et dans la phase cristalline (Jenkins *et al.*, 1993 ; **Figure 4**). D'autre part, la facilité d'extraction de l'amylose du grain suggère qu'il est faiblement lié à l'amylopectine. Un modèle récent qui illustre l'agencement relatif des deux fractions au sein du grain est présenté dans la **figure 4**.

Signalons que si les structures fines de l'amylopectine et de l'amylose sont à ce jour de plus en plus détaillées, leurs rôles respectifs (en particulier celui de l'amylose), dans l'établissement et le maintien de l'architecture du grain reste tout à fait inconnu.

1.3 - Comparaison des structures de l'amidon transitoire et de l'amidon de réserve

En règle générale, chez les végétaux supérieurs comme chez les algues vertes, l'amidon est synthétisé et accumulé dans les plastes. Bien que leur origine soit commune, ces organites se sont spécialisés ; ils présentent des caractères spécifiques selon qu'ils proviennent de tissus photosynthétiques (chloroplastes) ou de tissus de réserve (amyloplastés).

1.3.1 - L'amidon contenu dans les organes de réserve

La description de la structure qui vient d'être exposée est celle de l'amidon de réserve des grains de céréales ou du tubercule de pomme de terre. Dans ces tissus, le polysaccharide est abondant, facile à extraire et d'un grand intérêt économique ; c'est pourquoi, comme nous l'avons déjà évoqué, les données concernant sa structure sont nettement plus abondantes. De nombreuses observations ont mis en évidence que la forme, la taille et la structure des granules varient fortement d'un type d'organe à l'autre.

Les grains d'amidon contiennent de faibles quantités de composants non glucosidiques, lipides ou protéines. L'amidon des grains de céréales contient 0,5 % de protéines et 1 % de lipides parmi lesquels des lysophospholipides, molécules rares dans le règne végétal (Gidley & Bociék, 1988). Ces lipides se localiseraient à l'intérieur des hélices que forment les molécules

d'amylose (Morrison *et al.*, 1984). La phosphorylation de l'amylopectine du tubercule de pomme de terre constitue un autre exemple de particularité : ici, un glucose sur 300 est phosphorylé en position 6- ou 3- (Takeda & Hizukuri, 1982).

La composition du grain d'amidon est susceptible de varier au cours du développement. Pour des raisons encore inconnues, le rapport amylose/amylopectine augmente dans les grains de céréales ayant atteint la maturité (Shannon & Garwood, 1984)

1.3.2 - L'amidon des organes photosynthétiques

Contrairement à ceux des tissus de réserve, les grains d'amidon provenant des feuilles montrent peu de spécificité d'espèce. Ils sont en général petits (Shannon & Garwood, 1984). Les granules des feuilles de pois et épinard se caractérisent par une structure cristalline entourée d'une gaine amorphe constituée de molécules faiblement branchées. Cette gaine externe serait le siège de dégradations et de resynthèses périodiques (Beck, 1985 ; Steup *et al.*, 1983). Ceci traduit le rythme de synthèse, soumis à l'alternance d'un cycle jour/nuit, alors que l'amidon des tissus de réserve est accumulé selon d'autres critères de développement.

1.3.3 - L'amidon de l'algue unicellulaire Chlamydomonas reinhardtii

L'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* est capable de synthétiser l'amidon aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, mimant ainsi les cellules des organes photosynthétiques ou de réserve des plantes supérieures (Ball *et al.*, 1990). Selon les conditions de culture, la structure du polysaccharide varie considérablement (Libessart *et al.*, 1995). En carence azotée et à la lumière, l'amidon de *C. reinhardtii* est identique à celui accumulé dans les organes de réserve des végétaux supérieurs. Par contre, lors de la croissance active de l'algue, l'amidon synthétisé est composé presque exclusivement d'amylopectine ; aucune fraction d'amylose n'est alors détectable. Il faut ajouter que la structure de l'amylopectine composant cet amidon granulaire est anormale.

L'amidon transitoire synthétisé par les cellules des feuilles des plantes présenterait-il une structure similaire à l'amidon de l'algue en phase de croissance active ?

1.4 - Un moyen d'étude de la structure de l'amidon : l'analyse des interactions des α -glucanes avec l'iode.

1.4.1 - Le phénomène d'interaction

En présence d'iode, en milieu aqueux ou anhydre, les chaînes linéaires de glucose forment une hélice dont la cavité centrale hydrophobe peut renfermer de nombreux composés, en particulier l'iode. Cette interaction stabilise la formation d'une structure ordonnée artificielle (V-amylose) qui présente un spectre caractéristique de diffraction aux rayons X. Dans la molécule de V-amylose, des segments de 50 résidus formant une hélice et contenant les molécules d'iode s'alternent avec des segments enroulés de façon aléatoire (Murdoch, 1992). L'analyse d'oligosaccharides linéaires synthétiques par Banks et coll. (1971) a permis de montrer qu'il existe une corrélation entre la longueur des chaînes et la longueur d'onde au maximum d'absorption (**Tableau 2**). Ainsi, le complexe formé par l'iode et l'amylose absorbe dans le visible. Mais les polysaccharides branchés tels que le glycogène ou l'amylopectine peuvent également interagir avec l'iode (**Figure 5**) bien que la structure ramifiée ne permette que des interactions diffuses. Dans ce cas, la longueur d'onde au maximum d'absorption donne des renseignements sur la longueur des chaînes branchées et donc sur la structure du polysaccharide impliqué (Thorn & Mohazzeb, 1990). Notons toutefois que l'interaction polysaccharide/iode à 20°C n'est possible qu'au delà d'un degré de polymérisation supérieur à 12 (Thorn & Mohazzeb, 1990). Les chaînes plus courtes sont donc "invisibles" à l'iode.

1.4.2 - L'utilisation de l'interaction polysaccharide/iode pour les études de structure des polysaccharides

Deux types de techniques utilisant l'iode sont couramment employées pour les études systématiques de la structure des polysaccharides :

- L'ampérométrie permet d'évaluer la quantité d'iode fixée par le polysaccharide. Elle s'exprime en IBC ou IA (IBC pour Iodine Binding Capacity, IA pour Iodine Affinity). Pour les molécules branchées, les valeurs mesurées sont faibles (de l'ordre de 0,1 à 0,15 mg d'iode fixée pour 100 mg d'amylopectine) (Thorn & Mohazzeb, 1990) alors que l'amylose pure est capable de fixer 20 % de son poids en iode (Murdoch, 1992).

- La spectrophotométrie est très utilisée car facile à mettre en oeuvre. Elle consiste à mesurer la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe polysaccharide/iode.

d.p. moyen	22,2	28,9	31,3	36,4	50,7	71	93	105	134	1500
λ max (en nm)	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642
IBC	/	/	1,3	3,6	11,1	/	16,2	16,4	17,3	19,5

Tableau 2 : Longueur d'onde du maximum d'absorption (λ_{max}) et capacité de fixation d'iode (Iodine Binding Capacity) des complexes polysaccharide / iode en fonction de la longueur des chaînes glucosidiques linéaires (Banks et al., 1971).

dp : degré de polymérisation en nombre de molécules de glucose

IBC : pourcentage d'iode (en mg) par mg de polysaccharide

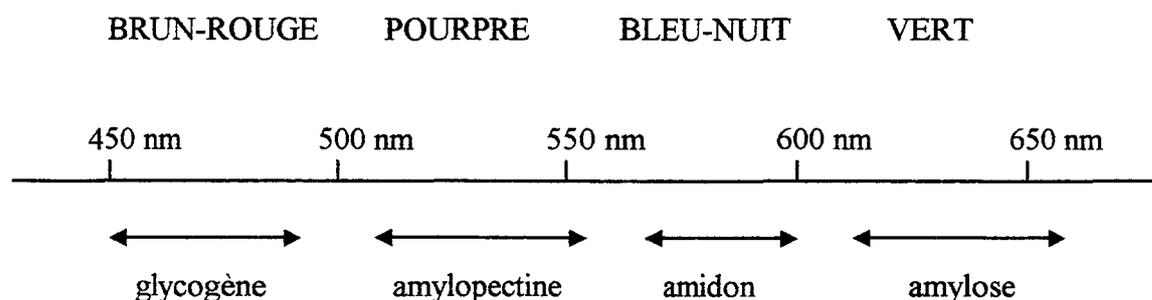


Figure 5 : Domaines d'absorption des complexes polysaccharides / iode (Banks et al., 1971).

Ces deux techniques donnent une relation linéaire entre la λ_{\max} ou l'IBC et le degré de polymérisation des α -1,4 glucanes (Banks & Greenwood, 1975).

1.4.3 - Les applications de l'interaction de l'iode avec l'amidon

L'interaction de l'iode avec les α -glucanes permet, d'une part l'étude de la proportion d'amylose contenue dans le grain d'amidon, d'autre part l'étude de la longueur des chaînes qui constituent les grappes de l'amylopectine.

Les valeurs mesurées, IBC ou λ_{\max} , n'indiquent qu'une valeur apparente du contenu en amylose (Montgomery *et al.*, 1961). En effet, certains amidons de céréales et de légumineuses ont été qualifiés de "riches en amylose" alors que la valeur élevée de la longueur d'onde au maximum d'absorption était en partie due, dans ces cas précis, à la longueur anormale des chaînes de l'amylopectine (Baba *et al.*, 1987 ; Hizukuri, 1985). De même, l'analyse fine de l'amidon de souches mutantes (*amylose-extender*, *sugary*) a montré que la haute capacité à fixer l'iode était due à la longueur des polysaccharides branchés et non exclusivement à une sur-représentation de la fraction d'amylose (Yeh *et al.*, 1981 ; Colonna & Mercier, 1984 ; Boyer, 1985 ; Takeda & Hizukuri, 1986, Takeda & Preiss, 1993). Inversement, la présence de lipides dans les grains d'amidon diminue la capacité de fixation de l'iode et, par conséquent, amène à sous-estimer la quantité d'amylose (Banks *et al.*, 1974).

La corrélation entre le degré de polymérisation et la λ_{\max} (ou l'IBC) est bien réelle mais doit être utilisée avec prudence. Si elle se révèle très précieuse pour des études préliminaires, en particulier pour sélectionner des génotypes mutants, elle ne peut en aucun cas être suffisante pour déterminer la structure fine de l'amidon.

Nous verrons dans le chapitre consacré à notre modèle d'étude, *C. reinhardtii*, l'utilisation possible des propriétés de complexation de l'iode *in situ* pour le criblage de souches défectueuses dans la synthèse d'amidon.

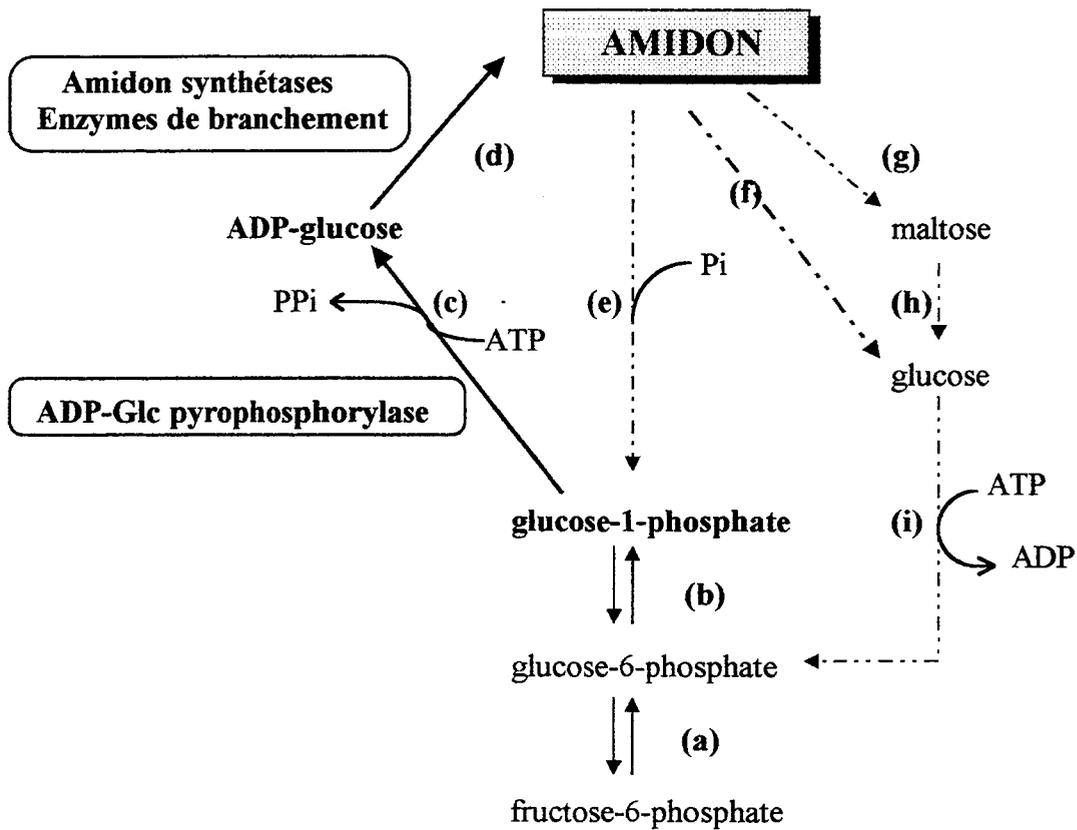


Figure 6 : Schéma général du métabolisme de l'amidon

(a) phosphoglucoisomérase; (b) phosphoglucomutase; (c) ADP-glucose pyrophosphorylase;

(d) amidon synthétases et enzymes de branchement; (e) phosphorylase;

(f) α -amylase; (g) β -amylase; (h) glucosidase; (i) hexokinase

---- voie de dégradation

— voie de synthèse

2 - VUE GENERALE SUR LE METABOLISME DE L'AMIDON

2.1 - La synthèse de l'amidon

La synthèse d'amidon, qui se produit dans l'amyloplaste ou dans le chloroplaste, débute par la synthèse de Glc-1-P à partir du Fru-6-P, ceci grâce à l'intervention des formes chloroplastiques de la phosphoglucoisomérase (PGI) et de la phosphoglucomutase (PGM). Le Glc-1-P formé est pris en charge par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ADP-Glc PPase) pour être transformé en nucléotide sucre, l'ADP-Glc. L'ensemble des réactions conduisant à la synthèse de l'ADP-Glc constitue la première étape de la synthèse de l'amidon.

La seconde étape, plus complexe, est celle de l'édification du grain d'amidon à partir des molécules d'ADP-Glc. Elle implique principalement l'intervention de deux types d'enzymes pour lesquelles différentes isoformes sont caractérisées : les amidon synthétases (ADP-glucose : 1,4- α -glucan glucosyl transférase, EC 2.4.1.21) et les enzymes de branchement (1,4- α -D-glucan : 1,4- α -D-glucan 6-glucosyl transférase, EC 2.4.1.18).

Notons qu'il est probable que des enzymes telles que les enzymes de débranchement soient, elles aussi, impliquées non pas dans la polymérisation mais dans l'édification du grain d'amidon en effectuant des réarrangements de la molécule d'amylopectine.

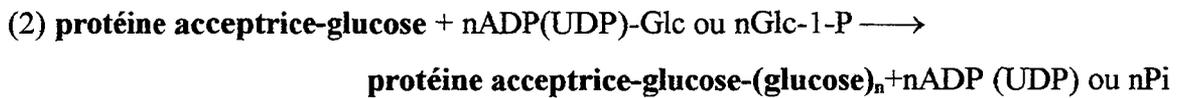
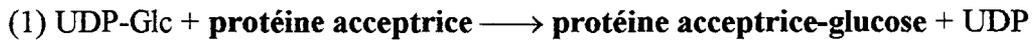
Parmi ces étapes de la synthèse de l'amidon, seuls quelques éléments de contrôle sont connus. La dégradation qui peut être concomitante à la synthèse (dans le cas de l'amidon transitoire) ajoute un niveau de complexité à la compréhension des mécanismes de régulation (**Figure 6**).

L'enzyme responsable de la synthèse du nucléotide sucre est au centre de nos préoccupations : un chapitre spécial lui sera donc consacré (chapitre 7).

2.2 - L'initiation de la synthèse de l'amidon

La synthèse d'amidon nécessite la présence d'une amorce glucosidique substrat des amidon synthétases (pour revue, Preiss, 1991). De quel type d'amorce s'agit-il et d'où vient cette amorce *in vivo* ?

Le processus d'initiation particulièrement étudié dans le tubercule de pomme de terre se ferait selon le mécanisme suivant :



La première réaction consistant à transférer un résidu de glucose sur une protéine acceptrice serait le fait d'une UDP-Glc : protéine transglucosylase tandis que la seconde réaction serait catalysée, soit par une amidon synthétase, soit par une phosphorylase. Des chaînes α -1,4-glucaniques liées de façon covalente à la protéine acceptrice seraient ainsi synthétisées. La synthèse peut se faire à partir, soit d'UDP-glucose, soit d'ADP-glucose ou de glucose-1-phosphate (Lavintman & Cardini, 1973 ; Lavintman *et al.*; 1974 ; Sivak *et al.*, 1981). Dans le tubercule de pomme de terre, la protéine acceptrice aurait une masse moléculaire de 38 kDa. La liaison O-glucosidique ferait intervenir une serine ou une thréonine (Moreno *et al.*, 1986).

L'initiation de la synthèse du glycogène (équivalent de l'amidon chez les mammifères) ferait intervenir une protéine appelée glycogénine. Cette protéine de 37 kDa, associée à la glycogène synthétase, est capable de s'autoglucosyler pour former une glucosyl-protéine utilisable comme amorce par la glycogène synthétase (Lomako *et al.* ; 1988). Contrairement à la protéine acceptrice des plantes, la glycogénine est glucosylée par une liaison avec une tyrosine (Smythe, 1988).

S'il est indéniable que la glycogénine est impliquée dans la synthèse du glycogène, sa fonction initiatrice reste fondée sur des données expérimentales amenant des preuves indirectes. Malgré la copurification de la protéine avec la glycogène synthétase et le glycogène, aucun mutant dépourvu de glycogénine n'a été isolé. Peut-être faut-il y voir le caractère essentiel de la fonction pour la survie cellulaire. Pourtant, des mutants dépourvus de glycogène sont viables chez *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*. Pour compliquer encore la compréhension du système, signalons que la glycogénine pourrait être impliquée dans la synthèse des protéoglycanes par l'intermédiaire d'une activité xylosyltransférase.

Beaucoup de questions restent en suspens en ce qui concerne l'initiation, en particulier la localisation du processus. Si le rôle de l'UDP-Glc : protéine transglucosylase dans l'amorçage de la synthèse d'amidon se confirme, de nouveaux problèmes se posent alors. En effet,

l'UDP-glucose n'est pas disponible dans le plaste alors que la synthèse d'amidon a lieu exclusivement dans ce compartiment. Il faut donc imaginer que la glucosylation ait lieu dans le cytosol et qu'il y ait ensuite translocation de la protéine glycosylée. Le deuxième aspect intéressant dans le processus d'initiation est son contrôle. Le mécanisme qui détermine la fréquence de l'initiation est inconnu ; selon Ardila et Tandecarz (1992), c'est le rapport ADP-glucose/UDP-glucose qui pourrait en être à l'origine.

Des mutations affectant le mécanisme d'amorçage de la synthèse d'amidon ne seront probablement jamais caractérisées chez les plantes supérieures puisque le polysaccharide est indispensable à leur survie et surtout à leur reproduction. En revanche, l'utilisation d'organismes tels que *C. reinhardtii*, pour lesquels la synthèse d'amidon ne semble pas indispensable, permettra sans doute d'explorer ce domaine.

2.3 - L'action concertée des amidon synthétases et enzymes de branchement dans la synthèse d'amidon

2.3.1 - Les amidon-synthétases

Les amidon synthétases transfèrent la partie glucosidique de l'ADP-Glc aux extrémités non réductrices des chaînes d' α -1,4-glucanes (Recondo & Leloir, 1961).

Il existe deux types d'amidon synthétase : l'amidon synthétase liée au grain d'amidon (GBSS pour Granule Bound Starch Synthase) et l'amidon synthétase soluble (SSS pour Soluble Starch Synthase). Dans un extrait brut d'albumen de maïs, environ la moitié de l'activité amidon synthétase est liée au grain (MacDonald & Preiss, 1985). Les organes pour lesquels les amidon synthétases ont été les plus étudiées sont l'albumen de maïs, le tubercule de pomme de terre et l'embryon de pois.

2.3.1.1 - Les amidon synthétases solubles (SSS)

Des études concernant les activités des amidon synthétases solubles, réalisées à partir de l'albumen de maïs, de l'orge, du blé, du tubercule de pomme de terre, du grain de riz, du pois, du sorgho et de feuilles d'épinard, ont montré qu'il existe deux formes majeures de SSS, appelées SSSI et SSSII (pour revue : Preiss, 1988 ; Preiss & Levi, 1980). Le clonage des ADNc correspondant à ces deux formes a permis de montrer qu'elles sont le produit de deux gènes différents. Les propriétés caractéristiques de la SSSI et de la SSSII sont résumées dans le **tableau 3**

Enzyme	Masse Moléculaire (kDa)	Km ADP-glucose (mM)	Substrat préférentiel	Km amylopectine (mg/ml)	
				0 M citrate	0,5 M citrate
SSSI	70	0.1	glycogène	0,16	< 0.001
SSSII	93-95	0.1	amylopectine	1,50	0,09

Tableau 3 : Principales propriétés des amidon synthétases solubles de l'albumen de maïs (Preiss, 1991).

De manière générale, l'augmentation de la salinité augmente l'affinité des amidon synthétases pour l'amorce. Alors qu'à faible concentration en sels, ni la SSSI ni la SSSII ne sont capables de travailler sans cette amorce, en présence de citrate (0,5 M), la SSSI acquiert la propriété de polymériser les molécules de glucose en absence d' α -1,4-glucanes exogènes. Signalons que cette propriété pourrait être le fait d'une contamination de la protéine purifiée par un polysaccharide endogène susceptible de servir d'amorce puisqu'un traitement amylolytique lui fait perdre sa capacité à polymériser en absence d'amorce (pour revue : Preiss, 1991). Les deux enzymes présentent une affinité pour l'ADP-glucose équivalente. Par contre, elles présentent des affinités spécifiques selon les amorces utilisées. La forme I semble être plus affine pour les polysaccharides à chaînes courtes (5 à 15 résidus de glucose) tandis que la forme II serait plus affine pour les chaînes composées d'au moins 20 résidus de glucose.

L'étude d'une souche mutante de *C. reinhardtii* a permis d'établir une corrélation entre la disparition de l'activité de la SSSII et la baisse du contenu en chaînes présentant un degré de polymérisation compris entre 8 et 50. Cette enzyme serait donc responsable de la synthèse des chaînes portant les grappes de l'amylopectine (chaînes B) (Fontaine *et al.*, 1993). Le rôle de la forme I n'est pas clairement établi ; elle pourrait être à l'origine de l'élongation des courtes chaînes externes (chaînes A).

2.3.1.2 - Les amidon synthétases liées (GBSS)

En plus des activités amidon synthétases présentes dans le stroma des plastes, il existe des activités associées au grain d'amidon. L'incubation du grain d'amidon avec l' α -amylase et l' α -glucosidase permet la libération des protéines responsables de cette activité (MacDonald & Preiss, 1983 ; 1985). Comme pour les amidon synthétases solubles, deux formes de GBSS ont été identifiées dans divers organismes. L'une d'entre-elle (GBSSI) est dans tous les cas prédominante. La forme minoritaire résulterait de la séquestration d'une amidon synthétase soluble.

Lorsqu'elles sont solubilisées (par digestion enzymatique du grain d'amidon), les enzymes de l'albumen de maïs présentent une affinité pour l'ADP-glucose 10 fois supérieure à celle de l'activité liée. Elle perd en outre sa capacité à utiliser l'UDP-glucose. Ses caractéristiques deviennent alors semblables à celles des amidon synthétases solubles.

ENZYME	Masse Moléculaire (kDa)	Km ADP-glucose (mM)	Substrat préférentiel	Km amylopectine (mg/ml)	
				0 M citrate	0,5 M citrate
GBSSI	61	0,14	glycogène	1,20	non déterminé
GBSSII	93	0,11	amylopectine	0,26	0,04

Tableau 4 : Principales propriétés des amidon synthétases liées de l'albumen de maïs (Preiss, 1991)

Dès 1922, Weatherwax décrit des souches mutantes de maïs dont l'albumen présente un aspect cireux (dit *waxy*). Par la suite, des analyses structurales sommaires ont permis de montrer que l'amidon de ces souches est dépourvu d'amylose. La nature de la lésion provoquant ce phénotype du maïs n'a été identifiée que bien plus tard par Nelson et Rines (1962). Ces auteurs ont montré que le phénotype *waxy* est associé à la perte de l'activité de l'amidon synthétase liée au grain. Depuis, de multiples travaux ont confirmé ces résultats et ont permis de montrer que la

GBSSI est bien l'enzyme responsable de la synthèse d'amylose (pour revue : Sivak & Preiss, 1994)

Chez *C. reinhardtii*, l'absence d'activité liée est également corrélée à l'absence d'amylose. Toutefois, une analyse de la structure fine de l'amidon isolé d'une souche défectueuse pour l'activité GBSS a révélé que le phénotype *waxy* s'accompagne non seulement de la disparition de l'amylose mais également de modifications structurales de l'amylopectine (Delrue *et al.*, 1992 ; Maddelein *et al.*, 1994).

Ces nouveaux éléments permettent d'affirmer que l'amidon synthétase liée au grain est à la fois impliquée dans la synthèse de l'amylose et dans celle de l'amylopectine.

Les principales propriétés, spécifiques des formes I et II de l'albumen de maïs, sont reprises dans le **tableau 4**. L'activité spécifique de la forme II mesurée *in vitro* est nettement plus élevée que celle de la forme I. Alors que la forme I est exclusivement retrouvée associée au grain d'amidon, la forme II a aussi été observée sous forme soluble dans l'embryon de pois (Smith, 1990 ; Denyer & Smith, 1992 ; Dry *et al.*, 1992), dans le tubercule de pomme de terre (Dry *et al.*, 1992) et dans l'albumen de maïs et de blé (Mu *et al.*, 1994 ; Denyer *et al.*, 1995). Il est clair que la forme I et les formes solubles sont bien des produits de gènes différents. La mutation *waxy* qui affecte l'albumen des céréales (pour le maïs voir Nelson & Rines, 1962 ; pour le riz, voir Sano, 1984) ainsi que la mutation *amf* affectant le tubercule de pomme de terre (Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987) se traduisent par la perte de l'activité liée de type I, l'activité soluble restant inchangée.

Les gènes ou ADNc codant chacune des formes liées ont été clonés, en particulier chez la pomme de terre (van der Leij *et al.*, 1991) et le pois (Dry *et al.*, 1992).

Il apparaît que l'expression des gènes codant les différentes formes de l'amidon synthétase liée n'est pas uniforme au cours du développement des organes de réserve (Dry *et al.*, 1992 ; Nakamura & Yuki, 1992). Celle de la forme I serait différée par rapport à celle de la forme II (voir chapitre 8).

2.3.2 - Les enzymes de branchement

Les enzymes de branchement (ou BE pour Branching Enzyme) transfèrent de courtes chaînes d' α -1,4-glucanes sur des chaînes d' α -1,4-glucanes préexistantes en créant une liaison α -1,6. Le mécanisme précis par lequel les enzymes de branchement agissent n'est pas encore clairement

défini. Il semblerait que l'enzyme clive une chaîne linéaire de glucoses liés en α -1,4 à quelques résidus de son extrémité non réductrice. Le fragment clivé serait alors lié à un glucose interne de la chaîne d'origine ou d'une chaîne voisine.

Comme dans le cas des amidon synthétases, il existe différentes isoformes de l'enzyme de branchement. Preiss et Boyer (1980) ont isolé 3 isoformes dans l'albumen de maïs. L'enzyme de type I est exclue en chromatographie DEAE cellulose tandis que les deux enzymes dites de type II (II a et II b) sont coéluées avec les amidon synthétases solubles I et II. Les deux formes II présentent de très fortes homologies. Par contre, la forme I est bien distincte. Les propriétés immunologiques de ces protéines vont également dans ce sens (Fisher & Boyer, 1983). Bien que très proches, les deux formes de type II semblent génétiquement indépendantes. En effet, la mutation *amylose extender* (*ae*) provoque la disparition spécifique de la forme IIb alors que les formes I et IIa restent intactes (Boyer & Preiss, 1978). Néanmoins, les études des profils de digestion tryptique ainsi que les analyses des propriétés immunologiques ne permettent pas de distinguer les deux protéines de type II (Singh & Preiss, 1985). Une sonde dirigée contre l'ADNc de l'une des deux formes de type II devrait donc s'hybrider avec la seconde. Or, Stinard et coll. (1993) n'ont détecté qu'un seul transcrit par cette méthode. Trois hypothèses expliquent ce résultat : la première est que les transcrits correspondant à chacune des formes ont la même taille. La seconde est qu'il n'existe qu'une seule forme II. La troisième impliquerait que le niveau d'accumulation du transcrit de la forme IIa soit trop faible pour être détecté. Néanmoins, s'il existe réellement deux formes, le locus *ae* code la forme IIb.

Les principales propriétés des enzymes de branchement de l'albumen de maïs sont résumées dans le **tableau 5**. Deux types de nomenclature sont utilisées : BEI et II ou A et B.

La situation chez *C. reinhardtii* est très comparable à celle de l'albumen de maïs : une forme de type I et une forme de type II ont pu être séparées (Fontaine *et al.*, 1993).

Dans le tubercule de pomme de terre, une seule forme d'enzyme de branchement a été isolée. La masse moléculaire de la protéine est encore controversée : certains auteurs tels Vos-Scheperkeuter et coll. (1989) ont purifié une protéine de 86 kDa, tandis que la protéine isolée par Blennow et Johanson (1991) possède une masse moléculaire de 103 kDa. Or, les premiers auteurs ont travaillé sur des tubercules en dormance tandis que les seconds ont étudié des tubercules en cours de développement ; la nature de l'enzyme de branchement purifiée pourrait donc dépendre de l'état physiologique du tubercule.

ENZYMES	Substrat préférentiel	Longueur des chaînes transférées (unités de glucose)	Nature des chaînes branchées au sein de l'amylopectine
Enzyme de branchement type I (famille B)	amylose	40 à plus de 100	chaînes B internes
Enzyme de branchement type II (famille A)	amylopectine	6 à 14	chaînes A externes et courtes chaînes B

Tableau 5 : Principales propriétés des enzymes de branchement de l'albumen de maïs
(Takeda *et al.*, 1993 ; Guan & Preiss, 1993)

Dans l'embryon de pois, on distingue 2 formes de la famille A (probablement issues du même gène) et une forme de la famille B (Smith, 1988). La preuve de l'indépendance génétique des formes A et B vient de l'analyse de la mutation *r* (*rugosus* ; le pois rugueux largement décrit par Mendel) qui touche uniquement la forme A. Le gène de structure de l'enzyme est interrompu par l'insertion d'un élément de type transposon (Bhattacharyya *et al.*, 1990). Dans la feuille de pois, la forme A semble absente mais une troisième forme pourrait y exister (Smith *et al.*, 1990).

Les études menées dans divers organismes et tissus révèlent qu'il existe une grande variabilité de la nature des enzymes de branchement selon l'espèce et, au sein d'une même espèce, selon le tissu et les conditions environnementales. Tout comme les amidon synthétases, les isoformes de l'enzyme de branchement, en particulier chez le pois, semblent avoir une spécificité d'expression spatiale et temporelle (Burton *et al.*, 1995).

Il est à signaler qu'aucun mutant affecté dans la forme I (famille B) n'a été décrit. Il est possible qu'une défectuosité dans cette enzyme n'ait pas de répercussion phénotypique suffisante pour être détectée (Burton *et al.*, 1995). En effet, un antisens dirigé contre la forme I du tubercule de pomme de terre ne modifie pas de manière significative le rapport amylose/amylopectine (Müller-Röber & Koßmann, 1994).

2.3.3 - Vers une compréhension de l'édification du grain d'amidon

La structure de l'amylopectine proposée par Hizukuri est largement acceptée. Elle se caractérise par un regroupement des points de branchement en certains endroits, regroupement à l'origine de la structure en grappe (chapitre 1). La principale question encore en suspens concerne le rôle spécifique des différentes amidon synthétases et enzymes de branchement dans l'édification de la structure organisée et complexe de l'amylopectine. La plupart des étapes de synthèse de l'amidon restent obscures.

Comment est effectuée l'initiation de la synthèse ? Comment se déroule la synthèse simultanée de l'amylose et de l'amylopectine ? Comment leurs proportions respectives sont-elles définies ? Comment s'organisent ces deux molécules au sein du grain d'amidon ? Enfin, quel est le déterminisme qui contrôle la morphologie et le nombre de grains dans une cellule ?

De récents résultats permettent cependant d'échafauder divers modèles faisant intervenir chacune des isoenzymes. Les études de l'effet de différentes mutations sur la structure du polysaccharide accumulé ainsi que sur le métabolisme carboné apportent de nouveaux éléments pour la compréhension des mécanismes complexes de synthèse à la fois de l'amylose et de l'amylopectine.

2.3.3.1 - Etude de souches affectées dans le métabolisme de l'amidon

De nombreux mutants affectés dans la voie de synthèse et de dégradation de l'amidon ont été isolés chez diverses espèces. Les mutations caractérisées touchent aussi bien les tissus chlorophylliens que les tissus de réserve. En ce qui concerne les tissus qui sont le siège de la photosynthèse, les déficiences sont peu fréquentes : il en existe chez *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana sylvestris*, *Clarkia xantiana* et enfin, chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les mutations caractérisées dans les tissus de réserve sont plus nombreuses. La plupart des études ont porté sur des céréales, en particulier le maïs. Des raisons économiques ont conduit à la sélection de nombreux cultivars de maïs produisant de l'amidon de structure anormale.

A l'heure actuelle, différents systèmes d'études du métabolisme de l'amidon se sont développés. Il s'agit en particulier de la pomme de terre et des céréales, mais également, depuis ces 5 dernières années, de l'algue *C. reinhardtii* qui s'est révélée être un modèle de choix. Nous n'évoquerons ici que les principales mutations caractérisées dans les deux systèmes pour lesquels le plus grand nombre de loci a été identifié : *C. reinhardtii* et l'albumen de maïs.

Génotype	Nom de la souche	Phénotype iode	Structure et Quantité d'amidon	Enzyme affectée	Référence
<i>sta1-1</i> <i>sta1-2::ARG7</i>	I7 BAF J3	jaune	5% d'amidon ne contenant pas d'amylose	ADP-Glc PPase	Ball <i>et al.</i> , 1990
<i>sta2-1</i> <i>sta2-2::ARG7</i>	I8B BAF R1	rouge	Quantité normale d'amidon dépourvu d'amylose	GBSS	Delrue <i>et al.</i> , 1992
<i>sta3-1</i> <i>sta3-2</i> <i>sta3-3</i>	I152 I154 I39	vert	Diminution de 60 % Amylopectine dépourvu de chaînes de taille intermédiaires	SSS II	Fontaine <i>et al.</i> , 1993
<i>sta4-1</i> <i>sta4-2</i>	I73 I97	vert	Accumulation de 60% d'amidon. Enrichissement en amylose, modification de l'amylopectine	fonction nécessaire à la synthèse d'amidon de réserve	Libessart <i>et al.</i> , 1995
<i>sta5</i>	GST	jaune	5 à 20 % d'amidon selon l'allèle Diminution de l'amylose	PGM	--
<i>sta6-1::ARG7</i>	BAF J5	jaune	moins de 1% de la quantité d'amidon	ADP-Glc PPase	--
<i>sta7-1::ARG7</i>	BAF J6	jaune	présence d'un polysaccharide soluble	isoamylase ?	--
<i>sta80-1</i>	N52	noir	sur-accumulation d'amidon	?	--

Tableau 6 : Mutations qui affectent le métabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Chlamydomonas reinhardtii : (mutants isolés et caractérisés au laboratoire)

L'analyse des mutations exposées ci-dessous a contribué à apporter quelques éléments à la compréhension des modalités d'édification de l'amidon.

→ L'altération de la SSSII

Une souche mutante défectueuse pour l'activité SSSII accumule 20 à 40 % de l'amidon accumulé par la souche sauvage ; la proportion d'amylose composant cet amidon résiduel passe de 25 à 55 %. De plus, la structure de l'amylopectine de cette souche est modifiée : le nombre de courtes chaînes (degré de polymérisation compris entre 2 et 7) est augmenté alors que le nombre de chaînes de longueur moyenne (8 à 60) a considérablement diminué (Fontaine *et al.*, 1993). Ces observations permettent d'assigner à la SSSII un rôle dans la synthèse ou dans le maintien des chaînes de taille intermédiaire de l'amylopectine (tableau 3, page 30).

→ L'altération de la GBSS

Une souche affectée dans l'activité GBSS a également été isolée et la structure de son amidon caractérisée (Delrue *et al.*, 1992). L'observation de la disparition de la fraction d'amylose s'est révélée concomitante à une modification de la structure de l'amylopectine qui présente dans cette souche moins de longues chaînes que dans la souche sauvage (tableau 4, page 50).

→ L'altération simultanée de la SSSII et de la GBSS

L'analyse du double mutant défectueux à la fois pour l'activité SSSII et pour l'activité GBSS apporte de nouveaux renseignements qui laissent penser que la GBSS intervient dans la synthèse de la structure de base (le squelette) de l'amylopectine (Maddelein *et al.*, 1994). Ces résultats montrent bien l'intervention de la GBSS dans la synthèse de l'amylopectine et non exclusivement dans celle de l'amylose comme cela avait été admis antérieurement.

D'autres souches mutantes isolées au laboratoire sont en cours d'étude. Elles devraient permettre d'apporter de nouveaux éléments et s'avérer utiles à notre compréhension des processus d'édification du grain d'amidon. Les principaux phénotypes mutants et la nature des lésions associées à ces phénotypes sont repris dans le **tableau 6**.

Génotype	Modifications de l'amidon		Activités enzymatiques défectueuses	Nature de la protéine mutée
	Quantité	Composition		
<i>ae</i>	49 %	40% d'amylose, amylopectine moins branchée	20 % de l'activité BE Iib	BE Iib
<i>bt-1</i>	?	accumulation d'ADP-Glc dans l'amyloplaste		transporteur d'adénylate
<i>bt-2</i>	25 %	nd	3% de l'activité ADP-Glc PPase	Petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase
<i>du</i>	64 %	40 à 60 % d'amylose	40 % de la SSS II et BE Iia	—
<i>sh-1</i>	30 %	nd	sucrose synthétase	sucrose synthétase I
<i>sh-2</i>	25 %	nd	6 % de l'activité ADP-Glc PPase	Grande sous-unité de l'ADP-Glc Ppase
<i>sh-4</i>	30-35 %	nd	20 à 40 % pour toutes les enzymes de synthèse de l'amidon	—
<i>su-1</i>	35 %	phytglycogène	17 à 30 % de l'activité α -1,6-glucosidase	isoamylase
<i>su-2</i>	62 %	30 à 40 % d'amylose	?	—
<i>wx</i>	100 %	pas d'amylose	pas d'activité GBSS I	GBSS I

Tableau 7 : Principales mutations qui affectent le métabolisme de l'amidon dans l'albumen de maïs

L'albumen de maïs :

Dans l'albumen de maïs, de nombreuses mutations affectant le métabolisme de l'amidon ont été caractérisées. Certaines d'entre elles sont présentées dans le **tableau 7**. Des constructions par voie génétique ont permis d'étudier les effets cumulés de certaines de ces mutations.

Nous évoquerons plus en détail la mutation *su1* (*sugary 1*) qui, par son originalité, a particulièrement retenu notre attention. Ses effets sur le métabolisme et la structure de l'amidon ont été élucidés par Pan et Nelson (1984). La découverte de la nature du gène touché est récente, elle est le fruit du travail de James et coll. (1995). La mutation *su1* provoque une baisse de la quantité d'amidon, ainsi que l'accumulation d'un polysaccharide soluble dont la quantité représente 35 % du poids sec de l'albumen. Il a été montré que la mutation *su1* touche un gène dont la séquence primaire est compatible avec une activité de débranchement (elle s'apparente à une isoamylase). L'absence de cette activité de débranchement provoque l'accumulation de phytoglycogène (polysaccharide hyperbranché) et la réduction de la quantité d'amidon. Chez *C. reinhardtii*, une mutation similaire à celle affectant le locus *su1* est en cours de caractérisation. Cette souche mutante voit s'effondrer la synthèse de l'amidon granulaire (0,1 % de la souche sauvage). Par contre, des quantités significatives de polysaccharide soluble sont dosables (0,5 à 1 µg/10⁶ cellules). Les analyses structurales ont permis de montrer que ce polysaccharide présente une structure hautement branchée qui s'apparente au glycogène. Ce phénotype est associé à la disparition d'une activité de débranchement en zymogramme.

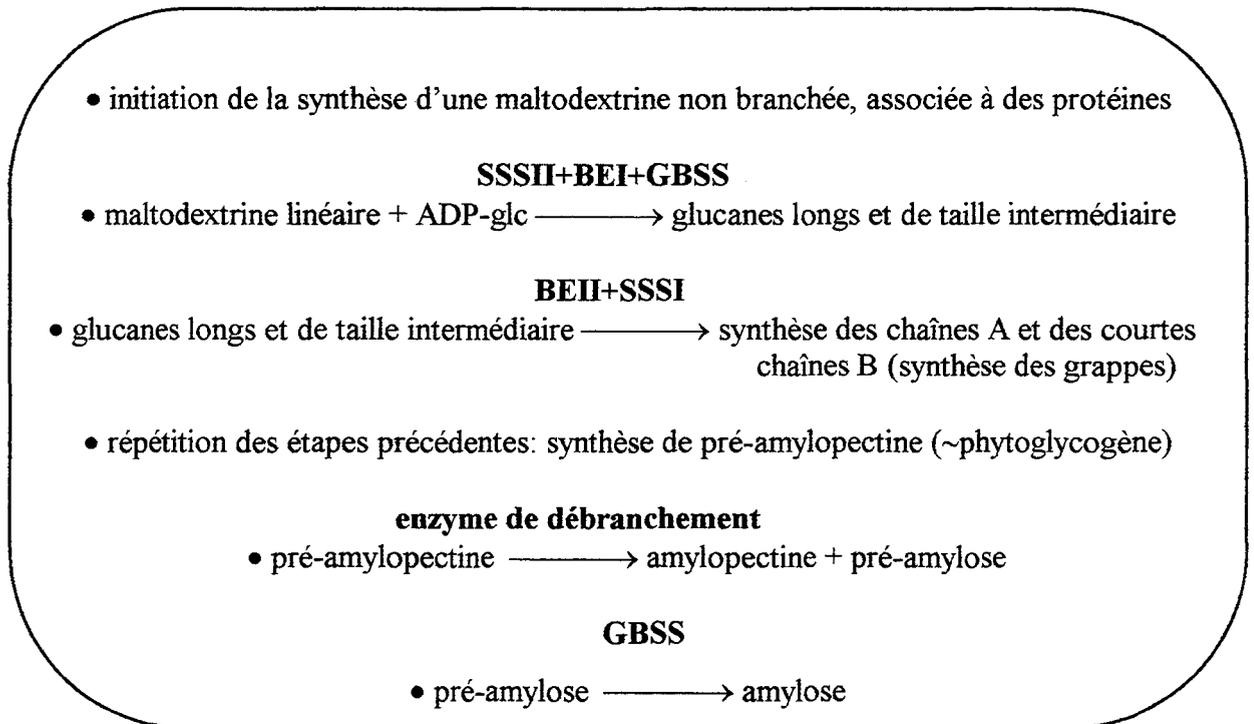
Nous verrons plus loin dans quelle mesure cette enzyme de dégradation pourrait intervenir dans l'édification du grain d'amidon.

2.3.3.2 - Modèles d'édification du grain d'amidon

Preiss (1995) a proposé un modèle pour illustrer le mécanisme d'édification du grain d'amidon (l'ordre séquentiel des réactions tel qu'il est présenté n'est probablement pas respecté *in vivo*).

L'élongation des polysaccharides aurait lieu à la surface du grain d'amidon lors de sa croissance. C'est donc à cet endroit que l'enzyme de branchement de type I (BEI) et l'amidon synthétase soluble de type II (SSSII) interagissent avec les chaînes glucaniques produites par l'amidon synthétase liée au grain (GBSS). L'action concertée de ces enzymes conduit à la synthèse de longues chaînes branchées et de chaînes de taille intermédiaire. Finalement, la SSSI et la BEII participeraient à la synthèse des courtes chaînes A et des chaînes B externes pour former un polysaccharide de structure hautement branchée, soluble dans l'eau, précurseur de

l'amylopectine (appelé pré-amylopectine ou phytoglycogène). L'isoamylase interviendrait alors et participerait à un processus de débranchement pour donner à l'amylopectine sa structure finale et libérer des chaînes précurseurs de l'amylose. La GBSS allongerait ces dernières afin de synthétiser l'amylose. En effet, seule la GBSS semble impliquée dans la synthèse de l'amylose qui a probablement lieu au sein du grain d'amidon.



Le modèle proposé par Preiss fait intervenir les deux enzymes de branchement dans des étapes séparées. La BEI serait associée à la SSSII pour la synthèse de longs glucanes et la BEII avec la SSSI conduirait à la synthèse des chaînes composant les grappes. Cependant, tout ceci n'a pu être démontré *in vivo*.

Nos connaissances sur la spécificité de l'activité des enzymes et de leurs interactions ne permettent pas de proposer un modèle d'élaboration du grain conférant un rôle spécifique et précis à chacune des enzymes. Néanmoins, plusieurs étapes du mécanisme de synthèse semblent maintenant acquises. Certains détails peuvent donc être ajoutés au schéma proposé par Preiss :

- La synthèse de l'amidon se produit à la surface du grain.
- Les SSSI, SSSII, GBSS, BEI et BEII allongent et branchent les chaînes glucosidiques existantes pour former un polymère hautement branché, non organisé, de structure comparable à

celle du glycogène. Celui-ci sera modifié au fur et à mesure de sa synthèse par une α -1,6-glucosidase.

- Une α -1,6-glucosidase rompt les liaisons α -1,6 sans pouvoir accéder aux points de branchement trop proches les uns des autres, ce qui conduit à leur "regroupement". Ajoutons ici que des données récentes montrent que les enzymes de branchement ne sont capables de transférer des polymères de glucose que sur des chaînes pré-existantes dont la longueur doit atteindre un minimum de 13 résidus. Autrement dit, la taille du fragment transféré et du fragment qui reçoit le produit du transfert sont définies. Cette propriété permet d'expliquer l'uniformité de la longueur des chaînes qui composent les grappes de l'amylopectine (**Figure 1a**).

- La SSSII allongent les courtes chaînes branchées ayant résisté à la digestion par l' α -1,6-glucosidase pour former les chaînes des grappes qui s'organisent en doubles hélices.

2.4 - L'association des enzymes au grain d'amidon

L'action des amidon synthétases et des enzymes de branchement est susceptible d'être contrôlée de différentes manières. Nous verrons dans le chapitre 8 que l'expression différentielle des isoformes en est une.

Un second type de contrôle pourrait intervenir au fur et à mesure de la croissance du granule d'amidon. En effet, la localisation des enzymes, en particulier des amidon synthétases, semble pouvoir déterminer leur spécificité d'action puisqu'elle détermine la nature des molécules auxquelles elles auront accès.

Dans l'embryon de pois, (Denyer *et al.*, 1993) ainsi que dans le tubercule de pomme de terre (Edwards *et al.*, 1988) et dans l'albumen de blé (Denyer *et al.*, 1995), deux formes de GBSS ont été caractérisées. La première est toujours associée au grain (GBSSI analogue à la protéine *Waxy* de l'albumen de maïs, *Amf* chez la pomme de terre). La seconde présente une activité spécifique élevée lorsqu'elle se trouve sous forme soluble. Cette seconde forme présente d'ailleurs de fortes homologues avec la SSSII ; il pourrait s'agir de la même protéine. Les SSS ainsi que les BE pourraient à la fois être associées au grain ou solubles. En effet, des expériences d'immunolocalisation montrent que plus de la moitié des protéines correspondant à la GBSSII/SSSII, à la BEI ainsi qu'à la BEII, sont associées au grain d'amidon. Les enzymes qui travaillent à la surface du grain d'amidon pourraient être incorporées à celui-ci au cours de la croissance. Elles seraient alors piégées dans la structure cristalline et certaines d'entre elles

deviendraient inactives par contrainte physique ou par absence de substrat. La GBSSI serait systématiquement associée au grain en raison de sa forte affinité pour l'amidon. Il faut ajouter qu'elle perd son activité lorsqu'elle est libérée du grain par digestion enzymatique de ce dernier. Ainsi, au cours de la croissance du grain d'amidon, les quantités relatives des différentes formes enzymatiques sont susceptibles de varier. Ce phénomène pourrait permettre d'expliquer les modifications de la structure de l'amidon observées au cours du développement des organes de réserve.

L'étude comparative des différentes isoformes de l'amidon synthétase présentes dans l'embryon de pois et dans l'albumen de blé met en évidence des différences sensibles. En effet, dans l'albumen de pois, chaque forme liée au grain est également présente sous forme soluble. Par contre, dans l'albumen de blé, l'une des isoformes de type *Waxy* (GBSSI) semble exclusivement associée au grain alors que d'autres isoformes sont exclusivement localisées dans la phase soluble (Denyer *et al.*, 1995).

Le nombre d'isoformes, leurs importances relatives et leurs spécificités sont probablement responsables du déterminisme de la structure de l'amidon, aussi bien pour les tissus de réserve que pour les tissus chlorophylliens. Le fait que certaines isoformes puissent être simultanément solubles et liées, ou exclusivement solubles, ou encore exclusivement associées au grain, amène un degré de complexité supérieur dans la compréhension du rôle respectif de chacune d'entre elles.

2.5 - La dégradation de l'amidon

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la dégradation de l'amidon (**Figure 7**).

- les α -amylases et autres endo-amylases (elles libèrent du glucose, du maltose, du maltotriose ainsi qu'une α -dextrine limite)
- les β -amylases (elles libèrent du maltose à partir des extrémités non réductrices des α -glucanes)
- l' α -glucosidase (elle hydrolyse le maltose et autres courts maltosaccharides en glucose)
- la phosphorylase (elle ne peut attaquer que des oligosaccharides de taille supérieure au maltotétraose et libère du glucose-1-phosphate)
- les enzymes de débranchement (elles clivent les liaisons α -1,6)

- l'enzyme D (pour Disproportionning enzyme ; elle catalyse le transfert de courtes chaînes linéaires par un processus de transglucosylation).

La première étape de dégradation et la fréquence de cet événement restent à ce jour indéterminées. La dégradation du grain d'amidon serait amorcée par une endoglucosidase permettant la libération d'oligosaccharides qui deviendraient alors accessibles aux autres enzymes.

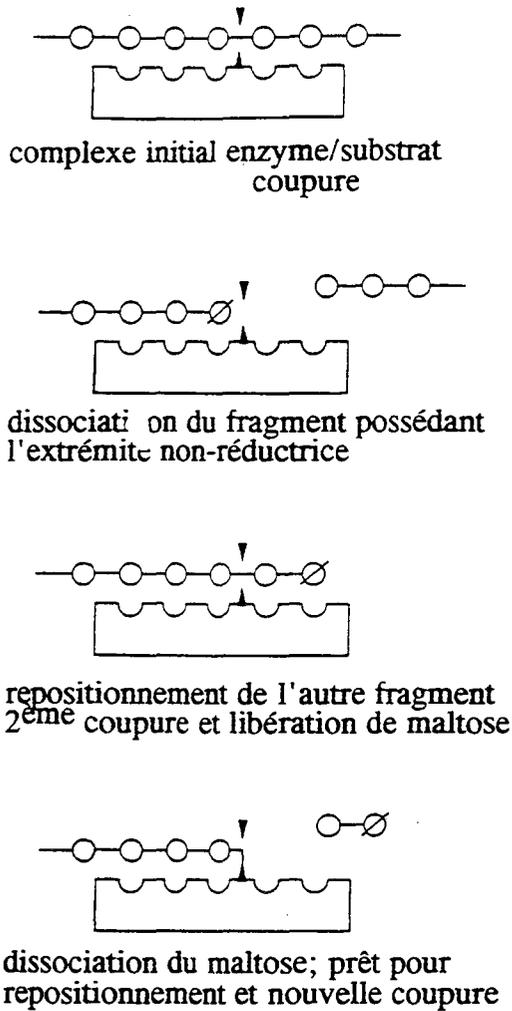
La seconde inconnue dans la dégradation de l'amidon est l'importance relative de l'hydrolyse par rapport à la phosphorylyse. Il existe sans doute un contrôle en fonction des besoins de la cellule. Par exemple, lors de la germination du grain de céréale, il se produit d'abord une destruction de l'albumen puis une dégradation des grains d'amidon. La dégradation devient alors extracellulaire et exclusivement hydrolytique (Boyer, 1985). Le glucose ainsi libéré est converti en saccharose et transporté sous cette forme à l'embryon. Dans la feuille d'épinard mais également dans le tubercule de pomme de terre, deux types de phosphorylases ont été caractérisées, l'une chloroplastique, l'autre cytosolique (Schächtele & Steup, 1986 ; Nakato & Fukui, 1986).

Retenons que la multiplicité et l'hétérogénéité des enzymes intervenant dans la dégradation de l'amidon rendent difficile sa compréhension mais permettent sans doute une régulation très fine du processus à l'intérieur des différents types cellulaires.

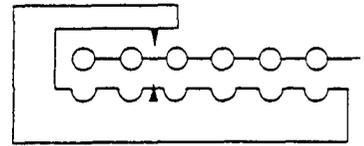
2.6 - Conclusion

L'existence et l'élaboration des zones cristallines correspondant à la structure organisée de l'amylopectine semblent de mieux en mieux comprises. Cependant, aucun modèle ne justifie la présence des cercles de croissance observables dans les grains d'amidon. Ces cercles, qui semblent traduire des modifications périodiques dans les étapes d'édification de l'amidon, correspondent peut-être à une expression différentielle des enzymes.

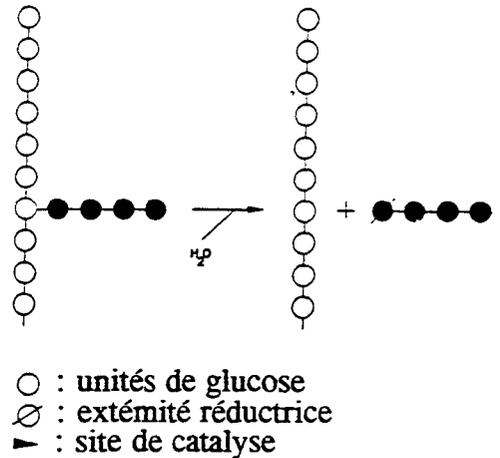
α -amylase :



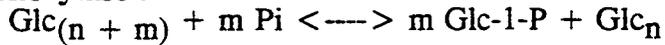
β -amylase :



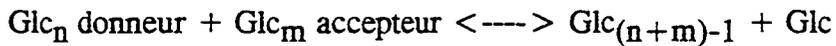
Enzyme de débranchement



α -1,4-glucane-phosphorylase :



D enzyme :



α -glucosidase :

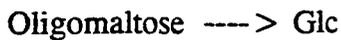


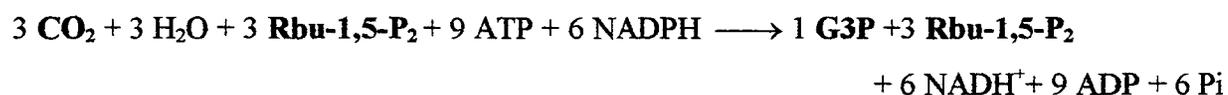
Figure 7 : Mode d'action des différentes enzymes de dégradation de l'amidon

3 - A L'ORIGINE DE LA SYNTHÈSE DE L'AMIDON TRANSITOIRE : LA FIXATION DU CARBONE INORGANIQUE.

3.1 - La photosynthèse

3.1.1 - *Le cycle de Calvin (cycle de réduction photosynthétique du CO₂ ou cycle réducteur des pentoses phosphate)*

Les pionniers de l'étude des mécanismes de photosynthèse (en particulier Calvin, Bassham et Benson) ont utilisé dès 1953, l'algue verte unicellulaire *Chlorella*, afin de suivre le devenir du CO₂ fixé par les cellules. Après quelques secondes d'incubation en présence de [¹⁴C]CO₂, une fraction importante de la radioactivité est retrouvée dans une petite molécule : l'acide 3-phosphoglycérique (3PGA). Cet acide est également le premier produit de photosynthèse détectable dans les feuilles des végétaux supérieurs. Les réactions enzymatiques impliquées dans l'assimilation du CO₂ sont à présent bien connues ; elles constituent un cycle appelé cycle de Calvin ou cycle de réduction des pentoses phosphate (RPP pour Reductive Pentose Phosphate cycle ou cycle réducteur des pentoses phosphate). Ce cycle comporte trois étapes majeures : l'étape de carboxylation (carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate par la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RUBISCO) qui conduit à la formation de deux molécules de 3PGA), une étape de réduction (réduction du 3PGA en 3-phosphoglyceraldéhyde ou G3P) et une étape de régénération (resynthèse de Rbu-1,5-P₂ à partir d'une fraction des G3P). L'ensemble de ces étapes peut être résumée de la manière suivante :



Le cycle de Calvin est confiné au stroma du chloroplaste. Lors de ce processus, trois molécules d'ATP et deux molécules de NADPH sont requises pour la fixation d'une molécule de CO₂. Une partie des molécules de G3P est directement utilisée dans le chloroplaste pour la synthèse de l'amidon, qui constitue le principal produit photosynthétique lors d'une photosynthèse très active. Le reste est soit transporté vers le cytosol en échange de Pi ou de 3PGA (Heldt & Flügge, 1987 ; Heldt *et al.*, 1990), soit converti en dihydroxyacétone phosphate lui-même susceptible d'être exporté par le même translocateur.

3.1.2 - La régulation de la fixation du CO₂

Chez les organismes photosynthétiques, la lumière constitue une source d'énergie pour la production d'ATP et de NADPH₂. Elle influence aussi l'activité des enzymes de la photosynthèse et du métabolisme carboné. Dans le chloroplaste ou chez les cyanobactéries, l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle est convertie en différents signaux de régulation :

- A la lumière, les protons sortent rapidement du stroma pour entrer dans les thylakoïdes, provoquant ainsi une augmentation du pH du stroma. La sortie des protons est compensée par une entrée de Mg²⁺ et Ca²⁺. Le pH et la concentration en cations deviennent alors favorables à l'activité de la RUBISCO (Barber, 1976), mais également à celle des enzymes de synthèse de l'amidon pour lesquelles le pH optimal est très nettement alcalin.

- Parmi les autres mécanismes d'activation contrôlés par la lumière, il faut également signaler le système ferrédoxine/thiorédoxine. Les thiorédoxines sont des protéines capables de réduire les ponts disulfure d'autres protéines. Sous sa forme réduite, la thiorédoxine active sélectivement, en les modifiant, certaines enzymes du métabolisme carboné telles que la fructose bisphosphatase, la sédoheptulose bisphosphatase, la phosphoribulokinase (enzymes impliquées dans la régénération du Rbu-1,5-P₂) (Cséke & Buchanan, 1986). Le système ferrédoxine/thiorédoxine existe chez les cyanobactéries, les plantes en C₃ et en C₄, ainsi que chez les crassulacées. Il est actif dans le chloroplaste et intervient dans la régénération de l'accepteur de CO₂, étape sans laquelle la photosynthèse ne pourrait se poursuivre.

3.2 - Devenir du CO₂ dans le métabolisme carboné

A l'issue de chacun des trois modes de fixation du CO₂ décrits ci-dessus, les principaux produits accumulés à la lumière sont le saccharose et l'amidon. De plus, on retrouve également des hexoses libres (du glucose et du fructose) en particulier dans les cellules des tissus non photosynthétiques. Plus rarement, des fructanes (polymères de fructose) s'accumulent dans les cellules des feuilles et des tiges ; ceci concerne en particulier les plantes des pâturages des régions tempérées (pour revue : Meier & Reid, 1982). Enfin, la synthèse de la paroi cellulaire représente une importante part de la consommation des glucides. Elle ne doit donc pas être négligée dans le bilan du métabolisme carboné (Delmer, 1983) (**Figure 8**). Nous nous limiterons ici à la description des métabolismes du saccharose et de l'amidon. Néanmoins, il apparaît nécessaire de faire un rappel préalable sur la synthèse des hexoses phosphate puisque ceux-ci sont impliqués dans toutes les voies métaboliques des polysaccharides.

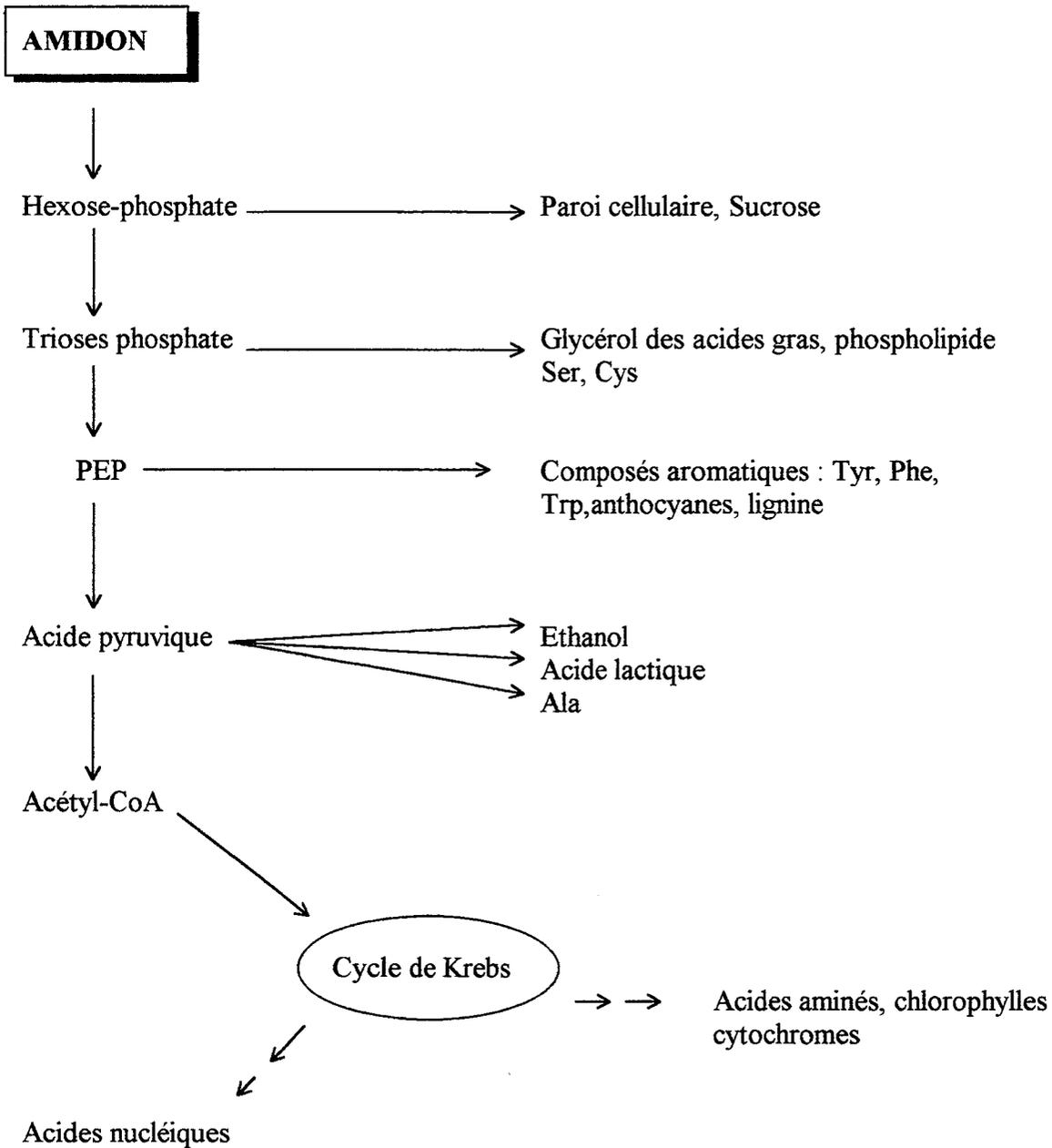


Figure 8 : La glycolyse et la respiration, mécanismes à l'origine de la synthèse des composés essentiels à la vie de la cellule et à sa multiplication.

3.2.1 - Rôle des hexoses phosphate

Les hexoses phosphate constituent le point de convergence de la synthèse et de la dégradation des glucanes. Ils proviennent soit de la néoglucogenèse, soit de la dégradation des polysaccharides. Le cytosol et le chloroplaste possèdent un pool d'hexoses phosphate qui leur est propre (Stitt *et al.*, 1980). Ceci est conforté par la caractérisation de formes cytosoliques et chloroplastiques de la phosphoglucomutase (PGM) et de la phosphoglucoisomérase (PGI) (apRees, 1985) (**Figure 8**). La situation semble différente dans les tissus non photosynthétiques. En effet, des amyloplastés intacts, isolés de l'albumen de blé, sont capables de synthétiser un amidon marqué lorsqu'ils sont incubés en présence de [¹⁴C]-glucose-1-phosphate, et ce, sans aucune redistribution du marquage au sein même des molécules de glucose (Tyson & apRees, 1988). Les amyloplastés posséderaient donc la capacité d'importer directement le Glc-1-P. Hill et Smith (1991) auraient pour leur part détecté de la même manière un transport de Glc-6-P vers l'amyloplaste de pois.

3.2.2 - Métabolisme du saccharose

3.2.2.1 - L'importance du saccharose

L'importance du saccharose au sein de la cellule végétale est indéniable. Omniprésent, on le retrouve dans toutes les étapes qui conduisent au stockage ou à la libération de carbone et d'énergie.

En effet, le saccharose constitue, avec l'amidon, le principal produit de la photosynthèse. Mais contrairement à ce dernier, il est stocké non pas dans le chloroplaste mais dans la vacuole. Il représente aussi la forme majeure sous laquelle le carbone est transporté des tissus chlorophylliens jusqu'aux tissus de réserve *via* le phloème. Ce transport est nécessaire à la constitution comme à la redistribution des réserves (Müller-Röber & Koßmann, 1994). Par exemple, la mobilisation de l'amidon lors de la germination implique sa conversion en saccharose. Enfin, même si le saccharose est le composant majeur des organes de réserve chez certaines plantes, sa localisation n'est pas limitée à ces organes spécialisés. Il peut notamment s'accumuler dans les feuilles de maïs où il peut constituer 25 % du poids sec (apRees, 1984 ; Hawker, 1985).

3.2.2.2 - La synthèse du saccharose

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux mécanismes de contrôle du métabolisme du saccharose. Les différentes étapes de synthèse et de dégradation sont schématisées dans la **figure 9**.

La régulation de la synthèse du saccharose est contrôlée par la saccharose phosphate synthétase (SPS). Cette enzyme existe sous deux formes dont l'une est plus active que l'autre. Le passage d'une forme à l'autre se produit par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation (Huber & Huber, 1992). La protéine est moins active lorsqu'elle se présente sous forme phosphorylée. La phosphorylation est fonction des concentrations de Pi et de Glc-6-P. En plus de son rôle d'activateur de la SPS, le Glc-6-P inhibe la SPS-protéine kinase.

La présence de phosphate inorganique dans le chloroplaste est indispensable à la photosynthèse. Or, la synthèse du saccharose conduit justement à en augmenter la concentration. Il est donc très probable que ces deux processus, photosynthèse et synthèse de saccharose, se déroulent de manière coordonnée. Le Pi est quant-à lui transporté vers le chloroplaste en échange de trioses phosphate (Flügge & Heldt, 1984). Notons que le 3PGA peut également sortir du chloroplaste grâce au même transporteur ; toutefois, les modifications de pH observées à la lumière ne sont pas en faveur d'un tel transport. La coordination de la synthèse de saccharose et de la photosynthèse est essentielle pour que cette dernière puisse se poursuivre. Nous détaillerons dans le paragraphe 1.3.2 le mécanisme de contrôle de l'équilibre entre la glycolyse et la synthèse de saccharose.

3.2.2.3 - La dégradation du saccharose

La saccharose synthétase et les invertases sont les enzymes impliquées dans la dégradation du saccharose. Le fructose et le glucose ainsi libérés sont phosphorylés (**Figure 9**). L'hypothèse selon laquelle la dégradation du saccharose fournirait directement des nucléotides sucres précurseurs de la synthèse d'amidon a été écartée pour une raison majeure : la saccharose synthétase produit *in vivo* essentiellement, si ce n'est exclusivement, de l'UDP-glucose (apRees, 1984). Or, les amidon synthétases utilisent spécifiquement l'ADP-glucose *in vitro* comme *in vivo*.

Une partie de l'UDP-glucose produit lors de la dégradation du saccharose servirait à la synthèse de cellulose et autres polysaccharides de structure. Toutefois, il est principalement transformé en hexoses phosphate par l'UDP-glucose pyrophosphorylase cytoplasmique. Les

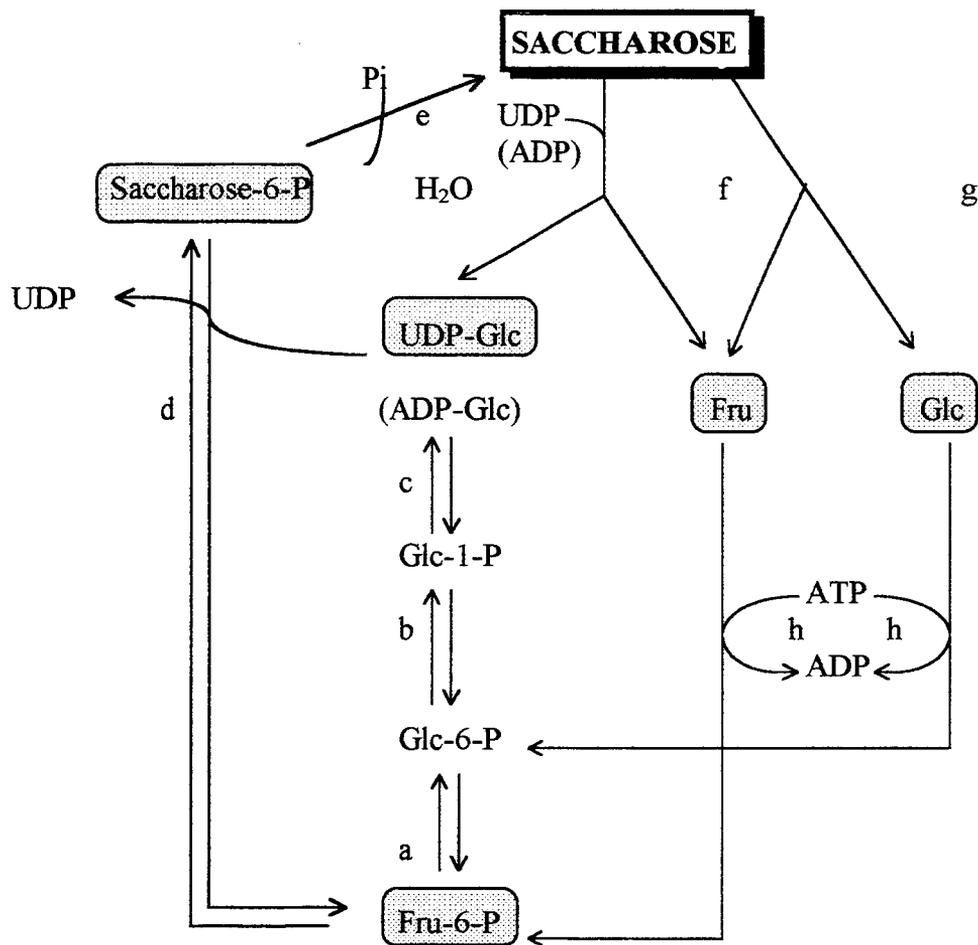


Figure 9 : Représentation schématique du métabolisme du saccharose.

a : Glc-6-P isomérase

b : phosphoglucomutase

c : UDP-Glc pyrophosphorylase

d : saccharose phosphate synthétase

e : saccharose phosphatase

f : saccharose synthétase, (une deuxième forme pourrait utiliser spécifiquement l'ADP au lieu de g : invertase l'UDP)

h : hexokinase

enzymes de la glycolyse transforment ceux-ci en trioses phosphate. Ces derniers sont, soit métabolisés directement dans le cytosol, soit transportés vers l'amyloplaste où ils peuvent servir à la synthèse d'amidon (**Figure 10**).

3.2.3 - L'influence de la synthèse et de la dégradation de l'amidon sur le métabolisme carboné

Les données concernant les mécanismes de synthèse de l'amidon ont été détaillées antérieurement (chapitre 2). Le paragraphe qui suit vise à replacer le processus dans un cadre plus général : celui du métabolisme carboné de la cellule.

3.2.3.1 - La place de l'amidon dans le métabolisme carboné

L'amidon est le polysaccharide de réserve dominant chez les plantes. Il est présent dans tous les tissus de la plupart des végétaux supérieurs. Il représente 80 % du poids sec du tubercule mature de pomme de terre, 65 à 75 % du grain de blé.

L'amidon et le saccharose sont des produits de la photosynthèse. A la lumière, 20 à 30 % du [¹⁴C]-CO₂ fixé par les feuilles est incorporé dans l'amidon. Cette accumulation d'amidon dans les chloroplastes serait un mécanisme de mise en réserve de carbone lorsque la photosynthèse excède les capacités de la feuille à exporter le saccharose (Stitt, 1984). C'est pour cette raison que cet amidon chloroplastique est aussi dit "amidon transitoire" puisqu'il est supposé être dégradé dès l'arrêt de la photosynthèse pour être transporté vers les organes de réserve. Néanmoins, la synthèse d'amidon dans les feuilles est régulée ; elle ne constitue donc pas simplement un moyen d'éponger les excès de produits carbonés issus de la photosynthèse.

3.3.2.2 - La synthèse de l'amidon

D'où vient le carbone servant à la synthèse d'amidon ?

L'unique donneur de glucose pour la synthèse d'amidon est l'ADP-glucose. En effet, dans la plupart des tissus (exception faite de certains tissus de réserve ; MacDonald & Preiss, 1985) les amidon synthétases sont spécifiques de l'ADP-glucose et non de l'UDP-glucose (Preiss, 1982). D'autre part, les enzymes responsables de la synthèse de ce dernier, l'UDP-glucose pyrophosphorylase et la saccharose synthétase, sont confinées dans le cytoplasme (apRees, 1984, 1988) alors que la synthèse d'amidon est exclusivement localisée dans les plastes. Si on considère l'UDP-Glc comme un précurseur potentiel de la synthèse d'amidon, cela suppose un transport du substrat qui n'a jamais été mis en évidence.

Cytosol

Plaste

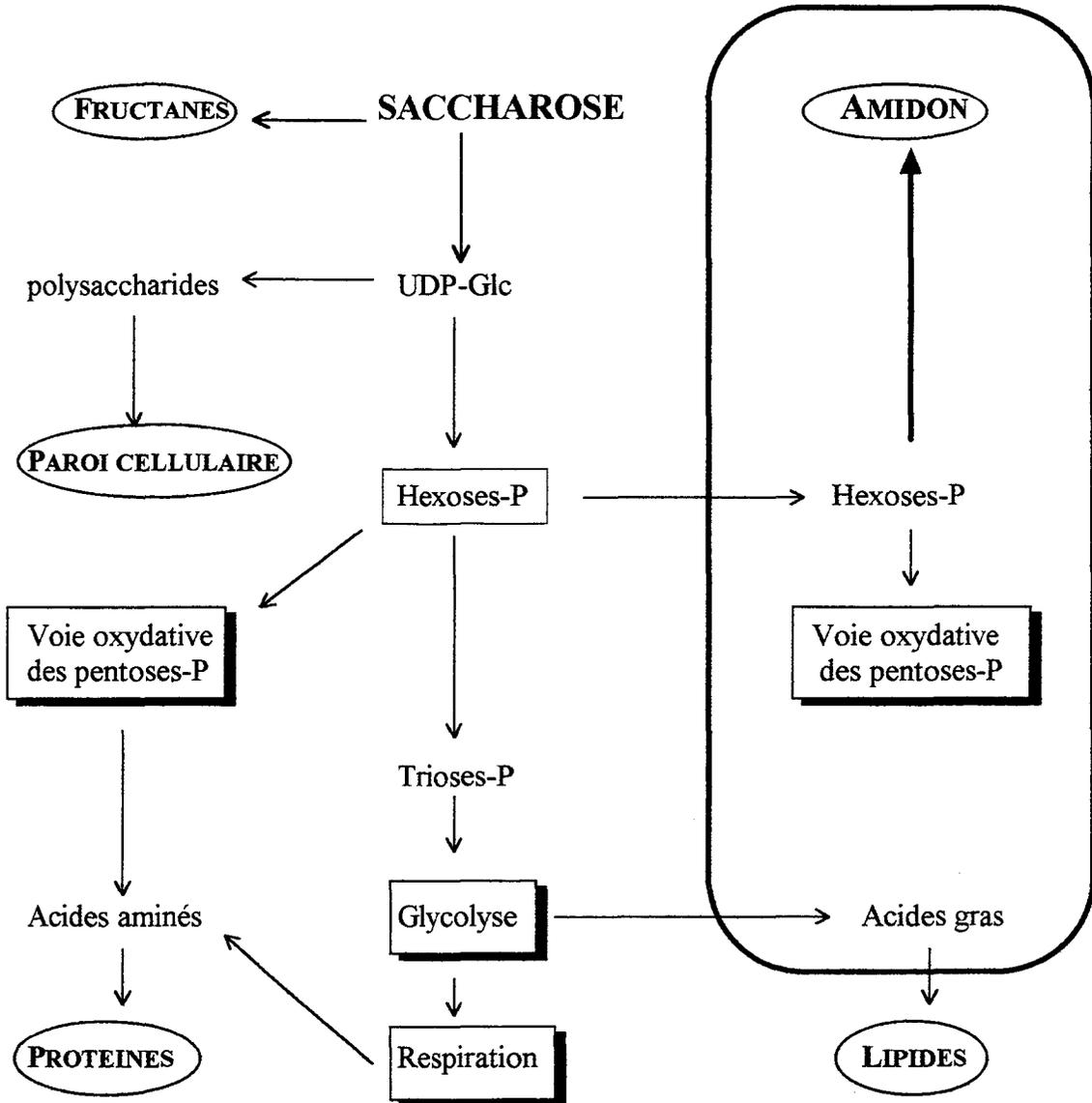
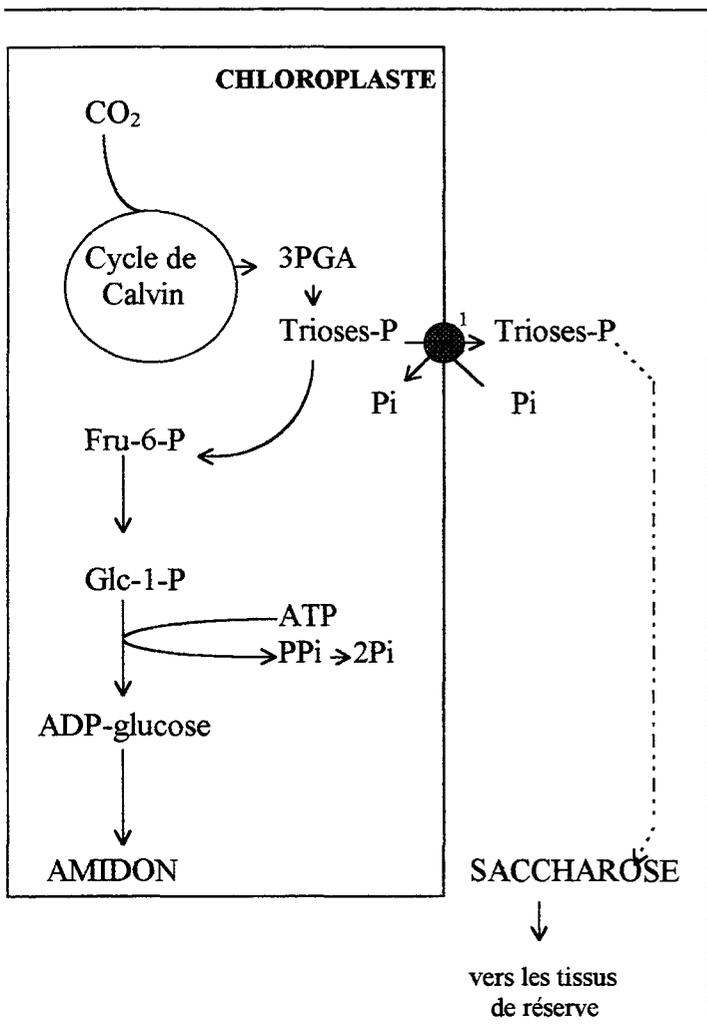
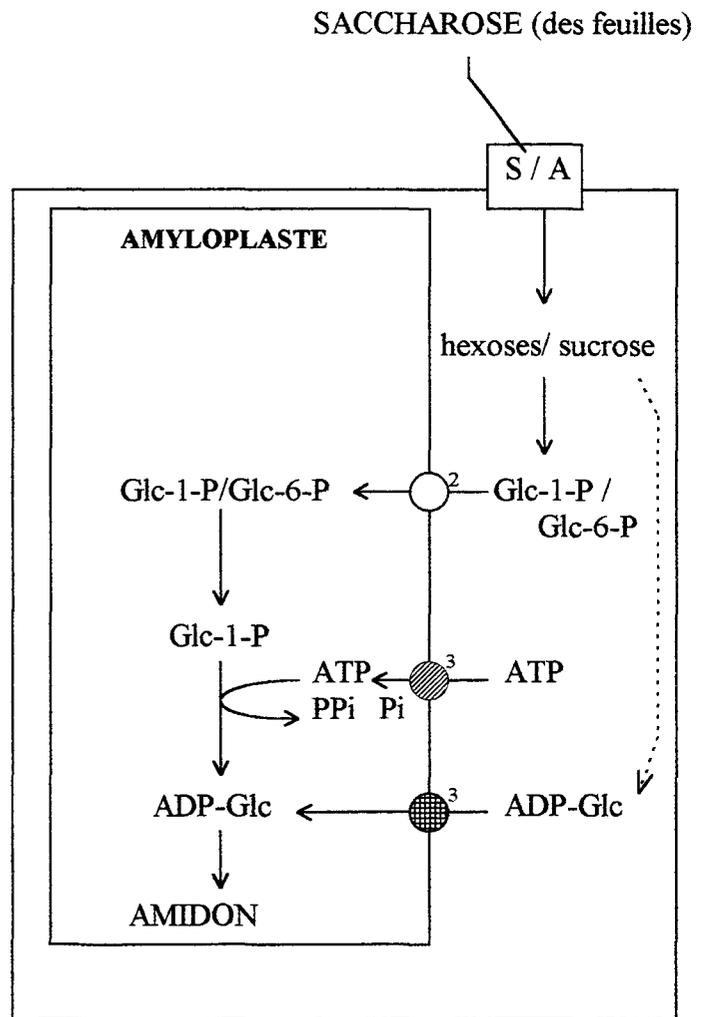


Figure 10 : Principaux produits carbonés dérivant de la dégradation du saccharose dans les cellules non photosynthétiques du pois (Smith et Martin, 1993)



Cellule du mésophylle



Cellule d'un organe de réserve (du tubercule de pomme de terre)

Figure 11 : Représentation schématique de la synthèse d'amidon dans les cellules chlorophylliennes et les tissus de réserve (d'après Müller-Röber et Kofmann, 1994)

●¹ translocateur de trioses-phosphate
 ●³ ●³ translocateurs d'adénylate

○² transporteur d'hexoses phosphate

S / A transport symplastique ou apoplastique du sucrose

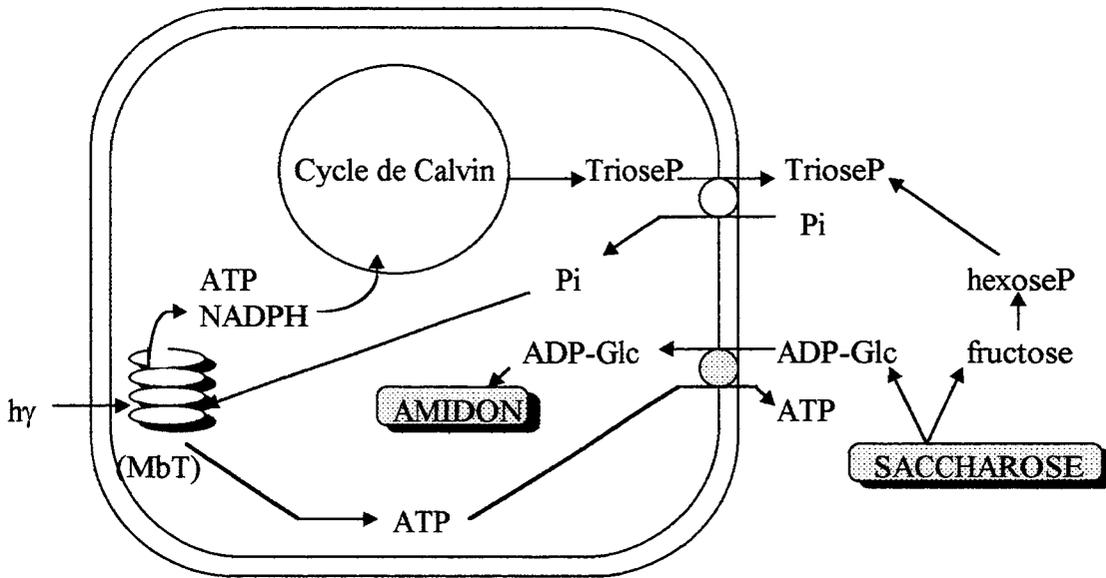
Dans les cellules des tissus photosynthétiques (**Figure 11**), les hexoses phosphate nécessaires à la synthèse d'amidon proviennent directement de la fixation du CO₂ ayant eu lieu au cours de la photosynthèse et de la néoglucogenèse. Le saccharose constitue quant à lui la source de carbone pour les cellules des tissus non photosynthétiques. La dégradation du saccharose conduit à la formation de trioses phosphate qui peuvent être transportés vers le plaste (Boyer, 1985). Or, les amyloplastes seraient dépourvus de fructose-1,6-bisphosphatase, activité essentielle au recyclage des hexoses à partir de trioses (Entwistle & apRees, 1988). Des résultats plus récents ont montré que dans l'albumen de blé, le Glc-1-P peut passer du cytosol à l'amyloplaste (Tyson & apRees, 1988). Ils sont en faveur d'un passage du carbone directement sous forme d'hexoses phosphate.

Notre compréhension du contrôle de la synthèse de l'amidon à partir d'hexoses phosphate se limite à la contribution de l'ADP-glucose pyrophosphorylase. L'activité extrêmement élevée de la pyrophosphatase alcaline des plastes implique que le P_{Pi} produit lors de la synthèse d'ADP-glucose est rapidement hydrolysé. *In vivo*, la réaction de synthèse d'ADP-glucose est donc loin de son niveau d'équilibre : elle peut subir un contrôle par des effecteurs allostériques. Dans les chloroplastes, l'ADP-Glc PPase, qui répond au 3PGA et au P_i, catalyse l'étape limitante la synthèse d'amidon (pour revue : Preiss 1988, 1991). Le rapport 3PGA/P_i reflète en effet la disponibilité en carbone et en énergie pour la synthèse d'amidon dans la feuille.

Dans les cellules n'effectuant pas de photosynthèse, et bien que l'ADP-glucose pyrophosphorylase conserve ses propriétés allostériques, les mécanismes de contrôle sont probablement différents. En effet, nous venons de voir que le carbone entre dans l'amyloplaste non sous forme de trioses phosphate mais sous forme de Glc-1-P (exception faite de l'amyloplaste du pois qui importe du Glc-6-P ; Hill & Smith, 1991) ; la signification du rapport 3PGA/P_i pourrait donc perdre une partie de son importance (Okita, 1992 ; Nakata & Okita, 1995).

Existe-t-il une autre voie d'apport de carbone pour la synthèse d'amidon ?

Une seconde voie de synthèse de l'amidon a récemment été proposée (**Figure 12**). Elle aurait lieu dans les amyloplastes mais également dans les chloroplastes. Akazawa et coll. (1989) ont isolé un transporteur d'adénylate dans les amyloplastes de cellules de sycamore tandis que Pozueta-Romero et coll. (1991) ont isolé ce type de transporteur dans les cellules de feuille d'épinard. Cette voie dite alternative (Okita, 1992) est donc basée sur le fait que, aussi bien l'amyloplaste que le chloroplaste seraient capables de transporter l'ADP-glucose. Sullivan et coll. (1991) ont cloné, chez le maïs, le gène *bt1* (*brittle 1*) codant une protéine ayant de fortes



CHLOROPLASTE

Figure12 : Mécanisme de la voie alternative de synthèse de l'amidon dans une cellule photosynthétique de plante supérieure (Pozueta-Romero et al. 1991)

MbT : membrane du thylakoïde ; *hy* : lumière

Les trioses phosphate, produits de la fixation du CO_2 par la photosynthèse, passent dans le cytosol via un translocateur de phosphate (○). Ils sont utilisés par la cellule, entre autre, pour la synthèse de saccharose. Une saccharose synthétase extrachloroplastique spécifique de l'ADP permettrait de cliver le saccharose en fructose et ADP-glucose. Ce dernier, par l'intermédiaire d'un translocateur d'adénylate (●), serait échangé avec de l'ATP du chloroplaste. L'ADP-glucose importé pourrait alors servir à la synthèse d'amidon.

homologies avec les transporteurs d'ATP/ADP mitochondriaux. Ceci confirmerait les résultats d'Akazawa et Pozueta-Romero quant à l'existence d'un transporteur d'adénylate dans la membrane interne des plastes. L'ADP-glucose transporté pourrait provenir directement de la dégradation du saccharose par la saccharose synthétase (Pozueta-Romero *et al.*, 1991). L'étude de la mutation *sh1*, mutation affectant la saccharose synthétase de l'albumen de maïs, vient renforcer cette hypothèse. En effet à cette mutation est corrélée une diminution de la quantité d'amidon accumulé. Néanmoins, la réalité de cette voie alternative reste très controversée. En effet, plusieurs mutations dans le métabolisme carboné remettent en cause son existence.

Les arguments en défaveur de la voie alternative :

Caspar et coll. (1985) ont caractérisé une souche d'*Arabidopsis* totalement déficiente pour l'activité PGM chloroplastique. La mutation se traduit par une chute de l'accumulation de l'amidon à moins de 2 % de la quantité dosée chez la souche sauvage. Ce phénotype permet d'affirmer que chez *Arabidopsis*, la quasi totalité du flux carboné entrant dans la synthèse d'amidon provient de la néoglucogenèse qui se produit à l'intérieur du plaste. D'autre part, un enrichissement en amidon est observé chez un mutant de *Clarkia xantiana* déficient pour l'activité PGI cytosolique (Kruckeberg *et al.*, 1989). La restriction du carbone pour la synthèse du saccharose dans le cytosol provoque donc sa réorientation vers l'amidon du plaste. De même, la mutation dans l'activité PGI chloroplastique induit une chute du contenu en amidon mais pas de modification de la quantité de saccharose. Ceci indique que la synthèse de l'ADP-glucose nécessaire à la synthèse d'amidon est limitée au chloroplaste. D'autre part, aucune corrélation entre la quantité d'amidon et l'activité de la saccharose synthétase n'a été constatée dans le mutant *rb* de l'embryon de pois, déficient pour l'activité ADP-Glc PPase (Smith *et al.*, 1989).

Toutes ces études montrent que l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase est indispensable à la synthèse d'amidon. La voie de synthèse de l'ADP-glucose par la saccharose synthétase semble jouer un rôle peu important, si ce n'est inexistant, dans les organismes étudiés. Le flux de carbone vers l'amidon passe donc par la néoglucogenèse et la synthèse d'ADP-glucose ou, dans certains organes de réserve, par l'importation d'hexoses phosphate. Malgré les éléments indiquant la présence de transporteurs d'adénylate dans la membrane des plastes, l'existence de la voie alternative est tout à fait incertaine et reste à démontrer *in vivo* (Okita, 1992). Il est tout aussi probable que le produit du gène *bt1* assure l'importation d'ATP dans l'amyloplaste des organes non photosynthétiques et non celle de l'ADP-glucose.

3.2.3.3 - La dégradation de l'amidon

La notion de recyclage de l'amidon transitoire semble aujourd'hui désuète ; le mécanisme de dégradation ferait l'objet d'une régulation directe, indépendante de la synthèse (Stitt & Steup, 1985). Elle se ferait par érosion de la surface du grain. Restreinte pendant la journée, elle peut néanmoins se produire en lumière continue, et ce, simultanément à la synthèse. Différentes études ont montré que l'utilisation de l'amidon au début de la nuit commence quand le contenu en saccharose des feuilles diminue ; c'est alors que l'amidon est requis afin de fournir à la plante à la fois un substrat pour la respiration et une source de carbone pour le maintien de la synthèse constante de saccharose.

Le Glc-1-P libéré lors de la dégradation de l'amidon transitoire par l'action concertée des transglucosidases (enzyme D) et de la phosphorylase est transformé en trioses phosphate tandis que les autres produits tels que le glucose et le maltose sont probablement exportés vers le cytoplasme. Le contrôle exact de la dégradation dans les feuilles reste à élucider.

Dans les cellules des organes de réserve, la dégradation de l'amidon est irréversible. Continue, elle s'accompagne d'une désorganisation totale du grain. Cette dégradation se produit lorsque la plante a atteint un certain stade de développement. C'est par exemple le cas lors de la germination des tubercules de pomme de terre (Müller-Röber & Koßmann 1994) ou des grains de céréales, processus très complexe qui dépasse le cadre de notre étude.

3.3 - La compartimentation cellulaire, un moyen de contrôle du métabolisme carboné et de la photosynthèse.

3.3.1 - La translocation du Pi et des trioses phosphate

En plus du contrôle biochimique précédemment exposé, une autre forme de contrôle s'exerce par le biais de la compartimentation cellulaire. Pendant la photosynthèse, le chloroplaste convertit le dioxyde de carbone, l'eau et le phosphate inorganique en trioses phosphate qui peuvent être exportés vers le cytosol. Comme le Pi est l'un des substrats de la réaction, la poursuite du processus dépend de sa production, et donc de l'utilisation des trioses phosphate lors la synthèse d'amidon dans le chloroplaste ou de saccharose dans le cytosol. En effet, ces deux processus libèrent du Pi qui peut alors alimenter le chloroplaste pour servir à nouveau à la photosynthèse.

La synthèse d'amidon est donc elle aussi dépendante de la compartimentation et du phénomène de translocation du Pi et des trioses phosphate. Lorsque les dépenses métaboliques du

cytosol sont limitées et que la quantité de Pi disponible dans le chloroplaste est faible, le rapport 3PGA/Pi devient important, la synthèse d'amidon est alors activée. Cette synthèse va libérer du Pi et donc relancer la fixation du CO₂ si les conditions environnementales le permettent.

3.3.2 - Rôle du Fru-2,6-P₂ dans le contrôle du devenir du carbone fixé par photosynthèse.

La synthèse de saccharose libère elle-aussi du Pi dans le cytosol. Une coordination entre la photosynthèse et la synthèse de saccharose est donc nécessaire afin que la fixation du carbone puisse se poursuivre (cinq des six trioses phosphate produits lors du cycle de Calvin servent à la régénération de l'accepteur de CO₂). Des résultats récents ont montré que le fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), présent uniquement dans le cytosol, est impliqué dans ce contrôle.

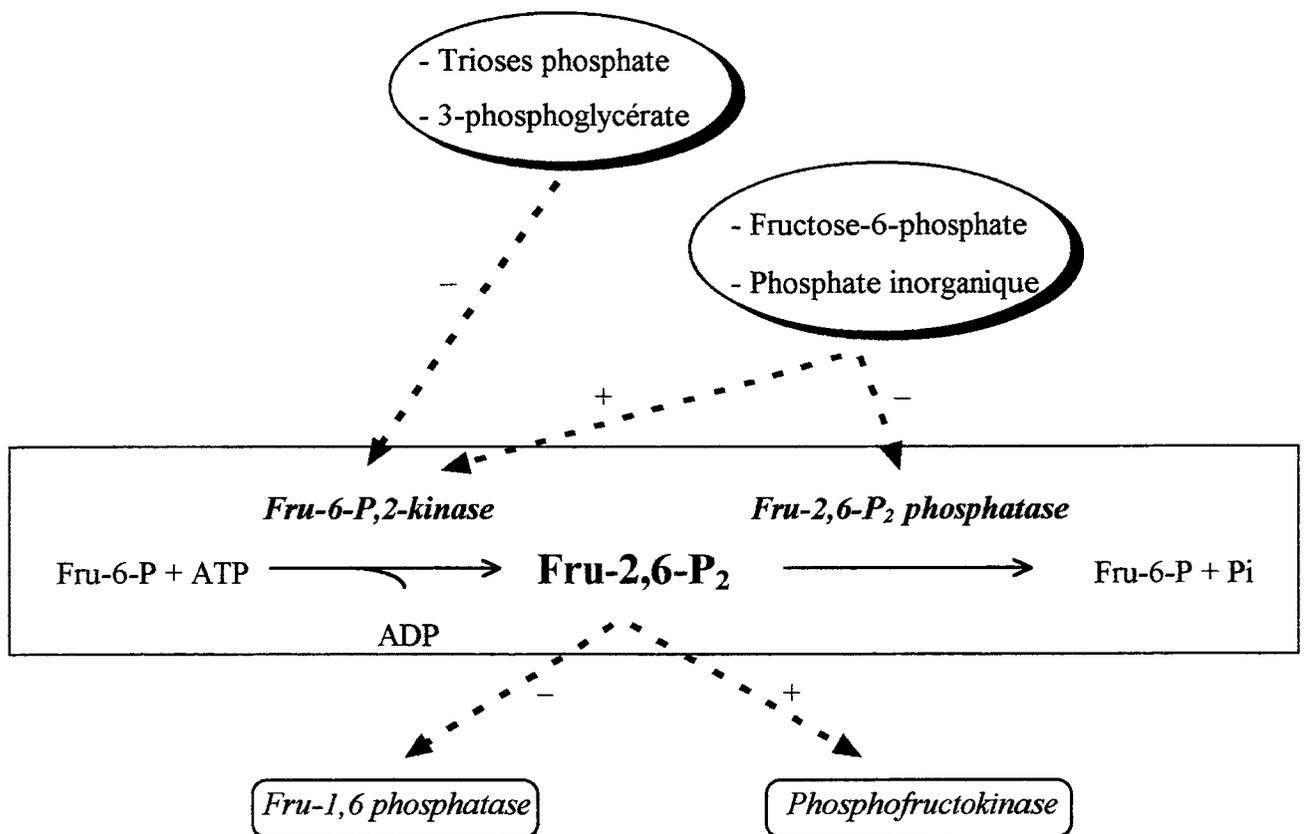


Figure 13 : La place du fructose-2,6-phosphate dans le métabolisme carboné.

En traduisant l'efficacité de la photosynthèse, les variations de la concentration en Fru-2,6-P₂ participent au contrôle du devenir du carbone dans la cellule photosynthétique

Le Fru-2,6-P₂ agirait en modulant l'activité de la fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) cytosolique ainsi que de l'une des formes de la phosphofructokinase-dépendante du PPi (PFK). Des travaux portant sur la feuille d'épinard ont permis de montrer que le Fru-2,6-P₂ présent dans le cytosol affecte la synthèse de saccharose en inhibant la FBPase cytosolique et en activant la PFK. Une exportation importante de trioses phosphate vers le cytosol diminue la concentration en Fru-2,6-P₂ et stimule la synthèse de saccharose en levant l'inhibition de la FBPase (**Figure 13**). Par contre, des concentrations élevées en Pi (à l'obscurité par exemple) ou en Fru-6-P (quand le saccharose est accumulé) provoquent une augmentation de la quantité de Fru-2,6-P₂ et favorisent donc la dégradation du saccharose plutôt que sa synthèse (**Figure 14**).

Pour résumer le Fru-2,6-P₂ permet donc la coordination entre le métabolisme du saccharose et le taux de fixation du CO₂. D'autre part, il intervient dans le contrôle de la répartition du carbone fixé entre le saccharose et l'amidon en reliant les processus métaboliques du chloroplaste et du cytosol (pour revue : Stitt, 1989 ; Stitt, 1990).

3.3.3 - Conclusion

La coordination par le Fru-2,6-P₂ ainsi que les mécanismes de régulation par la lumière permettent un contrôle de l'exportation des métabolites et du Pi, contrôle indispensable au fonctionnement de la cellule photosynthétique (**Figure 15**). Ce processus régulé régit l'accumulation et la dégradation de l'amidon des feuilles (appelé amidon transitoire).

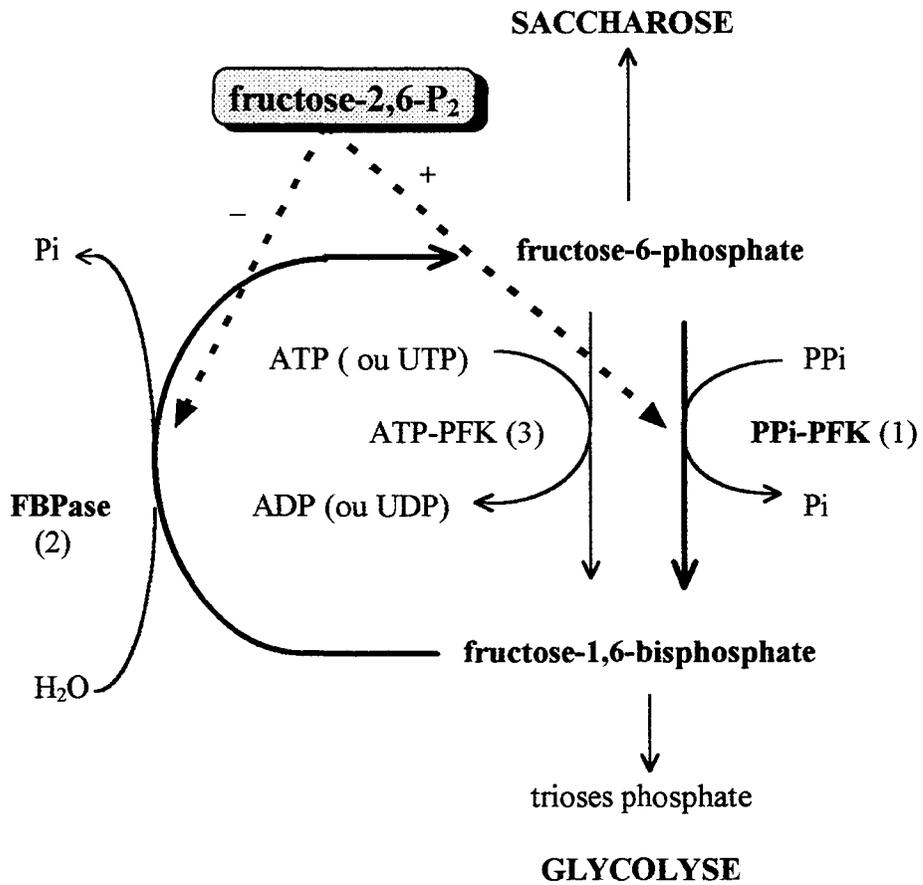


Figure 14 : L'intervention du fructose-2,6-bisphosphate dans le contrôle de la compétition entre la glycolyse et la synthèse de saccharose.

FBPase : fructose-1,6-bisphosphatase ; *PKF* : phosphofructo-kinase

La conversion du fructose-6-P en fructose-1,6-P par la PPI-PFK (1), enzyme spécifique des plantes, est activée par le fructose-2,6-P, tandis que la réaction inverse (2) est inhibée. La seconde PFK (l'ATP-PFK) subit quant à elle un contrôle métabolique important, en particulier par le phosphate inorganique (Pi) qui agit comme activateur.

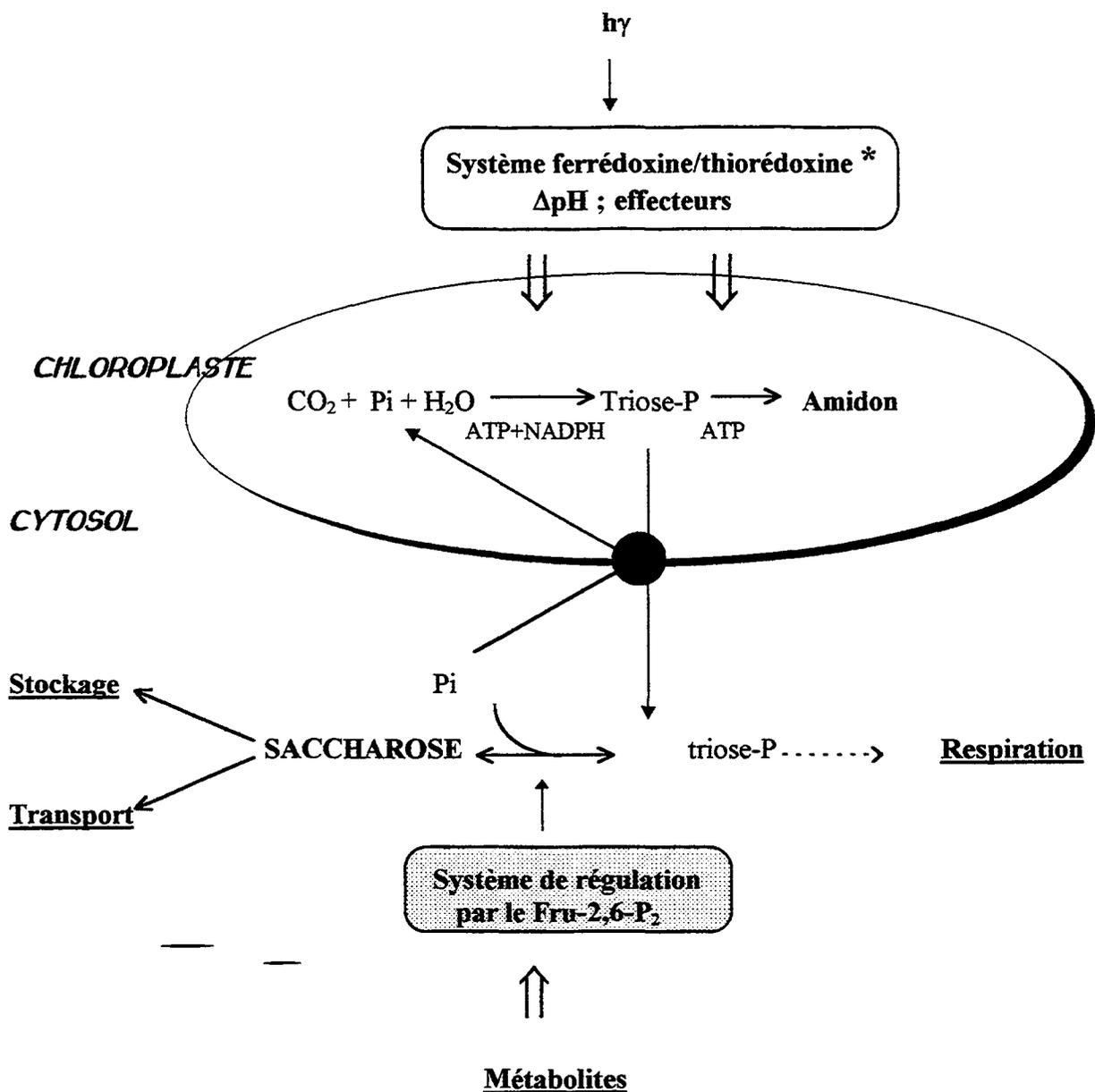


Figure 15 : Relation entre le carbone métabolisé dans le chloroplaste et son utilisation dans le cytosol (dans une cellule de feuille). L'intervention de la lumière comme source d'énergie, de pouvoir réducteur, et sa contribution dans les mécanismes de régulation du métabolisme carboné.

* La lumière induit des signaux régulateurs tels l'alcalinisation, l'augmentation de la concentration en cations, la mise en marche du système ferrédoxine/thiorédoxine ...

● Translocateur de trioses phosphate



Figure 16 : Observation en microscopie électronique du pyrénnoïde de *Chlamydomonas reinhardtii* lors de la croissance active. Le pyrénnoïde est entouré d'amidon.
Ch : chloroplaste
Am : amidon

4 - LE METABOLISME CARBONE CHEZ LES MICRO-ORGANISMES PHOTOSYNTHETIQUES

4.1 - Le mécanisme de concentration du carbone inorganique

4.1.1 - *Des organismes photosynthétiques capables de se développer lorsque la concentration en CO₂ est faible*

Contrairement à la plupart des plantes supérieures, les algues (uni et pluricellulaires) présentent la propriété de pouvoir croître dans des milieux contenant de faibles concentrations en carbone inorganique (0,03 % de CO₂), concentrations pour lesquelles les plantes en C3 ne peuvent survivre (Ramazanov *et al.*, 1994). Dans une atmosphère dont la teneur en CO₂ est faible, les algues développent une structure dense qui, dans certaines conditions, est entourée d'une gaine de polysaccharides (amidon ou paramylon). Cette structure dense chloroplastique est un complexe protéique appelée pyrénioïde (**Figure 16**) ; (Kushitsu *et al.*, 1991). Notons que des expériences d'immunolocalisation ont permis de montrer que, dans les cellules des algues cultivées en autotrophie, la presque totalité de la RUBISCO est située dans ce pyrénioïde (Okada, 1992). Ces expériences ont également montré que le pyrénioïde n'est pas seulement un lieu de stockage de la protéine mais aussi un lieu actif pour la fixation du CO₂.

4.1.2 - *Comment le CO₂ est-il concentré ?*

La simple diffusion du CO₂ n'est parfois pas suffisante pour alimenter le métabolisme carboné. En effet, elle est beaucoup plus lente dans l'eau que dans l'air. C'est pourquoi il existe chez les algues un système appelé CCM (pour CO₂-Concentrating Mechanism ou mécanisme de concentration du CO₂) qui le concentre. Le CCM permet l'accumulation de CO₂ et d'HCO₃⁻. Chez *C. reinhardtii*, *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Dunaliella*, il est induit dans une culture dès que la concentration en CO₂ décroît (Aizawa & Miyachi, 1986). Ainsi, chez *C. reinhardtii*, une exposition pendant 4 heures à une atmosphère contenant 3 % de CO₂ suffit à induire une anhydrase carbonique périplasmique appartenant au CCM (Manuel & Moroney, 1988). Signalons que, malgré la faible concentration en CO₂, les mécanismes d'inhibition de la photosynthèse par l'oxygène atmosphérique ne sont pas induits alors qu'ils le seraient chez les plantes supérieures (Ramazanov *et al.*, 1994).

Le CCM existe chez de nombreux organismes aquatiques (des microalgues ainsi que des cyanobactéries). Notons que les cyanobactéries ne possèdent pas de pyrénoloïde. Cependant, la RUBISCO, ainsi qu'une anhydrase carbonique, sont confinées dans une structure appelée carboxysome (McKay *et al.*, 1993). La fonction des carboxysomes, équivalente à celle du pyrénoloïde, est de transformer le bicarbonate du milieu en CO₂ pour le rendre métabolisable (Turpin *et al.*, 1984).

4.1.3 - La présence du pyrénoloïde est corrélée à l'activation du CCM

Le phénomène de concentration du carbone inorganique a récemment été étudié chez *C. reinhardtii*, *C. acidophila* et *Chlorella spK* (Ramazanov *et al.*, 1994). Les auteurs se sont efforcés de démontrer le rôle du pyrénoloïde dans les mécanismes de concentration du carbone inorganique. Les quatre observations principales reprises ci-après permettent de conclure quant à une contribution du pyrénoloïde dans le CCM.

- La formation de la gaine d'amidon autour du pyrénoloïde coïncide avec l'activation du CCM ;

- la formation de la gaine d'amidon autour du pyrénoloïde est partiellement inhibée lorsque les cellules sont cultivées en présence d'acétate (même si la concentration en CO₂ est faible) ;

- à l'obscurité, le pyrénoloïde est inexistant et les enzymes du CCM sont inactives ;

- la présence d'un inhibiteur de l'anhydrase carbonique (enzyme du CCM) empêche la formation de la gaine d'amidon autour du pyrénoloïde.

Ces résultats suggèrent très clairement l'implication du pyrénoloïde dans les mécanismes de concentration en CO₂.

4.2 - Le devenir du CO₂ chez *C. reinhardtii*

4.2.1 - La compartimentation chloroplaste/cytosol

Chez les végétaux supérieurs, les enzymes de la glycolyse et de la néoglucogenèse existent sous formes multiples et sont représentées aussi bien dans le chloroplaste que dans le cytosol (Stitt & apRees, 1979). Chez les algues vertes unicellulaires, la compartimentation est très différente ; elle est à la base d'un contrôle spécifique de la répartition du flux de carbone entre le chloroplaste et le cytosol. Dès 1980-82, Kombrink et Wöber montraient que la phosphofructokinase de *Dunaliella marina*, contrairement à celle des plantes, est localisée

exclusivement dans le chloroplaste. La situation est la même pour l'amylase et la phosphorylase qui sont toutes deux chloroplastiques chez les algues (Levi & Gibbs, 1984).

La mise au point de l'isolement de chloroplastes intacts de *C. reinhardtii* par Klein et coll. (1983) leur a permis d'étudier la compartimentation intracellulaire. En 1986, Klein décrit les différentes étapes de glycolyse ainsi que de la voie oxydative des pentoses phosphate chez cette algue unicellulaire *C. reinhardtii* (**Figure 17**). Il montre que cette compartimentation cellulaire lui est spécifique et se différencie par conséquent de celle des végétaux supérieurs.

4.2.1.1 - Les enzymes de la glycolyse

L'amylase et la phosphorylase, qui catalysent les premières étapes de la dégradation de l'amidon, sont exclusivement chloroplastiques. Par contre, les activités de la PGM et de la PGI, enzymes qui prennent en charge le Glc-1-P libéré par la phosphorylase, existent à la fois dans le cytosol et dans le chloroplaste. Les étapes suivantes de la glycolyse sont, quant-à elles, localisées presque exclusivement dans le chloroplaste. Enfin, les dernières étapes par lesquelles le 3PGA est transformé en pyruvate sont à 95 % cytosoliques.

Puisque l'existence d'un translocateur de phosphate a été démontrée (Klein *et al.*, 1983), la répartition des enzymes indique que la dégradation de l'amidon se fait dans le chloroplaste jusqu'au stade trioses phosphate. Ceux-ci sont ensuite transportés vers le cytosol pour y être transformés, en particulier en pyruvate.

4.2.1.2 - Les enzymes de la voie oxydative des pentoses phosphate

70 à 80 % de l'activité de la glucose-6-phosphate deshydrogénase et de la 6-phosphogluconate deshydrogénase (deux enzymes clefs de la voie oxydative des pentoses phosphate) sont détectés dans le chloroplaste. Il semble peu probable que les hexoses phosphate cytosoliques soient les produits directs de la dégradation de l'amidon puisque les deux compartiments contiennent les enzymes capables d'effectuer la néoglucogenèse. Cependant, l'activité de la fructose biphosphatase cytosolique reste limitée. Ceci laisse donc présager un transport d'hexoses phosphate à travers l'enveloppe chloroplastique (Klein, 1986 ; **Figure 17**).

4.2.1.3 - Conclusion

Chez les végétaux supérieurs, la plupart des activités de glycolyse sont extrachloroplastiques alors que chez *C. reinhardtii*, la glycolyse se déroule dans le chloroplaste jusqu'à l'étape de formation du 3PGA (**Figure 17**). Pour que la dégradation de l'amidon puisse avoir lieu, un

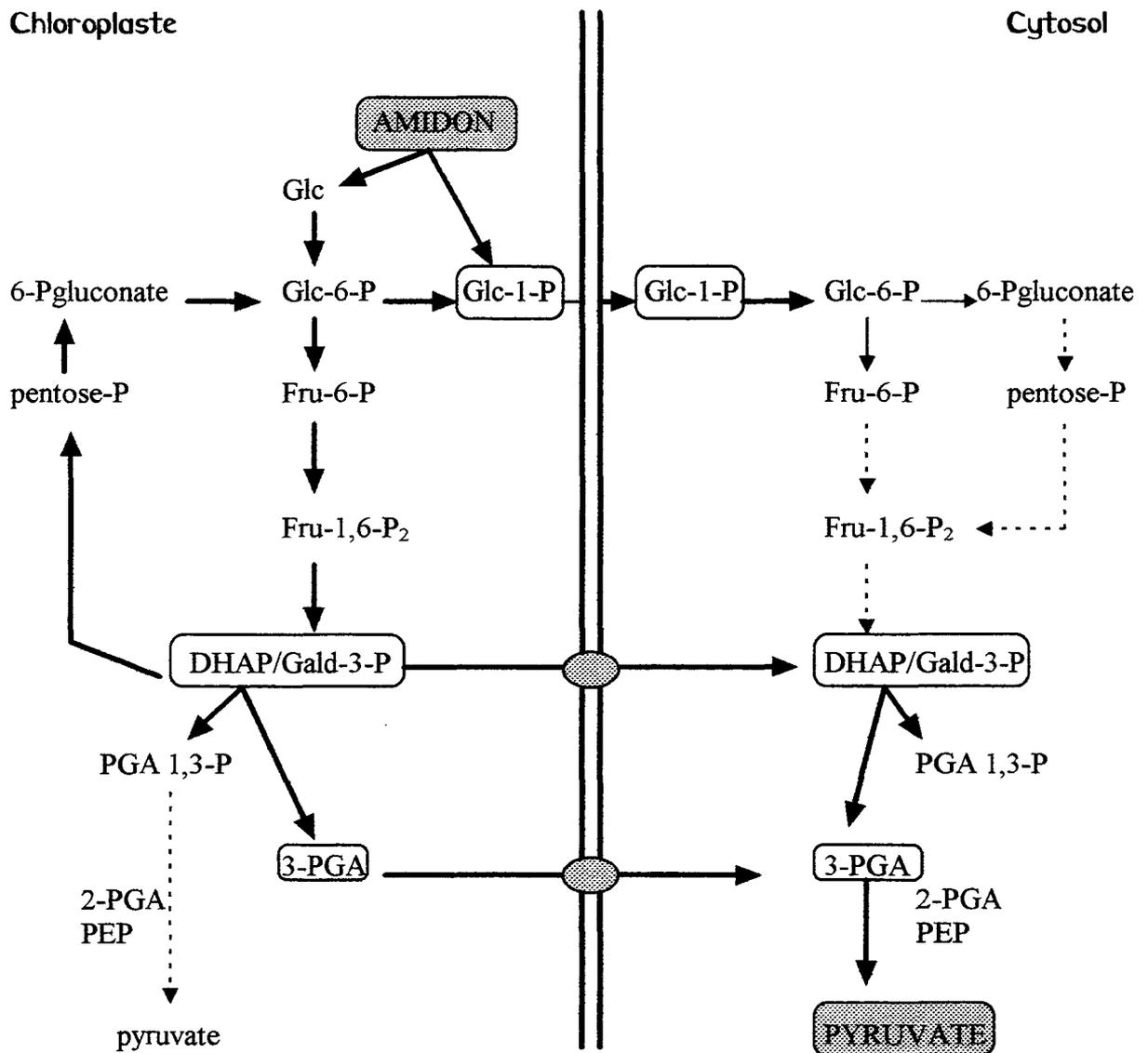


Figure 17: Représentation schématique de la compartimentation de la dégradation des hexose phosphate chez *C. reinhardtii*.

Cette compartimentation tient compte de l'activité relative des enzymes chloroplastiques et cytosoliques (schéma proposé par Klein, 1986). La voie préférentiellement utilisée est représentée par les flèches en caractères gras.

● Translocateur de trioses phosphate

équilibre des échanges de métabolites, d'ATP et d'équivalents réducteurs est nécessaire. La régulation de la néoglucogenèse résulte très probablement d'un contrôle des activités fructose bisphosphatases. Selon les conditions environnementales et les besoins de la cellule, la forme cytosolique domine sur la forme chloroplastique et *vice versa*.

4.2.2 - L'utilisation du carbone chez C. reinhardtii

4.2.2.1 - L'utilisation du carbone fixé chez les plantes et chez les organismes unicellulaires

Le saccharose et l'amidon sont les principaux produits de fixation du carbone chez la plupart des végétaux supérieurs. Chez les algues en revanche, le carbone est mis en réserve uniquement sous forme d'amidon. Hiller et Greenway (1968) ont néanmoins détecté des traces de saccharose chez l'algue *Chlorella pyrenoidosa*. Les quantités mesurées restent cependant très inférieures à celle contenues dans les cellules des végétaux supérieurs. Chez ces derniers, la régulation du flux carboné est basée sur un contrôle des transports de carbone à travers l'enveloppe chloroplastique et sur un équilibre entre phosphate inorganique et trioses phosphate. Il en résulte un contrôle de la répartition du carbone entre le saccharose et l'amidon. Pour les organismes tels que *C. reinhardtii*, le contrôle de la compartimentation métabolique est différent de celui des plantes du fait de l'absence de saccharose.

4.2.2.2 - Les variations du taux d'accumulation d'amidon au cours du cycle cellulaire chez C. reinhardtii

La répartition du carbone intracellulaire chez *C. reinhardtii* a été étudiée dans le détail par Klein (1987). Il a ainsi montré que l'amidon est accumulé en début et en fin de période lumineuse et qu'il est dégradé au milieu de la phase lumineuse ainsi qu'à l'obscurité (**Figure 18**). Notons que la diminution de la quantité d'amidon au milieu de la phase lumineuse n'est pas corrélée à une diminution des capacités photosynthétiques des cellules. Il est en fait probable qu'à ce moment du cycle cellulaire, la majorité du carbone fixé soit utilisée pour la croissance cellulaire plutôt que pour la constitution de réserves.

4.2.2.3 - Conclusion

La compartimentation cytosol/chloroplaste du carbone chez *C. reinhardtii* est différente de celle rencontrée chez les plantes. Lorsqu'elle arrête de croître, l'algue consacre plus de 50 % du carbone fixé au métabolisme de l'amidon tandis que les quantités de saccharose restent infimes.

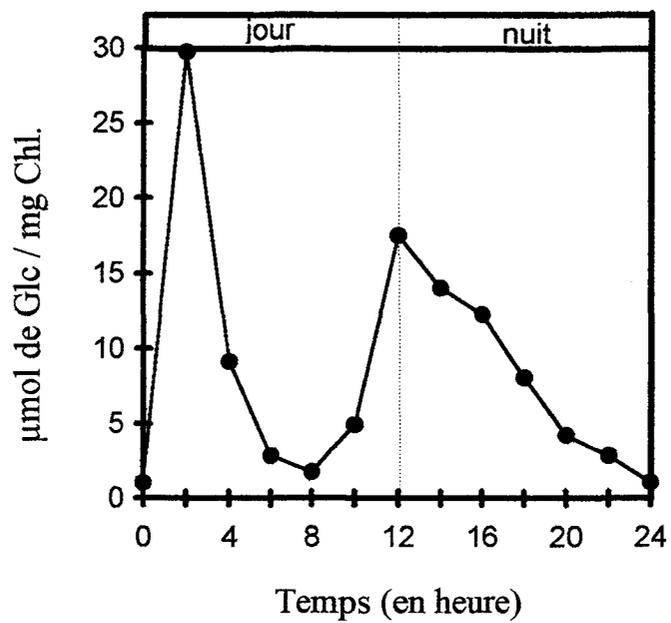


Figure 18 : *Variations des quantités d'amidon accumulées par Chlamydomonas reinhardtii au cours d'un cycle de 24 heures (Klein, 1987)*

Aucune activité saccharose synthétase n'est d'ailleurs détectable chez cet organisme. Chez les plantes, le saccharose est la forme sous laquelle le carbone peut être transporté d'une cellule à l'autre ou encore d'un tissu à l'autre. Il semble donc logique que les organismes unicellulaires tels que *C. reinhardtii* n'aient pas développé cette voie métabolique.

Pendant le cycle cellulaire, les quantités d'amidon accumulées par l'algue varient énormément. Il semblerait qu'à la lumière, l'amidon subisse un "turn-over" ; la synthèse et la dégradation seraient simultanées. Un tel recyclage a également été mis en évidence dans les chloroplastes des feuilles d'épinard (Stitt & Heldt, 1981) et des feuilles de pois (Kruger *et al.*, 1983). Pour les cellules photosynthétiques, la répartition des métabolites par compartimentation serait donc fortement sous la dépendance de la dégradation qui évolue au cours du cycle cellulaire.

5- COMPARAISON DES METABOLISMES DE L'AMIDON ET DU GLYCOGENE BACTERIEN

Alors que les cellules des organismes eucaryotes photosynthétiques accumulent de l'amidon, les bactéries, ainsi que les cellules du règne animal ou fongique, accumulent un polymère de structure plus simple : le glycogène. Malgré les différences structurales entre ces deux composés, la compréhension de la biosynthèse du glycogène apporte des éléments utiles à l'étude du métabolisme de l'amidon. Toutefois, les mécanismes qui régissent la synthèse du glycogène chez les cellules de mammifères sont très éloignés de ceux impliqués dans la synthèse de l'amidon chez les végétaux supérieurs. Dès les premières étapes, des différences majeures surgissent. En effet, alors que chez les mammifères, la glycogène synthétase utilise l'UDP-glucose, les glycogène synthétases bactériennes et les amidons synthétases utilisent spécifiquement l'ADP-glucose. D'autre part, le contrôle du métabolisme des glycogènes animal et fongique est entièrement différent de celui des bactéries et des plantes : il est basé sur des modifications post-traductionnelles de la phosphorylase et de la glycogène synthétase. Ces modifications sont soumises à l'action d'hormones chez les mammifères. A l'opposé, dans le cas de l'amidon ou du glycogène bactérien, c'est la concentration en métabolites qui agit sur l'activité de l'enzyme et qui contrôle ainsi la voie. Nous nous limiterons donc à une comparaison du métabolisme de l'amidon avec celui du glycogène bactérien puisque seules les données concernant les bactéries sont, dans une certaine mesure, transposables aux cellules végétales. Ceci n'est d'ailleurs pas surprenant si l'on considère que le chloroplaste et la cyanobactérie ont une origine commune.

5.1 - Le glycogène bactérien

5.1.1 - *Sa structure, son rôle*

Le glycogène est le principal polymère de réserve des bactéries. Plus de quarante espèces connues le synthétisent dont des bactéries à Gram négatif et positif, des archaebactéries et des bactéries chlorophylliennes (pour revue : Preiss & Romeo, 1989).

Le glycogène est un polymère de glucose dans lequel environ 90 % des molécules sont liées en α -1,4 et 10 % branchées en α -1,6 (contre seulement 5 à 6 % pour l'amylopectine). Certaines bactéries synthétisent le polysaccharide de manière optimale lors de la transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire, tandis que la plupart le font au cours de la phase stationnaire.

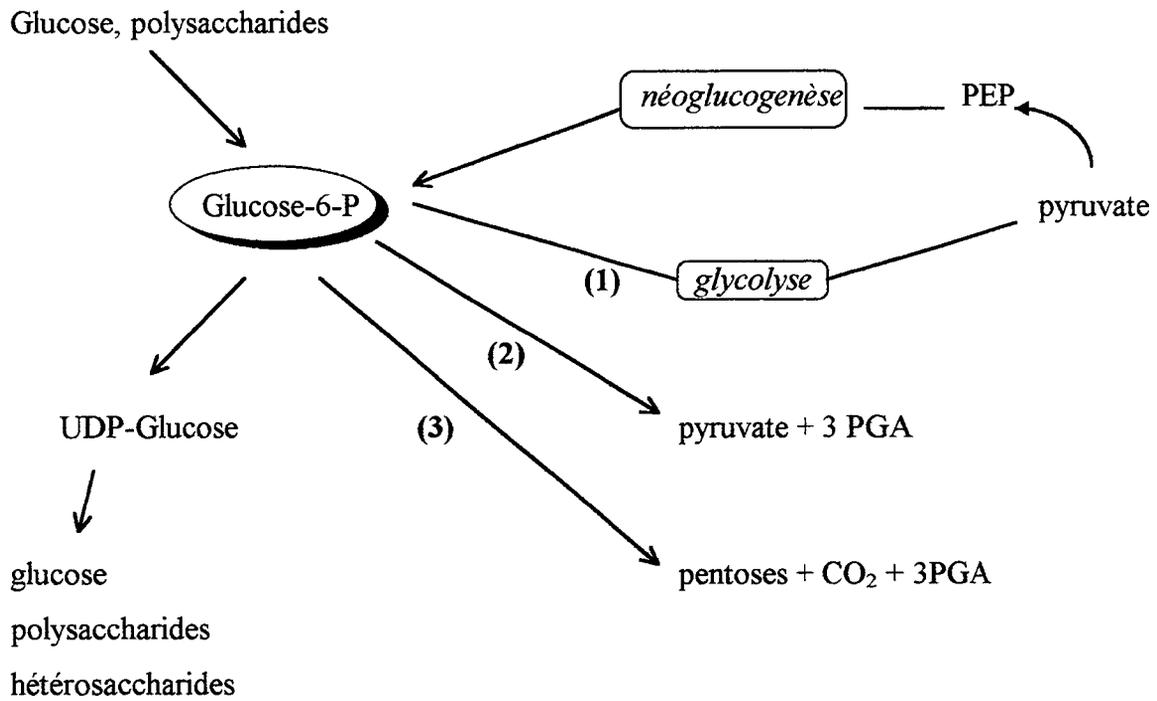


Figure 19 : Les différentes voies du métabolisme des hexoses chez les bactéries.

- (1) glycolyse
- (2) voie de Entner-Doudoroff
- (3) voie des pentoses phosphate

En général, le taux d'accumulation du glycogène est supérieur quand les bactéries sont cultivées en présence d'un excès de carbone ou lors d'une carence en azote, phosphate ou sulfate. La quantité de glycogène accumulé peut alors atteindre jusqu'à 50 % du poids sec de la cellule.

Les souches mutantes défectueuses pour la synthèse de glycogène poussent aussi bien que les souches sauvages correspondantes : le glycogène n'est donc pas indispensable à la croissance cellulaire. Néanmoins, il augmenterait le temps de survie de cellules placées dans des conditions défavorables (Marr et al., 1963).

Le glycogène posséderait deux fonctions majeures : il serait à la fois source d'énergie et source de carbone.

- une source d'énergie : lors de la germination des spores, le glucane accumulé est rapidement dégradé. D'autre part, en milieu carencé, chez *E. coli* et *E. aerogenes*, le glycogène prévient la dégradation des ARN et des protéines en ammoniac (Strange, 1968). Dans les cellules accumulant du glycogène, ces phénomènes existent mais se produisent plus tardivement et de manière moins prononcée.

- une source de carbone : la quantité de glycogène décroît pendant la phase stationnaire lorsque la source de carbone du milieu est épuisée.

5.1.2 - Sa synthèse

La synthèse du glycogène chez les bactéries, tout comme chez les levures ou les cellules de mammifère, fait intervenir une glycogène synthétase et une enzyme de branchement. Cependant, chez les bactéries, la polymérisation se fait à partir de l'ADP-glucose et non de l'UDP-glucose.

La synthèse de glycogène nécessite du carbone et de l'énergie. Or, la voie métabolique carbonée prédominante peut être différente d'une espèce à l'autre. Il est donc important de la connaître afin de comprendre les mécanismes de régulation de la synthèse du polysaccharide. En effet, l'enzyme limitante pour la synthèse de glycogène bactérien (l'ADP-glucose pyrophosphorylase) est sous contrôle d'effecteurs spécifiques de la voie métabolique carbonée. On distingue trois grands groupes de bactéries selon la voie métabolique utilisée (**Figure 19**).

- les bactéries qui utilisent le glucose du milieu comme source majeure de carbone. C'est le cas des entérobactéries et d'autres organismes hétérotrophes. La dégradation du glucose par la voie de Emben-Meyerhof ou celle de Entner-Doudoroff fournit l'énergie (pour revue : Brock *et al.*, 1984) ;

- les bactéries photosynthétiques qui peuvent croître de manière hétérotrophe à la lumière ou à l'obscurité en présence d'acides tricarboxyliques, ou de manière autotrophe en présence de CO₂ et d'H₂O en anaérobiose : c'est par exemple le cas des *Rhodospirillum* ;

- les bactéries capables d'effectuer la photosynthèse comme le font les chloroplastes des végétaux supérieurs : il s'agit des cyanobactéries.

5.2 - Le contrôle de la synthèse du glycogène et de l'amidon

De nombreuses expériences et analyses ont permis de montrer que, dans tous les organismes et tissus étudiés, l'ADP-glucose pyrophosphorylase est l'enzyme limitante de la synthèse. Elle est soumise à une régulation allostérique par des métabolites de la voie d'assimilation du carbone. En règle générale, la synthèse de glycogène ou d'amidon se produirait lorsqu'un excès d'énergie et carbone se fait ressentir dans la cellule. Ceci explique la corrélation existant entre la nature du métabolisme carboné et les propriétés allostériques de l'enzyme.

Chez les entérobactéries par exemple, le fructose-1,6-bisphosphate et l'ATP s'accumulent lors de la glycolyse. Or, il a été montré que l'ADP-glucose pyrophosphorylase de ces bactéries est activable par le fructose-1,6-bisphosphate. Cette molécule augmente l'affinité de l'enzyme pour les substrats (le glucose-1-phosphate et l'ATP) et diminue l'effet inhibiteur de l'AMP (pour revue, Preiss & Romeo, 1989). L'ADP-glucose pyrophosphorylase est donc sensible à la charge carbonée et énergétique de la cellule par l'intermédiaire de ces effecteurs.

Chez les organismes utilisant la voie de Entner-Doudoroff, le fructose-6-phosphate et le pyruvate font office d'activateurs (Preiss & Levi, 1980), alors que chez certaines bactéries photosynthétiques anaérobies, seul le pyruvate intervient. En règle générale, le métabolisme de ces bactéries présente une flexibilité importante. Leur ADP-glucose pyrophosphorylase est activable à la fois par le fructose-1,6-bisphosphate et par le fructose-6-phosphate/pyruvate. Elle est inhibée par le phosphate inorganique ou l'AMP.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase des organismes qui effectuent la photosynthèse en présence d'oxygène (cas des cyanobactéries, des algues vertes et des feuilles de végétaux supérieurs) est sensible au 3-phosphoglycérate et au phosphate inorganique. Le 3-phosphoglycérate est le premier produit de fixation du CO₂ via le cycle de Calvin, tandis que le phosphate inorganique est issu de cette voie et de la synthèse de l'amidon et du saccharose (il est utilisé en présence de lumière pour la régénération de l'ATP par photophosphorylation). Une forte concentration en phosphate inorganique indique une photosynthèse de faible intensité et, par

conséquent, une faible disponibilité en carbone et en énergie. De plus, chez les plantes supérieures, le phosphate inorganique intervient dans les échanges entre les compartiments cellulaires : l'équilibre entre Pi et le 3PGA contrôle ainsi le taux de synthèse à la fois de l'amidon et du saccharose.

5.3 - Le contrôle génétique de la synthèse du glycogène bactérien

Chez *E. coli*, les activités enzymatiques impliquées dans la synthèse du glycogène varient en fonction de l'état physiologique de la culture (Preiss, 1984). En règle générale, le taux de synthèse du glycogène, ainsi que celui des activités enzymatiques associées, est inversement proportionnel au taux de croissance des cellules. Pendant la phase stationnaire, dans une culture en milieu riche (1 % de glucose), les activités spécifiques de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, de la glycogène synthétase et de l'enzyme de branchement augmentent (d'un facteur de 10 pour les deux premières et de 5 pour la dernière). Que ce soit dans un milieu enrichi ou minimum, les activités enzymatiques atteignent leur maximum en phase stationnaire ; leurs valeurs sont d'ailleurs équivalentes. Les mécanismes qui contrôlent l'expression des enzymes sont encore assez mal connus. Néanmoins, les données disponibles permettent d'établir un schéma de régulation.

5.3.1 - Caractérisation des gènes de structure codant des protéines impliquées dans le métabolisme du glycogène

Les gènes clonés, énumérés ci-dessous, peuvent être divisés en deux catégories selon la fonction codée. La première catégorie est celle des loci correspondant aux protéines qui interviennent dans la synthèse et la dégradation du glycogène. La seconde comprend les gènes codant des protéines qui interviennent dans le contrôle du métabolisme du glycogène (pour revue : Preiss & Romeo, 1994).

Les chiffres entre parenthèses indiquent la position du gène sur le chromosome de *E. coli* exprimée en minutes. Cette liste n'est pas exhaustive ; nous ne nous sommes en effet intéressés qu'aux gènes codant les fonctions les mieux caractérisées.

Les gènes de synthèse et de dégradation du glycogène :

glgA : gène de structure de la glycogène synthétase (75)

glgB : gène de structure de l'enzyme de branchement (75)

glgC : gène de structure de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (75)

glgX : gène de structure d'une α -1,6 glucosidase (75)

glgY (*glgP*) : gène de structure de la glycogène phosphorylase (75)

amyA : gène de structure d'une α -amylase (43)

Les gènes de régulation du métabolisme du glycogène :

glgR : une mutation de ce gène provoque une surexpression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase et de la glycogène synthétase. *GlgR* agirait comme cis-activateur (75)

glgQ : sa mutation provoque une surexpression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, de la glycogène synthétase et de l'enzyme de branchement. Le produit de ce gène serait un facteur de trans-activation transcriptionnelle agissant sur l'expression de *glgCA*, *glgB*. Sa localisation sur le chromosome n'est pas documentée (non déterminé).

csrA : code une protéine de 6,8 kDa possédant un effet pléiotrope sur le métabolisme cellulaire. Cette protéine contrôle en particulier l'expression de *glgC* et *glgB* (58).

Gène de fonction inconnue :

glgS : (67) sa mutation provoque une absence de glycogène. *glgS* appartient à un opéron monocistronique non lié au regroupement des gènes *glg*. *glgS* est un bon candidat comme gène de structure d'une protéine qui intervient dans l'initiation de la synthèse du glycogène.

5.3.2 - Les facteurs de contrôle de l'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme du glycogène

Le clonage de gènes impliqués dans le métabolisme du glycogène est à l'origine de la découverte de facteurs de régulation de la synthèse de ce polysaccharide. Ils ont permis de faire

un grand pas dans la compréhension du mécanisme de mise en réserve du carbone et de l'énergie chez *E. coli*.

L'expression de l'opéron *glgCAY* est induite pendant la phase stationnaire. Elle est stimulée à la fois par l'AMPc et sa protéine réceptrice (CRP) ainsi que par la guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), (Romeo et al., 1990). La synthèse de l'ADP-glucose pyrophosphorylase augmente d'un facteur supérieur à 25 et celle de la glycogène synthétase d'un facteur de 10 (Preiss & Romeo, 1989). L'expression de l'opéron *glgBX* est également induite pendant la phase stationnaire, mais elle est insensible à l'AMPc et à la ppGpp. La transcription de *glgS* est sous le contrôle de l'AMPc et du CRP (Hengge-Aronis & Fischer, 1992).

En plus d'être un signal de la carence en acides aminés, la ppGpp semble impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la régulation du métabolisme de divers systèmes (Cashel & Rudd, 1987). Il serait à la base de la relation entre le taux de croissance et l'accumulation de glycogène. Par contre, l'augmentation de l'expression de *glgC* et *glgA* (et *glgB* dans une moindre mesure) est fortement accentuée en présence d'AMPc et de son récepteur. Ces trois gènes de structure appartiennent à un même régulon qui inclut probablement *glgY*, gène codant une enzyme impliquée dans le catabolisme du polysaccharide. La localisation de *glgY* juste derrière *glgA* suggère que la synthèse de la phosphorylase serait couplée à celles de l'ADP-glucose pyrophosphorylase et de la glycogène synthétase.

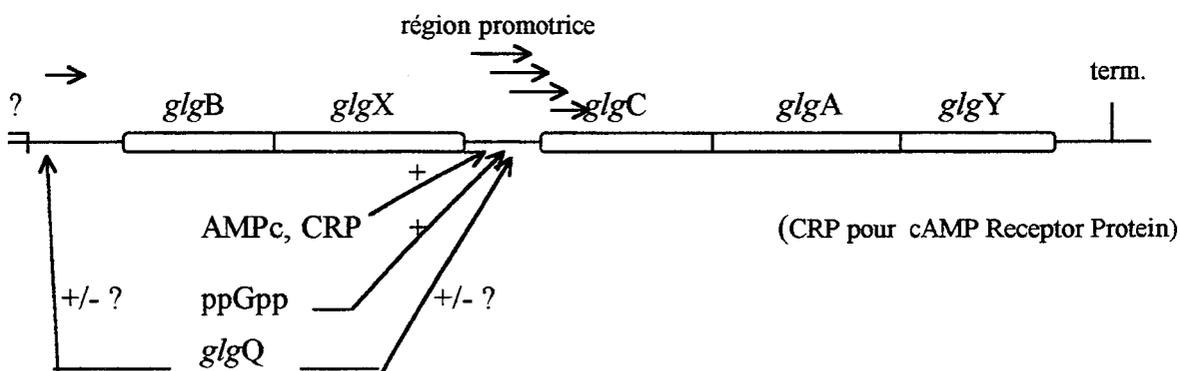


Figure 20 : Modèle de régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du glycogène chez *E. coli* (Preiss & Romeo, 1989 ; 1994)

glgA : glycogène synthétase ; *glgB* : enzyme de branchement ; *glgC* : ADP-Glc PPase ;
glgX : α -1,6-glucosidase ; *glgY* : phosphorylase

Romeo et coll. (1993) ont identifié un contrôle négatif de l'expression des gènes *glg*. Le produit du gène *csrA* responsable de cette répression affecte à la fois la synthèse du glycogène, la gluconéogenèse, la taille des cellules ainsi que leurs propriétés de surface. Ce gène code une protéine de 61 acides aminés qui réprime l'expression des gènes *glgB* et *glgC*. Pour preuve, l'expression de *glgC* est 10 fois supérieure dans une souche pour laquelle le gène *csrA* est interrompu (Liu *et al.*, 1995).

Bien que l'expression des différentes enzymes soit régulée, le taux d'accumulation du glycogène reste sous le contrôle de l'activité de l'ADP-Glc PPase.

6 - L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE

Nous l'avons vu précédemment, la structure de l'amidon est susceptible de varier en fonction de différents facteurs inhérents à la cellule comme de facteurs externes. Il en va de même pour la quantité de polysaccharide accumulée. Le taux de synthèse de l'amidon dépend du tissu, de la position de la cellule au sein de ce tissu, de la physiologie et des conditions environnementales.

Le contrôle de la synthèse se produit probablement à plusieurs niveaux et de différentes manières selon le tissu considéré. Un recyclage potentiel de l'amidon dans les tissus chlorophylliens (et dans les tissus de réserve) complique les mécanismes de régulation de la mise en réserve du polysaccharide. En effet, les enzymes de dégradation de l'amidon sont actives dans ces tissus. Il n'existe pas de preuves directes montrant que la dégradation est concomitante à la synthèse. Toutefois, des mécanismes d'hydrolyse partielle et de réarrangement ne peuvent être exclus.

De nombreuses observations, notamment de récentes études de coefficient de contrôle du flux carboné (Neuhaus & Stitt, 1990), ont permis de montrer que seule l'activité de l'ADP-Glc PPase exerce un contrôle sur la quantité d'amidon synthétisé (**Tableau 8**).

Enzyme	Coefficient de contrôle du flux carboné vers la synthèse d'amidon	
	Faible luminosité	Forte luminosité
PGI chloroplastique	0	0.35
PGM chloroplastique	0.01	0.20
ADP-Glc PPase	0.30	0.65
Enzyme de branchement	0.02	0.15

Tableau 8 : Coefficients de contrôle du flux carboné impliqué dans la synthèse d'amidon (Neuhaus & Stitt, 1990 ; Kruckeberg et al., 1989 ; Smith et al., 1990).

PGI : phosphoglucoisomérase ; *PGM* : phosphoglucomutase ;

ADP-Glc PPase : ADP-glucose pyrophosphorylase

En conditions de forte luminosité, même si la l'ADP-Glc PPase continue à exercer un contrôle prédominant, d'autres enzymes (enzyme de branchement, phosphoglucomutase, phosphoglucoisomérase) ont également une influence comme le montrent les coefficients de contrôle du flux (**Tableau 8**).

Les mécanismes de contrôle de la synthèse du saccharose et de l'amidon sont liés. La synthèse du saccharose réprime celle de l'amidon par un effet sur la compartimentation cellulaire du Pi et des trioses phosphate. Les modifications des concentrations en Pi et en trioses phosphate entraînent des variations de l'activité ADP-Glc PPase et, par conséquent, de la synthèse de l'amidon.

6.1 - Le rôle de l'ADP-glucose pyrophosphorylase dans la synthèse de l'amidon

En 1961, Recondo et Leloir montrent que la synthèse d'amidon fait intervenir l'ADP-Glc et non l'UDP-glucose comme ils l'avaient proposé l'année précédente. En 1962, Espada identifie l'activité enzymatique qui permet la synthèse d'ADP-Glc à partir du glucose-1-phosphate et de l'ATP. Un an plus tard, l'ADP-Glc est isolé de grains de maïs (Recondo *et al.*, 1963).

Leloir, Cardini et leurs collaborateurs ont été les pionniers dans la découverte des mécanismes de synthèse du saccharose et de l'amidon. Depuis, de nombreux groupes ont entrepris des travaux chez diverses plantes, algues et même chez les bactéries chez qui la synthèse du glycogène est, dans une certaine mesure, comparable à celle de l'amidon.

Les polymères d' α -1,4-glucose sont synthétisés par les amidon synthétases qui ont pour substrat spécifique l'ADP-Glc. Sous cette forme activée, la molécule de glucose pourra être transférée à l'extrémité non réductrice d'une chaîne glucosidique. Même si, *in vitro*, l'amidon synthétase liée au grain (la GBSS) est capable d'utiliser l'UDP-glucose, son *Km* pour ce substrat est 15 à 30 fois supérieur à celui qu'elle présente pour l'ADP-Glc (Preiss, 1988).

6.1.1 - La synthèse du précurseur de l'amidon : l'ADP-Glc

La synthèse de l'ADP-Glc est sous le contrôle de l'ADP-Glc PPase (ou ATP : α -glucose-1-P adénylyl transférase, EC 2.7.7.27) qui catalyse la réaction suivante :



Locus muté	Organisme	Sous-unité affectée	Activité de l'ADPGlc PPase	Quantité d'amidon accumulé
<i>Bt-2</i>	Albumen de maïs	Petite sous-unité (55 kDa)	3 %	25 à 30 %
<i>Sh-2</i>	Albumen de maïs	Grande sous-unité (60 kDa)	6 %	25 à 30 %
<i>rb</i>	Embryon de pois	Grande sous-unité	2,5 à 10 %	40 à 70 %
<i>adg1</i>	<i>A. thaliana</i>	<u>Absence des deux sous unités</u>	Absence d'activité détectable	Absence d'amidon
<i>adg2</i>	<i>A. thaliana</i>	Grande sous-unité (54 kDa)	5 %	40 %
<i>stal-1</i>	<i>C. reinhardtii</i>	Petite sous-unité	Activité de base non activable par le 3PGA	5 %
ARN antisens dirigé contre la petite sous unité	Tubercule de pomme de terre	Petite sous-unité	Pas d'activité détectable	moins de 2 %
<i>glgC16</i>	<i>E. coli</i>	Le seul et unique polypeptide de l'homotétramère de <i>E. coli</i>	Enzyme moins sensible à ses effecteurs: le Fru-1,6-P ₂ et l'AMP	33 % de glycogène en plus
?	Albumen de maïs	Mutant allostérique	Diminution de la sensibilité au Pi	Augmentation de l'accumulation de 15%

Tableau 9 : Principales mutations qui affectent l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

L'ADP-Glc PPase est capable de catalyser la synthèse ou la pyrophosphorylation de l'ADP-Glc. Néanmoins, la réaction de synthèse est maintenue loin de son équilibre *in vivo* grâce à l'activité de la pyrophosphatase alcaline contenue dans le plaste (Gross & apRees, 1986 ; Weiner *et al.*, 1987).

La caractérisation de mutations affectant l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

Le rôle exclusif de l'ADP-Glc PPase pouvait encore être remis en cause, d'une part du fait de l'existence de la phosphorylase, enzyme capable de synthétiser des α -glucanes à partir du glucose-1-phosphate et, d'autre part, du fait de l'utilisation possible de l'UDP-glucose par l'amidon synthétase liée au grain (Preiss, 1991) Cependant, de nombreux éléments montrent que, *in vivo*, l'unique précurseur de l'amidon est l'ADP-Glc. Les études de souches mutantes permettent d'affirmer que cette voie est exclusive. Il existe en effet une relation directe entre l'activité de l'ADP-Glc PPase et la quantité d'amidon accumulé dans tous les cas étudiés. Le **tableau 9** résume les propriétés de certaines de ces souches mutantes.

Plus récemment, la construction d'une lignée de pomme de terre transgénique conforte l'hypothèse selon laquelle seul l'ADP-Glc est utilisé pour la synthèse du polysaccharide de réserve. L'utilisation d'un ARN antisens dirigé contre la petite sous-unité conduit à une chute de l'activité enzymatique de 98 %. L'accumulation d'amidon dans les tubercules des plantes transgéniques est très faible (<4 %). Seule la disparition du transcrit codant la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase semble responsable de la chute de la quantité d'amidon accumulé. Par conséquent, seule la disparition de la synthèse d'ADP-Glc est responsable de la chute de la quantité du polysaccharide (Müller-Röber *et al.*, 1992).

6.1.2 - L'enzyme du contrôle de la synthèse de l'amidon

6.1.2.1 - L'ADP-glucose pyrophosphorylase : enzyme propre à la synthèse de l'amidon

La totalité du flux d'ADP-Glc synthétisé est impliqué dans le métabolisme de l'amidon. En effet, les glucosyl transférases autres que les amidon synthétases utilisent l'UDP-glucose. D'autre part, nous venons de voir que l'entrée du glucose dans l'amidon se fait exclusivement par la voie de l'ADP-Glc. Que ce soit dans le chloroplaste ou dans l'amyloplaste, la synthèse d'amidon débute par la synthèse de ce précurseur (Kruger, 1983). L'ADP-Glc PPase est donc une enzyme spécifique du métabolisme de l'amidon. La capacité d'accumulation d'amidon d'une cellule est par conséquent sous la dépendance directe de l'activité de cette enzyme. Ses propriétés en font

l'étape limitante de la synthèse du polysaccharide. Non seulement elle est la première à intervenir dans cette voie métabolique mais elle semble de plus être la seule enzyme de cette voie sensible à la charge énergétique et carbonée de la cellule.

6.1.2.2 - Comment s'opère le contrôle de l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase?

La régulation allostérique de l'ADP-Glc PPase des plantes supérieures a été décrite pour la première fois par Ghosh et Preiss en 1965. Ils ont montré que l'enzyme isolée de la feuille d'épinard est activée par le 3-phosphoglycérate (3PGA) et inhibée par le phosphate inorganique (Pi) *in vitro*. Le 3PGA diminue le K_m apparent de l'enzyme pour ses substrats et augmente son activité spécifique (Ghosh & Preiss, 1966). D'autre part, ces mêmes auteurs ont prouvé que le 3PGA module la sensibilité de l'ADP-Glc PPase à son inhibiteur en augmentant le K_i (concentration en inhibiteur pour laquelle l'activité maximale est diminuée de moitié). Inversement, le Pi exerce une activité antagoniste sur le 3PGA en affectant son effet activateur. L'activité de l'ADP-Glc PPase (et donc la synthèse d'amidon) est modulée par le rapport 3PGA/Pi.

En 1989, Pettersson et Ryde-Pettersson déterminent la contribution des métabolites dans le contrôle de l'accumulation de l'amidon dans les tissus chlorophylliens en condition de forte luminosité et de saturation en CO₂. C'est ainsi que les taux de fixation du CO₂ et de synthèse de l'amidon ont été définis comme fonctions de la concentration en Pi (à l'extérieur du chloroplaste). A faible concentration en Pi, la contribution la plus significative dans l'augmentation de la synthèse vient de l'ATP, substrat de l'ADP-Glc PPase, et, dans une moindre mesure, du 3PGA. A l'opposé, en forte concentration en Pi, le 3PGA devient le régulateur prédominant avec un léger effet du Glc-1-P et du Fru-6-P. Donc, seuls les métabolites substrats ou effecteurs de l'ADP-Glc PPase exercent un effet sur le taux d'accumulation de l'amidon.

Ces observations ont été reproduites *in vivo* et *in situ* chez divers organismes. Deux principales études apportent la preuve définitive d'une corrélation entre les concentrations en 3PGA ou en Pi et la quantité d'amidon. La première concerne une mutation de la phosphoglucoisomérase cytosolique caractérisée chez *Clarkia xantiana* (Neuhaus *et al.*, 1990). La seconde intéresse une défectuosité de l'ADP-Glc PPase chez *C. reinhardtii* (Ball *et al.*, 1991).

- La défectuosité de la phosphoglucoisomérase, en conditions de faible luminosité, conduit à une augmentation de la synthèse de l'amidon et à une diminution de la synthèse du saccharose.

Cette mutation a pour effet direct de doubler les taux de 3PGA et de Fru-2,6-P₂. La diminution de la synthèse du saccharose est due à l'augmentation de la quantité de Fru-2,6-P₂, inhibiteur de la fructose-1,6-bisphosphatase. L'activation de l'ADP-Glc PPase, due au doublement de la charge en 3PGA, a pour effet d'augmenter la quantité d'amidon.

- L'ADP-Glc PPase d'une souche mutante de *C. reinhardtii* est devenue insensible à l'activation par le 3PGA mais son activité de base (en absence de 3PGA) reste inchangée. La souche mutante accumule moins de 10 % de la quantité accumulée par la souche sauvage quelles que soient les conditions de culture.

Ces deux exemples apportent des preuves directes de l'implication du rapport 3PGA/Pi sur la quantité de polysaccharide, ainsi que sur le rôle majeur de l'ADP-Glc PPase dans son contrôle. Ils mettent en évidence la nécessité de l'activation *in vivo* pour la synthèse d'amidon.

6.1.2.3 - L'ADP-glucose pyrophosphorylase des tissus de réserve

Les données sur la régulation de l'ADP-Glc PPase dont nous disposons concernent principalement l'enzyme des tissus chlorophylliens. Qu'en-est-il des tissus de réserve?

Il semblerait que l'ADP-Glc PPase isolée des tissus de réserve soit également activée par le 3PGA et inhibée par le Pi (Preiss, 1982). Le contrôle de la synthèse du polysaccharide dans l'amyloplaste serait le même que dans le chloroplaste. Cependant, les ADP-Glc PPases isolées du blé (Olive *et al.*, 1989), de l'orge (Kleczkowski *et al.*, 1993) et également de l'embryon de pois (pour revue : Smith & Martin) semblent moins sensibles au 3PGA et au Pi que ne l'est l'ADP-Glc PPase isolée de feuilles d'épinard. Ces résultats sont controversés : selon certains auteurs, la perte de sensibilité aux effecteurs pourrait être due à une dégradation partielle de l'enzyme lors de sa purification. Dans le cas de l'enzyme de l'albumen de maïs, il a été démontré que la protéine purifiée était partiellement dégradée (Plaxton & Preiss, 1987). En règle générale, la protection vis-à-vis de la protéolyse augmente la sensibilité aux effecteurs. Néanmoins, celle-ci resterait plus faible pour l'enzyme des tissus de réserve que pour celle des tissus chlorophylliens. Toutefois, les enzymes de l'albumen de maïs, du tubercule de pomme de terre, de l'albumen de riz. sont activables par le 3PGA *in vitro* (pour revue : Preiss, 1995).

D'autre part, l'enzyme isolée *C. reinhardtii* présente des propriétés allostériques similaires lorsque l'algue est cultivée en autotrophie ou en hétérotrophie. La souche mutante dans laquelle l'ADP-Glc PPase est devenue insensible à l'activation par le 3PGA montre toujours son

phénotype mutant (chute de 95 % de la synthèse d'amidon) dans les conditions physiologiques mimant les organes de réserve (Ball *et al.*, 1990).

L'ADP-Glc PPase des différents tissus étudiés présente donc des propriétés allostériques similaires. Néanmoins, ceci n'implique pas que la régulation de la synthèse d'amidon s'opère de la même manière. Nous verrons que les quantités de 3PGA et de Pi dans les tissus de réserve ne sont probablement pas sujets à fluctuation comme ils le sont dans les tissus chlorophylliens.

6.2 - L'ADP-glucose pyrophosphorylase bactérienne

6.2.1 - *L'ADP- glucose pyrophosphorylase bactérienne et la synthèse de glycogène*

Le mécanisme général de synthèse du glycogène bactérien est similaire à celui du glycogène des mammifères. L'élongation de chaînes de glucose liés en α -1,4 s'effectue ici aussi à partir de nucléotides sucre. Dans le cas des cellules de mammifère, le donneur est l'UDP-Glc tandis que chez les bactéries, tout comme chez les végétaux supérieurs, il s'agit de l'ADP-Glc (voir le chapitre 5).

Toutes les glycogène synthétases bactériennes étudiées utilisent spécifiquement l'ADP-Glc. D'ailleurs, une souche mutante d'*E. coli* déficiente pour l'activité UDP-glucose pyrophosphorylase reste capable d'accumuler normalement le glycogène (Preiss & Roméo, 1989). D'autre part, des souches d'*E. coli* et de *Salmonella typhimurium* déficientes pour la synthèse de glycogène ou, au contraire hyperproductrices, sont toujours affectées, soit dans la glycogène synthétase, soit dans l'ADP-Glc PPase (Preiss, 1984 ; Preiss & Roméo, 1989).

Le contrôle de la synthèse du glycogène bactérien s'exerce de deux manières :

- par le contrôle de l'expression des enzymes de la voie de synthèse du glycogène
- par la régulation allostérique de l'ADP-Glc PPase

Le contrôle génétique ayant été détaillé précédemment (voir § 5.3), ce chapitre sera uniquement consacré au contrôle *via* l'ADP-Glc PPase.

6.2.2 - *Les effecteurs de l'ADP-glucose pyrophosphorylase bactérienne*

L'activité de l'ADP-Glc PPase bactérienne est, comme celle des plantes supérieures, contrôlée par les métabolites de la voie d'assimilation du carbone (Preiss, 1984). Pour les

bactéries dont le milieu de vie est susceptible de varier rapidement, ce type de contrôle est basé sur les fluctuations des charges énergétiques et carbonées. Or, comme nous l'avons évoqué au paragraphe 1.1.2 du chapitre 5, le métabolisme carboné bactérien est différent selon les espèces (Figure 19).

Quelques exemples illustrant la corrélation entre le métabolisme carboné et les effecteurs de l'ADP-glucose pyrophosphorylase :

L'ADP-Glc PPase des bactéries qui utilisent la voie glycolytique d'Embder-Meyerhof est principalement activée par le fructose-1-6-P₂ et/ou le fructose-6-P et inhibée par l'AMP et l'ADP. Pour les organismes utilisant la voie d'Entner-Doudoroff, l'ADP-Glc PPase est spécifiquement activée par le fructose-6-P et le pyruvate tandis que l'enzyme des bactéries anaérobies photosynthétiques est également sensible au fructose-1,6-P₂. Ceci s'explique par le fait que, selon les conditions de croissance, les bactéries telles que *Rhodobacter gelatinosa* ou *R. globiformis* métabolisent les hexoses par une voie glycolytique modifiée ou par la voie d'Entner-Doudoroff (Preiss, 1982). L'enzyme des bactéries photosynthétiques anoxygéniques est quant-à elle exclusivement activable par le pyruvate. Ces bactéries utilisent le pyruvate et les intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques comme sources de carbone. La dernière catégorie regroupe l'ADP-Glc PPase des cyanobactéries qui, comme celle des plantes supérieures, est principalement activée par le 3PGA, premier produit de la fixation du CO₂ par la voie oxydative des pentoses phosphate. Ces bactéries effectuent la photosynthèse en présence d'oxygène comme le font les chloroplastes des végétaux supérieurs.

6.3 - La structure de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

6.3.1 - La structure quaternaire : l'ADP-glucose pyrophosphorylase possède une structure tétramérique

Toutes les études réalisées jusqu'à présent montrent que, quelle que soit son origine, l'ADP-Glc PPase présente une structure tétramérique. L'enzyme isolée des entérobactéries (Haugen *et al.*, 1976) ou des cyanobactéries (Iglesias *et al.*, 1991) est un homotétramère tandis que celle des végétaux supérieurs est un hétérotétramère. La structure de l'enzyme isolée du tubercule de pomme de terre a d'abord été décrite comme homotétramérique (Sowokinos & Preiss, 1982). Mais en 1990, Okita et coll. ont montré qu'elle est en fait composée de deux sous-unités distinctes de masses moléculaires très proches (50 et 51 kDa, respectivement). La

structure hétérotétramérique de l'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard a été décrite pour la première fois en 1981 (Preiss & Copeland). Par la suite, Morell et coll. (1987) ont confirmé qu'elle est composée de deux sous-unités qui se différencient par leurs mobilités électrophorétiques, leurs propriétés antigéniques, leurs profils de digestion tryptique et, enfin, leurs séquences amino-terminales. La masse moléculaire de chacune des sous-unités, définies comme petite et grande, fut estimée à 51 et 54 kDa. La protéine native est un hétérotétramère composé de deux petites et de deux grandes sous-unités. Les anticorps dirigés contre la petite sous-unité réagissent faiblement avec la grande sous-unité et *vice versa* ; les protéines sont donc bien différentes et sont codées par deux gènes distincts. Des expériences de "Western blotting" menées sur l'ADP-Glc PPase isolée de feuilles d'*A. thaliana* (Lin *et al.*, 1988a) et d'albumen de maïs (Preiss *et al.*, 1990) ont révélé là aussi, la présence de deux sous-unités. La purification de plusieurs enzymes a permis de déterminer la masse moléculaire de chacune d'entre-elles.

Origine de l'enzyme	Structure IV de l'enzyme	Masse moléculaire
<i>E. coli</i>	homotétramère	49 kDa
<i>Synechocystis</i>	homotétramère	48 kDa
Feuille d'épinard	hétérotétramère	51 et 54 kDa
Albumen de maïs	hétérotétramère	55 et 60 kDa
Albumen d'orge	hétérotétramère	51 et 60 kDa
Tubercule de pomme de terre	hétérotétramère	50 et 51 kDa
<i>Arabidopsis thaliana</i>	hétérotétramère	51 et 54 kDa
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	hétérotétramère	51 et 53 kDa

Tableau 10 : Structure quaternaire de l'ADP-glucose pyrophosphorylase et masses moléculaires des différentes sous-unités

Les masses moléculaires des petites et des grandes sous-unités de l'ADP-Glc PPase sont plus ou moins variables. Elle sont généralement comprises entre 50 et 55 kDa pour la petite sous-unité et entre 50 et 60 kDa pour la grande sous-unité.

6.3.2 - La structure primaire de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de divers organismes

Le premier gène de structure de l'ADP-Glc PPase a été cloné chez *E. coli* par Okita et coll. (1981). Il s'agit du gène *glgC* localisé à 75 minutes. sur le chromosome de la souche

K12, dans une région contenant d'autres gènes de structure de protéines impliquées dans la synthèse du glycogène (voir chapitre 5, §1.3.1). En 1987, l'équivalent de ce gène a été séquencé chez *S. typhimurium* en utilisant une sonde hétérologue issue de *glgC* (pour revue : Preiss, 1989). Plus tard, ce sont les gènes codant les ADP-Glc PPases des plantes supérieures qui ont été clonés. Aujourd'hui, nous disposons de nombreuses séquences issues de tissus et d'espèces divers. Différentes stratégies de clonage ont été utilisées. En voici quelques exemples :

Smith-White et Preiss (1992) ont comparé les séquences primaires des ADP-Glc PPases connues. D'après cette étude, la structure primaire permet dans une certaine mesure de différencier la grande sous-unité de la petite. La séquence de la petite sous-unité est mieux conservée ; cependant, des régions hautement conservées semblent spécifiques de la grande. Les séquences de l'enzyme isolée des bactéries, en particulier des entérobactéries, sont éloignées de celles des végétaux supérieurs ; certaines régions sont néanmoins conservées. Les propriétés antigéniques de l'ADP-Glc PPase d'*Anabaena* (cyanobactérie) la rapprochent plus de celle des plantes supérieures que des entérobactéries, en particulier en ce qui concerne la petite sous-unité. Sa séquence peptidique présente 63, 54 et 33 % d'identité avec la petite sous-unité de l'albumen de riz, la grande sous-unité de l'albumen de maïs et l'enzyme de *E. coli*, respectivement.

Ces résultats confirment la fiabilité de l'interaction protéine-anticorps pour les études préliminaires d'appartenance à une famille. En effet les propriétés immunologiques montrent aussi que, de manière générale, les grandes sous-unités sont assez variables alors que les petites sont hautement conservées. La grande sous-unité de l'enzyme du tubercule de pomme de terre ne réagit pas avec l'anticorps dirigé contre cette même sous-unité de l'enzyme isolée de la feuille d'épinard. A l'opposé, l'anticorps dirigé contre la petite sous-unité de l'enzyme de l'épinard reconnaît celle du tubercule de pomme de terre (Okita *et al.*, 1990).

Cette méthode a montré que l'ADP-Glc PPase des cyanobactéries est plus éloignée d'*E. coli* que de la petite sous-unité de la feuille d'épinard (Iglesias *et al.*, 1991). Ce résultat est confirmé par l'analyse des séquences primaires.

Le pourcentage d'identité des séquences nucléotidiques des enzymes isolées de la feuille et de l'albumen de blé est de 55,7 % (Olive *et al.*, 1989). Entre l'enzyme de feuille d'épinard et celle de l'albumen de riz, il est de 50 %. La comparaison des séquences peptidiques de la petite sous-unité du grain de riz avec celle du tubercule de pomme de terre, de feuille d'épinard et de feuille d'*A. thaliana* révèle respectivement 75, 69 et 86 % d'identité. La séquence de *Sh2* (grande sous-unité de l'endosperme de maïs) se distingue car elle est assez peu conservée. En effet, il

n'existe que 36 et 37 % d'identité avec les séquences protéiques des petites sous-unités de grain de riz et de la feuille d'épinard. Néanmoins, elle présente 52 % d'identité avec la grande sous-unité de cette dernière.

En résumé :

- Il existe de très fortes homologues entre une même sous-unité chez différentes espèces. Ceci est particulièrement vrai pour les petites sous-unités qui semblent avoir subi une forte pression de sélection.
- Une spécificité tissulaire caractérise la grande sous-unité de la protéine (tissu photosynthétique ou tissu de réserve)
- Les séquences des petites sous-unités issues de végétaux monocotylés (riz, maïs...) se distinguent de celles des dicotylédones (pomme de terre, épinard...).

La comparaison de la séquence peptidique de l'ADP-Glc PPase d'*E. coli* et de la petite sous-unité des plantes supérieures suggère une origine commune des deux gènes (Smith-White & Preiss, 1992). Le même degré d'identité (30 %) a également été observé entre l'enzyme de *E. coli* et celle des cyanobactéries (Kakefuda *et al.*, 1992). D'autre part, les petites sous-unités des végétaux supérieurs partagent de fortes homologues entre-elles et avec l'enzyme des cyanobactéries, contrairement aux grandes qui sont plus divergentes. Ces informations sur la structure et les propriétés allostériques de l'ADP-Glc PPase des cyanobactéries, des entérobactéries et des plantes supérieures, suggèrent que les deux sous-unités proviennent d'un même gène. Au cours de l'évolution, le gène procaryotique se serait dupliqué pour évoluer vers les deux polypeptides qui composent l'enzyme native des plantes.

6.3.3 - Les sites de fixation des substrats et des effecteurs

6.3.3.1 - La nature des sites d'interaction de la protéine de *E. coli* avec les substrats et les effecteurs

La fixation des substrats et la libération des produits de la réaction suivent un ordre précis : l'ATP se fixe avant le Glc-1-P ; le pyrophosphate est ensuite libéré, suivi de l'ADP-Glc (Preiss, 1982b ; Haugen & Preiss, 1979 ; Kleczkowski *et al.*, 1993).

Il existe quatre sites potentiels de fixation des effecteurs sur l'enzyme d' *E. coli* native mais seuls deux d'entre eux semblent requis pour le contrôle de l'activité (Haugen & Preiss, 1979). Pour l'enzyme des plantes supérieures, qui est composée de deux sous-unités distinctes, des observations similaires ont été faites, à savoir que seule la moitié des sites est utilisée.

6.3.3.2 - La structure primaire des sites actifs

Le clonage et le séquençage de gènes codant l'ADP-Glc PPase chez divers organismes a conduit à la recherche d'une relation de type structure/fonction. Deux styles d'approche ont été utilisés :

- La modification chimique de la protéine par utilisation d'analogues structuraux
- La mutagenèse dirigée

La technique de modification chimique permet de localiser la région de fixation de l'effecteur ou du substrat. Néanmoins, elle ne permet pas d'identifier le ou les acides aminés impliqués dans la liaison. La mutagenèse dirigée des acides aminés de la région d'intérêt apporte des renseignements plus précis sur les sites catalytiques ou allostériques.

Le site de fixation de l'activateur de l'ADP-glucose pyrophosphorylase des végétaux supérieurs

Le pyridoxal-5-phosphate est un activateur artificiel de l'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard. Il n'est pas aussi efficace que le 3PGA puisqu'il active l'enzyme d'un facteur 6 alors que l'activation par le 3PGA peut atteindre un facteur 25 (Morell *et al.*, 1988). Les enzymes de l'albumen de maïs et des cyanobactéries sont elles aussi sensibles au pyridoxal-P. L'affinité apparente pour cette molécule est importante ($A_{0,5} = 15 \mu\text{M}$ pour le pyridoxal-P ; $A_{0,5} = 45 \mu\text{M}$ pour le 3PGA). Par réduction au borohydrure de sodium, le pyridoxal-P se lie de manière covalente à la protéine. La présence de 3PGA ou de P_i empêche cette liaison, ce qui indique que l'analogue se fixe au niveau du site activateur. La protéine modifiée présente alors une activité élevée en absence d'activateur. La modification chimique est donc probablement responsable d'une mise en conformation de l'enzyme, conformation dans laquelle son activité catalytique est élevée et résistante à l'inhibition par le P_i . La séquence du site de modification de la petite sous-unité de la feuille d'épinard est différente de celle du site de fixation de l'activateur (fructose-1,6- P_2) chez *E. coli* (Parsons & Preiss, 1978). En ce qui concerne la grande sous-unité, trois régions de modification ont été relevées.

Ces expériences montrent que chacune des sous-unités peut participer à la fixation de l'activateur. De plus, deux des sites identifiés sont protégés par le Pi, ce qui implique que les sites de fixation de l'activateur et l'inhibiteur sont probablement chevauchants.

Le site catalytique de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

La localisation du site catalytique a été réalisée sur l'enzyme de la feuille d'épinard en utilisant le 8-azido-ATP, analogue structural de l'ATP (Morell *et al.*, 1988). Seule la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase est modifiable. Mais cela ne signifie pas obligatoirement qu'elle est la seule sous-unité porteuse d'un site catalytique.

Le site de fixation du Glc-1-P chez *E. coli* a été déterminé en utilisant la protection par l'ADP-Glc vis-à-vis de la modification au pyridoxal-P (Parson & Preiss, 1978). Ces résultats préliminaires ont été confirmés par mutagenèse dirigée (Hill *et al.*, 1991). Cette technique a permis de déterminer que la lysine en position 195 participe à la liaison avec le phosphate des molécules de Glc-1-P ou avec le β -phosphate de l'ADP-Glc. Dans toutes les séquences des ADP-Glc PPases étudiées, un résidu de lysine est retrouvé dans une position équivalente.

Le schéma ci-dessous résume la localisation des sites dans l'enzyme de *E. coli* et d'*Anabaena*.

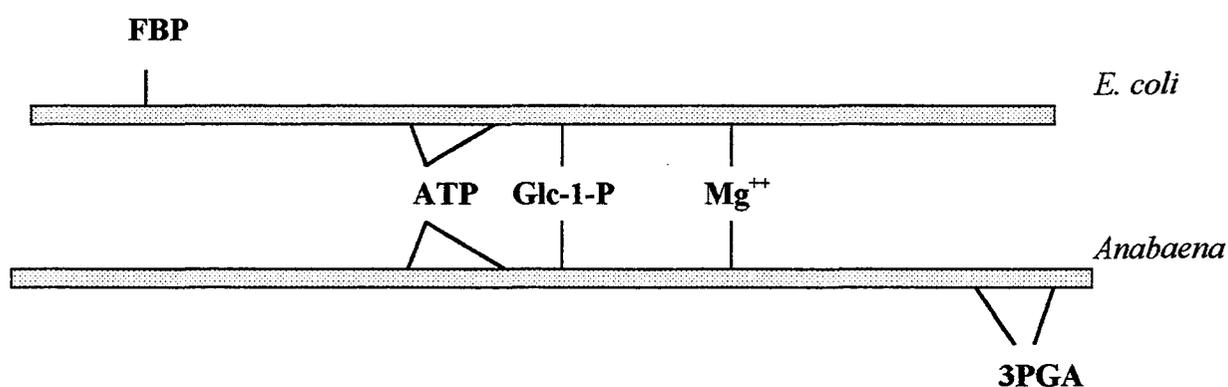


Figure 21 : Comparaison de la localisation des sites actifs connus de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *E.coli* et *Anabaena*.

FBP : fructose-1,6-bisphosphate

Les comparaisons de séquences montrent qu'il existe d'autres régions de la protéine très conservées. Ceci laisse présager des fonctions qui restent encore à élucider (Smith-White & Preiss, 1992).

6.4 - Le rôle respectif de chacune des sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

6.4.1 - Expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase du tubercule de pomme de terre dans E. coli

L'expression dans *E. coli* de l'ADP-Glc PPase du tubercule de pomme de terre apporte des éléments importants dans la compréhension du rôle respectif de chacune des sous-unités de l'enzyme (Iglesias *et al.*, 1993). Elle a permis la purification aisée de grandes quantités d'enzyme ainsi que l'étude de l'activité de chacune des sous-unités exprimées séparément et simultanément (Preiss *et al.*, 1995 ; Ballicora *et al.*, 1995).

Sous-unité exprimée	Activité (U)	A_{0.5} (mM)	Sensibilité au Pi
petite s.-u.	0,17	2,4	très sensible (I _{0.5} 0,08)
grande s.-u.	0,002	/	/
petite et grande s.-u.	1,80	0,16	sensible (I _{0.5} 0,6)

Tableau 11 : *Caractéristiques cinétiques des sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase du tubercule de pomme de terre exprimées dans E. coli.*

A_{0.5} : concentration en activateur (ici en 3PGA) pour laquelle l'enzyme atteint la moitié de sa vitesse maximale.

I_{0.5} : concentration en inhibiteur (ici Pi) donnant 50 % d'inhibition, pour une concentration en 3PGA de 3 mM.

L'activité est exprimée en mmol d'ADP-Glc/min.mg de protéine.

La petite sous-unité exprimée seule possède une activité environ 10 fois inférieure à celle de l'enzyme native tandis que la grande sous-unité seule est pratiquement inactive. L'étude des propriétés allostériques de la petite sous-unité montrent qu'elle peut atteindre la vitesse maximale

de l'enzyme native mais à une concentration en 3PGA 20 fois plus importante (ce qui représente une valeur non physiologique). De même, elle est fortement sensible à la présence de phosphate inorganique. De faibles concentrations suffisent en effet à faire chuter son activité. Dans l'enzyme native, la grande sous-unité semble donc moduler la sensibilité de la petite, en particulier l'inhibition par le Pi ; en d'autres termes, la petite sous-unité serait la partie catalytique de l'enzyme alors que la grande servirait au contrôle de son activité.

6.4.2 - L'activité résiduelle de la petite sous-unité

La mutation *adg2* chez *A. thaliana* provoque la disparition de la grande sous-unité de l'enzyme. L'activité résiduelle se situe aux alentours de 5 % de l'activité de l'enzyme sauvage. Sa sensibilité à l'inhibition par le Pi augmente; par contre, les concentrations en activateur requises pour atteindre le V_{max} sont supérieures.

Une situation similaire est rencontrée dans une souche de pois porteuse de la mutation *rb*, également déficiente pour la grande sous-unité. L'activité résiduelle de la petite sous-unité est inférieure à 10 % de celle de la souche sauvage. Par contre, dans ce cas, la sensibilité à la régulation par le 3PGA et par le phosphate est augmentée (Hylton & Smith, 1992 ; Martin & Smith, 1995).

La disparition de la grande sous-unité provoque donc une chute de l'activité de l'enzyme. Cependant, elle reste plus ou moins sensible aux effecteurs allostériques, en particulier au Pi. Ceci laisse supposer que, comme dans le cas de l'enzyme de pomme de terre, les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase n'ont pas une contribution équivalente dans le contrôle allostérique de l'enzyme.

6.4.3 - Les souches de maïs porteuses des mutations *sh2* et *bt2* sont-elles des contre-exemples ?

Quel que soit l'allèle muté considéré - *sh2* ou *bt2* - une activité résiduelle de l'ADP-Glc PPase persiste (Giroux & Hannah, 1994). Afin de contrôler si un homotétramère SH2 ou BT2 pouvait en être responsable, des souches portant simultanément les deux mutations ont été construites. Ces doubles mutants conservent une activité non négligeable (Hannah *et al*, 1980). Ce maintien d'activité malgré l'absence des deux sous-unités de l'enzyme (SH2 et BT2) s'explique par la présence du produit des gènes *Agp1* et *Agp2* codant chacune des sous-unités de l'ADP-Glc PPase dans l'embryon de maïs. Tandis que les gènes *Bt2* et *Sh2* semblent s'exprimer exclusivement dans l'albumen (Giroux & Hannah, 1994), des ARNm correspondant à *Agp1* et *Agp2* sont détectables

à la fois dans l'embryon et dans l'albumen. Il semble donc, qu'à l'intérieur d'un même tissu, différentes isoformes de l'ADP-Glc PPase participent à la synthèse d'ADP-Glc.

La mise en évidence de plus d'une forme de chacune des sous-unités remet donc en cause la signification des activités résiduelles mesurées chez certaines souches mutantes.

Il nous semble que cette observation est en contradiction avec l'interprétation issue de l'analyse des phénotypes mutants caractérisés chez le maïs, et ceci, quelle que soit l'enzyme de la voie de synthèse de l'amidon considérée. En effet, il existe également de nombreuses isoformes d'amidon synthétases et d'enzymes de branchement. Ceci justifie d'autant plus l'utilisation d'un modèle d'étude plus simple comme *Chlamydomonas reinhardtii*.

6.4.4 - La multiplicité des isoformes de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

Les nombreux travaux concernant l'étude de l'ADP-Glc PPase des végétaux supérieurs indiquent que l'enzyme possède une structure hétérotétramérique. Cependant, la situation pourrait être plus complexe : plusieurs rapports font état de l'existence de différentes isoformes de la grande et de la petite sous-unités. C'est par exemple le cas chez la pomme de terre où trois ADNc différents codant vraisemblablement la grande sous-unité ont été isolés (Müller-Röber *et al.*, 1990 ; Gebhardt *et al.*, 1993 ; résultats non publiés, cités par Müller-Röber & Koßmann, 1994). Ces ARNm s'exprimeraient dans le tubercule, dans les feuilles ou les racines mais à des niveaux différents. En 1990, Okita et coll. parviennent à purifier l'ADP-Glc PPase du tubercule de pomme de terre : la séparation par électrophorèse en gel bidimensionnel révèle que la mobilité de la grande sous-unité est variable. Trois à cinq isoformes sont détectées. L'isolement de différents ADNc confirme qu'Okita et coll. ont bien isolé des isoformes et non des polypeptides ayant subi des modifications post-traductionnelles, comme ils l'avaient d'abord suggéré. Il s'agirait en effet de protéines codées par des gènes différents.

Récemment, des formes multiples de l'ADP-Glc PPase ont également été détectées dans l'albumen de riz (Nakamura & Kawaguchi, 1992), chez *Arabidopsis* (Villand *et al.*, 1993), chez l'orge (Villand *et al.*, 1992a), dans l'embryon de pois (Hylton & Smith, 1992).

Il existe également différentes isoformes de la petite sous-unité. Chez *Vicia faba* ainsi que chez le maïs, deux ADNc correspondant vraisemblablement à la petite sous-unité ont été clonés. Ils présentent tous deux une spécificité d'expression tissulaire (Weber *et al.*, 1995 ; Giroux & Hannah, 1994 ; Prioul *et al.*, 1994).

La multiplicité des isoformes au sein d'un même tissu suggère que différentes combinaisons sont possibles. Il reste à établir si une même petite sous-unité peut s'associer avec différentes formes de la grande sous-unité. Ces combinaisons seraient susceptibles de produire des enzymes possédant des propriétés allostériques spécifiques.

D'autre part, l'expression séquentielle ou tissu-spécifique des isoformes pourrait servir à moduler la sensibilité de l'enzyme au cours des différentes étapes du développement. En effet, l'augmentation du taux de saccharose dans le tubercule de pomme de terre se traduit par l'expression spécifique d'une des isoformes de l'ADP-Glc PPase (Müller-Röber *et al.*, 1990). En ce qui concerne l'orge, l'expression de l'enzyme ne semble pas répondre à des facteurs externes ; elle serait plutôt spécifique du tissu. Les différentes isoformes sont spécifiquement exprimées dans les racines, dans l'albumen et dans les feuilles de l'orge (Villand *et al.*, 1992a).

6.5 - La localisation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

L'étude de la localisation des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon a débuté à la fin des années 70. C'est en 1979 que Okita et coll. ont réalisé les premiers travaux sur des chloroplastes isolés de feuilles d'épinard. Ces préparations contiennent les activités amidon synthétase, enzyme de branchement et ADP-Glc PPase. En 1978, Mares et coll. montrent que l'ADP-Glc PPase est exclusivement localisée dans le chloroplaste des cellules de feuilles d'épinard. La même année, Levi et Preiss obtiennent un résultat identique avec les feuilles de pois. Dans les cellules de garde de *Commelina communis*, la situation est la même : toutes les enzymes de synthèse de l'amidon sont chloroplastiques (Robinson & Preiss, 1987). MacDonald et apRees (1983) ont isolés des amyloplastés intacts du soja, ce qui a permis de montrer que l'ADP-Glc PPase se situe exclusivement dans ce compartiment. La localisation de l'ADP-Glc PPase au sein du chloroplaste a également été étudiée par des techniques d'immunocytochimie sur des coupes fines de tubercule de pomme de terre (Mohabir & John, 1988). Ces résultats ont été confirmés par Kim et coll. en 1989. Un anticorps dirigé contre l'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard permet le repérage l'enzyme dans l'amyloplaste de pomme de terre, le long des couches successives qui composent le grain d'amidon. La répartition de l'enzyme n'est donc pas aléatoire. Il semble qu'elle se situe spécifiquement aux endroits où la synthèse de l'amidon est très active (au niveau des cercles de croissance du grain), là où se trouvent également les amidon synthétases et les enzymes de branchement. Récemment, la localisation de l'ADP-Glc PPase dans les amyloplastés de l'albumen de maïs a été remise en cause par Giroux et Hannah (1994). En outre, la mise en évidence récente d'une possibilité de transport

des hexoses et plus particulièrement de l'ADP-Glc (Viola *et al.*, 1991 ; Hatzfeld & Stitt, 1990 ; Pozueta-Romero *et al.*, 1991) serait en faveur de la localisation cytosolique de l'ADP-Glc PPase. Ces spéculations restent toutefois sujettes à caution. Elles sont en contradiction, d'une part avec les données antérieures situant l'enzyme dans le chloroplaste et, d'autre part, avec l'ensemble des données génétiques, physiologiques et moléculaires.

6.6 - Les perspectives liées à l'étude et à l'utilisation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase en vue d'augmenter l'accumulation d'amidon chez les végétaux supérieurs.

L'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse d'amidon pourrait être à la base d'une augmentation de l'accumulation. Nous l'avons vu précédemment, l'ADP-Glc PPase est l'enzyme limitante de la synthèse de l'amidon ou du glycogène chez les bactéries. Les deux sous-unités de l'enzyme sont nécessaires afin d'obtenir une activité optimale de l'enzyme. Donc, pour augmenter la synthèse d'ADP-Glc sans devoir exprimer simultanément les deux sous-unités, Stark et coll. (1992) ont exprimé le gène *glgC* de *E. coli* dans différentes plantes. Le gène utilisé est issu d'une souche mutante accumulant 30 % de glycogène en plus de la souche sauvage. Cette ADP-Glc PPase mutante est moins sensible à l'inhibition par l'AMP et moins dépendante de l'activation par le Fru-1,6-P₂ (Creuzat-Sigal *et al.*, 1972). L'expression du gène *glgC* mesuré dans le tabac, la tomate et la pomme de terre transgéniques, se traduit par une accumulation accrue d'amidon. Néanmoins, le détournement du métabolisme carboné vers la synthèse d'amidon n'est pas sans effet sur le développement des plantes : les tissus se développent lentement et incomplètement. La diminution de la synthèse du saccharose, et par conséquent celle du flux de carbone circulant, pourrait expliquer le retard de croissance des plantes transgéniques. L'expression spécifique de *glgC* dans le tubercule de pomme de terre a permis de contourner ces problèmes physiologiques. Une augmentation d'environ 35 à 60 % de l'accumulation de l'amidon est mesurée dans ces plantes dont le développement se déroule normalement. L'augmentation présente cependant des limites. En effet, lorsque les capacités de synthèse d'ADP-Glc deviennent très élevées, la disponibilité en Glc-1-P qui devient limitante.

Ce travail de Stark et coll.(1992) amène trois conclusions principales :

- l'augmentation de l'activité de l'ADP-Glc PPase dans les plantes transgéniques conduit à une augmentation de la quantité d'amidon accumulé.
- les propriétés allostériques de l'ADP-Glc PPase exprimée sont importantes pour la modification de l'accumulation de l'amidon dans la plante transgénique.
- l'expression de l'ADP-Glc PPase dans le cytosol n'a aucun effet sur le taux d'accumulation, ce qui suggère que de l'ADP-Glc du cytosol ne peut servir à la synthèse d'amidon. Ceci réfute l'existence d'une activité cytosolique de l'enzyme chez la pomme de terre.

Ces résultats de transfection d'une plante avec le gène codant l'ADP-Glc PPase bactérienne montrent qu'il est possible d'agir sur le métabolisme de l'amidon. Les techniques de biotechnologie pourraient être utilisées, non seulement pour faire varier la quantité mais également la structure de l'amidon. L'expression de diverses isoformes d'amidon synthétases ou d'enzyme de branchement qui, comme cela a été démontré récemment pour certaines d'entre-elles, possèdent des activités catalytiques spécifiques, permettra sans doute d'envisager des modifications de structure *in vivo*. De telles perspectives ont été récemment décrites (Müller-Röber & Koßmann 1994).

- Des enzymes autres que l'ADP-Glc PPase pourraient, elles-aussi, influencer la voie métabolique en apportant des modifications structurales à l'amidon.
- En plus de l'expression des enzymes directement impliquées dans la voie de synthèse de l'amidon, l'expression des protéines de transport des métabolites à travers la membrane du chloroplaste ou de l'amyloplaste peuvent constituer une cible. Leur modification pourrait influencer le contrôle du métabolisme de l'amidon. La surexpression de protéines telles les transporteurs de saccharose (Riesmeier *et al.*, 1992), les transporteurs de monosaccharides (Sauer & Stadler, 1993), et les translocateurs de trioses phosphate (Flügge *et al.*, 1989) serait un moyen de dévier les voies métaboliques.
- Augmenter la disponibilité en ATP pourrait également être un moyen d'accroître la synthèse de l'amidon. Avant de modifier cette voie, des analyses de la production (métabolisme de la respiration) et de la distribution de l'ATP (translocateur ADP/ATP de l'enveloppe des plastes ; Schünemann *et al.*, 1993) sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes de régulation.

7 - CONTROLE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LE METABOLISME DE L'AMIDON

Les gènes de structure des protéines impliquées dans les voies métaboliques font l'objet d'une régulation qui traduit les fluctuations du milieu environnant. Une régulation de l'expression des gènes par les métabolites est nécessaire au maintien de l'équilibre entre leur synthèse et leur consommation.

Le glucose est essentielle pour la synthèse d'ATP par photophosphorylation pendant la photosynthèse (Stitt, 1986). Les sucres modulent la synthèse et la mise en réserve des produits de photosynthèse en fonction des capacités et des besoins de la cellule. En plus de ce contrôle basé essentiellement sur la compartimentation cellulaire, il semblerait que les sucres libres agissent directement sur l'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans le métabolisme carboné (Shen, 1990).

Le contrôle de la synthèse d'amidon dans les plantes supérieures s'effectue à deux niveaux : à court terme, il module l'activité des enzymes (par des métabolites par exemple) et, à plus long terme, il contrôle le développement de la plante.

7.1 - Existe-t-il un contrôle de l'expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase?

L'ADP-Glc PPase possède un rôle clef dans le contrôle de la synthèse de l'amidon, aussi bien dans les tissus chlorophylliens que dans les tissus de réserve. Alors que les données décrivant les propriétés allostériques de l'enzyme sont nombreuses, celles qui concernent l'expression des gènes de structure des sous-unités de l'enzyme sont plus rares. Les principaux travaux décrivant ce type de régulation datent des 10 dernières années.

Müller-Röber et coll. (1990) sont les premiers à s'être intéressés à la régulation de l'expression spécifique de chacune des sous-unités de l'ADP-Glc PPase dans divers tissus de la pomme de terre. Ils ont mis en évidence que les transcrits correspondant aux deux sous-unités de l'enzyme présentent des profils d'expression qui varient en fonction de l'organe et de l'état physiologique de la plante. L'expression du gène AGPase S (sous-unité présentant une forte homologie avec *shrunk2*, grande sous-unité du maïs) est induite par les sucres du métabolisme tels que le saccharose. D'autre part, l'accumulation du transcrit AGPase S s'accompagne toujours

d'une augmentation de la synthèse de l'amidon, alors que celle de AGPase B semble moins significative. En effet, l'expression de AGPase B est la même que ce soit dans les tissus "source" ou "puits" des polysaccharides. Elle n'est influencée ni par l'intensité de la photosynthèse ni par l'addition de sucres exogènes. L'expression de AGPase B semble donc constitutive, sauf dans le cas où les feuilles sont privées de lumière. Ces expériences menées par Müller-Röber et coll. (1990) apportent donc deux informations principales.

→ Dans le tubercule ou les feuilles de pomme de terre, l'augmentation de la quantité d'amidon est concomitante à celle du niveau de transcrits correspondant à la grande sous-unité de l'enzyme.

→ L'expression de la grande sous-unité peut se produire en réponse à un enrichissement en sucres tels que le saccharose. Ceci suggère un rôle de la régulation transcriptionnelle dans l'ajustement de la quantité d'amidon accumulé.

7.2 - L'expression de l'ADP-Glc PPase, son activité et le taux d'accumulation de l'amidon

Des travaux plus récents décrivent la corrélation qui existe entre l'expression des gènes des sous-unités composant l'enzyme, la quantité de peptide correspondant et l'accumulation d'amidon dans les différents tissus, chez la pomme de terre (Nakata & Okita, 1995) et chez le maïs (Prioul *et al.*, 1994).

Chez la pomme de terre

Le contrôle de l'expression de l'ADP-Glc PPase dans les tissus chlorophylliens est différent de celui observé dans les tissus de réserve. Dans les feuilles, il existe une hiérarchie du contrôle allant de la transcription aux modifications post-transcriptionnelles pour atteindre le contrôle allostérique. Dans le tubercule, le type de contrôle prédominant est un contrôle transcriptionnel (ou stabilité des ARNm). Cette différence est sans doute due à la spécificité des voies d'assimilation du carbone de chacun des tissus.

→ Dans les chloroplastes, la quantité d'enzyme (de protéine) reste constante ; l'accumulation d'amidon fluctue uniquement avec la photosynthèse. La quantité de transcrits correspondants à la petite sous-unité varie pendant le cycle jour/nuit : elle augmente dès le début de la phase lumineuse. L'activité de l'ADP-Glc PPase isolée de feuille mesurée *in vitro* reste inchangée au

cours de ces cycles jour/nuit. Cet élément est en faveur du contrôle allostérique comme moyen d'ajustement de l'accumulation de l'amidon en fonction de la physiologie de la cellule.

Les analyses de l'expression de l'ADP-Glc PPase dans les feuilles en photopériode ou en présence de saccharose montrent que le contrôle de la mise en réserve d'amidon dépend en premier lieu des propriétés allostériques de l'enzyme et non d'une régulation transcriptionnelle de son expression. La quantité de polypeptide correspondant à chaque sous-unité reste constante au cours de la photopériode ou en présence de saccharose, même si une augmentation du transcrit peut être détectée. Donc, contrairement à ce qu'avaient suggéré Müller-Röber et coll. (1990), l'augmentation de la concentration en saccharose provoque une augmentation de l'accumulation d'amidon par un effet, non pas sur la régulation transcriptionnelle, mais sur les disponibilités en substrat et en activateur.

→ Dans le tubercule, la quantité de peptide correspondant à chacune des sous-unités varie parallèlement à celle du transcrit. Elle augmente au cours du développement du tubercule et l'activité enzymatique devient de plus en plus importante. Ceci a également été vérifié pour les grains de riz et de blé (Anderson *et al.*, 1991 ; Reeves *et al.*, 1986 ; Ainsworth *et al.*, 1993). Reeves et coll. (1986) ont déterminé que le taux d'ARN messager codant chacune des sous-unités de l'ADP-Glc PPase est à 1 % de son maximum 4 jours après la floraison. Il augmente jusqu'au 14^{ème} jour pour diminuer après 18 jours. Parallèlement, l'enzyme atteint son maximum d'activité entre le 14 et 18^{ème} jour, puis est spécifiquement dégradée. Donc, dans les tissus de réserve, l'activité de l'ADP-Glc PPase est sous contrôle transcriptionnel.

D'ailleurs, les organes de réserve de l'orge (Kleczkowski *et al.*, 1993), du blé (Olive *et al.*, 1989) et du pois (Hylton & Smith, 1992) expriment des formes spécifiques de l'ADP-Glc PPase qui répondent faiblement aux effecteurs allostériques.

Chez le maïs

Les conclusions des travaux de Prioul et coll. (1994) sur les variations d'expression de l'ADP-Glc PPase vont globalement dans le sens des observations de Nakata et Okita (1995), à savoir que :

→ Les variations dans les taux d'ARN messagers correspondant à chacune des sous-unités (*Sh2*, *Bt2*) anticipent celles des peptides correspondant, ce qui suggère un contrôle transcriptionnel de l'expression de l'ADP-Glc PPase dans le grain de maïs.

→ Comme chez la pomme de terre, il existe une régulation de la quantité de protéines plus importante dans les tissus de réserve que dans les feuilles. Alors que dans les feuilles, la quantité de peptides passe du simple au double entre le premier et le 20^{ème} jour après la pollinisation, elle est susceptible d'être multipliée par 100 dans l'albumen (Prioul *et al.*, 1994).

→ Les modifications des taux de peptides correspondant à chacune des sous-unités sont simultanées. Contrairement à la situation décrite chez la pomme de terre, les quantités d'ARNm correspondant à la grande sous-unité varient de manière uniforme avec celles de la petite sous-unité.

La spécificité tissulaire du contrôle de l'activité ADP-Glc PPase est en corrélation avec les données biochimiques décrivant les propriétés de l'ADP-Glc PPase. En effet, les organes de réserve de l'orge (Kleczkowski *et al.*, 1993), du blé (Olive *et al.*, 1989) et du pois (Hylton & Smith, 1992) expriment des formes particulières de l'ADP-Glc PPase qui répondent faiblement aux effecteurs allostériques. Signalons d'autre part que les concentrations en métabolites - en particulier en 3PGA et en Pi, effecteurs de l'ADP-Glc PPase - sont susceptibles de varier de manière moins prononcée dans l'amyloplaste que dans le chloroplaste. L'amyloplaste importe principalement des hexoses phosphate directement utilisables par l'ADP-Glc PPase plutôt que des trioses phosphate (Tyson & apRees, 1988). Ceci explique les différences observées entre les ADP-Glc PPases isolées des tissus photosynthétiques et des tissus de réserve.

7.3 - Le contrôle de l'expression des enzymes de la voie de synthèse de l'amidon autres que l'ADP-glucose pyrophosphorylase

Alors que les données sur le contrôle de l'expression de l'ADP-Glc PPase sont assez nombreuses, celles qui concernent les amidon synthétases et enzymes de branchement sont plus rares. Cependant de plus en plus d'auteurs s'intéressent à l'expression différentielle des isoformes

de ces enzymes, expression qui pourrait jouer un rôle fondamental dans le contrôle de la structure de l'amidon synthétisé.

7.3.1 - La coordination de l'expression des gènes *Bt2*, *Sh2* et *Wx1* chez le maïs

Au cours du développement du grain de maïs, l'activité des enzymes impliquées dans la mise en réserve des produits carbonés augmente. Cette adaptation semble due à une stimulation de l'expression des gènes correspondants. Dans l'albumen de maïs, des concentrations élevées en sucre sont supposées provoquer l'augmentation de l'expression des gènes de la voie de synthèse de l'amidon. Dans la racine de maïs, l'expression des deux formes de la saccharose synthétase (*Sh1* et *Sus1*) est reconnue comme étant modulée par la concentration en sucres (Koch *et al.*, 1992).

Giroux et coll. (1994) ont entamé des travaux afin de déterminer s'il existe une coordination de l'expression des gènes de la voie de synthèse de l'amidon dans des souches défectueuses pour l'une des activités. Des études ont montré que la mutation de l'une des deux sous-unité de l'ADP-Glc PPase provoque la surproduction des ARNm codant l'autre sous-unité (Bae *et al.*, 1990). Les mutations *sh2*, *bt2*, *bt1* provoquent une chute de la synthèse d'amidon, corrélée à une augmentation de la concentration en sucres solubles. L'expression de *Bt2*, *Sh2*, *Wx1* est fortement augmentée lorsque la synthèse d'amidon est bloquée (par exemple chez une souche porteuse de la mutation *bt1*). Dans ce contexte, la hausse de la concentration en sucres solubles constituerait le signal nécessaire à l'expression. En règle générale, le saccharose inhibe l'expression des gènes impliqués dans sa synthèse et active celle des gènes impliqués dans la synthèse de l'amidon. L'effet du saccharose sur l'expression de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase chez la pomme de terre avait été décrit en 1990 par Müller-Röber et coll. Cet effet ne concerne pas exclusivement l'expression des gènes codant l'ADP-Glc PPase ; il s'agirait d'un mécanisme plus général.

7.3.2 - L'expression des différentes isoformes de l'enzyme de branchement (BE)

Au cours du développement de l'embryon de pois, les gènes codant les deux formes de l'enzyme de branchement présentent un profil d'expression différent (Burton *et al.*, 1995). En effet, la forme I (SBEI) est active plus tôt que la forme II (Bhattacharyya *et al.*, 1990), grâce à l'expression précoce de son gène de structure. Par contre, chez le riz, aucune différence n'a été

notée dans l'expression des deux formes (Mizuno *et al.*, 1993). Au cours du développement de l'embryon, l'augmentation de l'expression de la forme II s'accompagne de modifications de la structure de l'amylopectine : ceci suggère que les deux enzymes de branchement possèdent bien des rôles différents. Cette spécificité d'action avait par ailleurs été observée, *in vitro*, pour les enzymes purifiées de l'albumen de maïs (Takeda *et al.*, 1993). La longueur des chaînes branchées de l'amylopectine augmente avec l'âge de l'embryon. Dans ce cas, les variations de structure de l'amidon sont donc dues à un contrôle transcriptionnel de l'expression des différentes isoformes. Il existerait donc un contrôle de la quantité et de la structure de l'amidon. Le même type de régulation transcriptionnelle affecte les GBSSI et II dans l'embryon de pois (Dry *et al.*, 1992). La contribution des différentes isoformes d'enzymes de branchement ou d'amidon synthétases n'est pas uniforme au cours de la construction des grains d'amidon.

8 - LE MODELE D'ETUDE : *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

L'étude du métabolisme de l'amidon s'est focalisée en particulier sur les céréales (telles que le maïs) ou plus récemment sur la pomme de terre. Cependant, les végétaux supérieurs présentent de nombreux inconvénients qui rendent la recherche longue et peu aisée. En effet, le temps de croissance jusqu'au stade d'accumulation de l'amidon requiert plusieurs semaines, voire plusieurs mois. De plus, une infrastructure très complexe est nécessaire au développement de ces plantes. Ceci limite le nombre de cultivars étudiés simultanément. D'autre part, la polyploidie des tissus complique fortement, voire rend quasi impossible, la sélection et l'observation de l'impact physiologique des mutations. Enfin, une totale défectuosité des organes de réserve pour la synthèse d'amidon empêche la reproduction de la plante.

Pour ces principales raisons, notre laboratoire a développé un modèle d'étude simplifié : l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

8.1 - Présentation générale de l'algue

Comparé aux autres algues, le genre *Chlamydomonas* est très répandu. On le trouve dans tous types de biotope (eau douce, eau de mer, lacs salés ; climats chauds, tempérés ou froids). Plusieurs centaines d'espèces ont été répertoriées. Les trois espèces les plus utilisées en laboratoire sont *C. reinhardtii*, *C. eugametos* et *C. moewussi*. L'incapacité des deux dernières à croître en hétérotrophie ainsi que l'étendue des données génétiques disponibles sur *C. reinhardtii* ont fait de cette dernière le modèle de choix, en particulier pour l'étude de la photosynthèse et du métabolisme carboné.

C. reinhardtii est une algue verte vivant en eau douce ou à la surface des sols. Elle se présente sous forme ovoïde et mesure de 10 à 15 µm de long pendant la phase exponentielle de croissance. Son temps de génération est court ; en lumière continue et dans des conditions de cultures optimales, l'algue se divise en 8 heures. Elle possède un double flagelle apical qui lui permet de se déplacer et qui intervient dans la reconnaissance lors de la reproduction sexuée (**Figure 22**).

Le chloroplaste unique de *C. reinhardtii* peut occuper les deux-tiers du volume cellulaire. Il est le siège de la synthèse de l'amidon.

Les cellules peuvent croître aussi bien en milieu liquide qu'en milieu gélosé où elles perdent leurs flagelles. Cultivées sur boîte, elles formeront après quelques jours des colonies isolées.

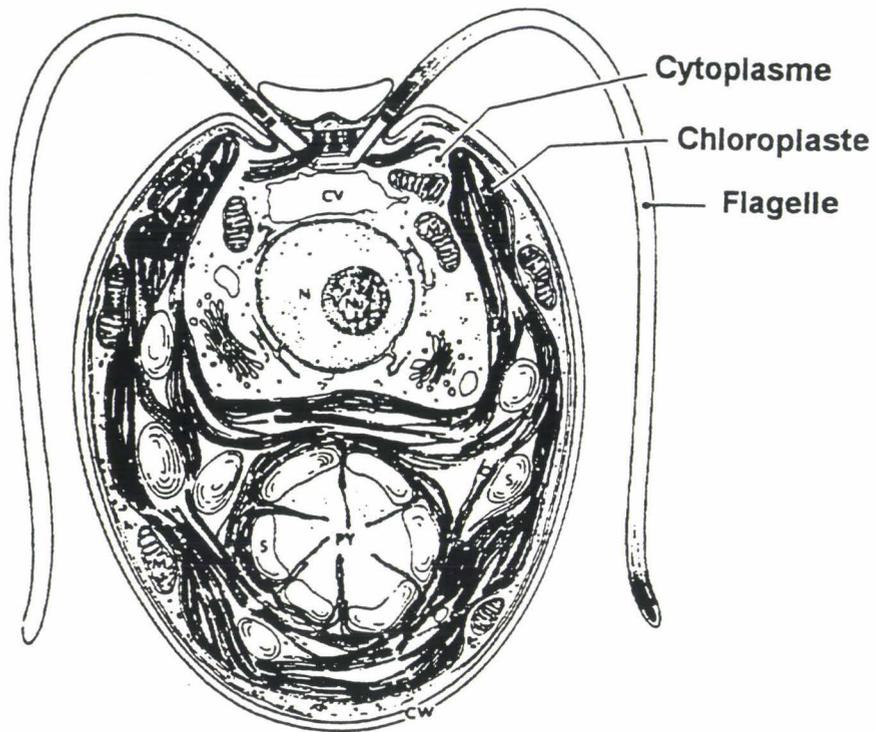


Figure 22 : Représentation schématique de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*

(cv : vacuole contractile / cw : paroi / n : noyau / py : pyrénioïde / s : amidon)

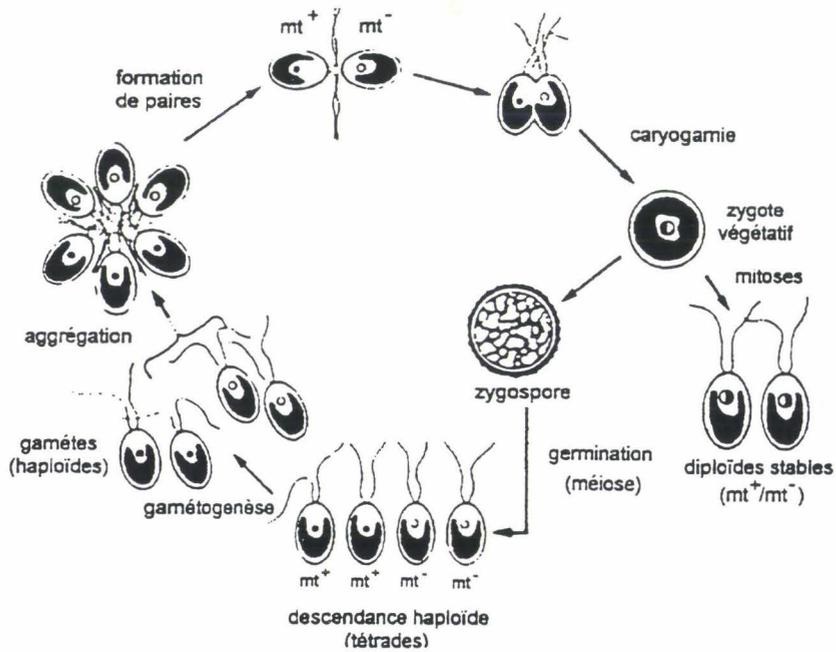


Figure 23 : Cycle de reproduction sexuée chez *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii se reproduit essentiellement par division asexuée. Toutefois, les cellules végétatives placées en milieu liquide carencé en azote minéral subissent la gamétogenèse pour devenir des isogamètes. La fusion de deux gamètes de polarités sexuelles opposées conduit à la formation d'un zygote diploïde, forme transitoire qui est susceptible d'évoluer de deux manières différentes. La majorité d'entre eux s'enkystent dans l'agar. Le zygote diploïde mature, contenant un noyau et un chloroplaste unique, peut subir la méiose pour libérer quatre spores haploïdes (les ségrégeants méiotiques). Les zygotes diploïdes (environ 5 %) se divisent par mitose et forment des colonies de cellules végétatives diploïdes stables. On peut les sélectionner grâce à la complémentation de caractères trophiques (Ebersold, 1967). Comme nous le verrons dans ce travail, la possibilité d'obtenir des cellules diploïdes végétatives présente un atout majeur pour l'étude génétique des phénomènes de complémentation. Signalons en outre que ces diploïdes végétatifs sont sexués (*mf*) et peuvent subir la gamétogenèse pour fusionner avec des gamètes haploïdes *mt*⁺. Les cellules triploïdes ainsi obtenues peuvent à leur tour faire l'objet d'une analyse génétique.

Enfin, des zygotes végétatifs peuvent se diviser avant la fusion des noyaux. Les cytoductants ainsi formés contiennent le noyau de l'un ou l'autre des parents dans un cytoplasme commun (Matagne *et al.*, 1991).

Le cycle général de reproduction de *C. reinhardtii* est schématisé dans la **figure 23**.

8.2 - Le métabolisme carboné

Contrairement au végétaux supérieurs, *C. reinhardtii* ne métabolise pas le carbone sous forme de saccharose (Klein, 1987). Le carbone fixé lors de la photosynthèse est, soit utilisé directement sous forme de trioses phosphate pour subvenir aux besoins métaboliques, soit mis en réserve sous forme d'amidon. En conditions de carence nutritive, la division cellulaire s'arrête ; la quasi totalité du flux carboné est alors orienté vers la synthèse d'amidon.

8.2.1 - *La fixation du CO₂*

L'ATP et le NADPH, produits de la photosynthèse, sont utilisés pour la conversion du CO₂ atmosphérique en composés organiques lors de la photosynthèse (ou cycle de Calvin) (Ogren *et al.*, 1984). Le processus de fixation du CO₂ mis en évidence chez *Chlamydomonas* est tout à fait similaire à celui décrit chez les plantes en C3 (cf chapitre 3). La RUBISCO, première

enzyme de cette voie, a particulièrement été étudiée chez l'algue. Ces études ont contribué à élucider le processus moléculaire par lequel la protéine effectue la carboxylation et l'oxygénation.

Des cellules de *Chlamydomonas* soumises à un cycle jour/nuit ne fixent pas le CO₂ de manière uniforme au cours du temps. La fixation se produit pendant la période d'exposition à la lumière puis chute à l'obscurité.

8.2.2 - La photorespiration

Dans des conditions où l'oxygène atteint des concentrations inhibitrices, la RUBISCO devient une oxygénase et transforme le Rbu-1,5-P₂ pour aboutir à une molécule de phosphoglycérate et une molécule de phosphoglycolate (pour revue : Ogren, 1984). Après déphosphorylation et oxydation, le phosphoglycolate prend, soit la voie du métabolisme des acides aminés, soit celle de la décarboxylation.

Dans les plantes en C₃, la perte de CO₂ par la photorespiration se produit également en présence de fortes concentrations en CO₂ atmosphérique. Le rapport de la quantité de CO₂ fixé par photosynthèse à la quantité de CO₂ libérée par photorespiration est plus faible chez *Chlamydomonas* que chez les plantes supérieures, ceci grâce au processus de concentration du carbone existant chez l'algue.

8.2.3 - La glycolyse

Nous avons déjà décrit en détails la glycolyse dans le chapitre 3. Rappelons uniquement que chez les végétaux supérieurs, la glycolyse est un processus presque exclusivement cytosolique tandis que chez *C. reinhardtii*, elle se déroule dans différents compartiments. Les premières étapes allant du glucose au glycéraldéhyde-3-phosphate, sont chloroplastiques (Klein, 1986 ; **Figure 17, page 66**).

8.2.4 - La synthèse et la dégradation de l'amidon

Toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon sont codées par des gènes nucléaires (Ball *et al.*, 1990). Pourtant, la synthèse et la dégradation sont exclusivement chloroplastiques (Klein, 1987), ce qui suppose un transport des protéines impliquées. Pendant le cycle cellulaire, la quantité d'amidon accumulé par *C. reinhardtii* varie considérablement (Klein, 1987). Au milieu de la période d'exposition à la lumière, la quantité de polysaccharide, chute indépendamment de la capacité de fixation du CO₂ ou de la capacité de synthèse : ces

dernières restent en effet constantes pendant toute cette période (**Figure 18**). La diminution de la quantité d'amidon accumulé est donc due à sa dégradation. Il se produit un recyclage qui a d'ailleurs été observé dans les chloroplastes de feuille d'épinard (Stitt & Heldt, 1981) et les feuilles de pois (Kruger *et al.*, 1983).

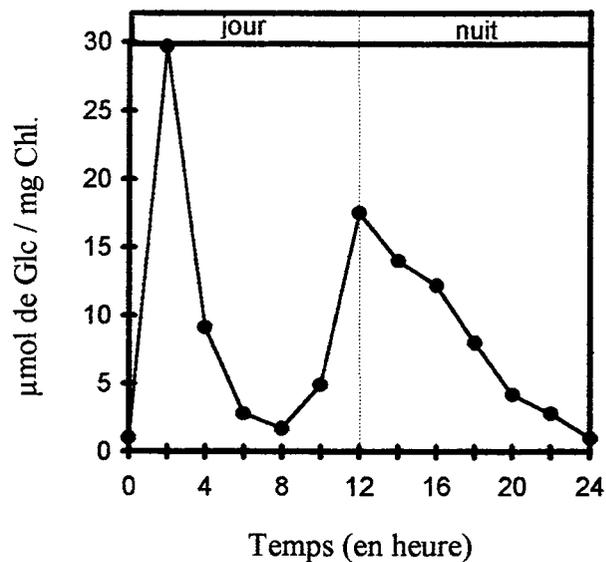


Figure 18 : Variations des quantités d'amidon accumulées par *Chlamydomonas reinhardtii* au cours d'un cycle de 24 heures (Klein, 1987)

Au cours de la 16^{ème} heure d'une photopériode 12:12, les activités de l' α -amylase et de la phosphorylase augmentent fortement (Levi & Gibbs, 1984). L'amidon est dégradé pendant la phase non éclairée du cycle.

Les mécanismes de contrôle de la dégradation restent inconnus, aussi bien chez l'algue que chez les végétaux supérieurs.

8.3 - La validité du modèle

Les études structurales menées au laboratoire ont permis de montrer une parfaite homologie entre la structure de l'amidon synthétisé par *C. reinhardtii* et celle de l'amidon accumulé dans l'albumen de maïs. D'autre part, toutes les enzymes impliquées dans la synthèse et dans la dégradation de l'amidon chez les végétaux supérieurs sont retrouvées chez l'algue

(Ball *et al.*, 1990). Toutefois, le nombre restreint d'isoformes chez *C. reinhardtii* facilite la compréhension du rôle de ces enzymes ainsi que la nature des interactions qui peuvent les unir.

Chez *C. reinhardtii*, les phénomènes de régulation de mise en réserve de l'amidon sont différents de ceux connus chez les plantes supérieures, en particulier du fait de l'absence de saccharose dans le métabolisme carboné. Néanmoins, les modalités de construction du grain d'amidon semblent tout à fait similaires : plusieurs types d'enzymes de branchement et d'amidon synthétases ont été caractérisées, la diversité des enzymes de dégradation est de même ordre. D'autre part, les souches mutantes de l'algue présentent des phénotypes comparables à ceux des mêmes mutants obtenus chez les plantes supérieures. C'est le cas par exemple des souches de *C. reinhardtii* défectueuses pour l'activité amidon synthétase liée au grain ou pour l'amidon synthétase soluble de type II, qui ont leurs équivalents dans l'albumen de maïs (Delrue *et al.*, 1992 ; Fontaine *et al.*, 1993). De même, la synthèse d'ADP-glucose, l'étape limitante de la synthèse de l'amidon, subit un contrôle identique à celui qui existe chez les végétaux supérieurs et les cyanobactéries (pour revue : Preiss, 1991).

Une liste de mutations caractérisées au laboratoire est reprise dans le **tableau 6**.

Le rôle de l'amidon chez *C. reinhardtii* est bien entendu la mise en réserve du carbone. Contrairement au glycogène des bactéries ou des levures, l'amidon est accumulé pendant la phase active de croissance et non pendant la phase stationnaire. D'autre part, il ne semble pas indispensable à la survie des cellules. En effet, des souches totalement déficientes pour la synthèse et dont le développement semble normal ont été isolées au laboratoire.

8. 4 - Les atouts de *C. reinhardtii*

L'accumulation d'amidon peut se faire aussi bien à la lumière (en photoautotrophie ou en mixotrophie) qu'à l'obscurité en présence d'acétate (hétérotrophie). Ces propriétés permettent de modéliser aussi bien les feuilles que les organes de réserve des végétaux supérieurs. Les cellules placées à l'obscurité dégradent l'amidon préalablement accumulé. L'obtention de mutants dans ces processus autorise une étude qui serait impossible chez les végétaux supérieurs.

Puisque les cellules peuvent être synchronisées par alternance jour/nuit, il est possible d'étudier l'évolution du métabolisme de l'amidon au cours du cycle cellulaire.

Génotype	Nom de la souche	Phénotype iode	Structure et Quantité d'amidon	Enzyme affectée	Référence
<i>sta1-1</i> <i>sta1-2::ARG7</i>	I7 BAF J3	jaune	5% d'amidon ne contenant pas d'amylose	ADP-Glc PPase	Ball <i>et al.</i> , 1990
<i>sta2-1</i> <i>sta2-2::ARG7</i>	18B BAF R1	rouge	Quantité normale d'amidon dépourvu d'amylose	GBSS	Delrue <i>et al.</i> , 1992
<i>sta3-1</i> <i>sta3-2</i> <i>sta3-3</i>	I152 I154 I39	vert	Diminution de 60 % Amylopectine dépourvu de chaînes de taille intermédiaires	SSS II	Fontaine <i>et al.</i> , 1993
<i>sta4-1</i> <i>sta4-2</i>	I73 I97	vert	Accumulation de 60% d'amidon. Enrichissement en amylose, modification de l'amylopectine	fonction nécessaire à la synthèse d'amidon de réserve	Libessart <i>et al.</i> , 1995
<i>sta5</i>	GST	jaune	5 à 20 % d'amidon selon l'allèle Diminution de l'amylose	PGM	--
<i>sta6-1::ARG7</i>	BAF J5	jaune	moins de 1% de la quantité d'amidon	ADP-Glc PPase	--
<i>sta7-1::ARG7</i>	BAF J6	jaune	présence d'un polysaccharide soluble	isoamylase ?	--
<i>sta80-1</i>	N52	noir	sur-accumulation d'amidon	?	--

Tableau 6 : Mutations qui affectent le métabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

L'amidon n'est pas indispensable à la survie de l'algue. Des souches totalement défectueuses pour la synthèse du polysaccharide, souches inaccessibles chez les végétaux supérieurs, facilitent d'autant l'étude du rôle exact des différentes enzymes.

En condition de carence nutritive, l'accumulation d'amidon est largement accrue. Au laboratoire, pour diverses raisons exposées ultérieurement, nous avons adopté la carence azotée. Elle conduit à l'accumulation de 40 à 60 μg d'amidon par million de cellules alors que les quantités mesurées sont de l'ordre de 1 μg par million de cellules en croissance active dans un milieu non carencé.

Ces conditions d'accumulation permettent en outre, de réaliser un criblage phénotypique des colonies directement sur boîte par coloration aux vapeurs d'iode. En effet, la carence azotée provoque, dans une certaine mesure, la dégradation des chlorophylles. Ceci rend possible la visualisation de l'interaction de l'amidon avec l'iode sans traitement préalable. Une simple exposition aux vapeurs d'iode des colonies cultivées sur boîte de Pétri permet de déceler des modifications intervenues dans la quantité ou la structure du polysaccharide. Le paragraphe consacré à cette interaction polysaccharide/iode (paragraphe 1.4.2 de l'introduction) décrit la relation entre la couleur du complexe et la structure de l'amidon (richesse relative en amylose, structure de l'amylopectine). La souche sauvage présente un phénotype bleu-nuit après traitement tandis qu'une souche défectueuse pour la synthèse d'amylose se colore en rouge. Un amidon enrichi en amylose présentera quant-à lui une couleur verte. Enfin, la coloration jaune caractérise une souche qui synthétise moins de 10 % de la quantité accumulée par la souche sauvage. Malgré les restrictions qu'il faut apporter à une description aussi simple des phénotypes, ces propriétés permettent le criblage rapide d'un nombre important de colonies. Elles nous ont permis de sélectionner une grande variété de souches mutantes. Notons que le fait que *C. reinhardtii* se développe essentiellement sous forme haploïde facilite d'autant ce criblage.

L'analyse de tétrades et l'accessibilité sélective de ses génomes nucléaire ou chloroplastique à la transformation sont autant d'atouts supplémentaires en faveur de notre modèle.

Les nombreux avantages offerts tant par les caractéristiques physiologiques de l'algue que par sa facilité de culture, ajoutés au fait que son métabolisme et la structure de son polysaccharide de réserve sont comparables à ceux des végétaux supérieurs, font de *C. reinhardtii* le modèle de choix pour l'étude à la fois de la synthèse et de la dégradation de l'amidon.

II - MATERIEL ET METHODES

1 - LES SOUCHES UTILISEES

Les souches mutantes obtenues par mutagenèse RX ou UV proviennent de la souche sauvage 137C tandis que celles issues de la transformation dérivent de la souche 330.

Le génotype des souches utilisées au cours de ce travail est le suivant:

SOUCHES	GENOTYPE	ORIGINE
<u>Souches haploïdes</u>		
137C	<i>mf nit1 nit2</i>	Loppes
37	<i>mt⁺ pab2 ac14</i>	Loppes
A35	<i>mf nit1 nit2</i>	ce travail
330	<i>mt⁺ nit1 nit2 cw15 arg7-7</i>	Loppes
I7	<i>mf nit1 nit2 sta1-1</i>	Ball et al., 1991
NV314	<i>mf pab2 sta1-1</i>	ce travail
18B	<i>mf nit1 nit2 sta2-1</i>	Delrue et al, 1992
A	<i>mt- nit1 nit2 sta2-1 sta80-1</i>	ce travail
N52	<i>mf nit1 nit2 sta80-1</i>	ce travail
GST 3-43	<i>mf nit1 nit2 sta5-1</i>	Wollmann
BAF J3	<i>mt⁺ nit-1nit-2 cw15 arg7-7 sta1-2::ARG7</i>	Bellanger, 1994
BAF J5	<i>mt⁺ nit-1nit-2 cw15 arg7-7 sta6-1::ARG7</i>	Bellanger, 1994
<u>Souches diploïdes</u>		
2n-wt	<i>A35 x 330</i>	ce travail
ZC1	<i>BAF J3 x A35</i>	ce travail
PY1	<i>BAF J3 x NV 314</i>	ce travail
DP1	<i>BAF J3 x BAF J5</i>	ce travail

mt⁺/mf : "mating type" ou type de conjugaison, allèle sauvage présent au locus de polarité sexuelle déterminent le type conjuguant de la cellule. Une souche *mt⁺* est insensible à la tunicamycine, elle transmet son génome chloroplastique à la descendance méiotique tandis qu'une souche *mf*, résistante à la tunicamycine, transmet son génome mitochondrial.

Le locus *mt* appartient au groupe de liaison VI .

ac-14: mutation nucléaire dans la voie de photosynthèse qui entraîne une auxotrophie pour l'acétate.

Ce locus appartient au groupe de liaison I

pab-2: mutation nucléaire qui entraîne une auxotrophie pour l'acide p-amino benzoïque (PAB).
le locus *pab-2* se situe à environ 14 centimorgans du locus *ac-14*, dans le groupe de liaison I.

nit-1: mutation nucléaire spontanée conduisant à une déficience en diaphorase et en activité terminale de la nitrate réductase. Les souches portant la mutation *nit-1* sont incapables de croître avec le nitrate comme seule source d'azote.

Groupe de liaison IX

nit-2: mutation nucléaire spontanée empêchant la souche de croître en présence de nitrate comme seule source d'azote.

Groupe de liaison III

cw15: mutation nucléaire se traduisant par une absence de paroi.

Groupe de liaison inconnu

arg7-7: mutation du gène nucléaire codant l'argino-succinate lyase (ASL), dernière étape de la synthèse de l'arginine transformant l'arginosuccinate en arginine et fumarate.

Groupe de liaison I

sta x: mutation affectant la voie de synthèse de l'amidon. Les loci identifiés chez *C. reinhardtii* sont énumérés dans l'introduction (tableau 6)

2 - LES MILIEUX DE CULTURE

2.1 - Les milieux liquides

Leur composition est décrite par Gorman et Levine (1965). Trois milieux sont principalement utilisés au laboratoire: le milieu Tris minimum Acétate Phosphate (TAP), le milieu TAP-N et enfin le milieu Tris minimum Phosphate (TP).

Le milieu TAP constitue le milieu de base pour les cultures courantes. Il contient une source carbonée assimilable par *Chlamydomonas* : l'acétate. Ce milieu permet la croissance en mixotrophie ou hétérotrophie selon l'exposition ou non à la lumière. Le milieu TAP-N contient une quantité limitante d'azote présente sous forme de chlorure d'ammonium. Il est utilisé pour les études de la synthèse d'amidon en conditions de carence, conditions dans lesquelles les cellules accumulent jusqu'à 20 fois plus de polysaccharide. Le milieu TP permet l'étude en autotrophie, c'est à dire sans source de carbone autre que le CO₂ atmosphérique et à la lumière. De l'acide p-amino benzoïque ou de l'arginine peuvent compléter chacun de ces milieux.

Milieu	Composition pour 1 litre de milieu
TAP	NH ₄ Cl 0,4 g / MgSO ₄ .7H ₂ O 0,3 g / CaCl ₂ .2H ₂ O 0,05 g / KH ₂ PO ₄ 0,32 g / K ₂ HPO ₄ 1,47 g / Tris 2,4 g; 1 ml de la solution d'oligo-éléments. Le pH est ajusté à 7 par l'acide acétique.
TAP-N	Composition identique au TAP sauf pour NH ₄ Cl: 8 mg au lieu de 400 mg
TP	Préparation identique au TAP, exception faite du pH, ajusté à 7 par l'acide chlorhydrique.

Solution d'oligo-éléments: composition pour 1 litre de solution

EDTA 50 g / H₃BO₃ 11,4 g / ZnSO₄.7H₂O 22 g / MnCl₂.4H₂O 5,1 g / FeSO₄.7H₂O 4,2 g / CoCl₂.6H₂O 1,6 g / CuSO₄.5H₂O 1,6 g / MoO₃ 1,8 g. Un ml de cette solution est ajouté à 1 litre de milieu de culture qu'il soit liquide ou solide.

2.2 - Les milieux solides

Les milieux gélosés renferment 12,5 ou 10 g d'agar par litre selon que les cellules possèdent ou non une paroi. Un milieu à 40 p.100 est utilisé pour les analyses méiotiques; il permet aux zygospores générées par la fusion cellulaire de s'enkyster. Tous les milieux sont préparés à partir du milieu dit minimum, qui est complété en fonction des auxotrophies et des critères sélectifs étudiés.

Milieu	Composition pour 1 litre de milieu
Min (HS)	<u>Milieu de base:</u> NH ₄ Cl 0,4 g / MgSO ₄ .7H ₂ O 0,3 g / CaCl ₂ .2H ₂ O 0,05 g / KH ₂ PO ₄ 0,18 g / K ₂ HPO ₄ 0,36 g / oligo-éléments 1 ml
Min + PAB (HSP)	Milieu minimum supplémenté en acide para-amio benzoïque (1 mg/l)
Min +acétate (HSA)	Milieu minimum supplémenté en acétate de sodium (1 g/l)
Ni Min	Milieu minimum supplémenté en nitrate (KNO ₃ 0,4 g/l)
Ni complet	Milieu minimum supplémenté en nitrate de potassium, acide p-amino benzoïque et acétate de sodium
Min-N	Milieu minimum sans azote dans lequel le chlorure d'ammonium a été remplacé par le chlorure de sodium
Riche	Milieu minimum auquel sont ajoutés 4 g d'extrait de levure

Comme les milieux liquides, les milieux solides peuvent recevoir de l'ampicilline à raison de 50 mg par litre et de l'arginine à raison de 100 µg par litre. Les solutions d'antibiotique ainsi que d'arginine stérilisées par filtration sont ajoutées à froid dans le milieu préalablement autoclavé 20 minutes à 120°C.

3 - LA PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES

Les cellules sont conservées sur milieu gélosé complet, elles sont repiquées environ toutes les 8 semaines. Avant d'entreprendre une culture en milieu liquide, il est nécessaire de réaliser une préculture en petit volume qui permet l'adaptation au changement de conditions de culture ainsi que la prolifération des cellules vivantes. Les conditions de cultures classiques sont les suivantes:

- lumière vive (2000 à 4000 lux) continue
- agitation moyenne (120 rpm, excentrique de 3 cm)
- 20 à 25°C

La densité cellulaire est estimée par comptage au détecteur de particules (compteur-coulter) et l'état physiologique des cultures est apprécié par observation au microscope optique (grossissement x 1000). La densité d'inoculation dépend des conditions de culture qui seront employées (**Tableau 12**).

3.1 - Préparation d'extraits bruts pour le dosage d'activités enzymatiques

Les cellules cultivées en milieu TAP ou TAP + arginine sont récoltées lorsque la culture atteint une densité cellulaire d'environ $2 \cdot 10^6$ cellules par ml, densité qui correspond à la fin de phase exponentielle de croissance. Les cultures sont centrifugées à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots cellulaires lavés à l'eau, sont resuspendus de manière à obtenir environ 10^8 cellules par ml. La suspension cellulaire est passée à la presse de French (pression de 18 000 psi). Les plus gros débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10 000 g, 15 min à 4°C. Le surnageant est utilisé tel quel pour le dosage des activités enzymatiques ou pour les zymogrammes (visualisation de l'activité des enzymes après séparation électrophorétique sur gel natif).

3.2 - Préparation de l'amidon

Les cellules cultivées dans nos conditions (**Tableau 12**) sont récoltées et traitées comme dans le cas de la préparation d'extraits cellulaires. Le broyât cellulaire est centrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes. Le culot contenant les plus gros débris cellulaires ainsi que l'amidon est resuspendu dans 9 volumes de Percoll (Pharmacia) et centrifugé 30 minutes à 10 000 g. Pendant

cette centrifugation, le gradient de densité qui se forme permet à l'amidon de culotter alors que les protéines forment une galette dans la partie supérieure du tube. Le culot est resuspendu dans l'eau et lavé à trois reprises. L'amidon ainsi obtenu est partiellement purifié, il est débarrassé de la plupart des protéines. Un traitement à l'éthanol pourra, quand cela est nécessaire, délipider le polysaccharide.

Chacune de ces étapes de purification s'accompagne de légères pertes qui peuvent devenir significatives dans le cas du dosage pour les souches produisant très peu d'amidon. Il est possible de réaliser une extraction sans étapes de purification qui permet uniquement d'évaluer la quantité d'amidon mais en aucun cas sa structure. Cette extraction consiste à ajouter trois volumes d'éthanol à un volume de suspension cellulaire, de centrifuger à 3 000 g pendant 15 minutes et ensuite de laisser sécher le culot. Le culot resuspendu dans de l'eau est solubilisé par dix minutes d'ébullition, un dosage des α -glucanes peut alors être réalisé.

3.3 - Analyses cytologiques

Les cellules destinées à être observées au microscope électronique sont préparées suivant la méthode décrite par Harris (1989).

Conditions de culture	Quantité de cellules inoculées	Densité cellulaire lors de la récolte
mixotrophie (Acétate ; lumière)	5.10^4	2.10^6
autotrophie (lumière)	2.10^5	2.10^6
hétérotrophie (Acétate ; obscurité)	5.10^4	2.10^6
mixotrophie et carence azotée	5.10^5	1.10^6

Tableau 12 : Densités cellulaires en début et en fin de culture selon le milieu employé.
L'obtention d'une préculture nécessite 4 jours tandis les cultures sont menées pendant 2 à 5 jours selon le cas.

4 - LA MUTAGENESE

4.1 - Mutagenèse par insertion d'ADN exogène

La technique employée est décrite par Kindle et coll. (1989). Elle consiste à faire entrer de l'ADN exogène dans une cellule sans paroi. Cet ADN s'intègre de manière aléatoire dans le génome nucléaire, par recombinaison non homologue, pour créer des délétions, des interruptions de gènes, réparties de manière aléatoires. L'ADN exogène employé porte la séquence codant l'argino-succinate lyase (ASL), enzyme de la voie de synthèse de l'arginine. Le gène de l'ASL est interrompu dans la souche 330 employée pour la transformation. Les transformants sont donc sélectionnés pour leur capacité à croître sur un milieu dépourvu d'arginine. Le protocole utilisé au laboratoire est décrit avec précision par Bellanger (1994).

4.2 - Mutagenèse par exposition aux rayons UV ou aux rayons X

La mutagenèse aux RX est décrite par Ball et coll. (1991). Elle consiste à exposer pendant quelque secondes un tapis cellulaire aux rayons X (2,58 C.Rg⁻¹).

La mutagenèse aux UV se fait selon le même principe. Des boîtes couvertes d'un tapis cellulaire sont exposées pendant 10 à 45 secondes aux rayonnements UV (255 nm; 7 mW/cm²).

Dans les deux cas, après exposition aux rayonnements, les boîtes sont placées à l'obscurité pendant une nuit afin de minimiser les processus de réparation de l'ADN. Le criblage se fait en exposant les clones cultivés sur un milieu carencé en azote à des vapeurs d'iode.

5 - LES ANALYSES GENETIQUES

5.1 - Croisements

Des cellules issues de cultures récentes sont concentrées puis mises en suspension dans un milieu carencé en azote. La gamétogénèse est alors induite en plaçant ces suspensions sous lumière vive continue (4 000 lux) sans agitation. Après 3 à 5 heures, des gamètes apparaissent. Des suspensions de gamètes de polarités sexuelles opposées sont mélangées. Une heure plus tard, la fusion cellulaire commence, son évolution peut être observée au microscope optique.

Les croisements s'effectuent en règle générale entre une souche porteuse des mutations *nit1 nit2* et une souche porteuse des mutations *pab2 ac14*. La ségrégation de ces marqueurs permet de contrôler le bon déroulement du croisement.

5.2 - Etude des souches diploïdes

Lors d'un croisement, environ 5 % des cellules fusionnées subsistent sous forme de diploïdes végétatifs. Ils sont sélectionnés sur milieu nitrate minimum par complémentarité des génotypes parentaux (*pab2, ac14 / nit1, nit2*). La construction de souches diploïdes permet l'étude de dominance ou récessivité des mutations ainsi la détermination des groupes de complémentarité.

5.3 - Analyse des descendants méiotiques

Après la fusion, les suspensions cellulaires sont déposées en gouttes sur un milieu riche contenant 4 p.100 d'agar. Les boîtes sont placées 24 heures en lumière atténuée (600 lux au lieu de 3 000). Elles passent ensuite 5 jours à l'obscurité, temps nécessaire à l'enkystement et la maturation des zygotes. Les zygotes sont ensuite récoltés en découpant des morceaux d'agar débarrassés des cellules végétatives qui restent en surface. La méiose est déclenchée par l'exposition à la lumière de ces blocs d'agar. Les cellules filles formeront des colonies par mitoses successives. L'analyse génétique pourra alors être entreprise selon deux techniques possibles : l'analyse de tétrades ou l'analyse au hasard plus fréquemment dite en "random". En effet, les zygotes ayant subi la méiose forment une tétrade qui peut être disséquée. Dans l'analyse au hasard, un ensemble de zygotes subissent ensemble la méiose et la germination. La détermination des génotypes se fera en moyennant les résultats.

5.4 - Fusion cellulaire

Dans les cas où le croisement n'est pas réalisable par la voie classique, il est possible d'utiliser la fusion cellulaire. Les diploïdes végétatifs obtenus sont incapables de germer, mais ils sont sexués (*mt*) : ils peuvent donc être croisés pour générer des souches triploïdes capables de donner des descendants méiotiques. Un protocole de fusion utilisant le PEG (polyéthylène glycol) est décrit ci-contre.

5.4.1 - *Préparation de l'autolysine*

Avant d'entamer la fusion proprement dite, il est nécessaire de traiter les cellules possédant une paroi par l'autolysine. Cette enzyme est produite lors du processus de croisement de deux souches. Elle intervient dans la déstabilisation des parois au point de fusion des gamètes. Il suffit donc d'initier un croisement entre deux souches (sauvages par exemple), afin de récolter cette enzyme qui, au cours du processus de fusion sera libérée dans le milieu (**Figure 26**).

5.4.2 - *Traitement lytique*

Les cellules fraîches sont mises en suspension dans l'extrait lytique brut, à raison de 5.10^6 /ml. La suspension cellulaire est placée 30 minutes à 34°C puis centrifugée. Le culot est à nouveau traité puis lavé dans du milieu de culture liquide (TAP). A ce stade, les cellules sont prêtes à fusionner.

Le rendement des cellules débarrassées de leur paroi peut être déterminé rapidement. Pour cela, 0,7 ml de cellules traitées à l'autolysine sont mélangées à 1,4 ml de triton X-100 à 0,1 %. Le mélange est agité au Vortex pendant 1 minute puis centrifugé brièvement à 12 000 g. Ensuite, des mesures de l'absorbance à 435 nm du surnageant de l'échantillon traité et non traité sont effectuées. Les 100 % de lyse sont définis en mesurant l'absorbance d'un échantillon de 1 ml de cellules soniquées traitées par 2 ml de triton.

5.4.3 - *Fusion au PEG*

La technique a été décrite par Matagne en 1979, elle est schématisée dans la **figure 26**.

La solution de fusion dont le pH est ajusté à 8 par la soude est stérilisée par filtration. Elle est composée de 85 mM de PEG 8 000 (Sigma), 20 mM de CaCl₂ et 20 mM de glycine.

PREPARATION DE L'AUTOLYSINE

Préparer des boîtes couvertes d'un tapis cellulaire, pour la souche mt+ et mt- (37 et 137C)



Récolter et laver les cellules dans du milieu minimum carencé en azote

Resuspendre les cellules à $5 \cdot 10^7$ cellules/ml



Maintenir les suspensions cellulaires 4 heures en chambre de culture sous agitation vive



Mélanger les cellules de polarités opposées, laisser incuber 15 minutes



Centrifuger 10 minutes à 4 000 g puis clarifier le surnageant à 27 000 g 20 minutes

Conserver le surnageant sous forme d'aliquots à -20°C

FUSION SOMATIQUE

Transférer $5 \cdot 10^7$ cellules de chacun des partenaires sur un milieu minimum

Mélanger à l'anse de platine



Ajouter 0.1 ml de la solution de fusion



Étaler des gouttes de ce mélange sur des boîtes de milieu minimum

Après 5 jours de culture, des diploïdes doivent apparaître

Figure 24 : Protocoles de préparation de l'autolysine et de fusion somatique au PEG

6 - ANALYSES BIOCHIMIQUES

6.1 - Purification de l'amidon synthétase liée au grain d'amidon

La protéine est extraite de l'amidon selon la technique décrite par Vos-Scheperkeuter et coll. (1986). Le tampon d'extraction utilisé contient 5 % de β -mercaptoéthanol et 2 % de SDS. L'extraction se fait sur 2 à 5 mg d'amidon purifié. Les produits d'extraction sont séparés par SDS-PAGE (gel de polyacrylamide à 7,5 %).

6.2 - Analyse de l'amidon

6.2.1 - Dosage

Après solubilisation dans l'eau à 100°C, l'amidon est dosé grâce au kit commercialisé par Boehringer Mannheim. Une amyloglucosidase libère les molécules de glucose de l'amidon; ce glucose est transformé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase qui subit ensuite une réduction par la glucose-6-phosphate deshydrogénase. La quantité de NADPH ainsi produite est estimée par spectrophotométrie à 365 nm.

6.2.2 - Spectrophotométrie à l'iode

L'amidon est solubilisé dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO-100%) ou dans l'acide chlorhydrique à 0,1 N pendant 1 minute à 100°C. Un spectre d'absorption de 400 et 700 nm est alors réalisé après addition de 400 μ l d'une solution d'iode (0,2 % KI; 0,02 % I₂) à 100 μ l d'amidon dissout.

6.2.3 - Chromatographie de gel filtration

Deux types de gel sont utilisés: le fractogel TSK HW75 (s) (Merck) ou la Sepharose CL2B (Pharmacia).

Chromatographie sur TSK HW75

Dix milligrammes d'amidon sont dissous par ébullition, 10 minutes, dans 500 μ l de DMSO pur. La solution diluée 10 fois avec de l'eau est déposée sur la colonne de fractogel TSK HW75 (180 cm x 1.8 cm). Le DMSO (10 %) est utilisé pour l'élution à un débit de 10 ml/h . Un spectre

d'absorption iode, de même qu'un dosage des sucres sont réalisés sur chacune des fractions de 2,5 ml.

Chromatographie sur Sepharose CL2B

Le domaine de fractionnement de ce gel est de 10^5 à 2.10^7 tandis que celui du fractogel TSK HW75 est de 8.10^4 à 10^7 . Comme précédemment, dix milligrammes d'amidon sont dissous dans le DMSO 100 % puis dilués dix fois. Aux 5 ml sont ajoutés 4 volumes d'éthanol, le mélange est incubé une nuit à température ambiante, ce qui permettra une précipitation correcte des polysaccharides. Il est ensuite centrifugé à 5 000 rpm pendant 15 minutes. Après séchage, le culot est resuspendu 5 ml dans la soude à 0,01 N. La solution est déposée sur une colonne Sepharose CL2B de 150 cm x 1,5 cm. L'élution par la soude 0,01 N est effectuée à un débit de 10 ml/h. Un spectre d'absorption iode ainsi qu'une estimation de la quantité de polysaccharides sont réalisés sur chacune des fractions de 3 ml.

Les fractions d'amylopectine ou d'amylose sont rassemblées et dialysées contre de l'eau puis lyophilisées en vue d'analyses ultérieures.

6.2.4 - Détermination de la taille des chaînes branchées de l'amylopectine

6.2.4.1 - Débranchement

Un débranchement par l'isoamylase (glycogène 6-gluconohydrolase) est effectué sur l'amylopectine purifié par chromatographie de gel filtration TSK HW75 ou Sepharose CL2B.

10 mg de polysaccharide dissous dans 0,2 ml de DMSO pur (à 100°C pendant 15 minutes) sont incubés 5 minutes à 45°C dans 1,8 ml de tampon acétate 55 mM, pH 3,5. Le polysaccharide est hydrolysé par ajout de 200 unités d'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* ATCC 21262 (Laboratoire Hayashibara). L'incubation se poursuit pendant environ 5 heures à 45°C. Le niveau de débranchement du glucane est suivi au cours du temps par un dosage au DNS (dinitrosalicylate), dosage qui permet de quantifier les sucres réducteurs donc le nombre de chaînes glucaniques libérées.

L'analyse des produits de débranchement se fera par deux techniques, l'une permettant le fractionnement des courtes chaînes glucaniques (dp inférieur à 30), la seconde permettant la séparation des chaînes plus longues (jusqu'à plus de 100 résidus).

6.2.4.2 - Séparation des petits polysaccharides

→ Par chromatographie d'échange d'anions

Ces expériences ont été réalisées au laboratoire en collaboration avec Nathalie Libessart.

Cette première chromatographie dans le système HPLC-Dionex équipé de la colonne CarboPac PA 100 (4 x 250 mm), se réalise à pH élevé. La détection des produits séparés se fait par ampérométrie pulsée.

Les échantillons seront préalablement dessalés par gel filtration sur fractogel TSK HW40 (S) (Merck). L'élution se fait à l'acide acétique 0,5 % à un débit de 1 ml/h. Les solutions dessalées sont concentrées par évaporation à 37°C.

500 mg d'échantillon sont injectés dans la colonne qui est éluée par de la soude 100 mM dans un gradient d'acétate de sodium 1 M de 5 à 35 %.

Les résultats obtenus par chromatographie peuvent être confirmés par spectrométrie de masse.

→ Par spectrométrie de masse

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec Yves Leroy.

Le système utilisé est le MALDI MS (Matrix-Associated Desorption/Ionization Mass Spectra pour spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser de la matrice) sur un appareil de spectrométrie à temps de vol, Vision 200 (Finnigan MAT. Bremen). La matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (10 mg/ml dans l'acétonitrile : H₂O 70 : 30). 1 µl d'échantillon à 1 à 5 µg/µl est mélangé à 1 µl de matrice et placé sur une cible métallique. La désorption/ionisation est initiée par un laser à azote pulsé émettant à 337 nm. Des pulses de 2 ns sont utilisés. Le résultat présenté est la somme de 20 spectres.

6.2.4.3 - Séparation des fragments de plus de 20 résidus de glucose

Pour la séparation des chaînes de plus de 20 résidus de glucose, une chromatographie sur colonne de fractogel TSK HW50 (1.5 x 55 cm) sera utilisée. L'élution se fait par du DMSO à 10 %, à un débit de 30 ml/h dans des fractions de 2 ml. Le degré de polymérisation des chaînes est déterminé par leur spécificité d'absorption en interaction avec l'iode. La quantification est réalisée par un dosage similaire à celui permettant le dosage de l'amidon (voir §6.1.1)

6.2.5 - Méthylation

La technique de méthylation de l'amidon et la séparation des éthers de méthyl par chromatographie en phase gaz sont décrits par Delrue et coll. (1992).

6.3 - Analyse des activités enzymatiques

6.3.1 - Dosage des activités en extrait brut

6.3.1.1 - L'amidon synthétase liée au grain

La technique de dosage utilisée est celle décrite par Delrue et coll. (1992). Elle est basée sur l'incorporation de [U-¹⁴C]-ADP-glucose sur une amorce de glycogène.

6.3.1.2 - La phosphoglucoisomérase (EC 1.3.1.9)

La phosphoglucoisomérase (PGI) transforme réversiblement le fructose-6-phosphate en glucose-6-phosphate. Le principe du dosage consiste à estimer la quantité de glucose-6-phosphate produit en oxydant celui-ci par la glucose-6-phosphate deshydrogénase; le NADPH formé est quantifié par spectrophotométrie à 365 nm.

Protocole : 50 à 100 µl d'extrait cellulaire sont incubés 15 minutes à 30°C dans le mélange réactionnel suivant: Tampon triéthanolamine-NaOH (pH 7,6) 83 mM; EDTA 0,9 mM; MgCl₂ 1,7 mM; Fru-6-P 10 mM. Le volume final est de 500 µl. La lecture de l'absorbance se fait à 365 nm après avoir additionné 3U de glucose-6-phosphate deshydrogénase.

6.3.1.3 - l'ADP-glucose pyrophosphorylase ou ADP-glucose synthétase

(ou ATP: α-glucose-1-phosphate-adényl-transférase : EC 2.7.7.27)

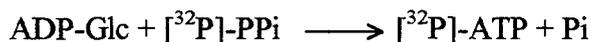
L'ADP-glucose pyrophosphorylase (ou ADP-Glc PPase) catalyse réversiblement la synthèse d'ADP-glucose et de pyrophosphate à partir d'ATP et de glucose-1-phosphate. L'activité de l'enzyme est dosable dans le sens de la pyrophosphorolyse de l'ADP-glucose ou dans le sens de la synthèse de l'ADP-glucose. En extrait brut, il est préférable d'étudier la réaction dans le sens de la dégradation car les activités parasites trop nombreuses viendraient fausser les résultats. Deux techniques de dosage sont utilisables: la première, spectrophotométrique, est basée sur l'apparition du glucose-1-phosphate qui est transformé en glucose-6-phosphate par la

phosphoglucomutase. Le glucose-6-phosphate est ensuite oxydé, le NADPH résultant de cette réaction est dosé. La seconde technique utilise le [³²P]-PPi : le [³²P]-ATP synthétisé est séparé du substrat, sa quantité est estimée par comptage au compteur à scintillation.

Dosage spectrophotométrique: 1 à 10 µl d'extrait cellulaire sont incubés 15 minutes à 30°C dans le mélange réactionnel qui suit (le volume final de la réaction est de 500 µl): glycylglycine-NaOH (pH 7,5) 80 mM; PPi 1 mM; MgCl₂ 60 mM; Glc-1,6-P₂ 0,05 mM; NADP 0,25 mM; NaF 10 mM; ADP-glucose 1 mM; 3PGA 1,5 mM. La réaction est arrêtée par ébullition, l'absorption est lue quelques minutes après avoir ajouté 3 unités de phosphoglucomutase et de glucose-6-phosphate deshydrogénase.

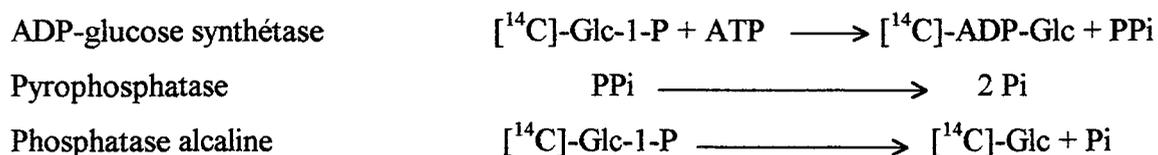
Dosage radioactif:

-Dans le sens de la pyrophosphorolyse:



La pyrophosphorolyse de l'ADP-glucose est suivit par la formation de [³²P]-ATP en présence de [³²P]-PPi. Le mélange réactionnel contient : du tampon Hepes-NaOH (pH 8,0) 80 mM, MgCl₂ 5 mM, NaF 1 mM, ADP-Glc 2,5 mM, [³²P]-PPi (~5.10⁶ cpm.µmol⁻¹) 1,5 mM, 50 µg de SAB, 3PGA 2 mM et de l'extrait cellulaire pour un volume final de 250 µl. La réaction débute lors de l'ajout du [³²P]-PPi. Après 10 minutes d'incubation à 37°C, elle est stoppée par addition de 3 ml de TCA froid à 5 % contenant 15 mg de Norit (lavé à l'acide) et 10 µmol de NaPPi. Le Norit, charbon actif, absorbe le [³²P]-ATP. Après 3 lavages du culot de Norit par le TCA à 5 %, le [³²P]-ATP est relargué par ébullition (10 minutes) dans l'acide chlorhydrique 1 N (1 ml). La radioactivité contenue dans le surnageant (0,5 ml) est ensuite mesurée.

- Dans le sens de la synthèse d'ADP-glucose:



La synthèse de [¹⁴C]-ADP-glucose se fait à partir du [¹⁴C]-glucose-1-phosphate. La pyrophosphatase permet de maintenir l'équilibre de la réaction dans le sens de la synthèse. Le mélange réactionnel contient du tampon Hepes-NaOH (pH 8,0) 100 mM, 50 µg de SAB, du MgCl₂ (5 mM), de l'ATP (1,75 mM), du [¹⁴C]-Glc-1-P (1.10⁶ cpm.µmol⁻¹ ; 0,5 mM) et 0,3 unité

de pyrophosphatase inorganique dans un volume final de 200 µl (du 3PGA (2,5 mM) est ajouté dans le cas d'un dosage en présence d'activateur). La réaction est initiée en ajoutant l'ADP-glucose pyrophosphorylase, l'incubation de 10 minutes à 37°C est stoppée par 30 secondes d'ébullition. Après une brève centrifugation, 20 µl de phosphatase alcaline d'*E. coli* (Sigma) diluée au 10^{ème} sont ajoutés à chaque tube, l'incubation se prolonge pendant encore 1 heure. 100 µl du contenu de chaque tube sont déposés sur des disques de papier DE-81 (Whatman). Ce papier ne retient que les molécules portant une substitution par le phosphate, dans notre cas uniquement le [¹⁴C]-ADP-glucose. Les disques sont partiellement séchés puis lavés à l'eau et à nouveau complètement séchés dans un four à 60°C. Ils sont ensuite comptés dans du BBOT-toluène (15 g de 2,5-bis-(5'-tert-butylbenzoyl [2'])thiophène (BBOT) pour 4 l de toluène).

6.3.2 - Analyses par zymogramme

L'activité de plusieurs enzymes du métabolisme de l'amidon peut être testée par zymogramme. Cette technique comprend deux étapes: la première consiste à effectuer une électrophorèse gel natif de polyacrylamide, la seconde, à révéler spécifiquement l'activité d'une enzyme en incubant le gel dans un mélange réactionnel adéquat. L'activité de l'amidon synthétase soluble, de la phosphoglucomutase et des enzymes de branchement peuvent être observables par cette technique. Des différences de mobilité électrophorétiques mais également des différences d'intensité de l'activité mises en évidence par zymogramme traduisent des modifications de la structure ou de l'activité de la protéine.

6.3.2.1 - Activité Phosphoglucomutase

Un gel natif de polyacrylamide est préparé selon la méthode de Laemmli (1970). La migration se fait à 4°C, 180 V pendant 1 heure.

Mélange réactionnel utilisé pour la révélation l'activité de la PGM:

Les quantités indiquées sont suffisantes pour 1 gel préparé avec le système miniprotean II commercialisé par Biorad.

30 ml tampon TrisA (Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; EDTA 1 mM)

3 ml MgCl₂ 0,5 M

150 mg Glc-1-P

1 ml NAD 1 %; 0,5 ml NADP 1 %

Avant l'emploi, ajouter:

1 mg Glc1,6-P₂

17 U Glc-6-P DH

1 ml MTT 1 % (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

0,5 ml PMS 1 % (phenazine methosulfate)

Après 15 à 60 minutes d'incubation à l'obscurité, une coloration bleue apparaît. Celle-ci est instable, une photographie sera donc prise dès l'apparition des bandes.

6.3.2.2 - Activité amidon synthétase soluble

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide à 7,5 %. Dans un tampon adéquat, les amidons synthétases contenues dans le gel sont capables d'allonger les chaînes glucosidiques du glycogène. Les produits qu'elles ont synthétisé sont révélés en incubant ce gel dans une solution d'iode (KI 0,5 %, I₂ 0,05 %).

Mélange réactionnel utilisé pour la révélation l'activité amidon synthétase soluble

Le gel est incubé une nuit à température ambiante dans le mélange suivant :

50 mM Glycylglycine-NaOH pH 9,0 ; 100 mM (NH₄)₂SO₄ ; 5 mM MgCl₂ 15 mM β-mercaptoéthanol, 0,5 g/ml sérum albumine bovine ; 4,5 g/l de glycogène de foie de lapin.

6.3.2.3 - Autres activités visualisées par zymogramme

Les protéines composant l'extrait cellulaire sont séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 7,5 % contenant de l'amidon (1 g/l). La révélation des activités enzymatique se fait en incubant le gel dans un mélange réactionnel équivalent à celui utilisé pour le zymogramme des activités amidon synthétases décrit ci-dessus.

6.4 - Purification de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

20 g de cellules sont nécessaires à la purification d'une quantité suffisante d'enzyme pour pouvoir effectuer une caractérisation de celle-ci. Les cellules sont resuspendues dans 100 ml de tampon A (50 mM glycylglycine pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 5 mM K-phosphate, 10 % sucrose et 5 mM DTT) auquel sont ajoutés 10 mg de chymostatine et du PMSF à la concentration finale de 1,5 mM. Le broyat issu du traitement aux ultrasons (3 x 45 sec.) est centrifugé à 12 000 g pendant 20 minutes, le culot lavé avec 50 ml de tampon A et à nouveau centrifugé. Les surnageants sont rassemblés, ils sont définis comme étant l'extrait brut.

6.4.1 - Précipitation sélective au sulfate d'ammonium

L'extrait préparé comme décrit précédemment est amené à 33 % de sulfate d'ammonium (en ajoutant le sel doucement à 4 °C) puis centrifugé. De la même façon, le surnageant est amené à 65 % de saturation en sulfate d'ammonium puis centrifugé. Le culot est récolté, il est dialysé une nuit contre 1000 volumes du tampon A.

6.4.2 - Chromatographie DEAE-Sepharose

L'échantillon dialysé est déposé sur une colonne de DEAE-Sepharose "fast-flow" de 2,25 x 17 cm qui a été équilibrée avec le tampon A. L'enzyme est éluée par un gradient linéaire constitué de 200 ml de tampon A dans le réservoir de mélange et 200 ml de 50 mM K-phosphate pH 6,0; 2 mM DTT et 0,4 M KCl dans le second réservoir. Les fractions de 8 ml contenant de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase sont réunies, concentrée à 5 ml dans un appareil Amicon muni d'une membrane PM-30.

6.4.3 - Chromatographie monoQ

L'échantillon est dilué 10 fois dans le tampon Q1 (20 mM bis-Tris-propane pH 7,0; 5 mM K-phosphate; 1 mM EDTA; 10 % sucrose, 2 mM DTT) puis reconcentré et déposé sur une colonne MonoQ HR10/10 (système de FPLC) préalablement équilibrée avec le tampon Q1. La colonne est lavée par 40 ml de ce tampon puis éluée par un gradient linéaire de KCl dans le tampon Q1 (100 ml, 0 à 0,5 M). Les fractions de 5 ml possédant une activité sont réunies puis concentrées.

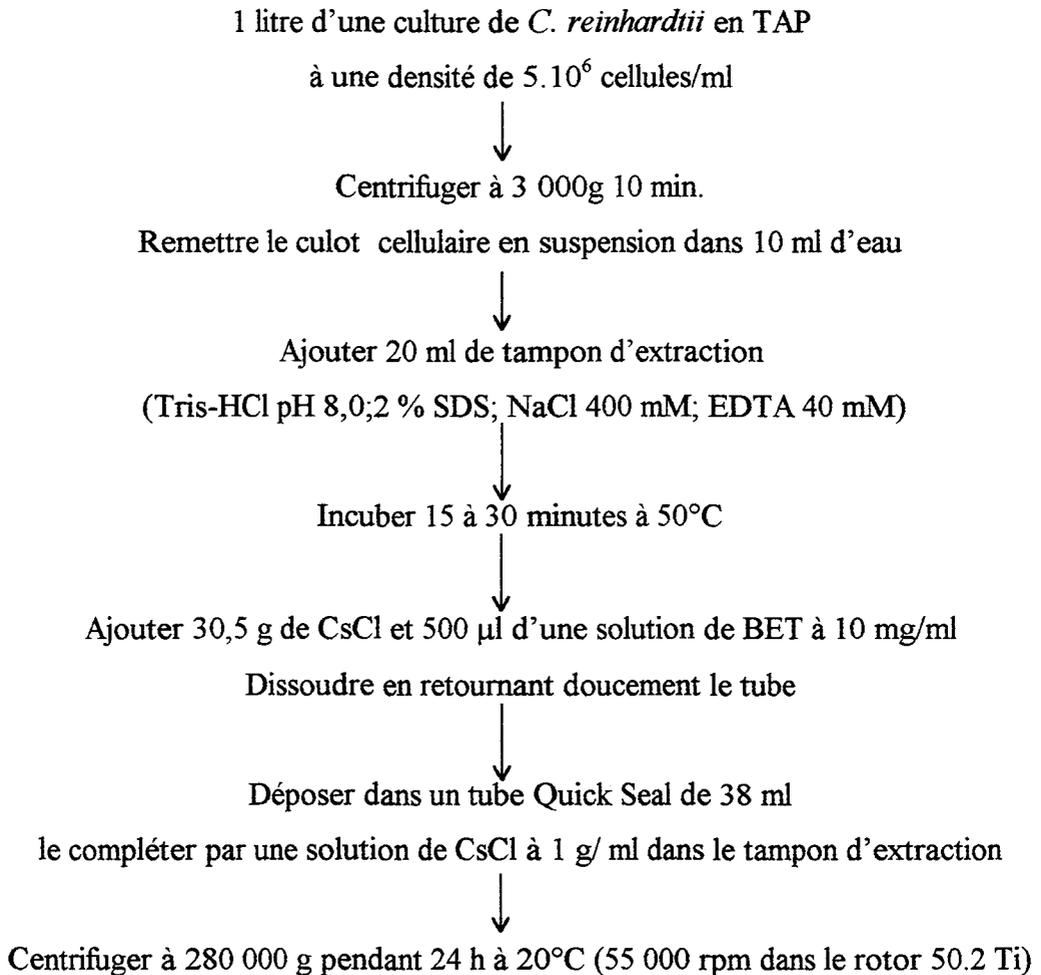
6.5 - Etude des propriétés cinétiques de l'enzyme semi-purifiée

Les valeurs $S_{0,5}$, $A_{0,5}$ et $I_{0,5}$ correspondent à la concentration donnant 50 % d'activité, d'activation et d'inhibition. Le coefficient de Hill (n_H) est calculé à partir du graphe de Hill (Dixon & Webb, 1979). Les paramètres cinétiques sont les résultats moyennés de deux expériences reproductibles à 10 %.

7 - TECHNIQUES D'ANALYSES MOLECULAIRES

7.1 - Préparation de l'ADN génomique

Le protocole d'extraction d'ADN est inspiré de celui de Weeks et collaborateurs (1986). Celui que nous utilisons est le suivant :

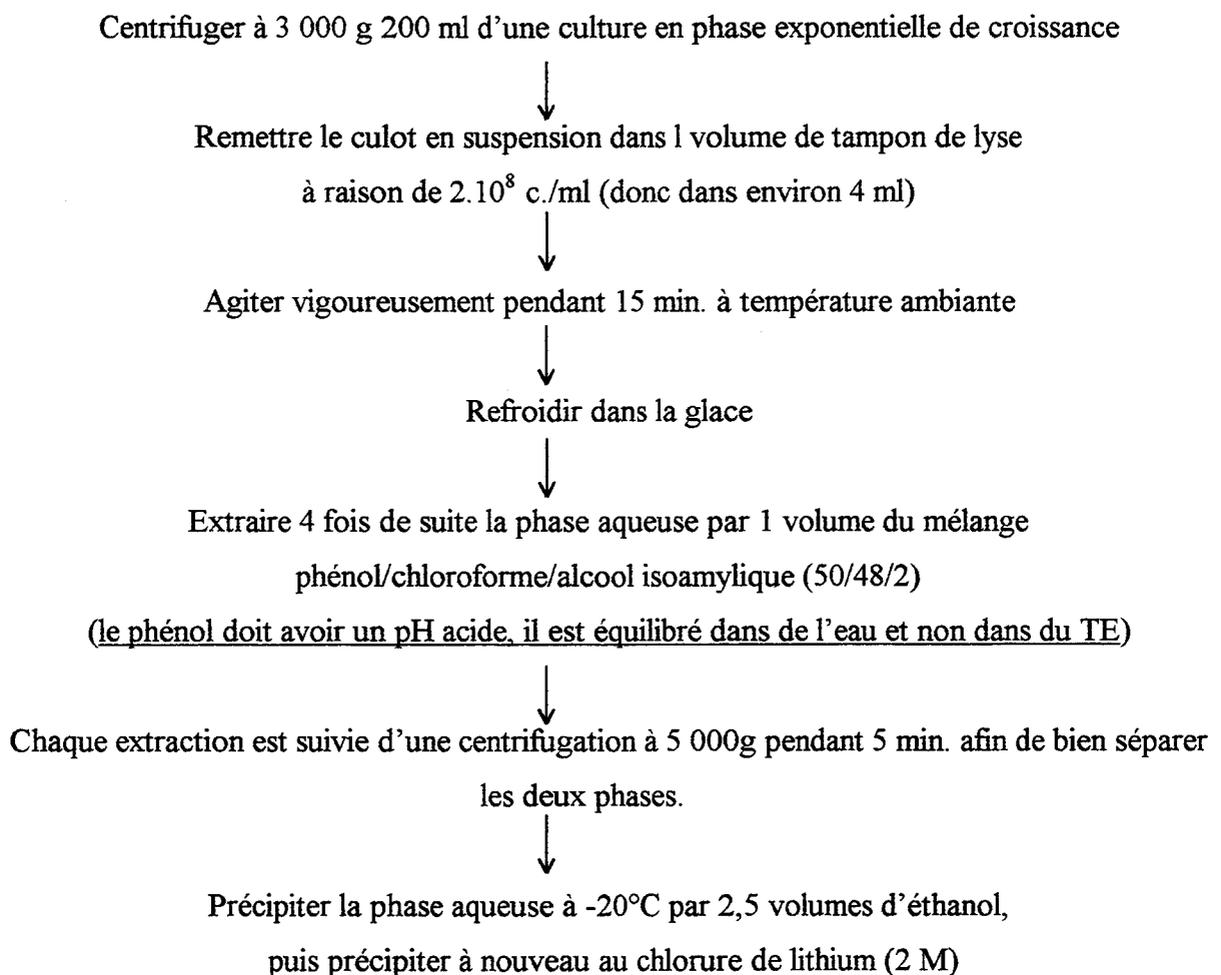


Le bromure d'éthidium (BET) est extrait 3 à 5 fois par du butanol saturé en TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). La solution est ensuite dialysée 24 h contre du TE x 0,1, d'abord sans agitation à température ambiante, puis à 4°C. La quantité et la qualité de l'ADN sont estimées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm ($1 DO_{260} \sim 40 \mu\text{g/ml}$) d'une part et d'autre part par migration sur gel d'agarose à 0,8 %.

7.2 - Préparation de l'ARN

La préparation d'ARN à petite échelle (5 à 25 µg d'ARN totaux) se fait grâce au kit Tri Reagent, Molecular Research Center. Le réactif utilisé contient du phénol et du chlorure de guanidium. Les cellules sont mises en suspension dans ce réactif, la phase aqueuse est séparée de la phase organique par addition de chloroforme. Les ARN, contenus dans la phase aqueuse, sont précipités à l'isopropanol.

Afin de réaliser une préparation plus importante, nous utilisons la technique d'extraction au phénol.



Composition du tampon de lyse : 50 mM Tris-HCl pH 8; 3 M NaCl; 5 mM EDTA; 2 % SDS; 40 µg protéinase K

7.3 - Hybridations moléculaires

7.3.1 - *Digestion, migration et traitement du gel*

5 à 10 mg d'ADN sont digérés par des enzymes de restriction puis déposés sur gel d'agarose à 0,8 %. La migration se fait à 0,5 V/cm pendant une nuit. Avant le transfert, le gel est successivement incubé sous agitation douce 15 minutes dans les solutions suivantes:

HCl 0,25 M (dépurination)

NaCl 1,5 M / NaOH 0,5 M (dénaturation)

NaCl 1,5 M / Tris-HCl pH7,2 / EDTA 0,001 M (neutralisation)

La dépurination a pour but de fragmenter l'ADN afin d'en faciliter le transfert.

7.3.2 - *Préparation de la membrane*

L'ADN est transféré sous vide (appareil Trans Vac TE80) pendant 2 heures sur une membrane de nylon (Hybond N-Amersham). Le tampon de transfert utilisé est le 20 X SSC (NaCl 3 M / 0,3 M citrate de sodium). Après transfert, la membrane est séchée à l'air puis l'ADN fixé par exposition aux rayonnements UV (4 J/cm²).

7.3.3 - *Conditions d'hybridation*

La membrane est d'abord préhybridée pendant 1 à 2 heures à 42°C puis hybridée une nuit à la même température. Les solutions utilisées sont les suivantes:

Préhybridation: 5 X SSC / 0,2 % SDS / 5 X Denhardt's / 50 % formamide déionisé / 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé.

Hybridation: Solution d'hybridation à laquelle sont ajoutés du sulfate de dextran (10 %) et 50 ng de sonde marquée au [³²P](activité spécifique d'au moins 10⁹ cpm/µg)

Les lavages se font à une température comprise entre 50 et 65°C selon la nature de la sonde utilisée et les conditions de stringence désirées. De même, la composition des solutions et les temps de lavage sont définis selon la stringence nécessaire à l'élimination spécifique des bruits de fond.

En général, des lavages successifs sont effectués dans chacune des solutions suivantes:

2 X SSC / SDS 0,1 % ; 1 X SSC / SDS 0,1 % ; 0,2 X SSC / SDS 0,1 %

7.4 - Préparation de la sonde

7.4.1 - *Extraction d'ADN plasmidique, préparation d'un fragment d'ADN*

L'extraction et la purification d'ADN plasmidique se fait selon la technique classique de lyse alcaline décrite dans Current Protocol of Molecular Biology (§1.6.1).

La digestion par une enzyme de restriction adéquate permet d'isoler le fragment plasmidique qui servira de sonde. Il est séparé du reste du plasmide par électrophorèse en gel d'agarose. Son extraction du gel se fait par la technique d'extraction au phénol à froid.

Dans un tube de 1,5 ml, écraser le bloc de gel
contenant le fragment d'ADN d'intérêt



Ajouter 0,2 ml de phénol, agiter vigoureusement, placer 5 min. à -80°C



Centrifuger 5 min., transférer le surnageant dans un tube propre,
ajouter 0,2 ml de TE, agiter vigoureusement,
placer à nouveau 5 min. à -80°C



Centrifuger, ajouter la phase aqueuse à celle précédemment récoltée
(une extraction au chloroforme / alcool isoamylique
peut être réalisée afin d'éliminer toute trace de phénol)



L'ADN est précipité en ajoutant 80 µl d'acétate d'ammonium (10 N) et 800 µl d'éthanol
et en centrifugeant à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Pour des fragments de petite taille
(moins de 500 bp), il est préférable de précipiter une nuit à -20°C.

7.4.2 - *Marquage radioactif de la sonde*

La sonde est préparée à partir de 50 à 100 ng d'ADN. Le marquage se fait par incorporation de α -[³²P]-dCTP (50 µCi / réaction) par la technique de "Random Priming" ou amorçage aléatoire, ceci grâce au kit de Pharmacia (Oligo labelling kit).

7.5 - Criblage de la banque

7.5.1 - Préparation de la sonde par PCR

La sonde a été préparée en amplifiant spécifiquement par PCR un insert de la banque d'ADNc selon la technique de Friedman et coll. (1988).

7.5.2 - Criblage et excision du fragment

Le fragment d'ADN amplifié et marqué est utilisé pour cribler la banque d'où il provient.

Le vecteur de cette banque d'ADN complémentaire est le bactériophage λ EX10x (Novagen). Les inserts sont clonés au sites *Eco*RI et *Hind* III. La souche d'*E.coli* utilisée pour la titration de la banque ainsi que pour le criblage à l'aide d'une sonde nucléotidique est la LE392 (Novagen). Nous avons utilisé les protocoles de titration et de criblage décrits par la société Novagen qui sont très proches de ceux utilisés dans la grande majorité des cas. La particularité du système est l'excision *in vivo*. La souche BM25.5 est infecté par le phage d'intérêt, elle va former des colonies et non des plages de lyse. Les cellules formant ces colonies contiennent un plasmide (pEX10x) dérivé du phage. Le plasmide est extrait par lyse alcaline, il sert à la transformation de la souche XL1-blue. Les inserts seront ultérieurement sous-clonés dans un vecteur permettant le séquençage sous la forme double brin ou simple brin (pBluescript II KS+/-; phagemide dérivé de pUC19).

7.6 - Séquençage nucléotidique

La séquence nucléotidique a été déterminée par la méthode de terminaison de chaîne par incorporation de didexynucléotides décrite par Sanger et coll. (1977). Il a été réalisé avec le kit Sequenase Version 2 (United States Biochemical Corporation). Les produits de réaction sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant. Le plasmide pBluescript II KS+/- permet le séquençage double brin et simple brin. Pour ce qui est du séquençage simple brin, la technique est décrite dans le livret qui accompagne le kit Sequenase Version 2. Dans le cas du séquençage double brin, seules les premières étapes diffèrent de la technique classique.

Combiner 1,5 µg de plasmide issu de la lyse alcaline avec 250 ng d'amorce et 1 µl de soude 1 N dans un volume final de 10 µl.



Incuber 10 min. à 68°C puis refroidir quelques secondes à température ambiante.



Ajouter 4 µl de TDMN, laisser 2 min. sur la paillasse puis centrifuger quelques secondes.



Ajouter 6 µl de la solution de marquage, incuber 5 min. à température ambiante.



La terminaison se réalise en ajoutant 4 µl de la solution obtenue dans l'étape précédente à 2,5 µl de chacun des ddNTP préchauffés à 37°C.



Incuber 5 min. à 37°C.



Afin de réduire le phénomène de compression, ajouter à chaque tube 1 µl d'une solution contenant de la déoxynucléotide terminale transférase et d'incuber 5 min.



Arrêter la réaction en ajoutant 4 µl de solution stop du kit.



Stocker à -20°C ou déposer 3,5 µl sur le gel après avoir chauffé 5 min. à 75-80°C.

Toutes les solutions utilisées sont contenues dans le kit, mis à part le TDMN et la solution de terminale transférase.

TDMN : 0,28 M TES; 0,12 M HCl; 0,05 M DTT; 0,08 M MgCl₂; 0,2 M NaCl. La solution est filtrée et stockée à -20°C.

Terminale transférase : pour 1 ml, mélanger 0,2 ml de dATP 10 mM, 0,2 ml de dCTP 10 mM; 0,2 ml de dGTP 10 mM; 0,2 ml de dTTP 10 mM et 100 unités de déoxynucléotide terminale transférase.

L'extraction et le séquençage d'ADN double brin ont pour avantage d'être rapides. Néanmoins, la qualité de la préparation plasmidique sera déterminante pour l'obtention de bons résultats de séquençage.

7.7 - Clonage de l'extrémité 5'

La technique de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends pour amplification rapide des extrémités des ADN complémentaire) permet d'amplifier spécifiquement les extrémités d'un fragment d'ADN. Nous avons utilisé pour cela le kit 5'-AmpliFINDER RACE commercialisé par la société Clontech.

La particularité de cette technique est la ligation d'une "ancree" à l'extrémité 3' de l'ADNc. Cette ancre est un fragment d'ADN simple brin de 15 nucléotides dont le brin complémentaire servira d'amorce lors de la PCR (**Figure 27**).

7.8 - La PCR à partir d'ARN totaux

En présence de manganèse, la *rTth* polymérase (Perkin Elmer Cetus) effectue la transcription inverse tandis qu'en présence de magnésium, elle retrouve ses propriétés d'ADN polymérase thermorésistante comme l'est la célèbre *Taq* polymérase. Suite à l'étape de transcription inverse, il suffit donc pour effectuer la PCR d'utiliser un tampon contenant du tween et de l'EGTA afin de chélater le Mn et d'ajouter une amorce complémentaire de l'ADNc synthétisé. Cette technique présente l'avantage d'éviter la purification de l'ADNc et donc de réaliser les deux réactions dans le même tube. D'autre part, dès l'étape de transcription inverse l'utilisation non pas un oligo d(T) mais une amorce complémentaire de la séquence d'intérêt diminue les risques d'amplifications aspécifiques. Le détail du protocole d'utilisation de la *rTth* polymérase est joint à la notice d'utilisation de l'enzyme commercialisée par la société Perkin Elmer Cetus.

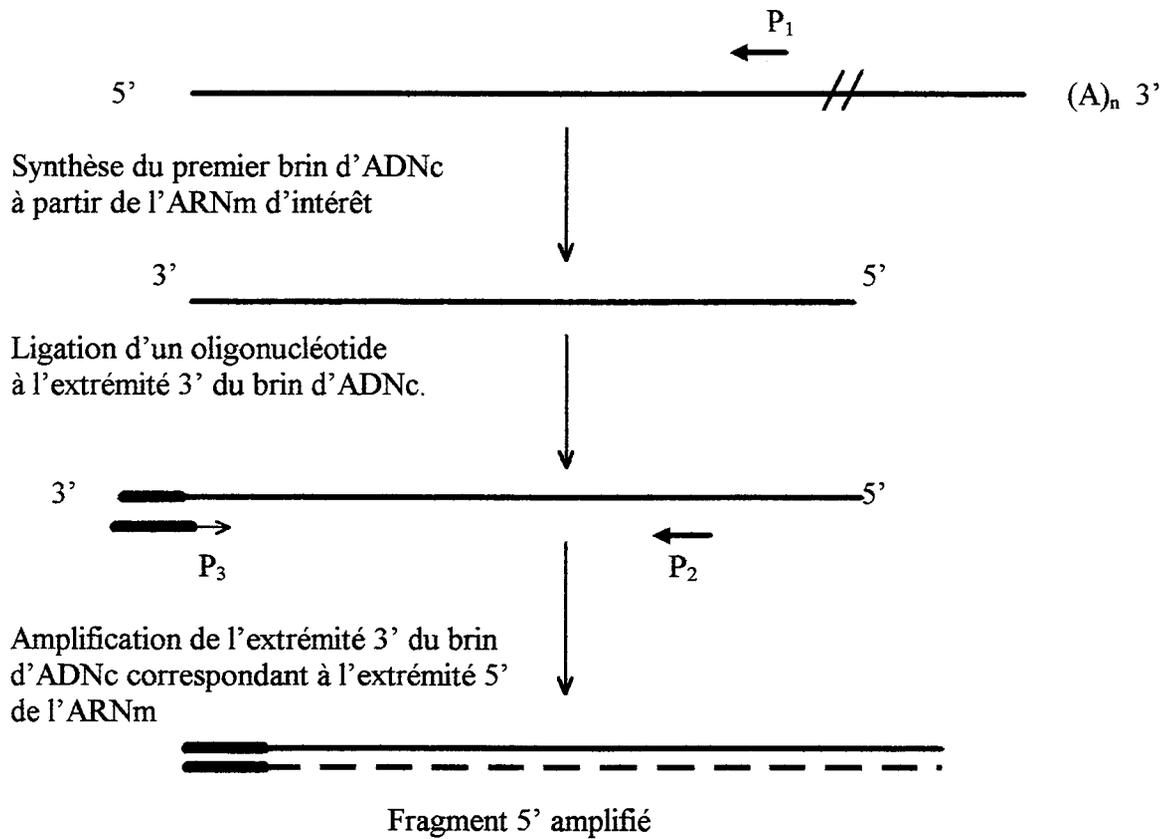


Figure 25 : Principe de l'amplification de l'extrémité 5' d'un ADNc par la technique de RACE-PCR

P1 : oligonucléotide correspondant à un fragment de la séquence connue

P2 : oligonucléotide correspondant à une région de la séquence proche de l'extrémité 5' connue

P3 : oligonucléotide complémentaire de "l'ancre"

III - RESULTATS

Il existe différentes manières d'aborder l'étude de la fonction biologique d'une protéine.

L'utilisation d'un système génétique tel que *C. reinhardtii* permet la sélection aisée de souches défectueuses pour les activités qui interviennent dans la synthèse (ou la dégradation) de l'amidon. Les conséquences physiologiques de la mutation permettent d'associer à la protéine mutée sa fonction précise *in vivo*. Par ailleurs, selon la technique de mutagenèse employée, il est possible d'isoler des mutants dont l'activité est diminuée ou complètement annulée.

En vue d'étudier les propriétés de l'ADP-Glc PPase de l'algue, nous débuterons notre travail par l'isolement et la caractérisation de souches défectueuses pour cette activité enzymatique. Nous mènerons ensuite une étude approfondie des altérations créées par la mutation en vérifiant l'activité de toutes les enzymes impliquées directement dans le métabolisme de l'amidon. Enfin, après avoir déterminé la nature précise des lésions enzymatiques, nous caractériserons les effets de ces lésions sur la physiologie de la cellule et sur la structure de l'amidon accumulé.

Ce type de démarche permet en général de d'attribuer à une protéine une fonction précise dans une voie métabolique.

1 - L'ISOLEMENT ET LA CARACTERISATION DE SOUCHES

ACCUMULANT DE FAIBLES QUANTITES D'AMIDON

1.1 - La mutagenèse et la sélection des souches

1.1.1 - Les souches mutantes issues de l'insertion aléatoire d'ADN

En 1993, une mutagenèse par intégration aléatoire d'ADN plasmidique a été réalisée au laboratoire par Brigitte Delrue et Fabienne Bellanger. Cette mutagenèse a permis de sélectionner une cinquantaine de clones regroupés en diverses catégories phénotypiques. Nous nous sommes intéressés aux dix clones présentant un phénotype jaune, caractéristique de l'accumulation de faibles quantités d'amidon puisque c'est le phénotype attendu pour les mutants affectés dans l'activité de synthèse de l'ADP-Glc que nous recherchons. Les résultats du dosage de l'activité de l'ADP-Glc PPase mené en extrait brut sur ces dix souches sont repris dans le **tableau 13**.

La souche sans paroi 330 utilisée pour la mutagenèse constitue notre référence pour le dosage de l'activité ADP-Glc PPase.

Les chiffres indiqués sont les résultats moyennés de 3 expériences indépendantes.

Souches	<u>330</u>	<u>I7</u>	S	Q	FB 001	BAF J1	BAF J2	BAF J3	BAF J4	BAF J5	BAF J6	BAF J7	BAF J9
Activité (U/mg x10 ⁻²) +3PGA	3,81	0.6	3,53	3,23	2,80	3,60	4,24	0,30	3,00	<1.d.	3,10	3,24	3,27
Activité (U/mg x10 ⁻²) -3PGA	0,28	0.3	0,31	0,41	0,18	0,28	0,28	0,26	0,29	<1.d.	0,20	0,29	0,3
Facteur d'activation	14	2	11	8	15	13	15	1	10	/	15	11	10

Tableau 13 : *Activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase des souches mutantes colorées en jaune par les vapeurs d'iode.*

L'activité de dégradation de l'ADP-glucose est mesurée en extrait brut par la technique spectrophotométrique en absence et en présence de 3PGA (2.5 mM).

Le facteur d'activation correspond au rapport des activités mesurées dans ces deux conditions; il traduit la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis de son activateur.

< 1.d : inférieur à la limite de détection du dosage

→ Seules deux souches présentent une anomalie : la souche BAF J3, dont le facteur d'activation est proche de un, et la souche BAF J5 dont l'activité est inférieure à la limite de détection du dosage. Toutes les autres souches sont dotées d'une activité ADP-Glc PPase proche de la souche sauvage. Une étude détaillée des souches BAF J3 et BAF J5 sera donc entreprise au cours de ce travail.

En plus de ces deux souches apparemment défectueuses pour la synthèse d'ADP-Glc, nous disposons d'une troisième souche mutante (I7), caractérisée précédemment au laboratoire (Ball *et al.*, 1991).

1.1.2 - Présentation de la souche I7 porteuse de la mutation *sta1-1*

La souche I7 défectueuse pour la synthèse d'amidon a été isolée après mutagenèse aux rayons X (Ball *et al.*, 1991). Exposée aux vapeurs d'iode, elle prend la coloration jaune caractéristique des souches accumulant peu de polysaccharide (Figure 26). Elle ne produit en effet que 5 à 10 % de la quantité d'amidon accumulée par la souche sauvage.

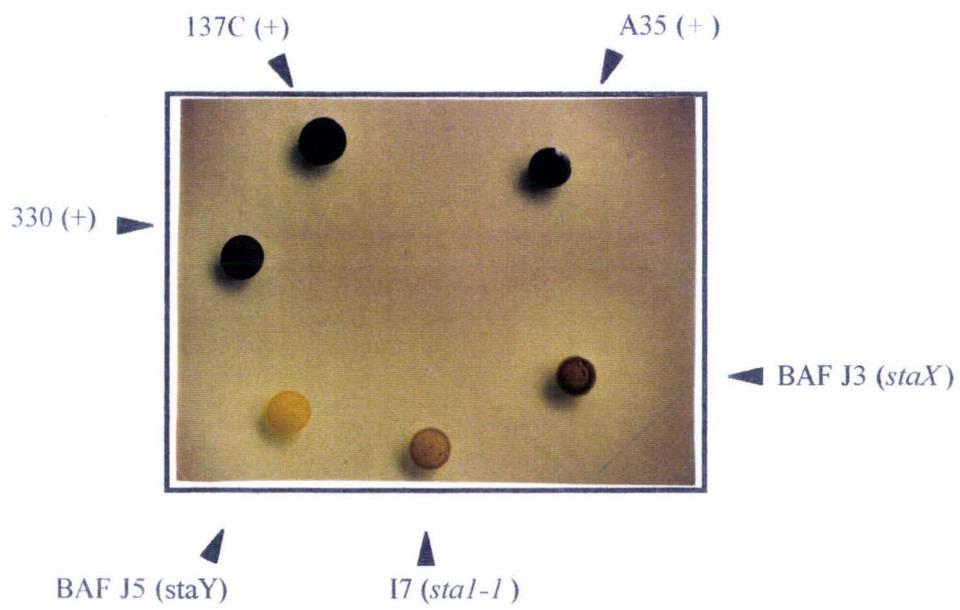


Figure 26 : *Phénotypes des souches cultivées sur milieu carencé en azote et colorées aux vapeurs d'iode*

L'étude en extrait brut des activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme de l'amidon a permis de montrer que la chute des capacités de synthèse est, dans ce cas précis, due à l'altération de l'ADP-Glc PPase.

L'activité de base de l'enzyme (c'est-à-dire l'activité en l'absence d'activateur), est identique à celle mesurée dans la souche sauvage. Cependant, en extrait brut, même en conditions de concentrations saturantes en 3PGA (5 mM), son V_{max} n'est que doublé alors qu'il est multiplié par un facteur allant de 10 à 15 pour l'enzyme sauvage.

Les analyses génétiques ont permis de montrer que la mutation *stal-1* portée par I7 est monogénique et récessive. Elle affecterait soit le gène de structure de l'une des sous-unités composant l'ADP-Glc PPase, soit un gène régulateur qui contrôlerait le passage de la protéine sous une forme activable.

Afin de mieux caractériser la mutation *stal-1*, nous avons effectué une purification de l'activité ADP-Glc PPase résiduelle (décrite au chapitre 2). Nous avons ensuite mené des études génétiques et une caractérisation moléculaire du génome de I7 dans le but d'identifier le produit du gène *STAI*. Toutes ces études ont été menées parallèlement avec les deux autres souches (BAF J3 et BAF J5) précédemment isolées.

Avant d'entamer une étude détaillée de l'activité de l'ADP-Glc PPase, intéressons nous à la physiologie de nos trois souches mutantes.

1.2 - La physiologie des souches défectueuses pour l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase

1.2.1 - Quantités d'amidon accumulé

En carence azotée, les souches mutantes I7 et BAF J3 accumulent des quantités faibles mais significatives de polysaccharide. Chez la souche BAF J5 (porteuse de la mutation *staY*), cette quantité devient proche de la limite de détection (**Tableau 14**, page 116).

En condition de croissance active (dans un milieu non carencé autorisant la photosynthèse), la souche sauvage produit de l'ordre de 2,5 à 5 μg d'amidon par million de cellules. La purification et la quantification du polysaccharide provenant des trois souches mutantes se sont par contre avérées impossibles. Les quantités accumulées dans ces conditions de culture sont trop faibles pour donner des résultats significatifs.

Souches	137C (+)	I7 (<i>sta1-1</i>)	BAFJ3	BAFJ5
Amidon (%)	100	5	5	0,1
λ_{\max} (nm)	590	570	575	540

Tableau 14 : *L'amidon accumulé dans les souches sauvage et mutantes cultivées en milieu carencé en azote.*

100 % correspond à la quantité accumulée par la souche sauvage, soit 35 à 45 μg par million de cellules.

λ_{\max} représente la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe que forme l'iode avec le polysaccharide purifié sur gradient de Percoll (Pharmacia). Elle est reproductible à ± 5 nm.

Dans chacun des cas, la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}) de l'amidon des souches mutantes est déplacée, de manière plus ou moins prononcée, vers de plus courtes longueurs d'onde. Ceci pourrait traduire une diminution de la fraction d'amylose. En effet, dans le cas d'une souche porteuse d'une défectuosité de l'activité amidon synthétase liée au grain, l'absence d'amylose se traduit par une λ_{\max} à 550 nm contre 590 nm pour l'amidon de la souche sauvage. Notons cependant qu'une modification de la structure de l'amylopectine pourrait être à l'origine d'un tel déplacement. Seule une séparation des différentes macromolécules composant l'amidon (suivie d'une étude détaillée de la structure de chacune) permettra de déterminer la structure du polysaccharide accumulé par les souches mutantes. Ces travaux feront l'objet du chapitre 4.

1.2.2 - Temps de génération

Afin de détecter un éventuel effet de l'effondrement des quantités d'amidon accumulé sur la croissance cellulaire, nous avons mesuré le temps de génération pour chacune des souches mutantes.

Cultivées sur milieu gélosé, les souches I7, BAF J3 et BAF J5 ne montrent aucune anomalie de croissance, que ce soit en milieu complet ou carencé en azote, à l'obscurité ou à la lumière. En milieu liquide sous lumière vive continue, le temps de doublement des souches mutantes au cours de la phase exponentielle de croissance est équivalent à celui des souches sauvages, soit environ 10 heures (**Figure 27**).

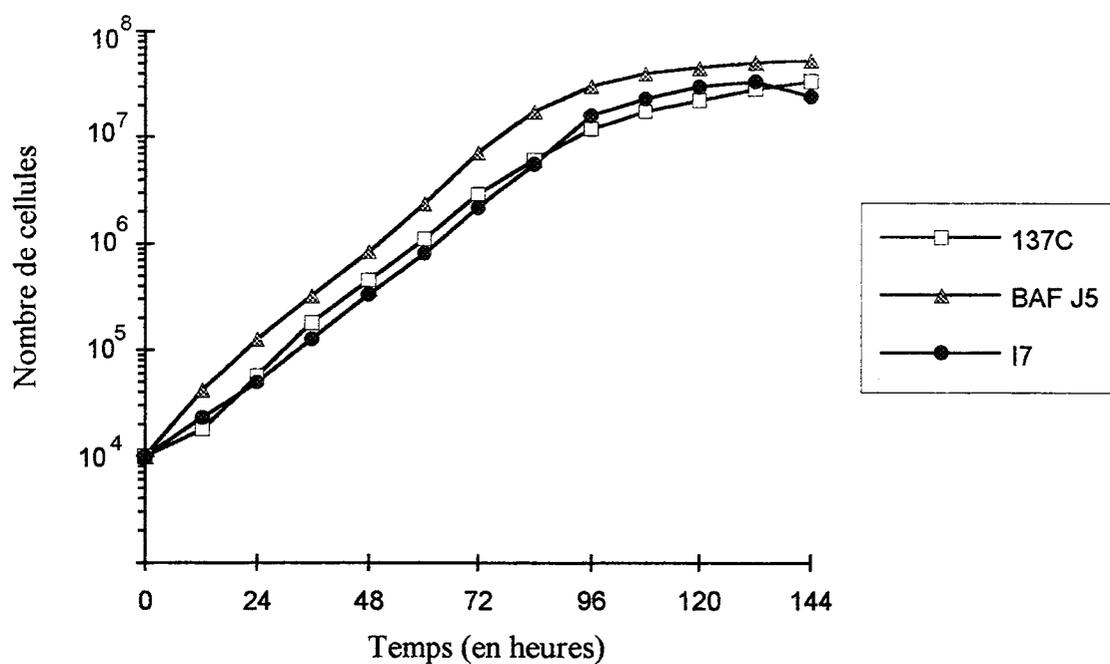


Figure 27 : *Courbes de croissance des souches 137C, I7 et BAF J5 cultivées en présence d'acétate et à la lumière*

De même, à l'obscurité, dans les conditions permettant à l'algue de mimer la physiologie des organes de réserve, les capacités de croissance sont identiques à celles de la souche sauvage. Enfin, en cycle jour/nuit, conditions dans lesquelles on pouvait s'attendre à des anomalies en particulier pour BAF J5 qui n'accumule presque plus de polysaccharide, le comportement de chacune des cultures est inchangé.

→ Il semble donc que la présence d'amidon ne soit pas indispensable à la croissance cellulaire aussi bien dans les cultures synchronisées (par cycle jour/nuit) que dans des conditions autorisant ou n'autorisant pas la photosynthèse.

1.2.3 - Structure générale de la cellule

1.2.3.1 - Comportement et aspect général

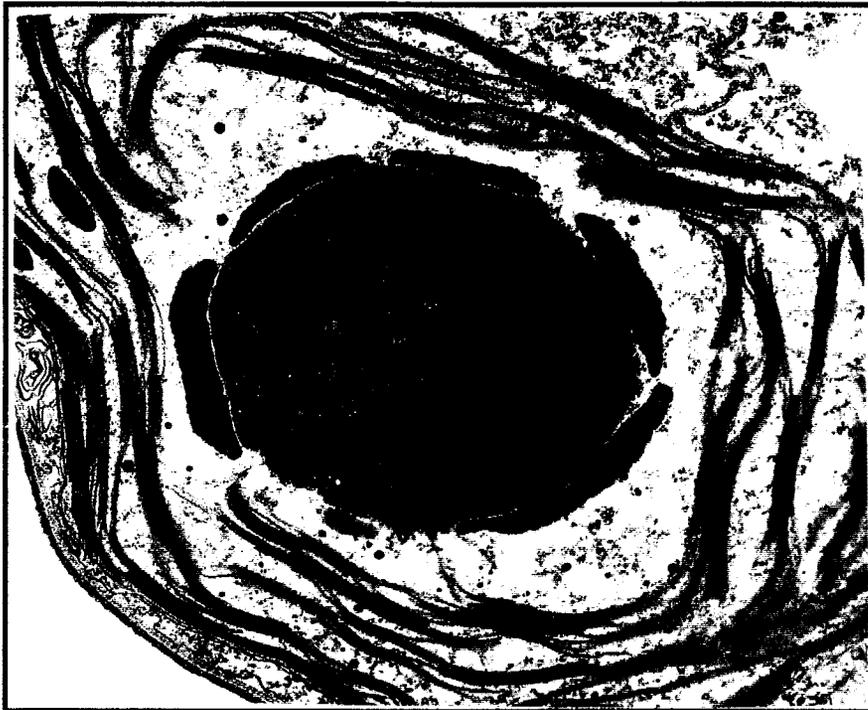
L'observation microscopique des cellules issues de cultures en milieu liquide montre que, contrairement au sauvage, la souche mutante BAF J5 est immobile. Ses flagelles présentent un aspect anormal, ils sont courts, parfois inexistantes. Par contre, cultivée sur milieu gélosé, les colonies isolées présentent un aspect normal.

Notons que la souche BAF J5 provient d'une mutagenèse par insertion aléatoire d'ADN plasmidique. Plusieurs copies du plasmide ont pu s'intégrer dans le génome de l'algue. De ce fait, les transformants issus de la mutagenèse sont susceptibles de porter plusieurs mutations.

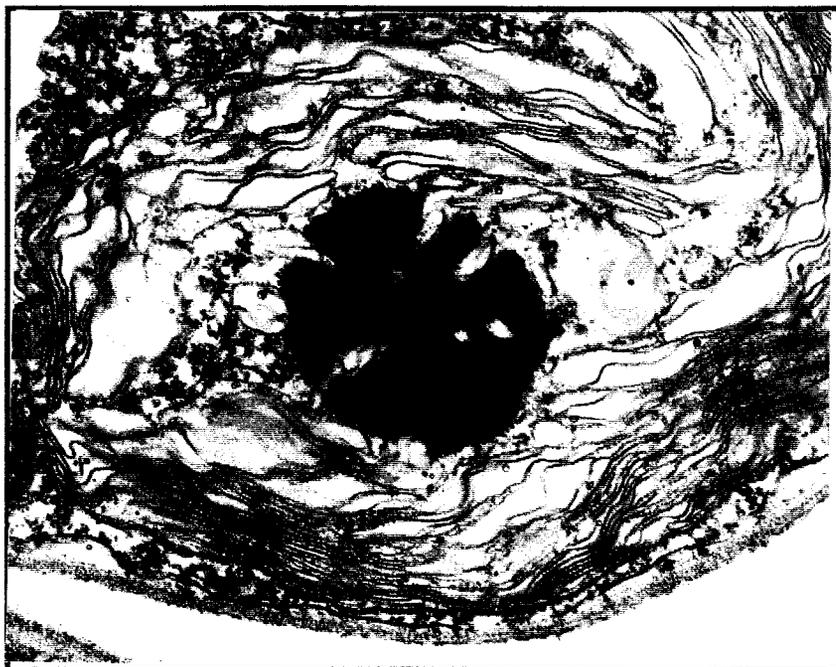
Afin de distinguer les effets pléiotropes (dûs à une mutation unique) des effets d'insertions multiples, il sera nécessaire de réaliser une analyse de coségrégation des phénotypes. Même dans le cas d'une liaison des deux caractères chez les descendants, il reste possible qu'un événement de délétion affecte deux cistrons adjacents.

1.2.3.2 - Observation microscopique

En condition de croissance active, l'amidon de la souche sauvage est localisé essentiellement autour du pyrénioïde où il forme une gaine opaque (**Figure 28a**). Alors que chez la souche sauvage, le pyrénioïde possède une structure compacte, il présente une structure moins dense et fissurée chez les souches mutantes I7 (*sta1-1*) et BAF J5 (**Figures 28a, 28b et 28c**).



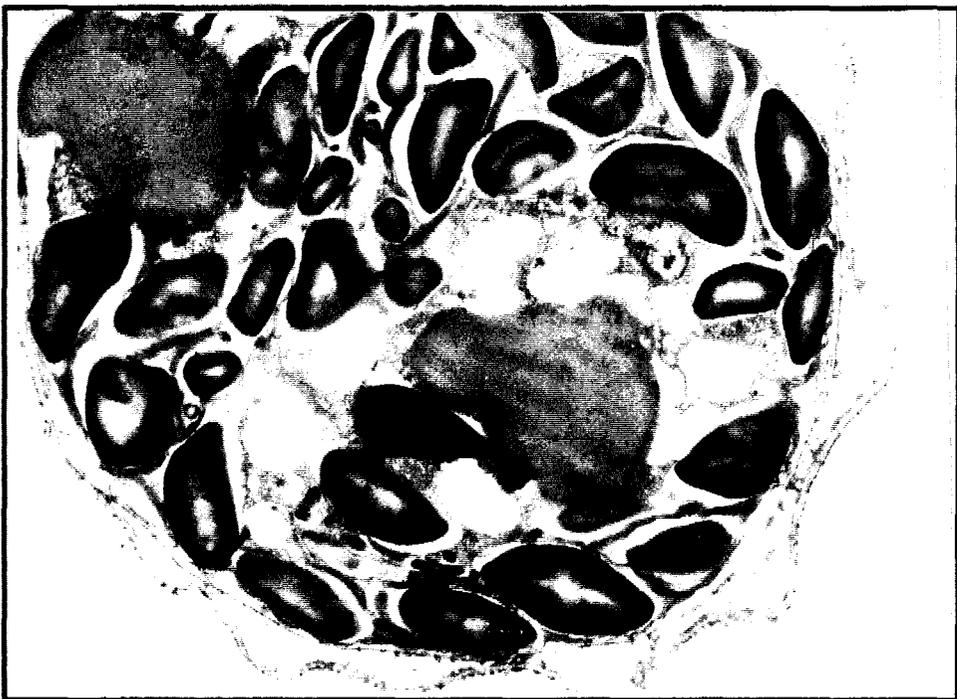
*Figure 28a: Pyrénoïde de la souche sauvage après culture en mixotrophie
observation au microscope électronique (X 25 000)*



*Figure 28b : Pyrénoïde de la souche mutante 17 après culture en mixotrophie
observation au microscope électronique (X 20 000)*



*Figure 28c: Souche sauvage cultivée en mixotrophie
observée au microscope électronique (X 10 000)*



*Figure 28d: Souche sauvage cultivée dans un milieu carencé en azote
observée au microscope électronique (X 10 000)*

Notons que lors d'une culture permettant l'accumulation massive de polysaccharide (milieu carencé en azote), dans la souche sauvage l'amidon envahit la presque totalité de la cellule (**Figure 28d**).

Dans des conditions de culture bien définies (concentration en CO₂ de 0,03 % et faible densité cellulaire), une fine gaine d'amidon peut être observée autour du pyrénocyste de la souche I7 (*stal-1*) (Moroney, communication personnelle).

1.2.4 - Activités enzymatiques liées au métabolisme de l'amidon

Afin de mieux caractériser l'effet des mutations portées par les souches I7, BAF J3 et BAF J5, nous avons effectué une étude systématique de toutes les activités enzymatiques (accessibles par dosage) impliquées dans le métabolisme de l'amidon.

1.2.4.1 - La phosphoglucoisomérase et la phosphoglucomutase

Rappelons que la phosphoglucoisomérase est responsable de la synthèse de glucose-6-P à partir du fructose-6-P (en amont de la synthèse d'ADP-Glc), (voir **Figure 6** page 22; schéma général de la synthèse d'amidon). Le glucose-6-P est ensuite converti en glucose-1-P par la phosphoglucomutase. Le glucose-1-P est, avec l'ATP, le substrat de l'ADP-Glc PPase. Une défectuosité de l'activité phosphoglucoisomérase ou phosphoglucomutase pourrait être à l'origine de la chute de la quantité d'amidon accumulé. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ces deux activités enzymatiques qui ne sont pourtant pas spécifiques du métabolisme de l'amidon.

La phosphoglucoisomérase (PGI)

Comme le montrent les résultats présentés dans le **tableau 15**, l'activité de la PGI est intacte dans les souches porteuses des mutations *stal-1* et *staY*.

Souches	137C (+)	I7 (<i>stal-1</i>)	BAF J3	BAF J5
Activité (U)	0,21 ±0,08	0,28 ±0,10	nd	0,20 ±0,05

Tableau 15 : Activité de la phosphoglucoisomérase chez les souches sauvage et mutantes.

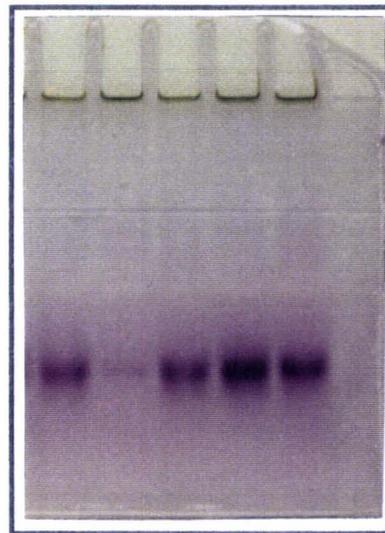
Une unité représente le nombre de μ moles de Glc-6-P formé par milligramme de protéine et par minute.

Ces résultats sont le fruit de deux expériences indépendantes. Le dosage de l'activité de la souche BAF J3 n'a pas été réalisé.

La phosphoglucomutase (PGM)

Deux formes de phosphoglucomutase ont été mises en évidence chez *C. reinhardtii*, l'une cytosolique, l'autre chloroplastique. L'altération d'une des deux formes de la PGM pourrait avoir des répercussions sur la quantité d'amidon accumulé. Néanmoins, celles-ci ne sont pas supposées être aussi dramatiques que dans le cas d'une défectuosité de l'ADP-Glc PPase puisqu'il existerait chez *C. reinhardtii* un transport de glucose-1-P à travers la membrane chloroplastique (**Figure 17**, page 49 ; Klein, 1987).

L'activité de la PGM a été mesurée sur extrait brut *via* une technique spectrophotométrique, expérience confirmée par zymogramme. Comme le montre la photo ci-dessous, aucune altération de l'activité n'est détectable par ces méthodes. Le profil de la souche sauvage est similaire à celui des souches mutantes (**Figure 29**).



(1) (2) (3) (4) (5)

Figure 29 : Mise en évidence par zymogramme de l'activité de la phosphoglucomutase .

Les extraits cellulaires utilisés proviennent de cultures en phase de croissance active.

Une souche de référence (*GST3-43*) défectueuse pour l'activité PGM a été utilisée comme témoin (2).

(1) *I37C* (+) ; (2) *GST3-43* (*sta5-1*) ; (3) *I7* (*sta1-1*) ; (4) *BAF J3* ; (5) *BAF J5*

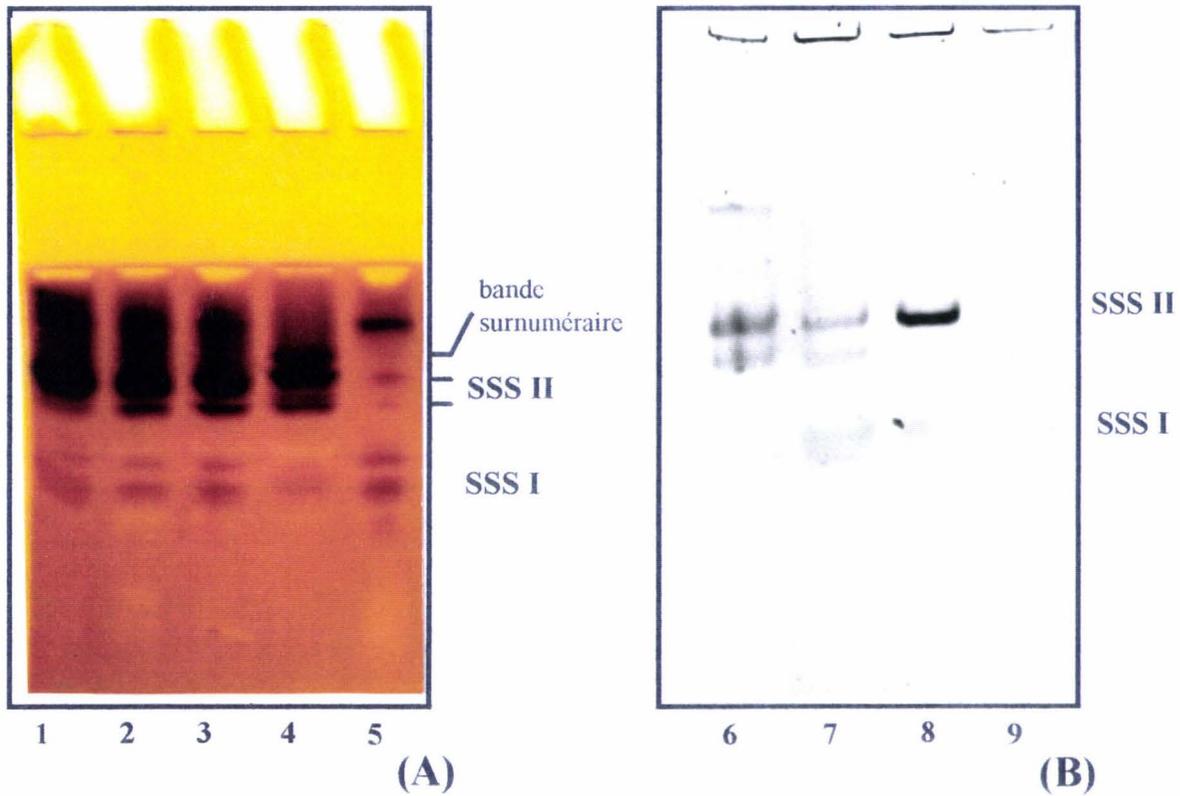


Figure 30 : *Activité amidon synthétase soluble dans les cellules en croissance active (A), dans les conditions de carence azotée (B)*

- (1) Sauvage de référence (330)
- (2) N52 (*sta80-1*), sur-productrice d'amidon
- (3) I7 (*sta1-1*)
- (4) BAF J5
- (5) I152 (*sta3-1*), souche défectueuse pour l'activité SSS II (Fontaine *et al.*, 1993)
- (6) I7 (*sta1-1*)
- (7) Souche sauvage de référence (330)
- (8) BAF J5
- (9) BAF J6 (*sta7*) défectueuse pour une activité de type isoamylasique

1.2.4.2 - Activité amidon synthétase soluble (SSS)

L'activité amidon synthétase soluble a été mesurée en extrait brut (**Tableau 16**). Elle a également été visualisée par zymogramme (**Figure 30**).

Souches	137C (+)	I7 (<i>sta1-1</i>)	BAF J3	BAF J5
Activité (U ^a)	15 ±4	10 ±1	12 ±3	23 ±8

Tableau 16: *Activité amidon synthétase soluble globale mesurée en extrait brut.*

^a nmoles de [¹⁴C]-ADP-Glc incorporé, par milligramme de protéine, par minute.

Deux expériences indépendantes ont été réalisées pour chacune des souches sauf pour BAF J3 dont l'activité soluble globale n'a été mesurée qu'une seule fois.

L'activité soluble globale des souches mutantes est équivalente à la souche sauvage. Pourtant, la technique de zymogramme révèle des différences importantes. En effet, le profil observé pour la souche BAF J5 est différent du profil des autres souches. Le résultat de cette expérience s'est avéré reproductible. Les modifications du profil sont observables à la fois sur des extraits de cellules cultivées en milieu non carencé et carencé en azote.

- Dans des extraits issus de cultures en milieu non carencé (**Figure 30 a**), on observe non plus deux, mais trois bandes correspondant à l'activité SSS de type II. De plus, la bande correspondant à l'activité de la SSS de type I est diffuse chez le mutant alors que dans les autres souches, elle se présente sous forme de deux bandes dont l'une est d'intensité légèrement supérieure.

- Dans le cas de cellules cultivées en milieu carencé en azote (**Figure 30 b**), la modification du profil de la SSSI semble moins prononcée. Néanmoins, la bande reste diffuse. En ce qui concerne l'activité de type II, la différence est très marquée. La bande supérieure est beaucoup plus intense que chez les trois autres souches. C'est d'ailleurs cette bande supérieure qui semblait dédoublée dans les conditions décrites précédemment (en milieu non carencé).

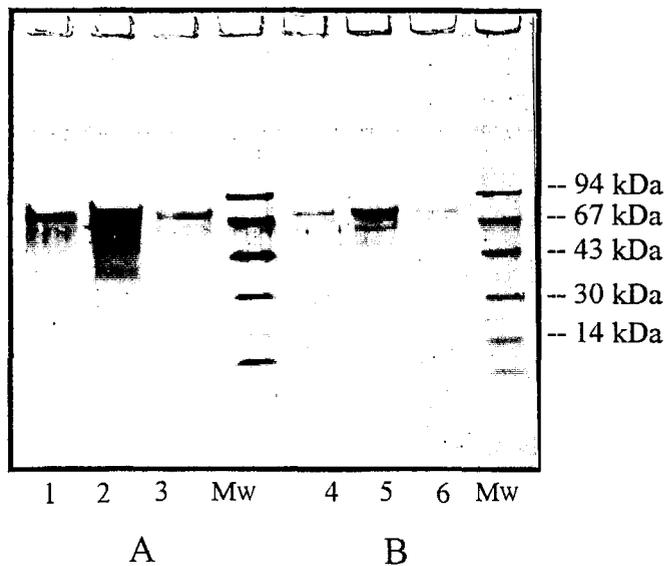


Figure 31 Profil électrophorétique de l'amidon synthétase extraite du grain d'amidon de réserve des souches 137C, I7 et N52.

Protéines extraites de 5 mg (A) ou 1,5 mg (B) d'amidon
 (1 et 4): 137C (+)
 (2 et 5): I7 (*sta1-1*)
 (3 et 6): N52 (*sta80-1*; mutant sur-producteur)
 MW : témoin de masse moléculaire

Souches	Génotype	V_{max}^a (par mg d'amidon)	V_{max}^b (pour 10^6 cellules)
137C	(+)	3.25	81.5
I7	(<i>sta1-1</i>)	18.0	32.5

Tableau 17: Activité de l'amidon synthétase liée au grain dosée chez la souche sauvage et chez la souche mutante *sta1-1*.

^{a,b} nmol d'ADP-glucose incorporées dans un polysaccharide par min. et par mg d'amidon ou pour 10^6 cellules respectivement.

CONCLUSION

→ Bien que l'activité globale de l'amidon synthétase soluble (SSS), mesurée en extrait brut, soit équivalente dans chacune des souches, le zymogramme met en évidence des différences pour la souche mutante BAF J5. En effet, des bandes surnuméraires apparaissent ; notons qu'elles correspondent à des isoformes actives de la SSS.

La mutation portée par la souche BAF J5 altère l'activité de l'ADP-Glc PPase et modifie le profil de l'activité de l'amidon synthétase soluble (sans toutefois diminuer le niveau global de cette activité).

Ajoutons qu'une étude cinétique comparative détaillée a été réalisée sur les souches I7 et sauvage (expériences réalisées au laboratoire par Léon Dirick). La mutation *sta1-1* n'altère ni le K_m , ni le V_m de l'activité amidon synthétase soluble, que ce soit sur des cellules cultivées à la lumière ou à l'obscurité. Une étude similaire a par ailleurs été réalisée sur la phosphorylase. Les valeurs de l'affinité de l'enzyme pour le phosphate inorganique et pour le glucose-1-P ainsi que le K_i pour l'ADP-Glc sont identiques à celles mesurées chez la souche sauvage.

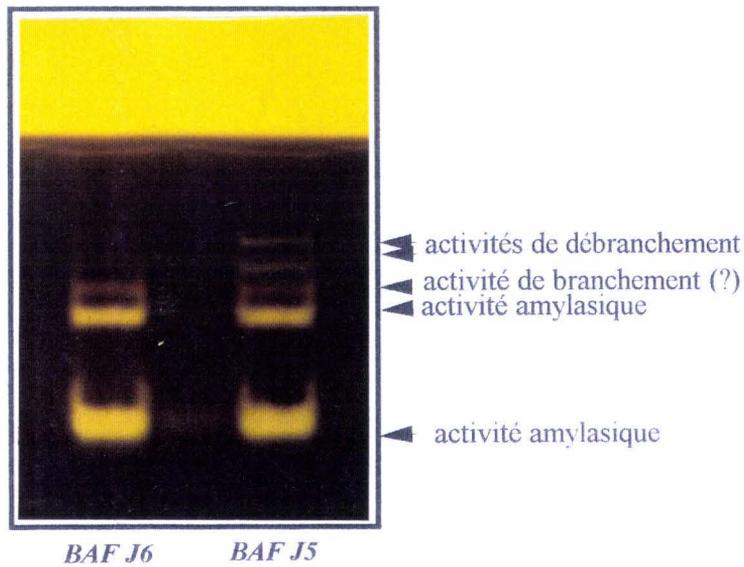
→ Dans les souches mutantes I7 et BAF J3, l'activité amidon synthétase soluble est intacte.

1.2.4.3 - Activité amidon synthétase liée (GBSS)

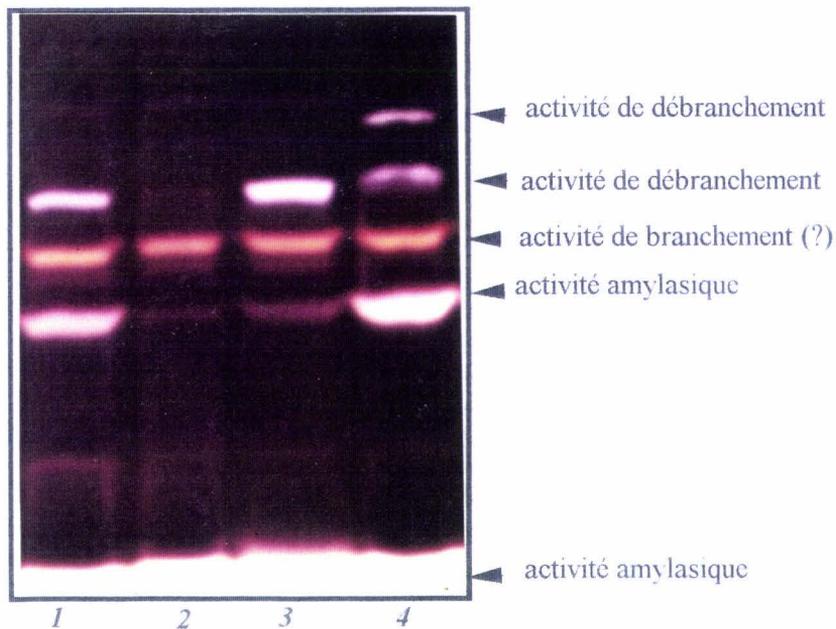
Comme nous l'avons vu précédemment, la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe polysaccharide/iode traduit pour chacune des souches mutantes une possible diminution de la fraction amylosique. Or, la GBSS est l'enzyme responsable de la synthèse des longues chaînes, en particulier de l'amylose (Delrue *et al.*, 1992). Il était donc important de tester l'efficacité de polymérisation de l'ADP-Glc par les protéines associées au grain.

Il n'a pas été possible d'estimer cette activité dans le cas de la souche BAF J5 qui accumule trop peu de polysaccharide. Seule la souche I7, porteuse de la mutation *sta1-1*, a été testée.

En général, l'expression de l'activité d'une enzyme se fait par milligramme de protéines. Dans le cas de la GBSS, l'expression par rapport à la quantité d'amidon est physiologiquement plus significative, d'autant plus que la GBSS représente chez *C. reinhardtii* plus de 90 % du total des protéines associées au polysaccharide. Néanmoins, il est aussi possible d'exprimer l'activité associée à l'amidon par million de cellules (**Tableau 17**).



- (1) *BAF J6 (sta7)* défectueuse pour l'activité de débranchement
 (2) *BAF J5*



- (1) Souche de référence (330)
 (2) *BAF J6 (sta7)* défectueuse pour l'activité de débranchement
 (3) Souche de référence (330)
 (4) *BAF J5*

Figure 32 : Activités des enzymes capables de modifier la structure de l'amidon contenu dans un gel de polyacrylamide
 Visualisation après séparation électrophorétique et coloration du gel par l'iode (observation dans deux conditions de migration)

L'activité de la GBSS ramenée au nombre de cellules apparaît 2 à 3 fois plus faible chez la souche mutante I7. Cependant, cette diminution ne semble pas physiologiquement significative puisque, pour une même quantité d'amidon, l'activité de l'enzyme se révèle beaucoup plus importante chez I7 que chez la souche sauvage. Ceci est à mettre en parallèle avec les profils d'extraction de la GBSS. En effet, dans une même quantité de polysaccharide, la protéine est nettement plus abondante chez le mutant que chez le sauvage (**Figure 31**).

→ **Les résultats de dosage d'activité associés aux profils d'extraction de la GBSS du grain d'amidon, indiquent que la mutation *stal-1* ne conduit pas à une baisse significative de l'activité spécifique de l'enzyme.**

1.2.4.4 - Les activités de branchement et de débranchement

La spécificité de l'interaction iode/polysaccharide permet de mettre en évidence d'éventuelles modifications de la structure de l'amidon. Les enzymes susceptibles de changer cette structure peuvent donc être visualisées par zymogramme sur un gel contenant le polysaccharide. Si le gel contient de l'amidon, révélé par une coloration bleu-nuit, l'action des enzymes de branchement conduira à l'apparition de bandes rouges. Les enzymes de débranchement seront responsables des bandes bleu-pâle. La digestion amylolytique aboutit à une dégradation telle que l'interaction devient impossible avec l'iode (apparition d'une bande blanche).

Différentes expériences indépendantes ont montré que le profil d'activité des souches I7 et BAF J3 est identique à celui de la souche sauvage (**Figure 34**). Par contre, le profil d'activité de la souche BAF J5 se caractérise par une bande surnuméraire. Cette nouvelle bande provient du dédoublement de la bande correspondant à l'activité de débranchement (type isoamylase).

→ **Dans les souches I7 et BAF J3, les activités de débranchement, de branchement et l'activité amylolytique sont intactes.**

Seul le profil enzymatique de la souche BAF J5 est modifié. Il présente une bande surnuméraire correspondant à une activité de débranchement.

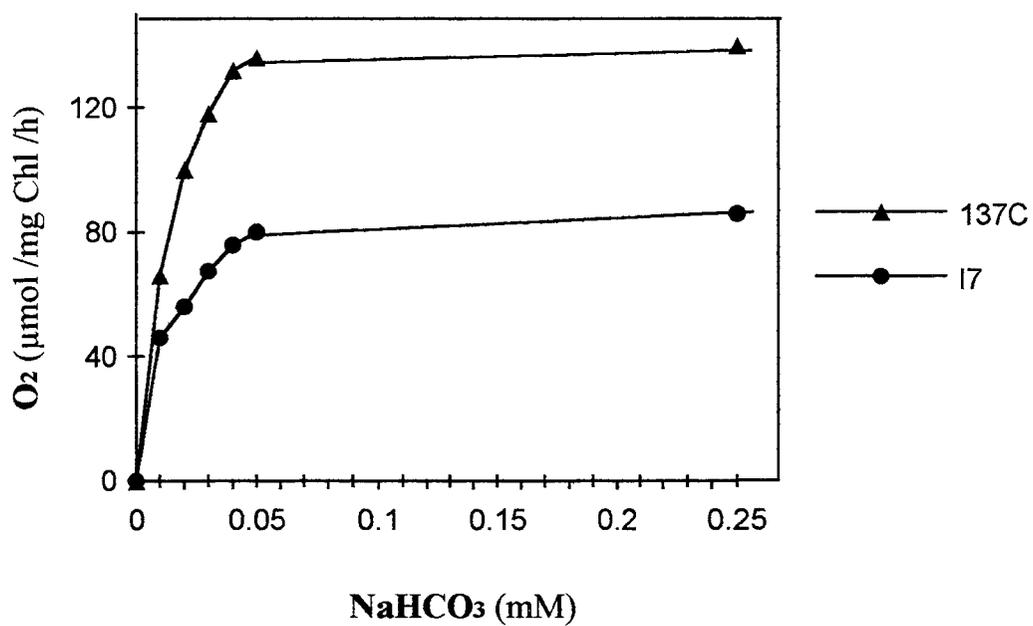


Figure 33 : *Efficacité de photosynthèse de C.reinhardtii en fonction de la concentration en carbone inorganique*

1.2.4.5 - Les capacités photosynthétiques des cellules

La capacité à fixer le CO₂ dans une culture synchronisée des souches mutantes I7 et sauvage (137C) a été déterminée dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Moroney.

Il semblerait que les capacités photosynthétiques de la souche porteuse de la mutation *sta1-1* soient égales à 50 % de la souche sauvage (**figure 33**).

La souche I7 a d'autre part été utilisée pour l'étude de la déstabilisation du complexe cytochrome b6/f (Bulté & Wollman, 1992). Ce phénomène est plus lent chez la souche porteuse de la mutation *sta1-1* que chez le sauvage. Notons que ce comportement est la conséquence de la chute de la quantité d'amidon et non un effet direct de la mutation.

1.2.4.6 - L'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

Une étude plus détaillée de l'activité de l'ADP-Glc PPase a été menée sur les trois souches mutantes retenues [*sta1-1*(I7), *staX* (BAF J3) et *staY* (BAF J5)]. Afin de vérifier que l'expression du phénotype mutant n'est pas dépendante des conditions de culture, l'activité de l'enzyme a été mesurée en extrait brut à partir des cellules cultivées en mixotrophie (acétate et lumière) dans un milieu non carencé et carencé en azote ainsi qu'en hétérotrophie (en absence de lumière) (**tableau 18**).

Notre étude de l'activité de l'ADP-Glc PPase comprend deux aspects :

- l'étude de l'activité en présence d'une concentration saturante en activateur (V_{max})
- la détermination du facteur d'activation ($V_{max} + [3PGA] / V_{max} - [3PGA]$).

Les résultats (**tableau 18**) indiquent que l'enzyme des souches I7 et BAF J3 est pratiquement insensible à l'activation alors que sa présence provoque l'augmentation de l'activité sauvage d'un facteur allant de 10 à 20. D'autre part, le facteur d'activation reste équivalent dans les trois conditions testées (mixotrophie, mixotrophie + carence azotée et hétérotrophie).

Signalons que selon les conditions de culture, des différences dans les niveaux d'activité de l'ADP-Glc PPase de la souche sauvage sont observées. Néanmoins, ces différences s'atténuent lorsque l'activité est exprimée non plus par milligramme de protéines mais par million de cellules. Il est difficile de conclure à une induction de l'enzyme en milieu carencé ; la précision de comptage cellulaire peut être remise en cause. Il reste cependant possible que l'activité augmente d'un facteur 2 à 3, au maximum, en carence azotée.

Souche et Génotype	Activité spécifique (U/mg)			Facteur d'activation (moyenne des 3 conditions)
	mixotrophie	mixotrophie -N	hétérotrophie	
137C (+)	0,040 ±0,005 (1,3.10 ⁻³)	0,13 ±0,01 (1,8. 10 ⁻³)	0,10 ±0,05	20 ±6
I7 (<i>sta1-1</i>)	0,007 ±0,001	0,020 ±0,01	0,012 ±0,02	1,5 ±1
BAF J3	0,010 ±0,002	0,025 ±0,08	nd	1 ±1
BAF J5	< seuil de détection	<seuil de détection	< seuil de détection	nd

Tableau 18 : *Activité spécifique et facteur d'activation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase mesurés en extrait brut.*

L'activité spécifique est mesurée en présence de 3PGA (2,5 mM) dans le sens de la dégradation de l'ADP-Glc, sur des extraits brut dessalés (par passage sur colonne Biogel P2-BIORAD). Le facteur d'activation correspond au rapport de la vitesse maximale en présence et en absence de 3 PGA.

Une unité correspond à la synthèse d'une micromole d'ATP à partir d'ADP-glucose en une minute. Les chiffres entre parenthèses représentent l'activité exprimée en unités par million de cellules et non plus par milligrammes de protéine.

Les résultats des dosages d'activité sur les cellules cultivées en mixotrophie sans azote et en hétérotrophie sont la moyenne de deux expériences tandis que dans le cas de la mixotrophie, en présence d'azote, au moins quatre expériences séparées ont été réalisées.

Une étude sur une culture synchronisée et un suivi de l'activité au cours du temps permettraient de déterminer si l'induction de l'ADP-Glc PPase est réelle.

1.2.4.7 - Conclusion

Deux conclusions principales ressortent de l'analyse des activités enzymatiques des souches mutantes.

→ Les souches I7 et BAF J3 semblent affectées uniquement dans l'activité ADP-Glc PPase. Le phénotype mutant se traduit dans les deux cas par une apparente insensibilité de l'enzyme vis-à-vis de l'activation par le 3PGA. Rappelons que l'activité de base de l'ADP-Glc PPase (en absence de 3PGA) de ces deux souches mutantes est équivalente à l'activité de la souche sauvage. **La chute de la quantité d'amidon est donc due exclusivement à une activation faible voir nulle de l'ADP-Glc PPase par le 3PGA.**

Malgré cette perte de sensibilité, l'activité résiduelle permet aux souches I7 et BAF J3 d'accumuler des quantités non négligeables de polysaccharide (1 à 5 $\mu\text{g}/10^6$ cellules). Une caractérisation de l'ADP-Glc PPase purifiée de la souche I7 nous apportera des informations plus précises sur les modifications des propriétés cinétiques de l'enzyme mutante (chapitre 3). D'autre part, l'étude de la structure de l'amidon résiduel de cette souche et de la souche BAF J3 fera l'objet du chapitre 5.

→ Dans le cas de la souche BAF J5, aucune activité ADP-Glc PPase n'a pu être détectée, que ce soit en absence ou en présence de l'activateur. **Donc, chez ce mutant BAF J5, l'absence d'amidon est imputable à l'absence de l'activité de synthèse de l'ADP-Glc.**

Néanmoins, il faut souligner que la mutation portée par la souche BAF J5 est pléiotrope : elle provoque non seulement la disparition de l'activité de l'ADP-Glc PPase mais également la modification des profils d'activité des amidon synthétases et de l'enzyme de débranchement.

En effet, des isoformes actives surnuméraires de l'amidon synthétase soluble et de l'isoamylase sont apparues. Dans les deux cas, la nouvelle bande traduit une masse moléculaire supérieure de la protéine.

1.3 - Analyse génétique des mutations portées par les souches I7, BAF J3 et BAF J5

Les résultats présentés ci-dessus indiquent clairement que les mutations des trois souches affectent l'activité de l'ADP-Glc PPase. La nature exacte de la lésion reste cependant à établir.

C. reinhardtii permet une analyse génétique rapide et relativement simple à mettre en oeuvre. Des expériences de complémentation nous conduiront à déterminer si les mutations portées par I7, BAF J3 et BAF J5 concernent un seul et même locus.

La mutation *sta1-1* portée par I7 est monogénique, nucléaire et récessive (Ball *et al.*, 1991). Elle est donc utilisable pour les tests classiques de complémentation en trans. Néanmoins, la sélection de souches diploïdes, qui représentent une faible part dans la population issue des croisements nécessite l'utilisation de marqueurs trophiques. Au laboratoire, nous utilisons l'auxotrophie vis-à-vis de l'acide *p*-amino benzoïque, le besoin en acétate et enfin l'impossibilité d'utilisation du nitrate comme source d'azote. Or, les souches I7, BAF J3 et BAF J5 sont porteuses des mêmes marqueurs. Nous avons donc été amenés à construire les souches qui nous permettront de sélectionner les diploïdes et donc d'effectuer ces tests de complémentation.

1.3.1 - Construction des souches

L'analyse, au hasard, des spores issues du croisement de la souche sauvage 37 (*mt⁺ pab2 ac14*) avec la souche I7 (*mt⁻ nit1 nit2 sta1-1*) a permis d'isoler des souches de génotype recherché, en particulier la souche NV 314 (*mt⁻ pab2 sta1-1*).

La souche NV 314 a donc été croisée avec les souches BAF J3 et BAF J5.

<p>(1) $mt^{-} pab2 sta1-1$ X $mt^{+} nit1 nit2 staX$ (NV 314) (BAF J3) \longrightarrow plusieurs souches diploïdes isolées baptisées PyI, PyII, etc..</p>

<p>(2) $mt^{-} pab2 sta1-1$ X $mt^{+} nit1 nit2 staY$ (NV 314) (BAF J5) \longrightarrow ni diploïdes, ni descendants méiotiques</p>

Malgré de nombreuses tentatives, le croisement de NV 314 avec BAF J5 n'a pas permis l'obtention de diploïdes ou de descendants méiotiques. Il semble que la souche porteuse de la mutation *staY* est incapable de former des gamètes compétents. Il est possible que cette apparente

stérilité soit liée à l'altération des flagelles nécessaires dans la reconnaissance sexuée. Nous avons donc eu recours à la fusion somatique. La souche NV 314 préalablement traitée à l'autolysine est fusionnée à la souche BAF J5 par la technique utilisant le PEG. Six clones indépendants ont ainsi été sélectionnés sur milieu minimum contenant du nitrate comme unique source d'azote. Etant donnés leurs marqueurs, les souches concernées proviennent nécessairement de la fusion des deux souches parentales. Ces souches porteuses à la fois de la mutation *sta1-1* et de la mutation *staY* ont été baptisées DP I à DP VI

Deux souches diploïdes de référence, un homozygote sauvage et un hétérozygote sauvage, ont également été construites par les croisements décrits ci-dessous.

$mf^{-} nit1^{-} nit2^{-} X mt^{+} ac14 pab2$ (137 C) (37)	\longrightarrow	Dwt (homozygote sauvage)
------------------------------------------------------------------------------------	-------------------	---------------------------------

$mf^{-} ac14 pab2 X mt^{+} nit1^{-} nit2^{-} sta1-1$ (A35) (I7)	\longrightarrow	ZCI (hétérozygote sauvage)
-----------------------------------------------------------------------------------------	-------------------	-----------------------------------

1.3.2 -Contrôle de la diploïdie

Avant d'entrer dans une étude détaillée des souches diploïdes retenues, il est possible d'effectuer un contrôle du volume cellulaire afin de confirmer la diploïdie. La **figure 34** montre l'exemple d'un profil de répartition des cellules selon leur volume. Les souches sélectionnées d'après leurs caractères trophiques ce sont toutes révélées diploïdes.

D'autre part, le contrôle de la présence d'un fragment du plasmide intégré dans le génome des souches BAF J3 et BAF J5a été effectué par hybridation moléculaire (§ 1.3.4.3). Ce contrôle constitue un élément supplémentaire en faveur de la nature diploïde des souches.

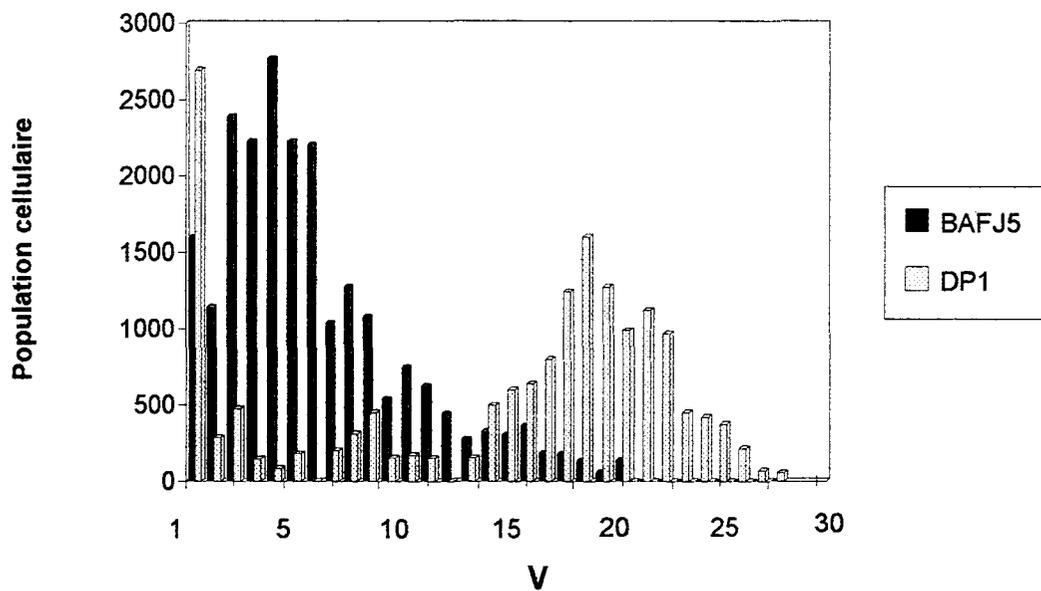


Figure 34 : *Volume cellulaire mesuré pour la souche sauvage BAF J5 et la souche diploïde hétérozygote mutant DP1.*

La valeur V correspond au diamètre d'ouverture utilisé pour le comptage et traduit donc le volume cellulaire.

La population cellulaire correspond à la variation du nombre de cellules comptées entre deux ouvertures successives.

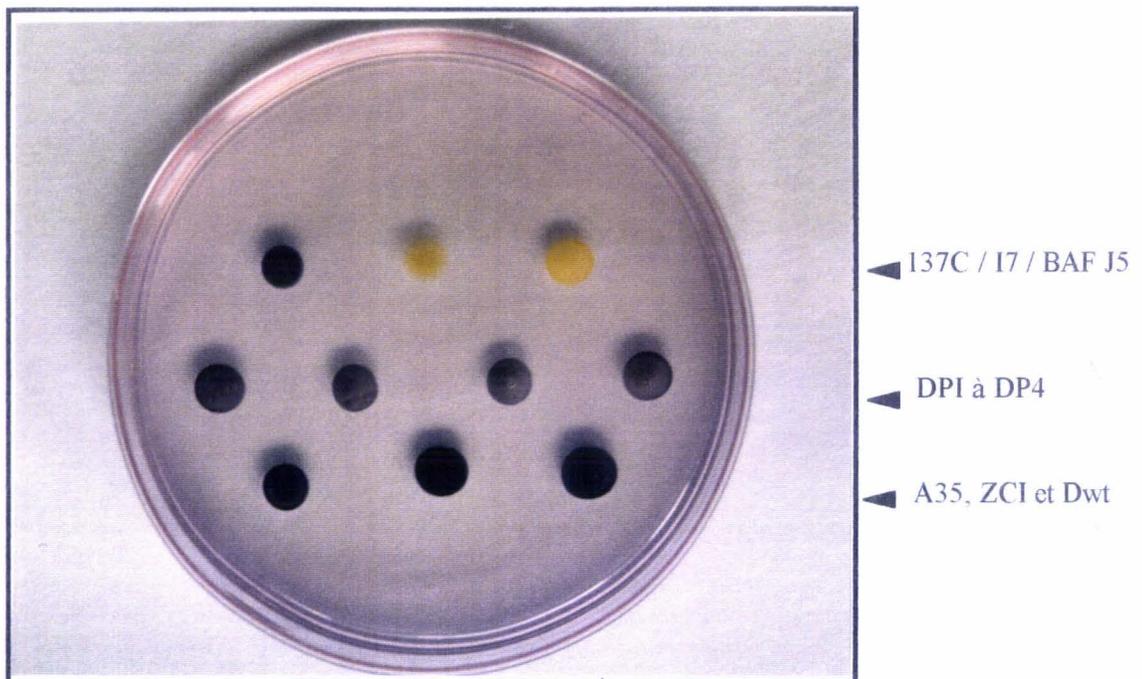
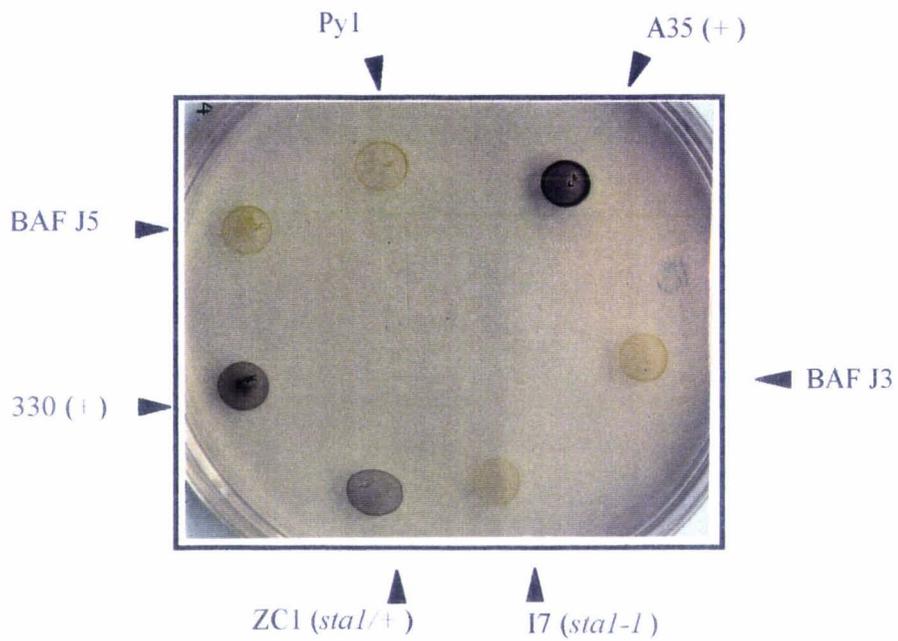


Figure 35 : *Phénotypes des souches cultivées sur milieu carencé en azote et colorées aux vapeurs d'iode*

1.3.3 - Caractérisation phénotypique des souches diploïdes

Les souches diploïdes cultivées sur un milieu carencé en azote sont exposées aux vapeurs d'iode.

Alors que les souches diploïdes issues du croisement de NV314 (*sta1-1*) et BAF J3 gardent une coloration jaune caractéristique d'un faible contenu en amidon, les souches porteuses de *sta1-1* et de la mutation de BAF J5 prennent une coloration noire témoignant du rétablissement de l'accumulation massive de polysaccharide (Figure 35).

Donc, dans les souches diploïdes, la présence simultanée des mutations *sta1-1* et de la mutation de BAF J3 ne permet pas le retour au phénotype sauvage. La mutation de BAF J3 est très probablement allélique de *sta1* ; elle est baptisée *sta1-2::ARG7*.

Par contre, le diploïde portant *sta1-1* et la mutation de BAF J5 accumule massivement l'amidon. Les mutations complémentent en trans, elles affectent donc des loci différents. Le locus muté chez BAF J5 est nommé *STA6* et la mutation *sta6-1::ARG7*.

Le phénotype "iode" est bien entendu insuffisant pour conclure à la complémentation telle que nous l'avons décrite, une étude plus détaillée sera donc effectuée.

1.3.4 - Caractérisation des souches diploïdes

1.3.4.1 - Activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

L'hétérozygote sauvage (ZC I) ne possède qu'une seule copie active de l'ADP-Glc PPase. Il présente une activité comparable mais légèrement inférieure à celle de l'homozygote sauvage (Dwt) (Tableau 19).

Souches	Activité en présence de 3PGA (U)	Facteur d'activation
137C (+)	0,035 ±0,002	12
Dwt (+/+)	0,058 ±0,012	11
ZC I (<i>sta1-1</i> / +) et (<i>sta1-2::ARG7</i> /+)	0,040 ±0,014	9
Py1 (<i>sta1-1</i> / <i>sta1-2::ARG7</i>)	0,007 ±0,003	1
DP I (<i>sta1-1</i> / <i>sta6-1::ARG7</i>)	0,046 ±0,021	10

Tableau 19 : Activité et facteur d'activation de l'ADP-Glc PPase des diploïdes mesurés en extrait brut.

Une unité (U) représente 1 μ mole de [14 C]-Glc-1-P libérée par minute et par mg de protéine. Le facteur d'activation correspond au rapport des activités en présence et en absence de 3PGA (2,5 mM).

La souche diploïde porteuse à la fois de la mutation *sta1-1* et *sta6-1::ARG7* (DP I) présente elle aussi, un V_{max} et un facteur d'activation équivalents à ceux de l'enzyme sauvage. Ces résultats vont dans le sens de l'hypothèse d'une complémentation en trans.

Néanmoins, une étude cinétique détaillée permettra d'écarter la possibilité de complémentation interallélique chez ce dernier. En effet, l'enzyme étant un hétérotétramère, on pourrait imaginer que la protéine issue de l'association des deux sous-unités mutées puisse présenter des caractéristiques de la souche sauvage mais en aucun cas des propriétés cinétiques en tous points identiques.

Comme c'est le cas chez les souches parentales, l'enzyme de la souche diploïde Py1 (*sta1-1/sta1-2::ARG7*) affiche une insensibilité à l'activation par le 3PGA.

1.3.4.2 - Les quantités d'amidon accumulé

Le diploïde homozygote sauvage accumule presque deux fois plus d'amidon que la souche haploïde correspondante (**Tableau 20**). Par contre, les souches diploïdes ne comportant qu'une seule copie active de l'ADP-Glc PPase accumulent environ 80 % de la quantité de l'homozygote sauvage. Ce résultat peut être mis en parallèle avec la diminution globale de l'activité de l'ADP-Glc PPase mesurée dans les souches hétérozygotes sauvages malgré un phénotype comparable sur boîte.

Souche	Quantité d'amidon (μg pour 10^6 cellules)	λ_{max} (nm)
137C (+)	35 ± 5	590
Dwt (+/+)	75 ± 10	590
ZC1 (<i>stal-1/+</i>)	60 ± 10	590
Py1 (<i>stal-1/stal-2::ARG7</i>)	2.5 ± 1	570
DPI (<i>stal-1/sta6-1::ARG7</i>)	55 ± 10	590

Tableau 20 : *Quantités et longueur d'onde au maximum d'absorption de l'amidon accumulé par les souches diploïdes*
La λ_{max} est reproductible à $\pm 5\text{nm}$

→ Dans les souches diploïdes, deux copies actives de l'ADP-Glc PPase sont requises à la synthèse optimale de l'amidon. La synthèse du nucléotide sucre est bien limitante à la synthèse du polysaccharide.

2 - PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE

2.1 - Purification de l'enzyme de la souche sauvage

Les enzymes de la souche sauvage et de la souche porteuse de la mutation *sta1-1* ont été purifiées selon le protocole décrit par Iglesias et coll. (1994).

La purification a été réalisée à partir de 30 g de cellules (poids frais), ce qui correspond à environ 35 litres de culture, récoltées en phase exponentielle de croissance. Le tableau ci-dessous résume les étapes de purification.

Etape de purification	Volume (ml)	Protéine (mg)	Activité (U)	Activité spécifique (U/mg)	Purification	Rendement (%)
Extrait brut	100	1520	58	0,04	1	100
Sulfate d'ammonium	18	450	46	0,10	2,5	79
DEAE-Sepharose	30	94	41	0,44	11	70
MonoQ	5	6	34	5,7	143	59
Green A	30	0,8	27,5	34	850	47

Tableau 21 : Etapes de purification de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase de la souche sauvage de référence (137C).

Une unité (U) représente la quantité d'enzyme capable de catalyser la synthèse de 1 mmol de [³²P]ATP par minute. La mesure de l'activité de l'ADP-Glc PPase non purifiée est obtenue via la détermination du niveau de pyrophosphorolyse du [³²P]PPi.

Le facteur de purification mesuré à l'issue de ces 4 étapes est de 850, pour un rendement de 47 %. En ajoutant, après la chromatographie sur Green A, un second fractionnement sur MonoQ, Iglesias et coll. (1994) ont atteint un facteur de 2033.

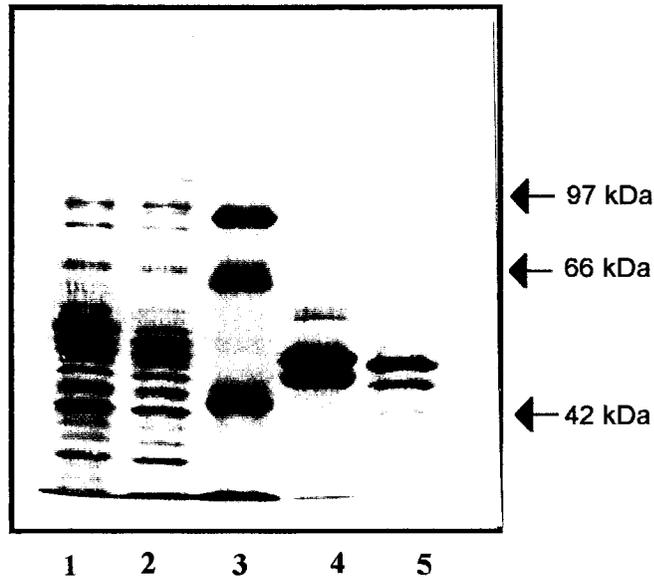


Figure 37 : Séparation des protéines lors des étapes de purification de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

- (1) Après précipitation sélective au sulfate d'ammonium
- (2) Après la chromatographie DEAE-Sepharose
- (3) Marqueur de poids moléculaire
- (4) Enzyme purifiée de la feuille d'épinard
- (5) Enzyme purifiée de *Chlamydomonas reinhardtii*

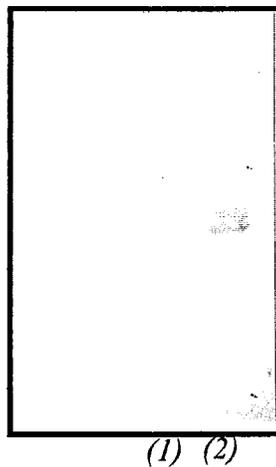


Figure 38 : Mise en évidence de l'ADP-glucose pyrophosphorylase par réaction avec un anticorps dirigé contre l'enzyme de la feuille d'épinard.

- (1) Enzyme de la souche sauvage de *Chlamydomonas reinhardtii*
- (2) Enzyme de la feuille d'épinard

L'ADP-Glc PPase de la souche mutante 17 n'a pas été détecté par cette technique.

L'ADP-Glc PPase purifiée s'avère stable. Son activité spécifique de 34 U/mg est de l'ordre de celle obtenue pour les enzymes purifiées des bactéries (Haugen *et al.*, 1976), cyanobactéries (Iglesias *et al.*, 1991) et plantes supérieures (Morell *et al.*, 1987).

La préparation d'enzyme semi-purifiée a été soumise à une SDS-PAGE. Plusieurs bandes ont été révélées ; deux d'entre elles possèdent une masse moléculaire correspondant à la masse moléculaire de l'ADP-Glc PPase purifiée de la souche sauvage par Iglesias et coll. (1994), (Figure 37). La réaction avec l'antiserum de lapin dirigé contre l'enzyme de feuille d'épinard nous a permis de confirmer que ce couple de bandes correspond bien à l'ADP-Glc PPase (Figure 38).

2.2 - Purification de l'enzyme de la souche mutante

Le protocole de purification est le même que celui utilisé pour l'enzyme de la souche sauvage. Néanmoins, l'activité totale de la préparation devenant trop faible, nous n'avons pu poursuivre la purification au delà de l'étape de l'étape utilisant la chromatographie monoQ. L'enzyme mutante est sans doute plus instable que l'enzyme sauvage. La caractérisation des propriétés allostériques a été effectuée à ce stade de purification.

Etape de purification	Volume (ml)	Protéine (mg)	Activité (U)	Activité spécifique (U/mg)	Purification	Rendement (%)
Extrait brut	200	1200	6	0,005	1	100
Sulfate d'ammonium	10	470	4,7	0,01	2	79
DEAE-Sepharose	56	55	3,6	0,065	13	70
MonoQ	3	0,6	0,48	0,8	160	8

Tableau 22 : *Etapes de purification de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase de la souche porteuse de la mutation sta1-1.*

A l'issue de la séparation sur MonoQ, le facteur de purification obtenu est de 160 mais le rendement n'est que de 8 %. L'activité totale chute à 0,5 U soit environ 90 % de moins que dans l'extrait brut alors qu'à cette étape de la purification, la préparation d'enzyme de la souche

Métabolites (1mM)	<i>C. reinhardtii</i>	<i>A. thaliana</i>
	Rapport de l'activité en présence et en absence du métabolite	
3PGA	>20	24
PEP	3,5	1,5
Fru-6-P	1,8	0,5
2,3-bisP-glycérate	2,0	0,5
Glc-6-P	1,8	0,4
Fru-1,6-P ₂	2,7	3,5
pyruvate	1	2,5
NADP ⁺	1,7	-
NADPH	2,0	-
ADP	0,6	1,2
AMP	1	1,7
PPi	0,6	-
Pi	0,06	<0,1

Tableau 23 : Effet de différents composés du métabolisme carboné sur l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *C. reinhardtii* (Iglesias et al., 1994) et de *A.thaliana* (Li et Preiss, 1992).

sauvage n'a perdu que 40 % de son activité totale. D'autre part, les quantités de protéines obtenues sont trop faibles pour permettre de visualiser clairement l'ADP-Glc PPase sur gel. Sa détection par réaction avec l'anticorps dirigé contre l'enzyme de la feuille d'épinard donne une réponse très faible, difficilement exploitable. En effet, les deux sous-unités de l'enzyme présentent une masse moléculaire et des propriétés électrophorétiques telles qu'il est difficile de les séparer correctement par électrophorèse (Iglesias *et al.*, 1994). A ce stade de l'étude, nous n'avons donc pas été en mesure de déterminer si les deux sous-unités de l'enzyme de la souche mutante sont intactes ou non.

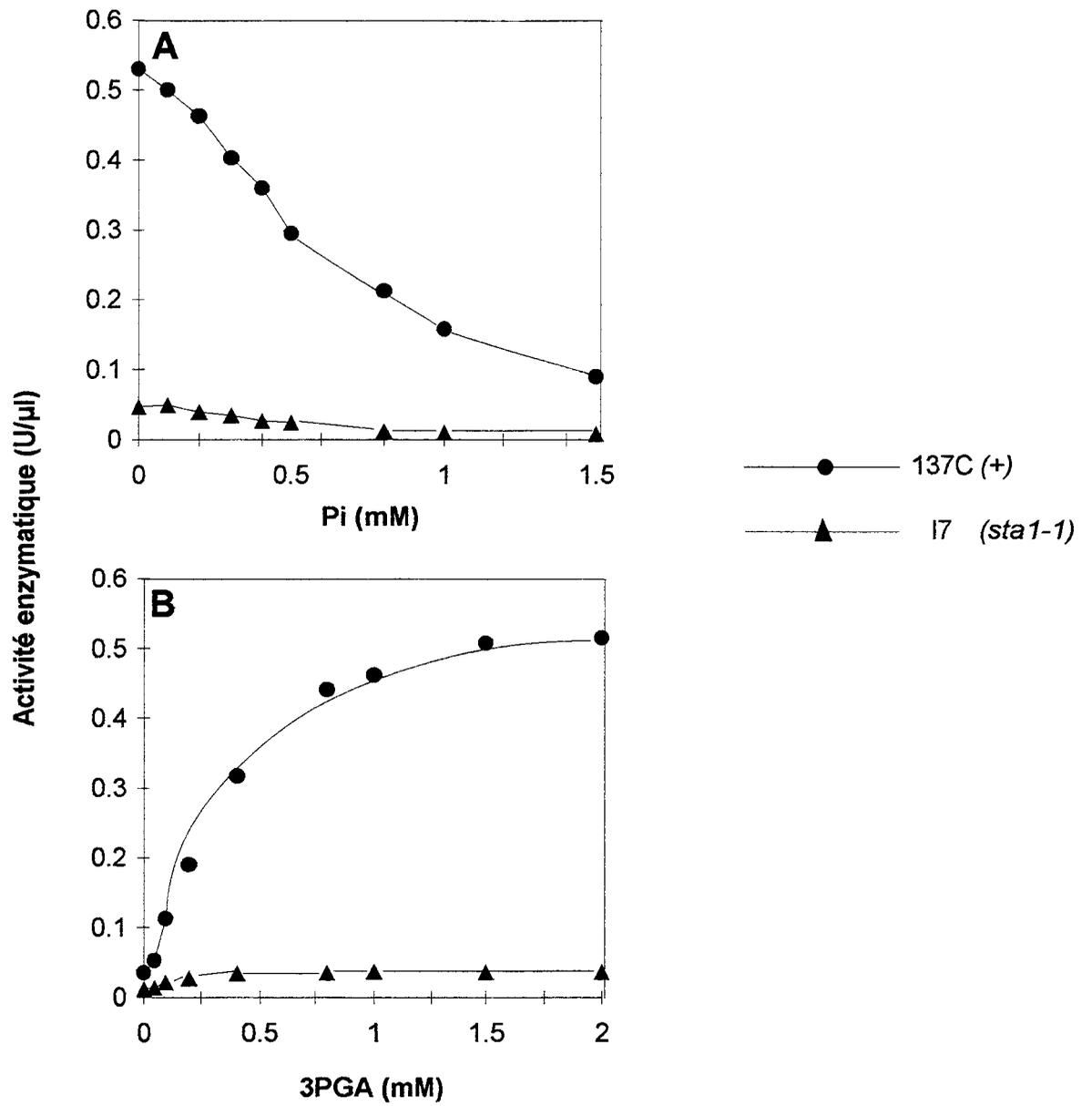
La préparation d'ADP-Glc PPase partiellement purifiée a uniquement été utilisée pour la détermination des propriétés catalytiques et allostériques de l'enzyme.

2.3 - Propriétés cinétiques de l'ADP-glucose pyrophosphorylase purifiée

Les techniques de dosage utilisées pour cette étude font appel aux propriétés de synthèse de [¹⁴C]ADP-Glc à partir du [¹⁴C]Glc-1-P. En effet, la préparation d'enzyme purifiée ne contient plus les activités pyrophosphatasiques qui venaient fausser l'estimation du dosage de l'activité de l'ADP-Glc PPase dans le sens de la synthèse d'ADP-Glc en extrait brut.

2.3.1 - Contrôle de l'activité par le 3-phosphoglycérate et le phosphate inorganique

Iglesias et coll. (1994) ont testé la sensibilité de l'ADP-Glc PPase à l'effet activateur ou inhibiteur de 16 molécules intervenant dans le métabolisme carboné. Les résultats de ces tests sont résumés dans le **tableau 23** ci-contre. A la concentration de 1 mM, l'ADP et le PPi inhibent l'activité de l'enzyme d'environ 40%, tandis que le Fru-1,6-P₂ et le PEP augmentent cette activité de 2 à 3,5 fois. Comme en extrait brut, il s'est avéré que le 3 PGA est le composé le plus efficace pour l'activation de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* et que le Pi est son meilleur inhibiteur (Ball *et al.*, 1991). Les résultats de Iglesias et coll. montrent en outre que l'ADP-Glc PPase de l'algue possède des propriétés similaires à celles de l'enzyme des cyanobactéries et des végétaux supérieurs. Les différences de sensibilité observées chez les enzymes de l'algue et d'*A. thaliana* (Li & Preiss, 1992) sont imputables aux caractéristiques de leurs métabolismes carbonés respectifs et également à leurs modes de fixation du CO₂. L'AMP, principal inhibiteur de l'ADP-Glc PPase bactérienne, est sans effet aussi bien sur l'enzyme de *C. reinhardtii* que sur celle des végétaux supérieurs.



Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés aux propriétés d'activation par le 3PGA et d'inhibition par le Pi des ADP-Glc PPases sauvage et mutante.

Paramètres cinétiques		137C (+)	I7 (<i>sta1-1</i>)
ACTIVATION par le 3PGA	A ₅₀	0,31 ±0,03	0,15 ±0,04
	n _H	1,8	2,0
	Facteur d'activation	15	3

INHIBITION par le Pi	En absence de 3PGA		
	I ₅₀	0,063 ±0,02	nd
	n _H	1,1	nd
	+ 2,5 mM 3PGA		
	I ₅₀	0,60 ±0,06	0,47 ±0,1
	n _H	1,6	2,4

Tableau 24 : Caractéristiques cinétiques de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase des souches sauvage et mutante I7(*sta1-1*).

Les valeurs obtenues pour l'ADP-Glucose pyrophosphorylase de la souche sauvage sont reproductibles à ± 10 %, tandis que celles de la souche mutante le sont à ± 25 %.

n_H représente la constante de Hill

Pour l'enzyme de la souche sauvage, la présence de 3PGA augmente la valeur de la concentration en Pi à partir de laquelle on observe 50 % du maximum d'inhibition (le I₅₀).

En ce qui concerne l'enzyme de la souche porteuse de la mutation *sta1-1*, la détermination de l'inhibition par l'orthophosphate en l'absence de 3PGA étant à la limite du seuil de détection, nous n'avons pu obtenir des valeurs reproductibles et donc significatives. Toutefois, en présence d'activateur, il semblerait que l'ADP-Glc PPase de I7 soit plus sensible à l'inhibition par le Pi que ne l'est l'enzyme de la souche sauvage. Ces résultats restent à préciser sur une nouvelle préparation d'enzyme car la marge d'erreur sur les valeurs concernant I7 est, dans cette expérience, de 25 %. Néanmoins, contrairement aux observations faites ultérieurement en extrait brut, nous avons montré que l'enzyme est sensible à l'inhibition par le Pi (voir plus sensible que l'enzyme sauvage)

L'activité de l'enzyme de la souche mutante I7, comme celle de la souche sauvage, est modulée par le 3PGA et le Pi. Les courbes de saturation en 3PGA et Pi présentent une allure

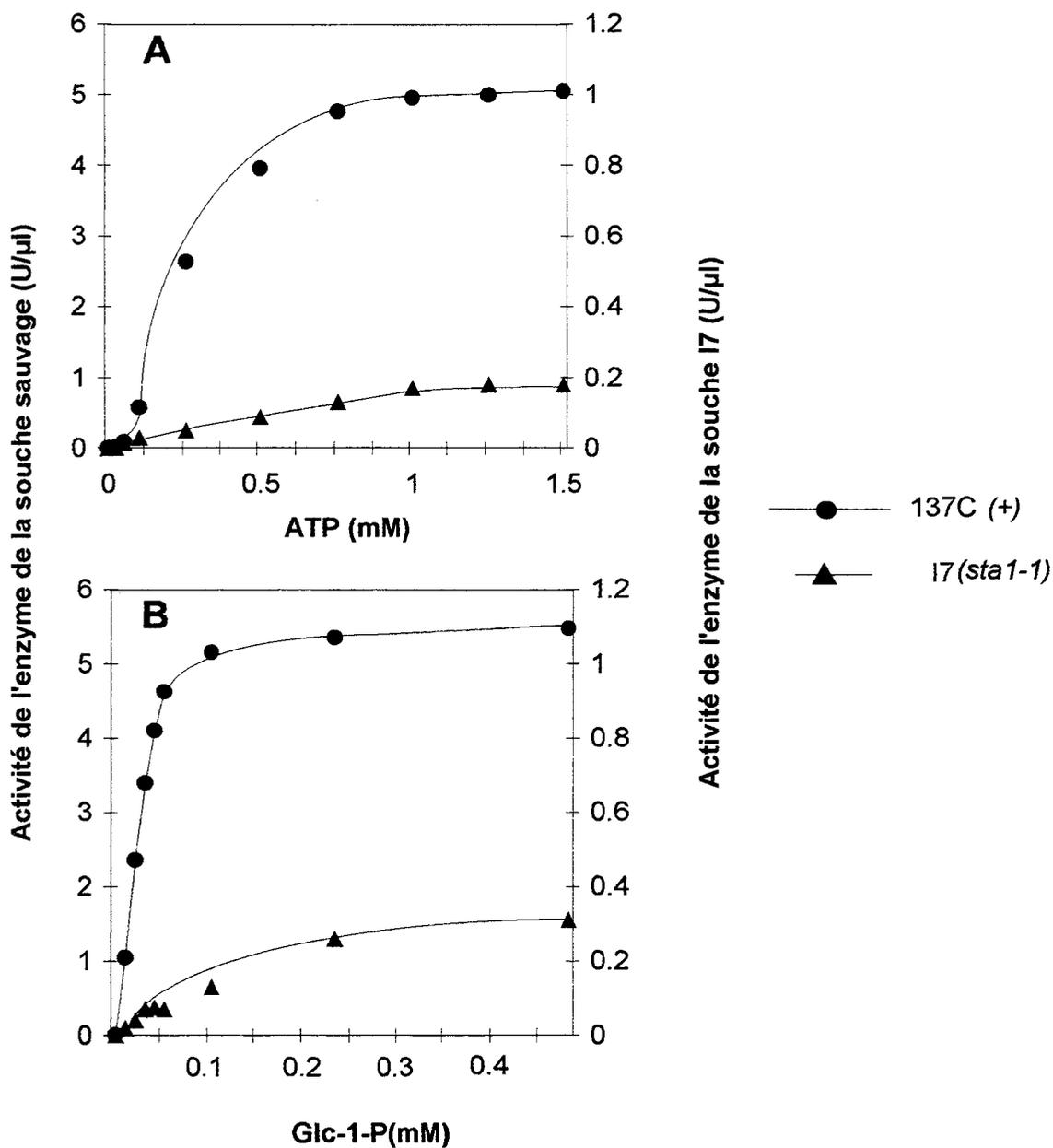


Figure 40 : Courbes de saturation en substrat de l'ADP-Glc PPase semi-purifiée de la souche sauvage et de la souche porteuse de la mutation *sta1-1*

similaire pour les deux enzymes, la valeur de n_H proches de 2 (**figure 39**). L'ADP-Glc PPase de la souche I7 atteint 50 % du maximum d'activation à 0,15 mM de 3PGA, valeur qui est du même ordre de grandeur que pour l'enzyme de la souche sauvage. Toutefois, le facteur d'activation maximale n'est que de 3.

CONCLUSION

L'efficacité de l'activation de l'ADP-Glc PPase de I7 est moindre par rapport à celle de l'enzyme de la souche sauvage. Ceci confirme donc pour l'enzyme purifiée l'essentiel des conclusions tirées lors de l'étude en extrait brut.

2.3.2 - Propriétés catalytiques

Nous avons poursuivi notre étude en mesurant les affinités de l'enzyme purifiée pour ses substrats.

Substrat	137C (+)		I7 (<i>sta1-1</i>)	
	$S_{0,5}$	n_H	$S_{0,5}$	n_H
Glc-1-P	0,19 ±0,02	1,5	0,12 ±0,09	1,3
Glc-1-P + 2,5 mM 3PGA	0,023 ±0,004	1,2	0,15 ±0,07	1,2
ATP	0,50 ±0,01	1,2	0,32 ±0,09	1,1
ATP + 2,5mM 3PGA	0,10 ±0,005	1,4	0,25 ±0,10	1,2

Tableau 25 : Propriétés cinétiques de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase des souches sauvage et mutante.

L'activité de l'enzyme est mesurée dans le sens de la synthèse d'ADP-Glc.

$S_{0,5}$ concentration en substrat permettant d'atteindre une vitesse de réaction égale à la moitié de la vitesse maximale

Que ce soit pour l'enzyme de la souche sauvage ou pour celle de la souche porteuse de la mutation *sta1-1*, les courbes d'activité en fonction de la concentration en substrat sont hyperboliques (**Figure 40**). En effet, les valeurs de constante de Hill (n_H) sont proches de 1.

En l'absence de 3 PGA, les affinités des ADP-Glucose pyrophosphorylase de I7 et de la souche sauvage sont comparables même si la valeur du $S_{0,5}$ de l'enzyme de I7 est légèrement inférieure.

Chez la souche sauvage, la présence du 3 PGA en concentration saturante diminue de 8 fois le K_m de l'ADP-Glc PPase pour le Glc-1-P et de 5 fois celui pour l'ATP. Par contre, l'activateur semble sans effet sur l'affinité de l'enzyme de I7 pour ces deux substrats.

2.3.3 - Conclusion

Le 3PGA, en augmentant l'affinité de l'enzyme pour les substrats de la réaction, présente des propriétés activatrices. Le mécanisme d'action proposé pour l'activation ferait intervenir une mise en conformation de l'ADP-Glc PPase favorable à l'utilisation du Glc-1-P et de l'ATP. D'autre part, il a été montré que le 3PGA augmente la valeur de $I_{0,5}$, c'est à dire diminue l'efficacité de l'inhibition par le Pi (Iglesias *et al.*, 1994). A la concentration de 2,5 mM, le 3 PGA multiplie par 10 la concentration en Pi pour laquelle on observe 50 % d'inhibition de l'activité. Inversement, le Pi augmente la valeur de $A_{0,5}$ c'est-à-dire la concentration pour laquelle l'enzyme atteint 50 % de son activité maximale. La compétition entre l'activateur et l'inhibiteur permet la modulation de l'activité de l'enzyme par le rapport 3PGA/Pi en plus d'une modulation par les quantités de ces mêmes effecteurs.

La mutation affectant le locus *STAI* a pour effet de diminuer l'efficacité de cette activation, sans doute en réduisant l'affinité vis-à-vis des substrats. En effet, les courbes d'activation des enzymes sauvage et mutante présentent une allure comparable.

Il est essentiel de remarquer que, mis à part la sensibilité à l'orthophosphate qui n'a pu être mesurée en absence de 3PGA, tous les paramètres cinétiques ($S_{0,5}$) de l'enzyme mutante sont comparables à ceux de l'enzyme sauvage en absence de l'activateur. De plus, les activités totales de l'enzyme en début de purification sont équivalentes pour les deux souches.

Puisque aucune autre activité enzymatique n'est modifiée par la mutation *sta1-1*, nous pouvons conclure que :

→ l'ensemble des altérations phénotypiques observées chez la souche mutante sont le réel fait du manque d'activation de l'enzyme par le 3PGA.

→ la baisse de synthèse de l'amidon serait due à une inhibition par l'orthophosphate qui n'est plus contrecarrée par le 3PGA.

3 - CLONAGE DE L'ADNc CORRESPONDANT AU GENE DE STRUCTURE DE LA GRANDE SOUS-UNITE DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE DE *C. REINHARDTII*

3.1 - Stratégie de clonage

La séquence des ADNc codant l'ADP-Glc PPase a été déterminée aussi bien dans les tissus de réserve que dans les tissus chlorophylliens de plantes supérieures ainsi que chez certaines bactéries. En nous basant sur l'alignement des séquences peptidiques proposé par Smith-White et Preiss (1992), nous avons sélectionné des régions hautement conservées à travers les différentes espèces dans chacune des sous-unités de la protéine, ceci en vue de dessiner des oligonucléotides utilisables pour l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN correspondant à l'enzyme chez *C. reinhardtii*. Certaines des régions conservées choisies ont été identifiées comme faisant partie des sites catalytique ou allostérique de la protéine. Ainsi, l'oligonucléotide JP94 est situé dans une région probablement impliquée dans l'activation de l'enzyme par le 3PGA.

Séquence peptidique	Séquence nucléotidique dérivée	Nom	F.D.*
FDDYWE	5'TWY SAY GRY TAC TGG GAG ^{3'}	<u>JP 91</u>	32
KIYVLTQF	5'AAG ATY TAC GTN CTB ACB GAG TT ^{3'}	<u>JP 92</u>	72
YWEDIGT (antisens)	5'VGT RCC RAT RTY CTC CCA GTA ^{3'}	<u>JP 93</u>	48
DKNARIG (antisens)	5'RCC RAT RCG VGC RTT CTT RTC ^{3'}	<u>JP 94</u>	96

Les abréviations utilisées sont les suivantes : R = A+G ; Y = C+T ; W = A+T ;

V = G+A+C ; B = G+T+C ; N = A+C+G+T ; S = G+C

**F.D. : Le facteur de dégénérescence correspond au nombre d'oligonucléotides différents présents dans le mélange*

3.2 - Synthèse d'une sonde

Dans un premier temps, les oligonucléotides ont été utilisés afin d'effectuer une PCR sur l'ADN génomique. Malgré les multiples conditions de réactions utilisées, aucune amplification spécifique n'a été obtenue. Cet échec peut être imputé à l'existence d'introns dans la région à amplifier ou à la richesse du génome de *C. reinhardtii* en GC.

Nous avons alors choisi d'amplifier un fragment d'ADNc à partir d'une banque de *C. reinhardtii*. Pour cela, deux couples d'amorces ont été utilisés : JP91/JP94 situées dans la région carboxyterminale et JP92/JP93 localisées dans le milieu de la protéine. La PCR menée sur 1 µl de la banque λ EXlox (10^9 pfu/ml) diluée au 5^{ème} a permis d'amplifier spécifiquement deux fragments d'une longueur coïncidant avec la longueur attendue. Le premier fragment généré en présence du couple JP91/JP94 présente une taille d'environ 400 bp tandis que la taille du second, obtenu avec JP92/JP93 est de 650 bp. Chacun de ces fragments a été à nouveau amplifié par PCR, déposé sur gel d'agarose et extrait afin de disposer de suffisamment de matériel pour vérifier l'homogénéité des bandes d'ADN et pour pouvoir effectuer un séquençage direct (sans passer par le clonage).

3.2.1 - Pureté des fragments de PCR

La digestion par différentes enzymes de restriction permet de vérifier si la bande observée sur gel est constituée d'une ou plusieurs espèces d'ADN.

Nous avons donc effectué une digestion totale de chacun des fragments par différentes enzymes coupant fréquemment (*PvuII*, *DdeI*, *BglI*, *AluI*). Les profils de restriction montrent que la bande de plus haut poids moléculaire est pure tandis que celle qui migre à 400 bp est un mélange d'au moins deux fragments d'ADN.

Seul le fragment d'environ 650 bp a donc été utilisé pour la suite du travail.

3.2.2 - Le séquençage direct du produit de PCR

Il est possible de séquencer un produit de PCR (double brin) sans l'avoir préalablement cloné dans un vecteur plasmidique. Le fragment d'ADN extrait du gel d'agarose par la technique du phénol à froid est soumis à une purification qui a pour but d'éliminer totalement les traces d'agarose et de phénol pouvant inhiber la réaction de séquence. La purification se fait grâce au kit Elu kick (Schleicher & Schuell). Des billes fixent de manière spécifique l'ADN qui, après des

lavages successifs, est relargué dans le surnageant. En employant les oligonucléotides de la PCR, le séquençage du fragment d'ADN est réalisable dans les deux directions. Une séquence d'environ 250 nucléotides a ainsi été obtenue à chaque extrémité du fragment. Nous l'avons, dans un premier temps, comparée à la séquence de l'ADP-Glc PPase d'*Anabaena* afin de vérifier qu'il ne s'agissait pas de contamination par l'ADN de cet organisme que nous utilisons comme témoin positif dans chacune de nos réactions de PCR.

La comparaison d'une partie de notre séquence avec les séquences contenues dans les banques de données EMBL et GenBank a confirmé qu'il s'agissait bien d'un morceau d'ADN apparenté aux gènes codant l'ADP-Glucose pyrophosphorylase.

3.3 - Criblage de la banque d'ADNc

Le produit de PCR de 650 bp identifié comme étant apparenté à l'ADP-Glc PPase. Il a été utilisé comme matrice pour fabriquer une sonde radiomarquée en vue de cribler la banque dont il provenait. Parmi les 250 000 plages de lyse criblées, 12 ont tout d'abord été sélectionnées pour leur capacité à s'hybrider avec la sonde. A l'issue de trois cycles de purification seules cinq d'entre elles ont été retenues comme réelles positives.

L'excision, *in vivo*, de λ EXlox donne naissance au plasmide pEXlox. Comme ce plasmide est peu approprié aux manipulations de séquençage, nous avons été amenés à sous-cloner les fragments insérés dans un autre vecteur. Le pBluescript-IKS a été choisi pour les nombreux avantages qu'il présente. Il est dérivé de pUC19 et peut être produit sous forme simple brin. Les insertions des cinq phages retenus, digérées par les enzymes de restriction *ApaI* et *EcoRI*, ont ainsi été sous-clonées aux sites correspondant de pB-IKS. Une carte de restriction sommaire et le séquençage de l'extrémité 3' ont permis de montrer que les insertions des plasmides pCA, pCG, pCM, pCU et pCX sont des formes partielles d'un même ADNc (**figure 41**). En effet, les sites de restriction du fragment inséré le plus court (insert n°5) sont présents dans les trois autres. D'autre part, la taille des fragments de restriction coïncide avec notre hypothèse. Enfin, la séquence de l'extrémité 3' est la même pour chacun d'entre eux. L'insertion n°1 présente quant-à elle une taille d'environ 350 paires de bases. La séquence de son extrémité 3' est différente de celle des autres fragments. Aucune phase ouverte de lecture n'est repérable sur la séquence complète de cette insertion. Elle a donc été abandonnée.

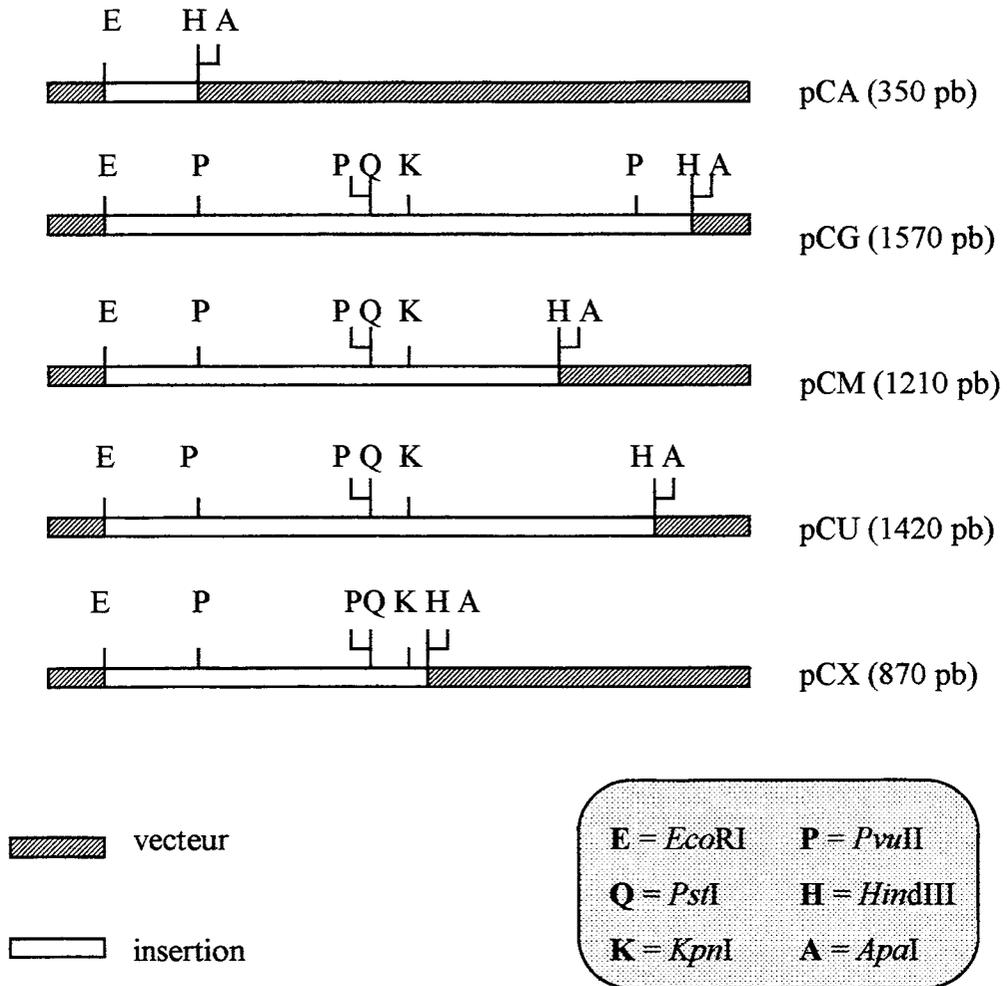


Figure 41 : Carte de restriction partielle des fragments d'ADNc sous-clonés dans le vecteur *pBluescript IKS*.

3.4 - Séquençage des ADN complémentaires

Les vecteurs pCG, pCM, pCU et pCX ont été utilisés pour le séquençage. D'autre part, une série de délétions à l'exonucléase III sur pCG a conduit à construire une collection de fragments de taille décroissante indispensable au séquençage. Par ailleurs, grâce aux sites de restriction uniques de l'insert, des sous-clonages ont permis le séquençage dans la direction opposée à celle obtenue par les délétions à l'*Exo* III. Enfin, quatre oligonucléotides synthétiques ont permis d'achever la séquence du fragment *Apa*I-*Eco*RI de pCG dans les deux directions. Ces différentes étapes sont représentées ci-dessous (**figure 42**).

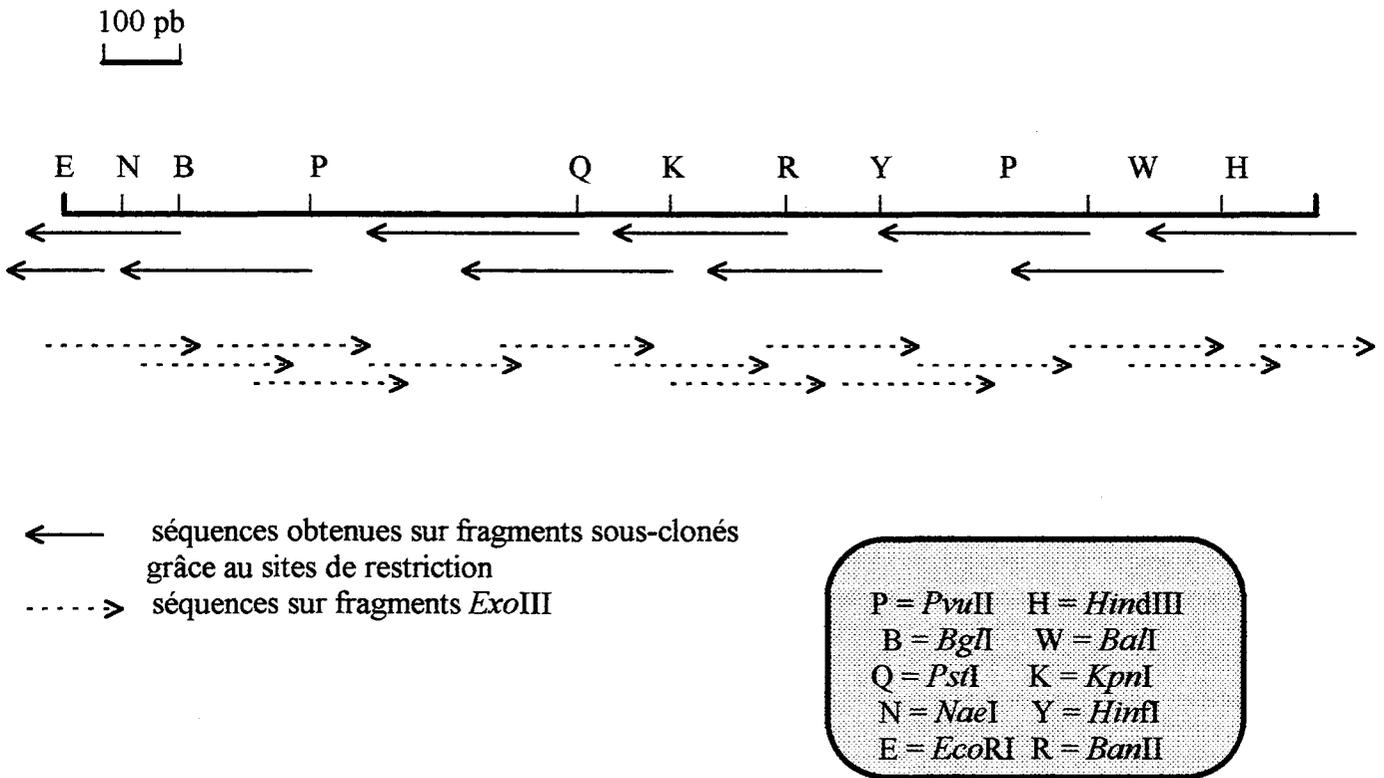


Figure 42 : Stratégie de séquençage et site de restrictions du fragment cloné dans le vecteur pCG

Les sous-clonages ont été réalisés dans le phagemide pBluescript KSII.
 La direction des flèches indique le sens de lecture des fragments d'ADN séquencés.

3.5 - Clonage de l'extrémité 5'

Le fragment n°2 (pCG) présente une phase ouverte de lecture de 1325 paires de bases, ce qui correspond à une protéine de masse moléculaire inférieure à la masse attendue, d'autant plus qu'un peptide de transit est susceptible d'augmenter la taille de l'ARNm. D'autre part, l'extrémité 5' du fragment d'ADN ne présente pas d'ATG, premier codon de la séquence de toute protéine native. Pour ces différentes raisons, nous avons tenté d'amplifier cette extrémité 5' manquante par la technique de RACE-PCR. Pour cela, 2 oligonucléotides complémentaires de la séquence et qui ont servi au séquençage décrit ci-dessus, ont été employés.

Séquence peptidique	Séquence nucléotidique dérivée	Nom
GTRLFP antisens	5'GGC ATC AGC AAG ATC TA ^{3'}	JP 138
SMGIYY antisens	5'ACG TAG ATG CCC ATG GA ^{3'}	JP 140

La stratégie de PCR utilisée est schématisée **figure 43 A**.

Un fragment d'environ 300 paires de bases a ainsi été amplifié spécifiquement à partir des ARN totaux. Il a été cloné et entièrement séquencé. Il contient une phase ouverte de lecture de 275 paires de bases, et chevauche la séquence de pCG de 36 paires de bases (**figure 43 B**). Il contient la séquence amino terminale EPATKAAT- qui correspond à la séquence amino terminale de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase mature de *C. reinhardtii* (déterminée par la dégradation d'Edman) (Iglesias *et al.*, 1994). La phase de lecture située en amont correspond donc très probablement au peptide de transit.

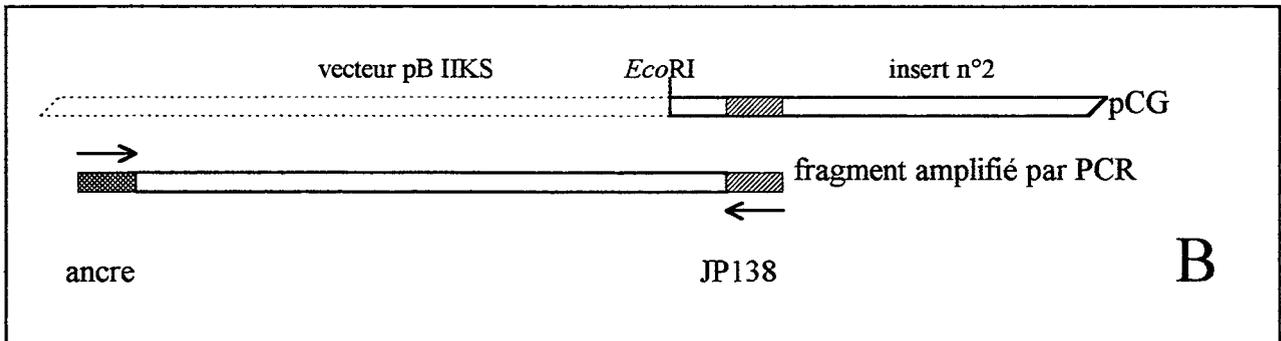
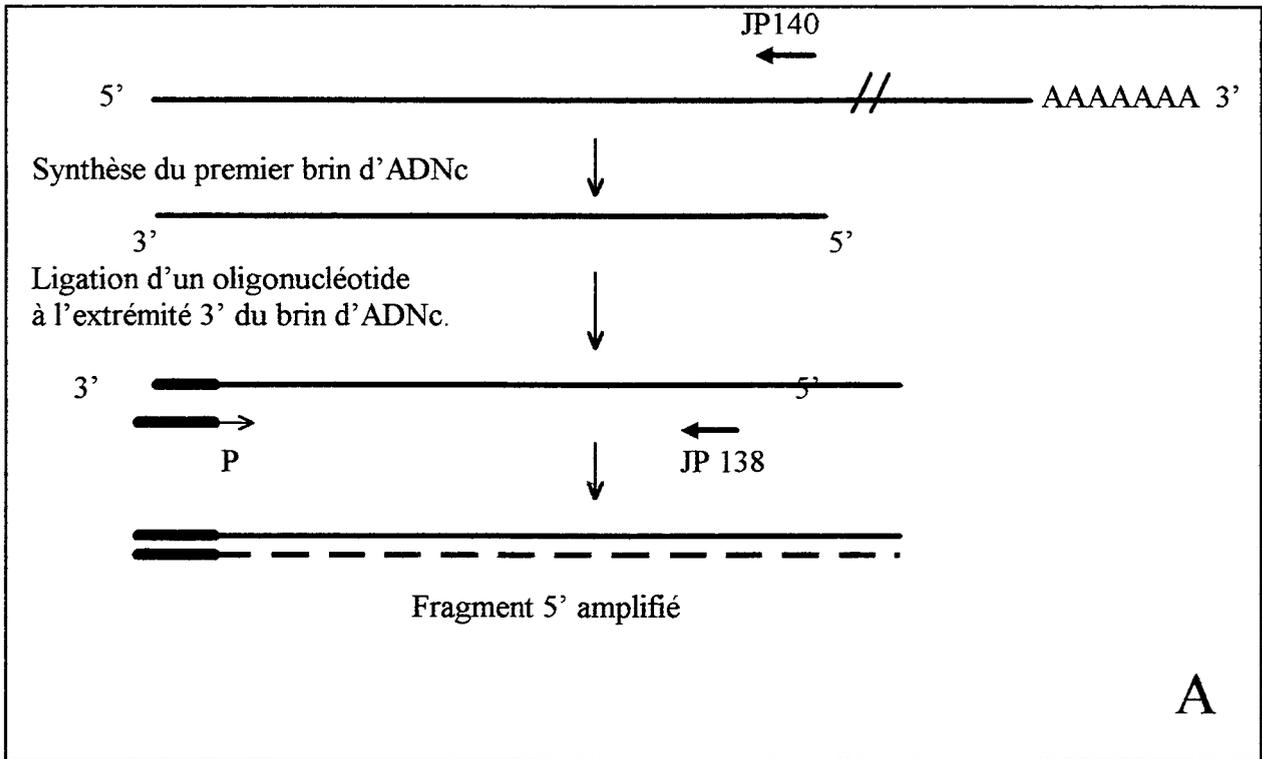


Figure 43 : Fragment d'ADN amplifié par RACE-PCR à partir d'ARN totaux.

A : Stratégie de PCR

B : Fragment amplifié (275 pb). Sa séquence chevauche celle de de l'insertion du vecteur pCG de 36 paires de bases.

Les amorces utilisées pour cette amplification sont d'une part, JP 138, oligonucléotide de 17 mer, complémentaire de l'extrémité 5' de l'insert n°2, et d'autre part un oligonucléotide complémentaire de l'ancre ajoutée à l'extrémité 5' de l'ADNc. Ce dernier est fourni avec le kit de RACE-PCR (Perkin Elmer-Cetus). L'amorces JP 140 est utilisée pour la synthèse du premier brin d'ADNc.

1 TTAATTTGTTCAACCATGGCCCTGGCCGTCCGCCCGCCCGTGGCCCTCGCGCGCCGCCGGGAAGGTCAACCTGCGCTCGGGGTCCGCCCGCGTGGCCGTGGTGGCCCTTACA
M A L A V R P A V A S R A A G K V N L R S G S A A A C R V V R L S 33
115 GGTGTCCGGCGAGCCCGCCACGAAGGCCGCCACGTTCTCGAACCAGATCTCGCGCCCTCGCAGACGGTGGACCGCGTCTCGTCTGATCATCGCCCTGAACACGTTCGACGTGGCCCTCGGACTCGAAGAACGTGTCCGGCCC
V S A (E P A T K A A) T F S N Q I S R P S Q T V D R V S S Y I A L N T S Q L A S D S K N V S A L 80
255 TGAAGTCGGTGTGGGATCATCGAATTCAGCGTACCGGCCACCCGCTGTTCCCGCTGACCAAGTCGCGGCCAAGCCGGCCGTGCCCATCGGCGGCGCTACCGCCTGATCGACGTGCCCATGAGCAACTGCATCAAC
K S V L G I I E F K R T **G T R L F P E** T K S R A K P A V P I G G A Y R L I D V P M S N C I N 126
395 AGCGGCATCAGCAAGATCTACATCTCTGACCCAGTTCAACTCGACCTCCCTGAACCGCCACCTGGGTTCGCGCCTACAACATGGGCAGCGGCGTGGCGTTCGGCGGCGACGGCTTTGTGGAGGTGCTGGCGGCCACCCAGAC
S G I S K I Y I L T Q F N S T S L N R H L G R A Y N M G S G V R F G G D G F V E V L A A T Q T 173
535 GCCCACCACAAAGGAGTGGTTCAGGGCACCGCCGACGCCGTGGCCAGTACAGCTGGCTGCTGGAGGACACCAAGAACCAGCCCATCGAGGACGTGCTCATCTGTTCGGCGGACCCACCTGTACCGCATGGACTACATGA
P T D K E W F Q G T A D A V A Q Y S W L L E D T K N R A I E D V L I L S G D H L Y R M D Y M K 220
675 AGTTCGTGAACCTACCACCGCAGACCAACGCCGACATCACCATCGGCTGCATCGCTACGGCTCGGACCGGCCAAGGAGTTCGGCTGATGAAGATCGACGAGAAGCGCGCTGACGTGCTTCGGCGAGAAGCCCAAG
F V N Y H R E T N A D I T I G C I A Y G S D R A K E F G L M K I D E K R R V T S F A E K P K 166
815 ACCCAGGAGGGCTGGACGCCATGAAGGTGGACACCACCGTGTGGCCCTGACCCCGAGGAGGCTGCTGAGAAGCCGTACATCGCTCCATGGGCATCTACGTGTTCAAGAAGTCGGTGTGCTGCTGCAGCTGCTCAACGA
T Q E A L D A M K V D T T V L G L T P E E A A E K P Y I A S M G I Y V F K K S V L L Q L L N D 313
955 CAGCTACGCCAAGGCCAACGACTTCGGTGGTGGATCATCCCTTCGGCCGCCAAGGACCACAACGTGGTGGCTACCCCTTCTACGGCTACTGGGAGGACATTTGGTACCATCAAGTCTTCTTCGAGGAGAACCCTCAAGT
S Y A K A N D F G G E I I P S A A K D H N V V A Y P F Y G Y W E D I G T I K S F F E E N L K S 360
1095 CGTGCCACCCCGCCACCTTCGAGTTCACGACCCCGAGTTCGCCCATCTACACCTCGCCAGCGCTGCTGCCGCCCGCCACCGTTCGCCAAGGTGACGGACGCCATCATCGCGCAGGGCTCGTTCGTGTCCGACTGC
C H P A T F E F Y D P Q S P I Y T S P A L L P P A T V R N C K V T D A I I A Q G S F V S D C 406
1235 ACCATCAACAACGCCGTTCATCGGCATCCGCTCCATCATCGGCCAGAAGTGCACCATCCAGGACGCCCTGGTGTGGTGGCGACTACTACGAGTTCGGACGACCAGCGGCCACGTTGCTCAAGAAGGGCGGCGTTCGGT
T I N N A V I G I R S I I G Q N C T I Q D A L V M G A D Y Y E S D D Q R A T L L K K G G V P V 453
1375 GGGCAITGGCGCAACAGCGTTCATCACCAACGCCATCATTGACAAGAAGCCCGGTTGGCAAGAATGTCAAGATCGTGAACAAGGAGGGCGTGAAGAGGCAGCGGAGAGGCCGAGGGCATCTACATCCGCTCCGGCA
G I G A N S V I T N A I I D K N A R V G K N V K I V N K E G V Q E A A R E A E G I Y I R S G I 500
1515 TACTGGTGTGCAACAAGGACCGCTGGTGGCGACAGGAACCACCATCTAAGCGCTGGGCTGCAATAGCTGAGCTGTTGGCGTGTAGGCTAGGCTGAGCGGCTGAGAAGCTGGCAGCTGGGCTAAGCGGCTGATGGGC
L V I D K D A L V P T G T T I *
1655 TAGTGTAGCTAGGTGGTGGCGCTAGCATGAACGCGGACGCCCTCCGGTTCAGACGCATACAGCTGCGGACGTCAACGTGCTTGTCTCCCTGGCTGCATCTTTGGCCAGCGCGCTGTGGGTTGTGTGTTTCGCCATGGAA
1795 CCGAGACGGACTTGACCGGACCGGAAACAGGCAGACGCGGGTGTGGCTTT

Figure 44 : Séquence nucléotidique et peptidique déduite de la grande sou-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *C.reinhardtii*
La séquence en caractère gras correspond au peptide de transit ; La séquence soulignée représente le fragment recouvert par la sonde PvuII utilisée pour les analyses en "Southern-blot". La séquence encadrée est celle obtenue par séquençage de la grande sous-unité de l'enzyme purifiée (Iglesias et al., 1994). La séquence grisée correspond à l'extrémité du fragment cloné dans pCG

3.6 - L'ADNc cloné correspond au gène de structure de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

3.6.1 - Nature du produit de l'ADNc cloné

Le produit correspondant à l'insertion de pCG et du fragment 5' réunis est une protéine de 515 acides aminés dont la masse moléculaire calculée est de 55 050 Da et dont la séquence est présentée dans la **figure 44**. Elle semble comporter un peptide de transit de 36 acides aminés, peptide permettant à la protéine d'être importée vers chloroplaste. La masse moléculaire de la protéine mature serait donc de 52 325 Da tandis que celle du peptide de transit serait de 3 568 Da (**Tableaux 26 et 27**).

Le codon d'initiation se situe probablement dans la séquence CAACCATG, séquence proche du consensus retrouvé chez les animaux et les plantes. Le codon stop est suivi d'une séquence 3' non traduite incomplète de 283 paires de bases. Nous n'avons pas été en mesure d'isoler la queue polyA, ce qui est sans doute lié à la technique de construction de la banque utilisée.

Acide aminé		Nombre de résidus	Pourcentage
Alanine	A	46	9,6
Cystéine	C	6	1,25
A.aspartique	D	29	6,1
A. glutamique	E	24	5,0
Phénylalanine	F	18	3,8
Glycine	G	35	7,3
Histidine	H	5	1,0
Isoleucine	I	41	8,6
Lysine	K	31	6,5
Leucine	L	32	6,7
Méthionine	M	8	1,7
Asparagine	N	24	5,0
Proline	P	20	4,2
Glutamine	Q	15	3,1
Arginine	R	21	4,4
Sérine	S	35	7,3
Thréonine	T	33	6,9
Valine	V	33	6,9
Tryptophane	W	3	0,6
Tyrosine	Y	20	4,2

Tableau 26 : *Composition de la protéine mature.*

Elle est constituée de 479 acides aminés, le premier résidu (acide glutamique) situé en position 37.

Masse moléculaire calculée : 52 325 Da

Acide aminé		Nombre de résidus	Pourcentage
Alanine	A	10	27,8
Cystéine	C	1	2,8
Glycine	G	2	5,6
Lysine	K	1	2,8
Leucine	L	3	8,3
Méthionine	M	1	2,8
Asparagine	N	1	2,8
Proline	P	1	2,8
Arginine	R	5	13,9
Sérine	S	5	13,9
Valine	V	6	16,7

Tableau 27 : Composition du peptide de transit (36 résidus)

Séquence du peptide signal : MALAVRPAVASRAAGKVNLRSGSAAACRVVRLSVSA

Masse moléculaire calculée : 3 568Da

3.6.2 - Analyse de la "pré-séquence"

La pré-séquence, encore appelée peptide de transit (TP pour Transit Peptide) permet l'importation spécifique des protéines vers l'un des organites de la cellule (entre autres, mitochondrie et chloroplaste). Le peptide de transit de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase décrit ci-dessus a été comparé à d'autres peptides de transit chloroplastiques (cTP). Il se différencie du cTP des plantes supérieures par sa petite taille. Alors que chez ces dernières, il présente une longueur allant de 60 à plus de cent acides aminés, chez *Chlamydomonas*, il est constitué en moyenne de 29 résidus (Franzén *et al.*, 1990). La pré-séquence mise en évidence pour la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase comprend, quant à elle, 36 acides aminés (Tableau 27).

La structure des cTP de *Chlamydomonas* est plus proche de celle des mTP (peptide de transit mitochondrial) des levures que de celle du cTP des plantes supérieures, non seulement par la taille mais également par la composition en acides aminés. Le peptide de transit de la levure est d'ailleurs interchangeable avec celui de *Chlamydomonas* (Hurt *et al.*, 1986). Néanmoins, il a été montré qu'une protéine portant le peptide de transit de la sous-unité γ de l'ATPase de *Chlamydomonas* peut être correctement importée dans les chloroplastes isolés de feuille de pois. La structure du cTP de l'algue serait "hybride" entre celle du mTP de levure et celle du cTP des plantes supérieures.

Les caractéristiques du peptide de transit de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase correspondent aux caractéristiques générales des cTP de *Chlamydomonas* qui sont au nombre de trois.

- Contrairement au cTP des végétaux supérieurs, la région centrale du peptide présente chez *C. reinhardtii* un haut potentiel à former une hélice α .

Dans le cas de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase, cette région est riche en alanine (28 %), valine (17 %), arginine (14 %) et serine (14 %).

- La région amino-terminale n'est pas chargée.

Alors que chez les végétaux supérieurs cette région est composée d'au moins 10 résidus, chez *C. reinhardtii*, dans tous les cas étudiés, il semblerait que la région amino-terminale non chargée se limite à 5 acides aminés (Franzén *et al.*, 1990).

- La région proche du site de clivage est susceptible d'adopter une structure en feuillet β .

Le consensus de cette région pour les cTP des végétaux supérieurs est

-(Val/Ile)-(X)-(Ala/Cys) \downarrow (Ala)-.

Chez *Chlamydomonas*, l'acide aminé situé après le site de clivage ne semble pas conservé.

Dans le cas de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase, la séquence est : -Val-Ser-Ala↓Glu-

La figure ci-dessous montre la séquence du peptide de transit de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase ainsi que celle de trois autres peptides de *C. reinhardtii*.

MALAVRPAVASRAAGKVNLRSGSAAACRVVRLSVSA↓EPATK (1) **AGP 1s**
MALVARPVLSARVAASRPRVAARKAVRVSA↓KYGEN (2) **PSI p28**
MAAVIAKSSVSAAVARPARSSVRPMAALKPAVKAAPVAAPAQANQ↓MMVWT (3) **Rubisco ss**
MAAMLASKQGAFMGRSSFAPAPKGVASRGLSQVVA↓GLKEV (4) **ATPase γ**

Figure 45 : Peptide de transit de différentes protéines chloroplastiques de *C. reinhardtii*.

Les exemples cités concernent des protéines destinées au stroma du chloroplaste. Les protéines destinées au lumen du thylakoïde portent une pré-séquence plus longue (environ 50 à 70 aa).

(1) : ADP-Glc PPase grande sous-unité (ce travail)

(2) : Sous-unité 28 du photosystème I (gène *psaH*) (3) : Petite sous-unité de la Rubisco

(4) : Sous-unité γ de l'ATPase (pour revue ; Franzen et al., 1989)

↓ : indique le site de coupure du peptide de transit, soit le premier acide aminé de la protéine mature.

Les acides aminés soulignés sont chargés positivement.

3.6.3 - Analyse des séquences nucléotidique et peptidique de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *C. reinhardtii*

Le clonage du gène codant la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* a été réalisé par homologies de séquence de régions de la protéine hautement conservées. Même si la fonction de toutes les régions conservées n'est pas déterminée, certaines d'entre elles sont maintenant connues. Des sites catalytiques ont été mis en évidence chez *E. coli* et chez les cyanobactéries tandis que des sites liant le 3PGA l'ont été dans l'enzyme de la feuille d'épinard et chez *Anabaena*. Les séquences correspondant à toutes ces régions se sont révélées conservées dans chacune des protéines étudiées.

Le site potentiel de liaison de l'activateur dans la petite sous-unité de la feuille d'épinard (*sl-51*) a été localisé par modification de la protéine grâce au pyridoxal phosphate (Morell et al., 1988). Une séquence similaire, à une position comparable, est retrouvée chez *C. reinhardtii* (Tableau 28). De même, un second site mis en évidence dans l'enzyme d'*Anabaena* est également présent dans la protéine de l'algue (Charng et al., 1994). Par contre, un

Sites protégés par le Fru-1,6-P₂

Sites protégés par l'ADP-Glc

potato tuber-s	-YP--K-----	KI--EGR----A---QGEQL	petites sous-unités
spinach leaf-51	-YP--K-----	KI---GR----A---KGEQL	
maize <i>bt-2</i>	-YP--K-----	KI--EGR----A---KGEQL	
<i>E. coli</i>	LKDLTNKRAKPAV	AVDENDKIIIEFVEKP .ANPP	
<i>Synechocystis</i>	-YP--KL-----	KI-AQGR-TD-S---RGKLR	grandes sous-unités
potato tuber-l	-FP--SRT-T---	KI-SRGRVVQ-A---KGFDL	
spinach leaf-54	-FP-.....---	K.....VLS-S---KGDDL	
maize <i>sh-2</i>	-FP--ST-T---	KF-SSGRVIQ-S---KGAAL	
<i>Chlamydomonas</i>	-FP--KS-----	KI--KRRVTS-A---KTQEA	

Sites catalytiques de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *E. coli*

	<u>site I</u> (3PGA-Pi)	<u>site II</u> (3PGA-Pi)	<u>site III</u> (3PGA)	
spinach leaf-51	SGIVTVIKDALIPSGTV	-----	D-----Q	petites sous-unités
potato tuber-s	-----II	--R-----	D-----Q	
maize <i>bt-2</i>	G-----L---TV	-R-----	N-----Q	
<i>E. coli</i>	E---L-TREM-RKL-HK	RCCV-DRACVP	N-YR-----TQ	grandes sous-unités
<i>Synechocystis</i>	N---V---NVT-AGTV-	-R-----	D-----Q	
potato tuber-l	---IIILEK-TIRD-TV	IRKCIIDKNAK	-----Q	
spinach leaf-54	---TVIF-N-T-KD-VV	IKDAI IDKNAR	KWFOGTADAVRK	
maize <i>sh-2</i>	---VIL-N-T-NECLV	-RNC---M---	G-----QDSI--	
<i>Chlamydomonas l.</i>	---LVID----V-T---	-TN-----	E-----AV	

Sites de liaison des effecteurs de l'ADP-Glc pyrophosphorylase de feuille d'épinard

Tableau 28 : Comparaison des sites actifs de la grande et la petite sous unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

troisième site potentiel détecté dans la grande sous-unité de la feuille d'épinard (*sl-54*) n'est conservé que chez la pomme de terre. Pourtant, on le retrouve dans la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* (Smith-White & Preiss, 1992). De plus, la séquence peptidique de la protéine de *C. reinhardtii* contient deux sites supposés intervenir dans la liaison du Glc-1-P et de l'ATP chez *E. coli* (Lee & Preiss, 1986), respectivement TSFAEKP et FRGTADA correspondant chez *C. reinhardtii* à IEFVEKP et YRGTADA (**Tableau 28**).

Au niveau nucléotidique, les gènes isolés de diverses plantes partagent peu de similitudes. Il n'existe que 59% d'identité entre l'enzyme exprimée dans la feuille et celle de l'albumen de blé. Par contre, 77% des nucléotides de la séquence de la petite sous-unité de l'enzyme de feuille d'épinard sont identiques à ceux de la séquence de la petite sous-unité de l'enzyme l'albumen de riz (Smith-White & Preiss, 1992). En règle générale, il existe plus de similitudes entre les séquences des petites sous-unités qu'entre celles des grandes. Au cours de l'évolution, ces dernières semblent avoir divergé de manière plus importante. D'ailleurs, les études des propriétés immunologiques confirment ces observations.

En ce qui concerne l'enzyme de *C. reinhardtii*, les résultats d'Iglesias et coll. (1994) que nous avons reproduits, montrent que l'antiserum de lapin dirigé contre l'ADP-Glc PPase de la feuille d'épinard inhibe l'activité de l'enzyme purifiée (**Figure 38**). L'antiserum dirigé uniquement contre la petite sous-unité de l'épinard réagit avec les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase de l'algue mais réagit de manière plus importante avec la petite sous-unité qu'avec la grande. Par contre, l'antiserum dirigé contre la grande sous-unité réagit uniquement avec la grande sous-unité de l'enzyme de *C. reinhardtii*. En conclusion, ces expériences montrent que les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* sont plus proches de la petite sous-unité des plantes supérieures que de la grande.

Sur la base des comparaisons des séquences peptidiques (**Tableau 29**), il apparaît que la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* partage plus d'homologies avec les petites sous-unités de la protéine des plantes supérieures (du blé, de la pomme de terre et du maïs) qu'avec les grandes sous-unités correspondantes. Notons que parmi les végétaux supérieurs, la séquence peptidique déduite la plus proche de celle de *C. reinhardtii* est celle de l'ADP-Glc PPase du tubercule de pomme de terre. Par ailleurs, le niveau d'homologie avec la protéine des cyanobactéries est encore plus important.

L'hypothèse selon laquelle les deux sous-unités composant l'ADP-Glc PPase proviennent d'un même gène qui se serait dupliqué au cours de l'évolution et dont les séquences auraient divergé est renforcée par l'analyse de la séquence de la protéine de *C. reinhardtii*.

Séquences utilisées pour la comparaison	Identité %	Identité et Spécificité (*)
Grande sous-unité (<i>sh-2, we7, pot-l, sl-54</i>)	38,8	32
Petite sous-unité (<i>bt-2, sl-51, rice, pot-s</i>)	43,5	56
Grande <u>ou</u> petite sous-unité ⁽¹⁾	46,9	-
Grande <u>et</u> petite sous-unités ⁽²⁾	32,6	
<hr/>		
Cyanobactéries (<i>Anabaena, Synechocystis</i>)	46,6	-
Entérobactéries (<i>E.coli, S. thyphimurium</i>)	22,1	-

Tableau 29 : Identités de la séquence peptidique de la grande sous-unité de *C. reinhardtii* (515 acides aminés) avec les séquences de l'enzyme des plantes supérieures et des bactéries.

sh-2 = grande sous-unité de l'enzyme de l'albumen de maïs (Bavhe et al., 1990) ;
we7 = grande sous-unité de l'enzyme de la feuille de blé (Olive et al., 1989) ;
pot-l = grande sous-unité de l'enzyme du tubercule de pomme de terre ;
rice = petite sous-unité de l'enzyme du grain de riz (Anderson et al., 1989) ;
bt-2 = petite sous-unité de l'enzyme de l'albumen de maïs (Bae et al., 1990) ;
sl-51 = petite sous-unité de l'enzyme de la feuille d'épinard,
sl-54 = grande sous-unité de l'enzyme de la feuille d'épinard (Smith-with et Preiss, non publié) ;
pot-s = petite sous-unité de l'enzyme du tubercule de pomme de terre (Müller-Röber et al., 1990).

(*) Parmi les résidus conservés, nombre de ceux spécifiques soit de la petite, soit de la grande sous-unité.

(1) résidus conservés dans l'une ou l'autre des sous-unités

(2) résidus conservés à la fois dans la grande et la petite sous-unité

En effet, de par la position de l'algue dans l'évolution, il était probable que l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* présente une structure homotétramérique. Or, comme chez les plantes supérieures, l'enzyme est composée de deux sous-unités différentes. De plus, la grande sous-unité, supposée être la moins conservée, partage de fortes homologues avec la petite sous-unité des plantes et avec la protéine bactérienne. Donc, l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* est à la fois proche de l'enzyme des cyanobactéries et de celle des plantes supérieures.

La séquence de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* met en évidence des régions conservées spécifiques des grandes sous-unités de l'enzyme des végétaux supérieurs tandis que d'autres sont spécifiques des petites sous-unités. La grande sous-unité de l'algue est assimilable à un "hybride" des séquences des deux sous-unités de l'enzyme des végétaux supérieurs. Les deux gènes issus de la duplication du gène bactérien auraient donc évolué chacun dans leur direction en conservant intactes des régions précises de la protéine. La petite sous-unité aurait subi une pression plus importante que la grande pour le maintien de sa séquence d'origine.

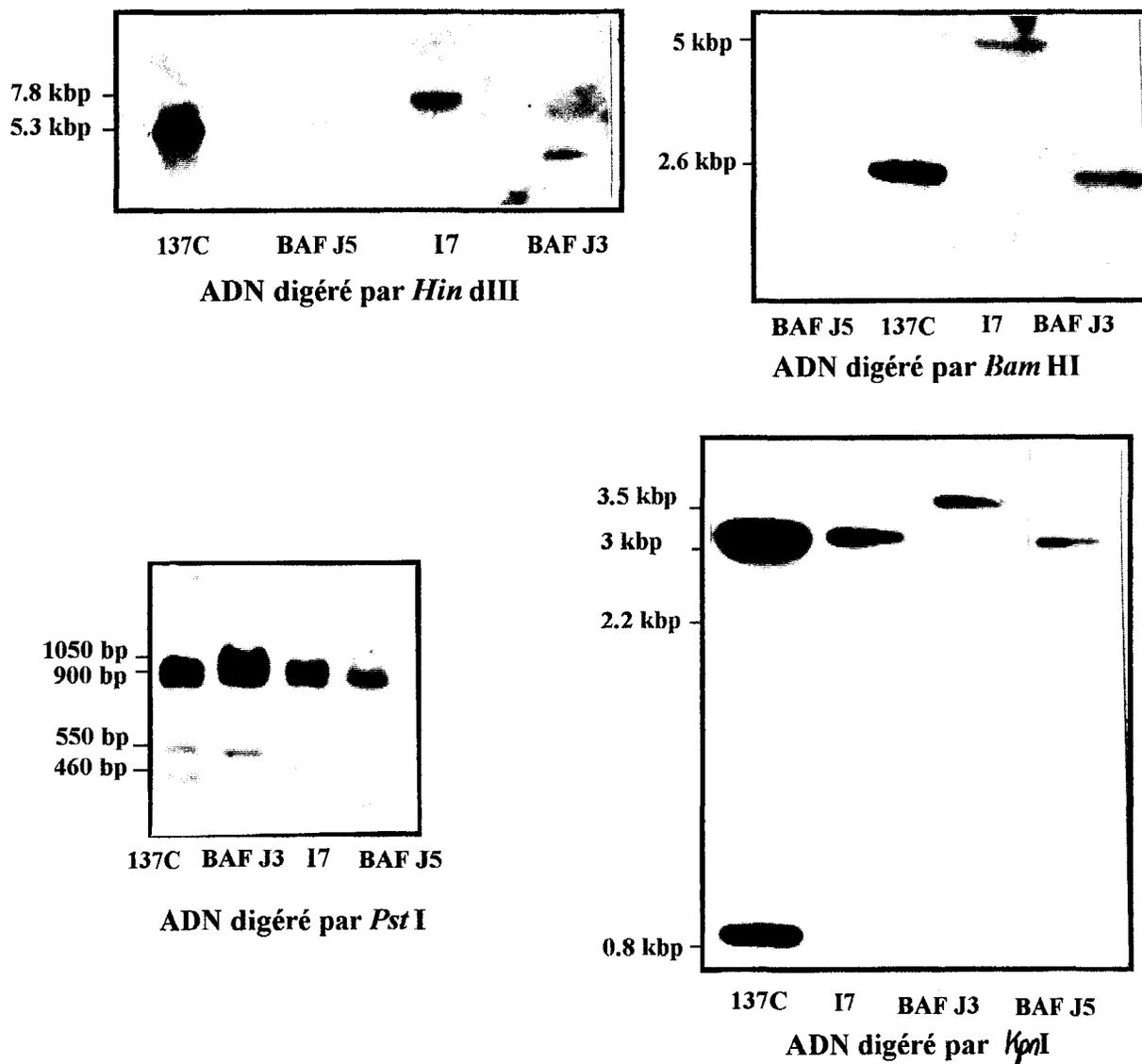


Figure 46 : Profils d'hybridation moléculaire du génome des souches sauvage et mutantes

La sonde utilisée est un fragment *pvu*II de 360 bp recouvrant une portion centrale de la région codante du gène de structure de la grande sous-unité

4 - CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES SAUVAGE ET MUTANTES

4.1 - Analyse de l'hybridation ADN/ADN génomique

Comme les analyses génétiques l'ont montré, parmi les trois souches mutantes défectueuses pour l'activité ADP-Glc PPase, deux sont touchées dans le même gène *STA1*, (I7 et BAF J3), tandis que la troisième (BAF J5), concerne le gène *STA6*.

La purification de l'enzyme de I7 ne nous ayant pas permis de déterminer l'identité de la sous-unité potentiellement affectée par la mutation *sta1-1*, une analyse de l'ADN génomique a été menée. Rappelons que les techniques de mutagenèse utilisées pour générer nos souches mutantes (RX, transformation) provoquent d'importants remaniements aux loci touchés.

Nous avons réalisé une hybridation moléculaire de l'ADN génomique des différentes souches avec un fragment *PvuII* de 360 paires de bases interne à la région codante du gène de la grande sous-unité de l'enzyme (voir **figure 44** pour la localisation de la sonde sur la séquence). Comme nous venons de le voir, la position de *C. reinhardtii* dans l'évolution ainsi que les propriétés immunologiques de chacune des sous-unités laissent présager une forte homologie entre elles. On s'attend donc à observer également une hybridation de cette sonde avec le gène codant la petite sous-unité. Tel semble être le cas puisque l'ADN des trois souches mutantes donne une réponse d'hybridation.

L'interprétation des profils d'hybridation s'est révélée complexe (**figure 46**).

→ La digestion par l'enzyme de restriction *HindIII* fait apparaître un signal très intense correspondant à un fragment unique de 5.3 Kb pour 137C. Ce signal est modifié dans son intensité et sa position chez tous les mutants. Donc, les délétions et remaniements au locus *STA6* ou *STA1* conduisent au maintien d'un signal d'hybridation unique de faible intensité et dont la longueur est nettement modifiée dans tous les cas. Les expériences de complémentation ont montré que les souches I7 (ou BAF J3) et BAF J5 sont mutées dans des loci différents. Or, aucune des souches mutantes ne présente le profil d'hybridation de la souche sauvage. Ceci ne peut se comprendre que si l'on suppose que le locus muté dans I7 (ou BAF J3) est sur le chromosome proche du locus muté dans BAF J5. Ce résultat est exactement celui qui serait attendu dans le cas de l'existence de deux cistrons très proches. Signalons que de tels regroupements de gènes ont déjà été mis en évidence chez *C. reinhardtii* (Fujiwara *et al.*, 1990).

→ La digestion par l'enzyme *Pst*I indique que les plus petits fragments de restriction révélés chez la souche sauvage sont, soit absents (460 pb) chez les souches porteuses des mutations *sta1-1* ou *sta1-2::ARG7*, soit absents ou de taille modifiée (substitution des fragments *Pst*I de 460 et 550 pb par un fragment unique de 360 pb) chez la souche porteuse de *sta6-1::ARG7*. Rappelons que la sonde que nous utilisons couvre une région allant des acides nucléiques numérotés 585 à 835 (**Figure 44**). Ce fragment d'ADN correspond aux acides aminés 190 à 310, soit à une région centrale de la protéine.

Les petits fragments révélés par l'hybridation couvrent nécessairement une portion interne à la région codante. Il appartient donc à des portions du gène de structure de la grande (ou de la petite) sous-unité.

→ La sonde comporte un site de restriction *Pst*I. En absence d'une séquence intronique dans la région codante homologue à la sonde, lors d'une digestion par l'enzyme *Pst*I, deux signaux doivent donc être visualisés. Or 4 bandes, de taille comparable par paires, sont présentes (1050 et 900 pb / 460 et 550 pb). Dans BAF J5, la disparition du signal de plus haut poids moléculaire s'accompagne de la disparition de la bande à 550 pb tandis que dans I7 et BAF J3, seul le signal correspondant à un fragment de 460 pb disparaît. Ces profils impliquent que chacun des loci *STA1* et *STA6* contiennent des séquences suffisamment apparentées au gène de structure de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase.

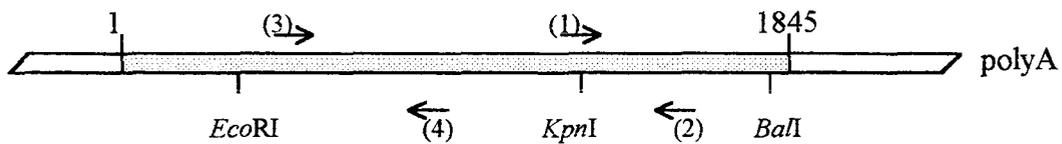
→ Nous ajouterons que les profils obtenus par hybridation de l'ADN génomique digéré par *Bam*HI ou *Kpn*I confirment nos résultats.

Nos résultats ne s'interprètent que si on suppose que les gènes *STA1* et *STA6* codent les deux sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

L'hybridation observée chez les deux types de mutants (mutés au locus *STA1* ou *STA6*) implique un important degré d'homologie nucléotidique entre les deux gènes.

4.2- Amplification d'ARNm

Les tentatives d'hybridation d'ARN totaux ou d'ARNm purifiés (Northern Blot) avec notre sonde ont échoués. Les ARNm codant chacune des sous-unités sont probablement peu abondants et donc difficiles à repérer par hybridation moléculaire.



 portion de l'ARNm clonée

	Nom de l'oligonucléotide	Position de la 1 ^{er} base	Séquence
(1)	JP 91	1035	5' TWY SAY GRY TAC TGG GAG ^{3'}
(2)	JP94 (antisens)	1436	5' RCC RAT RCG VGC RTT CTT RT ^{3'}
(3)	JP 137	398	5' GGC ATC AGC AAG ATC TA ^{3'}
(4)	JP 140 (antisens)	902	5' ACG TAG ATG CCC ATG GA ^{3'}

Figure 47 : Stratégie de PCR sur les ARN.

Le couple JP91 / JP94 permet d'amplifier un fragment d'environ 450 paires de bases tandis que le couple JP137 / JP140 donne un fragment d'environ 550 paires de bases. La signification du code des positions dégénérées est la suivante : R = A+G ; Y = C+T ; S = G+C ; W = A+T ; V = G+A+C

Nous avons donc choisi d'amplifier ces ARN par PCR. En utilisant des couples amorces synthétiques, l'un spécifique de la séquence de la grande sous-unité, l'autre dégénéré et spécifique de l'ADP-Glc PPase (JP137/JP140 et JP91/JP94), deux fragments d'ADN de taille attendue ont été amplifiés à partir des ARN de la souche sauvage ainsi que des souches I7 et BAF J3 (**Figure 47**). Ces fragments d'ADN ont été clonés et séquencés. Les alignements de séquence ont montré une parfaite homologie des deux fragments des souches mutantes avec ceux de la souche sauvage et de la séquence de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase. Par contre, la séquence du matériel amplifié à partir des ARN de la souche BAF J5 ne présente aucune similitude avec les séquences de l'ADP-Glc PPase connues. Puisqu'il apparaît que les séquences de l'ARN messager codant la grande sous-unité de l'enzyme sont intactes dans les souches mutées au locus *STAI*, *STA6* correspond nécessairement au gène de structure de cette grande sous-unité.

→ *STAI* serait le gène de structure de la petite sous-unité tandis que *STA6* serait le gène de structure de la grande sous-unité.

Souche	Quantité d'amidon (%)	λ_{\max} (nm)
137C (+)	100	590
I7 (<i>sta1-1</i>)	5	570
BAF J3 (<i>sta1-2::ARG7</i>)	5	570
BAF J5 (<i>sta6-1::ARG7</i>)	0,1	540
18B (<i>sta2-1</i>)	100	550

Tableau 30 : *Quantités d'amidon accumulé et longueur d'onde au maximum d'absorption.*
100 % représentent la quantité d'amidon accumulé par la souche de référence
137C soit 35 à 45 μg pour 10^6 cellules
La λ_{\max} est reproductible à $\pm 5\text{nm}$

5 - ANALYSE STRUCTURALE DE L'AMIDON RESIDUEL DES SOUCHES MUTANTES I7, BAF J3 ET BAF J5.

Au cours des chapitres précédents, nous avons montré que la chute de l'accumulation d'amidon dans les souches porteuses des mutations *sta1-1* (I7) et *sta1-2::ARG7* (BAF J3) est uniquement due à l'altération des propriétés de l'ADP-Glc PPase. En absence de la petite sous-unité, l'enzyme conserve une activité de base comparable à l'enzyme sauvage. Néanmoins, elle ne peut être activée par le 3-phosphoglycérate. Cette insensibilité à l'activation se traduit par la chute de la quantité d'amidon mis en réserve dans les cellules à 5-10 % de la quantité de la souche sauvage.

Qu'en est-il de la structure du polysaccharide résiduel ?

Bien que faibles, les taux de synthèse d'amidon dans les souches I7 et BAF J3 restent suffisants pour permettre la détermination de la structure du polysaccharide. Environ 20 mg d'amidon suffisent à l'étude décrite dans ce chapitre. Ces 20 mg ont été extraits à partir de 15 litres de culture de chacune des souches mutantes. Notons que l'analyse de l'amidon photosynthétique des souches mutantes n'est pas réalisable du fait des trop faibles quantités de polysaccharide disponibles.

5.1 - Structure de l'amidon de réserve

La longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}) du polysaccharide passe de 590 nm pour l'amidon de la souche sauvage à 570 nm pour celui des souches porteuses d'une mutation au locus *STAI* (tableau 30). Or, un déplacement de la λ_{\max} vers des longueurs d'onde plus courtes est caractéristique, chez les végétaux supérieurs, des mutants de type *waxy*. Ceux-ci sont défectueux pour l'activité amidon synthétase liée au grain (GBSS) et l'amidon qu'ils accumulent est dépourvu d'amylose. Une souche mutante de phénotype équivalent a été isolée chez *C. reinhardtii* (Delrue *et al.*, 1992). L'amidon de cette souche mutante 18B (*sta2-1*) présente une λ_{\max} de 550 nm.

Pour détecter un éventuel appauvrissement en amylose, les différents constituants de l'amidon des souches I7 et BAF J3 ont été séparés par chromatographie de tamisage moléculaire.

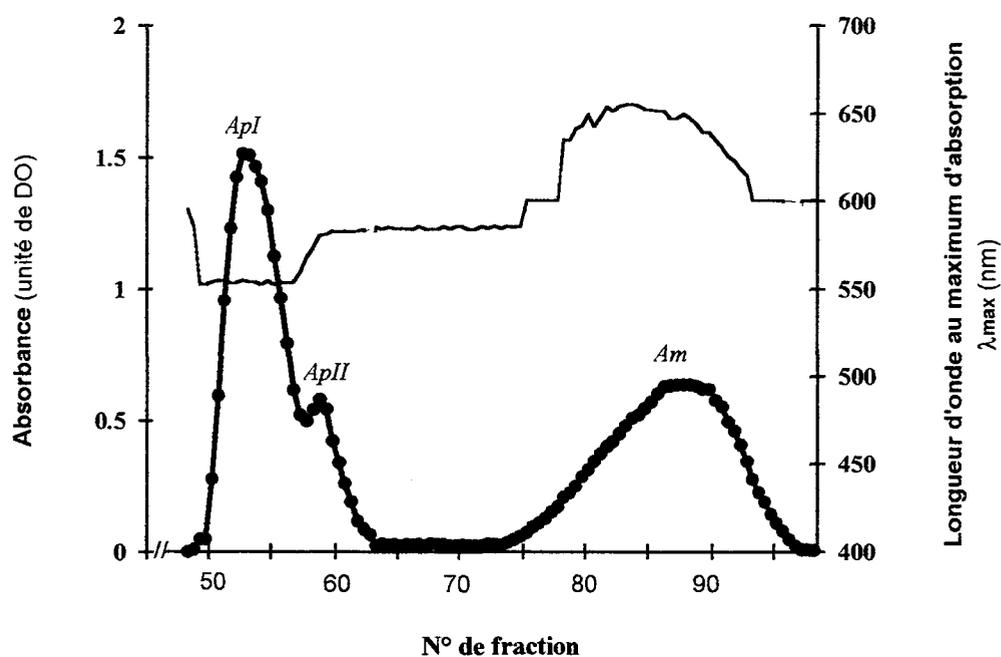


Figure 48 : Profil de séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie de tamisage moléculaire (TSK-HW 75)

- Absorbance du complexe polysaccharide/iode mesurée sur chacune des fractions de 3 ml éluées de la colonne
 - λ_{max} : longueur d'onde au maximum d'absorption des complexes polysaccharide/iode, mesurée sur chaque fraction
- ApI : amylopectine de type I ; ApII : amylopectine de type II ; Am : amylose

5.1.1 - Séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie de tamisage moléculaire

Le profil d'éluion obtenu à partir de l'amidon issu de la souche sauvage cultivée en milieu carencé en azote présente trois pics principaux caractéristiques de l'amidon de *C. reinhardtii* mais également du maïs (**Figure 48**). L'amylopectine est éluee sous forme de deux pics. Ces deux matériels se différencient à la fois par leur taille et leur structure comme le témoignent les λ_{\max} qui sont respectivement 550 et 590 nm. Le troisième pic, plus large, est constitué de longues chaînes peu branchées ; il s'agit des molécules d'amylose. La λ_{\max} de cette population s'étend essentiellement entre 620 et 650 nm.

Le profil d'éluion de l'amidon extrait des souches I7 et BAF J3 cultivées en milieu carencé en azote se caractérise par un pic unique d'amylopectine, de haut poids moléculaire, dont la λ_{\max} est située aux alentours de 570 nm (**Figure 49**). Après délipidation et séparation non plus sur TSK-HW75 en DMSO, mais sur colonne de Sepharose CL2B dans la soude 0,1N, le profil retrouvé est le même, l'amylose est complètement absent.

Le profil d'éluion observé dans le cas des souches mutantes est similaire à celui de l'amidon sauvage en milieu non carencé et en phase exponentielle de croissance (Libessart *et al.*, 1995). Dans de telles conditions, l'amidon accumulé est dit "photosynthétique" par opposition à l'amidon de réserve accumulé en milieu carencé.

→ L'amidon des souches défectueuses pour l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase est dépourvu d'amylose. De plus, la λ_{\max} de l'amylopectine est déplacée, ce qui montre que sa structure est probablement modifiée.

5.1.2 - Confirmation de l'absence d'amylose dans les souches mutantes I7, BAF J3 et BAF J5

La méthylation des groupements hydroxyl du glucose permet de différencier les résidus situés en bout de chaîne, à l'intérieur ou encore au point de jonction entre deux chaînes. Elle apporte donc des renseignements sur la fréquence des points de branchement et sur la longueur des chaînes glucosidiques. La présence d'amylose se traduit par une augmentation de la proportion de glucose engagés dans une liaison α -1,4. Nous avons donc utilisé cette approche pour confirmer l'absence d'amylose dans l'amidon des souches mutantes.

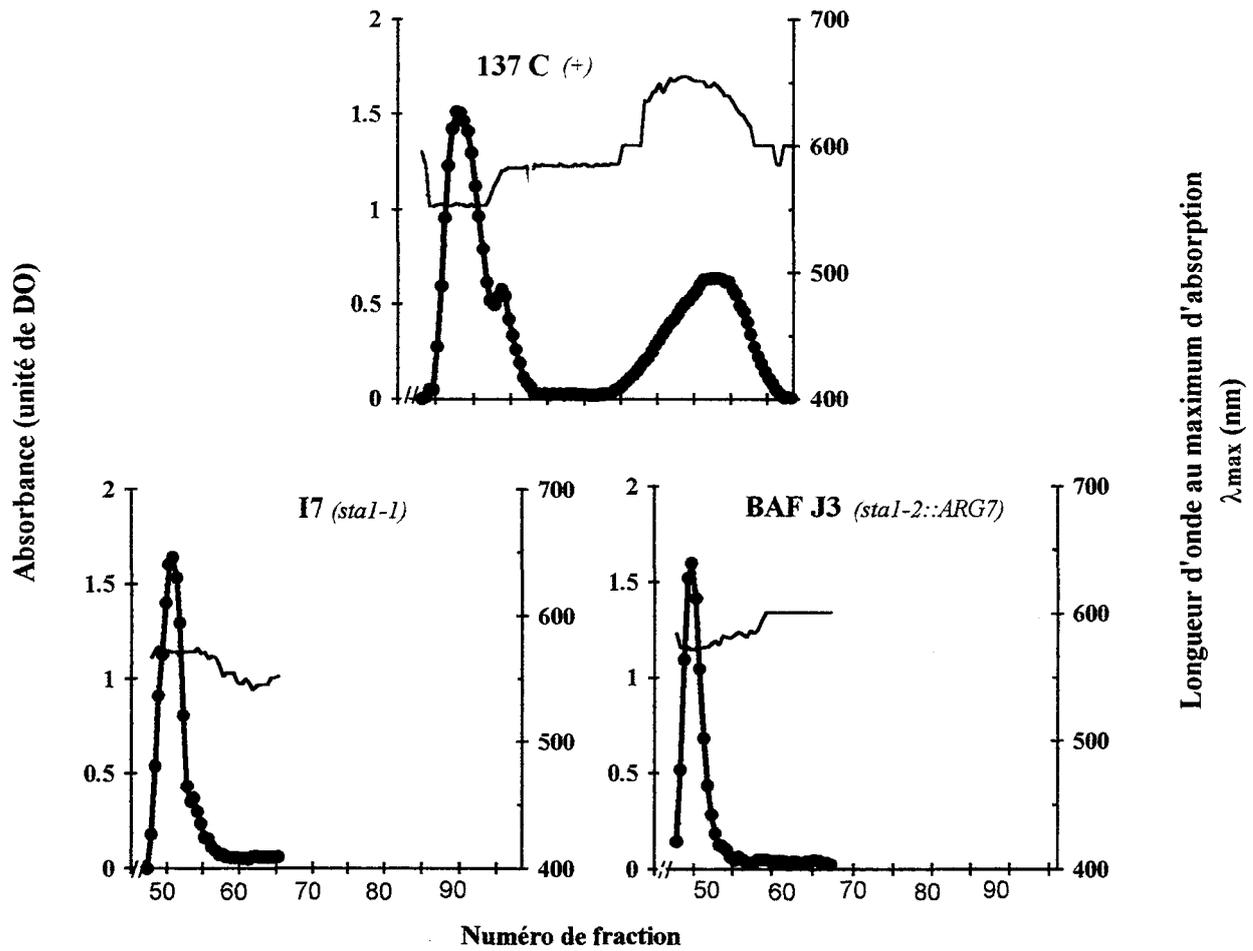


Figure 49 : Fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire de l'amidon de réserve des souches 137C, I7 et BAF J3 (gel TSK-HW 75)

—●— Absorbance du polysaccharide complexé à l'iode

— Longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe polysaccharide/iode

Souche	Génotype	λ_{\max}	2,3,4,6 Glc	2,3,6 Glc	2,3 Glc
137C	(+)	590	0,8	31	1
I7	(<i>sta1-1</i>)	570	0,9	17	1

18B	(<i>sta2-1</i>)	550	0,9	19	1

Tableau 31 : Distribution des molécules de glucose au sein de l'amidon des souches sauvage, mutante I7 (défectueuse pour l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase) et 18B (dont l'activité amidon synthétase liée au grain est altérée).

L'amidon provient de cellules cultivées en conditions de carence azotée.

La λ_{\max} représente la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe polysaccharide-iode. Elle est exprimée en nanomètres ; elle est reproductible à $\pm 5\text{nm}$.

Les 2,3,4,6 Glc; 2,3,6 Glc; 2,3 Glc sont les éthers de méthyl dérivant respectivement des résidus de glucose liés en position terminale non réductrice, en α -1,4 et enfin à la fois en α -1,6 et α -1,4. La quantité d'éthers de méthyl dérivés des glucose situés aux points de branchement est arbitrairement ramenée à 1.

Comme le montrent les résultats du tableau 31, le nombre de résidus situés à l'intérieur des chaînes glucosidiques de l'amidon de I7 est comparable à celui de l'amidon de la souche 18B (*sta2-1*) défectueuse pour la synthèse d'amylose (Delrue *et al.*, 1992).

Ces expériences menées sur l'amidon total (non fractionné) de la souche porteuse de la mutation *sta1-1* confirment l'absence de traces d'amylose. Notons néanmoins que la λ_{\max} de l'amidon de la souche I7 est supérieure à celle de l'amidon de 18B (550 nm).

→ L'amidon des souches mutantes I7 et 18B est dépourvu d'amylose, dans le second cas, du fait de la mutation du gène codant la GBSS (*sta2-1*), dans le cas qui nous intéresse, du fait de l'altération de l'activité de l'ADP-Glc PPase (*sta1-1*). Malgré l'absence d'amylose commune aux deux mutants, rien n'indique à ce stade que la structure du polysaccharide résiduel est la même.

Une détermination de la structure fine de l'amylopectine des souches porteuses des mutations *sta1* a donc été menée.

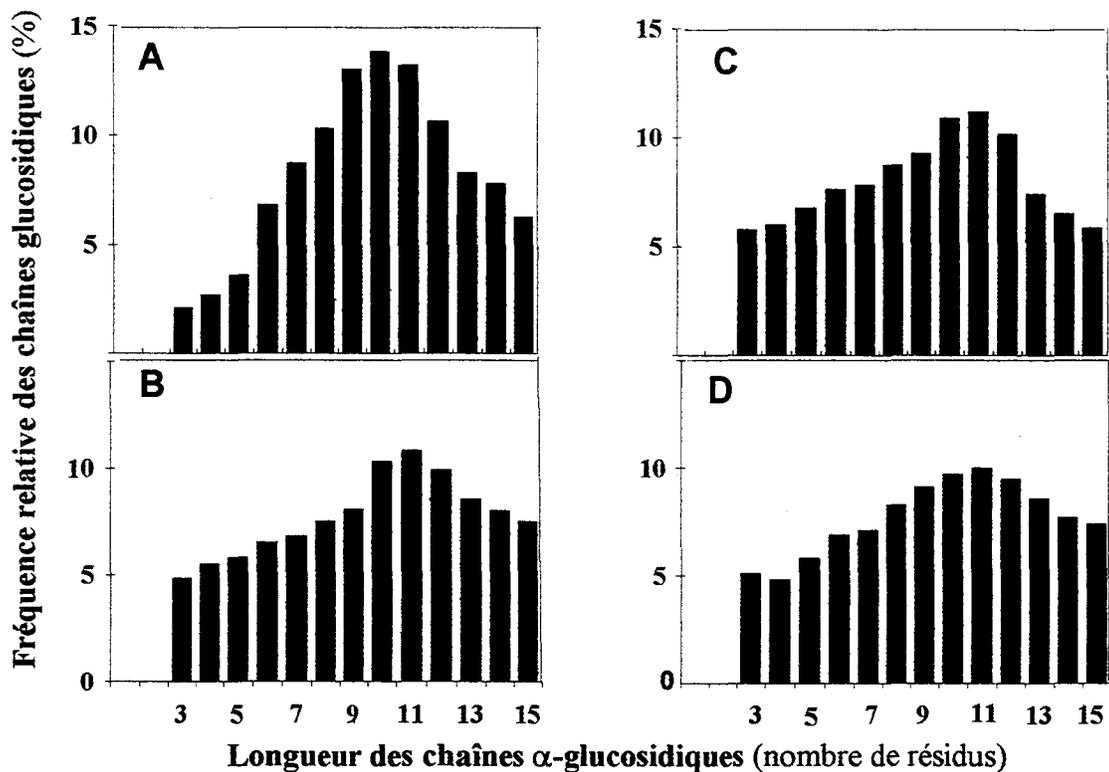


Figure 50 : Fractionnement des chaînes glucosidiques par chromatographie d'échange d'anions haute performance

Les résultats sont exprimés en fréquence relative des chaînes
 Leur degré de polymérisation (DP) est compris entre 3 et 15
 Le total des chaînes de DP compris entre 3 et 15 est ramené à 100

A : Amylopectine de type I de l'amidon de réserve de la souche sauvage
 B : Amylopectine de l'amidon photosynthétique de la souche sauvage
 C : Amylopectine de l'amidon de réserve de la souche I7
 D : Amylopectine de l'amidon de réserve de la souche BAF J3

5.2 - Caractérisation de la structure fine de l'amylopectine

Les fractions d'amylopectine éluées de la colonne de TSK HW75 sont rassemblées et lyophilisées en vue des analyses détaillées ci-dessous.

L'analyse de la structure de l'amylopectine comprend essentiellement la détermination de la fréquence de branchement et de la longueur des chaînes branchées. La fréquence de branchement est déterminée par des expériences de méthylation et de RMN tandis que l'analyse de la longueur des chaînes se fait après débranchement. Ici, les chaînes débranchées par l'isoamylase sont séparées soit par chromatographie de type HPAE-PAD (High Performance Anion Exchange chromatography with Pulse Amperometric Detection pour Chromatographie d'échange d'anion haute performance à détection ampérométrique pulsée) pour les chaînes courtes, soit par chromatographie de tamisage moléculaire pour les chaînes moyennes et longues.

L'utilisation plus récente de la spectrométrie de masse pour la séparation des chaînes courtes sera évoquée.

5.2.1 - Séparation des chaînes courtes de l'amidon résiduel des souches mutantes I7 et GST

Les chaînes dont la longueur diffère par une unité de glucose et n'excède pas un degré de polymérisation (DP) égal à 25 sont clairement séparées par HPAE-PAD.

A partir de ce profil d'élution on construit un diagramme représentatif de la proportion en chaînes de longueur comprise entre 3 et 15 résidus de glucose (**figure 50**).

Il apparaît nettement que l'amylopectine des souches porteuses des mutations *sta1* est enrichie en très courtes chaînes (DP 3 à 6) par rapport à l'amylopectine de haut poids moléculaire (pic I) de l'amidon de réserve de la souche sauvage. En revanche, la distribution observée est proche de celle dérivant de l'amidon photosynthétique de la souche sauvage.

Une distribution similaire est également obtenue dans le cas de l'amidon de la souche GST (*sta5-1*). Cette souche porte une mutation qui altère l'activité de la phosphoglucomutase. Des expériences réalisées au laboratoire ont montré que la composition de l'amidon résiduel de cette souche se caractérise par l'absence d'amylose. Notons que la mutation *sta5* affecte elle aussi une fonction nécessaire à la synthèse de l'ADP-Glc. Elle a pour conséquence la chute de l'accumulation du polysaccharide d'environ 80 %. D'autre part, la λ_{\max} de l'amidon résiduel passe à 570-580 nm au lieu de 590 chez la souche sauvage, pour des conditions de culture équivalentes.

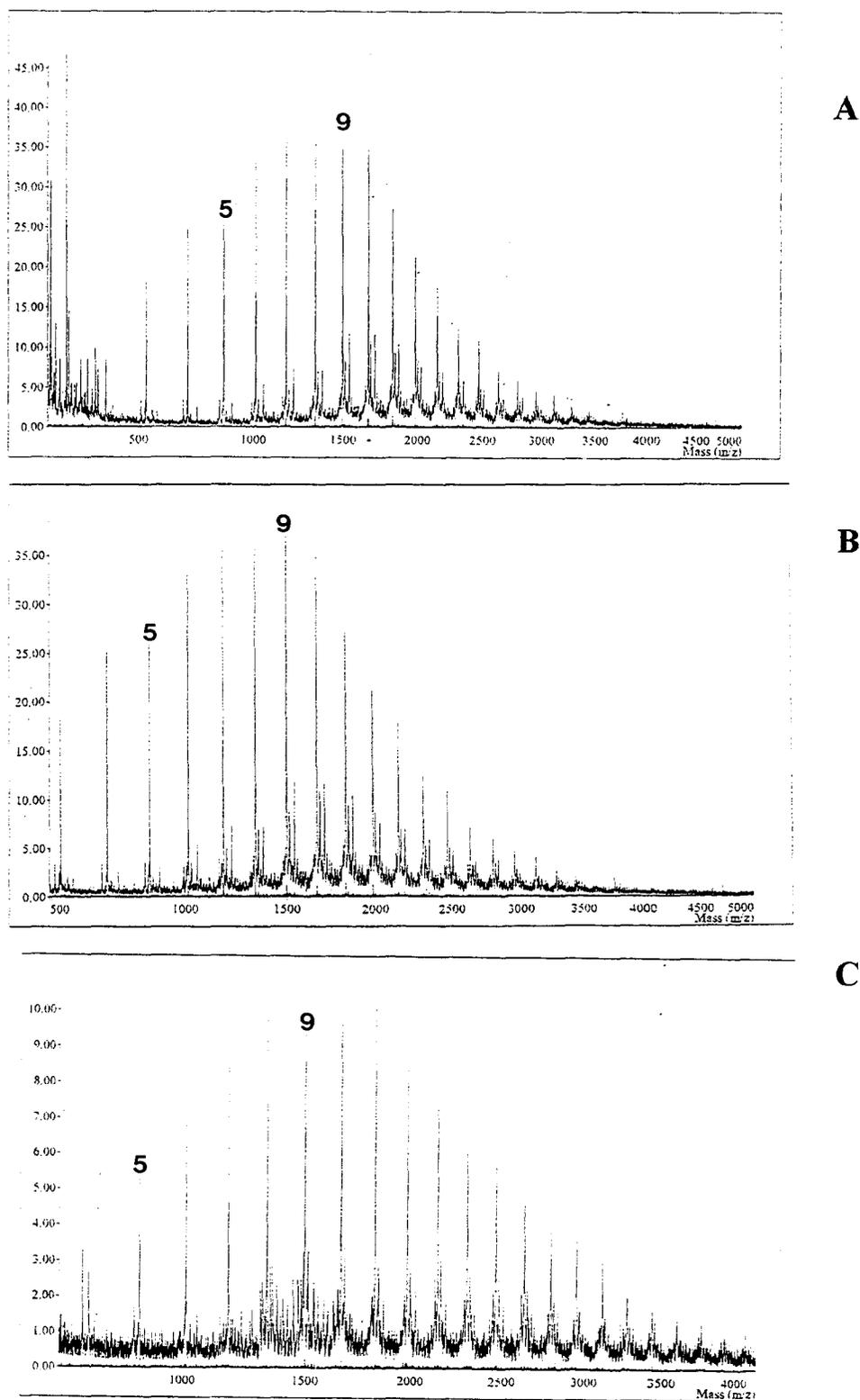


Figure 51 : *Distribution des courts glucanes de l'amylopectine débranchés par l'isoamylase*

- A :** *amylopectine de 137C en conditions de carence azotée*
- B :** *amylopectine de 137C en conditions de croissance active*
- C :** *amylopectine de BAF J3 (sta1-2::ARG7) en conditions de carence azotée*

La distribution des chaînes, déterminée par chromatographie HPAE-PAD, a été confirmée par des analyses en spectrométrie de masse (Figure 53).

→ La diminution de la disponibilité en substrat (ADP-Glc) a pour conséquence la disparition de l'amylose et l'augmentation de la proportion de chaînes très courtes (dp 3 à 6) de l'amidon résiduel.

Notons que ces modifications structurales chez les souches mutantes conduisent à la synthèse d'un amidon de type photosynthétique.

5.2.2 - Séparation des chaînes de plus de 20 résidus de glucose de l'amidon de la souche BAF J3

La distribution des longues chaînes du polysaccharide de la souche porteuse de la mutation *sta1-2::ARG7* (BAF J3) est analogue à celle de l'amylopectine de la souche sauvage (quelques soient les conditions d'accumulation) si ce n'est une représentation un peu plus prononcée des très longues chaînes (DP > 100) (Figure 52).

5.3 - Conclusion

Les conséquences de l'altération de l'activité de l'ADP-Glc PPase se font ressentir non seulement sur la quantité mais également sur la structure du polysaccharide accumulé.

L'amidon des souches porteuses des mutations au locus *STAI* est dépourvu de toute trace d'amylose. D'autre part, la structure de l'amylopectine est modifiée : seule une fraction de haut poids moléculaire subsiste, dont la λ_{\max} passe de 550 nm à 570 nm. Ce déplacement traduit une modification de structure qui consiste essentiellement en une sur-représentation des chaînes très courtes (DP compris entre 3 et 6) et une légère augmentation du nombre de chaînes très longues (DP <100). Ajoutons que les modifications quantitatives et structurales caractérisées pour la souche affectée dans l'activité PGM sont équivalentes.

→ On s'attend bien sûr à ce que l'altération de l'activité PGM et de l'activité ADP-Glc PPase se traduisent par une diminution du niveau de synthèse d'ADP-Glc (les tentatives de dosage du nucléotide sucre se sont avérées infructueuses). Cette très probable diminution de la concentration d'ADP-Glc provoque un remaniement de la structure et de la composition du granule d'amidon.

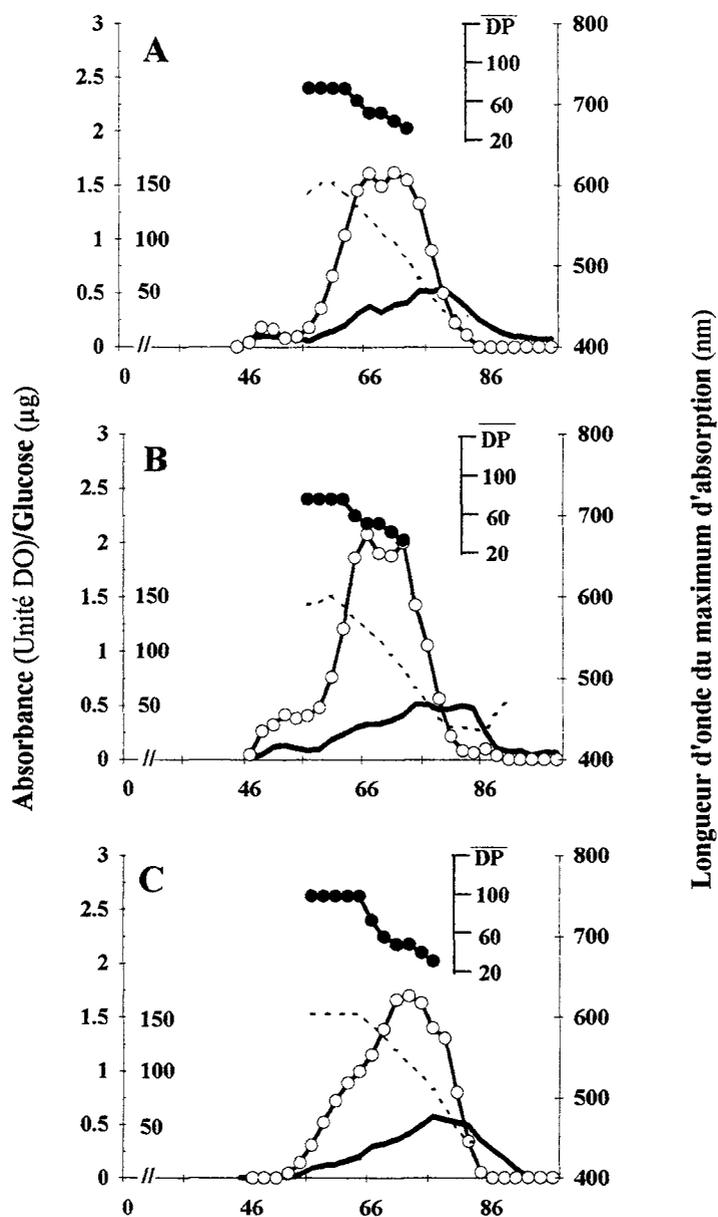


Figure 52 : Séparation des longues chaînes de l'amylopectine débranchées par l'isoamylase.

Chromatographie de tamisage moléculaire ; gel TSK HW50

- Degré de polymérisation (nombre de résidus)
- Absorbance (unité de DO)
- Longueur d'onde au maximum d'absorption (nm)
- Quantité de glucose (µg)

A : pic I de l'amylopectine de l'amidon de réserve de la souche sauvage 137C

B : amylopectine de l'amidon photosynthétique de la souche sauvage 137 C

C : amylopectine de l'amidon de réserve de la souche BAF J3 (sta1-2::ARG7)

Quelle serait la conséquence d'une augmentation de la disponibilité en ADP-Glc ?

Par chance, nous disposons au laboratoire d'une souche mutante "sur-productrice" d'amidon. Nous avons donc repris l'étude de cette souche et approfondi la caractérisation structurale de l'amidon qu'elle accumule dans différentes conditions physiologiques.

6 - CARACTERISATION DE LA STRUCTURE DE L'AMIDON D'UNE SOUCHE "SUR-PRODUCTRICE" D'AMIDON

6.1 - Présentation de la souche N52, porteuse de la mutation *sta80*

Comme nous venons de le voir, une mutation au locus *STAI* conduit à une chute de la synthèse d'ADP-Glc, ce qui provoque des changements importants dans la structure de l'amidon. Il était donc intéressant de voir si, à l'inverse, une augmentation de la concentration en nucléotide sucre se traduit elle aussi par une modification structurale du polysaccharide.

Or, nous disposons au laboratoire d'une souche portant une mutation impliquée dans la régulation du métabolisme de l'amidon (VandenKoornhuysse, 1992). En condition de carence en azotée, la souche N52 porteuse de la mutation *sta80-1* accumule 2 fois plus d'amidon que le sauvage (**tableau 32**). Cette différence s'accroît très fortement lorsque l'algue est cultivée dans des conditions lui permettant la photosynthèse. En effet, lors de la croissance active, N52 accumule 20 fois plus d'amidon que la normale. L'analyse génétique a montré que la mutation *sta80-1* est monogénique et nucléaire. Son effet sur l'activité des différentes enzymes du métabolisme de l'amidon se traduit par une légère induction de certaines d'entre elles. Cette induction reste cependant limitée en regard de l'augmentation des quantités d'amidon accumulées (VandenKoornhuysse, 1992). Notons que les propriétés de l'ADP-glc PPase ne sont pas modifiées par la mutation *sta80-1*. Par contre, la quantité et l'activité de la GBSS/mg d'amidon diminuent d'un facteur 2 à 3 dans la souche N52 (*sta80-1*). Rappelons que ces valeurs, ramenées à la quantité de polysaccharide, sont les seules qui soient physiologiquement significatives. L'accroissement de l'efficacité de mise en réserve de l'amidon est donc probablement imputable à l'altération d'une fonction intervenant dans la synthèse des précurseurs du glucose ou dans la régulation même du métabolisme de l'amidon.

Les deux principales informations que nous retiendrons de l'analyse de la mutation *sta80-1* sont les suivantes :

- l'augmentation du niveau de synthèse de l'amidon s'accompagne d'une légère diminution de l'activité spécifique de la GBSS (activité exprimée par mg d'amidon).

- la synthèse d'ADP-Glc est l'étape limitante de la synthèse d'amidon. Donc, si aucune enzyme impliquée directement dans le métabolisme n'est modifiée, une augmentation de

l'accumulation passe probablement par un accroissement de la disponibilité en nucléotide sucre. Nous supposons donc que quelque soit sa nature, la mutation *sta80-1* permet l'augmentation de la concentration intracellulaire d'ADP-Glc (ceci reste toutefois à démontrer).

6.2 - Quantification et analyses structurales de l'amidon accumulé

6.2.1 - *Extraction d'amidon photosynthétique et d'amidon de réserve*

Rappelons que l'amidon photosynthétique de la souche sauvage ainsi que celui des souches défectueuses pour la synthèse d'ADP-Glc est dépourvu d'amylose et que la structure de l'amylopectine est sensiblement modifiée (§V.1.1.1). Afin de contrôler et comparer à la fois la structure de l'amidon de réserve et de l'amidon photosynthétique des souches sauvage et porteuse de la mutation *sta80-1*, nous avons extrait le polysaccharide de cultures carencées et non carencée en azote. Une quantification ainsi qu'une détermination de la λ_{max} ont été réalisées (**Tableau 32**).

Souches	Amidon de réserve Conditions de culture favorables à l'accumulation [milieu carencé en azote]		Amidon photosynthétique Conditions de croissance et photosynthèse active [milieu non carencé]	
	amidon ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ max (nm)	amidon ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ max (nm)
137C (+)	35	590	1,5	570
N52 (<i>sta80-1</i>)	80	580	30	570

Tableau 32 : Accumulation et λ_{max} de l'amidon de souches cultivées dans des conditions favorables à la mise en réserve ou favorables à la croissance.

La λ_{max} représente la longueur d'onde au maximum d'absorption du polysaccharide complexé à l'iode, la valeur est reproductible à ± 5 nm.

La quantité d'amidon accumulée est exprimée en μg par million de cellules, les valeurs sont reproductible à environ ± 10 %.

→ Les résultats confirment ceux précédemment rapportés (VandenKoornhuyse, 1992). La mutation *sta80-1* provoque une hausse de la synthèse de la quantité d'amidon photosynthétique

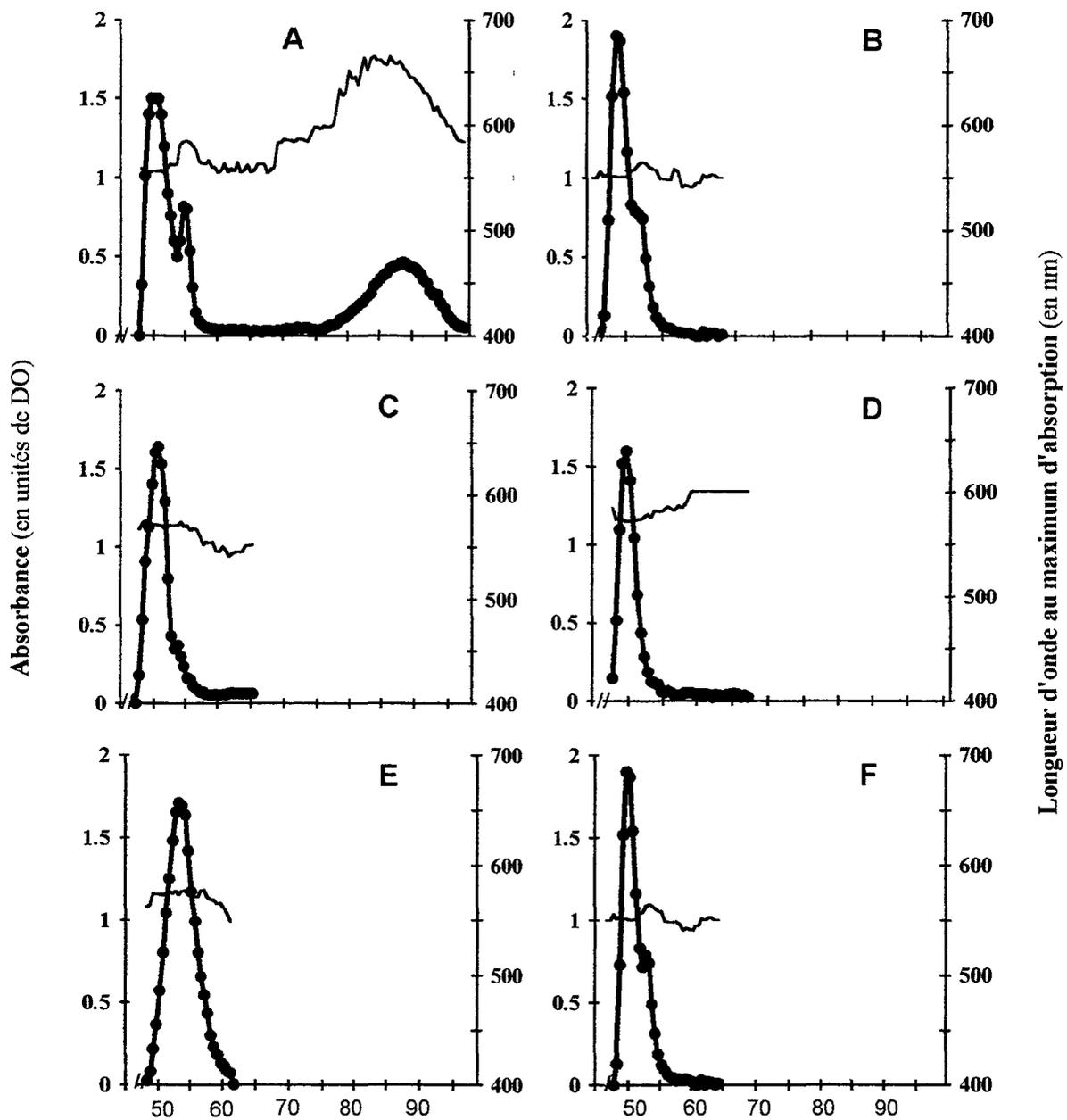


Figure 53 : Fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire de l'amidon des souches 137C, I7, BAF J3, GST et N52 (TSK-HW75)

- A : amidon de réserve de 137C (+)
- B : amidon photosynthétique de 137C (+)
- C : amidon de réserve de I7 (*sta1-1*)
- D : amidon de réserve de BAF J3 (*sta1-2::ARG7*)
- E : amidon de réserve de GST (*sta5-1*)
- F : amidon photosynthétique de N52 (*sta80-1*)

(30 $\mu\text{g}/10^6$ cellules) qui atteint un niveau équivalent à la quantité d'amidon de réserve de la souche sauvage (35 $\mu\text{g}/10^6$ cellules).

6.2.2 - L'amidon photosynthétique de la souche "sur-productrice" contient-il de l'amylose ?

Dans l'amidon photosynthétique de la souche sauvage, aucune trace d'amylose n'est détectable. La mutation *sta80-1* permet-elle le retour de la fraction d'amylose dans l'amidon photosynthétique?

D'après la valeur de la λ_{max} , qui reste à 570 nm, il semblerait que non. Toutefois, une analyse plus fine est nécessaire afin de pouvoir l'affirmer.

Nous avons donc effectué un fractionnement du polysaccharide par chromatographie de tamisage moléculaire. Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la **figure 53**.

→ **En conditions de croissance, malgré la suraccumulation d'amidon, la mutation *sta80-1* ne permet pas la synthèse d'amylose.**

6.3 - Conclusion

Une cellule qui effectue la photosynthèse et se multiplie ne synthétise pas d'amylose. Par contre, dans des conditions de carence nutritive, elle met en réserve un amidon qui en contient environ 30 %. La diminution de la synthèse de l'ADP-Glc conduit à des modifications structurales analogues à celles observées dans le polysaccharide des cellules en croissance.

L'accroissement probable de la disponibilité en nucléotide sucre par la mutation *sta80-1* ne suffit pas à la restauration de la fraction amylose. Il semble donc qu'il existe un déterminisme de la structure de l'amidon qui est fonction de la physiologie de la cellule.

IV - DISCUSSION

1 - QUELQUES ELEMENTS DU MECANISME DE SYNTHÈSE DE L'AMIDON

Les détails des voies de synthèse et de dégradation de l'amidon restent sujets à controverse. En effet, s'il est indéniable que l'ADP-glucose pyrophosphorylase joue un rôle déterminant dans le contrôle de la synthèse, aussi bien dans le chloroplaste que dans l'amyloplaste, le déterminisme de la structure de l'amidon accumulé dans ces deux organites reste une énigme.

Il est en général admis que la croissance du grain se produit à sa périphérie. La synthèse dépend, entre autres, de la présence des activités des différentes isoformes de l'amidon synthétase et de l'enzyme de branchement. Chacune possède probablement un rôle précis dans l'agencement des polymères de glucose grâce à des propriétés catalytiques spécifiques.

Plusieurs auteurs proposent un modèle général pour la synthèse de l'amylopectine (voir § 2.1 de l'introduction). Ce modèle comprend trois grandes étapes :

- la polymérisation des résidus de glucose et la création de multiples points de branchement en surface du grain.
- le remaniement de la distribution des chaînes néosynthétisées par les enzymes de débranchement pour aboutir au regroupement des points de branchement.
- l'allongement des chaînes constituant les grappes.

L'organisation des chaînes qui constituent les grappes conduit à une structure cristalline tandis que les points de branchement appartiennent à des zones amorphes. Les modèles proposés n'évoquent pas la synthèse de l'amylose.

Comment relier la synthèse de l'amylose à celle de l'amylopectine ? A quel moment se produit-elle ? Où a-t-elle lieu ? Comment s'organisent les molécules d'amylose par rapport aux molécules d'amylopectine ?

Il est clair que la synthèse d'amylose est sous la dépendance de l'amidon synthétase liée au grain. Cependant, de nombreuses questions quant-à l'origine de cette fraction de l'amidon restent en suspens. Notre travail apporte quelques éléments nouveaux à ce sujet.

2 - LES AMIDONS DEPOURVUS D'AMYLOSE

La structure de l'amidon comprend deux aspects principaux : d'une part le rapport amylose/amylopectine, et d'autre part l'organisation de cette dernière (la fréquence des points de branchement, leur répartition et la longueur des chaînes branchées). Il est important de noter que ces deux aspects peuvent être liés. En effet, chez *C. reinhardtii*, dans les cas de sur- ou de sous-représentation de la fraction d'amylose, des modifications du branchement de l'amylopectine ont été observées (Fontaine *et al.*, 1993 ; Delrue *et al.*, 1992). Nous nous intéresserons ici principalement à la présence d'amylose.

2.1 - Les conditions génétiques et physiologiques qui aboutissent à la synthèse d'un amidon dépourvu d'amylose

Nous avons répertorié les différentes situations pour lesquelles les végétaux supérieurs ou l'algue *C. reinhardtii* accumulent un amidon résiduel ne contenant plus la fraction d'amylose. Ces conditions sont d'ordre génétique ou environnementale. En effet, nous l'avons vu précédemment, plusieurs mutations entraînent l'absence d'amylose chez *C. reinhardtii* (Tableau 6, chapitre 2 de l'introduction). Par ailleurs, la présence ou l'absence d'amylose peuvent être liées à des critères de développement et de croissance.

2.1.1 - *Le début de la mise en réserve de l'amidon chez les végétaux supérieurs*

La quantité relative d'amylose des jeunes graines de céréales ou des jeunes tubercules de pomme de terre (de génotype sauvage) est très faible. Ceci s'explique aisément si on admet que la GBSS (enzyme responsable de la synthèse d'amylose) est exprimée plus tardivement que les amidon synthétases solubles (Nelson *et al.*, 1978 ; Dry *et al.*, 1992 ; Nakamura & Yuki, 1992). Un système de contrôle de l'expression des gènes expliquerait que l'amylose ne soit accumulé qu'à partir d'un stade avancé du développement de la plante (Shannon & Garwood, 1984).

2.1.2 - La croissance active et la photosynthèse

Dans des conditions de croissance active et de photosynthèse, *C. reinhardtii* accumule de faibles quantités d'un polysaccharide anormal appelé "amidon photosynthétique". Celui-ci est systématiquement dépourvu d'amylose et la structure de son amylopectine est modifiée, ceci malgré la présence d'une activité spécifique élevée de la GBSS (Libessart *et al.*, 1995).

Dans ces mêmes conditions, l'absence d'amylose se vérifie également pour une souche "sur-productrice" d'amidon (*sta80-1*). Lors de la croissance active, cette souche mutante synthétise autant d'amidon que la souche sauvage cultivée en carence azotée. Il semble donc que la disparition de la fraction linéaire de l'amidon ne soit pas directement corrélée à la diminution de la quantité du polysaccharide contrairement à ce qui a pu être suggéré (pour revue : Martin & Smith, 1995).

Notons que l'amidon accumulé par les feuilles de pois (amidon transitoire) pourrait également être dépourvu d'amylose (A. Smith, communication personnelle).

Pourquoi les cellules photosynthétiques ne fabriquent-elles pas d'amylose ?

Les mécanismes de dégradation de l'amidon semblent différents dans les feuilles et dans les organes de réserve. Ceci pourrait fournir une explication à l'absence d'amylose. En effet, dans les organes de réserve, la destruction du grain est déclenchée lorsque la maturité est atteinte. Une "batterie" d'enzymes (hydrolases et phosphorylases) permettent une dégradation à la fois rapide et complète. Par contre, dans la feuille, la dégradation se déroule de manière récurrente, en particulier grâce à la phosphorylase qui semble être l'enzyme prédominante dans ce processus. Cette enzyme attaque uniquement les résidus en position terminale non réductrice, d'où l'intérêt d'une molécule hautement branchée. Sans vouloir être finaliste, la présence d'amylose dans le grain d'amidon transitoire (ou amidon photosynthétique) n'apparaît donc pas avantageuse.

De manière générale, l'amidon qui n'est pas destiné à constituer les réserves est dépourvu d'amylose.

2.1.3 - Les souches affectées dans l'activité de la GBSS

Le rôle de l'amidon synthétase liée au grain (GBSS) dans la synthèse d'amylose a clairement été démontré chez tous les organismes étudiés (pour revue : Preiss, 1992 ; Tsai, 1974 ;

Souches	Amidon de réserve		Amidon photosynthétique	
	Q ^{te} d'amidon	Présence d'amylose	Q ^{te} d'amidon	Présence d'Amylose
137C (+)	35 ±5	+	1,5 ±1	-
I7 et BAF J3 (<i>sta1</i>)	2 ±1	-	0,1 ±0,1	-
GST4-43 (<i>sta5-1</i>)	7 ±2	-		-
N52 (<i>sta80-1</i>)	80 ±10	+	30 ±5	-

Tableau 33 : Quantité d'amidon accumulé et présence d'amylose dans l'amidon de réserve et l'amidon photosynthétique.

*Influence des mutations *sta1*, *sta5-1* et *sta80-1*.*

La quantité d'amidon est exprimée en µg par million de cellules; la longueur d'onde du maximum d'absorption (λ_{max}) en nm.

Kuipers *et al.*, 1994). L'exemple le plus célèbre est celui des souches de maïs porteuses de la mutation *waxy* (voir chapitre 2 de l'introduction) ; (Nelson & Rines, 1962). Ces souches sont défectueuses pour l'activité GBSS et elles accumulent un amidon dépourvu d'amylose. L'absence ou la diminution de cette même activité se traduit également par l'absence d'amylose chez la pomme de terre mutante *amf* (Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987; Visser *et al.*, 1991) ou chez les souches de *C. reinhardtii* porteuses des mutations *sta2* (Delrue *et al.*, 1992 ; Maddelein *et al.*, 1994).

2.1.4 - Les souches affectées dans les activités de la phosphoglucomutase et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

Chez les plantes supérieures, seule l'altération de l'activité de la GBSS est connue comme responsable de l'absence d'amylose dans l'amidon. Chez *C. reinhardtii* en revanche, nous avons montré que la chute de la synthèse d'ADP-Glc provoque également une disparition de cette fraction (**Tableau 33**).

Dans un milieu carencé en azote, les souches mutantes de l'algue affectées dans l'activité ADP-Glc PPase et PGM accumulent de très faibles quantités d'amidon (5 à 10 % de la quantité accumulée par la souche sauvage). Alors que l'amidon dit "de réserve" de la souche sauvage renferme environ 30 % d'amylose, l'amidon résiduel des mutants en est complètement dépourvu.

La diminution de la synthèse de l'ADP-Glc se traduit donc par l'absence d'amylose et ce, malgré la présence d'une activité spécifique élevée de la GBSS.

Dans un rapport publié en 1962, Kooistra fait état d'une diminution de la proportion d'amylose dans l'amidon des souches de pois porteuses de la mutation *rb*, mutation qui altère également l'activité de l'ADP-Glc PPase (voir le § 4.4 de l'introduction). Les observations de Kooistra vont donc, elles aussi, dans le sens d'une corrélation entre la diminution de la disponibilité en substrat et la chute, voire la disparition, de l'amylose.

2.1.5 - Conclusion

En dépit de la rareté des données concernant la structure de l'amidon transitoire (amidon des feuilles) et de l'amidon résiduel des souches affectées dans la synthèse d'ADP-Glc chez les végétaux supérieurs, les résultats obtenus chez *C. reinhardtii* permettent de suggérer que la

présence de la GBSS est une condition nécessaire mais non suffisante pour la synthèse d'amylose.

2.2 - Les mécanismes de la synthèse de l'amylose

La GBSS intervient non seulement dans la synthèse d'amylose mais également dans celle de l'amylopectine puisque des modifications de sa structure ont été observées, notamment dans le cas des souches porteuses des mutations *sta2* chez *C. reinhardtii* (Delrue *et al.*, 1992). La capacité à synthétiser l'amylose ne serait donc pas une propriété intrinsèque de la protéine. La présence de la fraction linéaire dans l'amidon serait consécutive à une évolution du rapport entre les activités de polymérisation et les activités de branchement, en défaveur de ces dernières.

2.3 - Comment une diminution de la synthèse d'ADP-glucose peut-elle affecter la structure de l'amidon ?

Il a été montré à maintes reprises que l'accumulation d'amidon est corrélée à l'activité de l'ADP-Glc PPase. Or, notre travail laisse suggérer que la présence d'amylose est elle aussi liée à l'existence d'une activité minimale de cette enzyme. Il semble que, en dessous d'un seuil de synthèse du nucléotide sucre substrat des amidon synthétases (l'ADP-Glc), la synthèse d'amylose ne puisse avoir lieu. Comment expliquer ce phénomène ?

⇒ par un effet de régulation :

La faible quantité d'ADP-Glc pourrait avoir un effet sur l'expression ou sur l'activité de différentes enzymes du métabolisme de l'amidon. Comme nous l'avons souligné précédemment, il se produit une expression différentielle des isoenzymes responsables de la synthèse de l'amidon (pour revue : Martin & Smith, 1995). Le contrôle de l'expression des gènes pourrait être à l'origine du déterminisme de la structure. Néanmoins, aucune défectuosité autre que celle de l'ADP-Glc PPase ou de la PGM n'a pu être détectée chez les souches qui produisent de faibles quantités d'ADP-Glc. Cette hypothèse est donc, dans le cas qui nous intéresse, peu convaincante.

⇒ par un effet K_m :

L'affinité apparente de la GBSS pour l'ADP-Glc est environ 5 fois plus faible que celle des amidon synthétases solubles (SSS), (MacDonald & Preiss, 1985 ; Delrue *et al.*, 1992).

Néanmoins, l'enzyme retrouve un K_m équivalent à celui des SSS lorsqu'elle est solubilisée. La différence peut donc être imputée à la localisation de la GBSS ; en effet, elle a difficilement accès au substrat qui diffuse probablement lentement à l'intérieur du grain. Par contre, si la quantité d'ADP-Glc est trop faible, elle ne peut alimenter la GBSS dans le grain.. Il n'y aura alors pas de synthèse d'amylose. Il faut admettre pour cela que la synthèse d'amylose se produit exclusivement à l'intérieur du grain, ce qui n'a jamais été démontré.

Ajoutons que les enzymes de branchement sont exclusivement actives dans la phase soluble, à la périphérie du grain d'amidon en croissance. Elles ne peuvent donc probablement pas accéder aux produits de synthèse de la GBSS, dans le cas où cette synthèse aurait lieu exclusivement à l'intérieur du grain.

⇒ par un effet de surface .

Imaginons que la synthèse d'amylose ait lieu à la surface du grain. Dans la mesure où la GBSS présente une forte affinité pour l'amidon, il semble possible qu'il puisse se créer une répartition non homogène de l'enzyme à la surface du grain en croissance. Certaines zones deviendraient donc particulièrement riches en activité d'élongation. Par contre, l'activité de ramification "diluée" dans la phase soluble autour du grain resterait homogène sur toute la périphérie. L'élongation des molécules d'amylose se produirait à la surface dans les régions où le déséquilibre est en faveur de la GBSS.

La surface totale développée par les grains d'amidon serait dans ce cas déterminante pour la synthèse d'amylose. Pour des souches affectées dans la synthèse de l'ADP-Glc, la restriction en substrat devient limitante et la surface totale des grains diminue. Le déséquilibre serait en faveur des activités de branchement et les événements de synthèse de chaînes inaccessibles à la ramification seraient alors exceptionnels, voire inexistantes.

Imaginons maintenant que la synthèse d'amylose se produise essentiellement à l'intérieur du grain. Au cours de sa croissance, le grain d'amidon séquestrerait la GBSS donc déplacerait l'équilibre des activités d'élongation et de branchement. Dans cette hypothèse, il est nécessaire d'atteindre un niveau de synthèse suffisant pour que l'amidon synthétase liée soit isolée. Si la synthèse est trop faible, les rapports d'activités GBSS séquestrée/enzyme de branchement ne permettent pas le maintien d'une population de molécules linéaires.

Les données actuelles ne permettent pas de savoir si la synthèse d'amylose s'effectue en surface ou à l'intérieur du grain.

2.4 - Différentes approches pour la compréhension du mécanisme de synthèse de l'amylose

La technique de synthèse *in vitro* pourrait nous permettre de savoir si l'absence d'amylose est simplement due à un effet K_m tel que nous l'avons décrit. Elle permet en effet le contrôle de la concentration en ADP-Glc et, dans une certaine mesure, celui des activités présentes dans la phase soluble. D'autre part, des analyses de granulométrie nous renseigneraient sur l'éventuelle existence d'une corrélation entre la surface développée (qui reflète à la fois la taille et le nombre de grains), la physiologie de la cellule et l'absence d'amylose.

2.4.1 - La synthèse in vitro

Afin d'écartier la possibilité d'un effet K_m , nous effectuerons une expérience de synthèse *in vitro* en utilisant comme amorce soit l'amidon de réserve, soit l'amidon photosynthétique.

Cette synthèse se déroule en présence de concentrations saturantes en ADP-Glc (5 à 10 mM). Si l'absence d'amylose dans l'amidon photosynthétique (ou l'amidon des souches défectueuses pour la synthèse d'ADP-Glc) est la simple conséquence d'un effet K_m , on doit observer sa restauration dans les deux types d'amidon après synthèse *in vitro*. La synthèse se fera à la même vitesse dans les deux cas. Par contre, la quantité d'amylose néosynthétisée pourrait être plus importante dans le cas de l'amidon photosynthétique puisque la GBSS y présente une activité spécifique nettement plus élevée (pour une même quantité de polysaccharide mise en jeu).

Il est possible de compléter cette expérience en incubant préalablement l'amidon avec des protéinases. La digestion provoquera artificiellement un déséquilibre des activités en faveur de la GBSS (puisque'elle est protégée). Ceci devrait conduire à la synthèse d'amylose quelque soit l'origine de l'amidon, même si sa disparition n'est pas imputable à un effet K_m . **Nous vérifierons ainsi que GBSS est bien active au sein du grain d'amidon photosynthétique.**

D'autre part, cette expérience de digestion permettra de contrôler que les activités de la phase soluble restent intactes après purification de l'amidon.

2.4.2 - L'étude de la surface développée

La souche porteuse de la mutation *sta80-1* accumule une quantité d'amidon photosynthétique équivalente à la quantité d'amidon de réserve de la souche sauvage. Or, cet amidon est comme l'amidon photosynthétique de la souche sauvage, dépourvu d'amylose. On ne peut donc associer

la faible quantité d'amidon et l'absence d'amylose. Il peut être intéressant de comparer le nombre et le volume des grains d'amidon contenant ou non de l'amylose par des mesures de granulométrie.

Rappelons que pour une même quantité de polysaccharide, le nombre et la taille des grains peuvent varier.

Puisque la fréquence des événements d'initiation fixe certainement le nombre de grains d'amidon, elle pourrait être un facteur déterminant dans la synthèse de l'amylose.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ainsworth C., Tarvis M. & Clark J.**(1993). Isolation and analysis of a cDNA clone encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat. *Plant Mol. Biol.* 23 : 22-23
- Aizawa K. & Miyachi S.** (1986). Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanism in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Micro.Rev.* 39 : 215-233
- Akazawa T., Pozueta J and Ngerprasisitsiri** (1989). Adenylate translocator in envelopemembranes of amyloplast. In *Physiology, biochemistry and genetics of nongreen plastids*. (Boyer C.D., Shannon J.C. and Hardison R.C. eds) American society of plant physiologists, Rockville, Maryland
- Anderson J.M., Hnilo J., Larson R., Okita T.W., Morell M & Preiss J.** (1989). The encoded primary sequence of a rice ADPglucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. *J. Biol. Chem.* 264 : 12238-12242
- apRees T.** (1984). Sucrose metabolism. In *Storage Carbohydrates in Vascular Plants* (Lewis D.H. ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp53-73
- apRees T.** (1985). The organisation of glycolysis and the pentose phosphate pathway in plants. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.18, (Douce R. and Day D. eds), Springer Verlag, Berlin, pp391-417
- apRees T.** (1988). Hexose phosphate metabolism by non-photosynthetic tissues of higher plants. In *The Biochemistry of Plants*, Vol.14, (Preiss J. ed.), Academic Press, New York, pp1-33
- Ardila F.J. & Tancardez J.S.** (1992). Potato tuber UDP-glucose : Protein transglucosylase catalyses its own glucosylation. *Plant Physiol.* 99 : 1342-1347
- Baba T., Yoshu M. & Kainuma K.** (1987). Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet potato roots. *Starch/Stärke* 39 : 52-56
- Badger M.R., Kaplan A. & Berry J.A.** (1980). Internal inorganic carbon pool of *C.reinhardtii* : Evidence for a carbon dioxide concentrating mechanism. *Plant Physiol.* 66 : 407-413
- Bae J.M., Giroux M. & Hannah L.** (1990). Cloning and characterization of the *Brittle-2* gene of maize. *Maydica* 35 : 87-94

- Ball S.G., Dirick L., Decq A., Martiat J.C. & Matagne R.F.** (1990). Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 66 : 1-9
- Ball S.G., Marianne T., Dirick L., Fresnoy M., Delrue B. & Decq A.** (1991). A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 185 : 17-26
- Ballicora M.A., Laughlin M.L., Fu Y., Okita T.W., Barry G.F. & Preiss J.** (1995). Adenosine 5'-diphosphate-glucose pyrophosphorylase from potato tuber. *Plant Physiol.* 109 : 254-251
- Banks W. & Greenwood C.T.** (1975). Fractionation of starch granule and the fine structure of its components. *Starch and its components*. Edinburgh University Press, Edinburgh 5-66
- Banks W., Greenwood C.T. and Khan K.M.** (1971). The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohyd. Res.* 17 : 25-33
- Barber J.** (1976). Cation control in photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 1 : 33-36
- Barton C., Yang L., Galvin M., Sengupta-Gopalan C & Borreli T.** (1986). Isolation of the *Shrunken-2* and *Brittle-2* genes from maize. In *Regulation of carbon and nitrogen reduction and utilization in maize* (Shannon J.C., Knievel D.P. and Boyer C.D. eds) American Society of Plant Physiologists, Rockville MD, pp. 363-365
- Beck E.** (1985). The degradation of transitory starch granules in chloroplasts. In *Regulation of Carbon Partitioning in Photosynthetic Tissue*. (Heath R.L. and Preiss J. eds), Waverley Press, Baltimore, pp27-44
- Beck E. & Ziegler P.** (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 : 95-117
- 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
- Bhattacharyya M.K., Smith A.M., Ellis T.H.N., Hedley C. & Martin C.** (1990). The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch branching enzyme. *Cell* 60 : 115-121

- Bhave M.R., Lawrence S., Barton C. & Hannah L.C.** (1990). Identification and molecular characterization of *Shrunken-2* cDNA clones of maize. *Plant Cell* 2 : 581-588
- Blanshard J.M.V.** (1987). Starch granule structure and function : a physicochemical approach. In *Starch : Properties and Potential* (T Gaillard, J Wiley and S Michester eds.), pp16-54
- Blennow A. & Johanson G.** (1991). Isolation of a Q-enzyme with Mr 103 000 from potato tubers. *Phytochem.* 30 : 437-444.
- Boyer C.D.** (1985). Synthesis and breakdown of starch. In *Biochemical Basis of Plant Breeding.*, Vol. 1, (Nevra C.A. ed), CRC Press, Boca Raton, pp133-153
- Boyer C.D. & Preiss J.** (1978). Multiple isoforms of starch branching enzyme of maize : evidence for independent genetic control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80 : 169-175
- Brock T.D., Smith D.W. and Madigan M.T.** (1984) The autotrophic way of life In *Biology of microorganisms* 4th edition Prentice-Hall International, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey
- Bulté L. & Wollman F.A.** (1992). Evidence for a selective destabilization of a integral membrane protein, the cytochrom b6/f complex, during gametogenesis in *Chlamydomonas reinhartii*. *Eur. J. Biochem.* 204 : 327-336.
- Burton R.A., Bewley J.D., Smith A.M., Bhattacharyya M.K., Tatge H., Ring S., Bull V., Hamilton W.D.P. & Martin C.** (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J.* 7 : 3-15
- Cashel M. & Rudd K.E.** (1987). In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and molecular Biology.* (Neidhardt F.C., Ingraham.J.L., Low D.B, Magasanik B, Schaecter M. & Umberger H.E. eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C. pp. 14110-1438
- Caspar T., Huber S.C. & Sommerville C.R.** (1985). Alteration in growth, photosynthesis and respiration in starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in phosphoglucomutase activity. *Plant Physiol.* 79 : 11-17

- Charng Y.-Y., Iglesias A. & Preiss J.** (1994). Structure-function relationships of cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylase. *J.Biol.Chem.* 269 : 24107-24113
- Colonna P. and Mercier C.** (1984). Macromolecular structure of wrinkled- and smooth-pea starch components. *Carbohydr. Res.* 126 : 233-247
- Creuzat-Sigal N, Latil-Damotte N., Cattaneo J & Puig J.** (1972). Genetic analysis and biochemical characterization of mutants impaired in glycogen metabolism in *E.coli* K-12. In Biochemistry of the Glycoside Linkage (Piras R and Pontis H.G. eds), Academic Press, New York, NY, pp. 647-680
- Cséke C & Buchanan B.B.** (1986). Regulation of the formation and utilization of photosynthate in leaves. *Biochem. Biophys. Acta* 853 : 43-64
- Delmer D.P.** (1983) Biosynthesis of cellulose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 41 : 105-153
- Delrue B., Fontaine T., Routier F., Decq A., Wieruszkeski J.M., VandenKoornhuysen N., Maddelein M.-L., Fournet B. & Ball S.G.** (1992). Waxy *Chlamydomonas reinhardtii* : Monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and Granule-bound starch synthase accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* 174 : 3612-3620
- Denyer K., Hylton C.M., Jenner C.F. & Smith A.M.** (1995). Identification of multiple isoforms of soluble and granule bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta* 196 : 256-265
- Denyer K., Sidebottom C., Hylton C.M. & Smith A.M.** (1993). Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. *Plant J.* 4 : 191-198
- Denyer K. & Smith A.M.** (1992). The purification and characterization of the two forms of soluble starch synthase from developing pea embryos. *Planta* 186 : 609-617
- Dixon M. & Webb E.C.** (1979). Enzyme kinetics. In *Enzymes* (Dixon M. & E.C. Webb eds.) vol.3. Academic Press New York, pp47-206
- Doehlert D.C. & Kuo T.M.** (1990). Sugar metabolism in developing kernels of starch deficient endosperm mutants of maize. *Plant Physiol.* 92 : 990-994

- Dry I., Smith A.M., Edwards E.A., Bhattacharyya M., Dunn P. & Martin C.** (1992). Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs. *Plant J.* 2 : 193-202
- Ebersold W.T.**(1967). *Chlamydomonas reinhardtii* : heterozygous strains. *Science* 157 : 447-449
- Edwards T., Green J.H. & apRees** (1988). Activity of branching enzyme as a cardinal feature of the *Ra* locus in *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 27 : 1615-1620
- Entwistle G and apRees T.** (1988). Enzymatic capacities of amyloplasts from wheat endosperm. *Biochem. J.* 225 : 391-396
- Espada J.** (1962). Enzymatic synthesis of adenosine diphosphate glucose from glucose-1-phosphate and adenosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 237 : 3577-3581
- Fisher M.B. & Boyer C.D.** (1983). Immunological characterization of starch branching enzymes. *Plant Physiol.* 72 : 813-816
- Flügge U.I., Fischer K., Gross A., Sebald W., Lottspeich F. & Eckerskorn C** (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts : nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *EMBO J.* 8 : 39-46
- Flügge U.I. & Heldt H.W.** (1984). The phosphate triose phosphate phosphoglycerate translocator of the chloroplast. *Trends Biochem.Sci.* 9 : 530-533
- Fontaine T., D'Hulst C., Maddelein M.-L., Routier F., Marianne-Pépin T., Decq A., Wieruszkeski J.-M., Delrue B., VandenKoornhuysse N., Bossu J.-P., Fournet B. & Ball S.G.** (1993). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* 268 : 16223-16230
- Franzén L.G., Rochaix J.D. & von Heijne G** (1990). Chloroplast transit peptides from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS* 260 : 165-168
- French D.** (1984). Organization of starch granules. In *Starch : Chemistry and Technology* (R.L. Whister, J.N. Bemiller and E.F. Paschall eds), ch. VII : 183-247

- Friedman K.D., Rosen N.L., Newman P.J. & Montgomery R.R.** (1988). Enzymatic amplification of specific cDNA inserts from λ gt11 library. *Nucleic Acids Res.* 14 : 7125-7127
- Fujiwara S., Fukuzawa H., Tachiki A. & Miyachi S.** (1990). Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 : 9779-9783
- Gebhardt C., Ritter E. & Salamini F.** (1993). RFLP map of the potato. In *Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, Vol. 1 : DNA-based Markers in Plants (Vasil I.K. and Phillips R.L. eds), in Press. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gidley M.J. and Bociek S.M.** (1988). 13 C CP/MAS NMR studies of amylose inclusion complexes, cyclodextrins, and the amorphous phase of starch granules. *J. Amer. Chem. Soc.* 110 : 3820-3829
- Giniger E., Varnum S.M. & Ptashne M.** (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein in yeast. *Cell* 40 : 767-774
- Giroux M.J., Boyer C., Feix G. & Hannah L.C.** (1994). Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in the maize endosperm. *Plant Physiol.* 106 : 713-722
- Giroux M.J. & Hannah L.C.** (1994). ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Mol. Gen. Genet.* 243 : 400-408
- Ghosh H.P. & Preiss J.** (1966). Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase : a regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 241 : 4491-4504
- Gross P. & apRees T.** (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta* 167 : 140-145
- Gorman D.S. & Levine R.P.** (1965). Cytochrome f and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 : 1665-1669
- Guan H.P. & Preiss J.** (1993). Differentiation of the properties of the branching isoenzymes of maize (*Zea Mays*). *Plant Physiol.* 102 : 1269-1273

- Hannah L.C., Tuschall D.M. & Mans R.J.** (1980). Multiple forms of maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase and their control by *shrunken-2* and *brittle-2*. *Genetics* 95 : 961-970
- Hatzfeld W.D. & Stitt M.** (1990). A study of the rate of recycling of trioses phosphates in heterotrophic *Chenopodium rubrum* cells, potato tuber, and maize endosperm. *Planta* 180 : 198-204
- Harris E.H.** (1989). "A starches and storage methods. The *Chlamydomonas* Source book. A comprehensive guide to biology and laboratory use." (E. Harris ed.). Academic Press, San Diego, Calif.
- Hawker J.S.** (1985) Sucrose. In *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, (Dey M. and Dixon R.A. eds), Academic Press, New York, pp1-51
- Heldt H.W. & Flügge U.I.** (1987). Subcellular transport of metabolites in a plant cell. In *The Biochemistry of Plants*. Vol.12, Academic Press, New York, pp49-85
- Heldt H.W., Flügge U.I., Borchert S., Bruckner G. and Ohnishi J.** (1990) Phosphate translocator in plastids. In *Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis*. Zelitch I. ed. Liss A.R. New York pp39-54
- Hengge-Aronis R. & Fischer D.** (1992). Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6 : 1877-1886.
- Hill L.M. & 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
- Hiller R.G. & Greenway H.** (1968). Effect of low water potentials on some aspects of carbohydrate metabolism in *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta* 78 : 49-59
- Hinnebusch A.G. & Fink G.R.** (1983). Repeated DNA sequences upstream from HIS 1 also occur at several other coregulated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 258 : 5238-5247
- Hizukuri S.** (1985). Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydr. Res.* 141 : 295-306

- Hovenkamp-Hermelink J.H.M., Jacobsen E., Ponstein A.S., Visser R.G.F., Vos-Scheperkeuter G.H., Bijmolt E.W., deVries J.N., Witholt B. & Feenstra W.J. (1987).** Isolation of an amylose-free starch mutant potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 75 : 217-221
- Huber J.L. & Huber S.C. (1992).** Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Biochem. J.* 283 : 877-882
- Hurt E.C., Soltanifor N., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J.D. & Schatz G. (1986).** The cleavable presequence of an imported chloroplast protein directs attached polypeptides into yeast mitochondria. *EMBO J.* 5 : 1343- 1350
- Hylton C & Smith A.M. (1992).** The *rb* mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADPglucose pyrophosphorylase from developing embryos. *Plant Physiol.* 99 : 1626-1634
- Iglesias A.A., Charng Y.-Y., Ball S.G. & Preiss J. (1994).** Characterization of the kinetic, regulatory and structural properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 104 : 1287-1294
- Iglesias A.A., Barry G.F., Meyer C., Bloksberg L.; Nakata P.A., Greene T., Laughlin M.J., Okita T.W., Kishore G.M. & Preiss J. (1993).** Expression of the potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase in *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 268 : 1081-1086
- Iglesias A.A., Kakefude G. & Preiss J. (1991).** Regulatory and structural properties of the cyanobacterial ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 97 : 1187-1195
- Imberty A., Buléon A., Tran V. and Perez S.(1991).** Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke* 43 : 375-384
- James M.G., Robertson D.S. & Meyer A.M (1995).** Characterization of the maize gene *sugary 1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 7 : 417-429
- Jenkins P.J., Cameron R.E. and Donald A.M. (1993).** A universal feature in the starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke* 45 : 417-420

- Kakefuda G, Charng Y.-Y., Iglesia A.A., McIntosh L. & Preiss J.** (1992). Molecular cloning and sequencing of ADP-Glucose pyrophosphorylase from *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiol.* 99 : 359-361
- Kim W.T., Franceschi V.R., Okita T.W., Robinson N.L., Morell M & Preiss J.** (1989). Immunocytochemical localization of ADPglucose Pyrophosphorylase in developing potato tuber cells. *Plant Physiol.* 91 : 217-220
- Kindle K.L., Schnell R.A., Fernandez E. & Lefebvre P.A.** (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J.Cell Biol.* 109 : 2589-2601
- Kleczkowski L.A., Villand P., Lüthi E., Olsen O.A. & Preiss J.** (1993). Insensitivity of barley endosperm ADPglucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiol.* 101 : 179-186
- Klein U.** (1986). Compartmentation of glycolysis and the oxydative pentose phosphate pathway in *C. reinhardtii*. *Planta* 167 : 81-86
- Klein U.** (1987). Intracellular carbon partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 85 : 892-897
- Klein U., Ghen C., Gibbs M. & Platt-Aloia K.A.** (1983). Cellular fractionation of *Chlamydomonas reinhardtii*. with emphasis on the isolation of chloroplast *Plant Physiol.* 72 : 481-487
- Koch K.E., Nolte K.D., Duke E.R., McCarty D.L. & Avigne W.T.** (1992). Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell.* 4 : 59-69
- Kooistra** (1962). On the differences between smooth and three types of wrinkled pea. *Euphytica* 11 : 357-373
- Kortschak H.P., Hartt C.E. and Burr G.O.** (1965) Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves *Plant Physiol.* 40 : 209-213
- Kruckeberg A.L., Neuhaus H.E, Feil R, Gotlieb L.D. & Stitt M** (1989). Decreased-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and in the chloroplast of *Clarkia xantiana*. Impact on mass-action ratios and fluxes to sucrose and starch and estimation of flux control coefficients and elasticity coefficients. *Biochem. J.* 261 : 457-467

- Kruger N.J., Bulpin P.V. & apRees T.** (1983). The extent of starch degradation in the light in pea leaves. *Planta* 157 : 271-273
- Kuchitsu K., Tsuzuki M. & Miyachi** (1991). Polypeptide composition and enzyme activities of the pyrenoid and its regulation by CO₂ concentration in unicellular green alga. *Can.J.Bot.* 69 : 1062-1069
- Kuipers A.G.J., Jacobsen E. & Visser R.G.F.** (1994). Formation and deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule-bound starch synthase gene expression. *Plant Cell* 6 : 43-52
- Kumar A., Larsen C. E. and Preiss J.** (1986). Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose : α -1,4-glucan,4-glucosyl transferase as deduced from nucleotide sequence of the *glgA* gene. *J.Biol.Chem.* 261 : 16256-16259
- Laemmeli U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685
- Lavintman N. & Cardini C.E.** (1973). Particulate UDP-glucose : protein transglucosylase from potato tuber. *FEBS letters* 29 : 43-46
- Lavintman N., Tancardez J., Carcellar M., Mendiara S. & Cardini C.E.** (1974). Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch. Mechanism of formation and enlargement of a glucoproteic acceptor. *Eur.J.Biochem.* 50 : 145-155
- Lee & Preiss J.** (1986). *J. Biol. Chem.* 261 : 1058-1064
- van der Leij F.R., Visser R.G.F., Ponstein A.S., Jacobsen E. & Feenstra W.J.** (1991). Sequence of the structural gene for granule bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the *amf* allele. *Mol. Gen. Genet.* 228 : 224-248
- Levi C and M. Gibbs** (1984) Starch degradation in synchronously grown *Chlamydomonas reinhartii* and characterization of the amylase *Plant Physiol.* 74 : 459-463
- Li L. & Preiss J.** (1992). Characterization of ADPglucose pyrophosphorylase from a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Carbohydrate Res.* 227 : 227-239

- Libessart N., Maddelein M.-L., VandenKoornhuysen N., Decq A., Delrue B. & Ball S.G.** (1995). Storage, photosynthesis and Growth : the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 7 : 1117-1127
- Lin T.P., Caspar T, Sommerville C. & Preiss J.** (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *A.thaliana* (L.)Heynh. lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* 86 : 1131-1135
- Liu M.Y., Yang H. & Romeo T.** (1995). The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* 177 : 2663-2672
- Lomako J., Lomako W.M. and Whelan W.J.** (1988) A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* 2 : 3097-3103
- MacDonald F.D. & apRees T.** (1983). Enzymatic Properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. *Biochim. Biophys. Acta* 755 : 81-89
- MacDonald F.D. & Preiss J.** (1983). Solubilization of the starch granule bound starch synthase of normal and *waxy* maize. *Plant Physiol.* 73 : 175-178
- MacDonald F.D. & Preiss J.** (1985). Partial purification and characterization of granule bound starch synthases from normal and *Waxy* maize. *Plant Physiol.* 78 : 849-852
- Maddelein M.-L., Libessart N., Bellanger F., Delrue B., D'Hulst, VandenKoornhuysen N., Fontaine T., Wieruszeski J.-M., Decq A. & Ball S.G.** (1994). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule : Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J.Biol.Chem.* 269 : 25150-25157
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J.** (1982). Molecular cloning ; A Laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY : Cold harbor Spring Harbor Laboratory
- Manners D.J.** (1989). Recent developpements in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydr. Res.* 11 : 87-112
- Manuel L.J. & Moroney J.V.** (1988). Inorganic carbon accumulation in *C. reinhardtii* : new proteins are made during adaptation to low CO₂. *Plant Physiol.* 88 : 491-496

- Mares D.J., Hawker J.S. & Possingham J.V.** (1978). Starch synthesizing enzymes in chloroplasts of developing leaves of spinach (*Spinacea oleracea* L.). *J.Exp.Bot.* 29 : 829-835
- Marr A.G., Nilson E.H. & Clark D.J.** (1963). *Annals of the New York Academy of Science.* 102 : 536-548
- Martin C. & Smith A.M.** (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* 7 : 971-985
- Matagne R.F., Deltour R. & Ledoux L.** (1979). Somatic fusion between cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature (London)* 278 : 344-346
- Matagne R.F., Remacle R & Dinant M.** (1991). Cytofusion in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad. Sci USA.* 88 : 7447-74450
- McKay R.M.L., Gibbs S.P. & Espie G.S.** (1993). Effect of dissolved inorganic carbon on expression of carboxysomes localization of Rubisco and the mode of inorganic carbon transport in cells of the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Arch.Microbiol.* 159 : 21-29
- McKnight S.L., Lane M.D. & Glueckesohn-Waelsch S.** (1989). Is CCAAT/enhancer-binding protein a central regulator of energy metabolism ? *Genes Dev.* 3 : 2021-2024
- McMichael R.W., Kochansky J., Klein R.R. & Huber S.C.** (1995). Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 321 : 71-75
- Meier H. and Reid J.S.G.** (1982) Reserve polysaccharides other than starch in higher plants In *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.13A, (Loewus F.A. and Tanner W. eds), Plant carbohydrates I. Intracellular carbohydrates. Springer-Verlag, Berlin, pp418-478
- Mizuno K., Kawasaky T., Shimada H., Satoh H., Kobayashi E., Okumura S., Arai Y. & Baba T.** (1993). Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *J Biol Chem.* 268 : 19084-19091
- Mohabir G. & John F.** (1988). Effect of temperature on starch synthesis in potato tissue and in amyloplasts. *Plant Physiol.* 88 : 1222-1228
- Montgomery E.M., Sexson K.R. & Senti F.R.** (1961). High amylose corn starch fractions. *Starch/Stärke* 6 : 215-224

- Moreno S., Cardini C.E. & Tancardez J.S.** (1986). α -Glucan synthesis on a protein primer, uridine diphosphoglucose : protein transglucosidase I. *Eur.J.Biochem.* 157 : 539-545
- Morell M., Bloom M., Knowles V. & Preiss J.** (1987). Subunit structure of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 85 : 185-187
- Morell M., Bloom M. & Preiss J.** (1988). Affinity labeling of the allosteric activator site of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J.Biol.Chem.* 263 : 633-637
- Morrison W.R., Milligan T.P. and Azudin M.N.** (1984). A relationship between the amylose and lipid contents of straches from diploid cereals. *J.Cereal Sci.* 2 : 257-271
- Mu C., Harn C., Ko Y.T., Singletary G.W., Keeling P.L. & Wasserman B.P.** (1994). Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase activity in maize (cv B73) endosperm. *Plant J.* 6 : 151-159
- Müller-Röber B.T. & Koßmann J.** (1994). Approaches to influence starch quantity and quality in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17 : 601-613
- Müller-Röber B.T., Koßmann J., Hannah L.C., Willmitzer L. & Sonnewald U.** (1990). Only one of the two different ADPglucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Mol. Gen. Genet.* 224: 136-146
- Müller-Röber B.T., Sonnewald U. & Willmitzer L.** (1992). Inhibition of the ADPglucose pyrophosphorylase in transgenic potatos leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11 : 1229-1238
- Murdoch K.A.** (1992). The amylose-iodine complex. *Carbohydr.Res.* 233 : 161-174
- Nakamura Y. & Kawaguchi K.** (1992). Multiple forms of ADPglucose pyrophosphorylase of rice endosperm. *Physiologia Plantarum* 84 : 336-342
- Nakamura Y & Yuki K.** (1992) Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm. *Plant Sci.* 82 : 18-20
- Nakano K. & Fukui T.** (1986). The complete amino-acid sequence of potato α -glucan phosphorylase. *J.Biol.Chem.* 261 : 8230-8236

- Nakata P.A., Greene T.W., , Anderson J.M., Smith-White B.J., Okita T.W. & Preiss J.** (1991). Comparison of the primary sequences of two potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Molec. Biol.* 17 : 1089-1093
- Nakata P.A. & Okita T.W.** (1993).
- Nakata P.A. & Okita T.W.** (1995). Differential regulation of ADPglucose pyrophosphorylase in the sink and the source tissues of potato. *Plant Physiol.* 108 : 361-368
- Nelson O.E., Chourey P.S. & Chang M.T.** (1978). Nucleotide diphosphate sugar-starch glucosyl transferase activity of *wx* starch granule. *Plant Physiol.* 72 : 383-386
- Nelson O.E. & Rines H.W.** (1962). The enzyme deficiency in the *waxy* mutant of maize. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 9 : 297-300
- Neuhaus H.E. & Stitt M.** (1990). Control analysis of photosynthate partitioning. Impact of reduced activity of ADPglucose pyrophosphorylase or plastid phosphoglucomutase on the fluxes to starch and sucrose in *A.thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 182 : 445-454
- Ogren W.L.** (1984). Photorespiration : pathways, regulation, and modification. *Annu. rev. Plant Physiol.* 35 : 415-442
- Ogren W.L., Somerville C.R., Somerville S.C., Spreitzer R.J., Spalding M.H. & Jordan D.B.** (1984). Genetic analysis of photosynthetic carbon pathways. *Adv.Photosynth.Res.* 3 : 429-435
- Okada M.** (1992). Recent studies on the composition and the activity of algal pyrenoids. *Progr. Phycol. Res.* 8 : 117-138
- Okita T.W.** (1992). Is there an alternative pathway for starch synthesis ? *Plant Physiol.* 100 : 560-564
- Okita T.W., Greenberg E., Kuhn D.N. & Preiss J.** (1979). Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol.* 64 : 187-192
- Okita T.W., Nakata P.A., Anderson J.M., Sowokinos J., Morell M. & Preiss J.** (1990). The subunit structure of potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 93 : 785-790

- Olive M.R., Ellis R.J. & Schuch W.W. (1989). Isolation and nucleotide sequences of cDNA clones encoding ADPglucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf and endosperm. *Plant Mol. Biol.* 12 : 525-538
- Pan D. and Nelson O.E. (1984) A debranching enzyme deficiency in endosperms of *sugary-1* mutants of maize. *Plant Physiol.* 74 : 324-328
- Parsons T.F. & Preiss J. (1978). Biosynthesis of bacterial glycogen. Isolation and characterization of the pyridoxal-P allosteric activator site and the ADP-glucose protected pyridoxal binding site in *E.coli* B ADP-glucose synthase. *J.Biol.Chem.* 253 : 7638-7645
- Perez C.M., Perdon A A., Resurreccion A.P., Villereal R.M. & Juliano B.O. (1975). Enzymes of carbohydrate Metabolism in developing rice grain. *Plant Physiol.* 56 : 579-586
- Pettersson G. & Ryde-Pettersson U. (1989). Metabolic controlling the rate of starch synthesis in the chloroplast of C3 plants. *Eur.J.Biol.Chem.* 179 : 169-172
- Plaxton W.C. & Preiss J. (1987). Purification and properties of nonproteolytic degraded ADPglucose pyrophosphorylase from maize endosperm. *Plant Physiol.* 83 : 105-112
- Pozueta-Romero J., Ardila F. & Akazawa T. (1991). ADP-glucose transport by the chloroplast adenylate translocator is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiol.* 97 : 1565-1572
- Preiss J. (1982a). Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Ann. Rev. of Plant Physiology.* 54 : 431-454
- Preiss J. (1982b). Biosynthesis of starch and its regulation. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.13A, (Loewus F.A. and Tanner W. eds), Springer-Verlag, Berlin, pp397-417
- Preiss J. (1984). Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 38 : 419-458
- Preiss J. (1988). Biosynthesis of starch and its regulation. In *The Biochemistry of Plants*, Vol.14 (Preiss J ed.), Academic Press, New York, NY. pp181-254
- Preiss J. (1991). Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. In *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Vol. 7 (Mifflin B.J. & Mifflin H. F eds), Oxford University Press, Oxford ; pp59-114

- Preiss J., Bloom M., Morell M., Knowles V., Plaxton W.C., Okita T.W., Larsen R., Harmon A.C. & Putman-Evans C.** (1987). Regulation of starch synthesis : Enzymological and genetics studies. In *Tailoring Genes for Crop Improvement. An Agricultural Perspective*, (Bruening G., Harada J., Kosuge T and Hollaender eds.), Plenum Press, New York. pp133-174
- Preiss J. & Boyer C.** (1980). Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases. In *Mechanism of Saccharide Polymerization and depolymerization*, (Marschall J.J. ed.). Academic Press, New York ; pp161-174
- Preiss J., Danner S., Summers P.S., Morell M., Barton C.R., Yang L. & Nieder M.** (1990). Molecular characterization of *Brittle-2* gene effect on maize endosperm ADPglucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Physiol.* 92 : 881-885
- Preiss J., Cress D., Hutny J., Morell M., Barton C.R., Okita T & Anderson J.** (1989). Regulation of starch synthesis. Biochemical and genetics studies. In *Biocatalysis in agricultural Biotchnology*. (Whitaker J.R.& Sonnet P.E. eds), Amer. Chem. Soc. Washington, D.C. pp.84-92
- Preiss J., Guan H.P., Fu Y.B., Ballicora M.A. & Sivak M.** (1995). Can we assign roles for the starch biosynthetic enzymes with respect to starch biosynthesis ? In *Proceedings of first International Meeting on Sucrose Metabolism*. ASPP Publishers
- Preiss J. & Levi C.** (1980). Starch biosynthesis and degradation. In *The Biochemistry of Plants* (Preiss J. ed.), vol.3 ; Academic Press, Inc., pp371-423
- Preiss J. & Romeo T.** (1989). Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. In *Advances in Microbial Physiology* (Rose H.A. and Tempest D.W. eds), Vol.30, pp183-238
- Preiss J. & Romeo T.** (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 47 : 301-327
- Prioul J.-L., Jeannette E., Reyss A., Grégory N., Giroux M., Hannah L.C. & Causse M.** (1994). Expression of ADPglucose pyrophosphorylase in maize (*Zea mays* L.), grain and source leaf during grain filling. *Plant Physiol.* 104 : 179-187

- Ramazanov Z, Rawat M., Henk M.C., Mason C.B., Matthews S.W. & Moroney J V.** (1994). The induction of the CO₂-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *C. reinhardtii*. *Planta*
- Recondo E., Dankert M. & Leloir L.F.** (1963). Isolation of adenosine diphosphate D-glucose from corn grains. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 12 : 204-207
- Recondo E. & Leloir L.F.** (1961). Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6 : 85-88
- Reeves C.D., Krishnan H.B. & Okita T.W.** (1986). Gene expression in developing wheat endosperm. Accumulation of gliadin and ADPglucose pyrophosphorylase messenger RNAs and polypeptides. *Plant Physiol.* 82 : 360-364
- Riesmeier J., Willmitzer L. & Frommer W.B.** (1992). Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11 : 4705-4713
- Robin J.P., Mercier C., Charbonnière R. and Guilbot A.** (1974). Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.* 51 : 389-406
- Robinson N. & Preiss J.** (1987). Localization of carbohydrate metabolizing enzymes in guard cells of *Commelia communis*. *Plant Physiol.* 85 : 360-364
- Romeo T., Black J. & Preiss J.** (1990). Genetic regulation of glycogen synthesis in *Escherichia coli* : *in vivo* effects of the catabolite repression and stringent response system in *glg* gene expression. *Curr. Microbiol.* 21 : 131-137
- Romeo T., Gong M., Liu M.Y. & Brun-Zinkernagel A.-M.** (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size and surface properties. *J. Bacteriol.* 175 : 4744-4755
- Romeo T., Kumar A. & Preiss J.** (1988). Analysis of the *Escherichia coli* gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic genes. *Gene* 70 : 363-376

- Sanger F., Nicklen S. & Carlson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463-5467
- Sano Y.** (1984). Differential regulation of *waxy* gene protein in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 68 : 467-473
- Sauer N. & Stadler R** (1993). A sink-specific H⁺/monosaccharide co-transporter from *Nicotiana tabacum* : cloning and heterologous expression in baker's yeast. *Plant J.* 4 : 601-610
- Schächtele C & Steup M** (1986). α -1,4 glucan phosphorylase forms from leaves of spinach (*Spinacea oleracea* L.). I-In situ localization by indirect immunofluorescence. *Planta* 167 : 444-451
- Schünemann D., Borchert S., Flügge U.L. & Heldt H.W.** (1993). ADP/ATP translocator from pea root plastids. Comparison with translocators from spinach chloroplasts and pea leaf mitochondria. *Plant Physiol.* 103 : 131-137
- Shannon J.C. and Garwood D.L.** (1984). Genetics and physiology of starch development. In *Starch Chemistry and Technology* (Whistler R.L., BeMiller J.N. and Paschall E.F. eds), Academic Press, Orlando, pp25-86.
- Shaw J.R. & Hannah L.C.** (1992). Genomic nucleotide sequence of a wild type *shrunk-2* allele of *Zea mays*. *Plant Physiol.* 98 : 1214-1216
- Shen J.** (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell.* 2 : 1027-1038
- Singh B.K. & Preiss J.** (1985). Starch branching enzymes from maize. Immunological characterization using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Physiol.* 79 : 34-40
- Sivak M.N. & Preiss J.** (1994) Starch synthesis in seeds. In *Seed development and germination* (J. Kigel and G. Galili eds) Marcel Dekker, Inc. New York pp139-168
- Sivak M.N., Tancardez J.S. & Cardini C.E.** (1981). Studies on potato tuber phosphorylase-catalysed reaction in the absence of an exogenous acceptor. Characterization and properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 212 : 525-536
- Smith A.M.** (1988). Major differences in isoforms of branching enzyme between developing embryos of round and wrinkled-seeded peas (*Pisum sativum* L.). *Planta* 175 : 270-279

- Smith A.M.** (1990). Enzymes of starch synthesis. In *Methods in Plant Biochemistry*, (Lea P.J. ed.) ; vol. 3 ; Academic Press, New York. pp.93-102
- Smith A.M., Bettey M. & 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 Physiol.* 89 : 1279-1284
- Smith A.M., Denyer K. & Martin C.R.** (1995). What controls the amount and structure of starch in storage organs ? *Plant Physiol.* 107 : 673-677
- Smith A.M., Neuhaus H.E. & Stitt M.** (1990). The impact of decreased activity of starch branching enzyme on photosynthetic starch synthesis in leaves of wrinkled-seeded peas. *Planta* 181 : 310-315
- Smith-White B.J. & Preiss J.** (1992). Comparison of proteins of ADPglucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Mol. Evol.* 34 : 449-464
- Smyth D.A.** (1988). Some Properties of starch branching enzyme from indica rice endosperm (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 57 : 1-8
- Sowokinos J.R. & Preiss J.** (1982). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum* III. Purification, physical and catalytic properties of ADPglucose pyrophosphorylase in potatoes. *Plant Physiol.* 69 : 1459-1466
- Stark D.M., Timmermann K.P., Barry G.F., Preiss J. & Kishore G.M.** (1992). Regulation of amount of starch in plant tissues by ADPglucose pyrophosphorylase. *Science* 258 : 287-292
- Steup M, Robenek H. and Melkonian M.** (1983). *In vitro* degradation of starch granules isolated from chloroplasts. *Planta* 158 : 428-436
- Stinard P.S., Robertson D.S. & Schnable P.S.** (1993). Genetic isolation, cloning and analysis of a *Mutator*-induced dominant antimorph of maize *amylose extender 1* locus. *Plant Cell* 5 : 1555-1566
- Stitt M.** (1984). Degradation of starch in chloroplasts : a buffer to sucrose metabolism. In *Storage Carbohydrates in Vascular Plants*, (Lewis D.H. ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp205-229

- Stitt M.** (1986). Regulation of photosynthetic sucrose synthesis : integration, adaptation, and limits. In *Phloem Transport*, (Cronshaw W.J., Lucas W.J. & Giaquinta R.T. eds), New York : Alan R. Liss, Inc. pp. 331-347
- Stitt M.** (1989). Control of sucrose synthesis : estimation of free energy charges, the contribution of equilibrium and non-equilibrium reactions, and elasticity and flux control coefficients. In : *Techniques and new developments in photosynthesis research*. (Barber J., Malkin R. eds) Plenum Press, New York. pp365-392
- Stitt M.** (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Molec. Biol.* 41 : 153-185.
- Stitt M., Wirtz W. and Heldt H.W.** (1980). Metabolite levels during induction in the chloroplast and extrachloroplast compartments of spinach protoplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 593 : 85-102
- Stitt M & Heldt H.W.** (1981). Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. *Biochem. Biophys. Acta* 638 : 1-11
- Stitt M. & Steup M.** (1985). Starch and sucrose degradation. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol.18,(Douce R nd Day D. eds), Springer-Verlag, Berlin, pp347-390
- Strange R.E.** (1968). *Nature* 220 : 606
- Sullivan T.D., Strelow L.I., Illingworth C.A., Phillips R.L. & Nelson O.E.** (1991). Analysis of maize *brittle-1* alleles and a defective suppressor-mutator-induced mutable allele. *Plant Cell* 3 : 1337-1348
- Takeda Y., Guan H.P. & Preiss J.** (1993). Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm.. *Carbohydr. Res.* 240 : 253-263
- Takeda Y. & Hizukuri S.** (1982). Location of phosphate groups in potato amylopectin. *Cabohyd. Res.* 102 : 312-327
- Takeda Y. & Hizukuri S.** (1986) Purification and structure of amylose from rice starch. *Carbohydr. Res.* 148 : 299-308
- Takeda Y, Shitaozono T. & Hizukuri S.** (1988). Molecular structure of corn starch. *Starch/Stärke* 40 : 51-54

- Takeda Y. & Preiss J.** (1992). Structure of B90 (*sugary*) and W64A (normal) maize starches. *Carbohydr. Res.* 240 : 265-275
- Tancardez J.S. & Cardini C.E.** (1978). A two-step enzymatic formation of glucoprotein in potato tuber. *Biochim. Biophys. Acta* 543 : 423-429
- Thorn W. & Mohazzeb S.** (1990). α -D-polyglucane-iodine complexes. *Starch/Stärke* 42 : 455-459
- Turpin D.H., Miller A.G. & Canvin D.T.** (1984). Carboxysome content of *Synechococcus leopoliensis* (Cyanophyta) in response to inorganic carbon. *J. Phycol.* 20 : 249-253
- Tyson R.H. & apRees T.** (1988). Starch synthesis by isolated amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* 175 : 33-38
- Vandenkoornhuysen N.** (1992). Isolement et caractérisation de mutations impliquées dans le métabolisme de l'amidon. *Mémoire de DEA* (Université des Sciences et Technologies de Lille)
- Villand P., Aalen R., Olsen O.A., Lüthi E., Lönneborg A & Kleczkowski L.A.** (1992a). PCR amplification and sequence of cDNA clones for the small and the large subunits of ADPglucose pyrophosphorylase from barley tissues. *Plant Mol. Biol.* 19 : 381-389
- Villand P., Olsen O.A., Kilian A & Kleczkowski L.A.** (1992b). ADPglucose pyrophosphorylase large subunit cDNA from barley endosperm. *Plant Physiol.* 100 : 1617-1618
- Viola R., Davis H.V. & Chudeck A.R.** (1991). Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.). Elucidation by ¹³C-NMR spectroscopy. *Planta* 183 : 202-208
- Vos-Scheperkeuter G.H., deBoer W., Visser R.G.F., Feenstra W.J. & Witholt B.** (1989) Identification of granule-bound starch synthase in potato tubers. *Plant Physiol.* 82 : 411-416
- Weatherwax P.** (1922). A rare carbohydrate in waxy maize. *Genetics* 7 : 568-572
- Weber H., Heim U., Borisjuk L. & Wobus U.** (1995). Cell-type specific, coordinate expression of two ADPglucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development in *Vicia faba* L. *Planta* 893 : 13-21

- Weeks D.P., Beerman N. & Griffith O.M.** (1986). A small scale five hour procedure for isolating multiple samples of CsCl-purified DNA : application to isolation from mammalian, insect, higher plant, algal, yeast and bacterial sources. *Analytical Biochemistry* 152 : 376-385
- Weiner H., Stitt M. & Heldt H.W.** (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochem. Biophys. Acta* 893 : 13-21
- Yeh J.Y., Garwood D.L. & Shannon J.C.** (1981). Characterization of starch from maize endosperm mutants. *Starch/Stärke* 33 : 222-230

ANNEXE

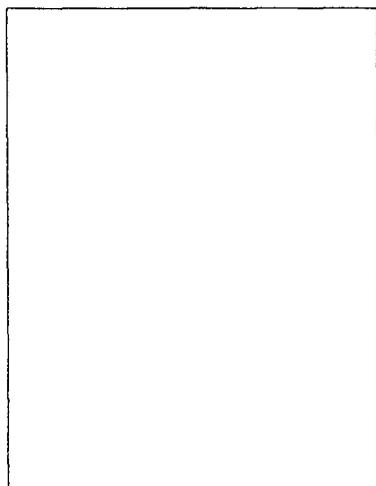
Vers une compréhension de la biogenèse du grain d'amidon chez les plantes

Nathalie Van den Koornhuysse, Nathalie Libessart et Steven Ball.

Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 111 du CNRS,

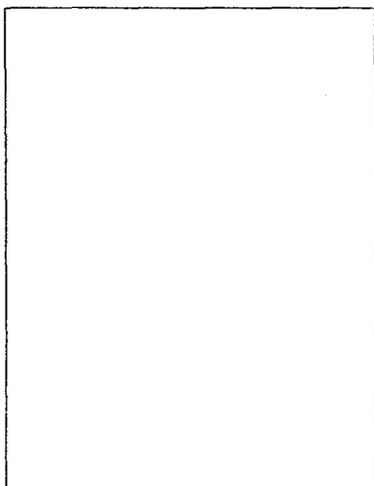
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Les auteurs



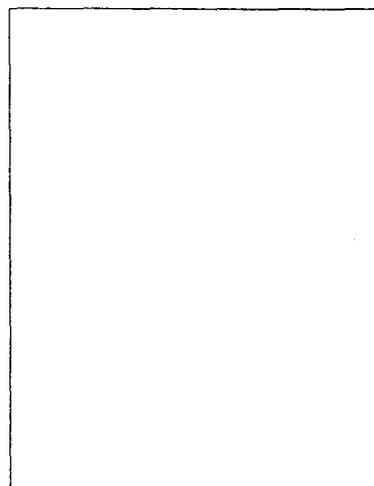
Nathalie Van den Koornhuysse

Nathalie Van den Koornhuysse a bénéficié d'une allocation de recherches du Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche. Docteur de l'Université des Sciences de Lille, son travail a porté sur l'étude de la biosynthèse du glycosynucléotide précurseur de la synthèse de l'amidon. Son travail a été codirigé par Jack Preiss lors de deux séjours consécutifs à l'Université d'Etat du Michigan. Elle débute actuellement son stage post-doctoral à Lille grâce à un financement de l'Union Européenne.



Nathalie Libessart

*Nathalie Libessart a bénéficié d'une allocation délivrée par la Société Roquette Frères. Elle a reçu son titre de Docteur de l'Université des Sciences de Lille en janvier 1996. Ses travaux ont surtout porté sur l'étude de la biosynthèse de l'amidon transitoire chez *Chlamydomonas*. Actuellement en stage post-doctoral court dans la Société Roquette Frères, elle sera dès le mois d'avril intégrée pour un stage de deux ans dans le laboratoire de Jack Preiss à l'Université d'Etat du Michigan.*



Steven Ball

*Steven Ball est Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Il dirige l'équipe de Génétique Microbienne du Laboratoire de Chimie Biologique. L'activité de son groupe est centrée sur l'étude de la biosynthèse de l'amidon et de sa régulation chez l'algue unicellulaire verte modèle *Chlamydomonas reinhardtii*. Il coordonne actuellement un programme FAIR de l'Union Européenne (PL 95-568) intitulé "Genetic Tailoring of Novel Starch Polymers" fédérant 12 participants de 8 pays différents.*

Introduction

L'amidon occupe une place prépondérante, non seulement comme apport calorique principal dans l'alimentation humaine et animale, mais aussi comme substrat de transformation pour les industries spécialisées d'extraction et de transformation. Plus de 600 produits distincts sont commercialisés à partir d'amidons purifiés dont la moitié sont utilisés à des fins non-alimentaires dans des secteurs aussi variés que la chimie, le textile, le bâtiment ou la papeterie. La structure fine du polysaccharide influe de manière considérable que ce soit sur la digestibilité alimentaire (amidons partiellement ou totalement résistants) ou sur l'ensemble des propriétés technologiques intervenant dans sa transformation (viscosité, solubi-

lité, gélification, rétrogradation...). Au plan biologique, l'amidon *sensu stricto* n'est retrouvé que dans le règne végétal et plus spécifiquement dans les chloroplastes ou dans les plastes non photosynthétiques (amyloplastes, leucoplastes ...) de la cellule végétale eucaryote. L'amidon, comme le glycogène, est constitué de glucanes liés en α -1,4 et ramifiés en α -1,6. Contrairement au polysaccharide de réserve animal ou fongique bâti à partir d'UDP-glucose, l'amidon, comme le glycogène bactérien, est exclusivement synthétisé à partir d'ADP-glucose. C'est du point de vue structural que les 2 types de polymères divergent le plus. Le glycogène est constitué de grains amorphes de petite taille, solubles dans l'eau, et facilement mobilisables. Par contre, l'a-

midon adopte une structure beaucoup plus complexe conduisant à l'élaboration de grains insolubles semi-cristallins, résistants et de très grosse taille (de 0.1 à 10 μ m de diamètre). L'amidon que l'on retrouve dans les amyloplastes des organes de réserve (amidon de réserve) se distingue aussi par son hétérogénéité. En effet, deux fractions principales sont retrouvées: l'amylose d'une part, fraction minoritaire (environ 30% en poids) de faible poids moléculaire modérément ramifiée (<1% de liaisons α -1,6) et l'amylopectine d'autre part, de haut poids moléculaire, et fortement ramifiée (5% de liaisons α -1,6). Le grain croît par apposition de couches successivement amorphes et cristallines à partir du centre du grain d'amidon ou hile qui renferme un polysaccharide de struc-

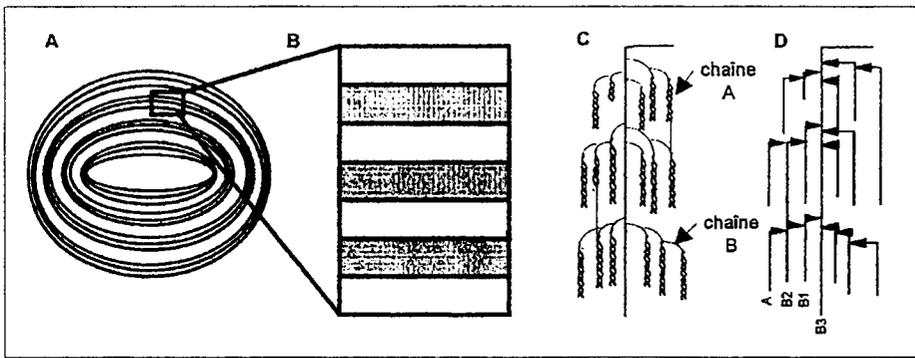


Figure 1 - Organisation du grain d'amidon. Structure primaire et secondaire de l'amylopectine. (A) Schéma du grain d'amidon montrant la succession des anneaux de croissance amorphes et cristallins. (B) Section agrandie du grain. (C et D) Organisation moléculaire de l'amylopectine (la position de l'amylose est trop mal définie pour figurer dans ce schéma). (C) Structure secondaire de trois grappes successives. (D) Structure primaire de trois grappes successives expliquant la nomenclature utilisée pour les différents types de chaînes.

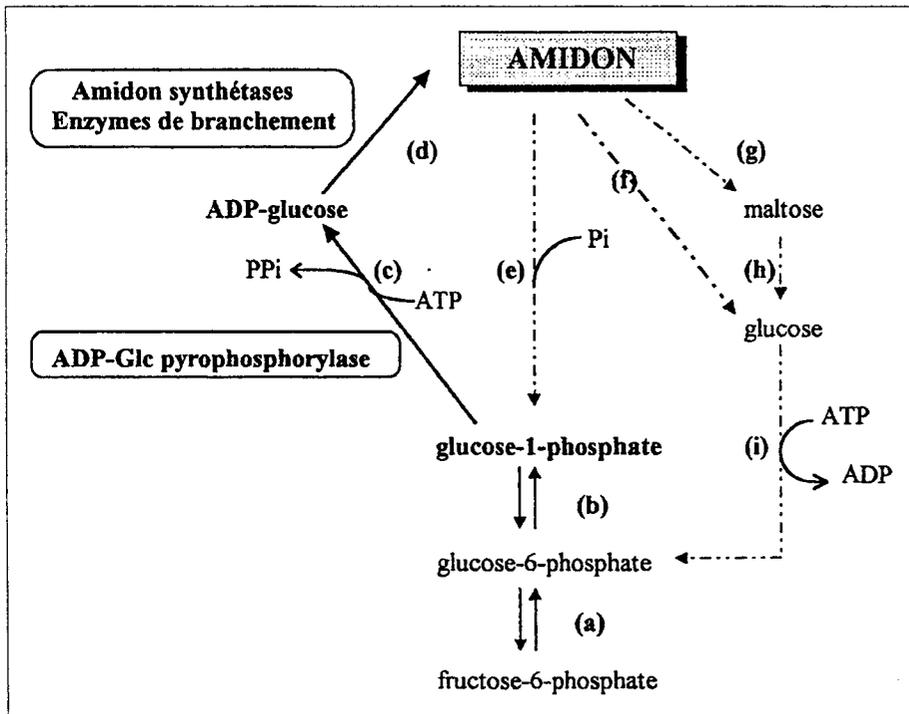


Figure 2 - Schéma général du métabolisme de l'amidon

(a) phosphoglucoisomérase; (b) phosphoglucomutase; (c) ADP-glucose pyrophosphorylase; (d) amidon synthétases et enzymes de branchement; (e) phosphorylase; (f) α -amylase; (h) glucosidase; (i) hexokinase

---- voie de dégradation — voie de synthèse

ture moins organisée. Les cristaux d'amylopectine sont disposés radialement de telle manière que les glucanes orientent leurs extrémités non-réductrices vers l'extérieur [1]. Comme nous le précisons, l'amylopectine forme le squelette de cette organisation (pour revue voir [2]). Aucun mutant dépourvu de cette fraction n'a pu être isolé chez les végétaux, alors que les amidons provenant soit de tissus photosynthétiques (amidon photosynthétique ou transitoire) [3], soit des tissus de réserve de mutants spécifiques ou encore d'espèces particulières (amidon floridéen des algues rouges [4]) sont dépourvus d'amylose et restent normalement synthé-

tisés et structurés. En conséquence une compréhension des mécanismes de base de l'édification du grain passe essentiellement par une étude approfondie de la biosynthèse de l'amylopectine. Nous traiterons dans cette revue de la structure fine de l'amylopectine. Nous discuterons ensuite de la synthèse du glycosylnucléotide précurseur et de la biosynthèse des deux fractions de l'amidon. Nous terminerons en envisageant des aspects plus fonctionnels portant sur les relations structure-fonctions existant au cours de la photosynthèse dans le chloroplaste ou de la mise en réserve dans l'amyloplaste.

L'amylopectine est une molécule semi-cristalline à ramification asymétrique

Les grains d'amidon se caractérisent par un degré de cristallinité situé entre 15 à 45% [5]. Les études de diffraction des rayons X démontrent qu'il existe un motif structural élémentaire de taille invariante (9 nm) dans le règne végétal [6]. Le motif élémentaire se compose de 2 lamelles alternativement amorphe et cristalline. L'importance relative de ces deux lamelles au sein du même motif dépend de l'espèce et du génotype. Ainsi la taille de la portion cristalline du motif varie de 4 à 6 nm; ce qui correspond à un glucane linéaire de 12 à 18 résidus de longueur. Les spectres de diffraction des rayons X se regroupent en 3 classes qui toutes s'interprètent par un agencement compact de doubles hélices parallèles (pour revue voir [7]). La figure 1 résume les différents niveaux d'organisation du grain et replace le motif élémentaire dans son contexte macroscopique. La structure primaire du motif illustré en 1C montre l'aspect asymétrique du branchement de l'amylopectine. C'est dans la lamelle amorphe que se retrouve la plupart, sinon l'intégralité, des liaisons α -1,6. Le degré de ramification de cette lamelle est donc équivalent, sinon supérieur, à celui qui caractérise le glycogène. La nature invariante de la taille de la grappe élémentaire pour toutes les espèces étudiées et l'aspect asymétrique de la ramification suggère l'existence dans le règne végétal d'un mécanisme de synthèse ordonnée très bien conservé et qui reste encore à établir.

La synthèse du glycosylnucléotide précurseur

Les étapes principales du métabolisme de l'amidon sont résumées dans la Figure 2. C'est Luis Leloir [8] qui en 1961 découvre que l'ADP-glucose est utilisé préférentiellement par les enzymes d'élongation végétales. L'ADP-glucose pyrophosphorylase, l'enzyme responsable de la synthèse du nucléotide-sucré précurseur, catalyse la formation du substrat à partir de glucose-1-phosphate (G-1-P) et d'ATP: $ATP + G-1-P \leftrightarrow ADPG + Pyrophosphate$.

La fonction essentielle de cette enzyme est attestée par la caractérisation de nombreux mutants dans des espèces aussi diverses que le maïs [9], le pois [10], *Arabidopsis thaliana* [11] ou l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*

[12, 13]. Dans tous les cas, la baisse de cette activité est corrélée à une diminution proportionnelle du taux de synthèse de l'amidon. La nature strictement limitante de l'activité a été aussi confirmée par la construction de pommes de terre transgéniques exprimant des ARN antisens dirigés contre la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase [14]. A l'inverse, il est possible de surexprimer l'activité dans la pomme de terre et d'obtenir des accroissements spectaculaires des teneurs en amidon des tubercules [15]. L'utilisation de gènes mutants d'origine bactérienne à activité spécifique intrinsèque anormalement élevée s'est avérée, dans ce contexte, particulièrement payante. L'intérêt agronomique de telles constructions est bien sûr considérable. L'ADP-glucose pyrophosphorylase végétale est une enzyme hétérotétramère sujette à une régulation allostérique double. Le 3-phosphoglycérate (3-PGA) en est l'activateur le plus efficace tandis que l'orthophosphate module négativement l'activité (pour revue voir [16]). Des mutants de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* dont l'enzyme est spécifiquement désensibilisée à l'activateur ont été obtenus [12]. Ces mutants renferment une activité ADP-glucose pyrophosphorylase qualitativement et quantitativement identique à celle de la souche sauvage en absence de 3-PGA. Par contre, ils ne contiennent que de 1 à 10% des quantités d'amidon normales quelles que soient les conditions physiologiques appliquées (lumière, obscurité, croissance et carences minérales). Ces observations établissent *in vivo* la réalité physiologique du contrôle allostérique de l'enzyme. Des mutations altérant d'autres activités enzymatiques telles que la phosphoglucomutase et la phosphoglucose isomérase plastidiales ont été décrits chez *Arabidopsis thaliana* [17], *Nicotiana glauca* [18] et *Chlamydomonas reinhardtii* [13]. Des baisses importantes des taux de synthèse et des quantités d'amidon ont été enregistrées dans tous les cas. Ces résultats plaident contre l'existence d'une voie de synthèse du glycosylnucléotide propre au cytoplasme et confirment la localisation plastidiale des enzymes de biosynthèse. La synthèse d'ADP-glucose contrôle non seulement la quantité de polysaccharide, mais aussi sa structure et sa composition [13]. Chez les végétaux, deux types d'amidon sont synthétisés: l'amidon transitoire (ou encore amidon photosynthétique) et l'amidon de réserve [3]. L'amidon transitoire est accumulé le jour dans les cellules photosynthétiques

des feuilles et dégradé la nuit autorisant ainsi l'alimentation régulière de la plante en saccharose. La synthèse d'amidon dans les organes de réserve reste par contre continue et se produit à un niveau beaucoup plus élevé. La disponibilité requise du carbone diffère dans ces deux conditions. L'amidon transitoire doit être rapidement et à tout moment métabolisable tandis que l'amidon de réserve verra son catabolisme différé à la germination lorsque des formes spécifiques d'enzymes de dégradation seront induites.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii* les deux formes d'amidon ont été purifiées et leurs structures analysées. L'amidon photosynthétique (ou transitoire) est dépourvu d'amylose malgré la présence d'une GBSS (Granule-Bound Starch Synthase) surabondante (voir ci-dessous). La structure de l'amylopectine devient plus ramifiée et la distribution de longueur des chaînes est enrichies en glucanes très courts [3]. Chez l'algue, les mutations provoquant une baisse des activités ADP-glucose pyrophosphorylase et de l'activité phosphoglucomutase conduisent à l'accumulation d'un polysaccharide de réserve dont la structure est en tous points identique à celle de l'amidon photosynthétique [13]. Par ailleurs, aucune modification apparente des autres activités biosynthétiques n'a pu être détectée chez ces mutants. Il est donc établi que l'approvisionnement en substrat va régir l'édification de la structure et celle-ci va s'adapter directement aux besoins physiologiques dictés par l'approvisionnement en carbone et ce, sans nécessiter l'activation, l'inhibition ou l'induction de transférases particulières. Il est probable que le contrôle s'exerce par l'entremise des affinités différentes pour l'ADP-glucose montrées par des enzymes d'élongation de spécificités structurales diverses.

La synthèse de l'amylose

Il ne fait aucun doute que la synthèse de l'amylose ne soit effectuée par la GBSS. Cette enzyme représente la forme principale d'amidon synthétase (ADPglucose:1,4- α -D-glucosyltransferases) liée au grain et constitue à elle seule plus de 80% en poids de la fraction protéique associée au grain. Les ADPglucose:1,4- α -D-glucosyltransferases végétales qui sont incapables d'amorcer seules une réaction de synthèse catalysent le transfert du glucose en position α -1,4 à l'extrémité non-réductrice d'un glucane préexistant. L'implication de la protéine majeure associée au grain d'amidon dans l'élonga-

tion des chaînes d'amylose a été très largement démontrée.

Des mutants dépourvus d'activité GBSS ont été isolés, entre autres dans le maïs [19], la pomme de terre [20] et *Chlamydomonas reinhardtii* [21]. Tous se sont révélés incapables de synthétiser l'amylose. Le grain d'amidon des mutants est normalement structuré et cristallin. L'amylopectine des mutants a des propriétés se rapprochant de celles que l'on retrouve dans l'amidon normal. La netteté des résultats obtenus a conduit à formuler des conclusions abusives sur la fonction de la GBSS. D'une part, la présence d'une enzyme active a été estimée nécessaire et suffisante pour aboutir à la synthèse de l'amylose et, d'autre part la fonction de la GBSS s'est vu réduite à l'édification unique et spécifique de cette fraction. Pourtant, les expériences originales de Leloir, reprises et approfondies par Baba [22], indiquaient clairement que la GBSS incorporait le glycosylnucléotide principalement dans la fraction amylopectine. Ces observations se sont vues récemment confortées par des études d'interactions géniques chez *Chlamydomonas reinhardtii* [23]. Ils établissent une corrélation nette entre la quantité d'activité résiduelle GBSS et la structure et la quantité d'amylopectine accumulées par différentes combinaisons de mutations impliquant la GBSS et l'amidon synthétase soluble majeure. Il nous semble désormais acquis que la GBSS est responsable de la synthèse de tous les longs glucanes et ce également au sein de la fraction amylopectine. L'absence de la fraction amylose dans l'amidon photosynthétique [3] ou dans le polysaccharide accumulé par les souches déficientes pour la synthèse de l'ADP-glucose [23] n'est pourtant pas corrélée à une baisse d'activité GBSS, au contraire. Ces observations démontrent que, si la présence d'activité GBSS demeure bien une condition nécessaire à la synthèse de l'amylose, elle n'en est pas pour autant suffisante. Les paramètres physiologiques et métaboliques autorisant la synthèse de cette sous-fraction sont actuellement à l'étude.

Elongation et ramification de l'amylopectine

Contrairement à la situation rencontrée pour le glycogène, les enzymes de ramification (1,4- α -D-glucan: 1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferases) et les amidons synthétases solubles intervenant dans la synthèse de l'amylopectine sont multiples et de spécificités diverses.

Un minimum de deux enzymes d'élongation solubles (SSS-I et SSS-II) et de deux enzymes de branchement (BE-I et BE-II) semblent requises pour l'édification d'un polysaccharide de type amidon (pour revues voir [24] et [25]). Des mutants déficients en activité de branchement de type II ont été rapportés chez le maïs (mutation *ae* ou amylose-extender) et le pois (mutation au locus *R* ou *rugosus*, premier gène identifié par Mendel) (pour revue voir [26]). Dans les deux cas, les loci incriminés ont été clonés [27], [28] et constituent les gènes de structure d'enzymes de branchement. L'amidon des mutants est considérablement enrichi en amylose (jusqu'à 90% si l'on tient compte du matériel intermédiaire), l'amylopectine résiduelle voit sa distribution de longueur de chaînes altérée et le type cristallin passe de A en B [26]. Un nouveau type de fraction s'accumule dans ces mutants dont la structure est intermédiaire entre celle de l'amylose et de l'amylopectine. Ces modifications structurales très importantes ne s'accompagnent que d'une baisse comparativement légère des quantités accumulées. L'activité BE-I suffit donc à assurer sur le plan quantitatif l'essentiel de la synthèse. Aucun mutant défectueux pour la BE-I n'a pu à ce jour être isolé. L'ensemble de nos connaissances concernant cette enzyme proviennent donc uniquement d'études enzymologiques de branchement réalisées *in vitro* [29], [30]. Ces études démontrent que la BE-I branche les longs glucanes avec une efficacité très supérieure à la BE-II. La longueur moyenne des chaînes transférées par la BE-I est aussi plus importante que celle qui caractérise la BEII. La spécificité moléculaire exacte de la réaction (branchement intra-ou intercaténaire) reste malheureusement encore incomprise pour les deux types d'enzymes. Nos connaissances concernant les enzymes d'élongation sont encore plus fragmentaires. A ce jour, seuls des mutants déficients en l'enzyme soluble d'élongation majeure (SSS-II) ont été décrits et ce uniquement chez *Chlamydomonas* [31]. Dans ce cas les mutants voient leur synthèse d'amidon réduite de 60 %. En outre, la structure du polysaccharide résiduel est fortement altérée: un accroissement de la teneur en longs glucanes s'accompagne d'une diminution sensible du contenu en chaînes de longueur comprises entre 8 et 40 résidus glucose de long. Ces amidons ont par ailleurs perdu l'essentiel de leur cristallinité qui passe du type A en type B. Ce remaniement s'accompagne d'un accroissement du nombre de petites chaînes avec un maximum caractéristique des

chaînes dont la longueur correspond à 6 résidus de glucose. Ce maximum constitue d'ailleurs la signature structurale de la défektivité. Assez curieusement le même maximum est retrouvé lorsque les enzymes de ramification végétales des 2 types (I et II) sont exprimées seules ou en combinaison dans une souche d'*E. coli* exprimant la glycogène synthétase bactérienne (et non l'enzyme de branchement du glycogène) [32].

Des mutants déficients simultanément pour la GBSS et la SSS-II ont été construits par croisement chez *Chlamydomonas* [23]. Ces souches qui ne contiennent plus que la SSSI voient leur synthèse d'amidon s'effondrer à moins de 5% de la quantité accumulée par la souche sauvage et le polysaccharide accumulé constitue un type nouveau. Plus ramifié (7 à 8%) que l'amylopectine la plus branchée rapportée chez les végétaux, cet "amidon" adopte encore une structure macroscopique granulaire. Toutefois, les grains se caractérisent par des distributions de taille et des formes particulièrement hétérogènes. L'ensemble de ces résultats nous ont conduits à proposer que chaque enzyme d'élongation est responsable de la synthèse de glucanes de classes de tailles différentes et ne seraient que très partiellement redondantes. Ainsi la GBSS conduirait à la formation de tous les longs glucanes, qu'ils soient internes à la structure de l'amylopectine ou compris dans la fraction amylose. La SSS-II synthétiserait préférentiellement les chaînes de taille moyenne constitutives des grappes élémentaires de l'amylopectine alors que la SSSI s'apparenterait plutôt à une glycogène synthétase et synthétiserait des glucanes encore plus courts. Cette proposition semble confortée par les expériences d'élongation réalisées à ce jour *in vitro*. Signalons que l'expression de la glycogène synthétase d'*E. coli* dans les tubercules de pomme de terre perturbe la synthèse de l'amidon. Cette expression conduit à une baisse de synthèse et à l'accumulation d'un polysaccharide plus ramifié [33].

Force nous est donc de constater que la synthèse de glucanes de classes distinctes établirait des liens fonctionnels complexes entre les enzymes de ramification et d'élongation. N'importe quelle enzyme de ramification ne branchera pas n'importe quel glucane avec la même efficacité. Inversement une enzyme d'élongation spécifique pourrait faire preuve d'une forte sélectivité pour une amorce dont la structure a été engendrée par une enzyme de branchement particulière. Nous pensons

que seule une approche de recherche associant expériences de ramification et d'élongation *in vitro* et inactivation de chaque enzyme *in vivo* sera capable de dénouer de tels liens. De toutes manières, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* par leur expression dans *E. coli*, les enzymes de ramification végétales associées ou non aux enzymes d'élongation sont incapables d'édifier une structure organisée évoluant, même de loin, celle du grain d'amidon végétal semi-cristallin [29-31]. Contrairement à toute attente ce sont d'autres activités enzymatiques qui semblent ordonner l'architecture du grain. Comme c'est souvent le cas en biologie, la surprise est venue de la caractérisation de phénotypes mutants.

L'épissage du phytoglycogène

Le maïs doux réservé à l'alimentation humaine a été sélectionné par les Indiens pour son goût sucré. Cette caractéristique provient de la baisse de synthèse d'amidon dans l'albumen du grain qui s'accompagne d'une augmentation corollaire de l'accumulation de saccharose dans les tissus. Le déterminisme génétique du phénotype est simple puisqu'il dépend d'un seul locus baptisé *Su1* (*sugary*) [34]. Ce n'est qu'en 1944 que Sumner et Somers [35] rapportent l'existence, dans ces mutants, d'un polysaccharide soluble de taille et de structure comparables à celles du glycogène. La mutation *Su1* conduit de fait à la substitution d'une partie seulement de l'amidon granulaire par cette nouvelle fraction dénommée *phytoglycogène*. Sur la base de ces résultats Erlander [36] a proposé en 1958 que l'amylopectine soit issue du débranchement du phytoglycogène et que l'amylose est engendrée par débranchement de l'amylopectine. Cette proposition, jugée hérétique parce que dénuée de tout support expérimental, tomba rapidement dans l'oubli. Ce n'est qu'en 1984 que l'étude de la défektivité enzymatique provoquée par *Su1* rend justice à l'hypothèse d'Erlander. Une forme particulière d'enzyme de débranchement est bien absente de l'albumen du maïs doux [37]. Il faudra malheureusement encore attendre 1995, le clonage du gène *Su1* et l'identification de son produit [38] pour que la communauté scientifique prenne la pleine mesure de ces résultats.

Le phénotype du maïs doux rend l'interprétation compliquée et ce parce que les deux fractions (phytoglycogène et amidon normal) coexistent. Dans l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhard-*

iii, des mutations analogues ont été récemment sélectionnées. Le phénotype de ces mutants est beaucoup plus sévère: l'amidon disparaît totalement et est remplacé par une petite quantité (5%) de phytoglycogène. Les souches mutantes sont en outre totalement dépourvues d'activités α -1,6-glucosidase et ne font preuve d'aucune autre déficience. Ces résultats établissent l'absolue nécessité d'un épissage de glucanes lors du processus biosynthétique. Nous pensons que cet épissage est remarquablement précis et est responsable de l'agencement asymétrique et ordonné des ramifications dans la lamelle amorphe du cristal d'amylopectine. A la suite d'une table ronde portant sur la biosynthèse de l'amidon, l'ensemble des groupes travaillant ces questions ont proposé un modèle de biosynthèse discontinue de la grappe d'amylopectine [39]. Le modèle présenté dans la figure 3 suppose, d'une part, que les enzymes de branchement requièrent une longueur minimale de glucane pour pouvoir catalyser la ramification et, d'autre part, que les branchements sont épissés par des α -1,6-glucosidases. Ces dernières, à la manière des isoamylases bactériennes, attaqueraient spécifiquement les branchements suffisamment espacés, engendrant de cette façon la densité de ramification élevée caractéristique de la lamelle amorphe de l'amylopectine.

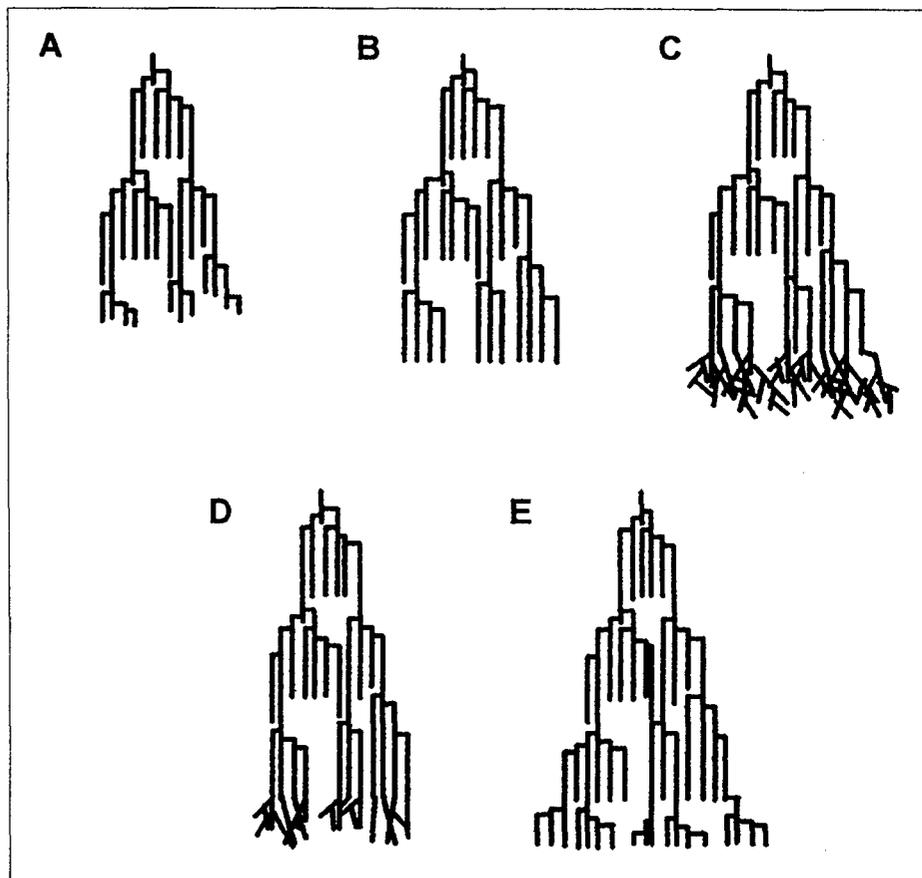


Figure 3 - Modèle de synthèse discontinue de l'amylopectine.

L'élongation débute à la surface du grain sur la lamelle amorphe telle qu'elle se présente en (A). Lorsque les chaînes atteignent une longueur suffisamment importante (B), un branchement aléatoire se produit (C). Des activités de débanchement interviennent simultanément pour réduire le nombre de points de ramification (D). Ce débanchement prévient la formation de phytoglycogène et conduit à un regroupement des chaînes branchées qui, lorsqu'elles seront allongées, formeront la lamelle cristalline (E).

Relations structures fonctions: pourquoi l'amidon?

En 1993, une étude de modélisation mathématique [40] a tenté d'optimiser la structure du glycogène animal en posant comme contrainte: 1°) de mettre en réserve le maximum de glucose dans le minimum d'espace, 2°) de le rendre disponible le plus vite possible par l'action de la phosphorylase sans nécessiter un débanchement, 3°) de maximiser le nombre d'extrémités non-réductrices disponibles pour l'attaque par la phosphorylase. Cette modélisation a abouti à la même structure que celle rencontrée *in vivo* pour le glycogène animal, fongique ou bactérien. Ceci suggère que les contraintes posées définissent relativement bien la fonction du polysaccharide. L'amidon végétal échappe pour l'instant à ce type d'analyse et les contraintes fonctionnelles restent à définir. Il est peu probable que le métabolisme photosynthétique ait conduit à lui seul à l'élaboration d'une nouvelle structure. En effet, les cyanobactéries, ancêtres supposés du chloroplaste végétal, accumu-

lent du glycogène et non de l'amidon. Les fonctions multiples que l'amidon est susceptible de remplir ne peuvent être cernés que par l'analyse physiologique détaillée de mutants qui en sont totalement dépourvus. A notre connaissance, seuls deux mutants de ce type ont été isolés, l'un chez *Arabidopsis thaliana* et l'autre chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour l'instant aucun effet physiologique majeur convainquant n'est retrouvé simultanément dans les deux mutants. Il nous faut toutefois signaler que dans les deux cas les mutants ralentissent très significativement leur réponse de positionnement par rapport au champ gravitationnel terrestre (géotropisme des plantes supérieures, géotactisme chez les algues) [41]. Depuis très longtemps les physiologistes ont assigné aux grains d'amidon des amyloplastes de la coiffe racinaire une fonction de géosenseurs ou encore de statolithes (pour revue voir [42]). Pour l'instant nous ne pouvons discerner la fonction de géosenseur de celle plus triviale de réservoir d'énergie nécessitée par la réponse. Force nous est d'admettre cependant que la structure et la taille des

grains de glycogène ne permettraient en aucun cas une sédimentation suffisamment rapide pour intervenir dans le mécanisme géosenseur.

Remerciements

La présente minirevue s'est largement inspirée des thèses de doctorat de Nathalie Van den Koornhuysse et de Nathalie Libessart. Ce travail a été financé par l'Université des Sciences et Technologies de Lille, par le Ministère de l'Éducation Nationale (France) et par le Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111 dirigée par André Verbert). Nathalie Libessart a vu sa thèse financée par la Société Roquette Frères (Lestrem, Pas-de-Calais).

Références

- French, D. (1972). Fine structure of starch and its relationship to the organization of starch granules. *J. Jpn. Soc. Starch. Sci.* 19, 8-25.
- Manners, D.J. (1989). Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydr. Polymers* 11, 87-112.

3. Libessart, N., Maddelein, M.-L., Van Den Koornhuysse, N., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S.G. (1995). Storage, photosynthesis and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **7**, 1117-1127.
4. Meeuse, J. D. and Kregler, D. R. (1954). On the nature of floridean starch and Ulva starch. *Biochim. Biophys. Acta* **13**, 593-595.
5. Zobel, H. F. (1988). Starch crystal transformations and their industrial importance. *Starch/Stärke* **40**, 1-7.
6. Jenkins, P.J., Cameron, R. E., and Donald, A. M. (1993). A universal feature in the starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke* **45**, 417-420.
7. Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., and Pérez, S. (1991). Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke* **43**, 375-384.
8. Leloir, L.F., Rongine De Fekete, M.A., and C.E. Cardini. (1961). Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J.Biol.Chem.* **236**, 636-641.
9. Tsai, C.-Y., and Nelson, O. E. (1966). Starch-deficient maize mutants lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* **151**, 341-343.
10. 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. Physiol.* **89**, 982-985.
11. Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C. and Preiss, J. (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**, 1131-1135.
12. Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. and Decq, A. (1991). A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17-26.
13. Van den Koornhuysse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Preiss, J., and Ball, S. (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* Submitted.
14. Müller-Röber, B. T., Sonnewald, U. and Willmitzer, L. (1992). Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238
15. Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G. F., Preiss, J. and Kishore, G. M. (1992). Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**, 287-292.
16. Preiss, J. and Sivak, M. N. (1996). Photoassimilate distribution in plants and crops: Source-sink relationships (zamski, E. and Schaffer, A. A., Eds.) Marcel Dekker Inc. New York. In Press.
17. Caspar, T., Huber, S.C., and Somerville, C. (1985). Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant. Physiol.* **79**, 11-17.
18. Hanson, K.R., and McHale N. A. (1988). A starchless mutant of *Nicotiana sylvestris* containing a modified plastid phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* **88**, 838-844.
19. Nelson, O. E., and Rines, H. W. (1962). The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 297-300
20. Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B. and Feenstra, W. J. 1987. Isolation of an amylose-free mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor.Appl.Genet.* **75**, 217-221.
21. Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszkeski, J.M., Van Den Koornhuysse, N., Maddelein, M.-L., Fournet, B., and Ball, S. (1992). Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: Monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase accumulate a structurally modified amylopectin. *J.Bacteriol.* **174**, 3612-3620.
22. Baba, T., Yoshii, M., and Kainuma, K.. (1987). Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots. *Starch/Stärke* **39**, 52-56.
23. Maddelein, M-L, Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van Den Koornhuysse, N., Fontaine, T., Wieruszkeski, J.M., Decq, A., and Ball, S.G. (1994). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule: Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J.Biol.Chem.* **269**, 25150-25157.
24. Ball, S. G. (1995). Recent views on the biosynthesis of the starch granule. *Trends. Glycosci. Glycotechnol.* **7**, 405-415.
25. Martin, C., and Smith, A. M. (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985
26. Shannon, J. C., and Garwood, D. L. (1984). Genetics and physiology of starch development. In *Starch: chemistry and technology*, second edition, (R. L., Whistler, J. N., Bemiller, and E. F., Paschall, eds) (Academic Press, Orlando, FL) pp. 25-86.
27. 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 extender1 locus. *Plant Cell* **5**, 1555-1566
28. Bhattacharyya, M. K., Smith, A. M., Noel Ellis, T. H., Hedley, C., and Martin, C. (1990). The wrinkled-seed character of pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding the starch branching enzyme. *Cell* **60**, 115-122.
29. Takeda, Y., Guan, H. P., and Preiss, J. (1993). Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* **240**, 253-263
30. Guan, H. P., and Preiss, J. (1993). Differentiation of the properties of the branching isoenzymes from maize. *Plant Physiol.* **102**, 1269-1273.
31. Guan, H. P., Kuriki, T., Sivak, M., and J. Preiss. (1995). Maize branching enzyme catalyzes synthesis of glycogen-like polysaccharide in glgB-deficient *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 964-967.
32. Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.-L., Routier, F., Marianne-Pépin, T., Decq, A., Wieruszkeski, J.M., Delrue, B., Van Den Koornhuysse, N., Bossu, J.P., Fournet, B., and Ball, S.G. (1993). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268**, 16223-16230.
33. Shewmaker, C. K., Boyer, C. D., Wiesenborn, D. P., Thompson, D. B., Boersig, M. R., Oakes, J. V., and Stalker, D. M. (1994). Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched starch. *Plant Physiol.* **104**, 1159-1166.
34. Correns, C. (1901). Bastarde zwischen Maisrassen, mit besonder Berücksichtigung der Xenien. *Bibl. Bot.* **53**, 1-161.
35. Sumner, J. B., and Somers, G. F. (1944). The water soluble polysaccharide of sweet corn. *Arch. Biochem.* **4**, 4-7.
36. Erlander, S. (1958). Proposed mechanism for the synthesis of starch by glycogen. *Enzymologia* **19**, 273-283.
37. Pan, D., and Nelson, O. E. (1984). A debranching enzyme deficiency in endosperms of the sugary1 mutants of maize. *Plant Physiol.* **74**, 324-328.
38. James, M. G., Robertson, D. S. and Meyers, A. M. (1995). Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell*, **7**, 417-429.
39. Ball, S., Guan, H-P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P. and Preiss, J., (1996). From glycogen to amylopectin: a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. (Cell Submitted).
40. Melendez-Hevia, E, Waddel, T. G., and Shelton, E. D. (1993). Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* **295**, 477-483.
41. Kiss, J. Z., Hertel, R., and Sack, F. D. (1989). Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **177**, 198-206.
42. Audus, L. J. (1979) Plant geosensors. *J. Exp. Bot.* **30**, 1051-1073.

CONTROL OF STARCH COMPOSITION AND STRUCTURE THROUGH SUBSTRATE
SUPPLY IN THE MONOCELLULAR ALGA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*.*

Nathalie Van den Koornhuyse, Nathalie Libessart, Brigitte Delrue, Christophe Zabawinski,
André Decq, Alberto Iglesias, Jack Preiss and Steven Ball*.

Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n°111,
Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois 59655 VILLENEUVE
D'ASCQ Cedex France

Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Univesidad Nacional de Rosario,
Suipacha 531, Rosario, (2000) Argentina (A.I.I.)

9 figures, 2 tables

* : To whom correspondance should be addressed

e-mail: steven.ball@univ-lille1.fr

Fax : 20.43.65.55

Tel : 20.43.65.43

Running title : starch synthesis in *Chlamydomonas*.

Key-words: starch/amylose synthesis/ADP-glucose pyrophosphorylase/*Chlamydomonas*

SUMMARY

In *Chlamydomonas*, as in higher plants, synthesis of ADP-glucose catalyzed by ADP-glucose pyrophosphorylase is rate-limiting for the building of starch in the chloroplast. We have isolated disruptions of the *STAI* ADP-glucose pyrophosphorylase structural gene that rendered the enzyme less responsive to the allosteric activator 3PGA. The structure and composition of the residual starch synthesized by all mutants of the *STAI* locus is dramatically altered. The residual polysaccharide is shown to be devoid of amylose despite the presence of GBSS, the amylose biosynthetic enzyme. In addition, the fine structure of the mutant amylopectin revealed the presence of an altered chain length distribution. This distribution mimicks that which is observed during growth and photosynthesis and differs markedly from that observed during storage. We therefore propose that low nucleotide-sugar concentrations are either directly or indirectly responsible for the major differences observed in the composition or structure of starch during storage and photosynthesis.

Starch is usually defined as a mix of 2 distinct polymer fractions : amylopectin and amylose. Amylopectin the major compound is composed of intermediate size $\alpha(1\text{-}>4)$ linked glucans that are organized in clusters of parallel chains (the crystal lamella) by a dense packing of $\alpha(1\text{-}>6)$ linkages (the amorphous lamella). The sum of both lamellae in a unit cluster is precisely 9 nm in all plants analyzed to date which is suggestive of a highly ordered and well conserved biosynthetic pathway (Jenkins *et al.*, 1993). Amylose is often referred to as a smaller linear molecule with very few $\alpha(1\text{-}>6)$ 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.*, 1988a; Smith *et al.*, 1989; Ball *et al.*, 1991; Müller-Röber *et al.*, 1992; Stark *et al.*; 1992) This enzyme has been shown to be a heterotetramer composed of 2 distinct subunits both in higher plants and in *Chlamydomonas* (Iglesias *et al.*, 1994). In most cases ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by 3-phosphoglycerate and inhibited by orthophosphate (Ghosh and Preiss, 1966; for review see Preiss, 1993; Sivak and Preiss, 1996).

Starch in plants accumulates either in the chloroplast of the leaf cell during photosynthesis (photosynthetic starch) or in the amyloplast of non-photosynthetic storage organs (storage starch) (for reviews see Shannon and Garwood, 1984; Preiss 1991; Müller-Röber and Kossmann, 1994, Nelson and Pan, 1995, Sivak and Preiss, 1996). All structural investigations performed to date have dealt with storage starch. We have shown that growth arrested (nitrogen starved) *Chlamydomonas* cells accumulate a polysaccharide that bears strong structural resemblance to maize endosperm storage starch (Ball *et al.*, 1990; Fontaine *et al.*, 1993; Maddelein *et al.*, 1994). Moreover we have demonstrated that it is synthesized by similar enzymes and that it responds in an identical fashion to mutations affecting these activities (Ball *et al.* 1991; Delrue *et al.* 1992). We have recently reported that the starch accumulated during growth and photosynthesis differs markedly from storage starch (Libessart *et al.*, 1995). The polysaccharide harbors little or no amylose and the amylopectin displays an altered chain-length distribution. Moreover storage starch synthesis

requires an additional function encoded by the *STA4* gene product (Libessart *et al.*, 1995). This function is not needed for starch synthesis during growth. We report here the cloning and molecular characterization of the ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA. We demonstrate that the *STA1* locus that we had previously reported to be necessary for allosteric regulation of this enzyme is an ADP-glucose pyrophosphorylase structural gene. We show that mutants at the *STA1* locus accumulate during storage a polysaccharide whose structure and composition display precise phenocopies of photosynthetic starch. We further show that this is a general property of mutants defective for ADP-glucose supply. We therefore conclude that unlike other biological polymers such as proteins or nucleic acids, storage polysaccharides can display wide variation in structure through control of substrate supply.

MATERIALS AND METHODS

Materials-[U-¹⁴C] Glucose 1-phosphate, [D-glucose-U-¹⁴C] adenosine diphosphate glucose were purchased from Amersham (U.K.). ADP-glucose, maize amylopectin and *Pseudomonas amyloclavata* 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 *C.reinhardtii* used in this study are wild-type with respect to starch and are 137C (*mt⁻ nit1 nit2*), 37 (*mt⁺ pab2 ac14*) and 330 (*mt⁺ cw15 arg7-7 nit1 nit2*) that was used for transformation. I7, carrying the *sta1-1* defect, was generated by X-Ray mutagenesis from 137C and was previously described (Ball *et al.*, 1991). NV314 (*mt⁻ pab2 ac14 sta1-1*) was generated by crossing I7 and 37. BAFJ3 (*mt⁺ cw15 arg7-7 nit1 nit2 sta1-2::ARG7*) was derived from strain 330 by random integration of pARG7 as described below. Genetic techniques are described in Harris (1989a). The GBSS¹ defective strain 18 (*mt⁻ nit1 nit2 sta2-1*) was generated by UV mutagenesis and is described in Delrue *et al.*. GST- (*mt⁻ nit1*

nit2 sta5-1) is a spontaneous low starch mutant isolated by F. A. Wollman and L. Buité. Standard media are fully detailed in Harris (1989b) while growth conditions, nitrogen starved media and diploid clone selection are described in Ball *et al.* (1990), Ball *et al.* (1991) and Delrue *et al.* (1992) and Libessart *et al.* (1995).

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, purification of mutant ADP-glucose pyrophosphorylase activities-Granule-bound starch synthase assays and extraction and analysis of granule-bound proteins were described in Delrue *et al.* (1992). Phosphoglucomutase assays were described in Ball *et al.* (1991). Standard zymogram techniques were detailed in Maddelein *et al.* (1994). Phosphoglucomutase zymograms were incubated in a buffer containing Tris-HCl 200 mM pH 8.0; 50 mM MgCl₂; 20 mg.ml⁻¹ Glc-1-P; 0.03 mg.ml⁻¹ Glc1,6-P₂; 0.4 mg.ml⁻¹ NAD; 0.2 mg.ml⁻¹ NADP; 0.4 mg.ml⁻¹ MTT; 0.2 mg.ml⁻¹PMS. Gels were incubated at 20°C in darkness for 15 to 60 min and immediately photographed. Soluble crude extracts were always prepared from late log phase cells (2.10⁶ cells.ml⁻¹) grown in HSA (High Salts Acetate) under continuous light (80 μ E.m⁻².sec⁻¹). ADP-glucose pyrophosphorylase activity was followed by 4 distinct assays. Crude extracts assays (synthesis or pyrophosphorolysis) can be found in Ball *et al.* (1991). Pyrophosphorolysis (assay A) and synthesis assays (assay B) that were used during and after purification are described in Iglesias *et al.* (1994). A detailed account of the purification procedure and yield can be found in Iglesias *et al.* (1994). The wild-type and mutant enzymes from 30g of frozen *Chlamydomonas* pellets were purified respectively 2033 and 1180-fold by 4 chromatographic steps (DEAE-Sepharose, Mono Q, Green A Dye-Ligand, Mono Q) with yields of 32 and 27%. In a second series of purifications, the mutant enzyme withstood only the first 2 chromatographic steps (DEAE-Sepharose and Mono Q) which gave 160 fold purification and 8% yield. In both cases the mutant enzyme displayed identical kinetics. Other enzyme assays or zymograms of starch synthases, branching enzymes, phosphoglucomutases and phosphorylases were previously described (Fontaine et

al. (1993); Maddelein et al. (1994); Libessart et al. (1995)).

Starch Fractionation-Separation of starch fractions on TSK HW-75(S) columns (Merck) was as previously detailed (Delrue *et al.* (1992)). Methylation of total starch was performed according to Delrue *et al.* (1992) and Fontaine *et al.* (1993) after modification of the method designed by Paz-Parente *et al.* (1985).

Debranching analysis-Isoamylase mediated debranching of GPC purified fractions was achieved as previously described (Libessart *et al.* (1995)). After completion of the debranching reaction, samples were kept at 80°C in 10% DMSO to avoid retrogradation of the long glucans into insoluble material. Half of the debranched polysaccharide was subjected to TSK HW-50(F) chromatography while the other sample half was subjected to HPAE-PAD (High Performance Anion Exchange chromatography with Pulsed Amperometric detection) on a Carbo-Pac PA-100 column. Details of those procedures can be found in Libessart *et al.* (1995).

MALDI-Matrix-associated laser desorption /ionization mass spectra (MALDI MS) have been measured on a Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer (Finnigan MAT. Bremen) using 2,5 - dihydroxybenzoic acid as matrix (10 mg.ml⁻¹ in MeCN:H₂O 70:30), 1 µl of sample (1_5 µg.µl⁻¹) was mixed with 1 µl of matrix solution on a stainless steel target. Desorption/ionization was performed using a N₂ laser at 337 nm. 20 spectra have been summed in order to enhance the signal to noise ratio.

NMR and methylation analysis-NMR analysis was performed as described in 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). Methylation of total starch and of fractions dialysed and freeze-dried after TSK HW-75 chromatography was performed according to Paz Parente *et al.* (1985) and adapted to starch analysis (Delrue *et al.*, 1992). The branching percentage was assayed as the ratio of methyl ether derivatives of $\alpha(1->4)$ linked Glc either to those of $\alpha(1->4)$ and $\alpha(1->6)$ linked Glc or to those of Glc in terminal non-reducing position (Delrue *et al.*, 1992; Fontaine *et al.*, 1993).

Transformation mediated gene disruption-Standard glass beads mediated transformation (Kindle, 1990) was performed on the cell wall deficient arginine requiring strain 330 with 1 μg of pARG7.2 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). Those mutants that stained yellow contained less than 5% of the wild-type starch amount. They were selected and subjected to routine complementation analysis. The frequency of mutant selection in the starch pathway was in the order of $4 \cdot 10^{-4}$.

Chlamydomonas DNA purification, cloning and sequencing, Accession number.-Algal DNA extraction was as described by Weeks *et al.* (1986). RNA extraction and purification was adapted from phenol extraction procedure described in Maniatis *et al.* (1982). Cloning of the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase was performed using a λ EXlox (10^9 pfu.ml⁻¹) library. The oligonucleotides 5' AAG AT(CT) TAC GT(ACGT) CT(GT) AC(GTC) GAG TT^{3'} and the antisense 5'(GAC)GT (AG)CC (AG)AT (AG)T(CT) CTC CCA GTAT^{3'} generated a 650 bp PCR fragment that was used to rescreen the library. 5 positive clones were then partly or fully sequenced. All clones displayed extensive sequence overlap. Subclones were generated either by the use of standard restriction sites or by that of *ExoIII*. The RACE-PCR kit from Perkin-Elmer-Cetus was used to generate the 5' end of the cDNA sequence. The amplification was performed using the 5'GGC ATC AGC AAG ATC TA^{3'} antisense nucleotide corresponding to the GTRLFP peptide. Sequencing was performed by the dideoxy chain termination method using the Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing kit (U. S. Biochemical Corp). The EMBL no. for the sequence reported and used in this paper is X91736.

RESULTS

Absence of the STAI gene product leads to lower sensitivity of ADP-glucose pyrophosphorylase to allosteric regulation by 3PGA-We had previously characterized the *stal-1* mutant allele as leading to a lower sensitivity of ADP-glucose pyrophosphorylase to the allosteric effectors 3PGA and orthophosphate (Ball *et al.*, 1991). To confirm these conclusions we purified the mutant activity from 95 to 1180 fold and made kinetic comparisons with the wild-type enzyme that was purified to homogeneity. Results shown in Fig. 1B clearly show that the mutant enzyme activity is less sensitive to 3PGA activation. However in contrast to what was initially reported for crude extracts (Ball *et al.*, 1991), it remained sensitive to orthophosphate inhibition (Fig. 1A). The mutant $S_{0.5}$ values measured in the presence of 2.5 mM 3PGA were of 0.25 mM and 0.15 mM for ATP and G-1-P respectively. These values which are in the physiological range for ADP-glucose synthesis, are significantly higher than those reported for the wild-type activity in the presence of 3PGA. However they remain very close to those of the wild-type unactivated enzyme (Iglesias *et al.*, 1994). Moreover no significant decrease in the amount of total activity (in the absence of 3PGA) was found in crude extracts. In order to understand if these defects were specific of the X-Ray generated *stal-1* allele we selected gene disruptions of the *STAI* locus. Strain BAFJ3 carrying the *stal-2::ARG7* disrupted allele failed to complement *stal-1* in diploids (Fig. 2). The disrupted strain showed the same phenotype as the original *stal-1* carrying mutants. It contained 5% of the wild-type starch amounts while ADP-glucose pyrophosphorylase became selectively unresponsive to 3PGA activation.

Evidence that STAI encodes an ADP-glucose pyrophosphorylase subunit structural gene

The lower sensitivity to 3PGA activation could be explained either by the absence of a regulatory protein responsible for switching the enzyme to a sensitive form or the absence or modification of one of the two subunits of the *Chlamydomonas* heterotetramer enzyme. In order to distinguish between these possibilities, we have cloned and sequenced a full length ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA. The sequence displayed in Fig. 3 shows that the mature product is a 479 amino acid protein of 52.3 kDa. The N-

terminal sequence of the large subunit enabled us to establish the presence of a 36 amino acid transit peptide whose composition typifies those reported for *Chlamydomonas*. The sequence of the mature enzyme is closer to that of cyanobacteria (48% identity with the *Anabaena* subunit) than to those of the higher plant small (44% identity both with the potato tuber and spinach leaf small subunits) and large subunits (46% identity both with the spinach leaf and potato tuber large subunits). Southern analysis using the *PvuII* fragment in the middle of the cDNA coding sequences (underlined in Fig. 3) showed that all strains carrying *stal* deletions displayed major alterations (Fig. 4). Moreover the size of the smallest fragments that appeared modified confirm that enzyme coding sequences are altered in the mutants. In addition Southern analysis was carried out on the meiotic progeny of a cross between I7 and wild-type strain 37, establishing cosegregation between the altered response and the mutant phenotype. While the results prove that *STA1* encodes an ADP-glucose pyrophosphorylase subunit sequence, they do not distinguish yet between loci encoding large or small subunits of the enzyme.

Mutants of the STA1 locus are devoid of amylose despite the presence of higher granule-bound starch synthase specific activities-Both *stal-1* and *stal-2::ARG7* carrying strains contain highly selective defects. We have assayed the level and whenever possible the kinetics of all enzymes known to be involved in starch metabolism in the mutant strains. We found no indirect effect of the drop of nucleotide sugar supply on enzymes involved in starch metabolism. Total levels of granule-bound starch synthase (GBSS), the enzyme known to be responsible for amylose biosynthesis, expressed per 10^6 cells showed a mere 2 to 3 fold reduction (table 1). However a spectacular increase of this enzyme specific activity expressed per μg starch comes as a consequence of the decrease in polysaccharide amounts (table 1 and Fig. 5). Despite this increase, the decrease in the λ_{max} (from 600 nm to 570 nm) of the iodine polysaccharide complex of purified starch granules suggested a large decrease in amylose content. The chromatograms displayed in Fig. 6 clearly show the absence of low molecular weight amylose in the residual starch stored by nitrogen starved *stal* carrying strains. In fact the storage polysaccharide chromatograms from the mutants are exact phenocopies of those of photosynthetic starch extracted from nitrogen supplied

wild-type cultures. The absence of a contaminating amylose fraction in the purified amylopectin was confirmed by methylation analysis performed on unfractionated starch samples. Table 2 clearly shows that the starch from *stal* carrying mutants contain slightly more branches (6%) than mutants defective for amylose biosynthesis. The λ_{\max} of the high molecular weight amylopectin purified in these chromatograms displayed a small increase in the mutants. We therefore embarked in a more detailed structural characterization of the mutant amylopectin.

The amylopectin chain-length distribution is modified and identical to that of photosynthetic starch-The chain-length distribution of the mutant amylopectins purified by gel filtration were further compared to wild-type starches both from starch storing cells (growth arrested cultures exhibiting low levels of photosynthesis) and from growing cultures actively engaged in photosynthesis. These physiological conditions are very simply obtained by supplying or not a nitrogen source to the medium (Libessart *et al.*, 1995). The purified amylopectins were debranched using isoamylase. The small glucans (up to 20 Glc residues long) were separated by HPAE-PAD (Fig. 7) while the longer chains were analyzed by TSK-HW50 chromatography (Fig. 8). While the long chains did not display major differences in their size distribution, the chain-length distributions of the small glucans were clearly different, a fact which was further confirmed by Mass Spectroscopy. The increase in frequency of the small glucans correlates with the increase in branching that we had measured (see above). We therefore assayed branching of photosynthetic starch by proton NMR and found the same 6.5% estimate. By all these criteria the starch purified during storage from the *stal* containing mutants was identical to the polysaccharide isolated from wild-type cultures actively engaged in photosynthesis and cell divisions. Both polysaccharides are markedly different from standard storage starch.

Mutants lacking a specific isoform of phosphoglucomutase accumulate a storage polysaccharide devoid of amylose with a modified amylopectin chain-length distribution-Standard nucleotide-sugar assays were not sufficiently sensitive to allow detection of ADP-glucose in standard volumes of wild-type algal cultures. We could however predict that if nucleotide-sugar concentrations were indeed involved, mutations inactivating or lowering

other enzyme activities essential to ADP-glucose supply should lead to similar defects in starch structure. We therefore embarked in characterization of storage starch structure from mutants lacking the major fast migrating phosphoglucomutase isoform. These mutants harbor 20% of residual cytoplasmic phosphoglucomutase activity and accumulate from 4 to 12% of the wild-type amount of starch during storage. The defect was shown to be due to a single nuclear gene defining a novel *Chlamydomonas* locus (*STA5*) necessary for normal starch accumulation. As shown in Fig. 9, the starch accumulated during storage by *sta5-1* carrying mutants lacks the low molecular weight amylose fraction and accumulates an amylopectin with a λ_{\max} identical to those reported for both the storage starch of *sta1* carrying mutants or the photosynthetic starch from wild-type cultures. Moreover the chain length distribution of the amylopectin from *sta5-1* carrying mutants was identical to those displayed in Fig. 7, panels B and C. By comparison low starch mutants carrying defects in the *STA3* gene affected in soluble starch synthase activities (downstream from ADP-glucose synthesis) do not show these modifications during storage and accumulate substantially higher amounts of low molecular weight amylose (Fontaine et al., 1993). We therefore conclude that it is the supply of ADP-glucose that controls both the differences in composition and structure occurring between plant cells engaged in photosynthesis or starch storage.

DISCUSSION

The absence of an ADP-glucose pyrophosphorylase subunit structural gene product renders the *Chlamydomonas* enzyme selectively less sensitive to 3PGA activation. The activation defect being the only consequence on the kinetics of the enzyme, this result distinguishes *Chlamydomonas* from other plants such as *Arabidopsis* (Lin et al., 1988b; Li and Preiss, 1992). Since the total amount of enzyme activity in the absence of 3PGA is the same in wild-type or mutant cells, *Chlamydomonas* offers a unique opportunity to investigate the physiological relevance of this regulation. As opposed to our initial observations (Ball et al., 1991), the purified mutant enzyme is shown to remain equally

sensitive to orthophosphate inhibition. Therefore we suspect that it is this inhibition which is chiefly responsible for the large decrease observed in starch synthesis.

No other enzyme activity assayed (starch synthases, branching enzymes, phosphorylases, phosphoglucomutases, amylases) appear modified as an aftermath of the drop in nucleotide-sugar supply. The decrease in starch content observed in *sta1* mutants (Ball *et al.*, 1991; this work) is an expected consequence of the reduction in ADP-glucose synthesis. However the dramatic changes in structure and composition of the residual mutant starch that occurred under storage conditions were totally unexpected. They also, are to be entirely explained by a decrease in substrate supply. Moreover these changes are identical to those that distinguished storage starch from the polysaccharide that can be found predominantly around the pyrenoid of growing and photosynthesizing algae (photosynthetic starch) (Libessart *et al.*, 1995). We therefore reason that a decrease in ADP-glucose concentration might be sufficient to explain the major differences between the two types of starches.

High and low supply of substrate may render different proteins rate-limiting for the building of distinct starch substructures. For instance a number of studies have established that the amount of GBSS is rate-limiting for amylose biosynthesis during storage (Nelson and Rines, 1962; Tsai, 1974; Visser *et al.*, 1991; Kuipers *et al.*, 1994, Wang *et al.*, 1995). We have already shown that this is not the case during growth and photosynthesis (Libessart *et al.*, 1995). We can now extend these observations and predict that amylose synthesis will not occur when the supply of ADP-glucose is low.

Substrate controlled modifications in starch structure can be explained through at least 3 different mechanisms. One is to suppose that the decrease in ADP-glucose could trigger a regulatory mechanism that will modify, induce or repress starch biosynthetic enzymes. As far as we can tell from our various enzyme assays, such a mechanism does not seem to be at work.

Another explanation can be found if one compares the different K_m values of the starch synthases for ADP-glucose. It is striking to note that GBSS the amylose biosynthetic enzyme has a five-fold higher K_m (5 mM) than the soluble starch synthases that are solely

involved in amylopectin synthesis (Macdonald and Preiss, 1985; Delrue *et al.*, 1992). This difference disappears upon solubilization of the enzyme and can be accounted for by the burying of the enzyme inside the granule leading to its physical isolation from the branching enzymes. The GBSS at the surface would on the other hand be involved in amylopectin synthesis. Thus both a decrease in amylose content and redistribution of chain-lengths in amylopectin are to be expected when the supply of ADP-glucose is low.

Finally, all the modifications observed could be explained if one assumes the existence of a critical balance existing at the surface of the granule between branching and elongation activities. If the amount of enzyme activities are kept more or less constant, then the increase of the starch stroma interface that occurs during storage could lead to the physical isolation of GBSS from the branching enzymes. This in turn would lead to amylose synthesis.

Whatever mechanism will turn out to be operating, the difference in structure and composition that are controlled by the supply of substrate are to be considered major for a polysaccharide as simple as starch. Substrate control offers a convenient and direct way to optimize the structure with respect of the plant cell's metabolic state. It is our opinion that the importance of such simple mechanisms regulating biological polymer structures has been underestimated. Clearly information and functional constraints that apply to proteins and nucleic acids will not allow for the control of primary structures by the relative and absolute concentrations of nucleotides and amino-acids. However it has not escaped us that in the case of complex polymers such as oligosaccharides of N-glycans or polysaccharides composed of different sugars, the decrease of the supply of one particular nucleotide-sugar might be sufficient to generate major primary structure modifications.

REFERENCES

1. Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A. Martiat, J.C., and Matagne R.F. (1990). *Plant Sci.* **66**, 1-9.
2. Ball, S., Marianne, T., Dirick, L. Fresnoy, M., Delrue, B., and Decq, A.. (1991). *Planta* **185**, 17-26.
3. Banks, W., Greenwood, C.T., and Khan K. M. (1971). *Carbohydr. Res.* **17**, 25-33.
4. Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Van Den Koornhuysse, N., Maddelein, M-L., Fournet, B., and Ball, S. (1992). *J. Bacteriol.* **174**, 3612-3620.
5. Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Delrue, B., Van Den Koornhuysse, N., Bossu, J.P., Fournet, B., and Ball, S.G. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 16223-16230.
6. Gidley, M.J. (1985). *Carbohydr.Res* **139**, 85-93
7. Ghosh, H.P., and Preiss, J. (1966). *J. Biol. Chem.* **241**, 4491-4504
8. Harris, E. H. (1989a). *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use* (Harris, E., ed), pp. 25-63, Academic Press, San Diego.
9. Harris, E. H. (1989b). *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use* (Harris, E., ed), pp. 399-446, Academic Press, San Diego.
10. Iglesias, A.A., Charng, Y.Y., Ball, S. and Preiss, J. (1994). *Plant. Physiol.* **104**, 1287-1294
11. Jenkins, P.J., Cameron, R. E., and Donald, A. M. (1993). *Stärke*, **45**, 417-420.
12. Kindle, K. L. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1228-1232
13. Kuipers, A.G.J., Jacobsen, E., and Visser, R.G. F. (1994). *Plant Cell* **6**, 43-52.
14. Libessart, N., Maddelein, M-L, Van Den Koornhuysse, N., Decq, A., Delrue, B., and Ball,S.G. (1995). *Plant Cell* **7**, 1117-1127..

15. Lin, T-P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988). *Plant. Physiol.* **86**, 1131-1135.
16. Lin, T-P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988). *Plant. Physiol.* **88**, 1175-1181.
17. Li, L., and Preiss, J. (1992). *Carbohydr. Res.* **227**, 227-239.
18. Macdonald, F. D., and Preiss, J. (1985). *Plant. Physiol.* **78**, 849-852.
19. Maddelein, M-L, Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van Den Koornhuysse, N., Fontaine, T., Wieruszeski, J.M., Decq, A., and Ball, S.G. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 25150-25157.
20. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.
21. Manners, D.J. (1989). *Carbohydr. Polymers* **11**, 87-112.
22. Müller-Röber, B., and Kossmann, J. (1994). *Plant Cell Environ.* **17**, 601-613
23. Müller-Röber, B., Sonnewald, U., and Willmitzer, L. (1992). *EMBO J.* **11**, 1229-1238.
24. Nelson, O. E., and Rines, H. W. (1962). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 297-300
25. Nelson, O. E., and Pan, D. (1995). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 475-496
26. Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., and Ricart, G. (1985). *Carbohydr. Res.* **141**, 41-47.
27. Preiss, J. (1991) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, vol 7*, (Mifflin, B.J., ed.), pp 59-114., Oxford Univ Press, Oxford.
28. Preiss, J. (1993). *Denpun Kagaku* **40**, 117-131.
29. Preiss, J. and Sivak, M. N. (1996), *Photoassimilate distribution in plants and crops: Source-sink relationships* (Zamski, E. and Schaffer, A. A., Eds.) Marcel Dekker Inc. New York. In Press.
30. Shannon, J. C., and Garwood, D. L. (1984) *Starch: chemistry and technology, 2nd edition*, (Whistler, R. L., Bemiller, J. N., and Paschall E. F., eds), pp 25-86., Academic Press, Orlando.

31. Smith, A.M., Bettey, M., and Bedford, I.D. (1989). *Plant. Physiol.* . **89**, 982-985.
32. Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G. F., Preiss, J. and Kishore, G. M. (1992).
Science **258**, 287-292
33. Tsai, C-Y. (1974). *Biochem. Genet.* **11**, 83-96.
34. Tsai, C-Y., and Nelson, O. E. (1966). *Science* **151**, 341-343.
35. 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
36. Wang, Z-Y, Zheng, F-Q, Shen, G-Z, Gao, J-P, Snustad, D. P., Li, M-G, Zhang, J-L,
and Hong, M-M. (1995). *PLant J.* **7**, 613-622
37. Weeks, D. P., Beerman, N. and Griffith, O. M. (1986). *Analytical Biochem.* **152**, 376-
385.

Fig. 1. Kinetic parameters for 3PGA and Pi inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase from wild-type and mutant strains (pyrophosphorolysis direction).

(A) displays the Pi inhibition curve of wild-type strain 137C (○) compared to that of the *sta1-1* carrying strain I7 (○). $I_{0.5}$ values of 0.56 mM and 0.47 mM Pi were measured respectively for the wild-type and the mutant with h values of 1.7 and 2.4. Inhibition was measured using substrate concentrations of 1 mM ATP and 0.5 mM Glc-1-P in the presence of 2.5 mM 3PGA. The left and right y axis display the enzyme activity scales used respectively for the wild-type and the mutant strains.

(B) displays the 3PGA activation curve of 137C (○) and I7 (○). K_a values of 0.3 mM and 0.15 mM 3PGA were measured respectively for the wild-type and the mutant with η_H values of 2.0 and 1.8. 137C and I7 gave respectively 15 and 3-fold maximal activation. Activation was measured using substrate concentrations of 1 mM ATP and 0.5 mM Glc-1-P in the absence of inhibitor

Units are expressed in nmol ADP-glucose synthesized per minute. The purified enzyme fractions were adjusted with respect to the amount of protein (1 μ l of adjusted fraction contained 16 ng protein). The left and right y axis display the enzyme activity scales used respectively for the wild-type and the mutant strains.

Fig. 2. Phenotypes of wild-type and mutant haploid and diploid strains. The genotypes corresponding to each haploid or diploid strain with respect to starch are listed between brackets. ZC1 and 137C are respectively wild-type diploid and haploid references. ZC21 is a diploid strain generated for the complementation test between NV314 (*sta1-1*) and BAFJ3 (*sta1-2::ARG7*). Cell patches were incubated for 5 days on solid nitrogen deprived medium and sprayed twice with iodine vapors.

Fig. 3. **cDNA and deduced amino acid sequences of the *Chlamydomonas* ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit.** The transit peptide sequence from the putative start site is shown in bold. The EPAKAAT N-terminal sequence of the purified protein (Iglesias *et al.*, 1994) is boxed. The 356 *PvuII* fragment that was used for Southern is underlined and delimited by arrows. The hatched sequence displays the RACE-PCR amplification origin.

Fig. 4. **Southern analysis of wild-type and mutant strains carrying defects for the *STA1* locus.** The probe covers the 356 bp *PvuII* fragment from the coding region of the 52.3 kDa ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA. Cross-hybridization with both large and small subunit structural genes are to be expected. Lanes 1, 2 and 3 represents 8 to 12 μ g of DNA extracted respectively from strains 137C (wild-type reference), I7 (carrying the X-Ray generated deletion *stal-1*) and BAFJ3 (carrying the *stal-2::ARG7* disruption). (A) *KpnI* digestion, (B) *PstI* digestion, (C) *HindIII*. Both X-Ray and insertional mutagenesis are expected to generate rather extensive deletions in the DNA. The same qualitative (presence, absence or modification of restriction fragments) and quantitative (reduction of the hybridization signal intensity in the mutants) were seen to cosegregate with *stal* mutations in crosses. Possible cross-hybridization between large and small subunit structural genes does not allow yet to distinguish which of the two polypeptides is encoded by *STA1*.

Fig. 5. **Starch-bound proteins.** A Coomassie Brilliant Blue R-250 stained 5 to 7.5% SDS- acrylamide gel of starch bound proteins. Lane 1 and 3 is starch-bound protein from the nitrogen-starved wild-type 137C strain while lane 2 displays starch-bound proteins extracted from strain I7 carrying the *stal-1* allele. Lane 4 displays molecular size standards (from top to bottom 94, 67, 43, and 30 kD). Proteins simultaneously extracted from equal amounts of polysaccharide (1 mg) were loaded on the gel. The major 76-kDa band corresponds to the GBSS protein and displayed the typical GBSS N-terminal sequence (Delrue *et al.* 1992).

Fig. 6. Separation of amylopectin and amylose by TSK-HW75 chromatography.

The optical density () was measured for each 3 ml fraction at λ_{\max} while λ_{\max} is displayed as an unbroken thin line. All samples were loaded on the same column set-up as described by Delrue *et al.* (1992). The wild-type haploid 137C strain starch extracted from nitrogen starved cultures (storage starch) (panel A) can be seen to carry the standard type I (ApI) and type II (ApII) amylopectins and amylose (Am). Panel B displays starch from the same strain extracted from nitrogen supplied growing and photosynthesizing cultures (photosynthetic starch). Panel C displays the starch extracted from a nitrogen starved *sta1-2::ARG7* carrying strain (BAFJ3). Panel D shows the starch extracted from nitrogen starved I7 cells containing the *sta1-1* mutation. Identical conclusions were reached using CL2B Sepharose in 10 mM NaOH. No amylose could be extracted from *sta1* (both *sta1-1* or *sta1-2::ARG7*) carrying strains whatever solvent or pretreatment was used. Notice that both I7 starch from -N cultures and 137C starch from +N carry amylopectins of identical λ_{\max} .

Fig. 7. High-Performance Anion Exchange with Pulsed Amperometric Detection chromatography of water soluble debranched glucans. Glucans differing by only one glucose residue in length are clearly separated up to degree of polymerization 25 (DP 25). Results are given in relative frequencies histograms of chains ranging from DP 3 to DP 15. These frequencies were computed from the chromatogram peak surfaces with the total amount of chains from 3 to 15 adjusted to 100%.

(A) Wild-type type I amylopectin from nitrogen starved cultures (storage starch).

(B) Amylopectin from the wild-type strain 137C from nitrogen supplied growing cultures (photosynthetic starch)

(C) Amylopectin from the I7 strain (*sta1-1*).

Fig. 8. Separation of isoamylase debranched glucans by TSK HW-50 chromatography. Four milligrams of starch fractions purified by gel filtration were loaded on each column after debranching. The optical density (0) of the iodine polysaccharide complex was measured for each 2-mL fraction at λ_{\max} . The OD scale is shown at the left on the y axis. The amount (micrograms) of glucose per milliliter fraction is scaled on the inner side of the y axis at the left. The right y axis at right represents the wavelength (nm) scale. The x axis shows the elution volume scale (mL). λ_{\max} are displayed for all fractions where it could be determined (broken line). The column set-up and debranching conditions are described in the methods section. The DP scale (0) was generated by using the λ_{\max} values of the debranched glucans as internal standards according to Banks et al. (1971).

(A) Wild-type type amylopectin from nitrogen supplied cultures (photosynthetic starch).
 (B) Wild-type type I amylopectin from nitrogen starved cultures (storage starch).
 (C) Amylopectin from nitrogen starved BAFJ3 cells (*sta1-2::ARG7*).

Fig. 9. Separation of amylopectin and amylose by CL2B-Sepharose chromatography. The optical density () was measured for each 3 ml fraction at λ_{\max} while λ_{\max} is displayed as an unbroken thin line. All samples were loaded on the same column set-up as described by Delrue *et al.* (1992). The wild-type haploid 137C strain starch extracted from nitrogen starved cultures (storage starch) (panel A) displays both amylopectin and low molecular weight amylose. CL2B does not separate type I and type II amylopectin. Panel B displays starch from the mutant strain GST- defective for phosphoglucomutase activity. Starch was also extracted under nitrogen starvation (storage starch).

FOOTNOTES

*This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Education Nationale, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS n°111. Director André Verbert), by the USDA/DOE/NSF n° 88-37271-3964 Plant Science Center Grant, U.S.P.H.S., N.I.H. Grant AI 022385.

¹The abbreviations used are GBSS, granule-bound starch synthase; CL, chain length; 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.

Table 1. Granule-bound starch synthase activity in wild-type and *stal-1* carrying strains

Strain	Genotype	Vmax ^a (per mg of starch)	Vmax ^b (per 10 ⁶ cells)
137C	(+)	3.2	82
I7	(<i>stal-1</i>)	18	33

a, b nmol of ADP-glucose incorporated into glucan per min per mg starch or per 10⁶ cells

Table 2. Structural properties of wild-type and mutant starch

Strain	Genotype	λ_{\max}^b	2,3,4,6 Glc ^a	2,3,6 Glc ^a	2,3 Glc ^a
137C	(+ +)	590	0.8	31	1
18B	(+ <i>sta2-1</i>)	550	0.9	19	1
I7	(<i>sta1-1</i> +)	560	0.9	17	1

^a 2,3,6 Glc, 2,3 Glc, 2,3,4,6 Glc represent the methyl ether derivatives respectively of an $\alpha(1 \rightarrow 4)$ linked glucose, an $\alpha(1 \rightarrow 4)$ and $\alpha(1 \rightarrow 6)$ linked glucose, and a glucose in terminal non reducing position. The amounts were compared taking 2,3 Glc as an arbitrary standard.

^b The λ_{\max} is expressed in nm rounded to the nearest decimal.

