

juin 2000 6734

50376
1997
257

Thèse de doctorat



présentée à

l'Université des Sciences et Technologies de Lille

UFR de Biologie

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences de Lille

spécialité :

Sciences de la Vie et de la Santé

par

Grégory MOUILLE

« L'épissage de glucanes : une étape majeure de la
biosynthèse de l'amylopectine »

Présidente : G.SPIK
Rapporteurs : A.BULEON
J.M.FRANCOIS
Examineurs : H.HÖFTE
A.MESSAGER
S.G.BALL

Je remercie l'ensemble du personnel de l'UMR 111 ainsi que Steven Ball pour l'accueil qui m'a été réservé durant ces quelques années.

J'adresse toute ma sympathie à André Decq, Marie-Christine Slomianny, Christophe Colleoni, Brigitte Macquart, Zab et David pour leur cordialité et leur disponibilité et toute mon estime à Frédéric Chirat pour sa contribution précieuse à la rédaction de cette thèse.

Je remercie également Bernard Mouchel du service RMN et Loïc Brunet du service commun de microscopie électronique pour leur disponibilité.

Bien sûr, j'attribue une mention spéciale à Philippe Talaga, sans qui tout ce qui arriva ne serait pas arrivé...

Enfin, je souhaite à tout thésard d'avoir une compagne autant à l'écoute et attentionnée que Pascale (mon épouse) et un soutien tel que Maxence (mon fils) pour qui *Chlamy* et l'amidon n'ont plus aucun secret.

Résumé

Des souches de *Chlamydomonas reinhardtii* présentant un phénotype nouveau traduisant une défectuosité dans la biosynthèse de l'amidon ont été récemment isolées. L'altération au locus *STA7*, responsable de ce phénotype, conduit à une diminution importante de la quantité d'amidon produite et à l'accumulation d'une fraction polysaccharidique soluble. L'étude biochimique de cette fraction soluble, absente dans le génotype sauvage, a permis d'en déterminer la nature. Elle se compose d'un polymère de glucose de structure comparable au glycogène que l'on a dénommé : phytoglycogène. De plus, la structure de l'amidon résiduel présent s'est révélée très altérée et dépourvue de polysaccharide de type amylopectine. Aucune défectuosité majeure en une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'amidon n'a pu être mise en évidence. Seule l'absence d'une activité de déramification de 88 kD a pu être démontrée. En effet, une activité de débranchement de type isoamylasique est manquante dans toutes les souches porteuses d'une mutation *sta7*.

Les conséquences de cette altération enzymatique sur la structure des polysaccharides accumulés nous ont suggéré l'élaboration d'un modèle discontinu de biosynthèse de l'amylopectine faisant intervenir au moins une enzyme de déramification. Ce schéma de biosynthèse intègre une étape d'épissage de glucanes déterminant l'agencement particulier des points de branchement responsable de la structure tridimensionnelle semi-cristalline de l'amylopectine.

Abréviations.

3-PGA :	acide-3-phosphoglycérique.
ADP-glucose :	adénosine diphosphoglucose.
ADNc :	ADN complémentaire.
AMP :	adénosine monophosphate.
ARNm :	acide ribonucléique messenger.
ATP :	adénosine triphosphate.
DMSO	diméthylsulfoxyde.
DMSO-D6 :	diméthylsulfoxyde deutérié
D.O :	densité optique.
D ₂ O :	oxyde de deutérium.
d.p. :	degré de polymérisation.
DTT :	dithiothréitol
GBE :	enzyme de branchement du glycogène (Glycogen Branching Enzyme).
GBSS :	amidon synthétase liée au grain (Granule Bound Starch-Synthase).
λ_{\max} :	longueur d'onde pour laquelle l'absorbance du complexe iode/polysaccharide est maximale.
nm :	nanomètre
NADP :	nicotinamide adénosine diphosphate
PAB :	acide-Para-Aminobenzoïque.
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
R.X :	rayon X.
SAB :	Sérum Albumine Bovine.
SBE :	enzyme de branchement de l'amidon (Starch Branching Enzyme).
SDS :	sodium dodecyl sulfate.
SSS :	amidon synthétase soluble (Soluble Starch-Synthase).
U.V. :	ultra-violet.
WSP :	polysaccharide soluble (Water Soluble Polysaccharide).

Introduction

La majorité des espèces fongiques ou bactériennes accumule le glycogène comme endopolysaccharide de réserve. Seuls les organismes photosynthétiques eucaryotes concentrent dans leurs plastes une substance de même composition et formule chimique, mais de structure différente : l'amidon.

Si, initialement, la décomposition du schéma de biosynthèse du glycogène a été réalisée chez les mammifères, son analyse approfondie a été grandement facilitée par l'étude d'organismes microbiens tels que la levure ou *Escherichia coli*. Comparativement, la voie de biosynthèse de l'amidon s'est révélée plus complexe et son étude a alors nécessité la définition d'un modèle autre qu'un végétal supérieur. L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* apparaît comme l'organisme le mieux adapté à ces investigations.

I. Chlamydomonas reinhardtii : modèle d'étude de la biosynthèse de l'amidon

L'amidon produit par *Chlamydomonas reinhardtii* est structuralement similaire à l'amidon de végétaux supérieurs. Récemment des études de cristallographie et de calorimétrie de l'amidon (Buléon et coll., 1997) ont confirmé ce fait. De plus, la mutation d'une même fonction chez le maïs et chez *Chlamydomonas reinhardtii* génère des modifications analogues de leur amidon résiduel (Ball et coll., 1991, Delrue et coll., 1992, Fontaine et coll., 1993). Ces éléments légitiment ce modèle pour l'étude du métabolisme de l'amidon, car les résultats de son observation sont directement transposables aux végétaux supérieurs.

A. L'algue : un végétal inférieur ?

Chlamydomonas reinhardtii est une algue verte unicellulaire dont le cycle de vie est généralement asexué. Cependant, une carence en élément nutritif peut induire l'entrée de

l'algue dans un cycle sexué permettant ainsi la production de diploïdes végétatifs ou de zygotes pouvant entrer en méiose (figure 1).

Ces caractéristiques font de *Chlamydomonas* un excellent outil génétique. En effet, la sélection directe de mutants et la production de diploïdes pour les études de complémentation et de coségrégation sont indispensables à l'approche génétique d'une voie de biosynthèse.

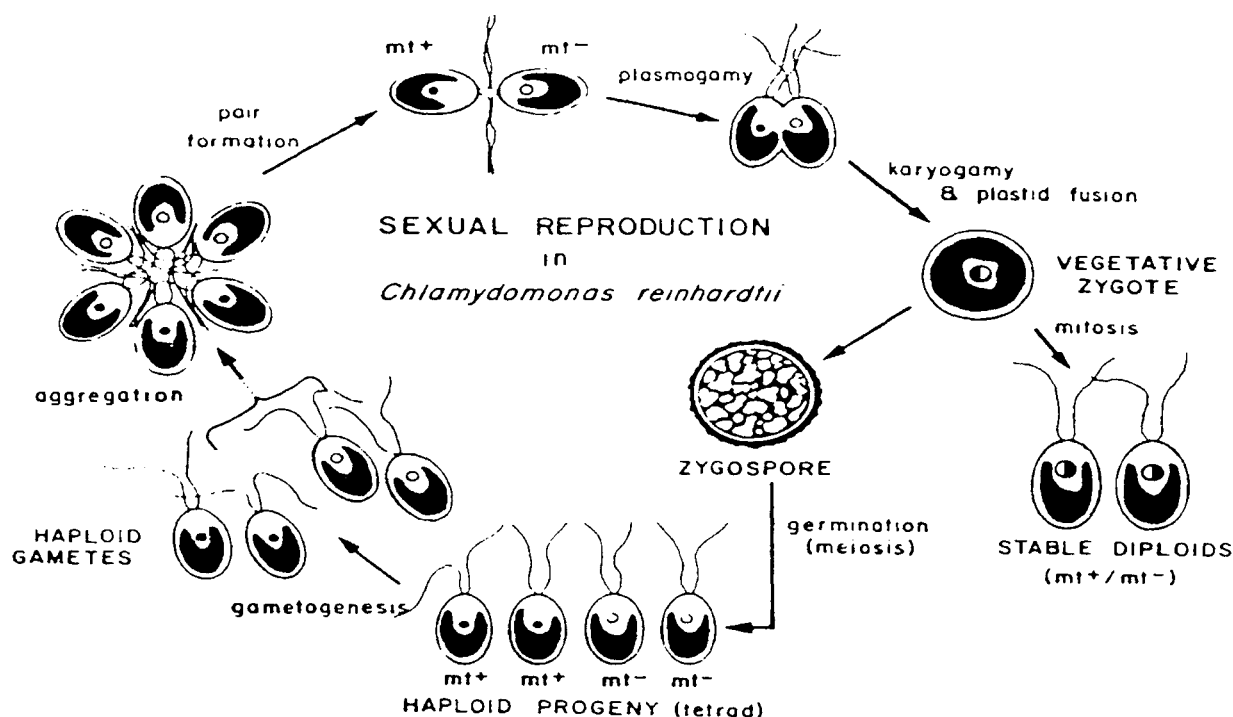


Figure 1 : Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris, 1989).

Enfin, les deux atouts majeurs pour l'étude spécifique de la biosynthèse de l'amidon dans ce micro-organisme résident d'une part dans un crible phénotypique sensible et d'autre part dans une survie de l'algue indépendante de la présence d'amidon.

B. Le crible phénotypique : clé du succès

La technique d'identification de mutants est basée sur une caractéristique physico-chimique fondamentale de l'amidon : l'interaction avec l'iode. En effet, l'amidon se combine avec l'iode pour donner un complexe caractéristique de couleur bleu-nuit.

Banks et coll. (1971) ont établi une relation directe entre le degré de polymérisation (d.p.) d'une chaîne de glucoses et la longueur d'onde (λ_{max}) pour laquelle l'absorbance du complexe iode/polysaccharide est maximale (tableau 1).

d.p. moyen	22,2	28,9	31,3	36,4	50,7	71	93	105	134	1500
λ_{max}	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642

Tableau 1 : Corrélation entre le d.p. et la λ_{max} de glucanes linéaires (selon Banks et coll., 1971).

Thorn et Mohazzeb (1990) ont démontré, quant à eux, que la λ_{max} d'un polysaccharide est fonction de la longueur de ses chaînes externes. Une variation de cette λ_{max} traduit ainsi d'éventuelles modifications structurales du polysaccharide étudié (figure 2).

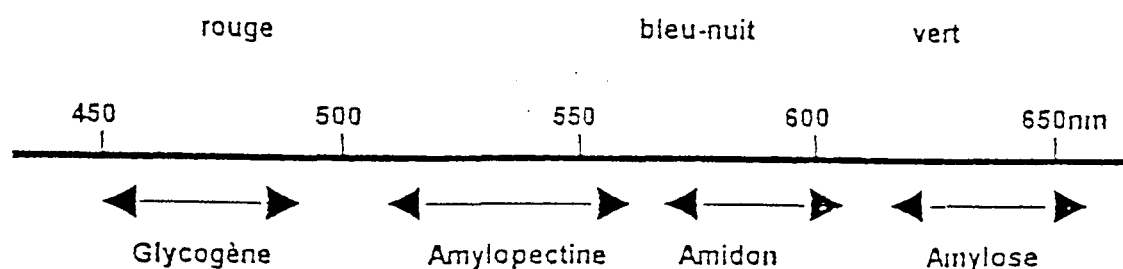


Figure 2 : λ_{max} et couleurs des complexes iode/polysaccharide (selon Thorn et Mohazzeb, 1990).

Comme l'indique la figure ci-dessus, la couleur que revêt le complexe iode/polysaccharide illustre la valeur de sa λ_{max} . C'est cette caractéristique qu'exploite la technique de criblage de mutants dans la biosynthèse de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ainsi, après une simple vaporisation d'iode, les différentes teintes des colonies reflètent la quantité ou la nature de l'amidon accumulé par les souches mutantes (figure 3).

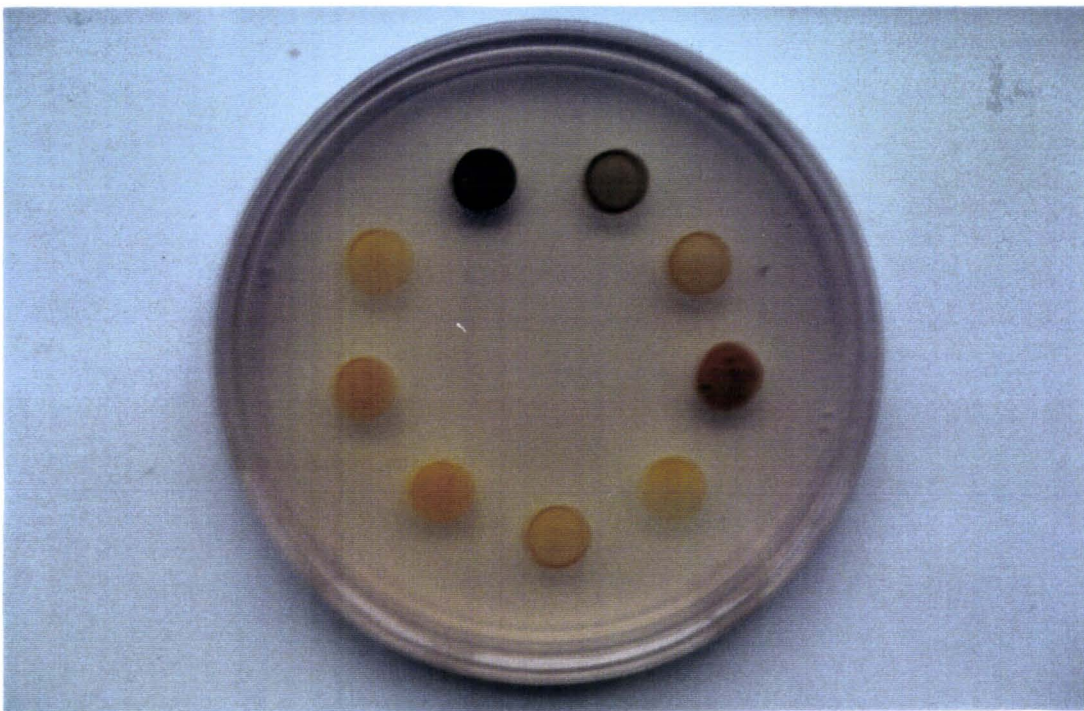


Figure 3 : Principaux phénotypes identifiables sur boîte de pétri.

Noir : quantité et qualité d'amidon normales.

Jaune : caractéristique d'une quantité d'amidon inférieure à 5% de la quantité d'amidon accumulée par la référence sauvage.

Verdâtre : amidon enrichi en amylose.

Rouge : amidon dépourvu d'amylose, composé exclusivement d'amylopectine.

II. L'amidon

L'amidon constitue la principale réserve carbonée des végétaux supérieurs. La production de ce polysaccharide s'effectue évidemment dans les organes de réserve de la plante : les graines, les fruits, les tubercules et les racines de certaines familles de végétaux (amidon de réserve). Il peut aussi être synthétisé dans les feuilles en liaison avec la photosynthèse (amidon photosynthétique).

La synthèse de l'amidon est précisément localisée dans des plastes : les amyloplastés des organes de réserve et les chloroplastes des organes photosynthétiques. L'amidon y est stocké sous la forme d'un granule insoluble de structure complexe.

A. *Le granule*

Le granule d'amidon résulte de l'association tridimensionnelle semi-cristalline de deux polymères de glucose (l'amylopectine et l'amylose) constitués de chaînes de glucoses

branchées entre elles. L'amylopectine est le composant majoritaire du granule (70 à 80%). La proportion de chaque polysaccharide varie en fonction des végétaux ou des organes étudiés, mais se révèle constante pour un même génotype.

Au sein du granule, des zones alternativement cristallines et amorphes forment des anneaux concentriques d'environ 100 nm d'épaisseur (figure 4 A). Ces anneaux concentriques voient leur taille et leur nombre varier en fonction des conditions de culture. Par exemple, chez le blé (Buttrose et coll., 1962) les zones amorphes disparaissent lorsque les plantes sont cultivées sans alternance jour-nuit. Ces anneaux de croissance semblent donc refléter une différence dans la structure du polysaccharide accumulé le jour et la nuit. Le mécanisme moléculaire responsable de cette croissance concentrique du granule reste à définir.

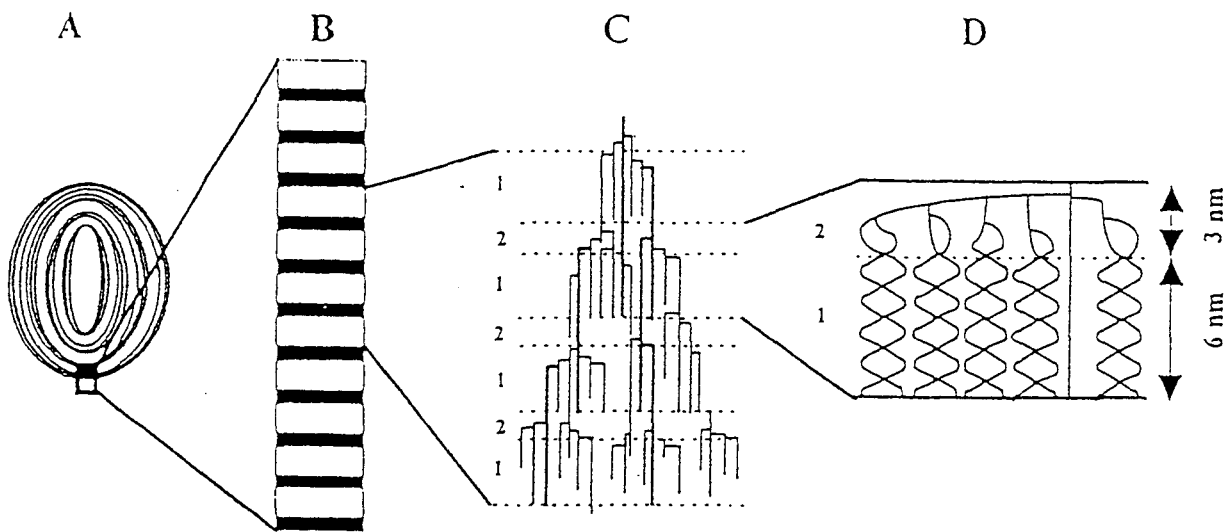


Figure 4 : Organisation du granule d'amidon et structure de l'amylopectine (Ball et coll., 1996).

A) Schéma d'un granule d'amidon figurant la succession d'anneaux concentriques amorphes et cristallins formant le granule.

B) Détail d'un anneau cristallin du granule; reflet de la structure semi-cristalline de l'amylopectine. Chaque zone claire et chaque zone noire représentent respectivement les lamelles cristallines et les lamelles amorphes de l'amylopectine.

C) Détail de 7 lamelles et corrélation avec la structure primaire en grappe de l'amylopectine. Chaque trait représente des α -1,4 glucanes. Les chaînes glucaniques sont reliées entre elles par une liaison glucosidique α -1,6 appelée : point de branchement. Les lignes en pointillés délimitent les zones cristallines (1) et amorphes (2).

D) Représentation de l'association en double hélice des chaînes d'une grappe.

B. L'amylopectine

L'amylopectine est constituée de chaînes glucaniques orientées en moyenne de façon radiale par rapport au centre du granule, leurs extrémités non-réductrices pointant vers la surface.

Le taux de branchement de l'amylopectine avoisine 5 à 6%. Les propriétés de ce polysaccharide procèdent de la localisation originale de ses points de branchement. En effet, ils sont répartis de telle façon que les glucanes s'organisent en grappe engendrant une succession de lamelles amorphes et cristallines (figure 4B, 4C). Les lamelles amorphes sont constituées par les points de branchements (Hizukuri, 1986) et les lamelles cristallines résultent de l'association en double hélice des chaînes linéaires d'une grappe (figure 4D, Imberty et coll., 1991). Une molécule d'amylopectine mesure en moyenne 200 à 400 nm (20 à 40 grappes) (Pour revue Kainuma 1988, Smith et Martin., 1993). Enfin, la périodicité de 9 nm des lamelles est bien conservée dans le règne végétal (Jenkins et coll., 1993).

Récemment, l'analyse du granule d'amidon de pomme de terre, par diffraction d'électrons (figure 5), a révélé que le domaine cristallin du granule résultait de l'agencement en hélices des molécules d'amylopectine (Oostergetel et Van Bruggen, 1993). Selon les auteurs, la structure lamellaire semi-cristalline de l'amylopectine est retrouvée dans certains polymères de synthèse. Néanmoins, une telle structure super-hélicoïdale n'avait jamais été mentionnée pour des polymères naturels ou de synthèse.

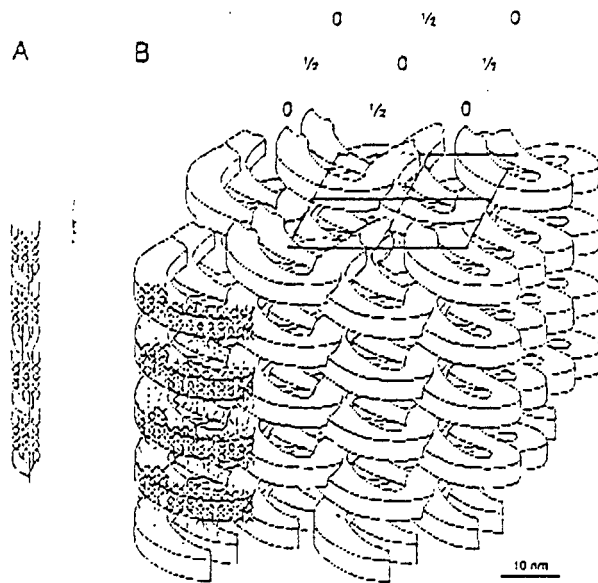


Figure 5 : Modèle schématique de l'agencement tridimensionnel de l'amylopectine (Oostergetel et coll., 1993).

A) Schéma d'une portion de molécule d'amylopectine montrant la structure en grappe et l'agencement en double hélice des glucanes linéaires.

B) Schéma de l'organisation super-hélicoïdale de la lamelle cristalline de l'amylopectine dans le granule. Chaque hélice s'emboîte dans l'hélice voisine pour générer une structure tétragonale.

La localisation compacte des points de branchements et l'agencement super-hélicoïdal des molécules d'amylopectine soulèvent des questions majeures sur la nature même des fonctions impliquées dans la biosynthèse de ce polymère. Les mécanismes enzymatiques invoqués jusqu'ici pour la synthèse de l'amidon ne peuvent, probablement pas, expliquer à eux seuls l'originalité et la complexité de la structure de l'amylopectine, ni de celle du granule d'amidon.

C. *L'amylose*

L'amylose est un polysaccharide faiblement branché, comparativement à l'amylopectine, puisque moins d'une liaison glucosidique sur 100 est un point de branchement. Chaque molécule d'amylose est constituée d'un petit nombre de chaînes glucaniques (1 à 10), de taille comprise entre 50 et 500 résidus (pour revue Manners, 1989). Ce polysaccharide amorphe, quantitativement minoritaire, pourrait localement former des simples hélices entremêlées avec l'amylopectine dans les régions amorphes du

granule (Gidley, 1992 et Jane et coll., 1992). Toutefois, son agencement précis et la nature de ses interactions avec l'amylopectine restent indéterminés. De plus, sa présence n'est pas indispensable à la formation d'un granule.

III. Le métabolisme des glucanes

L'amylose et l'amylopectine sont des polymères exclusivement constitués de résidus glucose reliés entre eux par des liaisons α -1,4 et α -1,6. Le mécanisme de leur synthèse implique le même type d'activités enzymatiques et leur métabolisme respectif semblent étroitement liés.

A. Synthèse du précurseur par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27)

Il est clairement établi que l'ADP-glucose constitue le seul nucléotide-sucre requis pour la biosynthèse de l'amidon. L'ADP-glucose pyrophosphorylase, responsable de la synthèse de ce précurseur à partir de glucose-1-P et d'ATP (figure 6.1), limite et contrôle la biosynthèse de l'amidon.

Chez des mutants de maïs (Tsai et Nelson, 1966), du pois (Smith et coll., 1989) ou d'*Arabidopsis* (Lin et coll., 1988) une diminution de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase a été directement corrélée à une diminution de la quantité d'amidon accumulée.

De plus, des expériences récentes de biologie moléculaire confirment l'aspect limitant de cette étape. En effet, l'utilisation d'ARN anti-sens (Müller-Röber et coll., 1992) a provoqué la diminution de la quantité d'amidon dans les tubercules de pomme de terre, alors que la surexpression par transgénèse d'un gène bactérien codant une ADP-glucose pyrophosphorylase de forte activité spécifique (Stark et coll., 1992) a permis l'obtention de plants de pomme de terre surproducteurs d'amidon.

Enfin, l'absence totale d'ADP-glucose pyrophosphorylase aboutie chez *Arabidopsis* (Lin et coll., 1988) comme chez *Chlamydomonas reinhardtii* à la disparition de l'amidon.

Cette enzyme hétérotétramérique est soumise à une régulation allostérique par l'acide-3-phosphoglycérique (activateur) et l'orthophosphate (inhibiteur). Le rôle majeur de la régulation allostérique de l'enzyme *in vivo* a été mis en évidence par l'étude d'un mutant de *Chlamydomonas reinhardtii* synthétisant moins de 10% de la quantité d'amidon accumulée par la souche sauvage (Ball et coll., 1991). Dans cette souche, l'ADP-glucose pyrophosphorylase est insensible au 3-phosphoglycérate, mais son niveau d'activité basale, en l'absence d'effecteur, est équivalent au niveau de l'enzyme de la souche sauvage.

Enfin, des études structurales approfondies des amidons des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* ont démontré que la simple diminution de la quantité d'ADP-glucose avait non seulement des conséquences sur la quantité d'amidon accumulée, mais aussi sur la structure de l'amidon produit, notamment sur son contenu en amylose et la distribution en longueur de chaînes de son amylopectine (Van Den Koornhuysse et coll., 1996).

Ce dernier élément illustre que le simple fait de modifier la concentration du précurseur, nécessaire à la synthèse d'un polysaccharide, peut avoir des effets sur l'ensemble de son métabolisme et engendrer non seulement une chute de la quantité de polysaccharides produite, mais aussi des modifications structurales importantes du produit synthétisé.

B. Elongation et branchement des chaînes glucaniques

Les amidon-synthétases (EC 2.4.1.21) sont impliquées dans la formation des liaisons glucosidiques α -1,4 des chaînes glucaniques (figure 6.2). Il en existe deux types, les amidon-synthétases solubles (SSS) et les amidon-synthétases liées au grain (GBSS).

Les liaisons α -1,6 glucosidiques, communément appelées point de branchement, sont générées par l'action des enzymes de branchement (EC 2.4.1.18, figure 6.3).

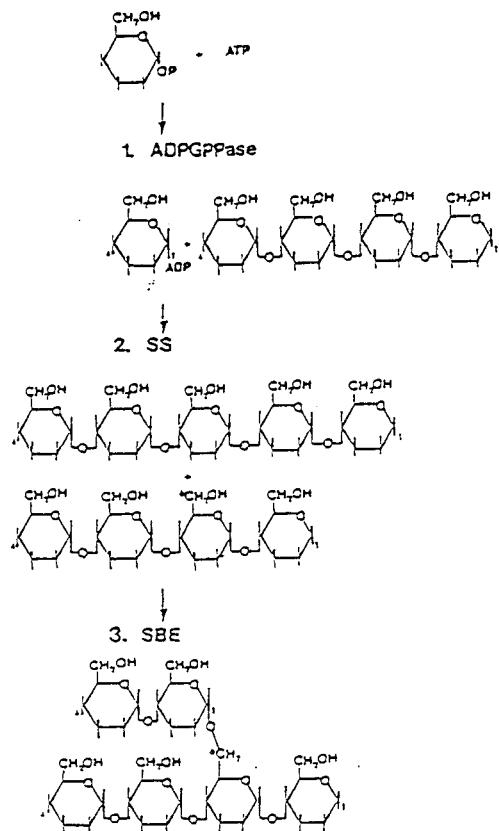


Figure 6 : Etapes de la biosynthèse des chaînes glucaniques de l'amidon (Martin et Smith, 1995).

- 1) Synthèse de l'ADP-glucose par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ADPGppase).
- 2) Elongation de la chaîne glucanique par l'amidon synthétase (SS).
- 3) Elaboration des points de branchement interchaines par l'enzyme de branchement (SBE).

- **L'amidon-synthétase liée au grain**

Des données génétiques concernant le mutant de maïs Waxy ont clairement démontré l'implication de la GBSS dans la synthèse de l'amylose (Nelson et Rines, 1962). D'autres mutants analogues ont également été décrits chez l'orge (Eriksson, 1969), le riz (Murata et coll., 1985), la pomme de terre (Hovenkamp-Hermelink et coll., 1987) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et coll., 1992).

La conséquence de l'altération de cette activité GBSS dans ces mutants Waxy est l'absence d'amylose au sein du granule d'amidon, composé alors exclusivement d'amylopectine, prouvant ainsi le rôle majeur de cette enzyme dans la biosynthèse de l'amylose.

Néanmoins, les travaux de Libessart et coll. (1995) chez *Chlamydomonas* ont révélé que l'activité GBSS liée au grain d'amidon photosynthétique est très élevée. Or, l'amidon accumulé dans ces conditions est fortement appauvri en amylose de faible masse. Ceci suggère que la GBSS est requise dans la synthèse de l'amylose, mais que d'autres facteurs semblent déterminants dans cette synthèse.

Récemment, Smith et coll. (pour revue Smith et coll., 1997) ont défini quatre éléments pouvant influencer la biosynthèse de l'amylose : la quantité de GBSS; la disponibilité de l'ADP-glucose; la concentration en malto-oligosaccharides, qui permettrait l'initiation de la synthèse et surtout l'espace physique disponible au sein de la matrice que forme l'amylopectine.

- **Les amidons synthétases solubles**

In vitro, les SSSI et SSSII ont des affinités comparables pour l'ADP-glucose, mais diffèrent par la nature des chaînes qu'elles peuvent allonger. En effet, la SSSI utilise plus efficacement le glycogène comme amorce, alors que la SSSII préférera l'amylopectine.

Les conséquences physiologiques de ces spécificités ont été étudiées, par Fontaine et coll. (1993), chez un mutant de *Chlamydomonas reinhardtii* porteur d'une défectuosité pour l'activité SSSII (*sta3*). Son phénotype, proche du phénotype des mutants de maïs *dull* (Boyer et Preiss, 1981a) et *su2*, se traduit par une réduction de 40 à 80% de la quantité d'amidon et une diminution importante de la proportion des chaînes de longueurs intermédiaires dans l'amylopectine (8 à 40 résidus glucose). La SSSII serait donc majoritairement responsable de la synthèse des chaînes de longueurs intermédiaires de l'amylopectine.

Enfin, une défectuosité de la GBSS (*sta2*), combinée à cette mutation *sta3*, conduit à un double mutant ne contenant que 5% de la quantité d'amidon produite par la souche sauvage (Maddelein et coll., 1994). Ce phénotype, très marqué, suggère que la GBSS n'est pas uniquement impliquée dans la biosynthèse de l'amylose (cf. page 15), mais jouerait également un rôle important dans l'élaboration des longues chaînes de l'amylopectine. Cette propriété semble confirmée par le fait que les lamelles cristallines de l'amylopectine du maïs Waxy, défectueux pour l'activité GBSS, sont plus courtes que celles du maïs normal (Jenkins et Donald, 1995).

- **Les enzymes de branchement**

Ces enzymes sont des transférases. Elles hydrolysent donc une liaison d'un α -1,4 glucane en un point donné, puis transfèrent la chaîne glucanique ainsi libérée sur un autre glucane en produisant une liaison α -1,6 glucosidique (cf. figure 6.3, page 15). Il en existe 2 types, la SBEI et la SBEII.

Seuls des mutants défectueux pour les enzymes de branchement de type II ont pu être identifiés. Ces mutants, *ae* chez le maïs (Stinard et coll., 1993), *r* chez le pois (Bhattacharya et coll., 1990) présentent des phénotypes analogues dont les caractéristiques sont : un enrichissement en amylose de l'amidon accumulé et la production d'un polysaccharide, modérément branché, de masse moléculaire intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine (Colonna et Mercier, 1984),.

Takeda et coll. (1993) avaient déjà montré que l'enzyme de branchement de maïs SBEI transfère préférentiellement des chaînes plus longues que celles transférées par la SBEII. En 1997, Guan et coll. ont déterminé précisément la spécificité de ces deux enzymes de branchement en les comparant à l'enzyme de branchement du glycogène (GBE).

Leurs travaux confirment que la structure du glycogène est définie par les propriétés de la GBE (Guan et coll. 1995). En effet, la GBE, en présence de glucanes linéaires, produit un polysaccharide dont la distribution en longueur de chaînes et la taille sont conformes à celles du glycogène. Par contre, *in vitro*, les SBEI et II ne semblent pas permettre, à elles seules, la synthèse d'un polysaccharide de propriétés physico-chimiques comparables à l'amylopectine. Le produit obtenu présente une distribution en longueur de chaînes proche de celle de l'amylopectine, mais une masse moléculaire inférieure. De plus, le polysaccharide synthétisé ne présente pas d'organisation granulaire. Les enzymes de branchements semblent donc capables d'engendrer la construction d'un polysaccharide dont les tailles des chaînes sont bien définies, mais où les points de branchement sont probablement répartis sur toute la structure comme cela est suggéré pour le glycogène (figure 7).

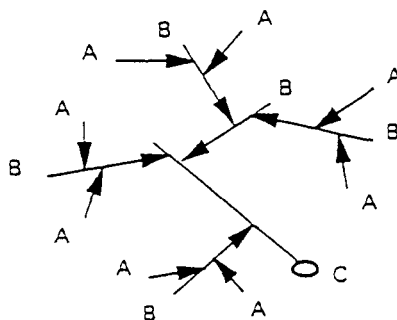


Figure 7 : Représentation schématique d'une molécule de glycogène (pour revue Manners 1985).

Néanmoins, il est à noter que la lamelle cristalline de l'amylopectine mesure de 4 à 6 nm, taille d'un glucane de d.p. 12 à 18. Or, ces longueurs de chaînes correspondent à la taille minimale requise pour l'action des SBEI et SBEII. Ces enzymes, du seul fait de leur spécificité d'action, pourraient donc jouer un rôle crucial dans la régulation de la taille des grappes de l'amylopectine.

En conclusion, l'action des enzymes de branchement ne peut expliquer à elle seule la structure tridimensionnelle de l'amylopectine. L'édification de l'amylopectine ne peut se justifier que par l'intervention simultanée des amidon-synthétases et probablement d'autres fonctions à définir.

C. *Dégradation des glucanes*

La dégradation de l'amidon peut s'effectuer selon deux voies, la voie hydrolytique et la voie phosphorolytique aboutissant respectivement à la production de glucose et de glucose-1-P. Ces deux procédés de dégradation semblent utilisés plus ou moins préférentiellement selon les tissus et les végétaux (Manners, 1985). L'ensemble des activités enzymatiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation de l'amidon est résumé dans le tableau 2 (Steup, 1990). Parmi ces enzymes, l'enzyme de débranchement est la seule capable de cliver les liaisons α -1,6, les autres enzymes hydrolysent les liaisons α -1,4.

Enzyme	Numéro EC	Principale réaction catalysée
α -glucosidase	3.2.1.20	Hydrolyse d'oligosaccharide et de maltose en glucose
α -amylase	3.2.1.1	Hydrolyse des liaisons α -1,4 internes
β -amylase	3.2.1.2	Libération de maltose à partir de l'extrémité non-réductrice d'un α -D-glucane
Enzyme de débranchement		Hydrolyse des liaisons α -1,6 de l'amidon et des polysaccharides de type amidon
α -1,4 glucane phosphorylase	2.4.1.1	Formation de glucose-1-P et de dextrine limite à partir des extrémités non-réductrices de polysaccharide de type amidon, en présence d'orthophosphate
Maltose phosphorylase	2.4.1.8	Conversion du maltose et de l'orthophosphate en glucose-1-P et glucose
Enzyme D	2.4.1.25	Transfert du groupement maltosyl d'un maltotriose sur un α -1,4-D-glucane et libération de glucose

Tableau 2 : Enzymes du catabolisme de l'amidon des végétaux supérieurs (selon Steup, 1990).

Une des difficultés majeures dans la dégradation de l'amidon résulte de la nature insoluble et compacte du granule d'amidon. Jusqu'en 1989, l' α -amylase était la seule enzyme connue capable d'initier l'hydrolyse de l'amidon natif. Des travaux ultérieurs (pour revue Henson et Sun 1995) ont démontré que l' α -glucosidase en était également capable. Sun et Henson (1991) ont tenté de modéliser la dégradation de l'amidon par l'étude de sa digestion *in vitro* en présence de différentes enzymes. Leur étude démontre que l'action de l' α -amylase sur l'amidon natif est principalement directe, alors que l'action de l' α -glucosidase est majoritairement indirecte et fortement corrélée à l'activité de l' α -amylase. Enfin, l'enzyme de débranchement ne semble intervenir dans ce processus de dégradation que tardivement lorsque le taux de branchement devient plus élevé dans les dextrans engendrés par l' α -amylase. La β -amylase, quant à elle, ne semble avoir aucun effet positif sur l'efficacité de dégradation de l'amidon natif et son rôle *in vivo* est à démontrer. De même, l'importance pondérale des diverses activités, décrites dans le tableau 2, dans le mécanisme de dégradation et de mobilisation de l'amidon reste à déterminer.

IV. Biosynthèse de l'amylopectine : épissage des glucanes?

Erlander est le premier à avoir proposé (1958) un schéma de biosynthèse de l'amidon où le glycogène serait précurseur à la formation d'amylopectine. L'auteur suggère que le glycogène est le premier polysaccharide synthétisé. Il serait ensuite partiellement et irréversiblement débranché, ce qui le convertirait en amylopectine. Enfin, l'amylose résulterait de l'association entre elles des chaînes libérées lors du débranchement du glycogène. L'étude du maïs doux porteur de la mutation *sugary1 (su1)* a permis d'asseoir cette hypothèse sur des données expérimentales concrètes.

A. *Le maïs doux*

Le maïs doux porteur de la mutation *sugary1 (sul)* demeure l'un des plus anciens cultivars de maïs utilisés. L'enrichissement en saccharose de son albumen, responsable de ses propriétés gustatives, et la présence (25% du poids sec) d'un polysaccharide soluble le distingue des maïs de référence (Morris et Morris, 1939).

Sumner et Somers (1944) confirment la présence du polysaccharide soluble dont la structure se rapproche de celle du glycogène. Pour cette raison, cette fraction soluble de λ_{\max} 485 nm a été dénommée phytoglycogène. Boyer et coll. (1981b) précisent que 20% de ce phytoglycogène peuvent-être collectés par centrifugation. Ce phytoglycogène est donc composé d'une fraction contenant des particules de polysaccharide soluble et serait de plus associées en rosette comme le glycogène du foie de rat (Lavintman, 1966).

Le granule d'amidon du maïs doux apparaît transparent, ridé et 3,5 fois plus petit que le granule de maïs normal. Ce maïs *Sugary1* accumule 50% de la quantité d'amidon produite par le maïs normal (Creech, 1965). Cet amidon, malgré des études contradictoires (Shannon et Garwood, 1984) semble bien enrichi en amylose (Ikawa et coll., 1981, Yeh et coll., 1981, Boyer et Liu, 1985). Parallèlement, la quantité d'amylopectine dans le granule semble réduite par rapport au maïs normal (Wang et coll., 1993).

- **Contrôle génétique de la biosynthèse du phytoglycogène**

La composition en polysaccharide de différents génotypes (tableau 3) démontre que la présence de phytoglycogène est sous l'influence de *sul* (Black et coll., 1966, Creech et McArdle, 1966). De plus, la diminution de la quantité de phytoglycogène, produite par le double mutant *aesul*, suggère l'épistasie d'*Ae* sur *Sul* pour la biosynthèse de phytoglycogène.

Génotype (homozygote)	Phytoglycogène (%)	Amidon (%)
normal	0,0	69,2
<i>ae</i>	0,0	48,9
<i>du</i>	0,0	56,5
<i>sul</i> *	24,9	29,2
<i>wx</i>	0,0	61,9
<i>ae du</i>	0,0	51,4
<i>ae sul</i>	0,0	37,2
<i>ae wx</i>	0,0	37,1
<i>du sul</i>	17,9	23,6
<i>du wx</i>	1,9	37,9
<i>sul wx</i>	19,0	32,8
<i>ae du sul</i>	6,6	32,7
<i>ae du wx</i>	non quantifiable	69,9
<i>ae sul wx</i>	7,3	38,5
<i>du sul wx</i>	27,9	17,5

Tableau 3 : Quantité de phytoglycogène (selon Black et coll., 1966) et d'amidon (selon Creech, 1965), dans des grains de maïs de différents génotypes, 24 jours après la pollinisation.

Les quantités de polysaccharides sont exprimées en % par gramme de matière sèche.

* variété Golden Cross Bantam.

L'effet de la mutation *ae* sur la production de phytoglycogène dans le double mutant *aesul* a incité Ayers et Creech (1969) à étudier le contrôle génétique de l'accumulation du phytoglycogène. L'albumen de maïs étant triploïde, 16 combinaisons géniques entre les gènes sauvages et mutants d'*Ae* et *Sul* ont été construites (tableau 4). Les résultats obtenus démontrent que l'homozygotie pour *sul* est nécessaire à l'accumulation de phytoglycogène. D'autre part, l'augmentation du nombre de copies de l'allèle mutant *ae* provoque la diminution progressive de la quantité de phytoglycogène (génotype 13,14,15,16). Puisque le locus *Ae* code l'enzyme de branchement de type II (Stinard et coll., 1993) nous concluons à l'intervention majeure de cette enzyme dans le branchement du phytoglycogène.

Numéro de génotype	Génotype de l'albumen	Contenu en polysaccharide soluble (mg/g de matière sèche)
1	<i>Ae Ae Ae Sul Sul Sul</i>	0,6
2	<i>Ae Ae ae Sul Sul Sul</i>	0,7
3	<i>Ae ae ae Sul Sul Sul</i>	0,6
4	<i>ae ae ae Sul Sul Sul</i>	0,3
5	<i>Ae Ae Ae Sul Sul sul</i>	0,5
6	<i>Ae Ae ae Sul Sul sul</i>	0,6
7	<i>Ae ae ae Sul Sul sul</i>	0,5
8	<i>ae ae ae Sul Sul sul</i>	0,4
9	<i>Ae Ae Ae Sul sul sul</i>	1,2
10	<i>Ae Ae ae Sul sul sul</i>	1,4
11	<i>Ae ae ae Sul sul sul</i>	1,1
12	<i>ae ae ae Sul sul sul</i>	1,1
13	<i>Ae Ae Ae sul sul sul</i>	387,6
14	<i>Ae Ae ae sul sul sul</i>	343,4
15	<i>Ae ae ae sul sul sul</i>	232,9
16	<i>ae ae ae sul sul sul</i>	42,0

Tableau 4 : Quantité de polysaccharide soluble produite par différents génotypes de maïs (selon Ayers et Creech, 1969).

Enfin, les différents génotypes semblent produire des phytyglycogènes de structure identiques, exception faite du génotype 16. En effet, la limite de β -amylolyse du phytyglycogène, accumulé par ce génotype, est légèrement supérieure aux autres, ce qui suggère un taux de branchement plus faible de ce polysaccharide (tableau 5).

D'autre part, la fraction soluble des 11 génotypes hétérozygotes pour *sul* (1 à 12) n'est composée que d'un mélange de malto-oligosaccharides de d.p. moyen 10 et non de phytyglycogène.

Numéro de génotype	Génotype de l'albumen	λ_{max} en nm	Limite de β -amylolyse
13	<i>Ae Ae Ae sul sul sul</i>	475	40,9
14	<i>Ae Ae ae sul sul sul</i>	475	40,2
15	<i>Ae ae ae sul sul sul</i>	475	41,9
16	<i>ae ae ae sul sul sul</i>	475	45,7

Tableau 5 : Limite de β -amylolyse des phytyglycogènes de différents génotypes de maïs (selon Ayers et Creech, 1969).

Selon Creech et McArdle (1966), le gène *sul* bloquerait la conversion du polysaccharide soluble en amidon ou serait responsable de la dégradation de l'amidon en polysaccharide soluble.

B. L'enzyme de branchement du phytoglycogène

L'un des éléments majeurs ayant motivé les travaux sur le maïs Sugary1 est la recherche d'activités enzymatiques responsables de la synthèse du phytoglycogène. Différentes études ont été menées tentant de démontrer l'existence d'une enzyme capable de produire ce polysaccharide soluble.

- **L'enzyme de synthèse du phytoglycogène**

La première anomalie biochimique mise en évidence par Lavintman et Krisman (1964) et Hodges et coll. (1969) est la présence dans les génotypes porteurs de la mutation *sul* d'une enzyme de branchement supplémentaire, différente de l'enzyme de branchement décrite dans le génotype normal (enzyme Q).

En effet, cette enzyme incubée en présence d'amylose entraîne l'apparition d'un polysaccharide analogue au phytoglycogène dont la λ_{\max} est inférieure à 500 nm, alors que dans ces conditions l'enzyme Q produit un polysaccharide de λ_{\max} comprise entre 520 et 540 nm proche de celle de l'amylopectine. La présence de cette enzyme de branchement dans l'albumen porteur de la mutation *sul* expliquerait la synthèse de ce polysaccharide plus ramifié que l'amylopectine : le phytoglycogène. D'autres travaux, visant à mieux caractériser cette enzyme de branchement, ont montré qu'elle correspond en fait à l'enzyme de branchement de type I du maïs dont la spécificité serait modifiée dans le maïs doux (figure 8, Boyer et Preiss, 1978b). Ce résultat est contraire aux études d'épistasie mettant en lumière l'importance de l'enzyme de branchement de type II dans l'édification du phytoglycogène.

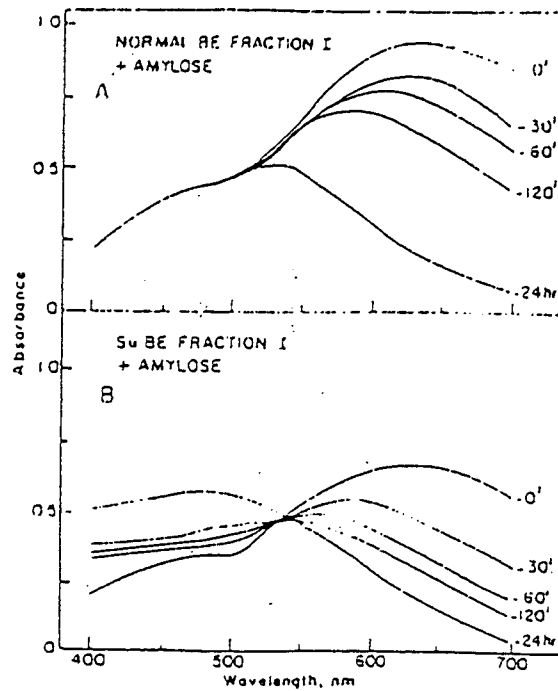


Figure 8 : Spectre d'absorption de complexes iode/polysaccharide (Boyer et Preiss, 1978b).

A) Amylose incubé avec la SBEI de maïs normal.

B) Amylose incubé avec la SBEI de maïs Sugary1.

Le chiffre à l'extrémité des courbes indique le temps d'incubation en présence de l'enzyme de branchement (en minutes : ' ou en heures : hr).

De plus, Black et coll. (1966) ont clairement démontré que la présence de cette enzyme de branchement de spécificité nouvelle n'est pas exclusivement associée à la présence de *su1*. Elle est aussi détectée dans les maïs renfermant les mutations *waxy* ou *dull*, pourtant dépourvus de phytoglycogène, (tableau 6). L'absence de phytoglycogène dans ces mutants pourrait s'expliquer, d'après les auteurs, par sa dégradation dans l'albumen. En effet, le comportement en purification de certaines des enzymes de dégradation, altéré dans ces mutants, pourrait refléter une modification de la spécificité de ces enzymes et expliquer la dégradation du phytoglycogène.

Génotype (homozygote)	Phytoglycogène*	Enzyme de branchement de spécificité nouvelle*	Enzyme Q* (enzyme de branchement normale)	Enzymes de dégradation*
normal	-	-	+	+
<i>ae</i>	-	-	+	+
<i>du</i>	-	+	+	+ †
<i>sul</i>	+	+	+	+
<i>wx</i>	-	+	+	+ †
<i>ae sul</i>	-	-	+	+
<i>du wx</i>	+	+	+	+ †
<i>sul wx</i>	+	+	+	+
<i>ae sul wx</i>	+	+	+	+

Tableau 6 : Corrélation entre la présence de phytoglycogène et la détection des enzymes de branchement dans différents génotypes de maïs (selon Black et coll., 1966).

* Le symbole (+) signifie la présence de phytoglycogène ou de l'enzyme correspondante, le symbole (-) signifie son absence.

† Les enzymes de dégradation sont apparues précocement lors des étapes de purification indiquant une possible modification de ces enzymes par rapport aux autres génotypes étudiés.

- **L'enzyme de branchement de l'amylopectine**

Parallèlement, Manners et coll. (1968) révèlent la présence dans l'albumen du maïs Sugary1 d'une enzyme de branchement capable d'agir sur l'amylopectine. En présence de cette enzyme de branchement, appelée « enzyme de branchement de l'amylopectine », le taux de branchement de l'amylopectine passe de 5,4% à 6,6%. En 1982, Boyer et coll. démontrent que cette « enzyme de branchement de l'amylopectine » n'est en fait que la SBEI normale. En effet, en présence d'amylopectine la SBEI peut produire un polysaccharide de type phytoglycogène (tableau 7).

Auparavant, les mêmes auteurs (Boyer et coll., 1981b) avaient signalé la capacité qu'à cette SBEI de produire du phytoglycogène en présence de granule d'amidon de maïs Sugary1,

mais pas en présence de granule d'amidon d'autres maïs, suggérant ainsi que la synthèse du phytoglycogène est postérieure à celle de l'amidon.

Substrat	λ_{\max}		Longueur moyenne des chaînes	
	- SBEI	+ SBEI	- SBEI	+ SBEI
Amylose	640	520	>300,0	23,5
Amylopectine	550	490	25,2	9,8
Glycogène	480	480	11,8	10,7

Tableau 7 : Caractéristiques des différents polysaccharides obtenus après incubation en présence ou en absence de SBEI (selon Boyer et coll., 1981b). Temps d'incubation 24h.

En conclusion, Manners et coll. (1968) et Boyer et coll. (1982) nous démontrent donc que l'enzyme de branchement de type I, présente dans le maïs Sugary1, est normale et peut conduire à la production de phytoglycogène, par son action sur de l'amylopectine ou sur l'amidon résiduel de maïs Sugary1.

A l'opposé, Black et coll. (1966) et Boyer et Preiss (1978b) établissent l'existence d'une enzyme de branchement de type I, de spécificité altérée, pouvant convertir l'amylose en phytoglycogène dans l'albumen des mutants porteurs de *sul*, *wx* ou *dull*, ces deux derniers étant dépourvus de phytoglycogène.

Ces différents auteurs décrivent donc dans le maïs Sugary1, soit la présence d'une enzyme de branchement normale, soit l'existence d'une enzyme de branchement de spécificité modifiée absente dans le maïs normal, mais décrite dans d'autres génotypes. Aucune altération du fonctionnement des enzymes de branchement ne peut donc être associée à la mutation *sugary1*. Il reste, par conséquent, à déterminer la nature de la fonction codée par le gène *Sul*.

C. Une défectuosité en enzyme de débranchement responsable du phénotype du maïs doux

- Le maïs Sugary1 défectueux pour une activité pullulanase

Pan et Nelson (1984) sont les premiers à définir une défectuosité enzymatique liée à la mutation *sugary1*. En effet, la capacité des enzymes de l'albumen du mutant à digérer le pullulan s'avère altérée par rapport à celle de la référence sauvage (figure 9). Rappelons que le pullulan est un glucane linéaire (cf. figure 11, page 37) constitué de 480 groupements maltotriosyls liés entre eux par des liaisons α -1,6 (Saha et coll., 1991).

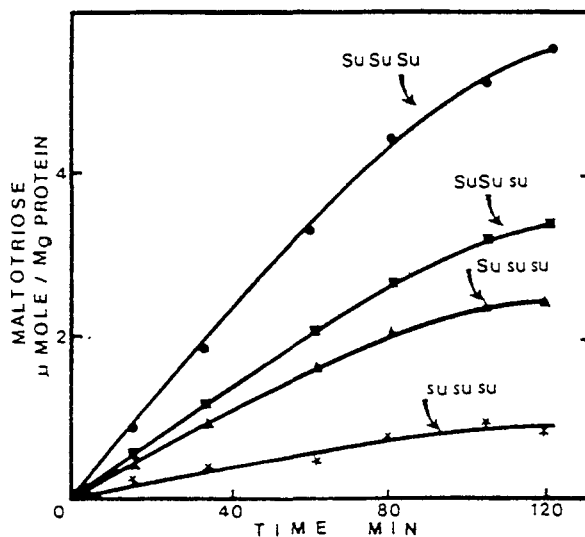


Figure 9 : Cinétique de digestion du pullulan par les enzymes de l'albumen de maïs de différents géotypes (Pan et Nelson, 1984).

Pan et Nelson ont donc procédé à la purification des pullulanases, seules enzymes de débranchement capables d'initier la dégradation du pullulan. L'albumen du maïs Sugary1 s'est révélé dépourvu d'une des trois activités pullulanases, mises en évidence chez le maïs normal après chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite. De plus, les deux autres activités pullulanases du maïs Sugary1 présentent une constante d'affinité pour le phytoglycogène plus faible que les enzymes du maïs normal.

Les auteurs suggèrent que la biosynthèse de l'amylopectine résulte d'un équilibre entre les activités de branchement et de débranchement. L'absence d'une enzyme de débranchement entraînerait l'accumulation d'un polysaccharide hyper-ramifié : le phytoglycogène. Selon Pan et Nelson (1984) la diminution d'activité de débranchement modifie l'équilibre en faveur d'un branchement excessif.

Cette hypothèse est compatible avec l'effet de la mutation *ae* associée à *sul* (cf. page 23). La diminution d'activité de branchement (Boyer et Preiss 1978b, 1981a) provoquée par *ae* a tendance à rétablir l'équilibre vers un rapport d'activité débranchement/branchement de type sauvage, provoquant dans le double mutant *aesul* une diminution importante de la quantité de phytoglycogène produite. Cependant, la présence de la mutation *ae* ne restitue pas une quantité normale d'amidon dans le maïs *sugary* (cf. tableau 3 page 22, Creech 1965, Creech et McArdle, 1966).

Pan et Nelson (1984) démontrent que le phénotype du maïs porteur de la mutation *sugary1* est associé à une déficience en enzyme de débranchement de type pullulanase. Ces activités de débranchement étaient jusqu'alors considérées comme des enzymes responsables de la dégradation de l'amidon. Or, le phénotype du maïs doux met en évidence qu'une déficience d'une activité de débranchement provoque une altération de la biosynthèse de l'amidon.

- ***Sugary1* : gène de structure d'une isoamylase**

L'effet dose de l'allèle *sul* (figure 9) suggère que la mutation concerne le gène de structure d'une enzyme impliquée dans la dégradation du pullulan. Cependant, l'étude de différentes enzymes du métabolisme de l'amidon entreprise par Doehlert et Kuo (1993) réfute cette hypothèse (tableau 8). L'activité pullulanase est bien diminuée dans le maïs doux, sans qu'aucun effet dose de l'allèle *sul* n'ait pu être montré. Ceci suggère que le gène *Sul* n'est pas le gène de structure de cette pullulanase.

Génotype	ADP-glucose Pyrophosphorylase	α -amylase	Pullulanase
+++	1,00	1,43	1,86
++ <i>sul</i>	1,78	1,32	1,85
+ <i>sul sul</i>	1,36	1,34	1,61
<i>sul sul sul</i>	3,30	0,84	1,01

Tableau 8 : Activités enzymatiques d'extraits bruts (selon Doehlert et Kuo, 1993) de l'albumen de maïs normal (+++) et porteur de la mutation *sugary1 (sul)*.

Parallèlement, Nakamura et coll. (1996a) ont mis en évidence le même type de défectuosité enzymatique chez le mutant de riz *Sugary* dont le phénotype est proche du phénotype du maïs *Sugary1*. Le gène codant la pullulanase défectueuse se trouve sur le chromosome 4 (Nakamura et coll., 1996b). Or, le locus *Sugary* est localisé sur le chromosome 8 du riz (Yuno et coll., 1984). *Sugary*, dans le riz ne semble donc pas être le gène de structure de la pullulanase défectueuse.

La nature de la fonction codée par *Sul* a été révélée par les travaux de James et coll. (1995). Ces auteurs ont généré, par l'utilisation de l'élément transposable *Mutator (Mu)*, 5 nouvelles mutations *sugary1*. La technique de mutagenèse utilisée a facilité le clonage d'une partie du gène *Sugary1* et de l'ADNc correspondant. La séquence en acides aminés déduite de cet ADNc établit une homologie avec des protéines de la super-famille α -amylase. La protéine SU1 possède une forte homologie avec une enzyme de débranchement de type isoamylasique (figure 10). L'expression dans *E.coli* de l'ADNc de *Sugary1* et l'étude de l'enzyme produite semblent converger vers le fait que ce gène code une enzyme de débranchement de type isoamylasique (Myers communication personnelle). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-SU1, dans l'albumen de maïs, provoque une diminution de l'activité isoamylasique (Nakamura, 1996).

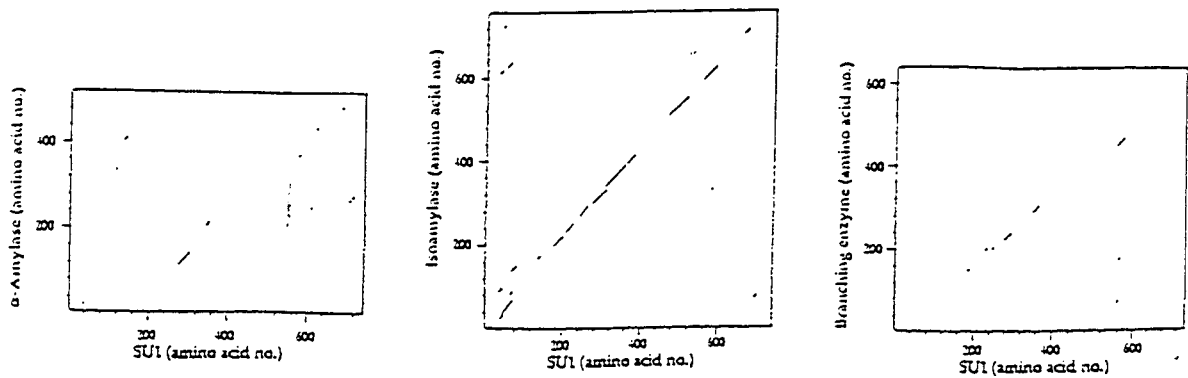


Figure 10 : *Sul* code une protéine de la super-famille α -amylase (James et coll., 1995). Séquence protéique de SU1 comparée avec l'isoamylase de *P.amyloderamosa*, l'enzyme de branchement *Bacillus stearothermophilus* et l' α -amylase de *B.megaterium*. Chaque point indique que 16 des 30 résidus analysés sont identiques dans les deux protéines comparées.

En conclusion, le maïs Sugary1 est porteur d'une défectuosité en activité de débranchement et le gène *Sugary1* code une enzyme de débranchement. Or, cette activité enzymatique est considérée comme responsable de la dégradation de l'amidon. Ce rôle ne peut cependant justifier le phénotype du maïs doux. Ce phénotype ne peut s'expliquer que si l'on considère que ces activités de débranchement interviennent dans la biosynthèse de l'amylopectine.

V. Les enzymes de débranchement

Les enzymes clivant les liaisons glucosidiques α -1,4 ne peuvent réaliser la dégradation complète de l'amidon ou du glycogène. En effet, la présence de points de branchement (liaisons α -1,6 glucosidiques) empêche, à un certain stade, l'hydrolyse du polysaccharide. Ainsi, l'action de ces enzymes sur l'amylopectine ou le glycogène entraîne la libération de glucose, de maltose, de dextrans linéaires de tailles variables, mais surtout l'accumulation de dextrans-limites branchées. Ces produits doivent obligatoirement subir un débranchement pour que la dégradation du polysaccharide puisse être totale.

A. Enzymes de débranchement direct et indirect

Les enzymes de déramification se répartissent en deux groupes, les enzymes de débranchement des mammifères exclusivement indirect et les enzymes de débranchement des végétaux uniquement direct.

- **Enzymes de débranchement indirect**

La phosphorylase hydrolyse le glycogène de manière récurrente à partir d'une extrémité non-réductrice jusqu'à une distance de 4 résidus glucose d'un point de branchement. L'enzyme de débranchement indirect agit sur cette dextrine-limite. Cette enzyme transfère un glucane de 3 résidus glucose sur un glucane linéaire proche, puis hydrolyse le point de branchement pour libérer un résidu glucose. L'enzyme de débranchement indirect contient donc deux activités : une activité amylo-1,6-glucosidasique et 4- α -glucanotransférasique. L'action concertée de l'enzyme de débranchement indirect et de la phosphorylase aboutit à la conversion totale du glycogène en glucose.

- **Enzymes de débranchement direct**

A l'opposé de l'enzyme de débranchement indirect, l'enzyme de débranchement direct ne possède que la capacité de cliver les liaisons α -1,6 glucosidiques. L'enzyme de débranchement direct hydrolyse les liaisons α -1,6 auxquelles elle accède, mais est incapable d'hydrolyser la liaison α -1,6 reliant un seul glucose à une chaîne glucanique. La taille minimale des glucanes libérés par l'action de ces enzymes de débranchement est donc de 2 résidus glucose (Pour revue, Manners, 1985 et Lee et Whelan, 1971b). Ces enzymes de débranchement se classent en deux types : les pullulanases et les isoamylases.

B. La pullulanase (EC 3.2.1.41) et la dextrinase-limite

Les principales études des enzymes de débranchement des végétaux supérieurs traitent d'une enzyme capable de dégrader les dextrines-limites branchées, que Manners baptise : dextrinase-limite ou enzyme R. L'équivalent de cette enzyme chez les bactéries est la pullulanase, décrite initialement comme seule enzyme capable de dégrader le pullulan. L'utilisation de ce substrat pour la détection de la dextrinase-limite a fortement facilité son étude chez les végétaux supérieurs. En effet, la détection de ces activités de débranchement est compliquée par l'interférence qu'entraîne la présence d'autres activités hydrolytiques de type amylasique.

Des dextrinases-limites ont été détectées dans un grand nombre de végétaux supérieurs (pour revue Manners, 1985 et Nakamura, 1996). Elles semblent avoir globalement la même spécificité de substrat quelque soit le végétal étudié (tableau 9). Néanmoins, des études comparatives de ces enzymes semblent nécessaires afin de définir avec précision leurs spécificités.

Substrat	Digestibilité
pullulan	++
dextrines-limites	++
amylopectine	+
glycogène	-

Tableau 9 : Digestibilité de différents substrats par la pullulanase des végétaux supérieurs.
++ : digestibilité forte, + : digestibilité moyenne, - : digestibilité nulle ou extrêmement faible

Les pullulanases bactériennes sont capables de digérer le glycogène à des taux très variables. Par exemple, l'activité de l'enzyme de *Clostridium thermohydrosulfuricum* sur le glycogène correspond à 75% de l'activité sur le pullulan (Saha et coll. 1988). A l'opposé, la pullulanase extra-cellulaire de *Klebsiella* a une activité très faible sur le glycogène, de l'ordre de 2% (Yamashita et coll., 1992).

A l'inverse les pullulanases de végétaux supérieurs semblent plus homogènes au niveau de leur spécificité. Elles ne digèrent pas ou peu le glycogène et à un taux n'excédant pas 5% de l'activité en présence de pullulan. En se basant sur ces éléments, Manners (1997) propose une classification des enzymes de débranchement où la pullulanase des plantes est dénommée dextrinase-limite et distincte des pullulanases bactériennes.

Cette activité de débranchement semblait être induite par une synthèse lors de la germination (pour revue Manners, 1985). Or, Yamada (1981) a montré, dans diverses céréales (l'orge, l'avoine, le blé, le seigle), l'existence d'activité pullulanase activable par des agents réducteurs ou des peptidases. De plus, Beck et coll. (pour revue Beck et Ziegler, 1989) démontrent que des agents réducteurs tels que le DTT ou le β -mercaptoéthanol ont la capacité de restaurer l'activité perdue lors du stockage de l'enzyme. Enfin, Toguri (1990) établit que dans le riz l'enzyme est présente avant la germination sous une forme inactive insoluble. Toguri propose donc que, lors de la germination, la synthèse de réductases et de protéases augmente le taux d'activité pullulanase et favorise, ainsi, la mobilisation de l'amidon.

Plus récemment, Li et coll. (1992) ont montré que la présence de DTT diminue le K_m et augmente le V_{max} de l'enzyme de Betterave sucrière. Le DTT semble modifier la conformation de l'enzyme en clivant des ponts disulfures dont l'existence altère l'efficacité de l'enzyme. Ces groupements thiols, indispensables à l'activité maximale de l'enzyme, ne se situeraient pas au sein du site actif.

Chronologiquement la pullulanase représente la première enzyme découverte capable de digérer le pullulan, mais ultérieurement, d'autres activités enzymatiques ont été mises en évidence chez les bactéries (tableau 10, Saha et coll., 1991). Aucune de ces activités n'a jamais été décrite chez les végétaux supérieurs.

L'isoamylase des végétaux semble présenter la même spécificité que l'isoamylase bactérienne (tableau 11).

Substrat	Digestibilité
pullulan	-
dextrines-limites	+
amylopectine	++
glycogène	++

Tableau 11 : Digestibilité de différents substrats par l'isoamylase des végétaux supérieurs. ++ : digestibilité forte, + : digestibilité moyenne, - : digestibilité nulle ou extrêmement faible

D. Mécanisme d'action.

La pullulanase digère plus efficacement l'amylopectine que le glycogène. Or, si l'on classe les polysaccharides en fonction de la longueur des chaînes qui les composent, le classement est le suivant : 1. le pullulan, 2. le glycogène, 3. l'amylopectine. La spécificité de cette enzyme ne semble donc pas déterminée par la longueur des chaînes qui composent leur substrat.

De plus, Kainuma et coll. (1978) démontrent que les produits de digestion d'amylopectine ou de dextrines limites, engendrés par l'isoamylase ou la pullulanase, présentent la même distribution en longueur de chaînes, en ce qui concerne les glucanes courts. Ceci confirme que la spécificité de ces enzymes ne réside pas principalement dans la longueur des chaînes qu'elles sont capables de cliver.

La différence majeure entre le pullulan et le glycogène, hormis la longueur des chaînes qui les composent, reste l'agencement des points de branchements. Le pullulan possède des points de branchements très ordonnés (figure 11) contrairement au glycogène dont les liaisons α -1,6 sont disposées de manière très différente (cf. figure 7, page 18).

Par certains aspects l'amylopectine se rapprocherait plus du pullulan que du glycogène. En effet, l'espacement moyen des liaisons α -1,6 glucosidiques des lamelles amorphes d'une

grappe d'amylopectine (cf. figure 4, page 10) pourrait s'avérer plus court que dans le cas du glycogène. Nous pensons que cet espacement régit la spécificité des enzymes de débranchement.

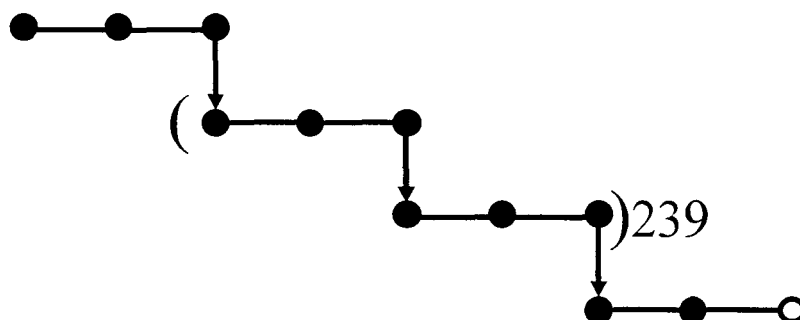


Figure 11 : Représentation schématique d'une molécule de pullulan .

● : Résidu glucose, ○ : Extrémité réductrice, — : liaison α -1,4 glucosidique, ↓ : liaison α -1,6 glucosidique.

En conclusion et avec les réserves qui s'imposent, il semble que l'action des enzymes de débranchement soit plus influencée par la disposition des points de branchements que par la longueur des chaînes disponibles à l'hydrolyse. Cet élément les différencie des enzymes de branchement pour lesquelles la longueur de chaînes demeure un critère majeur de leur spécificité.

Objectifs du travail de thèse.

Les étapes enzymatiques invoquées pour le métabolisme de l'amidon ne permettent d'expliquer ni la formation d'une molécule semi-cristalline telle que l'amylopectine, ni la structure tridimensionnelle du granule d'amidon. Par conséquent, l'étude de la synthèse de l'amidon dans l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* a été initiée afin de déterminer de nouvelles fonctions impliquées dans cette biosynthèse. La corrélation entre des déficiences enzymatiques et des altérations biochimiques des polysaccharides permet de définir et d'ordonner les étapes nécessaires à l'élaboration du granule d'amidon et des polymères qui le composent.

Des souches présentant une altération majeure de la biosynthèse de l'amidon ont récemment été isolées. Elles présentent un phénotype nouveau et accumulent une quantité très réduite d'amidon. Jusqu'à ce jour les seules altérations enzymatiques décrites expliquant un tel phénotype concernaient des déficiences dans la production de précurseur. Or, l'étude préliminaire de ces souches de *Chlamydomonas reinhardtii* n'a révélé aucun dysfonctionnement des enzymes invoquées dans la biosynthèse de nucléotide-sucrose précurseur. Ces mutants, potentiellement intéressants du fait de leur phénotype très prononcé, ont donc fait l'objet d'une caractérisation génétique, biochimique et enzymologique approfondie.

Matériels et méthodes

I. Souches et conditions de culture

A. Souches

Souches utilisées	Polarité sexuelle	Génotype	Phénotype
A35	<i>mt</i> ⁻	<i>ac14 pab2</i>	noir
37	<i>mt</i> ⁺	<i>ac14 pab2</i>	noir
330	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7</i>	noir
BAFJ6	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-1::ARG7</i>	jaune
BAFJ4	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-2::ARG7</i>	jaune
BAFJ7	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-3::ARG7</i>	jaune
S	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-4::ARG7</i>	jaune
FB001	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-5::ARG7</i>	jaune
BAFJ9	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-6::ARG7</i>	jaune
BAFR4	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta7-7::ARG7</i>	jaune
GM7.27	<i>mt</i> ⁻	<i>ac14 pab2 arg7-7 sta7-1::ARG7</i>	jaune
BAFJ3	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta1-2::ARG7</i>	jaune
BAFJ5	<i>mt</i> ⁺	<i>nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta6-1::ARG7</i>	jaune

mt : locus de polarité sexuelle, la souche porteuse de l'allèle *mt*⁺ transmet son génome chloroplastique et la souche porteuse de l'allèle *mt*⁻ transmet son génome mitochondrial à sa descendance.

ac14 : mutation provoquant le besoin en acétate pour la croissance.

arg7-7 : mutation affectant l'argininino-succinate lyase, dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'arginine, entraînant l'auxotrophie de la souche pour l'arginine.

pab2 : mutation entraînant l'auxotrophie de la souche pour l'acide para-amino-benzoïque (PAB). Les loci *pab2* et *ac14* sont distants de 15 centimorgans.

cw15 : mutation conduisant à la disparition de la paroi de l'algue.

nit1, *nit2* : mutations conduisant à l'incapacité pour la souche d'utiliser le nitrate comme source d'azote. L'expression du gène *NIT1* est sous la dépendance du produit du gène *NIT2*.

sta : mutation altérant un gène impliqué dans le métabolisme de l'amidon.

B. Milieux et conditions de culture

- **Composition des milieux liquides (Harris, 1989)**

TMPA : TRIS Minimum Phosphate Acétate (pour 1 litre).

TRIS 2,40 g, NH₄Cl 0,40 g, MgSO₄ 0,30 g, CaCl₂ 0,05 g, KH₂PO₄ 1,47 g, K₂HPO₄ 0,32 g, H₃BO₃ 13 mg, ZnCl₂ 11 mg, MnCl₂·4H₂O 6 g, FeCl₂·4H₂O 2 mg, CuCl₂·2H₂O 1,1 g, MoO₃ 0,9 mg, EDTA 50 mg. Cette solution est ajustée à pH 7,0 par de l'acide acétique.

N : milieu de même composition que le TMPA dans lequel le NH₄Cl est remplacé par du NaCl.

- **Composition des milieux gélosés**

Milieu minimum : TMPA sans TRIS et dont les quantités de phosphate sont modifiées KH₂PO₄ 0,18 g, et K₂HPO₄ 0,36 g, auquel on ajoute 1,5 % d'agar.

Milieu minimum partiellement supplémenté : milieu minimum supplémenté en PAB 1 mg l⁻¹ et/ou en acétate de sodium 1 g l⁻¹.

Milieu supplémenté en arginine : milieu minimum auquel est ajoutée de l'arginine 50 µg ml⁻¹

Milieu nitrate minimum : on remplace le NH₄Cl du milieu minimum par du KNO₃ 0,4 g l⁻¹.

Milieu nitrate complet : milieu nitrate minimum supplémenté en acétate de sodium et en PAB.

Milieu riche : milieu minimum supplémenté en PAB 1 mg l⁻¹, en acétate de sodium 1g l⁻¹ et en extrait de levure 4 g l⁻¹.

- **Conditions de culture**

Les souches sont conservées sur milieu riche gélosé. Pour les cultures en milieu liquide, les souches sont transférées dans 50 ml de TMPA durant 3 à 5 jours. La préculture en phase exponentielle de croissance, ainsi obtenue, est transférée dans le milieu adéquat avant l'ensemencement dans le volume désiré.

Les cultures sont effectuées sous agitation vive, à 22°C +/- 2°C exposées à une lumière de 2000 à 4000 lux.

Milieu	Temps de culture	Densité d'ensemencement	Caractéristiques
TMPA	3 jours	5.10^4 cellules ml ⁻¹	photosynthèse, croissance active
-N	7 jours	5.10^5 cellules ml ⁻¹	favorise l'accumulation d'amidon

Pour toutes les expériences les cultures sont utilisées à une densité de 2.10^6 cellules ml⁻¹.

II. Analyse génétique

A. Croisement

Des cellules sont mises en suspension, à une densité de 5.10^6 cellules ml⁻¹, dans un milieu carencé en azote pendant 6 h. à 16 h. durant lesquelles s'effectue la gamétogenèse. Celle-ci s'effectue à 22°C en lumière continue. Des gamètes de polarité opposée sont ensuite mis en présence afin que la fusion s'effectue pendant 3 h. à 5 h.

- **Obtention de descendants méiotiques**

Les suspensions cellulaires sont ensuite déposées en gouttelettes sur milieu minimum à 4% d'agar, placées en lumière douce une nuit, puis à l'obscurité durant 6 à 30 jours pour favoriser la maturation des zygotes et leur enkystement. Après un minimum de 6 jours, les cellules végétatives sont partiellement éliminées à l'aide d'une lame de rasoir et un bloc d'agar contenant une cinquantaine de zygotes est transféré sur milieu riche. Les

cellules sont détachées du bloc de gélose par immersion par 200 µl d'eau stérile, partiellement étalées et chloroformées 45 secondes. Après une nuit en lumière atténuée, les zygotes germés sont étalés avec 200 µl d'eau stérile et placés en lumière vive. Les clones apparaissant après 7 jours sont isolés deux fois, puis caractérisés sur différents milieux sélectifs.

- **Obtention de diploïdes**

Après la fusion, 500 µl de suspension cellulaire sont déposés sur milieu Nitrate-minimum afin de sélectionner les diploïdes végétatifs par complémentarité des génotypes parentaux. Les clones sont ensuite isolés à deux reprises sur un milieu Nitrate-minimum.

La diploïdie des souches est confirmée en estimant leurs volumes cellulaires. En effet, le volume cellulaire moyen d'une cellule diploïde est très différent du volume cellulaire moyen d'une cellule haploïde. Le comptage d'une suspension cellulaire à une densité de $2 \cdot 10^7$ cellules ml⁻¹ est donc effectué en faisant varier la valeur du volume détecté par le compteur (Coulter-counter).

- **Caractérisation phénotypique des souches**

Des gouttelettes de suspension cellulaire de *Chlamydomonas* repris dans de l'eau stérile sont déposées sur un milieu gélosé carencé en azote. Après 7 jours de culture en lumière continue, les colonies sont vaporisées à l'iode une première fois afin de les décolorer. Lors de la seconde vaporisation, les colonies présentent une coloration caractéristique de la quantité d'amidon accumulée, mais aussi de la structure de celui-ci (cf. figure 3, page 9).

B. Caractérisation moléculaire

• Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'une culture en phase stationnaire, selon le protocole décrit par Rochaix et coll. (1991).

Un culot cellulaire de 3.10^7 cellules est repris dans 425 μ l de TRIS HCl 20 mM pH 8, EDTA 50 mM, NaCl 0,1 M, protéinase K 0,2 mg ml⁻¹, SDS 1,5% et incubé 2 h. à 55°C. Après adjonction de 2 μ l de diéthyl pyrocarbonate, le lysat est incubé 15 min. à 70°C. On réalise ensuite une précipitation par l'ajout de 50 μ l d'acétate de sodium 5 M, à 4°C durant 30 min. Le lysat est alors éclairci 15 min. à 10000 g. Ensuite, l'ADN est purifié par centrifugation 5 min. à 10000 g en présence d'un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1). L'ADN est précipité par 1 ml d'éthanol à 96°, lavé par de l'éthanol à 70°, puis séché.

• Transfert d'ADN et hybridation

Une quantité équivalente à 10 μ g d'ADN génomique digéré est déposée sur gel d'agarose (0,8%). Après migration, l'ADN est dépuriné par de l'HCl 0,2N, puis dénaturé*. L'ensemble est ensuite neutralisé*. Le transfert sur membrane de Nylon (Hybond N, Amersham) s'effectue en présence de tampon SSC 20X*. L'ensemble de ces opérations est réalisé sur l'appareil de transfert TE 80 (transvac). L'ADN est ensuite fixé sur la membrane par ultraviolet.

Le marquage de la sonde (fragment Nru1-Sal1 de pBR329) est réalisé par élongation d'amorce aléatoire en présence de [³²P]dCTP. La préhybridation (4 h.) en présence d'ADN de sperme de saumon* et l'hybridation (16 h.) sont réalisées à 42°C dans un tampon Dehhardt1X*, formamide 50%, SSC 6X*, sous agitation lente. La membrane subit ensuite plusieurs lavages, puis est exposée à un film d'autoradiographie à -80°C.

* Les tampons utilisés sont ceux préconisés par le guide « Molecular cloning » (Sambrook et coll., 1989).

III. Etude biochimique des polysaccharides

Les cellules sont concentrées à une densité de 10^8 cellules ml^{-1} par centrifugation à 4°C à 1000 g pendant 10 min., puis lysées en presse de French à une pression de 1000 psi. Le lysat est alors éclairci à 13.000 g pendant 30 min. Le surnageant est congelé à -80°C pour l'extraction du polysaccharide soluble et le culot est exploité pour l'étude de l'amidon.

A. *Purification et séparation des constituants de l'amidon*

Après lyse des cellules, le culot obtenu est repris dans un volume d'eau pour 9 volumes de percoll (Pharmacia), centrifugé à 13.000 g pendant 40 min., puis rincé 3 fois à l'eau par centrifugation à 13.000 g pendant 30 min. Une fraction de l'échantillon est dispersée par ébullition 10 min. et soumise à un dosage à l'aide du kit Starch (Boehringer Mannheim). Ce dosage est basé sur l'hydrolyse amyloglucosidasique de l'amidon en glucose. Ce dernier est ensuite converti en glucose-6-P par une hexokinase. Le glucose-6-P est oxydé en gluconate-6-phosphate et le NADP présent est réduit en NADPH, par une glucose-6-P-déhydrogénase. La quantification du NADPH formé est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 365 nm.

- **Chromatographie de tamisage moléculaire**

Une quantité équivalente à 5 mg d'amidon est dissoute par ébullition dans 500 μl de diméthyl sulfoxyde (DMSO 100%), pendant 20 min. Deux microlitres de cet échantillon

sont ajoutés à 400 μl de DMSO 10% et 100 μl d'une solution d'iode (1% KI, 0,1%). La λ_{max} de ce polysaccharide est alors déterminée par spectrophotométrie.

Le reste de l'échantillon est précipité par 4 volumes d'éthanol (une nuit à 4°C). Ensuite 1 mg de cet amidon est dissous dans 500 μl de NaOH 0.01 N et déposé sur une colonne de gel sépharose CL2B (Hauteur : 50 cm, diamètre : 0,5 cm, débit 10 ml h⁻¹, solvant : NaOH 0.01N, volumes des fractions : 200 μl).

La λ_{max} du polysaccharide de chaque fraction est déterminée à l'aide d'une solution d'iode (0,25% KI, 0,025% I₂).

Les fractions contenant le même polysaccharide sont quantifiées, groupées, dessalées par dialyse et lyophilisées.

B. Purification du polysaccharide soluble

Le surnageant du lysat cellulaire est décongelé, puis centrifugé à 15.000 g pendant 15 min. Le surnageant recueilli est ensuite traité par 2 volumes de chloroforme/1 volume de méthanol, puis centrifugé 15 min. à 5000 g. La phase supérieure est alors prélevée. Le méthanol de cette fraction est éliminé par un barbotage d'air et l'échantillon est lyophilisé. Le lyophilisât, ainsi obtenu, est dissout dans 500 μl à 2 ml de DMSO 10% et éclairci 5 min. à 10.000 g.

Il est possible de doser et de déterminer la λ_{max} de ce polysaccharide (cf. purification d'amidon) sans autre étape de purification.

Cependant, les glucanes solubles (2 à 10 mg), destinés à une étude par Résonance Magnétique Nucléaire ou à un débranchement enzymatique, sont soumis à une chromatographie sur une colonne de gel filtration TSK HW 50. (Hauteur : 50 cm, diamètre : 1,5 cm, débit : 25 ml h⁻¹, solvant : DMSO 10%, volume du dépôt : 1 ml, volume des fractions : 2 ml).

La λ_{\max} et la quantité de polysaccharide de chaque fraction sont définies. Les fractions contenant le même type de polysaccharide sont groupées, dessalées et lyophilisées.

C. *Analyse de la distribution en longueur de chaînes des polysaccharides*

- **Débranchement enzymatique**

5 à 10 mg de polysaccharide lyophilisé sont dissous par ébullition 20 min. dans 250 μ l de DMSO 100%. Après complète dissolution du polysaccharide, 1,8 ml de tampon acétate de sodium 55 mM pH 3,5 sont ajoutés à l'échantillon. Parallèlement, 4 unités d'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* (Laboratoire Hayashibara Okayama, Japon) sont additionnées à 400 μ l de tampon.

Le polysaccharide et l'enzyme sont préchauffés 10 min. à 45°C. Ils sont ensuite mélangés et incubés à 45°C.

Le débranchement s'accompagne de l'augmentation du pouvoir réducteur. Le débranchement total est atteint après 5 h d'incubation. L'échantillon est alors porté à ébullition et conservé à -80°C pour éviter la rétrogradation des longues chaînes linéaires.

- **Chromatographie de tamisage moléculaire**

1,2 ml de glucanes débranchés (2,5 à 5 mg) sont soumis à cette chromatographie. La colonne de gel est celle utilisée lors de la purification du polysaccharide soluble. Cette chromatographie permet d'étudier la distribution des glucanes linéaires de taille supérieure à 25 résidus glucoses. La détection des glucanes s'effectue par dosage (cf. purification d'amidon) et en déterminant la λ_{\max} de chaque fraction. Cette λ_{\max} permet de définir le d.p. moyen des glucanes de la fraction étudiée, en utilisant la corrélation entre la λ_{\max} et le d.p. de chaînes linéaires établie par Banks et coll. (cf. page 8).

- **Chromatographie d'échange d'anions à détection ampérométrique pulsée (HPAE-PAD)**

50 µg de glucanes linéaires, dessalés, lyophilisés et dissous dans une solution de NaOH 100 mM, sont injectés sur une colonne analytique CarboPAC-PA100 DIONEX (hauteur : 250 mm, diamètre : 4 mm, débit : 1 ml min⁻¹, solvant : NaOH, 100 mM). Les glucanes sont élués par un gradient linéaire d'Acétate de Sodium de 50 mM à 350 mM d'une durée de 35 min.

- **Electrophorèse après dérivatisation de glucanes**

125 µg de glucanes sont mis en suspension dans 5 µl d'une solution d'APTS (acide 8-amino-1,3,6-pyreneTRISulfonique) 0,2 M, solubilisés en acide acétique 15% et 5 µl d'une solution de Cyanoborohydrure de Sodium 1 M. Les glucanes sont ensuite placés à 40°C. Après une nuit, 90 µl de tampon TRIS 0,04 M, acide borique 0,04 M, urée 6 M, pH 8,6 sont ajoutés au glucanes dérivatisés. 1 µl d'échantillon est alors déposé sur un gel de polyacrylamide.

Composition du gel : 20% (acrylamide : bisacrylamide, 37,5 : 1). TRIS 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA 0,002 M, urée 8,3 M, pH 8,6.

Composition du tampon d'électrophorèse : solution de TRIS 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA 0,002 M, pH 8,6.

L'appareil utilisé pour l'électrophorèse est un MacroPhor (Pharmacia). La migration est réalisée à 4°C en puissance constante (1250 W). La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un fluoromètre Molecular Dynamics 595 et du logiciel Image Quant.

- **Chromatographie sur couche mince**

5 µg de glucanes sont déposés sur une matrice de gel de silice (Kiesel-gel 60, Merck). La migration s'effectue en cuve de chromatographie saturée par un solvant

butanol/éthanol/eau (5/5/4, V/V). La détection est réalisée par une vaporisation d'une solution d'orcinol sulfurique, suivie d'une cuisson de 5 min. à 80°C.

D. Résonance Magnétique Nucléaire.

L'échantillon lyophilisé, dessalé (0,5 à 10 mg) est mis en suspension dans 500 µl de D₂O et lyophilisé. Les glucanes sont ensuite placés à 80°C durant 4 h dans 500 µl de D₂O avant d'être de nouveau lyophilisés. Par la suite, les glucanes obtenus sont dissous dans un mélange de DMSO-D₆/ D₂O (80/20).

Suivant les paramètres décrits par Fontaine et coll. (1993), les analyses par Résonance Magnétique Nucléaire sont réalisées à l'aide d'un spectromètre Bruker AM-400WB, équipé d'une sonde ¹H/¹³C de 5 mm à une température de 90°C (δ-CH₃ du DMSO=2,6 ppm pour le ¹H et 39,6 ppm pour le ¹³C).

IV. Etude enzymologique

La préparation de l'extrait se fait comme pour l'extraction d'amidon. Le surnageant est utilisé pour les dosages enzymatiques ou congelé à -80°C.

A. Dosages

- **La phosphoglucomutase**

-Principe : quantification du glucose-6-P formé à partir de glucose-1-P.

5 à 50 µg d'extrait brut sont incubés à 30°C pendant 15 min. dans un tampon triéthanolamine NaOH 834 mM pH 7,6, glucose-1-P 3,34 mM, glucose-1,6-diphosphate 0,0166 mM, EDTA 0,868 mM, MgCl₂ 1,67 mM, NADP 0,184 mM, la réaction est interrompue par ébullition 10 min. Le glucose-6-P formé est oxydé en gluconate-6-P et le NADP présent est réduit en NADPH, par une glucose-6-P-déhydrogénase. La

quantification du NADPH formé est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 365 nm.

- **L'ADP-glucose pyrophosphorylase**

-Principe : mesure de l'activité dans le sens dégradation en présence et en absence d'acide 3-phosphoglycérique, par évaluation de la quantité de glucose-1-P formé à partir d'ADP-glucose et d'orthophosphate.

Un volume de 500 µl d'extrait brut (1 mg) est déposé sur une colonne PD10 (Pharmacia), équilibrée en tampon TRIS HCl 50 mM pH 7,5, à 4°C. L'élution des protéines est contrôlée par la progression des pigments. La fraction contenant les pigments (1,5 ml) est utilisée pour le dosage de l'activité.

5 à 20 µg de cette fraction protéique partiellement purifiée sont incubés à 30°C pendant 30 min. dans un tampon Glycylglycine NaOH 80 mM pH 7,5, ADPG 80 mM, P_iNa 1 mM, MgCl₂ 60 mM, glucose-1,6-diphosphate 0,05 mM, NADP 0,25 mM, NaF 10 mM, ADPG 1 mM, 3PGA 1,5 mM.

Sous l'action d'une phosphoglucomutase, le glucose-1-P produit est converti en glucose-6-P et ce dernier est quantifié de la même manière que lors du dosage de l'activité phosphoglucomutase.

- **Les enzymes de branchement**

-Principe : la phosphorylase a de muscle de lapin est capable, en présence de glucose-1-P et sans amorce, de synthétiser des chaînes de glucose. Cette activité faible peut-être amplifier en présence d'amorces glucaniques. Or, les enzymes de branchement sont des transférases. Leurs actions sur ces glucanes provoquent donc l'apparition de nouvelles extrémités non-réductrices qui constituent autant d'amorces pour la phosphorylase et viendront donc amplifier l'incorporation de glucose-1-P.

20 µl d'échantillon sont incubés 1 h. à 30°C dans 180 µl de tampon citrate de sodium 250mM pH 7, AMP 1mM, phosphorylase a de muscle de lapin 0,2 mg ml⁻¹, glucose-1-P 45 mM, [¹⁴C]glucose-1-P 3,8 µM. La réaction est stoppée et les glucanes précipités par l'ajout de 800 µl d'acide trichloroacétique 10% (TCA). Après une nuit à 4°C, les précipités sont filtrés, rincés par 5 ml de TCA 5%, 5 ml d'eau, puis par 5 ml d'éthanol à 70%. La radioactivité présente sur les filtres est ensuite évaluée.

B. Révélation d'activités par zymogramme

• Zymogrammes en conditions dénaturantes

Cette technique de zymogramme est adaptée d'une méthode mise au point par Lacks et Springhorn (1980). D'autres études de ce genre sont abondamment décrites par Gabriel et Gersten (1992).

L'extrait brut (400 µg de protéine) est porté à ébullition durant 5 min en présence de SDS 1%, β-mercaptoéthanol 5% dans un volume final de 115 µl. L'échantillon est ensuite déposé sur un gel de polyacrylamide 30:1 (acrylamide/bisacrylamide), 7,5% (acrylamide), TRIS-HCl 250 mM pH 8,8. Après 80 min. d'électrophorèse à 15 Vcm⁻¹ à température ambiante dans un tampon TRIS-glycine 25 mM pH 8,3, DTT 1 mM, SDS 0,1%, les gels sont rincés par du TRIS 0,04 M durant 2 h. Ce rinçage, à température ambiante sous agitation lente, permet d'éliminer le SDS et de renaturer les protéines. Les gels sont ensuite incubés dans les mélanges réactionnels adéquats. La révélation se fait à l'aide d'une solution d'iode.

Activité amidon-synthétases

Principe : conditions d'incubation permettant l'incorporation d'ADP-glucose par les amidon-synthétases au niveau des extrémités non réductrices du glycogène. Ceci provoque

un allongement des chaînes glucaniques externes du glycogène, se traduisant par l'apparition de taches brunes après coloration à l'iode.

Nature du gel : gel de polyacrylamide de 0,75 mm d'épaisseur contenant 0,45% de glycogène.

Mélange réactionnel : Glycylglycine NaOH pH 9,0 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM, ADP-glucose 1,8 mM, MgCl_2 5 mM, β -mercaptoéthanol 15 mM, SAB 0,5 mg ml⁻¹. Incubation une nuit à température ambiante sous agitation lente.

Activités glucanohydrolytiques.

Principe : le zymogramme en conditions dénaturantes est particulièrement intéressant pour la détection de ce type d'enzymes très affines pour leur substrat. En effet, à l'état natif la migration de ces enzymes en présence de leur substrat est ralentie et fortement perturbée ne permettant pas une détection satisfaisante de ces activités. De plus, après coloration à l'iode, la couleur des dextrines résiduelles engendrée par l'action de ces enzymes, nous renseigne sur la nature de l'activité enzymatique détectée.

Nature du gel : gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur contenant 0,3% d'amidon soluble de pomme de terre (SIGMA) ou d'amylopectine (Waxyliiss, Roquette Frères) autoclavée.

Mélange réactionnel : TRIS-glycine 25 mM pH 8,3, DTT 20 mM. Incubation une nuit à température ambiante sous agitation lente.

Elution de dextrines produites par les activités glucanohydrolytiques

Une bande de gel rincée, correspondante à l'activité recherchée, est placée 72 h dans 1,5 ml de tampon d'incubation stérile. La quantité de glucanes élués est dosée et les produits sont dessalés, puis lyophilisés.

- **Zymogrammes en conditions natives.**

L'électrophorèse est réalisée à 4°C dans des conditions analogues à celles décrites pour les zymogrammes en conditions dénaturantes, mais en absence de SDS. Après centrifugation, l'extrait brut est directement soumis à l'électrophorèse.

Enzymes de branchement.

Principe : en présence d'une forte quantité de glucose-1-P et d'AMP, la phosphorylase synthétise des chaînes glucaniques qui sont associées entre elles sous l'action des enzymes de branchement. Le polysaccharide obtenu se colore ensuite à l'iode.

Nature du gel : gel de polyacrylamide de 0,75 mm d'épaisseur.

Mélange réactionnel : Citrate de Sodium 0,5 M pH 7, glucose-1-P 83,3 mM, AMP 1,66 mM, DTT 20 mM. Incubation une nuit à 30°C sous agitation lente.

La phosphorylase

Principe : conditions d'incubation permettant l'incorporation de glucose-1-P par la phosphorylase au niveau des extrémités non réductrices du glycogène. Ceci provoque un allongement des chaînes glucaniques externes du glycogène, se traduisant par l'apparition de taches après coloration à l'iode.

Nature du gel : gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur contenant 0,45% de glycogène.

Mélange réactionnel : TRIS-HCl 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, DTT 20 mM, glucose-1-P 83,3 mM. Incubation une nuit à température ambiante, sous agitation lente.

C. Purification enzymatique

Préalablement à toute étape de chromatographie, l'extrait brut est dépigmenté. Les pigments sont précipités par de la protamine sulfate à une concentration finale de 0,15%. La précipitation est réalisée à 4°C. L'échantillon est ensuite centrifugé 10 min. à 10.000 g pour éliminer les pigments. Le surnageant est alors soumis à des chromatographies successives.

- **Chromatographie d'échange d'anions**

La colonne utilisée est une colonne MonoQ de 1,5 ml (Pharmacia). Elle est équilibrée 30 min. en tampon acétate de sodium 50 mM pH 6 (solvant A), puis est soumise à un gradient linéaire de 50 min., de 0 à 50% de tampon acétate de sodium 50 mM pH 6, NaCl 1 M (solvant B). Elle est ensuite rincée par le solvant B seul (débit : 1 ml min⁻¹, volume de fraction : 1 ml).

- **Chromatographie de tamisage moléculaire**

La matrice utilisée est de type S 100 (Pharmacia). La colonne est équilibrée par un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6 (Hauteur : 60 cm, diamètre : 2,5 cm, débit : 1 ml min⁻¹, volume de fraction : 2 ml, volume du dépôt : 2 ml).

Résultats

I. Définition d'un nouveau locus impliqué dans la biosynthèse de l'amidon

A. Découverte d'une nouvelle classe phénotypique

En 1993, une mutagenèse par insertion de plasmide a été effectuée chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Bellanger, 1994). Une souche sauvage sans paroi (330), déficiente pour l'argininosuccinate lyase (ARG7), a été transformée par un plasmide porteur du gène *ARG7*. Les transformants (15000), devenus prototrophes pour l'arginine, ont ensuite été criblés afin de trouver d'éventuelles souches déficientes pour la biosynthèse de l'amidon.

A l'issue de cette mutagenèse, 9 souches de phénotypes jaunes ont été isolées (figure 12).

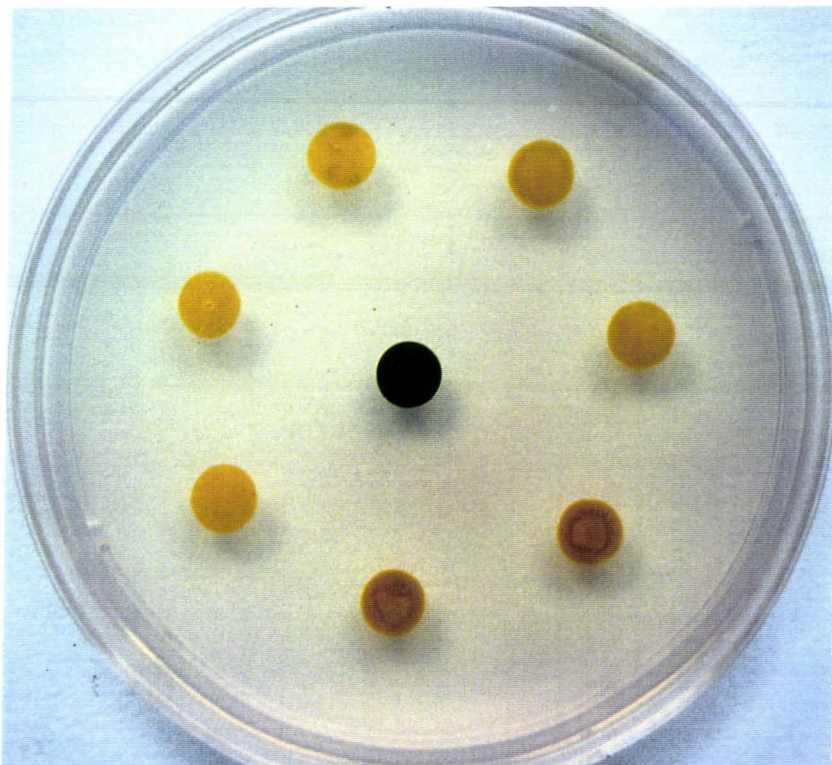


Figure 12 : Coloration à l'iode de souches mutantes de phénotypes jaunes. Au centre la souche sauvage (330), de phénotype noir, utilisée pour la mutagenèse.

Ce phénotype jaune est observé lorsque la production d'amidon est inférieure à 5% de la quantité accumulée par une souche sauvage. Ces souches présentent donc d'importantes déficiences dans le métabolisme de l'amidon.

Les quantités précises d'amidon et de polysaccharides solubles, produites par les différents mutants, sont présentées dans le tableau 12.

Nom de la souche	Amidon ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ_{max} amidon (nm)	Polysaccharide soluble ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)
330	10,0	565	0,07
BAFJ3	0,2	590	0,01
BAFJ4	$4,5 \cdot 10^{-3}$	569	0,50
BAFJ5	$0,5 \cdot 10^{-3}$	-	0,01
BAFJ6	$3,1 \cdot 10^{-3}$	590	0,32
BAFJ7	$2,3 \cdot 10^{-3}$	578	0,42
BAFJ9	$1,8 \cdot 10^{-3}$	576	0,34
BAFR4	$6,3 \cdot 10^{-3}$	572	0,30
FB001	$1,1 \cdot 10^{-3}$	571	0,52
S	$14,3 \cdot 10^{-3}$	573	0,45

Tableau 12 : Quantités d'amidon et de polysaccharide soluble produites par les souches de phénotypes jaunes.

- : Quantité insuffisante pour permettre d'effectuer la mesure d'une λ_{max} .

On distingue donc trois groupes phénotypiques : la souche BAFJ3 produisant 5% de la quantité d'amidon accumulée par le sauvage, la souche BAFJ5 produisant moins de 0,1 % de la quantité d'amidon accumulée par le sauvage et la classe majoritaire, constituée des 7 souches restantes, produisant moins de **0,1% de la quantité d'amidon** accumulée par la référence sauvage, mais accumulant une **fraction polysaccharidique soluble** nouvelle.

Les souches mutantes ne produisant pas de polysaccharide soluble (BAFJ3, BAFJ5) se sont révélées porteuses de déficiences pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase. Les **7 autres souches** présentent un **phénotype original** jamais obtenu au cours des précédentes mutagenèses (U.V. et R.X) et sans analogue décrit dans la littérature, quelque soit l'organisme étudié.

B. Récessivité des mutations

Des diploïdes hétérozygotes ont été engendrés par le croisement de ces 7 mutants avec une souche sauvage de référence (A35), de polarité sexuelle et de caractères trophiques opposés. Le phénotype sur boîte des diploïdes a été déterminé (figure 13) .

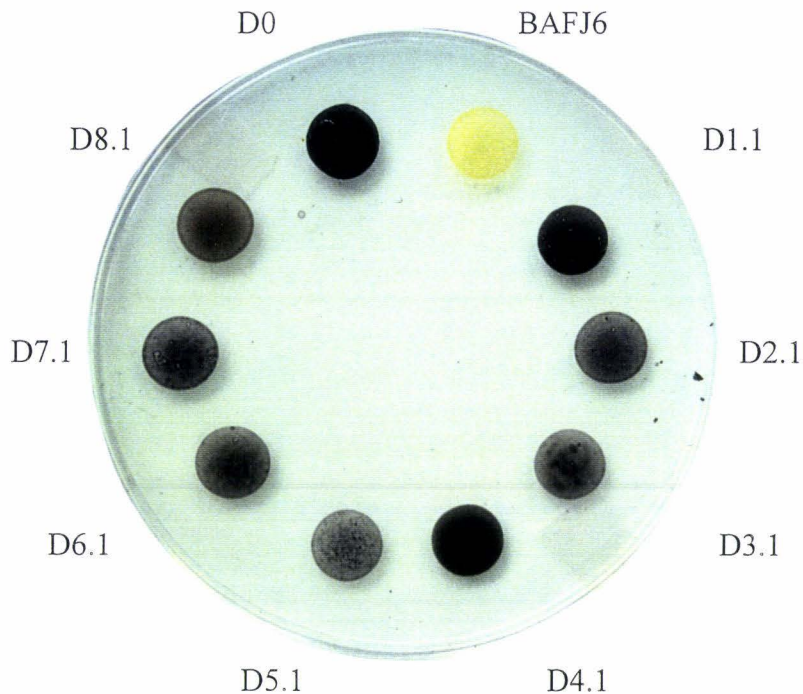


Figure 13 : Phénotype sur boîte de diploïdes.

D1.1 à D7.1 diploïdes hétérozygotes issus du croisement des 7 mutants d'origine avec la souche sauvage A35. D8.1 diploïde issu du croisement de la souche BAFJ3 avec la souche BAFJ6. D0 diploïde homozygote sauvage.

Ces diploïdes hétérozygotes présentent une coloration noire, analogue au phénotype de la souche sauvage. De même, la quantité (tableau 13) et la structure de l'amidon accumulé par les diploïdes hétérozygotes D1.1 et D1.5 se sont révélées identiques à celles de l'amidon produit par la souche diploïde homozygote sauvage D0 (figure 14). Enfin, ces diploïdes ne produisent aucune fraction polysaccharidique soluble. La diploïdie de ces souches a été

confirmée par une analyse de leur ADN génomique effectuée selon la méthode de Southern (figure 15) et par la détermination de leur volume cellulaire.

Nom de la souche	Quantité d'amidon ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ max (nm)
D0	54	602
D1.1	65	610
D1.5	69	605

Tableau 13 : Quantité et λ max d'amidon accumulé par les diploïdes.
D0 : diploïde issu du croisement des souches A35 et 330.
D1.1, D1.5 : diploïdes issus du croisement des souches BAFJ6 et A35.

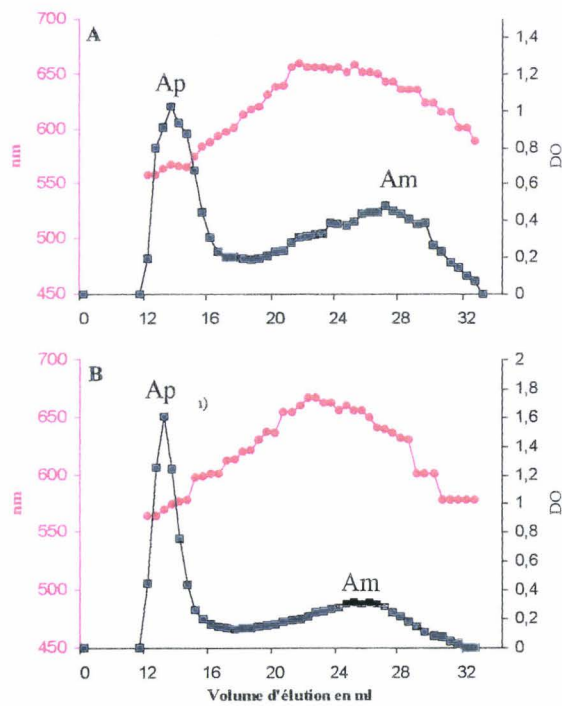


Figure 14 : Profil d'élution de l'amidon d'un diploïde homozygote sauvage (A) et d'un diploïde hétérozygote pour la mutation *sta* (B).
Chromatographie de tamisage moléculaire sur gel Cl2B, Ap : amylopectine, Am : amylose, λ max.

S D D M



Figure 15 : Analyse par la méthode de Southern de l'ADN génomique (digestion par Pst1) des diploïdes hétérozygotes et des partenaires de croisement (BAFJ6 et A35).
D : diploïdes hétérozygotes, S : souche sauvage A35, M : souche mutante BAFJ6.

Les **diploïdes hétérozygotes** pour la mutation *sta* sont de phénotype **sauvage**. Cette **mutation est donc parfaitement récessive**. Par conséquent, des tests de complémentation en trans peuvent être envisagés.

C. *Allélisme des mutations*

Devant l'analogie des phénotypes de ces 7 mutants, un test de complémentation a été envisagé afin de déterminer un éventuel allélisme des mutations. Ce test de complémentation trans consiste en la construction de souches diploïdes, à partir des mutants d'origine et en la détermination de leur phénotype.

Ce test nécessite la construction d'une souche de phénotype mutant, mais de polarité sexuelle et de caractères trophiques opposés au mutant d'origine. Classiquement, une telle souche peut-être obtenue par le simple croisement d'une souche sauvage avec un des mutants d'origine. La souche mutante adéquate est ensuite choisie dans la descendance méiotique. Aucun des croisements n'a permis l'obtention de descendants méiotiques. Seuls des diploïdes végétatifs ont pu être isolés. La fertilité du croisement semble perturbée par l'absence de paroi des mutants.

Pour contourner ce problème, un diploïde végétatif (D1.1) a été utilisé comme partenaire de croisement avec une souche sauvage de polarité mt^+ (37). En effet, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, les diploïdes végétatifs sont de polarité sexuelle mt^- et peuvent donc être croisés. Les triplôïdes obtenus lors de ce croisement ont donné lieu à la production de nombreux zygotes enkystés et d'une descendance aneuploïde plus abondante.

Quatre descendants aneuploïdes, recombinants pour les caractères trophiques utilisés, ont été obtenus. Parmi eux, la souche mutante GM7.27 arborait la polarité sexuelle nécessaire au test de complémentation.

Les résultats de cette étude (figure 16) indiquent que les **diploïdes**, obtenus lors du croisement de la souche GM7.27 avec les souches mutantes d'origine, sont de phénotype **jaune**. La diploïdie des souches a été confirmée par la détermination de leur volume cellulaire.

Ces mutations étant récessives, le phénotype mutant des diploïdes ne peut s'expliquer que par **l'allélisme de ces différentes déficiences**.



Figure 16 : Test de complémentation : phénotype après coloration à l'iode des diploïdes issus de la fusion de GM7.27 avec les 7 mutants d'origine au centre le diploïde hétérozygote D1.1.

D. Coségrégation des caractéristiques phénotypiques liées à la mutation

Un nouveau phénotype ayant été déterminé, il convient de définir si l'ensemble des caractéristiques de ces mutants coségrègent dans la descendance méiotique

L'obtention de descendants méiotiques est restée problématique. Cependant, une étude de coségrégation a pu être effectuée à partir d'un premier groupe de ségrégeants. Ces souches résultent des croisements des souches BAFJ6 ou BAFJ4 avec une souche sauvage.

Les résultats de coségrégation concernant 18 souches, recombinantes pour les caractères trophiques, sont résumés dans le tableau 14.

Nom de la souche	Polysaccharide soluble ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ max (nm)	Phénotype sur boîte
A35	0,03	-	Noir
BAFJ6	0,30	471	Jaune
BAFJ4	0,30	488	Jaune
GM7.27	0,52	488	Jaune
2	0,03	-	Noir
3	0,04	-	Noir
4	0,65	498	Jaune
5	0,10	-	Noir
6	0,08	-	Noir
7	1,91	491	Jaune
8	0,08	-	Noir
9	<0,001	-	Noir
10	1,25	511	Jaune
11	1,10	485	Jaune
12	0,50	516	Jaune
13	0,03	-	Noir
14	0,65	496	Jaune
15	0,40	492	Jaune
16	0,70	488	Jaune
17	0,01	-	Noir
18	0,55	488	Jaune

Tableau 14 : Quantité, λ_{max} de la fraction polysaccharidique soluble et phénotype de 18 ségrégeants méiotiques issus du croisement des souches BAFJ4 et BAFJ6 avec la souche sauvage A35.

L'ensemble de ces ségrégeants est euploïde, exceptée la souche GM7.27 (cf. page 61).

- : Quantité insuffisante pour permettre une mesure de la λ_{max} .

Par la suite, l'obtention d'une quantité suffisante de descendants méiotiques, issue du croisement de la souche S avec la souche A35, a permis une analyse complémentaire. Les résultats de coségrégation phénotypiques concernant 22 de ces souches, prises au hasard parmi les descendants méiotiques recombinants, sont présentés dans le tableau 15.

Nom de la souche	Amidon ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ max amidon (nm)	Polysaccharide soluble ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	λ max polysaccharide soluble (nm)
17	30,40	580	0,02	-
19	13,60	584	0,02	-
20	22,20	588	0,03	-
22	18,40	576	0,03	-
23	0,02	580	0,43	489
25	16,40	578	0,02	-
26	0,01	586	0,37	493
30	26,60	604	0,10	-
28	-	-	0,05	-
31	0,04	588	0,48	484
115	0,01	-	0,49	516
122	0,06	590	0,25	501
126	0,06	573	0,70	492
129	30,00	575	0,02	-
130	42,80	597	0,02	-
132	26,50	570	0,03	-
147	0,04	573	0,83	490
118	0,02	562	0,02	-
120	0,02	587	0,13	-
125	26,00	570	0,03	-
128	0,01	-	0,21	-
135	22,00	587	0,05	-

Tableau 15 : Quantité et λ_{max} des polysaccharides produits par 22 ségrégeants méiotiques, issus du croisement de la souche S avec la souche sauvage A35.

- : quantité insuffisante pour permettre une quantification ou la détermination d'une λ_{max} .

Les λ_{max} des amidons résiduels, ainsi que celles des polysaccharides solubles, sont à interpréter avec prudence. En effet, la quantité d'amidon produite par les mutants étant très faible, la quantité d'impuretés présentes dans cet amidon est plus importante que lors de l'analyse d'amidon de type sauvage. Or, ces impuretés peuvent perturber l'interaction iode/polysaccharide. La λ_{max} de l'amidon résiduel des souches mutantes semble cependant

identique à celle du sauvage et varie de 560 à 590 nm. La λ_{\max} de la fraction polysaccharidique soluble oscille, quant à elle, entre 484 nm et 516 nm.

En conclusion, les souches mutantes accumulent en moyenne **0,1% de la quantité d'amidon** produite par la souche sauvage. De plus, elles produisent une **fraction polysaccharidique soluble**, équivalente à **2%** en moyenne de la quantité d'amidon produite par une souche sauvage. Cette fraction soluble semble contenir un polysaccharide dont la λ_{\max} est **proche de celle du glycogène ou encore de celle du phytyglycogène** décrit chez certains mutants de végétaux supérieurs.

E. Analyse génétique du croisement

Une quantité suffisante de descendants méiotiques a pu être obtenue pour permettre une analyse génétique approfondie du comportement de la mutation en croisement. 144 clones ont été isolés après germination des zygotes provenant du croisement de la souche S avec la souche A35.

Une analyse statistique préalable a mis en évidence une forte contamination par des génotypes parentaux, correspondant aux parents n'ayant pas fusionné, et nécessitant une correction des effectifs du croisement.

Nous avons conçu une correction permettant de soustraire la contribution issue de souches parentales n'ayant pas fusionné lors du croisement. Les effectifs correspondant à cette « contamination parentale » peuvent être déduits par la résolution du système suivant :

$$X / (N+X+Y) = P \text{ et } Y / (N+X+Y) = Q$$

X correspond au nombre de souches de phénotype parental dont la fréquence théorique (par rapport à l'unité) est P et Y au nombre de souches de phénotype parental dont la fréquence théorique (par rapport à l'unité) est Q. N est l'effectif des phénotypes recombinants.

Le nombre de phénotypes recombinants (N) pour les caractères trophiques marqueurs se limite à 67, les fréquences théoriques (cf. proportion théorique du tableau 16) des phénotypes parentaux $AC^+ PAB^+ NIT^-$ ou $AC^- PAB^- NIT^+$ sont respectivement 0,15 (P) et 0,06 (Q).

Les effectifs des souches de phénotypes parentaux correspondants sont donc 15 (X) et 1 (Y).

Après correction, l'effectif a donc été réduit à 83 ségrégeants. L'analyse statistique de la ségrégation des différents gènes marqueurs est présentée dans le tableau 16.

Génotype ou phénotype	Effectif	Proportion	Proportion théorique
<i>AC14</i>	43/83	52%	50%
<i>ac14</i>	40/83	48%	50%
<i>PAB2</i>	43/83	52%	50%
<i>pab2</i>	40/83	48%	50%
<i>NIT1NIT2</i>	24/83	29%	25%
<i>nit1nit2</i> ou <i>NIT1nit2</i> ou <i>nit1NIT2</i>	59/83	71%	75%
<i>AC14pab2</i> et <i>ac14PAB2</i>	28/83	33%	21%
<i>ARG7</i>	77/83	93%	75%*
<i>arg7</i>	6/83	7%	25%*
Noir	39/83	47%	50%
Jaune	44/83	53%	50%

Tableau 16 : Analyse du croisement de la souche S avec la souche sauvage A35.

Génotype de la souche S : *AC14 PAB2 nit1 nit2 arg7-7 sta::ARG7*.

Génotype de la souche A35 : *ac14 pab2 NIT1 NIT2 ARG7 STA*.

* ces proportions correspondent aux proportions attendues dans le cas d'une seule insertion fonctionnelle du gène *ARG7* lors de la mutagenèse (87,5% d'*ARG7* serait la proportion attendue si deux copies indépendantes s'étaient insérées).

Aucune des 6 souches porteuses de la mutation *arg7* (cf. tableau 16) n'est de phénotype jaune. La copie du gène *ARG7* responsable de la mutation semble donc fonctionnelle. Il est à noter que le nombre de descendants porteurs de la mutation *arg7* est plus faible que le nombre attendu dans le cas d'un unique événement d'intégration d'une copie fonctionnelle de *ARG7*. Un test de X^2 a permis de réfuter l'hypothèse de la présence d'une seule copie fonctionnelle de même que la présence de plus de trois copies indépendantes. Il apparaît donc, si l'on considère que ces copies ne sont pas génétiquement liées, que 2 à 3 copies fonctionnelles du gène *ARG7* sont intégrées dans le génome du mutant.

Le profil en analyse Southern de l'ADN génomique de la souche mutante S, hybridé avec un fragment du plasmide utilisé lors de la mutagenèse, ne montre qu'un seul signal lié à la mutation, mais ne coségrégant pas rigoureusement avec celle-ci (cf. figure 17). En effet, deux souches sauvages présentent ce signal de 4000 paires de bases. Celui-ci ne provient donc pas d'une copie de plasmide responsable de la mutation.

La sonde utilisée est un fragment d'ADN correspondant à la séquence procaryote du plasmide et non au gène *ARG7*. Par conséquent, la présence d'un seul signal n'est pas en désaccord avec l'intégration de plusieurs copies fonctionnelles de ce gène. Enfin, une hybridation complémentaire utilisant d'autres fragments plasmidiques permettrait de déterminer la présence d'ADN exogène au locus muté.

M M M M S S S S S S M M S M



S S S M M M S M

Figure 17 : Analyse par southern de l'intégration du plasmide pArg7.8 des 22 ségrégeants étudiés. Hybridation d'ADN génomiques digéré par l'enzyme de restriction PstI. S : souches de phénotypes sauvages, M : souches de phénotypes mutants.

En conclusion, la **ségrégation mendélienne** du phénotype sur boîte confirme la nature **monogénique** de cette **mutation**. Ce phénotype original résulte de l'altération **d'un nouveau gène que l'on nomme : STA7** dont la fonction codée est nécessaire à la biosynthèse de l'amidon. Les allèles de ce gène ont été numérotés de 1 à 7 (tableau 17). Il est à noter que l'indépendance des allèles est garantie par le fait que chaque mutant résulte d'événements distincts d'intégration du plasmide lors de la mutagenèse comme l'a confirmé un analyse en Southern de l'ADN de ces 7 souches.

Enfin, très récemment des étudiants en Travaux d'Etudes et de Recherche (TER) ont isolé, à la suite d'une mutagenèse par U.V., 7 souches de phénotypes jaunes dont l'une s'est avérée être allélique de *sta7* (DD27). Or, la nature de l'agent mutagène utilisé est très propice à la production de mutation monocistronique, ce qui confirme que le phénotype provoqué par la mutation *sta7* résulte bien de l'inactivation d'un gène unique et non de la délétion de 2 cistrons adjacents.

Allèle	Nom de la souche.
<i>sta7-1::ARG7</i>	BAFJ6
<i>sta7-2::ARG7</i>	BAFJ4
<i>sta7-3::ARG7</i>	BAFJ7
<i>sta7-4::ARG7</i>	S
<i>sta7-5::ARG7</i>	FB001
<i>sta7-6::ARG7</i>	BAFJ9
<i>sta7-7::ARG7</i>	BAFR4
<i>sta7-8</i>	DD27 (mutant UV)

Tableau 17 : Correspondance entre le nom de la souche et l'allèle de *sta7*.

II. Conséquences biochimiques de l'altération du gène *STA7*

A. Caractérisation de la fraction polysaccharidique soluble

1. Chromatographie de tamisage moléculaire

La fraction polysaccharidique soluble a été soumise à une chromatographie de tamisage moléculaire sur gel TSK HW50. Ce type de gel est utilisé pour déterminer la distribution en longueur de chaînes de glucanes linéaires. Cette chromatographie permet donc de définir si la fraction polysaccharidique soluble est exclusivement composée de polysaccharide de haut poids moléculaire tel que le phytoglycogène ou l'amylopectine ou au contraire de dextrans de faible masse (figure 18).

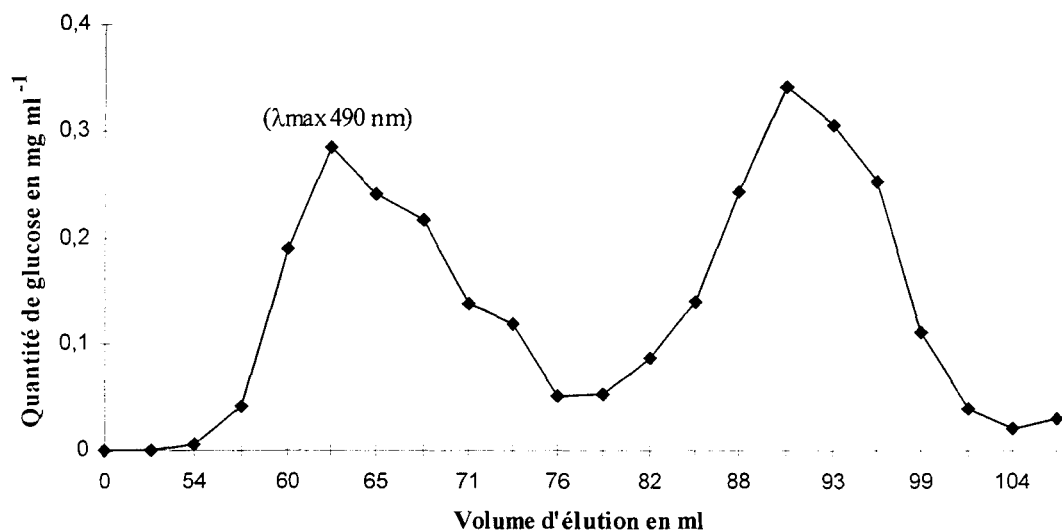


Figure 18 : Profil d'élution du polysaccharide soluble de la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*. Chromatographie de tamisage moléculaire sur gel TSK HW50.

La fraction polysaccharidique soluble des mutants apparaît composée de deux sous-fractions glucaniques : **la fraction 1** dont la λ_{max} est de **490 nm** et **la fraction 2** n'interagissant pas avec l'iode. Les proportions de ces fractions varient d'une extraction à l'autre et la proportion de la fraction 1 oscille de 40 à 100%.

2. Caractérisation biochimique de la fraction 1

a) Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN du proton nous permet de caractériser les polysaccharides. L'intégration et le rapport des signaux, correspondant aux protons anomériques des carbones impliqués dans une liaison α -1,4 (5,15 à 5,25 ppm) ou α -1,6 (4,9 ppm), déterminent avec précision le taux de branchement du polysaccharide. De plus, l'aspect du signal correspondant aux liaisons α -1,4 nous renseigne sur la distribution en longueur de chaînes du polymère.

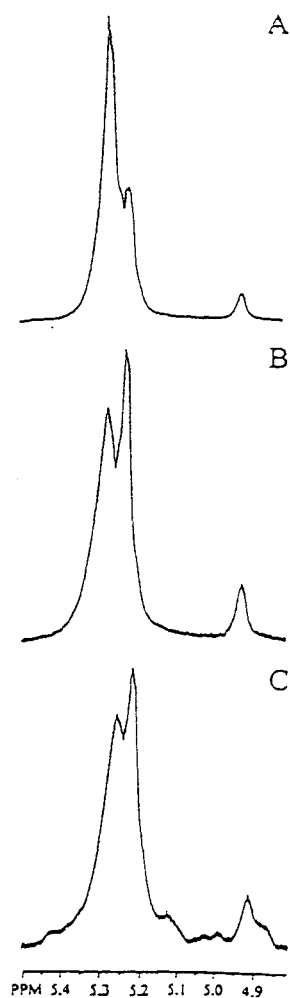


Figure19: Spectre de RMN du ^1H de polysaccharides.

A) Amylopectine de type sauvage.

B) Glycogène.

C) Fraction 1 de la souche porteuse de la mutation *sta7-1::ARG7*.

L'étude de ces fractions par RMN du proton (figure 19) confirme que la fraction polysaccharidique soluble d'une souche porteuse de la mutation *sta7* contient un polysaccharide de haut poids (fraction 1) dont le taux de branchement est proche du taux de branchement du glycogène (8%). De plus, l'aspect du signal correspondant aux liaisons α -1,4 de la fraction 1 est analogue à celui du glycogène et diffère de celui de l'amylopectine.

b) Distribution en longueur de chaînes du polysaccharide de la fraction 1

La fraction 1, mise en évidence après chromatographie, a été débranchée par une isoamylase. Les chaînes linéaires engendrées ont été séparées par chromatographie de tamisage moléculaire et par chromatographie d'échange d'anions à haut pH à détection ampérométrique pulsée (figure 20). Cette analyse permet de déterminer la distribution en taille des chaînes qui composent un polysaccharide.

Ultérieurement, la fraction 1 débranchée a été analysée à l'aide d'une technique développée par O'Shea et Morell en 1996. Ces analyses ont été effectuées au Cooperative Research Centre for Plant Science à Canberra.

Les chaînes linéaires sont soumises à une électrophorèse, après dérivatisation de leur extrémité réductrice par un fluorophore. Cette technique présente deux atouts majeurs par rapport aux précédentes : une sensibilité très importante, du fait du marquage fluorescent utilisé et une grande fiabilité dans la quantification des glucanes de différents d.p. En effet, chaque chaîne ne peut fixer qu'une seule molécule fluorescente. Ainsi, le nombre de chaînes est directement proportionnel à la quantité de fluorescence mesurée (figure 21).

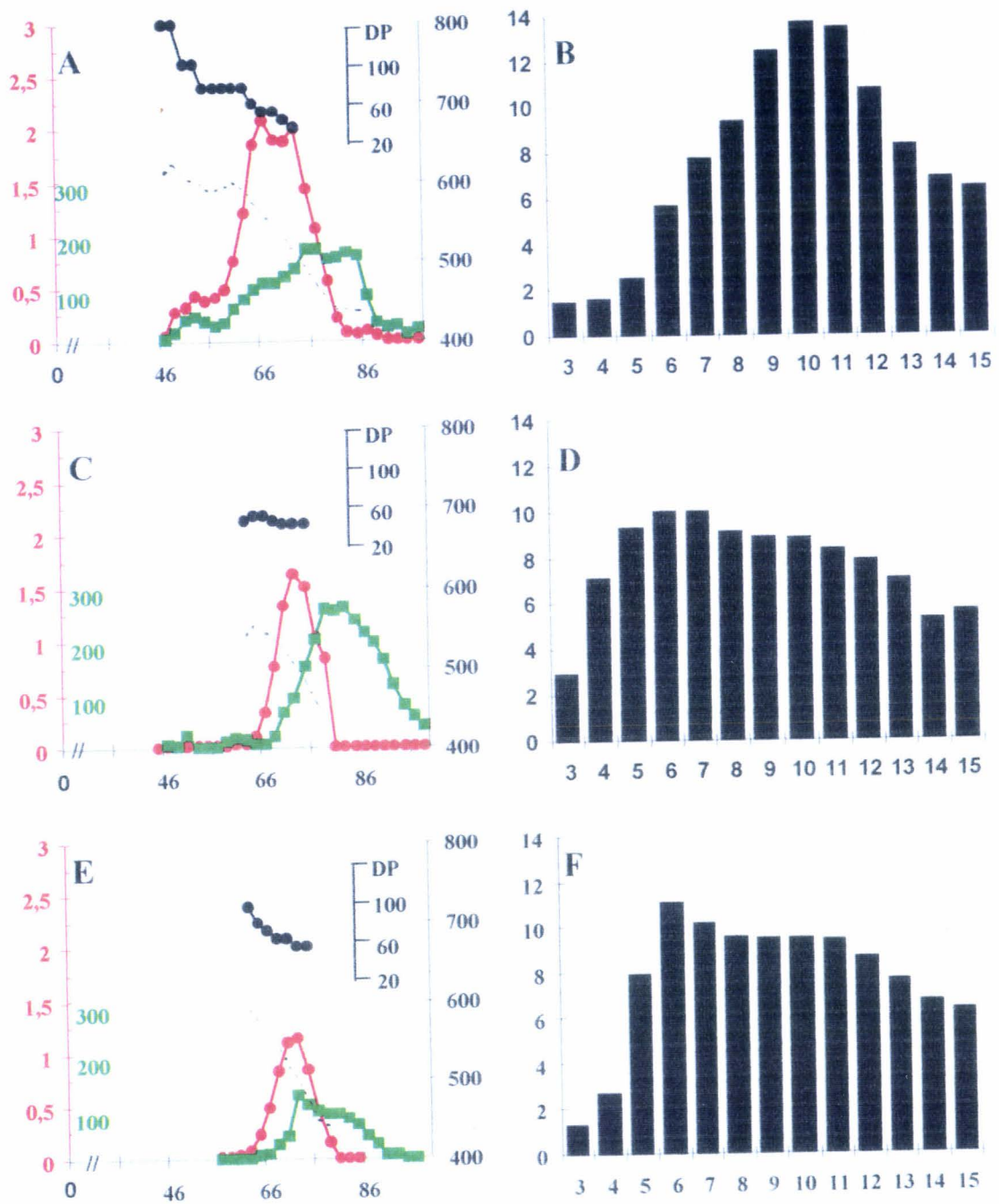


Figure 20 : Distribution en longueur des chaînes de polysaccharides.

A, C, E séparation par chromatographie de tamisage moléculaire des chaînes linéaires résultant du débranchement du polysaccharide.

B, D, F séparation par HPAE-PAD des chaînes linéaires résultant du débranchement du polysaccharide (proportions relatives des différents glucanes).

A et B) Amylopectine de type sauvage, C et D) Glycogène, E et F) Fraction 1 du mutant porteur de la mutation *sta7-4::ARG7*.

Quantité de glucose en $\mu\text{g ml}^{-1}$, densité optique, λ_{max} en nm, le d.p est déduit de la valeur de la λ_{max} .

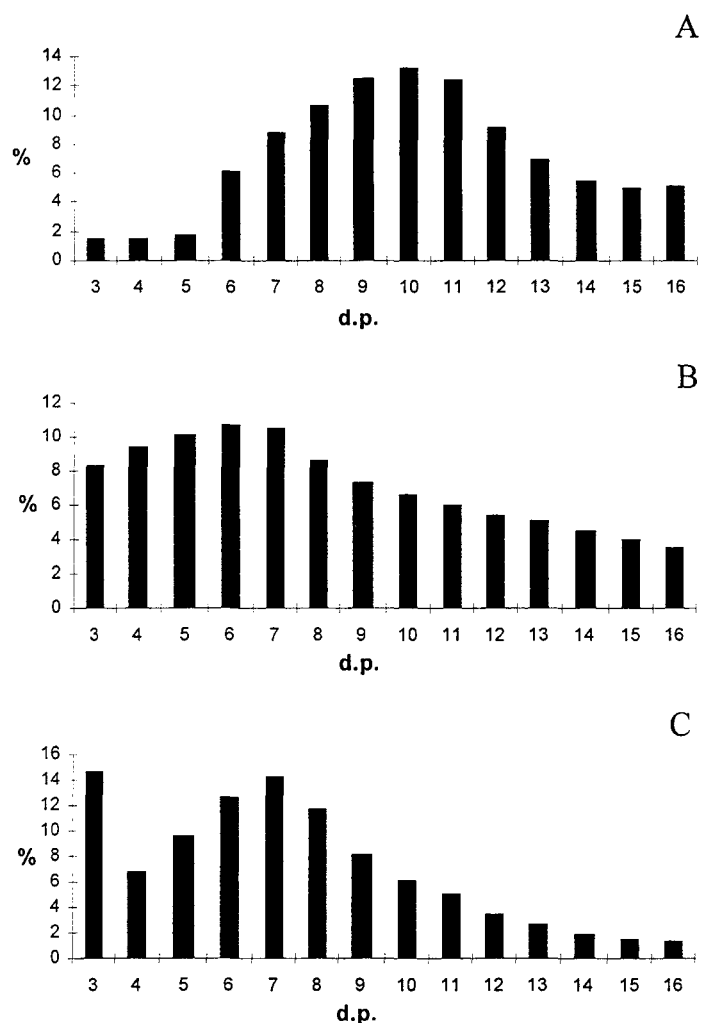


Figure 21 : Analyse par électrophorèse de la distribution en longueur de chaînes de polysaccharides.
 A) Amylopectine de type sauvage, B) Glycogène de foie de lapin, C) Fraction 1 de la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*.

Les profils obtenus, après débranchement du polysaccharide de la fraction 1, confirment que cette fraction contient un **polysaccharide soluble** dont la **distribution en longueur de chaînes est proche de celle du glycogène**. Ces données sont en accord avec l'analyse par RMN et nous permettent de dénommer cette fraction 1 : **phytoglycogène**, du fait de ses similitudes structurales avec le glycogène et par analogie avec le polysaccharide soluble décrit chez certains génotypes de végétaux supérieurs.

3. Caractérisation biochimique de la fraction 2

a) Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire

La fraction 2, de faible poids moléculaire (d.p.<20), semble bien formée de dextrans, comme le démontre la présence de signaux correspondant à des extrémités réductrices libres, d'anométrie α (5,1 ppm) et β (4,5 ppm). L'absence de signal correspondant aux liaisons α -1,6 (4,9 ppm) suggère que ces dextrans ont un taux de branchement inférieur à 1% (figure 22).

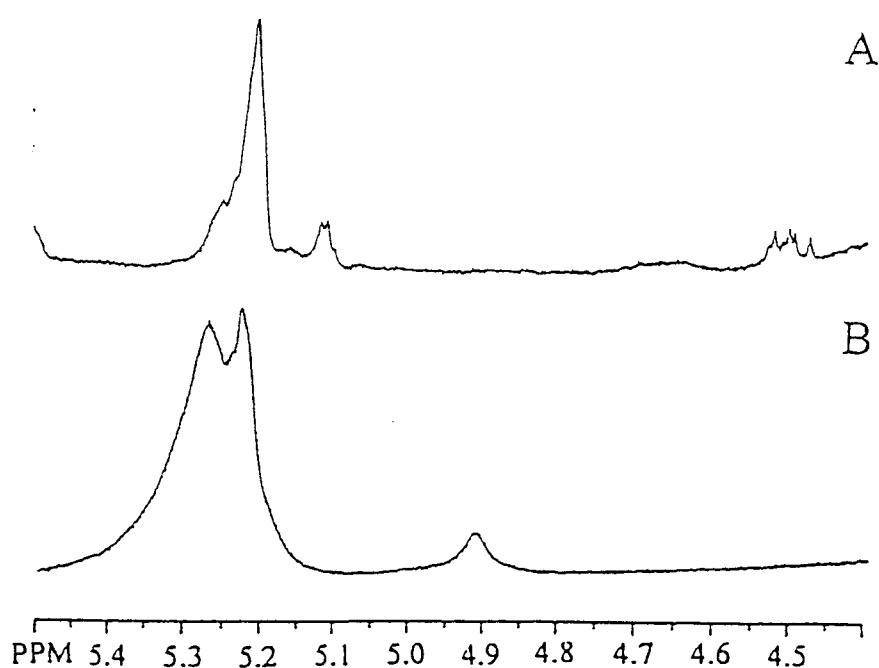


Figure 22 : Spectre de RMN du ^1H de la fraction 2 et du glycogène.

A) Fraction 2 de la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*, B) Glycogène de foie de lapin.

b) Distribution en longueur de chaînes de la fraction 2

L'analyse des dextrans de la fraction 2 a pu être réalisée par électrophorèse après dérivatisation (figure 23). Cette technique s'est avérée très performante dans la séparation des glucanes linéaires et des glucanes branchés.

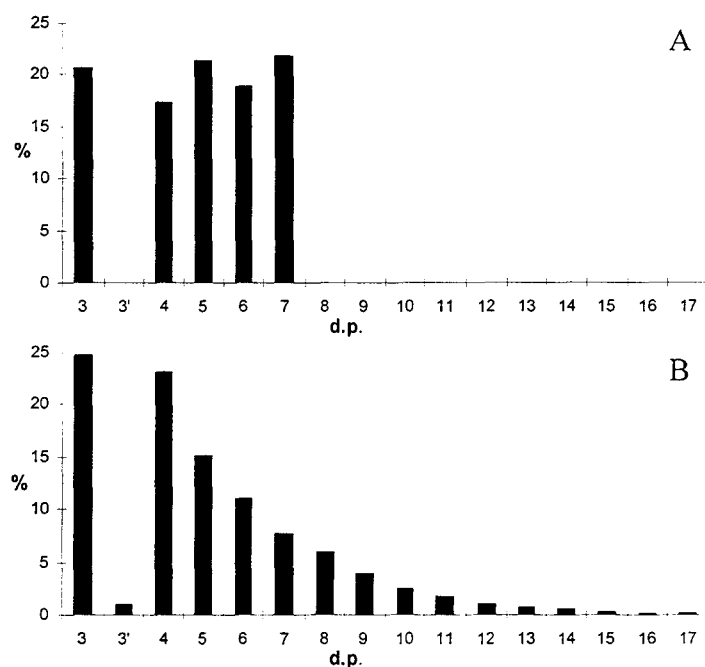


Figure 23 : Analyse par électrophorèse de la distribution en longueur de chaînes de dextrines.
 A) Glucanes linéaires de d.p. 3 à 7.
 B) Fraction 2 de la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*.
 3' glucanes de d.p 3 porteur d'une liaison α -1,6.

La fraction 2 se compose principalement de glucanes linéaires de taille inférieure à 16 résidus glucose, mais contient très clairement 1% de glucanes de d.p. 3 branchés. Ce taux de branchement correspond à la limite de détection de la RMN, ce qui justifie l'absence de signal correspondant aux liaisons α -1,6 sur les spectres de la figure 23.

Les souches porteuses de la mutation *sta7* accumulent donc une fraction polysaccharidique soluble, absente chez le sauvage, composée de **phytoglycogène et de dextrines**. Il existe des génotypes de maïs producteurs de phytoglycogène (Shannon et Garwood, 1984). Toutefois, la quantité d'amidon produite par ces cultivars est toujours supérieure à 50% de la quantité accumulée par le génotype normal. Ce point les distingue du phénotype des mutants au locus *STA7* dont la quantité d'amidon accumulée se voit réduite de 99,9%.

B. Nature du matériel insoluble produit par les mutants.

1. Chromatographie de tamisage moléculaire

La λ_{\max} de l'amidon résiduel des mutants est similaire à celle du sauvage (cf. tableau 15, page 63). Cependant, il est nécessaire d'évaluer les proportions et la nature des polysaccharides qui le composent.

En dépit de la faible quantité de matériel insoluble produite par les mutants, une chromatographie de tamisage moléculaire sur gel Cl2B a pu être effectuée. Les fractions ont été repérées sur couche mince par vaporisation d'orcinol sulfurique. Par la suite, les fractions des différents pics ont été rassemblées. Une λ_{\max} et un dosage ont ensuite été effectués (tableau 18).

Origine de l'amidon	Pic1 : fraction 12 à 18		Pic 2 : fraction 20 à 32	
	λ_{\max} (nm)	quantité (mg)	λ_{\max} (nm)	quantité (mg)
Souche sauvage	540	0,95	640	0,25
Souche mutante	590	0,40	650	1,30

Tableau 18 : Séparation des constituants de l'amidon par chromatographie de tamisage moléculaire (Cl2B).

De manière générale, les λ_{\max} des différentes fractions excèdent la λ_{\max} de l'amidon du mutant de départ. Ceci peut s'expliquer par la délipidation de l'amidon réalisée avant le fractionnement.

La proportion d'amylose dans l'amidon normal est de 20% alors qu'elle est de 76% dans le matériel insoluble synthétisé par le mutant. L'amidon d'une souche mutante au locus *STA7* est donc **enrichi en amylose**. De plus, l'amylopectine produite présente une λ_{\max} de 590 nm, plus **élevée** que la λ_{\max} de l'amylopectine de type sauvage, laissant présager des modifications de sa structure.

2. Caractérisation biochimique de la fraction insoluble

a) Analyse des polysaccharides insolubles par Résonance Magnétique Nucléaire

Les polysaccharides provenant de ces chromatographies ont été analysés par RMN du proton (figure 24).

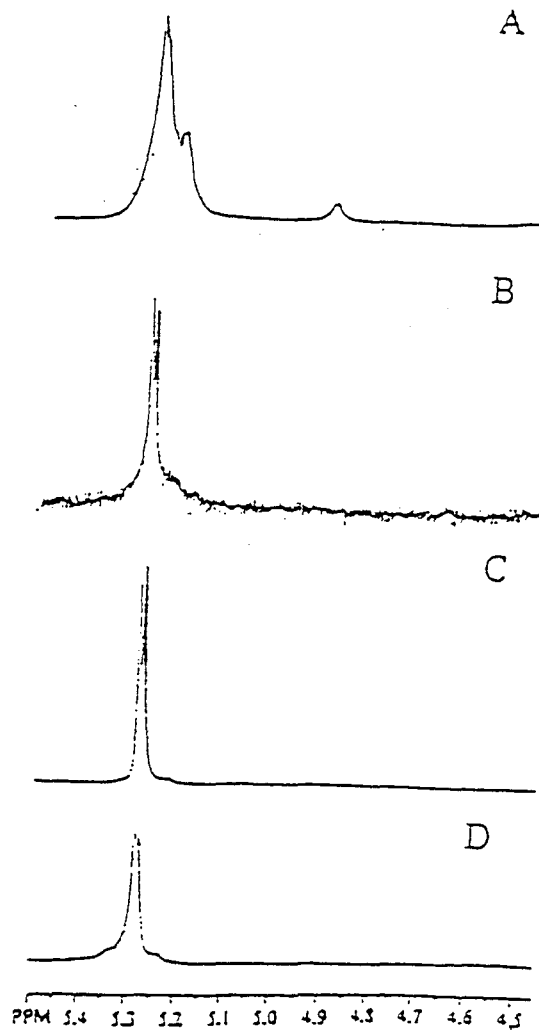


Figure 24 : Spectre de RMN du ^1H du matériel insoluble.

Amylopectine (A) et Amylose (C) de type sauvage.

Amylopectine (B) et Amylose (D) produits par la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*.

Le signal correspondant aux points de branchement (4,9 ppm) n'est pas visible sur les spectre de l'amylopectine des souches porteuses de la mutation *sta7*. Le taux de branchement

de ce polysaccharide est, par conséquent, inférieur à 1%. Cette donnée n'est pas en accord avec la λ_{\max} de 590 nm. En effet, un tel taux de branchement n'est retrouvé que pour des molécules telles que l'amylose dont la λ_{\max} moyenne est 630 nm. De plus, les amylopectines des mutants au locus *STA3* (Fontaine et coll., 1993) ou *STA8* (S.Ball communication personnelle) présentent des λ_{\max} similaires, mais leur taux de branchement est proche du taux de branchement de l'amylopectine de type sauvage (5%). Enfin, l'aspect du signal correspondant aux liaisons α -1,4, analogue au signal de l'amylose, n'a jamais été décrit pour des polysaccharides de type amylopectine et suggère la prépondérance des longues chaînes dans ce matériel.

En conclusion, ce polysaccharide ne peut **ni** être défini comme une **amylopectine modifiée ni** être considéré comme de l'**amylose**, du fait de son poids moléculaire trop élevé.

b) Distribution en longueur des chaînes des polysaccharides

La faible quantité de polysaccharides purifiés n'a permis qu'une étude de la distribution en longueur de chaînes par électrophorèse (figure 25).

La fluorescence des glucanes linéaires analysés par rapport à la quantité de polysaccharide mis en jeu lors de ces débranchements montre que les chaînes de d.p.<20 sont respectivement 6 fois et 8 fois moins abondantes dans l'amylopectine et l'amylose de la souche mutante comparativement à l'amylopectine de type sauvage. Ceci nous permet d'évaluer que le taux de branchement de l'amylopectine du mutant est environ 0,8% et celui de l'amylose 0,6%, si l'on considère une amylopectine de type sauvage avec un taux de 5%.

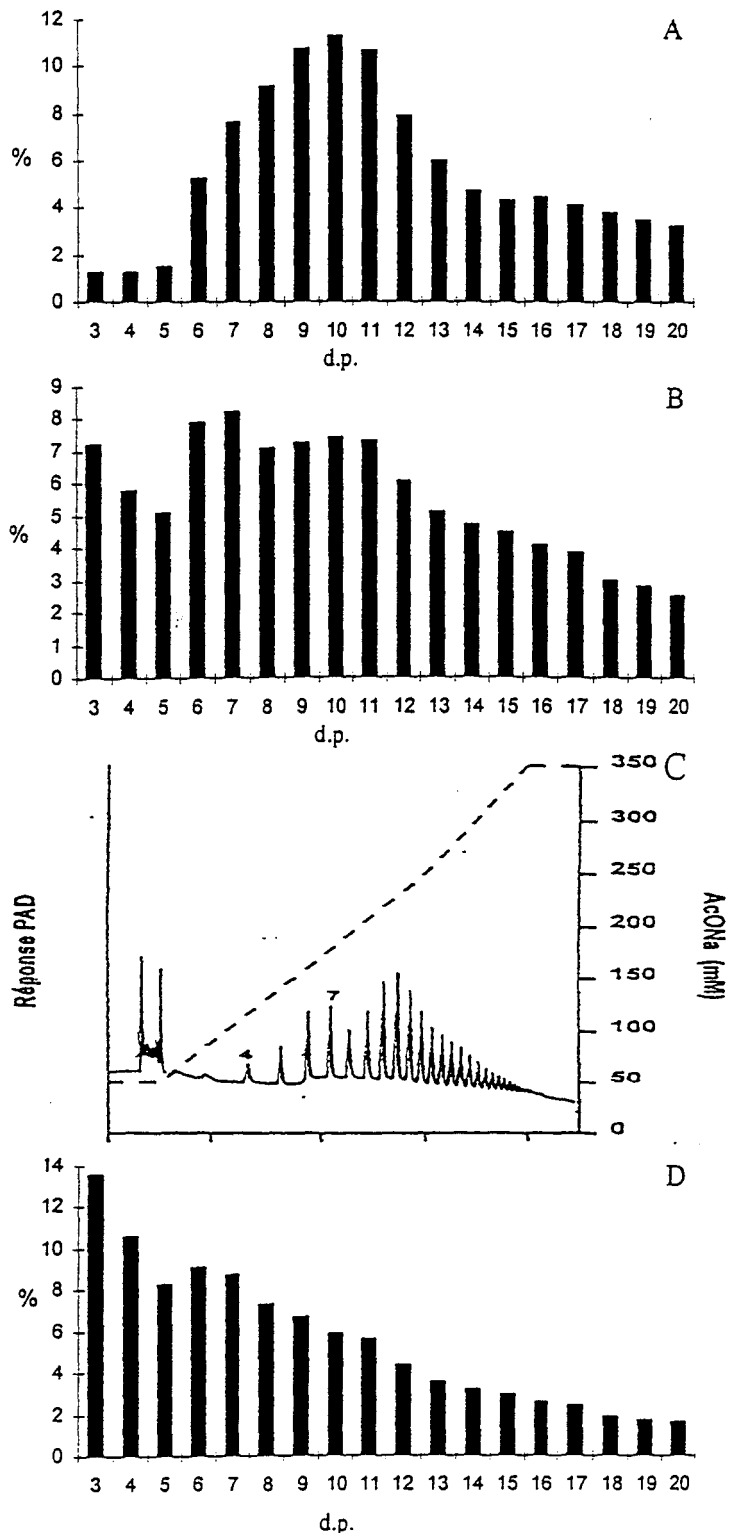


Figure 25 : Analyse par électrophorèse de la distribution en longueur de chaînes des polysaccharides insolubles.

A) Amylopectine de type sauvage.

B) Amylopectine de la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*.

C) Amylose de type sauvage.

D) Amylose de de la souche porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7*.

A, B, D : séparation des glucanes par électrophorèse après dérivation.

C : séparation des glucanes par HPAE-PAD.

Un zymogramme en conditions dénaturantes en gel de polyacrylamide contenant de l'amidon a été réalisé afin de détecter ces activités de dégradation. Les différentes teintes engendrées par les activités hydrolytiques reflètent la spécificité des enzymes.

Les 7 souches renfermant une mutation au locus *STA7* révèlent l'absence d'une bande de teinte bleue (figure 26). De même, la souche DD27 précédemment décrite comme allèle de *sta7* montre la même défectuosité. En zymogramme cette couleur est engendrée par l'action d'enzymes de débranchements telles que la pullulanase ou l'isoamylase (figure 27). Les 40 ségrégeants précédemment décrits (cf. tableau 14 et 15 page 62 et 63) ont été soumis à cette analyse enzymologique par zymogrammes (figure 28).

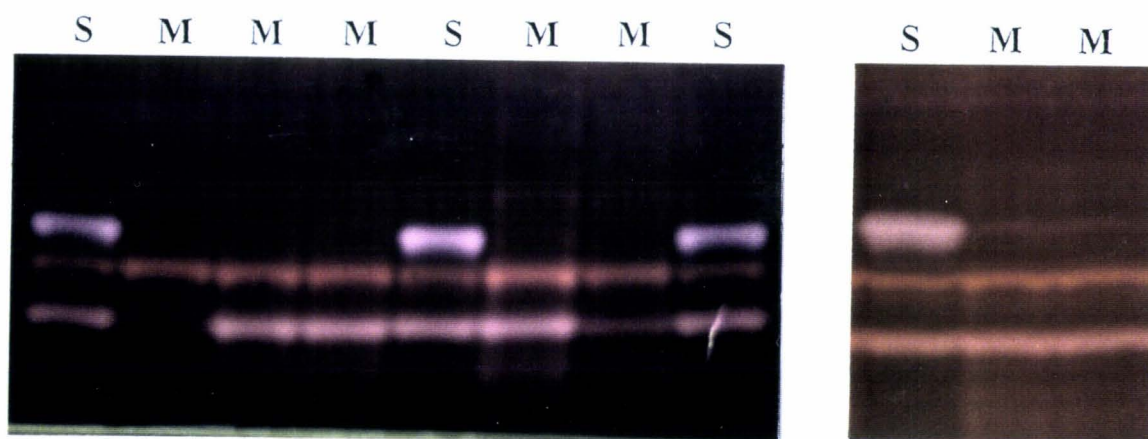


Figure 26 : Détection d'activités hydrolytiques par zymogramme en gel d'amidon en conditions dénaturantes.

Extraits bruts des 7 mutants d'origine (M) et de 4 souches sauvages (S).

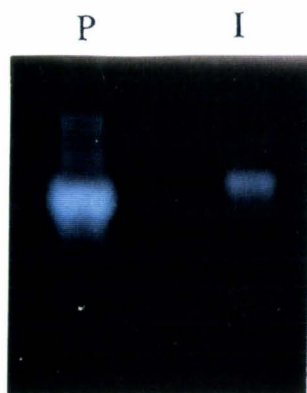
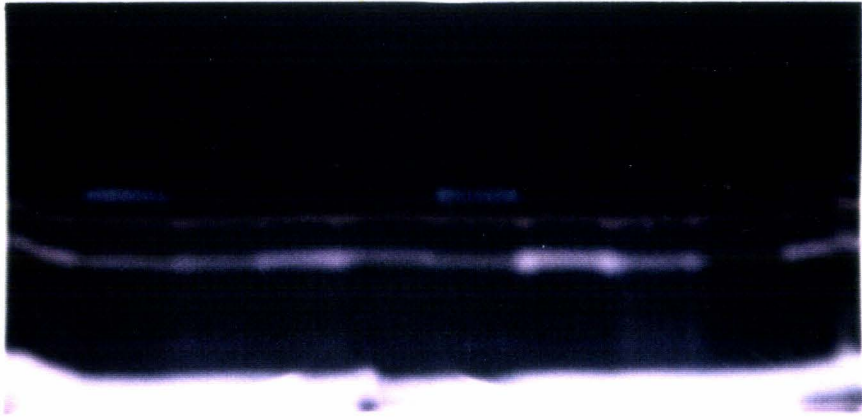
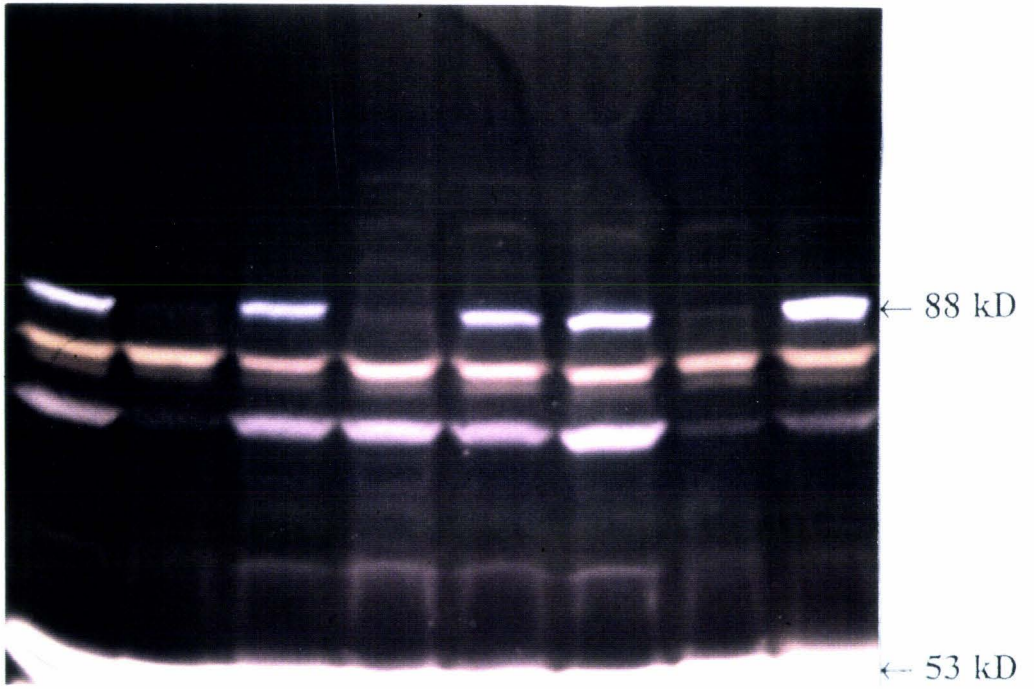


Figure 27 : Détection d'activités pullulanase (P) et Isoamylase (I) par zymogramme en gel d'amidon en conditions natives.

M S M M M S M M M S



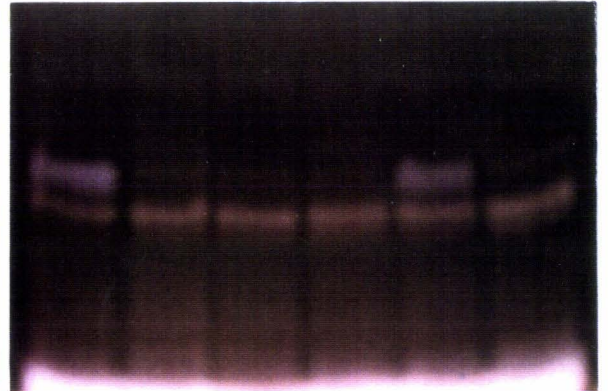
S M S M S S M S



S S S S M S



S M M M S M



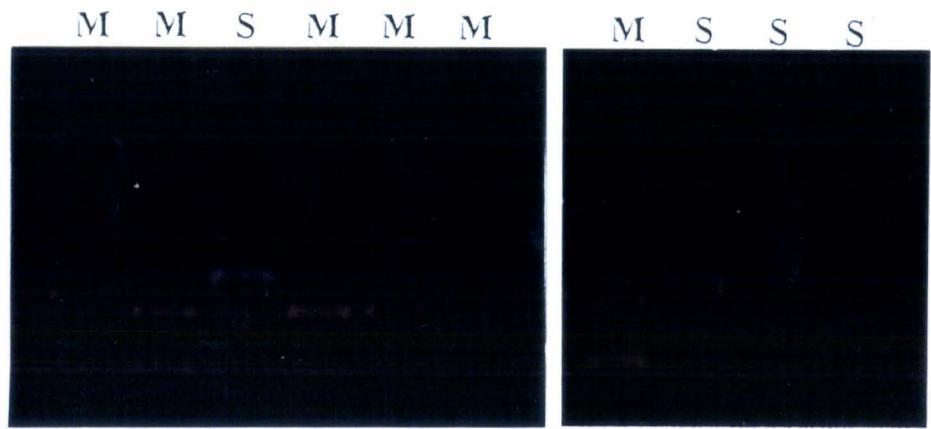


Figure 28 : Détection d'activités hydrolytiques par zymogramme en gel d'amidon en conditions dénaturantes (extraits bruts des 40 ségrégeants).
M : souches de phénotype mutant, S : souches de phénotype sauvage

L'absence de bande bleue coségrège avec la présence de la mutation *sta7*. Les souches porteuses de la mutation **présentent une déficuosité** pour une **enzyme glucanohydrolytique de 88 kD**, capable d'hydrolyser l'amidon. Cette activité est fortement amplifiée par le DTT et maximale à une concentration en DTT de 20 mM (concentrations testées 5, 10, 20 et 30 mM).

B. Les mutants au locus STA7 sont déficients en une enzyme de débranchement

La teinte bleue de cette activité enzymatique ne permet pas de conclure que cette enzyme procède au débranchement de l'amidon contenu dans le gel de polyacrylamide. Les dextrines éluées au niveau des bandes bleues (88 kD) et blanches (53 kD) d'un gel contenant de l'amylopectine ont donc été analysées afin de définir la nature de ces activités enzymatiques. Le coefficient d'extinction du complexe iode/polysaccharide (tableau 19) et la distribution en longueur de chaînes (figure 29) des dextrines produites sont très différents, selon qu'elles proviennent de l'activité de l'enzyme de 53 kD ou de 88 kD. L'enzyme de 88 kD génère des dextrines de plus grande taille dont l'interaction avec l'iode est peu modifiée comparativement aux dextrines produites par l'enzyme de 53 kD.

Les profils obtenus, après débranchement du polysaccharide de haut poids moléculaire retrouvé chez les souches mutantes, ne correspondent pas au profil d'un polysaccharide de type amylopectine. La distribution des chaînes est plus étalée, moins centrée autour d'un glucane majoritaire. La distribution en longueur de chaînes de l'amylose du mutant diffère aussi de celle de l'amylose accumulé par la souche sauvage.

Les mutants accumulent, dans une faible proportion, une fraction polysaccharidique insoluble, mais semblent **incapables de produire un polysaccharide dont la structure s'apparenterait à l'amylopectine**. En conclusion, **l'altération du gène *STA7*** a pour conséquence un dysfonctionnement majeur du métabolisme de l'amidon provoquant **une forte diminution de la quantité de polysaccharide accumulé s'accompagnant d'importantes modifications structurales**.

III. Nature de la défectuosité enzymatique du mutant au locus *STA7*

A. Mise en évidence de l'absence d'une activité glucanohydrolytique.

Une première étude enzymologique, essentiellement basée sur la détection d'activité enzymatique sur gel, n'a pas permis de révéler chez les mutants de défectuosité majeure en amidon-synthétase ou en enzyme de branchement. Enfin, une défectuosité en ADP-glucose pyrophosphorylase ou en phosphoglucomutase semblait plus compatible avec le phénotype de ces souches, mais n'a pas été retrouvée.

Ces enzymes représentent les principales activités connues pour jouer un rôle majeur dans la biosynthèse de l'amidon. Les autres activités intervenant dans le métabolisme de l'amidon sont les enzymes hydrolytiques, invoquées dans la dégradation de l'amidon, mais dont les rôles respectifs restent à définir.

Ces dextrans ont été analysés par RMN du ^1H afin de déterminer leur taux de branchement (figure 30).

Enzyme (kD)	λ_{max} (nm)	coefficient d'extinction (moles cm^{-1})*
-	526	22800
88	536	20300
53	481	3900

Tableau 19 : Propriétés physico-chimiques des dextrans élués.

* : coefficient d'extinction du complexe iode/polysaccharide à 526 nm.

- : amylopectine témoin éluée d'une bande de gel ne contenant aucune activité.

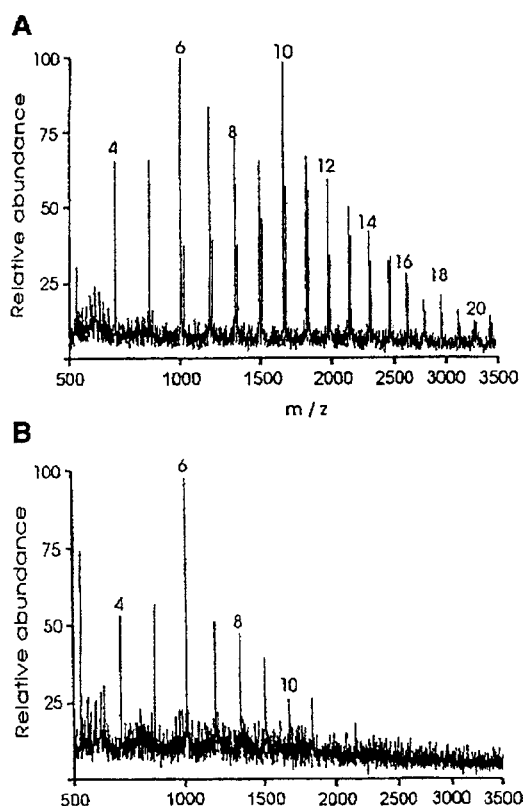


Figure 29 : Spectre de masse (MALDI-MS) des dextrans élués.

A) Spectre de masse des dextrans résultant de la digestion d'amylopectine de maïs par l'hydrolase de 88 kD.

B) Spectre de masse des dextrans résultant de la digestion d'amylopectine de maïs par l'hydrolase de 53 kD.

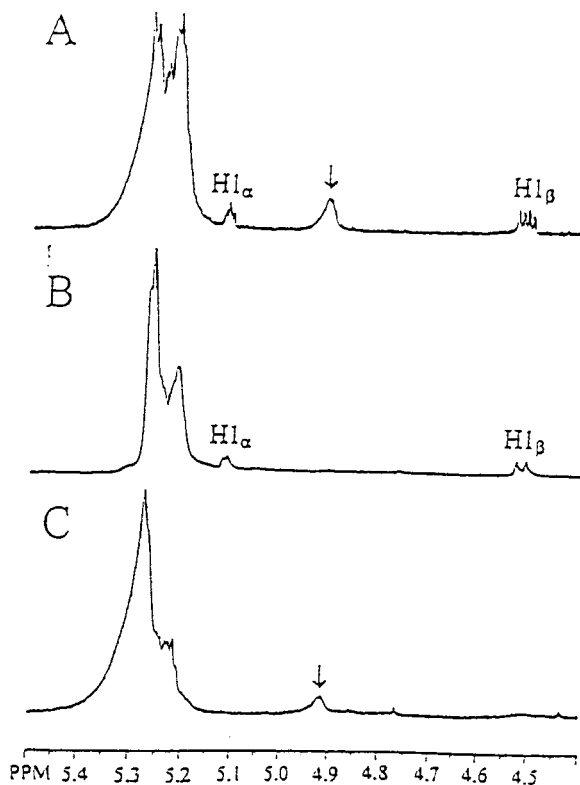


Figure 30 : Spectre de RMN du ^1H des dextrans élués.

- A) Dextrans produites par l'hydrolase de 53 kD.
- B) Dextrans produites par l'hydrolase de 88 kD.
- C) Amylopectine de maïs éluee du gel.

Le signal, à 4,9 ppm, correspondant aux liaisons α -1,6 des dextrans produites par l'enzyme de 88 kD a totalement disparu. Cette disparition s'accompagne de l'apparition de signaux dus à la présence d'extrémités réductrices libres d'anomérisation α (5,1 ppm) et β (4,5 ppm) conséquence du clivage des points de branchement. L'enzyme renferme donc bien une **activité de débranchement**. Par contre, l'enzyme de 53 kD se comporte comme une enzyme de type α -amylasique ne clivant que les liaisons α -1,4 et produisant des dextrans plus courtes.

L'activité hydrolytique de teinte bleue en zymogramme est une enzyme de débranchement, capable de cliver les liaisons α -1,6 de l'amylopectine. Les mutants présentent donc une déficience en une enzyme de débranchement de 88 kD.

C. Purification de l'enzyme de débranchement

La défektivité enzymatique présente chez les mutants concerne une enzyme de débranchement dont il faut maintenant déterminer la spécificité. Une seule étape de chromatographie d'échange d'anions a permis d'obtenir des fractions protéiques contenant l'activité de débranchement et dépourvues d'activité amylasique. Les activités contenues dans ces fractions ont été dosées par zymogrammes en conditions dénaturantes. L'ensemble des fractions a été utilisé afin de déterminer leur capacité à digérer différents substrats : l'amylopectine de maïs, le glycogène et le pullulan (figure 31).

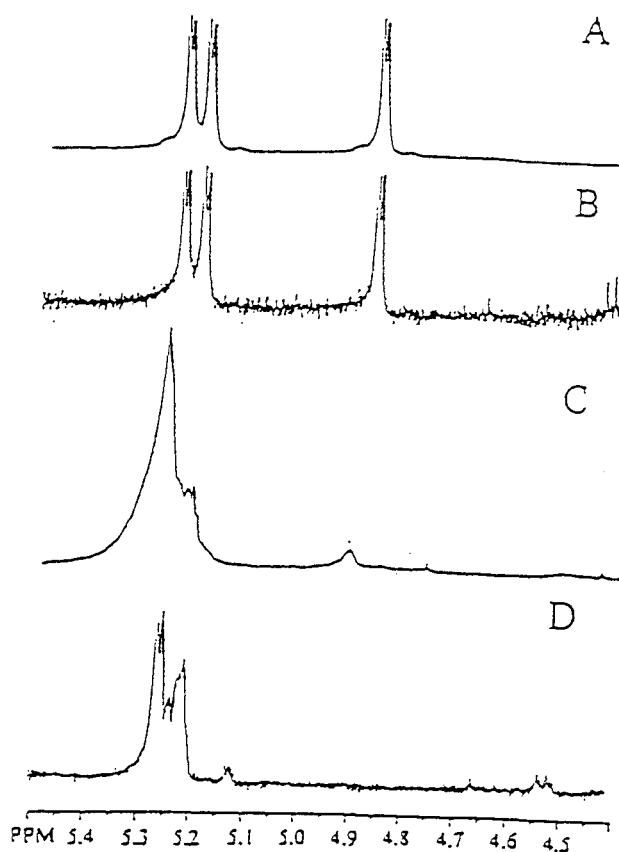


Figure 31 : Détermination de la spécificité de l'enzyme de débranchement de 88 kD. Spectre RMN du ^1H des produits d'hydrolyse.

- Pullulan.
- Pullulan incubée 24 h en présence d'enzyme de débranchement partiellement purifiée.
- Amylopectine.
- Amylopectine incubée 24 h en présence d'enzyme de débranchement partiellement purifiée

Les 4,5% de points de branchement de l'amylopectine ont complètement disparu après action de la fraction protéique. Au contraire aucun signal correspondant à des extrémités réductrices n'est apparu après incubation du pullulan. Ce dernier a donc été débranché à un taux inférieur à 2% (1% étant le seuil de détection de cette technique). Cette **enzyme de débranchement** peut donc être qualifiée d'**isoamylase**.

Les souches porteuses d'une **mutation *sta7*** ont une **défectuosité en une activité isoamylasique**. Celle-ci a pour conséquence **l'effondrement de la quantité d'amidon accumulée et l'apparition d'un polysaccharide soluble**. **L'association de ce phénotype à l'altération d'une enzyme hydrolytique** que l'on pensait jusqu'il y a peu impliquée dans le catabolisme des polysaccharides, est surprenante. Il convenait donc de déterminer si ces mutants présentaient d'autres altérations majeures d'activités enzymatiques connues pour être impliquées dans la biosynthèse de l'amidon.

IV. Les activités enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'amidon chez les souches porteuses d'une mutation au locus *STA7*

Diverses activités enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'amidon ont été quantifiées dans les souches mutantes. De plus, nous avons examiné les activités dans des produits de méiose sauvages et mutants obtenus par croisement. Ceci nous permet de corréler un éventuel effet mesuré à la présence de la mutation *sta7*.

A. Etude enzymologique de ségrégeants

1. La phosphoglucomutase

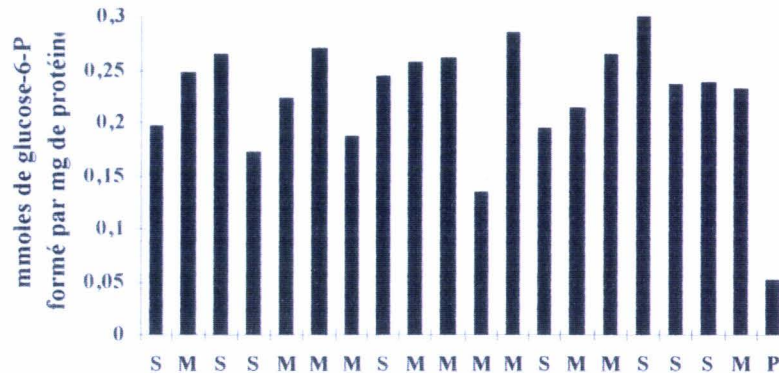


Figure 32 : Dosage de la phosphoglucomutase.

Dosage d'extraits bruts des 22 ségrégeants, M : souches mutantes, S souches sauvages, P : souche défectueuse en phosphoglucomutase.

Aucune déficience significative en phosphoglucomutase ne semble coségrégérer avec la mutation *sta7*.

2. L'ADP-glucose pyrophosphorylase

Ce dosage nécessite une étape de chromatographie et n'a donc été effectué que sur un effectif de 9 ségrégeants.

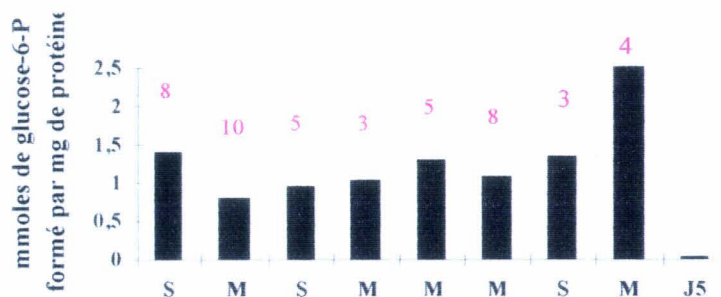


Figure 33 : Dosage de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

Dosage d'extraits de 9 ségrégeants et de la souche BAFJ5 (J5) : une souche porteuse d'une déficience pour la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (*sta6-1::ARG7*).

Facteur d'activation par l'acide-3-phosphoglycérique.

Aucune altération de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase n'a été mise en évidence, tant au niveau de l'activité qu'au niveau du facteur d'activation par l'acide-3-phosphoglycérique.

En conclusion, la **diminution importante de la quantité d'amidon** dans les mutants ne peut **pas s'expliquer par une chute de la production de nucléotide-sucres précurseur**.

3. Les phosphorylases et les amidon synthétases solubles

La technique de zymogramme, choisie pour doser ces activités enzymatiques, est plus fiable quantitativement et permet une meilleure différenciation de la SSSI et de la SSSII que le dosage d'un extrait brut. De même, elle permet de différencier deux formes de phosphorylase. L'amidon synthétase soluble II produit des bandes multiples d'intensité variable selon les extraits. Ces bandes correspondent à des isoformes de la même enzyme. En effet, l'altération du gène *STA3*, présumé gène de structure de cette SSSII, provoque la disparition de l'ensemble de ces bandes (Fontaine et coll., 1993). La SSSI, quant à elle, apparaît sous l'aspect d'une bande unique de poids moléculaire plus faible.

Les phosphorylases présentent un profil plus simple composé de deux bandes de teintes différentes. Aucun mutant défectueux pour cette activité n'a été isolé chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les différences de teintes pourraient s'expliquer par la comigration d'une enzyme de branchement avec une des phosphorylases.

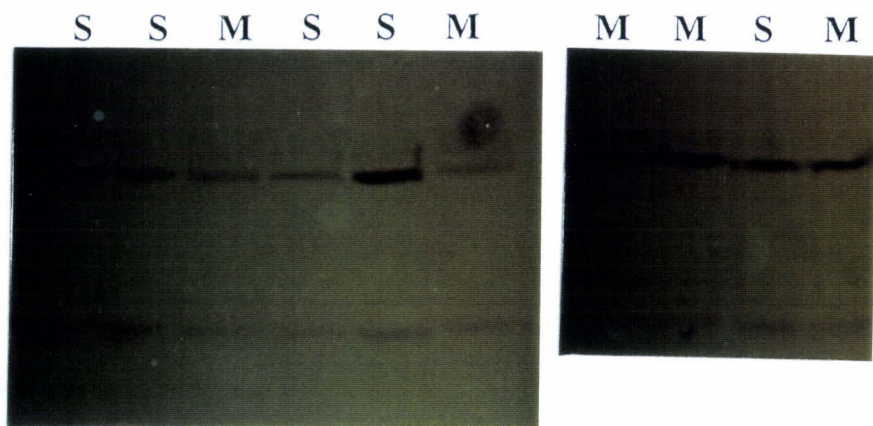
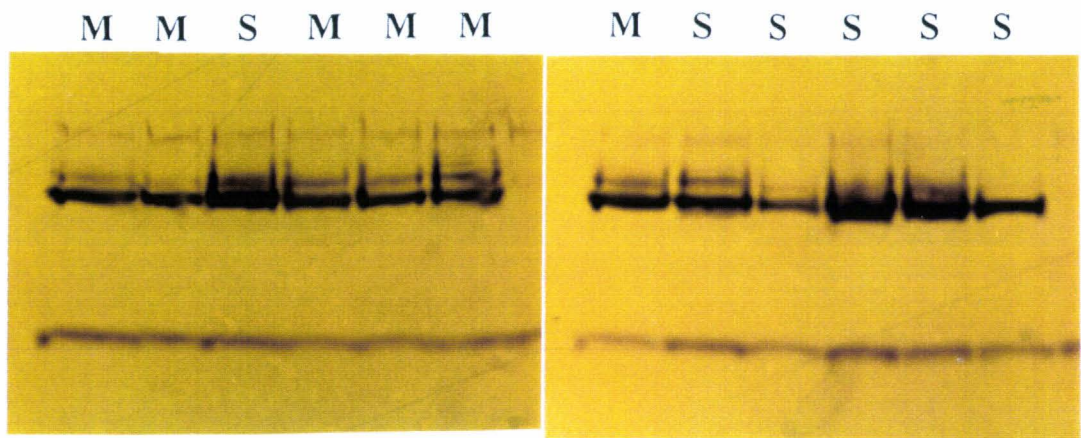


Figure 34 : Zymogrammes d'activités amidon-synthétases solubles.
Analyse des extraits bruts de 22 ségrégeants en conditions dénaturantes.

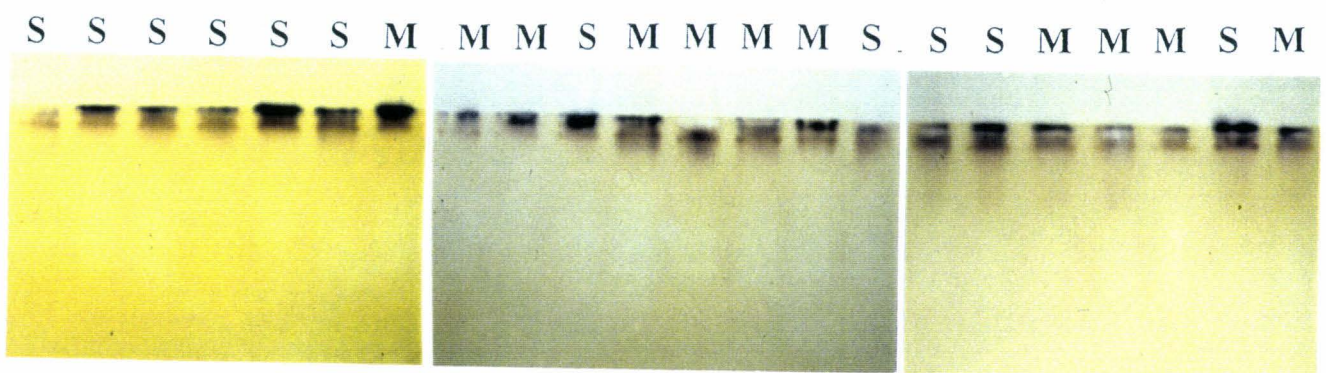


Figure 35 : Zymogrammes d'activités phosphorylases.
Analyse des extraits bruts de 22 ségrégeants en conditions natives.

Aucune altération des profils de ces enzymes en zymogramme ne semble coségrégier avec la mutation. Nous pouvons conclure que **les mutants ne présentent pas de défectuosité pour les amidon-synthétases ou les phosphorylases.**

4. Les enzymes de branchement

La technique de zymogramme a de nouveau été préférée au dosage d'extrait brut pour quantifier les enzymes de branchement. Comme dans le cas des amidon-synthétases, cette technique diminue les interférences que peuvent engendrer les activités hydrolytiques et permet surtout de visualiser les différentes enzymes de branchement présentes. Les premiers zymogrammes effectués sur les mutants d'origine n'avaient révélé aucune modification de ces activités. Cependant, cette étude sur 22 ségrégeants fait apparaître la présence, dans l'ensemble des mutants, d'une activité de branchement supplémentaire en haut du gel (figure 36). Cette activité n'est pas ou très faiblement détectée dans les extraits bruts des souches sauvages.

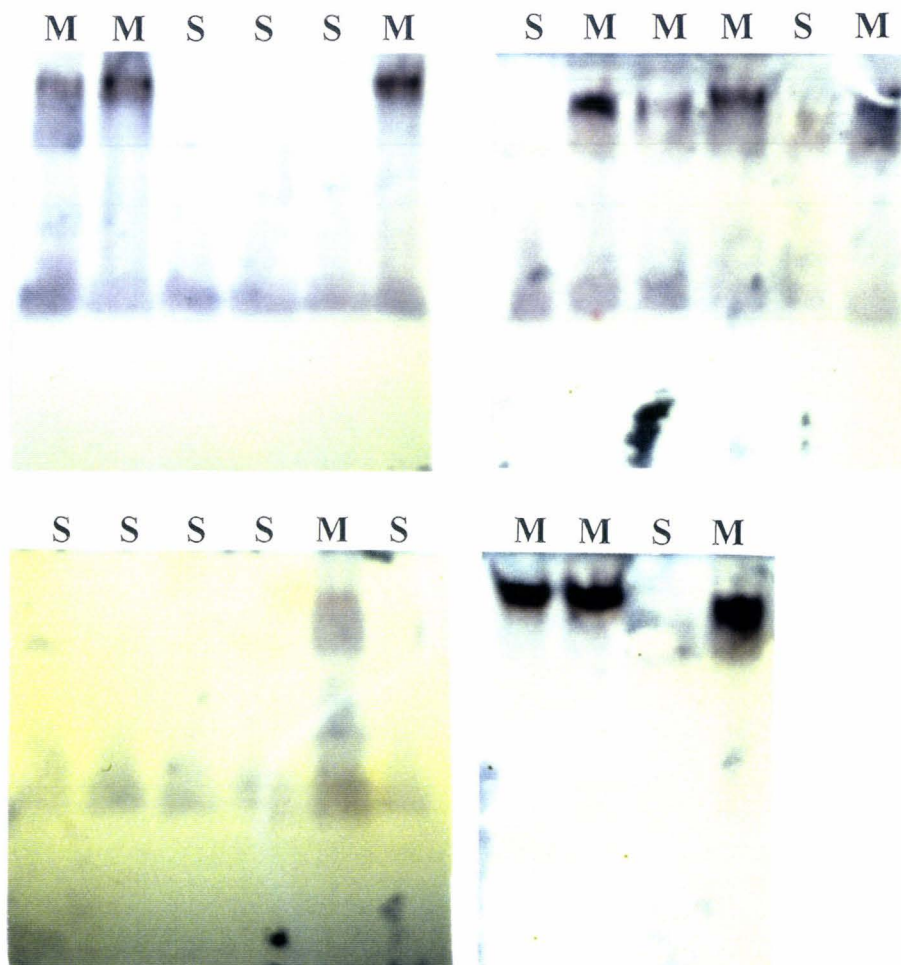


Figure 36 : Zymogrammes des activités de branchement.
Analyse des extraits bruts de 22 ségrégeants en conditions natives.

La seule différence expérimentale entre cette étude et l'étude antérieure sur les mutants d'origine provient de l'ajout de DTT 20 mM dans le mélange réactionnel de ce zymogramme. En effet, celui-ci augmente la sensibilité de la technique, du fait de son action positive probable sur la phosphorylase. Or, le DTT est un fort activateur de l'enzyme de débranchement. L'absence ou la faiblesse de cette activité de branchement dans la souche sauvage pourrait donc s'expliquer par sa comigration, en conditions natives, avec l'enzyme de débranchement. Dans l'extrait brut de la souche sauvage, le polysaccharide produit par l'enzyme de branchement serait hydrolysé par l'enzyme de débranchement présente. L'absence de celle-ci dans les mutants aurait donc pour effet d'amplifier la détection de cette enzyme de branchement.

B. Les enzymes de branchement de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Les résultats des zymogrammes des enzymes de branchement et les données concernant l'enzyme de branchement du phytoglycogène, décrite dans l'introduction (cf. page 24), nous ont incité à approfondir l'étude de ces transférases dans ces mutants. Deux étapes chromatographiques de purification se sont avérées nécessaires pour l'obtention de résultats satisfaisants.

La purification comporte une première chromatographie de tamisage moléculaire. Deux pics majeurs A et B sont détectés dans les deux souches. Les activités de branchement contenues dans le pic B se sont révélées insuffisamment stables lors de leur conservation pour permettre une étude approfondie. Le pic A a pu être analysé en chromatographie d'échange d'anions. L'étude des caractéristiques de ces enzymes de branchement dans la souche sauvage et dans les mutants a fait l'objet du travail de DEA de Virginie Mestre (1997).

L'étude des enzymes de branchement d'une souche sauvage (330) et de la souche S porteuse de la mutation *sta7-4::ARG7* démontre clairement la détection d'une enzyme de branchement

supplémentaire dans le mutant. Cependant, cette activité se situe (figure 37) dans les fractions qui contiennent l'enzyme de débranchement dans la souche sauvage. Ceci conforte l'hypothèse, suggéré lors de l'analyse par zymogramme, du « masquage » de cette activité de branchement par une activité de débranchement. De plus, ces différentes enzymes de branchement produisent, en présence d'amylose, un polysaccharide de même λ_{max} (530 nm) (figure 37). Aucune d'elles n'entraîne la production d'un polysaccharide de λ_{max} inférieur à 500 nm.

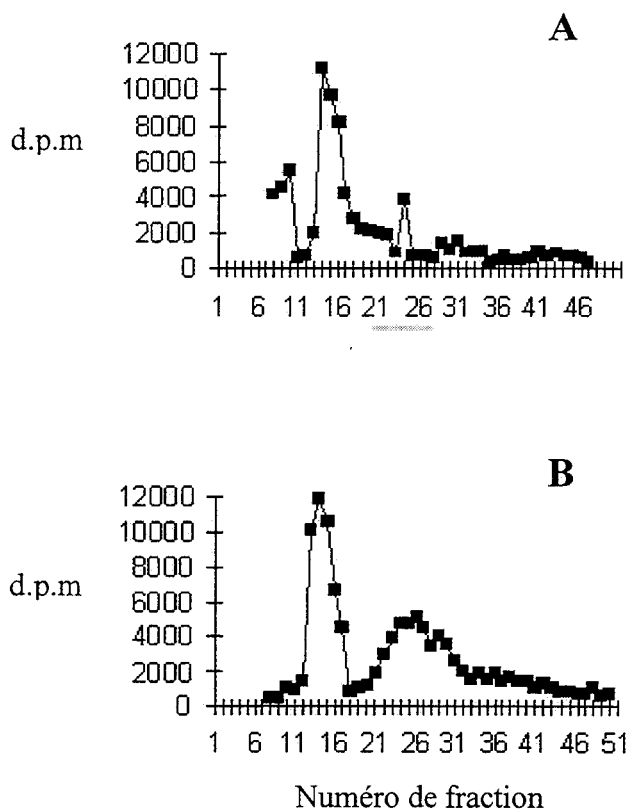


Figure 37 : Séparation d'activités de branchement par chromatographie d'échange d'anions (MonoQ).

A) Souche sauvage 330.

B) Souche mutante S.

□ : localisation de l'activité de débranchement de 88 kD.

Ces résultats confirment l'absence d'altération des activités de branchement dans les mutants, de même que l'absence d'enzyme de branchement du phytyglycogène telle

que celle décrite par Lavintman et coll. (1964) ou Hodges et coll. (1969). De plus, ils suggèrent que l'existence de l'enzyme de branchement du phytoglycogène détectée chez le maïs pourrait également être artéfactuelle.

Discussion

Discussion

Du glycogène à l'amidon

Le maïs doux porteur de la mutation *sugary1* produit une quantité réduite d'amidon enrichi en amylose et accumule du phytoglycogène. L'existence d'un tel cultivar de maïs a suscité l'élaboration de différents modèles tentant d'expliquer la biosynthèse de l'amylopectine.

En 1958, Erlander suggéra que le glycogène était précurseur de la synthèse de l'amylopectine du fait de son taux de branchement plus élevé. Il proposa alors un modèle impliquant **une déramification du glycogène conduisant à la formation d'amylopectine**. Le principal objet de ce modèle était d'expliquer la biosynthèse simultanée, *in vivo*, de l'amylopectine et de l'amylose. Selon lui, les chaînes générées par la déramification du glycogène seraient mises bout à bout pour former des molécules d'amylose.

Ce modèle ne respecte pas les données structurales récentes selon lesquelles l'amylopectine et glycogène diffèrent non seulement par leurs taux de branchement, mais surtout par la répartition des points de branchement. **En effet, la simple déramification du glycogène ne peut entraîner une telle réorganisation des points de branchement**. Par ailleurs, nos connaissances de la biosynthèse de l'amylose ne concordent aucunement avec le modèle de biosynthèse proposé.

Considérer le **glycogène comme le produit d'un dysfonctionnement du métabolisme de l'amidon** semble plus conciliable avec les structures respectives de ces polysaccharides.

Cette hypothèse a donc été délaissée jusqu'à la mise en évidence, par Pan et Nelson en 1984, d'une défectuosité en une activité pullulanase dans le maïs doux. La synthèse de

l'amylopectine résulterait, selon les auteurs, **d'un équilibre entre activités de branchement et de débranchement**. La diminution de la quantité de phytoglycogène produite par les maïs porteurs de la mutation *ae* dans un fond génétique *sul* conforte cette hypothèse, puisque le gène *Ae* encode une enzyme de branchement. Cependant, **le rétablissement de cet équilibre dans le double mutant ne restaure pas une quantité d'amidon normale**. Or, c'est l'effet que devrait avoir cette mutation si l'on considère l'hypothèse de Pan et Nelson. De plus, les souches diploïdes hétérozygotes pour la mutation *sta7* ne produisent pas de phytoglycogène et accumulent une quantité d'amidon normale. Or, si l'on imagine un équilibre entre débranchement et branchement, **l'absence d'une copie du gène *STA7* dans ce diploïde devrait engendrer un déséquilibre provoquant une diminution de la quantité d'amidon et l'accumulation de phytoglycogène**.

L'épissage des glucanes: une étape clef de la biosynthèse de l'amylopectine

Les mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* au locus *STA7* ne peuvent être assimilés à l'équivalent unicellulaire du maïs doux. En effet, ils produisent une quantité d'amidon très réduite comparativement à celle du mutant de maïs et démontre par conséquent le rôle majeur de l'enzyme de débranchement dans la biosynthèse de l'amylopectine. Ils nous est apparu intéressant d'introduire cette étape de débranchement dans un schéma de biosynthèse de l'amylopectine que l'on sait incomplet. Ce modèle de biosynthèse discontinu de l'amylopectine (figure 38) a fait l'objet de la réflexion et de la concertation de plusieurs groupes (Ball et coll. 1996) impliqués dans l'étude de la biosynthèse et de la structure fine de l'amidon.

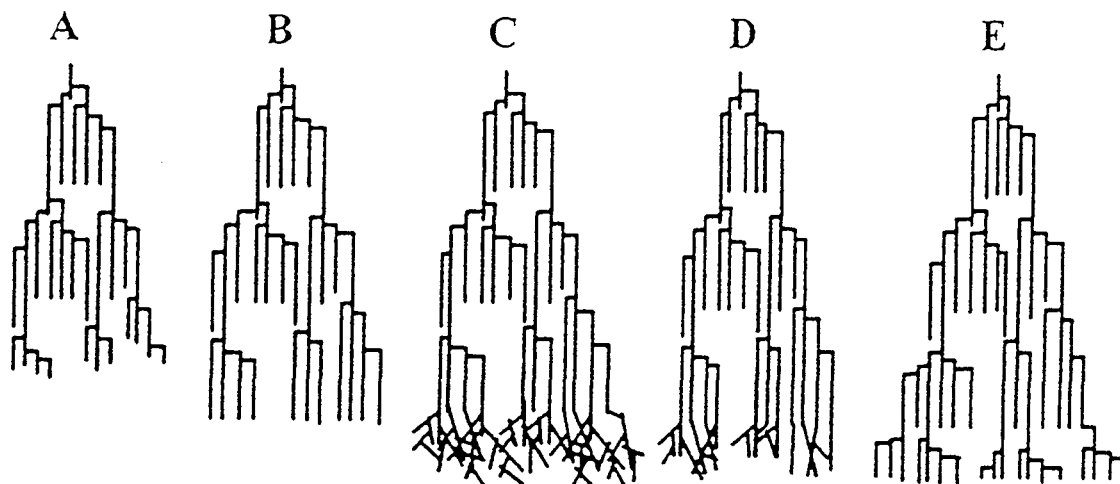


Figure 38 : Modèle discontinu de synthèse de l'amylopectine (Ball et coll., 1996).

Lorsque les chaînes de la lamelle amorphe en élancement atteignent la taille minimale requise à l'action des enzymes de branchement (A-B) la ramification s'effectue simultanément au débranchement sélectif des points créés (C-D). L'action concertée de ces enzymes prévient la formation de phytoglycogène et engendre une zone où les points de branchement sont très proches les uns des autres et où les enzymes d'élancement interviennent pour la formation d'une nouvelle grappe (E-A). Selon ce modèle, l'absence d'épissage a pour conséquence l'accumulation d'un polysaccharide hyperramifié tel que le phytoglycogène. Ce polysaccharide n'existe pas en conditions normales. Toutefois un polymère hybride appelé préamylopectine existerait de manière transitoire (C).

L'élancement dans le modèle

Ce modèle fournit aux 2 synthétases présentes chez *Chlamydomonas reinhardtii* un rôle en accord avec leur spécificité respective. En effet, *in vitro*, la SSSI a une activité optimale sur le glycogène, alors que la SSSII a une activité optimale sur l'amylopectine. La SSSI serait responsable de l'élancement des chaînes de la préamylopectine (C). Par contre, la SSSII interviendrait dans l'élancement des chaînes de la lamelle cristalline (A-B). Ces hypothèses sont compatibles avec la structure de l'amylopectine produite par la souche

défectueuse pour la SSSII (*STA3*). De plus, les souches porteuses de triple mutation *sta7sta2sta3* produisent une quantité de phytoglycogène normale (David Dauvillee communication personnelle). Par conséquent, la **SSSI**, seule synthétase restante dans ces mutants, **serait bien responsable de l'élongation des chaînes de la préamylopectine.**

Enzymes de branchement et phytoglycogène

Suite à la définition du gène *Sugary1*, James et coll. (1995) proposent l'existence d'un complexe multi-enzymatique. L'enzyme de débranchement encodée par le gène *Sul* serait associée à une enzyme de branchement et à une amidon-synthétase. Ces trois enzymes fonctionneraient simultanément pour former une molécule d'amylopectine. L'altération de la protéine *SUI* aurait pour conséquence une modification de ce complexe multi-enzymatique dont le dysfonctionnement entraînerait la production de phytoglycogène. Ceci permet à James et coll. d'introduire une explication à la production de ce polysaccharide hyperramifié.

En effet, *in vitro* et en présence d'amylose, les enzymes de branchement ne peuvent produire un polysaccharide dont la distribution en longueur de chaînes s'apparenterait à celle du glycogène. Cependant, dans **le maïs doux aucune défectuosité en enzyme de branchement n'a pu être clairement établie.** De même, **les mutants porteurs de la mutation *sta7* ne présentent aucune altération du fonctionnement de l'enzyme *in vitro* et en présence d'amylose.**

Guan et coll. ont démontré, qu'en présence d'amylose, l'enzyme de branchement du glycogène produit un polysaccharide similaire au glycogène. Ceci suggère que cette enzyme de branchement joue un rôle majeur dans la distribution en longueur des chaînes du polysaccharide et dans celle des point de branchements. **Les enzymes de branchement des plantes contribuent probablement à l'élaboration de phytoglycogène.** *In vitro*, L'absence de synthèse de ce polysaccharide par ces enzymes à partir de l'amylose peut s'expliquer **par le**

fait que le substrat auquel elles ont accès, *in vivo*, ne correspond pas à l'amylose. En effet, Guan et coll. ont montré que le substrat peut influencer la nature du produit synthétisé par les enzymes de ramification. De même, l'interaction des enzymes de branchement végétales avec les amidons-synthétases pourrait aussi conduire à l'élaboration de phytoglycogène.

L'analyse génétique des génotypes de maïs *aesul* suggère que l'enzyme de branchement de **type II (SBEII) est responsable de la biosynthèse du polysaccharide hyperramifié.** Ceci concorde avec les spécificités respectivement attribuées aux SBEI et SBEII. Cependant, le mécanisme de synthèse engendrant cette distribution des points de ramification reste un sujet de controverse.

Pullulanase ou isoamylase ?

L'**épissage** de glucanes invoqués dans ce modèle (figure 38D) **ne nécessite pas une spécificité particulière de l'enzyme de débranchement.** Cependant, il implique que cette enzyme de débranchement soit de type **isoamylasique**, puisque la structure épissée présente un agencement des points de branchement analogue à celui du glycogène. La cinétique de clivage de ces activités suffit à expliquer l'épissage préférentiel de ces points de branchement. En effet, l'isoamylase digère plus efficacement le glycogène que l'amylopectine. La déféctuosité en isoamylase décrite dans les souches porteuses de la mutation *sta7*, de même que les propriétés attribuées à l'enzyme encodée par la gène *Sugary1*, sont en accord avec ce principe. Les déféctuosités en pullulanase décrites pour le maïs ou le riz pourraient s'expliquer par une interdépendance des activités isoamylases et pullulanases *in vivo*.

L'épissage un mécanisme multifonctionnel ?

La caractérisation de **nouveaux mutants producteurs de phytyglycogène** a suggéré que le **modèle de biosynthèse discontinu de l'amylopectine**, développé ici, est **incomplet** et implique **d'autres mécanismes et des activités enzymatiques nouvelles**. Il existe, en effet, 3 nouveaux loci en cours d'étude dont l'altération entraîne l'apparition de phytyglycogène et la diminution, dans des proportions variables, de la quantité d'amidon accumulé. Un minimum de **trois fonctions spécifiques semble donc requis à un épissage correct**. Aucune de ces souches ne présente de déféctuosité en une des enzymes couramment décrites dans le métabolisme de l'amidon.

En conclusion et d'un point de vue évolutif, la biosynthèse de l'amidon semble postérieure à celle du glycogène et le modèle suggéré conforte ce principe. De plus, cette étude révèle que la simple intervention d'une enzyme, préexistante dans le métabolisme du glycogène, peut entraîner la production d'un polymère de glucose très différent, lorsqu'elle agit dans un mécanisme non plus de catabolisme mais d'anabolisme.

Ainsi, au cours de l'évolution des espèces, la simple modulation d'expression ou la compartimentation de certaines activités enzymatiques pourrait expliquer l'élaboration d'un polysaccharide plus complexe que le glycogène et plus adéquat pour les cellules végétales eucaryotes.

Références Bibliographiques

- Ayers, J.E., and Creech, R.G.** (1969) Genetic Control of Phytoglycogen Accumulation in Maize (*Zea Mays* L.). *Crop Science* **9**, 739-741.
- Ball, S.G., 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 for the Biogenesis of the plant Starch Granule. *Cell* **86**, 349-352.
- Ball, S.G., Marianne, T., Dirick, L.,Fresnoy, M., Delrue, B., and Decq, A.** (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17-26.
- Banks, W., Greenwood, C.T., and Khan, K.M.** (1971) The Interaction of Linear, Amylose Oligomers with Iodine. *Carbohydr. Res.* **17**, 25-33.
- Beck, E., Ziegler, P.** (1989). Biosynthesis and degradation of starch in high 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 synthèse de l'amidon. Thèse doctorale, Université de Technologie de Compiègne.
- Bhattacharya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.H.N., Hedley, C., and Martin, C.** (1990) The wrinkled-seeded character of peas described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch branching enzyme. *Cell* **60**, 115-122.
- Black, R.C, Loerch, J.D., McArdle, F.J., and Creech, R.G.** (1966) Genetic interactions affecting maize phytoglycogen and the phytoglycogen-forming branching enzyme. *Genetics* **53**, 661-668.
- Boyer, C.D., and Preiss, J.** (1978a) Multiple forms of (1,4)- α -D-glucan, (1,4)- α -D-glucan-6-glycosyl transferase from developing *Zea mays* L. kernels. *Carbohydr. Res.* **61**, 321-334.
- Boyer, C.D., and Preiss, J.** (1978b) Multiple forms of starch branching enzyme of maize evidence for independent genetic control. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **80**, 1169-175.

- Boyer, C.D., and Preiss, J.** (1981a) Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzyme and starch synthases. *Plant Physiol.* **67**, 1141-1145.
- Boyer, C.D, Damewood, P A., and Simpson, E.K.G.** (1981b) The Possible Relationship of Starch and Phytoglycogen in Sweet Corn. I Characterization of Particulate and Soluble Polysaccharides. *Starch* **34**, 81-85.
- Boyer, C.D, Simpson, E.K.G., and Damewood, P.A.** (1982) The Possible Relationship of Starch and Phytoglycogen in Sweet Corn. II The Role of Branching Enzyme I. *Starch* **34**, 81-85.
- Boyer, C.D., and Liu, K.C.** (1985) The interaction of endosperm genotype and genetic background. 1. Differences in chromatographic profiles of starches from nonmutant and mutant endosperms. *Starch* **37**, 73-.
- Buléon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossman, J., and Ball, S.** (1997). Starches from A to C: *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.* In Press.
- Buttrose, M.S.** (1962). The Influence of environment on the shell structure of starch granules. *J. Cell. Biol.* **14**, 159-167.
- Colonna, P., and Mercier, C.** (1984) Macromolecular structure of wrinkled- and smooth-pea starch components. *Carbohydr. Res.* **126**, 233-247.
- Creech, R.G.** (1965) Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics* **52**, 1175-1186.
- Creech, R.G., and McArdle, F.J.** (1966) Gene Interaction for Quantitative Changes in Carbohydrates in Maize Kernels. *Crop. Science* **6**, 192-194.

- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Van Den Koornhuysse, N., Maddelein, M.L, Fournet, B., and 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.
- Doehlert, D.C., and Knutson, C.A.** (1991) Two Classes of Starch Debranching Enzymes from Developing Maize Kernels. *J. Plant Physiol.* **138**, 566-572.
- Doehlert, D.C., and Kuo, T.M.** (1993) Characteristics of Carbohydrate Metabolism in Sweet Corn (*sugary-1*) Endosperms. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **118 (5)**, 661-666.
- Eriksson, G.** (1969) *Hereditas.* **63**, 180-204.
- Erlander, S., R.** (1958) A proposed mechanism for the synthesis of starch from glycogen. *Enzymologia* **XIX, 5**, 273-283.
- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.L, Routier, F., Marianne-Pépin, T., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Delrue, B., Van Den Koornhuysse, N., Bossu, J.P., Fournet, B., and Ball, S.G.** (1993) Towards an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem* **268**, 16223-16230.
- Gabriel, O., and Gersten, D. M.** (1992). Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis, I. *Anal. Biochem.* **203**, 1-21.
- Gidley, M.J.** (1992) Structural order in starch granules and its loss during gelatinisation. *Gums and Stabilisers In Food Industry 6*, ed GO Phillips, PA Williams, DJ Wedlock, 87-92. Oxford IRL.
- Guan, H.P., Kuriki, T., Sivak, M.,Preiss, J.** (1995) Maize branching enzyme catalyses synthesis of glycogen-like polysaccharide in *glgb*-deficient *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 964-967.

Guan, H.P, Ping, L., Imparl-Radosevich, J., Preiss, J., and Keeling, P. (1997) Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics **342**, 92-98..

Harris, E.H. (1989) The *Chlamydomonas* Sourcebook. A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Academic Press San Diego.

Henson, C.A. and Sun, Z. (1995) Barley Seed α -Glucosidases: Their Characteristics and Roles in Starch Degradation. Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates. Chapter 4. American Chemical Society.

Hizukuri, S. (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. Carbohydr. Res. **147**, 342-347.

Hodges, H.F., Creech, R.G., and Loerch, J.D. (1969) Biosynthesis of phytoglycogen in maize endosperm; the branching enzyme. Biochim. Biophys. Acta. **185**, 70-79.

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 amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.).Theor. Appl. Genet. **75**, 217-221.

Ikawa, Y., Glover, D.V., Sujimoto, Y., and Fuwa, H. (1981) Some structural characteristics of starches of maize having a specific genetic background. Starch **33**, 9.

Imberty, A., Buléon, A. Tran, V., and Pérez, S. (1991) Recent advances in knowledge of starch structure. Starch **43**, 375-384.

Ishizaki, Y., Taniguchi, H., Maruyama, Y, and, Nakamura, M. (1983) Debranching Enzymes of Potato Tubers (*Solanum tuberosum* L.). I. Purification and Some Properties of Potato Isoamylase. Agric. Biol. Chem. **47**, 771-779.

James, M.G., Robertson, D.S., and Myers, A.M. (1995) Characterization of the Maize Gene *sugary1*, a Determinant of Starch Composition in Kernels. The Plant Cell **7**, 417-429.

- Jane, J. Xu, A. Radosavljevic, M. Seib, PA.** (1992) Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linking reagents. *Cereal Chem.* **69**, 405-409.
- Jenkins, P.J., Cameron, R.E., Donald, A.M.** (1993) A universal feature in the structure of starch granules from different botanical sources. *Starch* **45**, 417-420.
- Jenkins, P.J., Donald, A.M.** (1995) The influence of amylose on starch granule structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **17**, 315-321.
- Kainuma, K., Kobayashi, S., and Harada, T.** (1978) Action of *Pseudomonas* Isoamylase on various branched oligo- and poly-saccharides. *Carbohydr. Res.* **61**, 345-357.
- Kainuma, K.** (1988) The structure and chemistry of the starch granule. In the *Biochemistry of Plants 14 Carbohydrates*, J. Preiss, ed (San Diego: Academic Press) 141-180.
- Lacks, S.A., and Springhorn, S.S.** (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* **255**, 7467-7473.
- Lavintman, N., and Krisman, C.R.** (1964) The alpha-glucan-branching glycosyltransferase of sweet corn. *Biochim. Biophys. Acta.* **89**, 193-196.
- Lavintman, N.** (1966) The formation of Branched Glucans in Sweet Corn. *Archives of biochemistry and biophysics* **116**, 1-8.
- Lee, E.Y., Marshall, J.J., and Whelan, W.J.** (1971a) The Substrate Specificity of Amylopectin-Debranching Enzymes from Sweet Corn. *Archives of biochemistry and biophysics* **143**, 365-374.
- Lee, E.Y.C, Whelan, W.J.** (1971b) Glycogen and Starch Debranching Enzymes. In *The Enzymes*, P. Boyer, ed (New-York: Academic Press), 191-234.
- Li, B., Servaites, J. C., and Geiger, D.R.** (1992) Characterization and Subcellular Localization of Debranching Enzyme and Endoamylase from Leaves of Sugar Beet. *Plant Physiol.* **98**, 1277-1284.

- Libessart, N., Maddelein, M.L, Van Den Koornhuysse, N., Decq, A., Delrue, B., Mouille, G., D'Hulst, C., and Ball, S.G.** (1995) Storage, photosynthesis and growth: The conditional nature mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell* **7**, 1117-1127.
- Lin, T.P, Caspar, Y., Somerville, C., and Preiss, J.** (1988) Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**, 1131-1135.
- Ludwig, I., Ziegler, P., and Beck, E.** (1984) Purification and Properties of Spinach Leaf Debranching Enzyme. *Plant Physiol.* **74**, 856-861.
- 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) Towards an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of the granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 25150-25157).
- Manners, D.J., Rowe, J.J.M., and Rowe, K.L.** (1968) Studies on carbohydrate-metabolising enzymes. Part XIX. Sweet-corn branching enzymes. *Carbohydr. Res.* **8**, 72-81.
- Manners, D.J., and Rowe, K.L.** (1969) Studies on carbohydrate-metabolising enzymes. Part XX. Sweet-corn debranching enzymes. *Carbohydr. Res.* **9**, 107-121.
- Manners, D.J.** (1985) Some Aspects of the Metabolism of Starch. *Cereal Food World* **30**, 722-727.
- Manners, D.J.** (1989) Recent Developments in our Understanding of Amylopectin Structure. *Carbohydr. Polymers* **11**, 87-112.
- Manners, D.J.** (1997) Observations on the Specificity and Nomenclature of Starch Debranching Enzymes. *J. Appl. Glycosci.* **44**, 83-85.
- Martin, C., and Smith, A.M.** (1995) Starch Biosynthesis. *The Plant Cell.* **7**, 971-985.

- Morris D.L., and Morris C.T** (1939) Glycogen in the seeds of *Zea Mays* (Variety Golden Bantam). *J. Biol. Chem.* **130**, 535-544.
- Müller-Röber, B., 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.
- Murata, T., Sugiyama, T., and Akazawa, T.** (1965) Enzymic mechanism of starch synthesis in glutinous rice grains. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **18**, 371-376.
- Nakamura, Y.** (1996) Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Science* **121**, 1-18.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E., and Satoh, H.** (1996a) Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations. Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiol. Plant.* **97**, 491-498.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Ogata, N., Kuboki, Y., Yano, M., and Sasaki, T.** (1996b) Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. *Planta*
- Nelson, O.E., and Rines, H.W.** (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **9**, 297-300.
- Oostergetel, G.T., Van Bruggen, E.F.J.** (1993) The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohydr. Polym.* **21**, 7-12.
- O'Shea, M.G., and Morell, M.K.** (1996) High resolution slab gel electrophoresis of 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) tagged oligosaccharides using a DNA sequencer. *Electrophoresis* **17**, 681-688.
- Ozbun, J.L., Hawker, J.S., and Preiss, J.** (1971). Adenosine diphosphoglucose starch glucosyl transferase from developing kernels of Waxy maize. *Plant Physiol.* **48**, 765-769.

- Pan, O., and Nelson, O.E.** (1984) A Debranching Enzyme Deficiency in Endosperms of the *Sugary-1* Mutants of Maize. *Plant Physiol.* **74**, 324-328.
- Rochaix, J., Mayfield, S., Goldschmith-Clermont, M., and Erickson, J.** (1991) Molecular biology of *Chlamydomonas*. In *Plant Molecular Biology: a practical approach*, 253-275, ed. Shaw C., IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Saha, B.C., Mathupala, S.P., and Zeikus, J.G.** (1988) Purification and Characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. (1988) *Biochem. J.* **252**, 343-348.
- Saha, B.C., Mathupala, S.P., and Zeikus, J.G.** (1991) Comparison of Amylopullanase to α -Amylase and pullulanase. *Enzymes in Biomass Conversion Chapter 27*. American Chemical Society.
- Sambrooks, J., Fritsch, E.F, and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. 2 Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shannon, J.C., and Garwood, D.L.** (1984) Genetics and physiology of starch development. In *Starch: Chemistry and Technology*, R.L. Whistler, J.N. Bemiller, and E.F. Paschall, eds (Orlando, FL: Academic Press), 25-86.
- Smith, A.M., Bettey, M., and Bedford, I.D.** (1989) Evidence that the rb locus alters the starch contents of developing pea embryos through an effect on ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **89**, 1175-1181.
- Smith, A.M., and Martin, C.** (1993) Starch biosynthesis and the potential for its manipulation. In *Biosynthesis and Manipulation of Plant Products*, Plant Biotechnology Series, **3**, D. Grierson, ed (Glasgow: Blackie Academic and Professional Publishers) 1-54.
- Smith, A.M., Denyer, K., and Martin, C.** (1997). The Synthesis of the Starch Granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 67-87.

- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., and Kishore, G.M.** (1992) Regulation of the amount of starch in tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**, 287-292.
- Steup, M.** (1990) Starch Degrading Enzymes. in *Methods in Plant Biochemistry* **3**, 103-129.
- Stinard, P.S., Robertson, D.S., and Schnable, P.S.** (1993) Genetic isolation, cloning, and analysis of *Mutator*-induced dominant antimorph of the maize *amylose extender1* locus. *Plant Cell* **5**, 1555-1566.
- Sumner, J.B., and Somers G.F.** (1944) The Water-soluble polysaccharides of sweet corn. *Arch. Biochem.* **4**, 7-9.
- Sun, Z., and Henson, C.A.** (1991) A Quantitative Assessment of the Importance of Barley Seed α -Amylase, Debranching Enzyme, and α -Glucosidase in Starch Degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **284**, 298-305.
- Takeda, Y., Guan, H.P. and Preiss, J.** (1993) Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* **240**, 253-263.
- Thorn, W., and Mohazzeb, S.** (1990) α -D-polyglucane-iodine complexes. *Starch* **42**, 455-459.
- Toguri, T.** (1990) Changes of a Rice Debranching Enzyme during Seed Formation and Germination. *Plant Physiol.* **137**, 541-546.
- Tsai, C.Y., and Nelson, O.E.** (1966) Starch deficient mutant lacking adenosine disphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* **151**, 341-343.
- Van Den Koornhuysse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Preiss, J., and Ball, S.G.** (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16281-16287.

- Wang, Y.J., White, P., Pollack, L., and Jane, J.I.** (1993) Characterization of starch structures of 17 maize endosperm mutant genotypes with Oh43 inbred line background. *Cereal. Chem.* **70**, 171-179.
- Yamada, J.** (1981) Purification of Oat Debranching Enzyme and Occurrence of Inactive Debranching Enzyme in Cereals. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 1013-1015.
- Yamashita, M., Nakagawa, A., Katsuragi, N., and Murooka, Y.** (1992) Role of lipid modification on a starch-debranching enzymes, *Kebsiella* pullulanase: comparison of properties of lipid-modified and unmodified pullulanases. *Molecular Microbiology* **6**, 389-394.
- Yeh, J.Y., Garwood, D.L., and Shannon, J.C.** (1981) Characterization of starch from maize endosperm mutants. *Starch* **33**, 222.
- Yuno, M., Isono, Y., Satoh, H., and Omura, T.** (1984) Gene analysis of sugary and shrunken mutants of rice, *Oryza sativa* L. *Jpn. J. Breed.* **34**, 43-49.

Objectifs du travail de thèse	38
-------------------------------	----

Matériels et méthodes

I. Souches et conditions de culture	40
<i>A. Souches</i>	40
<i>B. Milieux et conditions de culture</i>	41
II. Analyse génétique	42
<i>A. Croisement</i>	42
<i>B. Caractérisation moléculaire</i>	44
III. Etude biochimique des polysaccharides	45
<i>A. Purification et séparation des constituants de l'amidon</i>	45
<i>B. Purification du polysaccharide soluble</i>	46
<i>C. Analyse de la distribution en longueur de chaînes des polysaccharides</i>	47
<i>D. Résonance Magnétique Nucléaire.</i>	49
IV. Etude enzymologique	49
<i>A. Dosages</i>	49
<i>B. Révélation d'activités par zymogramme</i>	51
<i>C. Purification enzymatique</i>	54

Résultats

I. Définition d'un nouveau locus impliqué dans la biosynthèse de l'amidon	56
<i>A. Découverte d'une nouvelle classe phénotypique</i>	56
<i>B. Récéssivité des mutations</i>	58
<i>C. Allélisme des mutations</i>	60
<i>D. Coségrégation des caractéristiques phénotypiques liées à la mutation</i>	62

<i>E. Analyse génétique du croisement</i>	64
II. Conséquences biochimiques de l'altération du gène <i>STA7</i>	68
<i>A. Caractérisation de la fraction polysaccharidique soluble</i>	68
<i>B. Nature du matériel insoluble produit par les mutants.</i>	75
III. Nature de la défektivité enzymatique du mutant au locus <i>STA7</i>	79
<i>A. Mise en évidence de l'absence d'une activité glucanohydrolytique.</i>	79
<i>B. Les mutants au locus <i>STA7</i> sont déficients en une enzyme de débranchement</i>	82
<i>C. Purification de l'enzyme de débranchement</i>	85
IV. Les activités enzymatiques impliquées dans la biosynthèse de l'amidon chez les souches porteuses d'une mutation au locus <i>STA7</i>	86
<i>A. Etude enzymologique de ségrégeants</i>	87
<i>B. Les enzymes de branchement de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.</i>	91
 Discussion	 95
 Références bibliographiques	 101

