

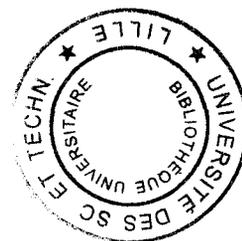
Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génétique Microbienne

présentée par

Christophe ZABAWINSKI



en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

L'ADP-glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii* : constitution, fonction et régulation.

Présentée le 21 septembre 1999, devant la commission d'examen composée de :

Président :	A. Verbert
Rapporteurs :	F.A. Wollman R. Matagne
Examineurs :	J. Preiss R. Schlichting S.G. Ball



REMERCIEMENTS



Je tiens tout d'abord à saluer notre directeur d'unité, M. le Professeur André Verbert, qui m'a permis d'effectuer ce travail, dans les meilleures conditions.

Je souhaiterais témoigner, tout particulièrement, ma reconnaissance, au professeur Steven Ball, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir fait confiance durant ces trois années. Merci, Chef, de m'avoir soutenu et de m'avoir permis une escale d'un an aux Etats-Unis et une autre de deux mois en Allemagne.

I would like to thank Dr Preiss to give me the opportunity to work in his lab. These ten months were wonderful scientifically and socially. My regards to the complete team : Mirta, Brian, Miguel, Hong, Ying-Bin, Kim, René and Nathalie. A special regard to Laurence, Jill, Claire, Mike and Raj who permit to me to live more than a scientific experience.

Mes remerciements également au professeur Giersch pour m'avoir reçu pour deux mois dans son laboratoire à l'Université de Darmstadt . Danke! (Mon allemand ne s'est pas amélioré...). Je remercie Ralf Schlichting pour son accueil chaleureux au sein de son équipe. Viele grüsse à Ralf S., Susan, Nils, Steffie, Jens et Ralf G. qui m'ont fait vivre deux mois très intense humainement.

Enfin, je remercie vivement tout le labo : Coco (alors quand te venges tu ?), David (et pas seulement pour les cigarettes), Greg (comment vas-tuyau de poêle ?), Brigitte (merci pour le coup de main), Christophe (itou), André (le roi de l'info). Bien sûr, je n'oublie pas Fab, Seb, Luc et Jean-Phi pour la bonne ambiance de tous les jours. Merci aussi à Jean-Marie pour ses conseils précieux. Pour faire plaisir à tout le monde, je remercie vivement Radio Campus qui a enchanté nos journées de travail.

Mes dernières pensées, qui me tiennent tout particulièrement à coeur, iront à ma famille et à Eva qui ont dû supporter mes absences avec une grande (très grande) patience.

RESUME

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, comme chez les végétaux supérieurs, la synthèse de l'ADP-glucose, catalysée par l'ADP-glucose pyrophosphorylase, représente l'étape majeure du contrôle du flux de carbone, dans la voie de biosynthèse de l'amidon.

Trois mutations dans deux loci distincts conduisent à l'altération de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.

Les mutations *sta1-1* (mutation aux rayons X) et *sta1-2::ARG7* (obtenue par insertion) aboutissent au même phénotype. L'enzyme devient insensible à son activateur allostérique, le 3-phosphoglycérate, mais reste sensible à l'inhibition par le phosphate inorganique. Ceci est suffisant pour réduire de 90 % la quantité d'amidon accumulé par les souches mutantes.

La mutation *sta6-1::ARG7* (obtenue par insertion) est responsable de l'effondrement de la synthèse d'amidon et, de la disparition de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.

L'ADNc de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase a précédemment été cloné. Nous avons, dans ce travail, cloné et séquencé l'ADNc complet de la petite sous-unité. Les deux sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii* sont apparentées à leurs homologues chez les plantes. Ce résultat confirme la validité de notre algue comme modèle pertinent pour la compréhension de la synthèse d'amidon chez les végétaux.

L'étude de l'expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, au cours d'un cycle jour/nuit (12h/12h), laisse supposer l'existence d'une régulation, par la lumière et/ou l'horloge circadienne, du gène de la petite sous-unité.

Une analyse génétique originale effectuée sur la descendance de zygotes triploïdes a permis de positionner les loci *STA1* et *STA6* sur un même groupe de liaison (le chromosome III) avec *STA6* lié à *NIT2*. La coségrégation entre les phénotypes des descendants déficients pour la synthèse d'amidon et les profils d'hybridation moléculaires spécifiques, révélés par les ADNc de la petite et de la grande sous-unité, nous amène à conclure que *STA1* et *STA6* codent respectivement la grande et la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

SUMMARY

ADP-glucose pyrophosphorylase of vascular plants and algae defines a major control point for the flux of carbon towards starch.

Two loci have been demonstrated to affect ADP-glucose pyrophosphorylase activity in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

The X-Ray induced allele *sta1-1* and the gene disruption *sta1-2::ARG7* obtained through insertional mutagenesis both yield the same phenotype. The enzyme has considerably reduced its sensitivity to 3-phosphoglycerate allosteric activation but has remained equally responsive to orthophosphate inhibition. This change is sufficient to account for a 90% downfall in starch content in the corresponding mutant strains.

The *sta6::ARG7* mutation obtained through insertional mutagenesis leads to a disappearance of both starch and ADP-glucose pyrophosphorylase activity.

A cDNA encoding the large subunit of the *Chlamydomonas* enzyme has been previously cloned and characterized. We now report the cloning and characterization of a cDNA encoding the small subunit of the enzyme. Both subunits are related to the corresponding genes from vascular plants confirming thus that *Chlamydomonas reinhardtii* defines a suitable model to understand higher plant starch metabolism.

Investigations performed on the mRNA abundance in synchronized cells grown in 12h day 12h night cycles are suggestive of a light or (and) a circadian clock regulated expression of the small-subunit gene.

An original genetic analysis performed after meiosis of triploid zygotes has positioned both *STA6* and *STAI* on the same linkage group (chromosome III) with *STA6* linked to *NIT2*. Cosegregation of all starch defective phenotypes with that of Southern blot specific hybridization patterns revealed by small and large subunit cDNAs prove that *STAI* and *STA6* encode respectively the large and small subunit of the *Chlamydomonas* ADP-glucose pyrophosphorylase.

ABREVIATIONS

3PG	3 phosphoglycéraldéhyde
3PGA	3-phosphoglycérate
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
ADP-Glc	adénosine diphospho-glucose
ADP-Glc PPase	ADP-glc pyrophosphorylase
AMP	adénosine monophosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASL	arginino-succinate lyase
ATP	adénosine triphosphate
BE	branching enzyme ou enzyme de branchement
Da	dalton
BET	bromure d'éthidium
DBE	debranching enzyme ou enzyme de débranchement
DEPC	diéthylpyrocarbonate
DHAP	dihydroxyacétone-phosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
DP	degré de polymérisation
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
F1,6P₂	fructose-1,6-bisphosphate
F2,6P₂	fructose-2,6-bisphosphate
F6P	fructose-6-phosphate
GBSS	granule bound starch synthase ou amidon synthétase liée au grain
G1P	glucose-1-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
G6PDH	glucose-6-phosphata déhydrogénase
HS	high salt
kb	kilo paires de base

kDa	kiloDalton
K_m	constante d'affinité
λ_{max}	longueur d'onde au maximum d'absorption
MES	acide morpholino-éthane-sulfonique
NAD(P)	nicotinamide adénosine (di)phosphate
PAB	acide para-amino benzoïque
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyéthylène glycol
PGI	phosphoglucoisomérase
PGM	phosphoglucomutase
P_i	phosphate inorganique
PLP	pyridoxal-5-phosphate
PP_i	pyrophosphate
ppm	parts pour million
SDS	sodium dodécyl sulfate
SS	soluble starch synthase ou amidon synthétase soluble
TBE	tris Borate EDTA
TP	transit peptide ou peptide de transit
Tris	tris-(hydrométhyl)-aminométhane
UDP-Glc	uridine diphosphoglucose
UDP-Glc PPase	UDP-Glc pyrophosphorylase
WSP	water soluble polysaccharide ou polysaccharide soluble dans l'eau

SOMMAIRE

<u>RESUME</u>	3
ABREVIATIONS	5

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION GENERALE

<u>1) LA STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE DU GRAIN D'AMIDON.</u>	12
1.1) L'amidon est composé de deux types de molécules aux propriétés physico-chimiques radicalement différentes.	12
1.1.1) L'amylose.	12
1.1.2) L'amylopectine.	13
1.1.3) Des structures différentes confèrent des propriétés physico-chimiques différentes.	13
1.2) Le grain d'amidon présente une structure cristalline très ordonnée.	13
1.3) Les constituants associés au grain d'amidon.	14
<u>2) LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON.</u>	15
2.1) La biosynthèse de l'amidon débute uniquement par la synthèse de l'ADP-glucose.	16
2.2) Existe-t-il une autre activité enzymatique limitante pour la synthèse d'amidon?	17
2.3) Existe-t-il une voie alternative pour la synthèse d'ADP-glucose ?	19
2.4) Les amidon-synthétases.	20
2.4.1) Les amidon-synthétases liées au grain d'amidon.	20
2.4.2) Les amidon-synthétases solubles.	21
2.5) Les enzymes de branchement.	23
2.6) L'action d'enzymes de débranchement est nécessaire à l'élaboration de la structure finale de l'amylopectine.	25
2.7) La dégradation de l'amidon.	26
2.7.1) Les enzymes coupant les liaisons glucosidiques α -1,4.	26
2.7.2) Les enzymes de débranchement hydrolysant les liaisons α -1,6.	27
<u>3) L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE.</u>	28
3.1) L'importance de la régulation allostérique de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.	28
3.2) La localisation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.	30

3.2.1) La localisation dans les tissus chlorophylliens.	30
3.2.2) La localisation dans les tissus de réserve.	31
3.2.3) La source de carbone utilisée et la localisation de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.	33
3.3) La structure de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.	35
3.4) Quels sont les sites catalytiques et les sites de régulation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase ?	36
3.5) Quelle est la fonction des deux sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase ?	38
3.6) L'association des deux sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.	39
3.7) Le contrôle de l'expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.	40
3.7.1) La régulation transcriptionnelle dans les organes de réserve.	40
3.7.2) Le contrôle allostérique de l'ADP-glucose pyrophosphorylase semble être la régulation dominante dans la feuille de pomme de terre.	41
3.8) L'expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase est spécifique du tissu.	41
<u>4) NOTRE MODELE D'ETUDE : <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>.</u>	43
4.1) Importance de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> pour l'étude de la biosynthèse de l'amidon..	43
4.2) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : un formidable outil génétique.	44
4.3) <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : Un formidable outil de biologie moléculaire.	45

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

<u>1) LES SOUCHES DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>.</u>	48
<u>2) LES MILIEUX ET LES CONDITIONS DE CULTURE.</u>	49
2.1) Les milieux liquides.	49
2.2) Les milieux solides.	50
2.3) La mise en culture des souches.	50
<u>3) LES TECHNIQUES GENETIQUES.</u>	51
3.1) Les croisements.	51
3.2) L'obtention de diploïdes végétatifs.	51
3.3) L'analyse de la descendance méiotique.	52
3.4) La fusion cellulaire.	52

3.4.1) La préparation de l'autolysine.	52
3.4.2) Le traitement lytique.	53
3.4.3) La fusion au PEG	53
<u>4) LA PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES.</u>	53
4.1) La préparation d'extraits bruts pour le dosage d'activités enzymatiques.	53
4.2) La préparation de l'amidon.	54
<u>5) LES ANALYSES BIOCHIMIQUES.</u>	55
5.1) Le dosage de l'amidon.	55
5.2) La détermination de la longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode-polysaccharide.	56
5.3) Le dosage de la quantité de chlorophylle.	56
<u>6) LES ANALYSES ENZYMOLOGIQUES.</u>	56
6.1) Le dosage de protéines.	56
6.2) Le dosage de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.	56
6.3) Le zymogramme activité de débranchement.	57
<u>7) LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.</u>	58
7.1) Les souches d' <i>E. coli</i> et les techniques de base en biologie moléculaire.	58
7.2) L'extraction de l'ADN génomique de <i>C. reinhardtii</i> .	58
7.3) L'extraction des ARN totaux de <i>C. reinhardtii</i> .	59
7.4) La préparation d'une sonde nucléotidique marquée.	60
7.5) Le criblage des banques d'ADN complémentaires.	61
7.6) Les hybridations moléculaires.	61
7.6.1) Les analyses en Southern Blot.	61
7.6.2) Les analyses en Northern Blot.	62
7.7) La technique de RACE-PCR.	64
7.8) Le séquençage nucléotidique.	64

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

<u>1) LE CLONAGE DE L'ADNc CORRESPONDANT AU GENE DE STRUCTURE DE LA PETITE SOUS-UNITE DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE.</u>	67
1.1) La stratégie de clonage.	67

1.2) L'obtention de la sonde.	67
1.3) Vérification que le produit de PCR n'est pas spécifique du gène de la grande sous-unité.	68
1.4) Le séquençage du fragment amplifié par PCR.	68
1.5) Le criblage des banques d'ADN complémentaires.	69
1.6) Le séquençage des différents inserts.	69
1.7) Le clonage de l'extrémité 5'.	69
1.8) La nature de l'ADNc cloné.	70
1.9) L'analyse de la séquence nucléotidique et peptidique de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase.	72
1.9.1) Le peptide de transit.	72
1.9.2) La protéine mature.	72
<u>2) LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES I7 (<i>sta1-1</i>) ET BAF J5 (<i>sta6-1::ARG7</i>) ET L'ETUDE DU TRANSCRIT DU GENE DE LA PETITE SOUS-UNITE.</u>	76
2.1) La caractérisation moléculaire des souches I7 et BAF J5.	76
2.2) L'expression des ARN messagers de la petite sous-unité.	77
<u>3) L'ANALYSE GENETIQUE DES LOCI <i>STAI</i> ET <i>STA6</i>.</u>	79
3.1) La réalisation du croisement triploïde.	80
3.2) L'analyse de la population recombinante mutante "jaune"	82
3.2.1) Le contrôle de la qualité du croisement.	82
3.2.2) L'étude du caractère arginine.	83
3.3) L'analyse de la population recombinante sauvage.	83
3.4) L'analyse de ségrégation des gènes <i>STAI</i> et <i>STA6</i> parmi les recombinants défectueux pour la synthèse de l'amidon.	84
3.4.1) Les tests de complémentation.	84
3.4.2) La caractérisation moléculaire des recombinants mutants.	86
3.4.2.1) Quels sont les profils attendus ?	86
3.4.2.2) Les profils observés.	87
3.4.3) Le cas des souches ACJ38 et ACJ51.	89
3.4.4) Le marqueur NIT dans la descendance "jaune".	90
<u>4) LES CARACTERISTIQUES DES SOUCHES MUTANTES "JAUNES" ISSUES DU CROISEMENT DP1×37.</u>	91
4.1) La quantité de polysaccharide accumulé.	91
4.2) L'activité ADP-glucose pyrophosphorylase des recombinants mutants.	92

4.3) Les effets pléiotropes de la mutation <i>sta6-1::ARG7</i>.	92
4.3.1) La mobilité des souches mutées au locus <i>STA6</i> .	92
4.3.2) L'activité de débranchement surnuméraire.	93

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

<u>1) L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE DE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> ADOPTE DEJA LES CARACTERISTIQUES DE L'ENZYME HETEROTETRAMERIQUE DES VEGETAUX SUPERIEURS.</u>	95
<u>2) ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE, AMIDON ET EVOLUTION.</u>	96
<u>3) LA REGULATION DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE.</u>	97
<u>4) PERSPECTIVES.</u>	100

CINQUIEME PARTIE : BIBLIOGRAPHIE

102

SIXIEME PARTIE : ANNEXES

<u>ANNEXE 1.</u>	116
<u>ANNEXE 2.</u>	121
<u>ANNEXE 3.</u>	123
<u>ANNEXE 4.</u>	124
<u>ANNEXE 5.</u>	127

INTRODUCTION GENERALE

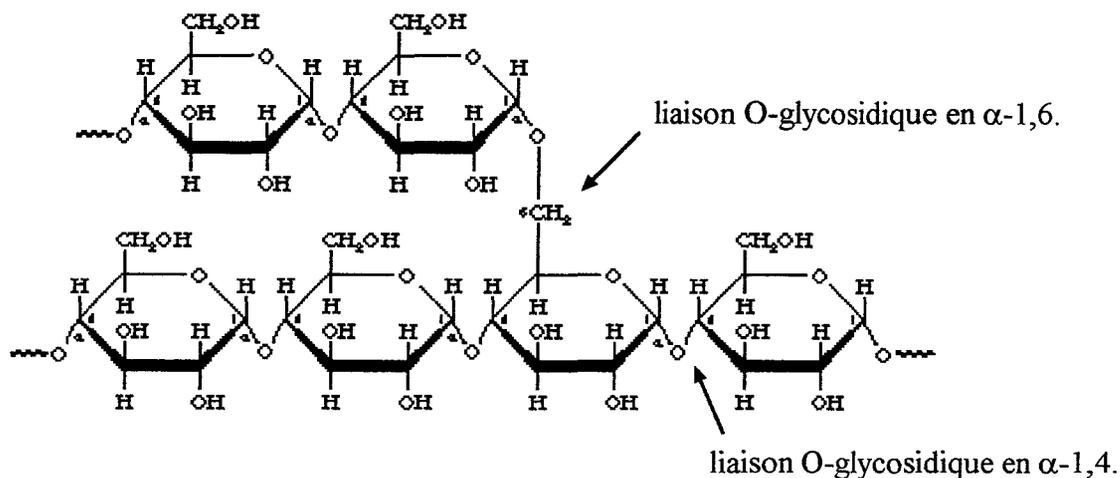


Figure 1 : La structure primaire de l'amidon. Les résidus de glucose sont liés par des liaisons O-glycosidiques en α -1,4 et en α -1,6.

	Amylose	Amylopectine
% en poids sec du granule	15 à 30 %	70 à 85%
% des points de branchement	< 1%	4 à 6%
Masse moléculaire (Da)	10^4 à 10^5	10^7 à 10^8
Degré de polymérisation	100 à 10000	10000 à 100000
Longueur des chaînes	3 à 1000	3 à 50
Couleur en présence d'iode	verte	rouge
λ max.	> 600 nm	530 à 550 nm
Capacité à lier l'iode (poids/poids)	20%	< 1%
Solubilité	variable	soluble
Stabilité en solution aqueuse	rétrograde	stable

Tableau 1 : Les propriétés physico-chimiques des deux principaux composants de l'amidon : l'amylose et l'amylopectine. Les valeurs indiquées dans ce tableau sont représentatives d'un amidon accumulé par les organes de réserve des végétaux supérieurs.

1) LA STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE DU GRAIN D'AMIDON.

L'amidon est un polymère de α -D-Glucose synthétisé sous forme de grains insolubles dans l'eau. Il est localisé dans les plastes des cellules de la plupart des organes de la plante :

- dans les tissus photosynthétiques (feuilles, tiges,...), l'amidon est accumulé dans les chloroplastes où il est synthétisé à partir du CO_2 fixé lors de la photosynthèse. Le carbone, issu de sa dégradation nocturne, est exporté vers les autres tissus de la plante mais, couvre également, les besoins de la cellule. Cet amidon, très vite métabolisé, est nommé amidon transitoire.

- dans les tissus non chlorophylliens (racines, tubercules, embryons,...), son lieu de synthèse est l'amyloplaste, où il est stocké comme amidon de réserve.

La forme et la taille des grains d'amidon dépendent de leur origine. Leur apparence en microscopie suffit, généralement, à déterminer l'identité de la source botanique. Néanmoins, dans un même tissu, les tailles et les formes de grains ne sont pas uniformes et, le diamètre du grain évolue au cours du développement du tissu.

1.1) L'amidon est composé de deux types de molécules aux propriétés physico-chimiques radicalement différentes.

Classiquement, deux fractions se distinguent à l'intérieur du grain d'amidon : l'amylose, molécule plutôt linéaire et l'amylopectine, molécule modérément branchée.

La structure primaire de ces deux molécules est représentée dans la figure 1. Quoique de formule brute identique, la différence dans les proportions de branchement confère à l'amylose et à l'amylopectine des propriétés physico-chimiques radicalement différentes.

1.1.1) L'amylose.

L'amylose représente 15 à 30% du poids sec du grain d'amidon. Il est composé de chaînes essentiellement linéaires, de quelques centaines à quelques milliers de résidus α -D-glucoses. Le nombre moyen d'unités glucose varie avec l'espèce et le stade de développement de la plante.

L'amylose n'est pas une molécule complètement linéaire. Il y a environ un point de branchement tous les 100 à 1000 résidus de glucose.

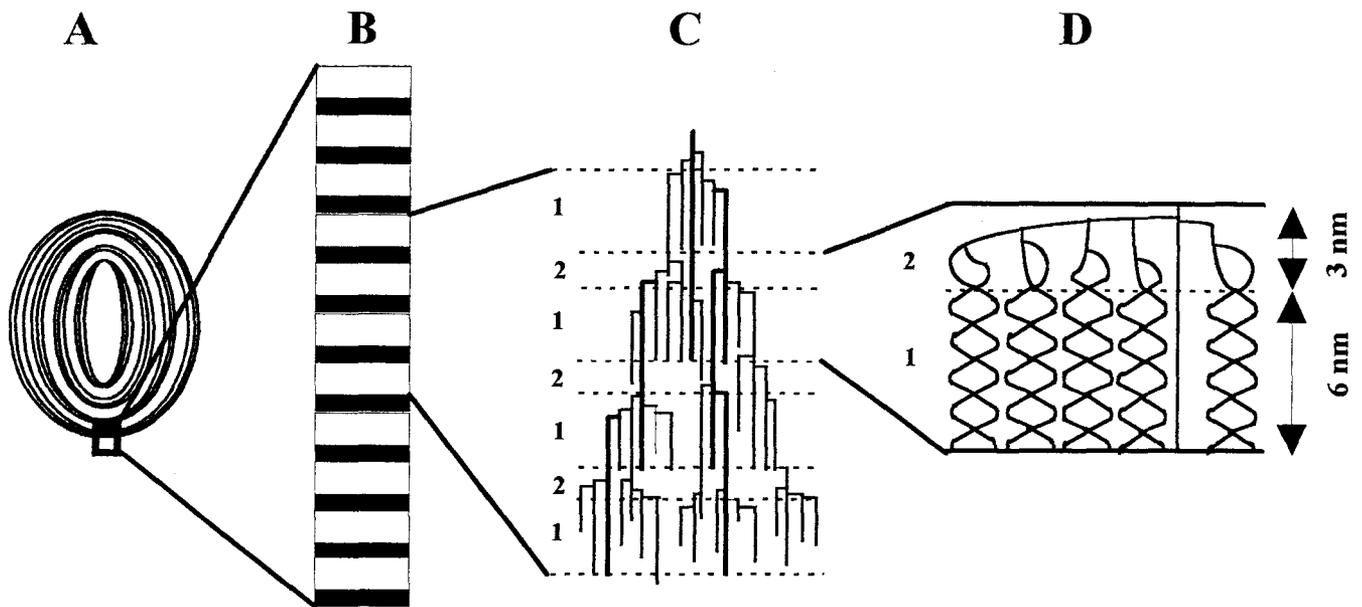


Figure 2 : Schéma de la structure du grain d'amidon.

(A) vue schématique du grain d'amidon représentant la succession des anneaux de croissance cristallins et amorphes.

(B) agrandissement d'une section d'une couche cristalline : les lamelles amorphes sont ombrées et les lamelles cristallines sont blanches. Cet anneau de croissance cristallin contient une succession de 11 lamelles amorphes et cristallines, ce qui correspond environ à 0,1 μm d'épaisseur.

(C) agrandissement d'une succession de 7 lamelles amorphes et cristallines en relation avec la structure en grappe de l'amylopectine. Chaque ligne représente une chaîne de glucanes liés en α -1,4. Les chaînes sont accrochées entre elles par des liaisons α -1,6. Les lignes en pointillés délimitent les sections correspondant aux lamelles cristallines (1) et amorphes (2).

(D) structure d'une grappe de l'amylopectine : les zones denses en branchements en α -1,6 sont à l'origine des lamelles amorphes, tandis que l'agencement en doubles hélices des chaînes de l'amylopectine est à l'origine des lamelles cristallines. La taille de 6 nm de la portion cristalline correspond à la longueur d'une chaîne de 16 résidus de glucose.

1.1.2) L'amylopectine.

L'amylopectine constitue la fraction majoritaire du grain. Elle représente 70 à 80% du poids sec du grain d'amidon. Elle comprend environ 10 000 à 500 000 résidus de glucose pour une masse d'environ 10^8 Dalton (Da).

La ramification en α -1,6 de l'amylopectine est beaucoup plus importante que celle de l'amylose. Le taux de branchement est de 4 à 6%. Deux points de branchement sont distants d'environ 20 à 25 résidus de glucose.

1.1.3) Des structures différentes confèrent des propriétés physico-chimiques différentes.

Les principales propriétés physico-chimiques de l'amylopectine et de l'amylose sont résumées dans le tableau 1.

En raison de sa nature quasi linéaire, l'amylose forme des complexes avec les acides gras, avec les alcools de bas poids moléculaire et avec les molécules d'iode. Les chaînes d'amylose s'organisent en hélice simple, dont la cavité centrale hydrophobe emprisonne de tels composés. Cette structure quasi linéaire rend compte du phénomène de rétrogradation de l'amidon : les molécules d'amylose s'alignent parallèlement et forment entre elles des ponts hydrogène, pour aboutir à un composé qui précipite.

1.2) Le grain d'amidon présente une structure cristalline très ordonnée.

Le grain d'amidon se caractérise par une structure très ordonnée. Une succession de couches semi-cristallines et amorphes d'environ 100 nm d'épaisseur (figure 2A) constitue les anneaux de croissance. Chaque couche semi-cristalline renferme, elle-même, une succession de lamelles cristallines et amorphes (figure 2B).

Les mutants de type *waxy* de l'orge et du maïs synthétisent un amidon uniquement composé d'amylopectine. Or, le degré de cristallinité est identique à celui d'un polymère sauvage. Seule l'amylopectine serait donc responsable du caractère cristallin du grain d'amidon.

Plusieurs modèles structuraux tentent d'expliquer la cristallinité de l'amidon. A l'heure actuelle, le modèle de la structure en "grappes" d'Hizukuri (1986, figure 3) semble le plus en accord avec les faits expérimentaux. Dans ce modèle, la répartition asymétrique des points de branchement en α -1,6 provoque le regroupement en grappes des chaînes de l'amylopectine. Les courtes chaînes de type A et B1 seraient parallèles et très proches les unes des autres. Cette promiscuité leur permettrait de s'associer entre elles pour former des doubles hélices

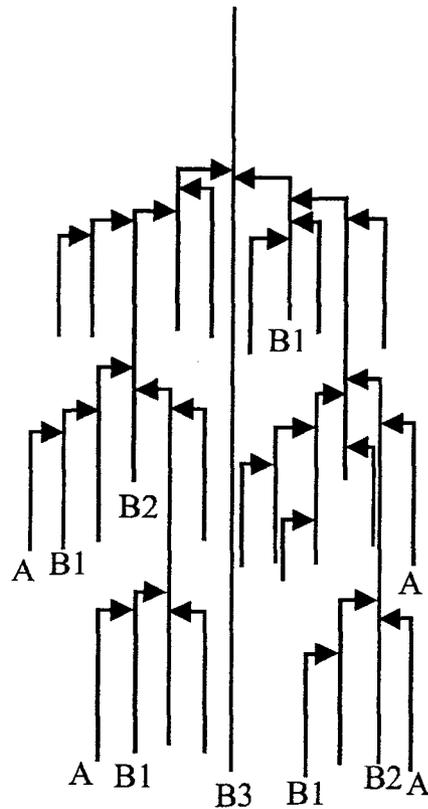


Figure 3 : Le modèle de la structure en grappe de l'amylopectine d'Hizukiri (1986).

Les chaînes A, les plus courtes, sont les chaînes les plus externes de l'amylopectine. Elles ne portent pas de points de branchement. Elles sont reliées par une liaison de type α -1,6 aux chaînes B qui peuvent supporter plusieurs chaînes de type A ou B.

Les chaînes B1, d'un DP (degré de polymérisation) moyen de 19, se situent à l'intérieur d'une seule grappe élémentaire. Les chaînes B2, d'un DP moyen de 41, unissent deux grappes élémentaires successives. Les chaînes B3, d'un DP moyen de 69, relient trois grappes successives. Enfin, les chaînes B4 (ne figurant pas sur le schéma), d'un DP moyen de 104, se développent sur quatre grappes adjacentes ou plus.

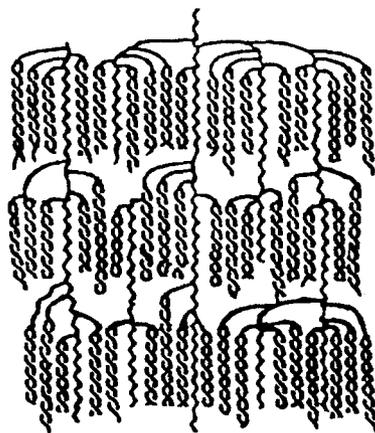


Figure 4 : L'association des courtes chaînes A et B1 de l'amylopectine en double hélice (Imberty et coll., 1991).

(Imberty et coll., 1991, figure 4). Cette association engendrerait la lamelle cristalline, tandis que les zones de branchement intense seraient à l'origine des lamelles amorphes (figure 2C).

Des expériences de dispersion aux rayons X petit angle suggèrent que la taille du motif structural élémentaire (lamelle amorphe-lamelle cristalline) est conservée à travers le règne végétal (Jenkins et coll., 1993) : elle est invariablement de 9 nm. Ceci implique l'existence d'une voie biosynthétique fortement préservée à travers l'évolution. Mais, le déterminisme génétique de cette conservation n'est pas encore élucidé.

La manière, dont interagissent l'amylose et l'amylopectine, est, elle aussi, encore mystérieuse. Ainsi, on ne sait toujours pas si les molécules d'amylose s'intercalent dans la structure cristalline de l'amylopectine.

1.3) Les constituants associés au grain d'amidon.

On entend, par constituants associés, des molécules localisées à la surface ou à l'intérieur du grain.

Les amidons d'origine non céréalière ne possèdent quasiment pas de lipides associés. Par contre, les amidons de céréales en contiennent tous de 0,5 à 1%. Deux faits intéressants sont à noter : le contenu en lipides augmente quand la teneur en amylose s'accroît et les lipides restent insensibles aux solvants, tant que le grain n'est pas rompu. Les lipides seraient donc complexés à l'amylose dans l'amidon natif, sans que l'on sache s'ils jouent un rôle dans l'organisation du grain.

L'amidon contient du phosphore sous trois formes. Il peut être associé aux lipides, dans le cas des phospholipides, ou adsorbé sur la fraction amylosique (c'est le cas de la quasi-totalité du phosphore de l'amidon de blé). Dans l'amylopectine, il apparaît uniquement sous la forme de glucose-6-phosphate (G6P). La teneur en G6P varie selon les espèces : 200 à 1000 parts pour million (ppm) dans l'amylopectine de pomme de terre, alors qu'elle est inférieure à 20 ppm dans l'amylopectine de céréales. Après dégradation de l'amylopectine par des amylases, le phosphore est concentré dans des dextrans limites. Les résidus de G6P seraient donc proches des points de branchement. L'origine de ces groupements est encore inconnue. Sont-ils incorporés dans une chaîne en élongation ou résultent-ils d'une phosphorylation enzymatique ultérieure de certains résidus de l'amylopectine ?

2) LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON.

La biosynthèse de l'amidon se déroule exclusivement dans les chloroplastes et les amyloplastes. Elle débute avec la synthèse du nucléotide-sucré donneur puis, se poursuit avec l'édification du grain d'amidon.

La synthèse du nucléotide-sucré précurseur : l'ADP-glucose

Dans les cellules photosynthétiques, le 3-phosphoglycérate (3PGA) est formé durant la fixation du CO₂ atmosphérique par le cycle de Calvin. Il est transformé en G6P via la gluconéogénèse. Le G6P est converti en glucose-1-phosphate (G1P) par la forme plastidiale de la phosphoglucomutase (PGM, EC 2.1.5.1). Le G1P est le substrat de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ADP-Glc PPase, EC 2.7.7.27) pour la synthèse de l'unique nucléotide-sucré précurseur : l'ADP-glucose (ADP-Glc).

Les avis sont partagés, quant à la localisation de la synthèse de l'ADP-Glc dans les tissus non photosynthétiques. Neuhaus et coll. (1993) pensent que le carbone est transporté dans l'amyloplaste, sous forme d'hexoses monophosphates (G6P et G1P issus de la dégradation du saccharose dans le cytosol) via un transporteur spécifique. Les étapes suivantes, y compris la synthèse du précurseur, sont identiques à celles décrites dans la cellule photosynthétique et se déroulent entièrement dans l'amyloplaste. Par contre, Denyer et coll. (1996a) pensent que, pour quelques espèces, l'ADP-Glc est synthétisé dans le cytosol ; il existerait donc un transporteur d'ADP-Glc dans la membrane des amyloplastes. Nous reviendrons plus loin sur cette controverse, dans un chapitre particulier consacré à l'ADP-Glc PPase (voir chap. 3) qui est au coeur de notre travail.

L'édification du grain d'amidon

Les amidon-synthétases (adénosine diphosphate glucose α -1,4-glucosyltransférases, EC 2.4.1.21) catalysent le transfert du glucose du précurseur, sur des chaînes de glucanes en élongation, en créant une liaison glucosidique en α -1,4.

Les enzymes de branchement (α -1,4-glucane: α -1,4-glucane-6-glycosyltransférases, EC 2.4.1.18) permettent la ramification en α -1,6, par transfert de chaînes de glucanes liés en α -1,4 sur les chaînes précédentes.

Mouille et coll. (1996) proposent que les enzymes de débranchement participent à l'élaboration de la grappe par l'épissage d'une molécule hyperbranchée appelée pré-amylopectine.

Toutes ces enzymes n'agissent sûrement pas de manière séquentielle mais ont plutôt une action concertée. Un schéma de la voie de biosynthèse de l'amidon est présenté dans la figure 5.

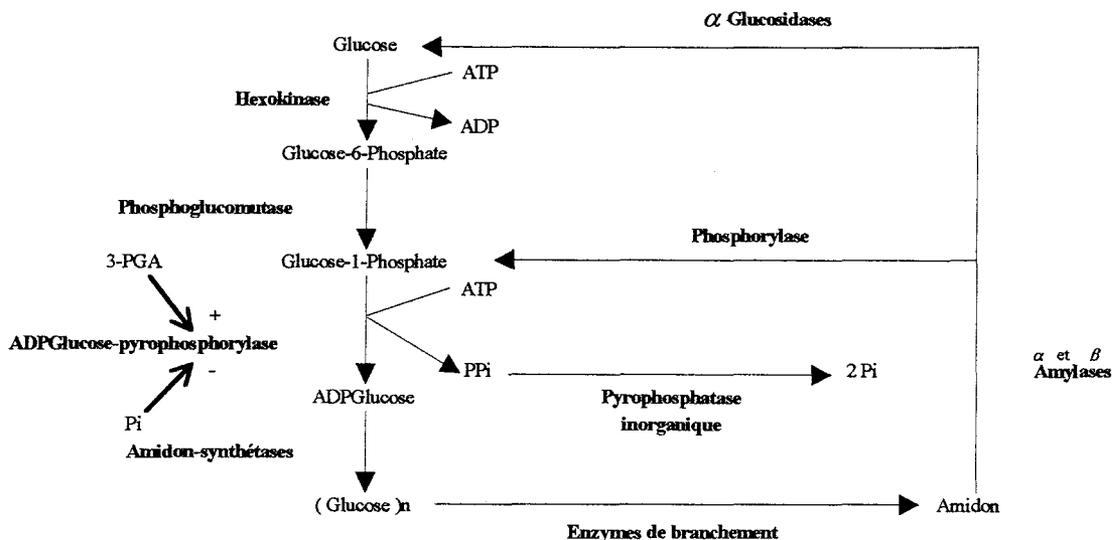


Figure 5 : Le schéma général du métabolisme de l'amidon.

2.1) La biosynthèse de l'amidon débute uniquement par la synthèse de l'ADP-glucose.

Il est maintenant parfaitement établi que la biosynthèse de l'amidon débute par la synthèse de l'ADP-Glc.

Un grand nombre de mutants affectés dans l'activité ADP-Glc PPase, isolés chez plusieurs organismes, prouvent l'exclusivité de cette voie pour la synthèse d'amidon. Pour exemple, les mutants d'albumen de maïs *brittle-2* et *shrunken-2* (Tsai et Nelson, 1966; Dickinson et Preiss, 1969) présentent respectivement une activité ADP-Glc PPase de 3 et 6%, et accumulent seulement 25 à 30% d'amidon par rapport à une lignée sauvage. Le mutant *adgl* d'*Arabidopsis thaliana* (Lin et coll., 1988a) dépourvu des deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase ne montre aucune accumulation détectable de polysaccharide. Tous les mutants référencés se caractérisent par une corrélation entre la baisse ou la disparition de l'activité ADP-Glc PPase et la diminution de la quantité d'amidon accumulé.

Une preuve supplémentaire est fournie par Müller-Röber et coll. (1992). Ils ont exprimé dans le tubercule de pomme de terre un gène chimérique codant un ARN antisens de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase. L'activité de l'enzyme diminue alors fortement (5% de l'activité normale) et, entraîne une réduction de 98% de la quantité d'amidon accumulé.

Enfin, Stark et coll. (1992) ont surexprimé le gène muté de l'ADP-Glc PPase d'*E. coli*, dans des tubercules de pomme de terre. Cette ADP-Glc PPase est insensible à ses effecteurs allostériques (fructose-6-phosphate et AMP). La quantité d'amidon accumulé par ces tubercules augmente alors de 30 à 60% par rapport à un tubercule de type sauvage.

L'ADP-glucose apparaît, par conséquent, le seul nucléotide-sucre précurseur de la biosynthèse de l'amidon. Sa synthèse par l'ADP-glucose pyrophosphorylase représente l'étape limitante de la voie.

2.2) Existe-t-il une autre activité enzymatique limitante pour la synthèse de l'amidon ?

La synthèse d'ADP-glucose constitue l'étape limitante de la voie de biosynthèse de l'amidon et, jusqu'à maintenant, aucune autre enzyme que l'ADP-Glc PPase ne semblait jouer un rôle limitant. Cependant, les travaux de Tjaden et coll. (1998) remettent en cause cette hypothèse.

Dans le tubercule de pomme de terre, l'ADP-Glc PPase est localisée dans les amyloplastes. Le G1P et le G6P importés dans l'amyloplaste ont, tous deux, été proposés comme précurseur de la biosynthèse de l'amidon (Schott et coll., 1995; Naeem et coll., 1997). L'amyloplaste doit, en plus de ces hexoses phosphates, importer de l'ATP, pour la synthèse d'ADP-Glc. Ce transport d'ATP se ferait par le biais d'un transporteur d'adénylate plastidique (Schünemann et coll., 1993). Kampfenkel et coll. (1995) ont isolé l'ADN complémentaire (ADNc) d'un tel transporteur chez *A. thaliana*. Cet ADNc a été utilisé par Tjaden et coll. (1998) pour créer des lignées transgéniques de pomme de terre possédant une activité accrue du transporteur. Ils ont également engendré des lignées transgéniques, en exprimant l'ADNc du transporteur endogène de la pomme de terre en orientation antisens, pour en réduire l'activité.

La transformation par l'ADNc cloné dans une orientation antisens conduit à une réduction de l'expression des ARN messagers (ARNm) codant le transporteur. Cette réduction est corrélée à un faible niveau d'importation d'ATP, dans des protéoliposomes contenant les

protéines de la membrane amyloplastique. De plus, la biosynthèse d'amidon dans de telles lignées est inhibée.

Les effets inverses sont observés pour les lignées transformées avec l'ADNc du transporteur d'*A. thaliana*. Une augmentation de l'importation d'ATP a lieu dans les protéoliposomes. Corrélativement, le contenu en amidon des tubercules de pomme de terre augmente (jusqu'à 36% de la quantité accumulée par une lignée sauvage).

Ces résultats suggèrent que l'activité du transporteur ATP/ADP de la membrane amyloplastique exerce un contrôle important, en limitant la biosynthèse de l'amidon, dans le tubercule de pomme de terre.

L'amidon, dans les lignées antisens présente, en outre, des modifications de structure. Le taux d'amylose se voit réduit, passant de 18,8% (lignée sauvage) à 11,5% pour la lignée la plus sévèrement touchée. Les auteurs sont d'avis que la diminution de l'apport d'ATP serait responsable d'une chute de la concentration en ADP-Glc, qui serait donc moins disponible pour l'amidon-synthétase majeure liée au grain (la GBSSI). Or, celle-ci possède une faible affinité pour ce substrat. Une telle diminution de la concentration en nucléotide sucre aurait pour effet direct, une baisse de la synthèse d'amylose.

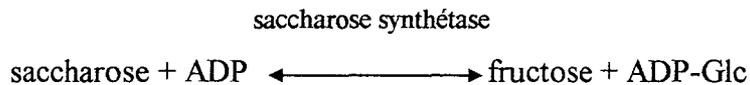
De telles modifications de la structure de l'amidon, en relation avec une baisse de la teneur en ADP-Glc, sont observées chez d'autres espèces. La mutation *rb* est responsable de la baisse de l'activité ADP-Glc PPase dans l'embryon de pois (Hylton et Smith, 1992). L'amidon est alors caractérisé par une diminution de la proportion amylose/amylopectine. Chez *C. reinhardtii*, la mutation *sta1-1* rend insensible l'ADP-Glc PPase au 3PGA : elle conduit à une réduction de la quantité d'amidon et surtout, à la disparition de la fraction amylosique (Van den Koornhuyse et coll., 1996).

Un tel résultat n'a pour l'instant été mis en évidence que dans le tubercule de pomme de terre. Il serait intéressant d'étudier, ce qui se passe chez d'autres espèces. On ne peut exclure, que de telles modifications de la concentration en ATP dans la cellule, aient un effet sur les concentrations en métabolites, tels que le 3PGA ou le phosphate inorganique (Pi) modulant l'activité de l'ADP-Glc PPase.

2.3) Existe-t-il une voie alternative pour la synthèse d'ADP-glucose ?

En 1991, Pozueta-Romero et coll. isolent des chloroplastes de cellules de feuilles d'épinard un transporteur d'adénylate. Celui-ci apparaît capable de transporter de l'ADP-Glc marqué. La radioactivité, quant à elle, est retrouvée incorporée dans l'amidon. Ce transporteur est similaire à celui mis en évidence dans l'enveloppe des amyloplastes de cellules de sycomore (Pozueta-Romero et coll., 1991a). L'inhibition de ce transporteur par la carboxyatractyloside empêche uniquement le passage de l'ATP et de l'ADP-Glc.

La présence additionnelle d'une haute activité saccharose-synthétase, produisant de l'ADP-Glc, dans les fractions extrachloroplastiques conduit les auteurs à postuler, que l'ADP-Glc produit par la saccharose-synthétase (réaction ci-dessous) est transporté dans les plastes via un transporteur adénylate. Il est, alors, utilisé comme nucléotide sucre donneur par les amidon-synthétases.



La mutation *sh1* affecte la forme majeure de saccharose-synthétase de l'albumen de maïs. Elle entraîne une réduction de la synthèse d'amidon dans l'albumen. Un rôle de la saccharose-synthétase dans la synthèse de l'ADP-Glc n'est donc pas exclu.

Plusieurs faits vont pourtant à l'encontre de cette hypothèse.

Kruckeberg et coll. (1989) ont isolé un mutant de *Clarkia xantiana* déficient pour l'activité phosphoglucoisomérase (PGI) cytosolique. La PGI catalyse la transformation réversible du G6P en fructose-6-phosphate (F6P). Sa synthèse, suivie de l'action de la saccharose-phosphate synthétase et de la saccharose phosphatase conduit à la formation du saccharose. Ce mutant, en condition de basse luminosité, accumule moins de saccharose. Un des effets escomptés est une chute de la synthèse de l'amidon. Mais, au contraire, elle augmente. Une réorientation du carbone, vers la synthèse d'amidon, a donc eu lieu dans le plaste. L'étude par les mêmes auteurs de mutants déficients pour la PGI chloroplastique infirme également le rôle majeur de la voie alternative. Cette mutation devrait très peu affecter la synthèse d'amidon, si cette dernière est dépendante du saccharose. On observe toutefois, une très nette réduction de la quantité de polysaccharide accumulé.

Enfin, les nombreux mutants affectés dans l'activité ADP-Glc PPase attestent que cette dernière reste absolument essentielle pour la synthèse de l'ADP-Glc et donc, pour la synthèse de l'amidon.

Il faut en déduire, que cette voie alternative n'est absolument pas requise pour la biosynthèse d'amidon.

2.4) Les amidon-synthétases.

Les amidon-synthétases et les glycogène-synthétases catalysent le transfert du résidu de glucose de l'ADP-glucose, sur l'extrémité non réductrice des glucanes en élongation, par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidiques de type α -1,4. Contrairement aux bactéries et aux eucaryotes non photosynthétiques, chez lesquels il n'existe qu'une seule glycogène-synthétase, plusieurs isoformes d'amidon-synthétases ont été clairement identifiées chez les végétaux.

Beaucoup d'ADNc correspondant à des amidon-synthétases ont été clonés chez les plantes supérieures. L'analyse en détail des séquences peptidiques, déduites de chacun d'entre eux, met en évidence la présence de deux régions de séquences très conservées, quelle que soit l'origine de l'enzyme. Ces séquences de type " KTGGL " sont impliquées dans la fixation de l'ADP-glucose (Furukawa et coll., 1990).

Malgré les similitudes de séquences importantes, on distingue deux types d'amidon-synthétases chez les eucaryotes photosynthétiques : celles solubles dans le stroma plastidial et celles intimement liées au grain d'amidon.

2.4.1) Les amidon-synthétases liées au grain d'amidon.

C'est sans aucun doute le rôle de la GBSSI (pour Granule Bound Starch Synthase) qui est le mieux compris, à l'heure actuelle.

La GBSSI constitue la protéine majeure liée au grain d'amidon représentant, à elle seule, plus de 90% des protéines du grain. Chez tous les végétaux, la GBSSI présente une masse moléculaire d'environ 60 kDa, lui valant d'être la plus petite représentante de toutes les amidon-synthétases connues. La GBSSI de *C. reinhardtii* fait exception à la règle. En effet, celle-ci possède une masse moléculaire d'environ 76 kDa. Les analyses de séquences suggèrent que la GBSSI de *C. reinhardtii* possède une extension C-terminale de 119 acides aminés, ne partageant aucune similitude convaincante avec les autres protéines déjà clonées. Cette extension n'est pas requise pour le ciblage de la protéine dans le grain d'amidon (Delrue et coll., 1992) et sa fonction, si elle existe, reste encore indéterminée.

L'activité de la GBSSI conditionne la présence de l'amylose dans le grain d'amidon. Les études de mutants aussi variés que ceux du maïs (*waxy* ; Tsai, 1974), de la pomme de terre (*amf* ; Hovenkamp-Hermelink et coll., 1987), du pois (*lam* ; Denyer et coll., 1996b) et de *C. reinhardtii* (*sta2* ; Delrue et coll., 1992) ont permis de démontrer, sans ambiguïté, qu'en absence de l'activité GBSSI, le grain d'amidon est uniquement constitué d'amylopectine.

Très récemment Ball et coll. (1998) ont proposé un modèle d'action de la GBSSI dans le grain d'amidon. Ce modèle est bâti, d'après les travaux de synthèse d'amylose menés *in vitro*, par van de Wal et coll. (1998), à partir de grains d'amidon purifiés de *C. reinhardtii*. La GBSSI allongerait les chaînes externes de l'amylopectine, en quantité abondante dans son entourage immédiat, avant que celles-ci ne soient clivées, rejoignant ainsi la fraction amylosique. Il reste, cependant, à déterminer si c'est la GBSSI elle-même ou une autre enzyme qui réalise le clivage de la chaîne néoformée.

Dans une moindre mesure, on constate la présence de la GBSSII associée au grain d'amidon, chez la pomme de terre et le pois (Denyer et Smith, 1992 ; Edwards et coll., 1995 et 1996). Cependant, cette isoforme est principalement présente en phase soluble dans le stroma (c'est l'amidon synthétase soluble II) et, ne semble active que dans ces conditions. La protéine pourrait être simplement piégée dans le grain d'amidon lors de sa croissance.

2.4.2) Les amidon-synthétases solubles.

Le système relativement simple décrit pour les amidon-synthétases liées au grain d'amidon, se complique fortement dans le cas des isoformes solubles. En effet, ce sont au moins trois isoformes qui sont actives sur le polysaccharide en croissance. Pendant très longtemps, aucun mutant affecté spécifiquement pour une de ces isoformes n'était disponible chez les plantes supérieures. Le travail de compréhension des mécanismes d'action des amidon-synthétases solubles *in vivo* s'en est trouvé largement ralenti.

Historiquement, c'est chez le maïs, que le premier mutant affecté pour une amidon-synthétase soluble a été isolé. Il s'agit du mutant *dull* (Boyer et Preiss, 1981). Cependant, la déficience n'est pas totale, et s'accompagne de la décroissance de l'activité d'une isoforme d'enzyme de branchement. C'est pourquoi, on a pensé, pendant longtemps, que le gène *DULL* pouvait être un gène de régulation. C'est en 1998 que Gao et coll., ont définitivement démontré, que le gène *DULL* représentait le gène de structure de la SSII (pour Soluble Starch Synthase II) du maïs, en clonant la séquence d'ADNc correspondant à ce locus.

La SSII, d'une masse moléculaire d'environ 200 kDa représente l'une des deux isoformes majeures de l'albumen de maïs, puisque 20 à 30% de l'activité de polymérisation est supportée par cette enzyme. La SSI, l'autre amidon-synthétase majeure (76 kDa), conditionne 60% de l'activité de polymérisation (Cao et coll., 1999). La mutation au locus *DULL* s'accompagne d'une forte augmentation de la proportion de la fraction amylosique (55% de la masse du grain contre 20 à 30% dans un amidon standard) et d'une modification de la répartition des chaînes constitutives de l'amylopectine. Le nombre de chaînes de longueur intermédiaire s'avère, dans ce cas, légèrement décri.

Entre temps, un mutant de *C. reinhardtii* et un mutant du pois ont été isolés. Il s'agit respectivement des mutants aux loci *STA3* et *RUG5* (Fontaine et coll., 1993 ; Craig et coll., 1998). Dans les deux cas, l'activité d'une isoforme soluble est spécifiquement déficiente.

Chez *C. reinhardtii*, la mutation au locus *STA3* conduit à l'absence de la SSII, réduisant ainsi, en extrait brut, l'activité amidon-synthétase globale de plus de 60%. Cette chute s'accompagne d'une baisse sensible de la quantité de polysaccharide synthétisé (20% de la quantité sauvage). L'amidon résiduel montre un enrichissement en amylose, comme dans le cas du mutant *dull* du maïs, ainsi qu'une modification similaire de la répartition des chaînes constitutives de l'amylopectine. Le nombre de chaînes de longueur intermédiaire (d'un DP compris entre 8 et 40 appartenant au type B dans le modèle d'Hizukuri (1986) précédemment présenté) chute fortement, alors que le nombre de chaînes courtes (DP<8) et longues (DP>40) s'avère beaucoup plus élevé. Il en résulte une baisse importante de la cristallinité de l'amidon résiduel, dont la maille cristalline adopte un type B (c'est le type A qui caractérise un amidon sauvage de *C. reinhardtii* ; Buléon et coll., 1997).

Le même phénotype est observable chez le mutant *rug5* du pois, chez lequel l'activité de la SSII (ou GBSSII) fait défaut. Alors que la masse moléculaire de la SSII de *C. reinhardtii* atteint environ 130 kDa et s'approche beaucoup de la protéine Dull du maïs, celle de la SSII du pois n'est que de 77 kDa.

Chez la pomme de terre, une amidon-synthétase d'une masse moléculaire de 140 kDa a pu aussi être clonée et caractérisée (Abel et coll., 1996 ; Marshall et coll., 1996). Dénommée SSIII, cette dernière est l'isoforme majeure du tubercule de pomme de terre. Aucun mutant pour cette enzyme n'a pu être isolé et, les constructions antisens n'ont pas permis de montrer de modification majeure de la structure du polysaccharide. On note juste l'apparition de

craquelures en forme de "T" dans le grain d'amidon et, une augmentation de la teneur en phosphate.

La réduction simultanée des SSII et SSIII du tubercule de pomme de terre, par la même technique des ARN antisens, laisse, cette fois-ci, apparaître de profondes modifications de la structure de l'amidon accumulé par le cultivar transgénique (Lloyd et coll., 1999 ; Edwards et coll., 1999). L'activité amidon-synthétase totale du tubercule chute de plus de 90%, sans effet notable sur les quantités de polysaccharide accumulé. Cependant, la structure de l'amylopectine s'apparente très fortement à celle précédemment décrite respectivement chez les mutants *sta3* et *rug5* de *C. reinhardtii* et du pois. Cet effet, que l'on peut distinguer uniquement par l'inhibition simultanée de deux isoformes d'amidon-synthétase, laisse présager l'existence d'interactions indispensables au travail efficace de chacune d'entre elles (l'impact phénotypique de la réduction des SSII et SSIII indépendamment l'une de l'autre est quasi nul).

Notons finalement que chez *C. reinhardtii*, quatre séquences d'ADNc correspondant à des amidon-synthétases ont été clonés (D'Hulst, 1997 ; Saul Purton, communication personnelle). L'un d'entre eux, clairement identifié, émane du gène de structure de la GBSSI. Il semble donc qu'au moins trois isoformes d'amidon-synthétases solubles soient présentes chez l'algue verte comme cela s'est révélé pour les plantes supérieures telles la pomme de terre, le maïs ou encore le pois. Beaucoup de travail reste donc à accomplir, afin d'appréhender les mécanismes d'actions de chacune d'entre elles et leur implication exacte dans l'édification de la structure de l'amylopectine.

2.5) Les enzymes de branchement.

De même que pour les amidon-synthétases, il existe deux classes d'enzymes de branchement chez les plantes, alors qu'il en existe qu'une chez les bactéries.

Cette division en deux classes A et B (pour revue Martin et Smith, 1995) se base sur les différences de séquences primaires. Les isoformes se distinguent également, par leur affinité pour le substrat et, la longueur des chaînes qu'elles transfèrent (Takeda et coll., 1993; Guan et Preiss, 1993). Ainsi, les enzymes de branchement (BE pour branching enzyme) de type A préfèrent *in vitro*, l'amylopectine comme substrat et transfèrent des chaînes plus courtes que les BE de type B. Les BEIIa et BEIIb de l'albumen du maïs, la BEI du pois et la BEIII du riz appartiennent à cette famille. Par contre, la BEI de l'albumen de maïs, la BEII du pois et la BEI du riz (classe B) préfèrent l'amylose.

Chaque classe se distingue par la longueur minimale des glucanes nécessaires au transfert (Guan et coll., 1997). La longueur des chaînes doit être, au minimum, de 12 résidus

de glucose pour le type A de l'albumen de maïs (BEII) et, d'au moins 16 résidus de glucose pour le type B (BEI). La BE de type A est capable de transférer de très courtes chaînes d'un degré de polymérisation (DP) entre 3 et 9 avec un maximum d'activité pour les DP 6 et 7. La BE de type B est dans l'incapacité de transférer de si courtes chaînes (Guan et coll., 1997).

Les seules mutations obtenues jusqu'à maintenant sont celles affectant les BE de type A. Ces mutations concernent les loci *AE* (*Amylose extender*) des céréales et le locus *R* (*Rugosus*) du pois. Dans tous les cas, les mutants partagent un même phénotype. La réduction de l'amidon accumulé s'accompagne d'une forte augmentation de la fraction amylosique et de l'apparition d'une fraction intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine. Aucun mutant pour les BE de type B n'a encore été décrit. L'expression d'un ARN antisens dans le tubercule de pomme de terre entraîne peu d'effets sur la structure de l'amylopectine (Flipse et coll., 1996). La forme B jouerait donc, un rôle mineur dans l'édification du grain. Ceci peut être corrélé avec son expression dans le temps. Alors que les BE de type A sont exprimées de manière constitutive dans l'albumen de céréales (Morrel et coll., 1997) et dans les embryons de pois (Burton et coll., 1995), les BE de type B sont toujours exprimées plus tard dans le développement.

Guan et coll. (1995) ont exprimé, chez une souche d'*E. coli* déficiente pour l'activité de branchement du glycogène, les deux isoformes de BE de l'albumen de maïs. Le produit final, quel que soit l'isoforme exprimée, est un polymère de type glycogène. Dans cette expérience, l'action des deux isoformes *in vitro* est reflétée *in vivo*. En effet, l'isoforme A synthétise un polymère plus riche en chaînes courtes (6 à 9 résidus de glucose) et moins riche en chaînes longues (supérieures à 14 résidus de glucose) que le polymère synthétisé par l'isoforme B.

L'expression dans *E. coli* des deux isoformes de l'albumen de maïs n'aboutit pas à la synthèse d'amylopectine. Les propriétés intrinsèques des enzymes de branchement ne définissent donc pas, à elles seules, l'organisation structurale de l'amylopectine.

2.6) L'action d'enzymes de débranchement est nécessaire à l'élaboration de la structure finale de l'amylopectine.

L'action conjuguée des amidon-synthétases et des enzymes de branchement a longtemps été tenue suffisante pour la synthèse de l'amylopectine. L'expression des enzymes de branchement de l'albumen de maïs, dans une souche d'*E. coli* dépourvue de l'enzyme de branchement du glycogène, contredit cette idée (Guan et coll., 1995). Puisque le produit obtenu est un polymère de type glycogène, une fonction distincte de l'élongation et du branchement intervient dans l'élaboration de la structure complexe en grappe de l'amylopectine telle qu'elle est décrite.

Le mutant de l'albumen de maïs *sugary1 (su1)* est connu depuis le début du siècle. Il accumule une faible quantité d'amidon et, de manière concomitante, un nouveau type de polysaccharide soluble dans l'eau (WSP pour water-soluble polysaccharide ou polysaccharide soluble dans l'eau)(Summer et coll., 1944). Ce WSP présente des similitudes de structure avec le glycogène animal, fongique et bactérien. C'est pourquoi, il a été baptisé phytoglycogène. Erlander (1958) propose que ce polysaccharide soit le précurseur de l'amylopectine. Un débranchement partiel du phytoglycogène serait alors nécessaire, pour donner naissance à l'amylopectine, qui subirait, à son tour, un débranchement complet, pour aboutir à l'amylose.

Vingt-six ans plus tard, Pan et Nelson (1984) remettent cette idée au goût du jour en prouvant que ces mutants *su1* sont déficients pour l'une des isoformes de l'enzyme de débranchement (DBE pour debranching enzyme). Les auteurs parlent d'un équilibre entre les activités de branchement et de débranchement pour expliquer la synthèse de l'amylopectine. James et coll. (1995) apportent la preuve définitive de la participation d'une DBE dans la synthèse de l'amylopectine grâce au clonage de l'ADNc de *SUI*. La séquence en acides aminés déduite présente de fortes homologues avec les isoamylases bactériennes. Le produit du gène *SUI* exprimé dans *E.coli* a bien une activité de débranchement. Dans le riz également, la présence de phytoglycogène est corrélée à une diminution de l'activité de débranchement.

Néanmoins, l'existence d'amidon résiduel chez les mutants *sugary1* du maïs est gênante pour affirmer, de manière péremptoire, que l'activité DBE est absolument requise pour la construction de la molécule d'amylopectine. La preuve de l'importance primordiale de l'activité DBE nous est fournie par les mutants *sta7* de *C. reinhardtii* (Mouille et coll., 1996). Chez ces mutants, l'amidon granulaire disparaît pour être remplacé par 5% de phytoglycogène. Ceci est uniquement corrélé à la disparition d'une activité spécifique de débranchement.

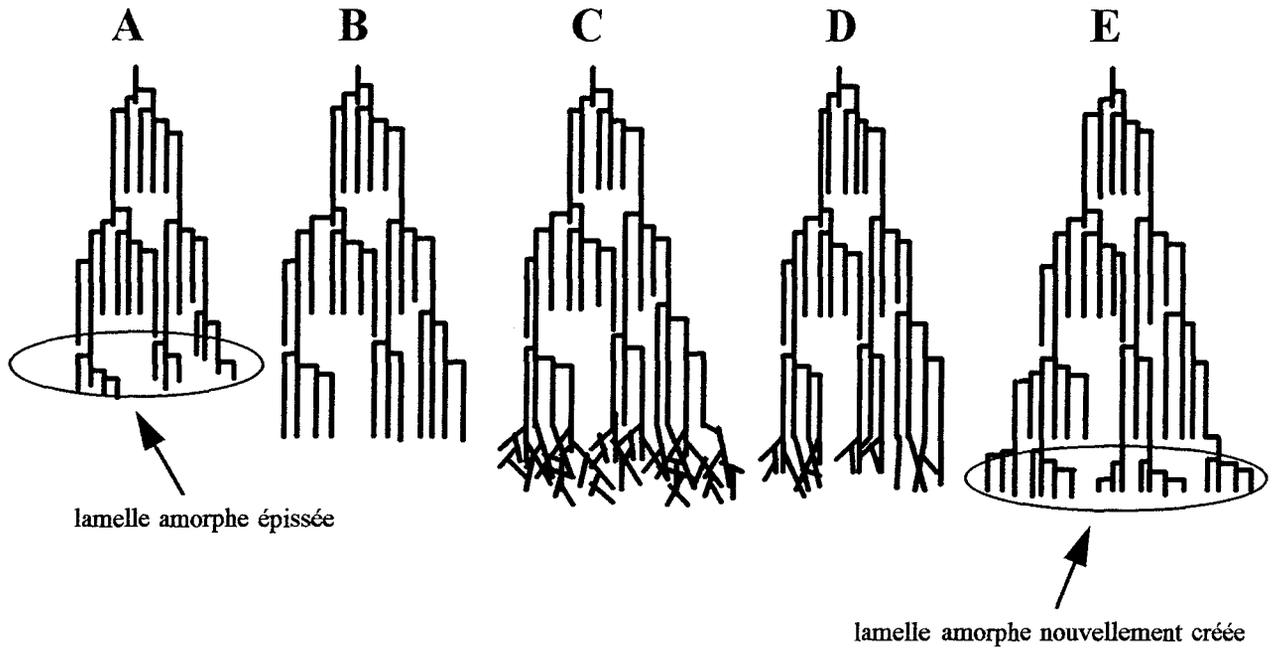


Figure 6 : Le modèle de synthèse discontinue de l'élaboration de l'amylopectine (Ball et coll., 1996).

(A) l'élongation des chaînes de glucanes débute à partir d'une lamelle amorphe épissée.

(B) l'élongation se poursuit jusqu'à atteindre la taille critique nécessaire à l'action des enzymes de branchement.

(C) la ramification des chaînes linéaires est aléatoire, à cause de la présence importante des activités de branchement.

(D) simultanément, les activités de débranchement élaguent la structure désordonnée.

(E) l'épissage de la grappe a permis l'obtention de la lamelle amorphe suivante.

Une étape de débranchement semble donc obligatoire pour la synthèse de l'amylopectine. Ball et coll. (1996) proposent un modèle de synthèse de l'amylopectine intégrant l'épissage d'une molécule de préamylopectine et tenant compte des longueurs de chaînes requises pour l'action des enzymes de branchement. Ce modèle discontinu de synthèse de l'amylopectine est présenté dans la figure 6.

2.7) La dégradation de l'amidon.

Contrairement à la synthèse de l'amidon, dont un schéma général commence à se dégager, la dégradation de l'amidon reste encore très obscure. Plusieurs enzymes connues sont susceptibles d'y participer. Toutefois, la façon dont elles interviennent dans un processus, qui démarre d'un grain intact pour aboutir à des oligosaccharides solubles, est loin d'être élucidée.

Que ce soit dans les organes photosynthétiques ou les organes de réserve, les mêmes enzymes interviennent lors de la dégradation. Toutefois, la physiologie de la dégradation est différente dans ces deux types d'organes.

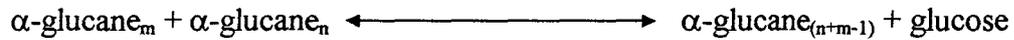
Dans les organes de réserve (tubercules, graines,...), c'est un processus irréversible et continu jusqu'à ce que la totalité de l'amidon soit métabolisée. Cette dégradation s'accompagne de la destruction de l'environnement du grain d'amidon. Dans les cellules de cotylédons de légumes, la membrane des amyloplastes disparaît durant la germination, soumettant l'amidon aux enzymes cytosoliques. Chez les céréales, l'albumen est dégradé durant la germination.

Dans les organes photosynthétiques, le polysaccharide est un amidon transitoire qui est dégradé durant la nuit. Ici, l'intégrité de la cellule et des organites est maintenue.

La dégradation de l'amidon requiert des enzymes coupant les liaisons α -1,4 glucosidiques et les liaisons α -1,6 glucosidiques.

2.7.1) Les enzymes coupant les liaisons glucosidiques α -1,4.

- les endoamylases : elles hydrolysent les liaisons α -1,4, produisant un mélange d'oligosaccharides branchés et linéaires (maltotrioses, maltose, glucose et α -dextrines limite branchées),
- les β -amylases : elles enlèvent successivement des unités maltose à partir de l'extrémité non réductrice des chaînes de glucanes,
- l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) : elle hydrolyse les maltooligosaccharides en glucose,
- les phosphorylases : seuls les glucanes, dont la taille est supérieure au maltotétraose, peuvent être substrats de ces enzymes. Elles libèrent du G1P,
- les glucosyltransférases : elles utilisent les oligosaccharides courts selon la réaction suivante



2.7.2) Les enzymes de débranchement hydrolysant les liaisons α -1,6

Manners (1997) classe les enzymes de débranchement en deux familles selon la spécificité pour le glycogène ou le pullulan (assemblage de maltotrioses liés en α -1,6).

- les limites-dextrinases : encore appelées pullulanases, elles peuvent hydrolyser l'amylopectine et le pullulan, mais pas le glycogène,
- les isoamylases : elles hydrolysent l'amylopectine et le glycogène, mais pas le pullulan.

Les oligosaccharides relargués par l'action des enzymes de débranchement peuvent être utilisés par les amylases ou les phosphorylases.

Mutations	Organismes	Sous-unité affectée	Activité ADP-Glc PPase	Quantité d'amidon accumulé
<i>bt2</i>	Albumen de maïs	Petite sous-unité (55 kDa)	3%	25 à 30%
<i>sh2</i>	Albumen de maïs	Grande sous-unité (60 kDa)	6%	25 à 30%
révertant de <i>sh2</i> par transposition	Albumen de maïs	Mutant allostérique	Diminution de la sensibilité au Pi	15% supplémentaire
<i>rb</i>	Embryon de pois	Grande sous-unité	2,5 à 10%	40 à 70%
<i>adg1</i>	<i>A. thaliana</i>	Absence des deux sous-unités	Aucune activité détectable	Absence d'amidon
<i>adg2</i>	<i>A. thaliana</i>	Grande sous-unité	5%	40%
<i>sta1-1</i>	<i>C. reinhardtii</i>	Grande sous-unité	Défaut d'activation par le 3PGA	5%
<i>glgC16</i>	<i>E. coli</i>	L'unique sous-unité	Sensibilité moindre à ses effecteurs allostériques le F1,6P ₂ et l'AMP	33% de glycogène supplémentaire

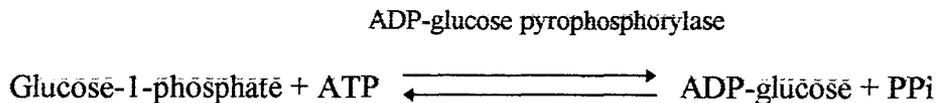
Tableau 2 : Les principaux mutants affectés dans l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.

Organisme	Activateur spécifique	Voie d'assimilation du carbone
Entérobactéries	F1,6P ₂	Glycolyse
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	F6P, pyruvate	Voie d'Entner-Doudoroff
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Pyruvate	Photosynthèse anoxygénique
<i>Rhodobacter spheroides</i>	F1,6P ₂ , pyruvate, F6P	Glycolyse, voie d'Entner-Doudoroff, photosynthèse anoxygénique
Cyanobactéries, algues vertes, végétaux supérieurs	3PGA	Photosynthèse

Tableau 3 : La variation des activateurs allostériques de l'ADP-glucose pyrophosphorylase en fonction de la voie majeure d'assimilation du carbone.

3) L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase catalyse la synthèse ou la pyrophosphorolyse de l'ADP-glucose. Néanmoins, la réaction de synthèse est déplacée loin de son équilibre *in vivo* grâce au clivage du pyrophosphate par la pyrophosphatase alcaline du plaste (Gross et apRees, 1986; Weiner et coll., 1987)



Nous avons vu précédemment que l'ADP-Glc PPase joue un rôle clef dans la voie de biosynthèse de l'amidon. En effet, la quantité de polysaccharide produit dépend directement de son activité. Une réduction de l'activité affecte le taux de synthèse (tableau 2), tandis qu'une augmentation entraîne une accumulation accrue d'amidon (Stark et coll., 1992).

In vivo, une part importante de la modulation de l'activité ADP-Glc PPase intervient au niveau de la régulation allostérique de l'enzyme.

3.1) L'importance de la régulation allostérique de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

L'ADP-Glc PPase intervient dans la synthèse de l'amidon chez les végétaux supérieurs et les algues vertes. Mais, elle est aussi impliquée dans la synthèse du glycogène bactérien. Il est intéressant de noter que les activateurs allostériques de l'enzyme sont étroitement liés à la voie majeure d'assimilation du carbone. Le fructose-1,6-bisphosphate (F1,6P₂), le F6P et le 3PGA sont les activateurs majeurs pour beaucoup d'ADP-Glc PPases. Le tableau 3 résume les propriétés régulatrices des ADP-Glc PPases issues de différentes espèces.

Le 3PGA est un produit de la photosynthèse chez les cyanobactéries, les algues vertes et les plantes supérieures. Il constitue, chez elles, l'activateur le plus actif. Les ADP-Glc PPases des bactéries comme *E. coli* assimilant le glucose par la glycolyse sont principalement activées par le F1,6P₂. Or, la régulation de la voie glycolytique a lieu au niveau de la synthèse du F1,6P₂. Ce dernier n'est pas synthétisé chez les bactéries assimilant le glucose par la voie d'Entner-Doudoroff. Ce sont alors le F6P et le pyruvate qui constituent les activateurs préférentiels. Chez *Rhodospirillum rubrum*, une bactérie anaérobie ne métabolisant pas le glucose, le pyruvate est le produit de la fixation du CO₂ et le seul activateur de l'ADP-Glc PPase. Enfin, une bactérie comme *Rhodobacter spheroides* peut métaboliser le glucose par la

glycolyse ou par la voie d'Entner-Doudoroff, mais elle peut également assimiler le CO₂ comme *R. rubrum* en photosynthèse anaérobie. Son ADP-Glc PPase est activable par les composés intermédiaires de chaque voie : le F1,6P₂, le F6P et le pyruvate.

L'augmentation de la concentration de ces activateurs allostériques constitue, en fait, le signal d'un excès de carbone dans la cellule. La cellule commence alors la synthèse du polysaccharide de réserve considéré, en activant l'ADP-Glc PPase.

Depuis les travaux de Ghosh et Preiss (1966) sur la feuille d'épinard, l'activation par le 3PGA et l'inhibition par le Pi *in vitro* ont été retrouvées pour les ADP-Glc PPases de tissus photosynthétiques de nombreuses espèces. Toutefois, l'activation par le 3PGA n'est pas spécifique des tissus chlorophylliens. En effet, elle est aussi à l'oeuvre dans les amyloplastes, où l'activation de l'enzyme semble être fortement dépendante de la présence de 3PGA (pour revue, Preiss, 1982, 1988).

Chez les végétaux supérieurs, les premières indications d'une régulation allostérique par le 3PGA et le Pi sont apparues *in vitro*. Neuhaus et coll., en 1989, confirment les résultats de Kruckeberg et coll. (1989), avec un mutant de *Clarkia xantiana* touché dans l'activité phosphoglucoisomérase (PGI) cytosolique (18% de l'activité de la souche sauvage). En lumière atténuée, la répartition du carbone issu de la photosynthèse, entre le saccharose et l'amidon est modifiée. En effet, de manière concomitante, la synthèse d'amidon augmente et, la synthèse de saccharose diminue. Les auteurs démontrent que la mutation affecte la concentration en métabolites car le contenu en fructose-2,6-bisphosphate (F2,6P₂) et en 3PGA est doublé. Ces résultats suggèrent qu'une concentration plus forte en 3PGA, et donc un rapport 3PGA/Pi plus élevé conduit à une augmentation de la synthèse d'amidon via l'activation de l'ADP-Glc PPase.

Toujours en 1989, Petersson et Ryde-Pettersson évaluent l'influence de différents métabolites sur l'accumulation d'amidon dans les tissus photosynthétiques, en condition de forte luminosité et de saturation en CO₂. Selon leur conclusion, le 3PGA et le Pi jouent un rôle régulateur essentiel dans la biosynthèse de l'amidon ainsi que, dans une moindre mesure, l'ATP, le GIP et le F6P. Puisque ces métabolites sont *in vitro* les substrats ou les effecteurs de l'ADP-Glc PPase, ces résultats accréditent l'hypothèse d'une régulation de la synthèse d'amidon sous la dépendance du rapport 3PGA/Pi.

Ces résultats ne représentent, cependant, que des preuves indirectes de l'importance de la régulation allostérique. L'existence de mutants de *C. reinhardtii* (Ball et coll., 1991) et du maïs (Giroux et coll., 1996) apportent la preuve directe que cette régulation est fonctionnelle *in vivo*. Les mutants *stal-1* et *stal-2::ARG7* de *C. reinhardtii* possèdent une ADP-Glc PPase

insensible au 3PGA, mais qui reste toujours inhibée par le Pi (Van den Koornhuysse et coll., 1996). Ces souches accumulent seulement 5% de la quantité d'amidon d'une souche sauvage, alors que les activités des enzymes sauvages et mutées, sont comparables en absence d'activateur. Chez les mutants du maïs, l'ADP-Glc PPase de l'albumen est devenue insensible au Pi, ce qui se traduit par une accumulation du polysaccharide supérieure de 15% (Giroux et coll., 1996). Déjà en 1970, MacDonald et Strobel avaient remarqué que des feuilles de blé infectées par le champignon *Fungus striiformis* contenaient une faible teneur en Pi et accumulaient plus d'amidon que des feuilles non infectées

La régulation de la synthèse d'amidon est sous le contrôle de la concentration en 3PGA et en Pi dans le plaste, via leur action allostérique sur l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

3.2) La localisation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

En microscopie, il est facile de voir que les grains d'amidon sont localisés dans les plastes. Qu'en est-il de la localisation de l'ADP-Glc PPase ?

Avant 1978, très peu d'études avaient été menées sur la localisation des enzymes de synthèse de l'amidon dans la cellule. Nous en savons beaucoup plus maintenant grâce à de nombreux travaux faisant appel aux techniques d'immunocytochimie et de fractionnement cellulaire.

3.2.1) La localisation dans les tissus chlorophylliens.

En 1978, Levi et Preiss localisent l'activité ADP-Glc PPase dans les chloroplastes des cellules de feuilles de pois. La même année, Mares et coll. trouvent l'activité confinée aux chloroplastes des cellules de feuilles d'épinard. En 1979, Okita et coll. utilisent des préparations de chloroplastes isolés de feuilles d'épinard et y retrouvent effectivement l'activité ADP-Glc PPase ainsi que les activités amidon-synthétases et les activités de branchement. Enfin, Robinson et Preiss (1987) travaillant sur les cellules de garde de *Commelina communis* affectent les activités ADP-Glc PPase et amidon-synthétases au chloroplaste.

Il est aisé de concevoir que l'ADP-Glc PPase et les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon soient localisées au lieu de synthèse que sont les plastes. Cela semble admis pour les tissus photosynthétiques. Mais, en ce qui concerne les tissus de réserve, la localisation de l'ADP-Glc PPase prête à discussion.

3.2.2) La localisation dans les tissus de réserve.

Jusqu'au début des années 1990, plusieurs travaux confinent l'ADP-Glc PPase dans les amyloplastes.

En 1983, MacDonald et apRees isolent des amyloplastes de soja intacts, très peu contaminés par la fraction cytosolique. Ils montrent que les activités ADP-Glc PPase et amidon-synthétases se situent dans ce compartiment. Par la suite, de nombreux auteurs arrivent à la même conclusion chez de nombreuses espèces : Echeverria et coll. (1985) avec des amyloplastes issus de protoplastes préparés à partir de cellules d'albumen de maïs, 14 à 17 jours après la pollinisation, Journet et Douce (1985) avec des amyloplastes de bourgeons de choux-fleurs, Macheral et coll. (1985) et Journet et coll. (1986) avec des amyloplastes de cellules de Sycomore, ou Entwistle et coll. (1988) et Entwistle et apRees (1988) avec des amyloplastes de cellules d'albumen de blé en croissance.

Mohabir et John en 1988 identifient également l'ADP-Glc PPase dans les amyloplastes de tubercules de pomme de terre. Kim et coll. (1989) confirment ce résultat, par des techniques immunocytochimiques : un anticorps dirigé contre l'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard réagit spécifiquement avec l'ADP-Glc PPase dans les amyloplastes.

Enfin, des travaux sur l'albumen de blé (Tetlow et coll., 1993), sur l'embryon (Denyer et Smith, 1988) et sur les racines de pois (Borchert et coll., 1993) appuient sérieusement la thèse d'une localisation amyloplastique de l'ADP-Glc PPase.

Quelques résultats discordants s'accumulent néanmoins, et sèment le doute, quant à la localisation uniquement plastidique de l'ADP-Glc PPase.

De nombreuses plantes possèdent plusieurs isoformes des petites et grandes sous-unités de l'ADP-Glc PPase. Ces isoformes sont les produits de gènes différents dont l'expression est généralement spécifique du tissu (chez le riz : Nakamura et Kawaguchi, 1992; chez l'orge : Villand et coll., 1992; chez la pomme de terre : Okita et coll., 1990; La Cognata et coll., 1995).

L'étude des transcrits de ces multiples gènes laisse présager une localisation cytosolique de l'ADP-Glc PPase, dans certains organes de réserve. Les ADNc codant les petites sous-unités d'ADP-Glc PPase d'albumen de maïs et de blé ont, apparemment, perdu la séquence correspondant au peptide de transit (Villand et Kleczkowski, 1994). Chez l'orge, il n'existe qu'un seul gène pour deux transcrits de la petite sous-unité (Thorbjørnsen et coll., 1996a). Ceux-ci sont produits par un épissage alternatif et diffèrent par leur extrémité 5'. Un des transcrits apparaît abondant dans les feuilles et contient les motifs caractéristiques des peptides

de transit. Par contre, le second transcrit, abondamment exprimé dans l'albumen, ne possède pas ces motifs.

De plus, la maturation des petites et grandes sous-unités de l'albumen de maïs et d'orge ne paraît pas faire appel au clivage d'un peptide de transit. En effet, les masses moléculaires des sous-unités isolées d'extraits végétaux ainsi que les masses moléculaires des sous-unités obtenues par traduction *in vitro* (Giroux et Hannah, 1994) ou par expression de l'ADNc dans *E. coli* (Villand et Kleczkowski, 1994) sont identiques. Une ADP-Glc PPase composée de ces deux sous-unités ne possédant pas de peptide de transit pourrait de ce fait être cytosolique.

Des études réalisées sur des préparations d'amyloplastes renforcent cette hypothèse. Des amyloplastes isolés de cellules de Sycomore en culture peuvent importer de l'ADP-Glc et l'utiliser comme substrat pour la synthèse d'amidon (Pozueta-Romero et coll., 1991b). Il en est de même pour des amyloplastes isolés de cellules d'albumen de blé (Tetlow et coll., 1994).

Ces faits à eux seuls ne suffisent pas, pour conclure à l'existence d'une ADP-Glc PPase cytosolique. Toutefois, deux articles de 1996 sont venus donner plus de poids à cette hypothèse. Thorbjørnsen et coll. (1996b) ont isolé des amyloplastes intacts provenant de cellules d'albumen d'orge, 11 à 13 jours après la pollinisation. Ils ont comparé l'activité ADP-Glc PPase dans les plastes avec des activités enzymatiques spécifiquement plastidiques ou cytosoliques. Ils en ont conclu que 85% de l'activité ADP-Glc PPase se situe dans le cytosol. Leurs études immunologiques démontrent que les petites sous-unités de la forme cytosolique et de la forme plastidique sont différentes et, que la forme cytosolique est codée par le transcrit exprimé abondamment dans l'albumen. Les auteurs proposent alors que la plus grande partie de l'activité ADP-Glc PPase dans l'albumen d'orge est extraplastidiale et que les deux sous-unités de la forme cytosolique sont codées par les transcrits exprimés de manière abondante dans l'albumen. Bien que l'activité plastidique représente une faible part de l'activité totale, elle est encore suffisante pour contrôler le flux de carbone vers la synthèse d'amidon à ce stade de développement. Quel est donc le rôle exact de la forme cytosolique dans l'albumen d'orge ?

Denyer et coll. (1996a) ont, quant à eux, étudié la localisation de l'ADP-Glc PPase, dans l'albumen de jeunes grains de maïs en croissance (11 à 17 jours après la pollinisation). La plupart de l'activité (94%) se situe en dehors de l'amyloplaste. L'activité plastidique, dans ce cas, ne reflète pas, à elle seule, le taux de synthèse d'amidon observé dans l'albumen. Les deux participent donc nécessairement à cette synthèse. L'anticorps dirigé contre le produit du gène *BT2* (*brittle2*, petite sous-unité de l'albumen de maïs; Giroux et Hannah, 1994) réagit

fortement avec la petite sous-unité de la forme cytosolique et faiblement avec la petite sous-unité de la forme plastidiale. Chez le mutant *bt2*, seule l'hybridation avec la petite sous-unité plastidiale est maintenue. Le gène *BT2* coderait donc la petite sous-unité cytosolique. L'existence d'une activité ADP-Glc PPase résiduelle de 3% chez le mutant *bt2*, ainsi qu'une accumulation d'amidon de 25 à 30% de la normale pourraient s'expliquer par le maintien de l'activité ADP-Glc PPase plastidiale. Dernièrement, Shannon et coll. (1998) ont étudié la compartimentation de l'ADP-Glc PPase dans des grains plus âgés (20 jours après la pollinisation). Ils confirment les résultats de Denyer et coll.(1996a), en retrouvant 90% de l'activité ADP-Glc PPase dans le cytosol, et en attribuant aux protéines BT2 et SH2 une localisation majoritairement cytoplasmique.

Récemment, Chen et al. (1998) ont montré par immunocytochimie, dans des péricarpes en croissance de tomates, une localisation de l'ADP-Glc PPase aussi bien cytosolique que plastidiale. Néanmoins, la majorité de l'ADP-Glc PPase apparaît résider dans les amyloplastes.

3.2.3) La source de carbone utilisée et la localisation de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.

Dans les chloroplastes, l'apport des hexoses-phosphates nécessaires à la synthèse d'amidon, est directement relié à la photosynthèse et à la néoglucogenèse, deux phénomènes se déroulant eux-même dans le plaste.

Il en va autrement pour les amyloplastes. Le saccharose, produit dans le cytoplasme des feuilles, est exporté vers les amyloplastes et fournit le carbone nécessaire à la synthèse d'amidon.

Ici, deux cas se présentent. Si l'activité ADP-Glc PPase se situe dans l'amyloplaste, ce dernier est obligé d'importer le G1P ou tout précurseur du G1P pour la synthèse de l'ADP-Glc. Par contre, si l'enzyme est cytosolique, l'amyloplaste doit importer impérativement l'ADP-Glc.

Source de carbone et activité ADP-glucose pyrophosphorylase plastidiale

Le principal système de transport de carbone dans les chloroplastes consiste en l'échange des trioses-phosphates, issus du cycle de Calvin, contre du Pi, via un transporteur spécifique (Heber et Heldt, 1981). Quelques résultats vont dans le sens d'un système de transport similaire, permettant l'entrée des trioses-phosphates issus de la dégradation du saccharose, dans les amyloplastes. En 1988, Echeveria et coll. mettent en évidence une incorporation de trioses-phosphates marqués, dans l'amidon des amyloplastes d'albumen de maïs. D'après Mohabir et John (1988), ce type de transporteur existerait dans les amyloplastes

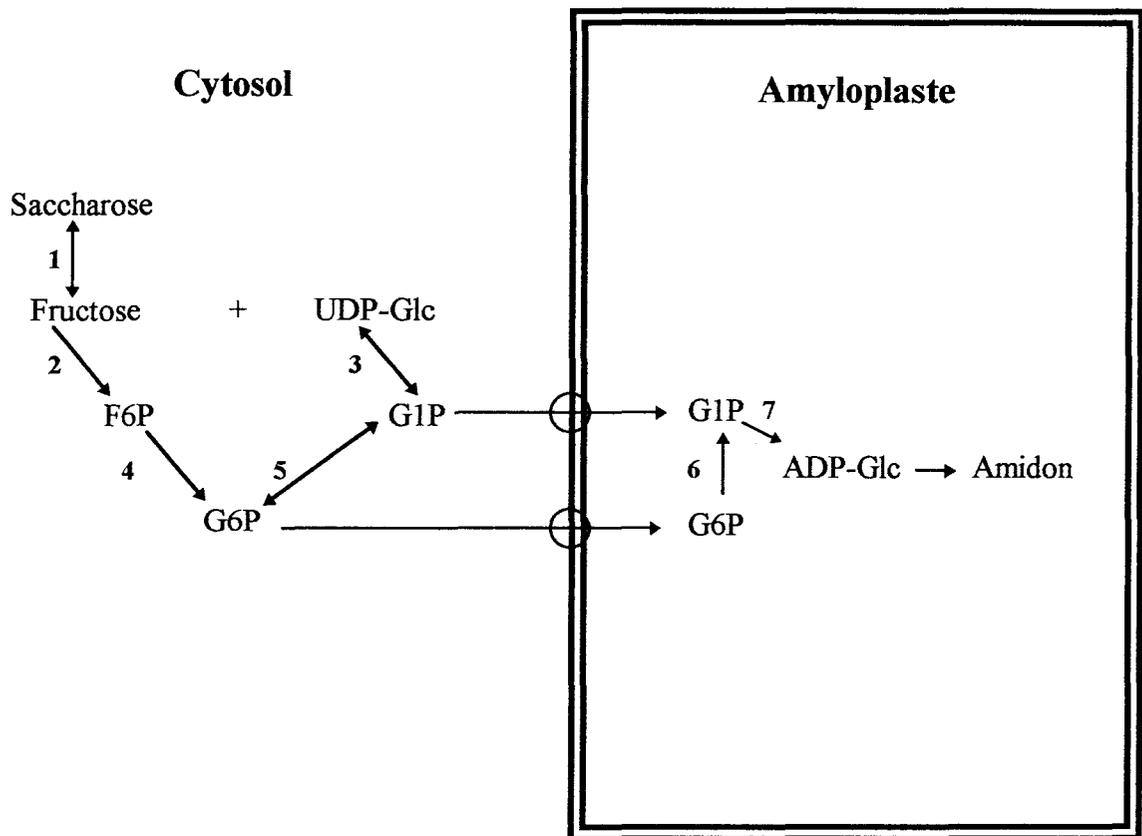


Figure 7 : L'apport de carbone dans les amyloplastes par la voie des hexoses-phosphates.

Dans le cytosol, le saccharose est métabolisé en G1P et G6P. Ils sont alors transportés à travers la membrane amyloplastique par des transporteurs spécifiques (représentés par ○)

Les enzymes impliquées sont les suivantes :

- | | | |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| 1 : saccharose-synthétase | 2 : fructokinase | 3 : UDP-glucose pyrophosphorylase |
| 4 : hexoses-phosphates isomérase | 5 : phosphoglucomutase | 6 : phosphoglucomutase |
| 7 : ADP-glucose pyrophosphorylase | | |

de tubercule de pomme de terre. Enfin, des amyloplastés de cellules de racines de pois possèdent un transporteur pouvant échanger le Pi avec le G6P, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le 3PGA. Ce transporteur possède une affinité plus forte avec le Pi et le DHAP puis avec le 3PGA et le G6P (Borchert et coll., 1989)

D'autres travaux suggèrent l'existence d'un système de transport différent. Dans l'albumen de blé, la fructose-1,6 bisphosphatase amyloplastique est absente. Or, celle-ci est requise si le système trioses-phosphates/Pi est fonctionnel car elle permet le recyclage du F1,6P issu de la condensation de deux trioses-phosphates : le DHAP et le 3 phosphoglycéraldéhyde (3PG) (Entwistle et apRees, 1988). Pour Keeling et coll. (1988), l'importation d'hexoses-phosphates représente le système majeur de transport du carbone dans les amyloplastés d'albumen de blé. Ils ont étudié la répartition du ^{13}C issu de glucoses marqués en position 1 et 6, dans la voie de biosynthèse conduisant des trioses-phosphates aux hexoses-phosphates. La synthèse de trioses-phosphates à partir du glucose puis, la production subséquente d'hexoses-phosphates à partir des trioses-phosphates, a bien lieu, mais uniquement dans le cytosol. De même, Tyson et apRees (1988), en incubant des amyloplastés intacts d'albumen de blé avec différentes molécules marquées au ^{14}C , prouvent que seul le G1P est incorporé dans l'amidon. De nombreux travaux mettent en évidence l'import d'hexoses-phosphates dans les amyloplastés de pomme de terre (Viola et coll., 1991), d'albumen de maïs (Hatzfeld et Stitt, 1990), de cellules de soja (Coates et apRees, 1994) et de cotylédons de pois (Hill et Smith, 1991).

Ces résultats semblent indiquer que la voie des hexoses-phosphates prédomine, non seulement dans les amyloplastés d'albumen de blé, mais aussi dans les amyloplastés d'embryons de pois, d'albumen de maïs et de tubercules de pomme de terre. L'apport du carbone dans les amyloplastés selon la voie des hexoses-phosphates est schématisé dans la figure 7.

Source de carbone et activité ADP-glucose pyrophosphorylase cytosolique

Une activité ADP-Glc PPase cytosolique implique l'existence d'un système de transport de l'ADP-Glc à travers la membrane de l'amyloplaste. Le transporteur d'adénylate BT1 pourrait remplir cette fonction. Le gène *BT1* (*brittle1*) code une protéine associée à la membrane plastidique dans l'albumen de maïs en croissance (Cao et coll., 1995; Sullivan et Kaneko, 1995). La séquence en acides aminés déduite fait apparaître des similitudes avec des transporteurs connus de nucléotides adénylés (Sullivan et coll., 1991).

Cytosol

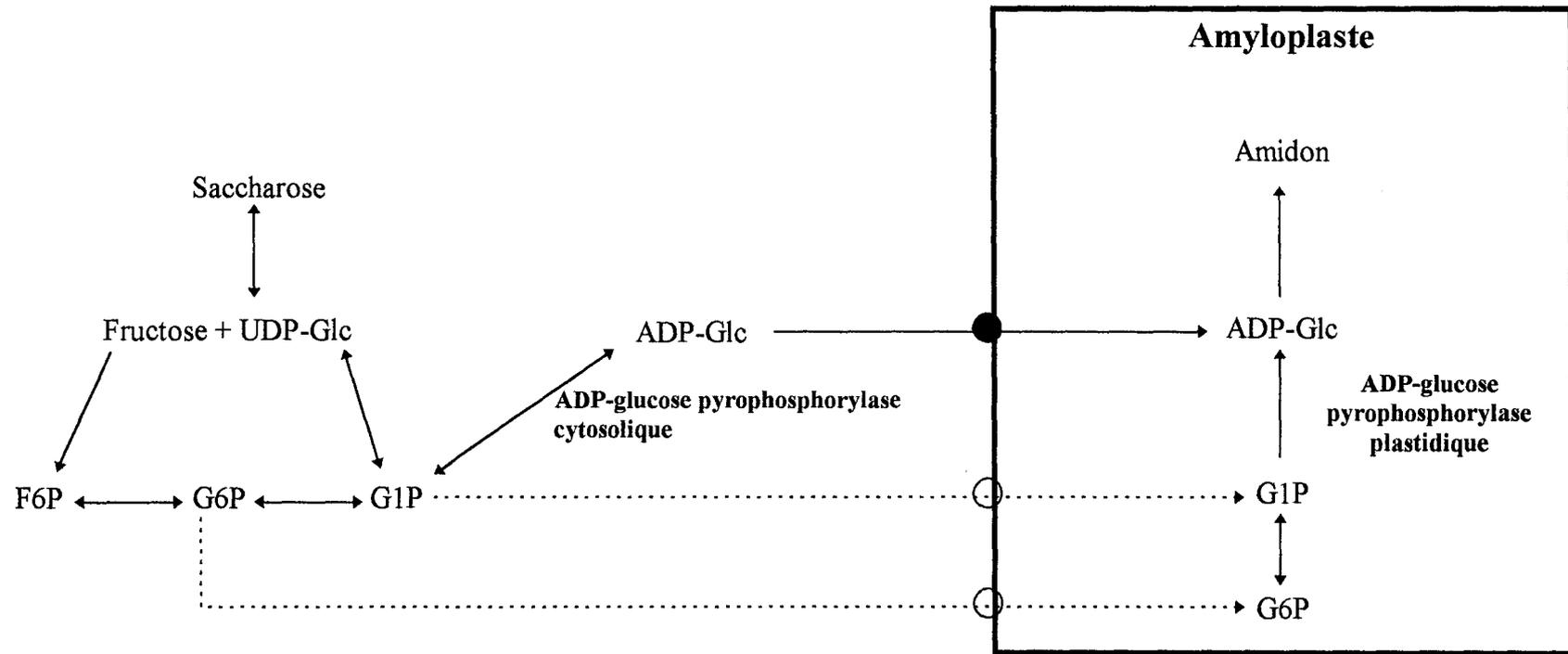


Figure 8 : Un modèle de la voie conduisant du saccharose à l'amidon dans l'albumen de maïs en développement (Denyer et coll., 1996). Ce modèle montre le rôle des formes cytosoliques et plastidiales des ADP-glucose pyrophosphorylases. Les flèches à deux points représentent les réactions réversibles *in vivo*. Les flèches en pointillés indiquent la possible voie de translocation des hexoses phosphates dans l'amyloplaste.

● transporteur BT1

○ transporteurs d'hexoses-phosphates

Une mutation au locus *BT1* a pour conséquence une réduction de l'accumulation d'amidon et une augmentation du contenu en ADP-Glc de l'albumen immature (Shannon et coll., 1996). Shannon et coll. (1998) ont étudié l'entrée d'ADP glucose marqué au ^{14}C et son utilisation, dans la synthèse d'amidon dans des amyloplastes d'albumen de maïs normaux et porteurs de la mutation *bt1*. L'efficacité du transport et de l'incorporation dans l'amidon sont réduits de 74% pour le mutant *bt1*. Un tel phénotype se justifie, si la forme cytosolique de l'ADP-Glc PPase joue un rôle majeur dans la synthèse de l'amidon.

Denyer et coll. (1996a) ont proposé un modèle prenant en compte l'existence du transporteur BT1 pour expliquer l'apport de carbone dans les amyloplastes d'albumen de maïs en croissance (figure 8).

La raison d'être de l'ADP-Glc PPase cytosolique reste encore à déterminer. Quoiqu'il en soit, cette hypothèse ne remet pas en cause le rôle limitant de l'ADP-Glc PPase dans la voie de biosynthèse de l'amidon.

3.3) La structure de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

De nombreuses ADP-Glc PPases bactériennes ont été purifiées, et leur structure déterminée. L'enzyme native est tétramérique et possède un seul type de sous-unité dont la masse moléculaire varie entre 49 et 54 kDa.

Chez les végétaux supérieurs, la structure tétramérique est conservée. Néanmoins, de nombreuses études biochimiques et immunologiques ont montré que l'ADP-Glc PPase des végétaux supérieurs est composée de deux sous-unités distinctes. Ces deux sous-unités sont communément appelées petite et grande sous-unités.

L'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard a été la première enzyme purifiée à homogénéité chez les végétaux supérieurs (Morell et coll., 1987). Elle est formée de deux sous-unités de 51 et 54 kDa qui diffèrent par leur composition en acides aminés et par leurs propriétés antigéniques.

Les anticorps dirigés contre l'enzyme native de feuille d'épinard ou contre ses sous-unités ont été utilisés dans de nombreux travaux concernant la structure de l'ADP-Glc PPase chez différentes espèces (albumen de maïs : Preiss et coll., 1990; tubercule de pomme de terre : Okita et coll., 1990; *A. thaliana* : Li et Preiss, 1992; *C. reinhardtii* : Iglesias et coll., 1994), la localisation de l'ADP-Glc PPase (Kim et coll., 1989) ou encore la variabilité de l'enzyme dans différents tissus d'une même plante (Krishnan et coll., 1986).

Organismes	site de liaison au G1P	site de liaison à l'ATP
Procaryotes		
<i>Escherichia coli</i>	I I E F V E K P - A N	W Y R G T A D A V
<i>Salmonella typhimurium</i>	* * D * * * * * - * *	* * * * * * * * *
<i>Anabaena</i>	V * D * S * * * K G E	* F Q * * * * * *
<i>Synechocystis</i>	* T D * S * * * Q G E	* F Q * * * * * *
Petite sous-unité des plantes		
feuille d'épinard, 51 kDa	* * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
tubercule de pomme de terre, 50 kDa	* * * * A * * * Q G E	* F Q * * * * * *
albumen de maïs, 54 kDa	* * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
<i>Arabidopsis thaliana</i>	* * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
albumen de blé	* * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
Grande sous-unité des plantes		
feuille d'épinard, 54 kDa	V L S * S * * * K G D	* F Q * * * * * *
tubercule de pomme de terre, 51 kDa	V V Q * A * * * K G F	* F Q * * * * * *
albumen de maïs, 60 kDa	V L Q * F * * * K G A	* F Q * * * * S I
<i>Arabidopsis thaliana</i>	V * S F S * * * K G D	* F Q * * * * * L
albumen de blé	V V Q * S * Q * K G D	* F R * * * * * W

Tableau 4 : La conservation des séquences correspondant aux sites de liaisons au G1P et à l'ATP de l'ADP-glucose pyrophosphorylase d'*E.coli* (Hill et coll., 1991; Kumar et coll., 1988) chez différentes espèces.

* : acide aminé identique à celui trouvé dans l'enzyme d'*E. coli*.

De nombreux ADNc et clones génomiques ont maintenant été obtenus pour les deux sous-unités, par criblage de banques d'expression ou de banques d'ADNc, ou encore par PCR. La comparaison des séquences en acides aminés déduites (Smith-White et Preiss, 1992) fait apparaître une forte identité entre les petites sous-unités des différentes espèces (85-95%). Par contre, les homologies paraissent beaucoup moins fortes pour les grandes sous-unités (50-60%). Cette grande similitude entre les petites sous-unités était un résultat escompté, puisque l'anticorps dirigé contre la petite sous-unité de feuille d'épinard réagit fortement avec les sous-unités équivalentes de l'enzyme d'albumen de maïs (Preiss et coll., 1990), d'embryon de riz (Krishnan et coll., 1986; Anderson et coll., 1989), de feuilles d'*A. thaliana* (Lin et coll., 1988a,b) et de tubercule de pomme de terre (Okita et coll., 1990).

Les petites et grandes sous-unités des végétaux supérieurs présentent, entre elles, une homologie de 40 à 60%. Avec les sous-unités d'entérobactéries, cette homologie est faible. Cependant, l'existence de régions fortement conservées suggère une origine commune des gènes (Smith-White et Preiss, 1992).

Sur la base des homologies partagées, entre les deux types de sous-unités, et avec les sous-unités bactériennes, Preiss propose que petites et grandes sous-unités proviennent d'un gène ancestral unique issu des bactéries et dupliqué au cours de l'évolution.

Comme chez les entérobactéries l'enzyme des cyanobactéries est un homotétramère mais sa séquence protéique est plus proche de la séquence des petites sous-unités des végétaux supérieurs que de celle d'*E. coli*. L'ADP-Glc PPase des cyanobactéries est activée par le 3PGA et inhibée par le Pi comme celle des végétaux supérieurs. Donc, la régulation par ces deux métabolites n'est pas relié à la nature hétérotétramérique de l'enzyme.

3.4) Quels sont les sites catalytiques et les sites de régulation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase ?

Les deux techniques principalement utilisées pour localiser les sites de régulation et les sites catalytiques sont la modification chimique à l'aide d'analogues structuraux et la mutagenèse dirigée.

Elles ont permis de montrer que chez *E. coli*, le résidu lysine en position 195 est impliqué dans la liaison au G1P (Parsons et Preiss, 1978; Hill et coll., 1991). Ce résidu est fortement conservé, aussi bien chez les enzymes bactériennes que dans les petites et grandes sous-unités des plantes (tableau 4). Fu et coll. (1998a) ont étudié la fonction de cette lysine dans l'ADP-Glc PPase recombinante de tubercule de pomme de terre (respectivement Lys 198 et Lys 293 pour les petite et grande sous-unités) exprimée chez *E. coli*. Par mutagenèse

	Site d'activation 1	Site d'activation 2
<i>Anabaena</i>	SGIVVVL <u>K</u> NAVITDGTII	QRRAIID <u>K</u> NAR
<i>Synechocystis</i>	NGIVVVIK <u>N</u> VTIADGTVI	IRRAIID <u>K</u> NAR
Petite sous-unité de plantes		
tubercule de pomme de terre, 50 kDa	SGIVTVIK <u>D</u> DALIPSGIII	IKRAIID <u>K</u> NAR
feuille d'épinard, 51 kDa	SGIVTVIK <u>D</u> DALIPSGTVI	IKRAIID <u>K</u> NAR
albumen de maïs, 54 kDa	GGIVVVIK <u>D</u> DALLPSGTVI	IKRAIID <u>K</u> NAR
grain de blé	SGIVTVIK <u>D</u> DALLPSGTVI	IKRAIID <u>K</u> NAR
Grande sous-unité de plantes		
tubercule de pomme de terre, 51 kDa	SGIIIIILE <u>K</u> ATIRDGTVI	IRKCIID <u>K</u> NAK
feuille d'épinard, 54 kDa	SGITVIFK <u>Q</u> ATIKDGVV	IKRAIID <u>K</u> NAR
albumen de maïs, 60 kDa	SGIVVILK <u>N</u> ATINECLVI	IRNCIID <u>M</u> NAR
grain de blé	SGIVVIQ <u>K</u> NATIKDGTVV	IQNCIID <u>K</u> NAR
albumen d'orge	SGIVVIQ <u>K</u> NATIKDGTVV	ISNCIID <u>M</u> NAR

Tableau 5 ; Les sites de liaisons au 3PGA chez les ADP-glucose pyrophosphorylases de cyanobactéries et de plantes.

Les résidus lysine soulignés sont soit ceux covalamment modifiés par le pyridoxal-phosphate et dont la modification chimique est empêchée par le 3PGA et le Pi ou, ceux identifiés par mutagenèse dirigée comme intervenant dans la liaison au 3PGA.

dirigée, la lysine a été remplacée de manière conservative ou non, par différents acides aminés. Les sous-unités mutées ont été exprimées ensemble ou séparément. Les auteurs concluent que la Lys 198 de la petite sous-unité participe à la liaison au G1P, alors que la Lys 293 de la grande sous-unité n'est pas du tout requise.

La tyrosine 114 de l'ADP-Glc PPase d'*E. coli* se lie à la partie adénylée de l'ATP (Lee et Preiss, 1986). La région de 9 acides aminés, à laquelle elle appartient, est fortement conservée chez différentes espèces de bactéries et de plantes (petites et grandes sous-unités) (tableau 4). Cette conservation indique que cette région pourrait être importante pour l'activité ADP-Glc PPase des plantes et, devrait probablement assurer le même rôle que chez *E. coli*. Aucune étude de mutagenèse dirigée n'a pour l'instant été réalisée pour vérifier cette hypothèse.

Le pyridoxal-5-phosphate (PLP) sert d'analogue au 3PGA ou à des sucres phosphorylés. Il se lie covalamment aux enzymes après réduction par le NaBH₄. Dans l'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard, deux lysines semblent importantes pour l'activation allostérique : une lysine à l'extrémité carboxy-terminale de la petite sous-unité (site d'activation 1) et une lysine appartenant à la grande sous-unité (site d'activation 2) (Morell et coll., 1988; Preiss et coll., 1992; Ball et Preiss, 1994). La modification chimique par le PLP de ces résidus est empêchée en présence de 3PGA ou en présence de Pi. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'enzyme d'*Anabaena* (Charnig et coll., 1994). Deux lysines appartenant aux régions homologues aux sites d'activation 1 et 2 de l'ADP-Glc PPase de la feuille d'épinard participeraient à la liaison au 3PGA. Par mutagenèse dirigée, les lysines correspondantes des sous-unités de l'enzyme du tubercule de pomme de terre ont été modifiées (Ballicora et coll., 1998). Les affinités pour le 3PGA et pour le Pi diminuent très fortement quand les lysines de la petite sous-unité sont transformées en alanine ou en acide glutamique. Par contre, l'inhibition par le Pi n'est pas altérée et la baisse de l'affinité pour le 3PGA n'est pas aussi marquée si la grande sous-unité est modifiée. Les deux lysines de la petite sous-unité semblent, apparemment, plus importantes pour la régulation de l'ADP-Glc PPase que leurs homologues dans la grande sous-unité.

De plus, la région entourant ces deux lysines présente un haut degré de similitude chez différentes espèces (tableau 5). Cette conservation suggère que cette région est requise pour la fonction allostérique normale de la protéine. En effet, dans l'ADP-Glc PPase de tubercule de pomme de terre, l'acide aspartique en position 413 de la grande sous-unité, juste adjacent à la

lysine du site d'activation 2 s'avère indispensable à l'activation allostérique par le 3PGA (Greene et coll., 1996).

Le phénylglyoxal est un composé permettant de repérer les résidus arginine importants pour la fonction d'une protéine. L'inactivation de l'ADP-Glc PPase de feuille d'épinard, par ce composé, est empêchée en présence de 3PGA ou de Pi (Ball et Preiss, 1992). Un ou plusieurs résidus arginine sont donc proches, ou appartiennent aux sites allostériques de l'enzyme de feuille d'épinard. D'après les comparaisons de séquence, cinq résidus arginine apparaissent fortement conservés chez les plantes supérieures et *Anabaena* mais pas chez les entérobactéries. Ces cinq résidus ont été transformés en résidus alanine par mutagenèse dirigée chez *Anabaena* (Sheng et Preiss, 1998). La mutation à la position 294 a pour conséquence une réduction très importante de l'affinité pour le Pi.

3.5) Quelle est la fonction des deux sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase ?

L'obtention d'une ADP-Glc PPase recombinante, chez une souche mutante d'*E. coli* dépourvue d'activité, a apporté une meilleure compréhension quant à la fonction de chaque sous-unité.

Les deux ADNc codant pour les grande et petite sous-unités matures du tubercule de pomme de terre ont été exprimés chez *E. coli*, soit ensemble, soit séparément (Iglesias et coll., 1993; Ballicora et coll., 1995). Quand les deux sous-unités sont exprimées simultanément, les propriétés cinétiques de l'enzyme sont similaires à celles de l'enzyme purifiée du tubercule de pomme de terre. L'activité est très faible, quand la grande sous-unité est seule. L'expression de la petite sous-unité seule conduit à la formation d'un homotétramère dont l'activité n'est pas négligeable en présence d'une forte concentration en 3PGA. L'affinité de cet homotétramère pour le 3PGA est plus faible que celle de l'hétérotétramère. Sa sensibilité au Pi est également plus importante (une concentration en Pi huit fois inférieure à celle utilisée pour l'hétérotétramère inhibe l'activité de 50%). En revanche, les Km pour les substrats (G1P et ATP) et pour le Mg²⁺ sont comparables à ceux de l'enzyme normale.

Pour une forte concentration en 3PGA, l'activité en absence de la grande sous-unité est significative, et la grande sous-unité seule engendre une activité très réduite. De plus, la protéine recombinante composée de ses deux sous-unités possède les mêmes constantes cinétiques que l'enzyme native. **Ces résultats suggèrent que la petite sous-unité possède la fonction de catalyse et que la grande sous-unité est associée pour réguler son activité.**

Elle augmenterait l'affinité de l'enzyme pour le 3PGA et réduirait son affinité pour le Pi.

Les résultats de Fu et coll. (1998; paragraphe précédent) démontrant que seule la petite sous-unité est impliquée dans la liaison au G1P renforce cette hypothèse.

La grande sous-unité semble jouer un rôle très important dans la régulation car, sa présence dans l'hétérotétramère augmente l'affinité pour le 3PGA. Selon les travaux de Ballicora et coll. (1995), celle-ci possède un site de régulation avec une affinité plus forte. Cependant, leurs dernières données (Ballicora et coll, 1998; paragraphe précédent) suggèrent tout autre chose. **Les sites potentiels d'activation de la grande sous-unité ne seraient pas aussi importants pour la régulation. L'interaction avec la petite sous-unité permettrait, en fait, à cette dernière d'augmenter son affinité pour le 3PGA.**

3.6) L'association des deux sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

Très peu d'informations sont disponibles concernant le mécanisme d'assemblage des ADP-Glc PPases des végétaux supérieurs. Giroux et Hannah (1994) ont montré dans l'albumen de maïs, que la stabilité des sous-unités SH2 ou BT2 est dépendante de la présence de l'autre sous-unité. Greene et Hannah (1998) ont tenté de déterminer les motifs nécessaires à l'assemblage de l'enzyme, dans les sous-unités SH2 et BT2. Ils ont exprimé pour cela les deux sous-unités dans un système double-hybride chez la levure. Aucune interaction SH2-SH2 ou BT2-BT2 n'a lieu. La petite sous-unité BT2 semble fondamentalement différente de celle de pomme de terre capable de former des homotétramères (Ballicora et coll., 1995).

Leurs expériences de délétion et de mutagenèse chimique suggèrent que les parties amino et carboxy-terminales des deux sous-unités sont essentielles pour une interaction efficace. Deux résidus ont été identifiés comme nécessaires pour l'assemblage : l'alanine en position 245 et la glycine en position 455. Notons qu'ils sont également fortement conservés dans les ADP-Glc PPases de nombreuses espèces.

Lin et coll. (1988a) ont décrit la mutation *adg1-1* chez *A. thaliana*. Les deux sous-unités sont absentes chez les mutants. Aucune activité ADP-Glc PPase n'est détectée. Toutefois, l'activité et la présence des deux sous-unités sont restaurées dans les plantes hétérozygotes *adg1-1/ADG1*. Ils ont, par conséquent, postulé que *ADG1* était un gène de régulation affectant l'expression des deux sous-unités.

En 1998, Wang et coll. montrent, par complémentation, que *ADG1* est, en fait, le gène de la petite sous-unité. Chez les mutants *adg1-1*, l'ARNm de la grande sous-unité est présent et celui de la petite absent. Par contre, en Western Blot les deux sous-unités sont absentes. Donc,

chez *A. thaliana* la présence d'une petite sous-unité fonctionnelle est requise pour la stabilité de la grande sous-unité. En absence de la petite sous-unité, la grande serait instable dans le chloroplaste. Par contre, en absence de la grande sous-unité, les petites formeraient un homotétramère (Li et Preiss, 1992). Sur la base de ces informations, Wang et coll. (1998) proposent que l'initiation de l'assemblage de l'ADP-Glc PPase a lieu par la constitution d'un dimère de petites sous-unités. Ce dimère peut, alors, interagir avec les grandes ou les petites sous-unités. Dans le cas de l'absence des grandes, un homotétramère se forme.

3.7) Le contrôle de l'expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

Très peu de données concernant la régulation de l'expression de l'ADP-Glc PPase sont disponibles. Les derniers travaux sont déjà anciens, puisqu'ils datent de 1995.

3.7.1) La régulation transcriptionnelle dans les organes de réserve.

L'existence d'un contrôle transcriptionnel a d'abord été mis en évidence par Reeves et coll. (1986), dans l'albumen de blé en croissance. Ils ont comparé l'activité de l'ADP-Glc PPase et l'expression de ses ARNm durant le développement du grain. Ils révèlent l'existence d'une coordination directe entre la quantité de transcrits, la teneur en enzyme et l'accumulation d'amidon.

Un résultat similaire a été obtenu pour l'albumen de riz. Le taux de transcrits de la petite sous-unité, dans l'albumen en croissance (Anderson et coll., 1991), est en relation directe avec l'accumulation d'amidon observée durant la même période (Perez et coll., 1975). De même, l'analyse temporelle de l'expression de l'ADP-Glc PPase du tubercule de pomme de terre révèle une expression coordonnée des transcrits de la petite sous-unité et de la grande sous-unité avec les polypeptides correspondants (Nakata et Okita, 1995). Durant la même période, une activité importante est mesurée (Sowokinos et Preiss, 1982; Okita et coll., 1990).

Dans les tissus de réserve, l'expression de l'ADP-Glc PPase semble, par conséquent, contrôlée au niveau transcriptionnel.

Ce résultat pouvait être anticipé. En effet, dans les organes de réserve de certaines plantes, il existe des ADP-Glc PPases beaucoup moins sensibles, *in vitro*, au contrôle allostérique par le 3PGA (pour l'orge : Kleczkowski et coll., 1993; pour le blé; pour le pois : Hylton et Smith, 1992). Cette régulation transcriptionnelle pourrait suppléer au contrôle allostérique de l'enzyme. De plus, les amyloplastes ne semblent pas importer des trioses-phosphates mais, au contraire, des hexoses-phosphates comme source de carbone. Le

rôle du 3PGA, *in vivo*, dans l'activation allostérique, pourrait, de ce fait, ne pas être aussi important que dans les organes photosynthétiques.

3.7.2) Le contrôle allostérique de l'ADP-Glc pyrophosphorylase semble être la régulation dominante dans la feuille de pomme de terre.

Nakata et Okita (1995) ont réalisé le même type d'expériences que précédemment dans la feuille de pomme de terre. La synthèse d'amidon dans la feuille fluctue en réponse à la photosynthèse. Les niveaux en ARNm de la petite et de la grande sous-unités augmentent en corrélation avec l'augmentation de la synthèse d'amidon. Mais, le taux de protéines, ainsi que l'activité ADP-Glc PPase, restent relativement constants dans le temps.

Dans le cas des organes photosynthétiques, le contrôle le plus important de l'activité serait la régulation allostérique. En réponse à la photosynthèse, la concentration en 3PGA augmente et celle en Pi diminue, permettant une activité accrue de l'ADP-Glc PPase, sans qu'une augmentation de la quantité en protéine soit nécessaire.

Un troisième mécanisme de régulation, celui-ci post-traductionnelle serait susceptible d'intervenir. Une thiorédoxine activerait l'ADP-Glc PPase de la feuille de pomme de terre (Fu et coll., 1998b). Elle réduirait un pont disulfure impliquant les cystéines 12 des sous-unités catalytiques, rendant l'enzyme plus affine pour le 3PGA.

3.8) L'expression de l'ADP-glucose pyrophosphorylase est spécifique du tissu.

Plusieurs espèces de plantes contiennent des isoformes différentes de chacune des sous-unités. Leur expression est généralement spécifique d'un tissu.

Quatre transcrits ont été identifiés dans la pomme de terre : trois codent des grandes sous-unités et un code une petite sous-unité (La Cognata et coll., 1995). Les trois gènes des grandes sous-unités sont exprimés dans les tubercules, mais seulement deux sur trois le sont dans les feuilles.

Dans le pois, deux gènes de petites sous-unités sont révélés dans l'embryon. Un seul, retrouvé par ailleurs en grande quantité, apparaît spécifique de l'embryon. L'autre est exprimé dans les feuilles et les cosses (Weber et coll., 1995).

Dans le maïs, trois gènes de petites sous-unités et deux gènes de grandes sous-unités ont été identifiés. Un des transcrits de la petite sous-unité (*BRITTLE2*) est présent seulement dans l'albumen; le second transcrit *AGP1* est localisé dans l'embryon et faiblement représenté dans l'albumen. L'expression du troisième gène est détectée seulement dans les feuilles (Giroux et Hannah, 1994; Prioul et coll., 1994). En ce qui concerne la grande sous-unité, un des transcrits est fortement exprimé dans l'albumen (*SHRUNKEN2*), tandis que le second l'est faiblement (*AGP2*) (Giroux et Hannah, 1994).

Pour Giroux et Hannah (1994), *AGP1* et *AGP2* sont responsables de l'activité ADP-Glc PPase résiduelle trouvée chez les mutants *sh2* et *bt2*. Denyer et coll (1996a), émettent quant à eux, l'hypothèse que la forme plastidiale de l'ADP-Glc PPase est codée par ces deux gènes (la forme cytosolique étant composée des deux sous-unités *BRITTLE2* et *SHRUNKEN2*).

Chez l'orge, il y aurait deux gènes codant les grandes sous-unités : un dont l'expression est spécifique à l'albumen et le second spécifique aux feuilles. Par contre, un seul gène code la petite sous-unité (Villand et coll., 1992; Thorbjørnsen et coll., 1996a). Mais, il apparaît que ce gène, par épissage alternatif, est à l'origine de deux transcrits identiques à 90%, différant par leurs extrémités 5'. Un transcrit est retrouvé seulement dans l'albumen, et l'autre à la fois dans les feuilles et l'albumen.

Dans un même tissu, différentes isoformes d'une même sous-unité coexistent. Une petite sous-unité peut-elle interagir avec n'importe quelle grandes sous-unités (et vice versa)? Quelles en seraient les conséquences sur les propriétés allostériques de l'enzyme? L'expression de protéines recombinantes chez *E. coli* serait un moyen adéquat de répondre à ces questions.

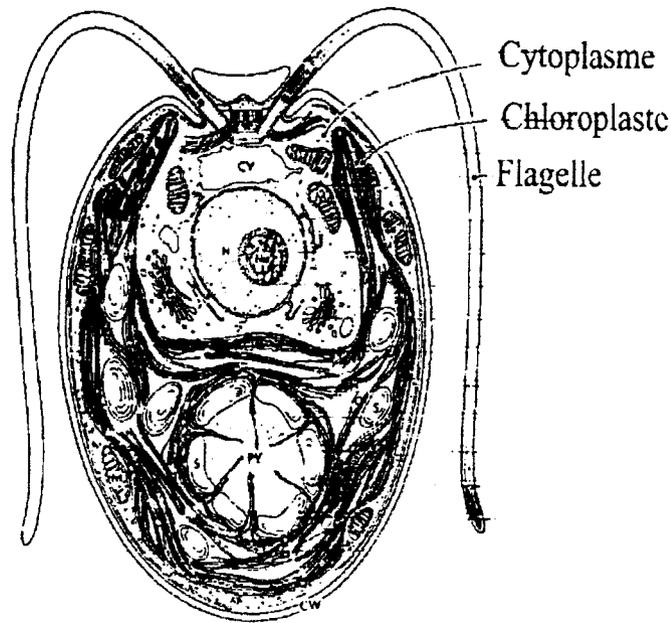


Figure 9 : La représentation schématique de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*.
 (cv : vacuole contractile; cw : paroi cellulaire; n : noyau; mu : nucléole; py : pyrénoloïde;
 s : amidon).

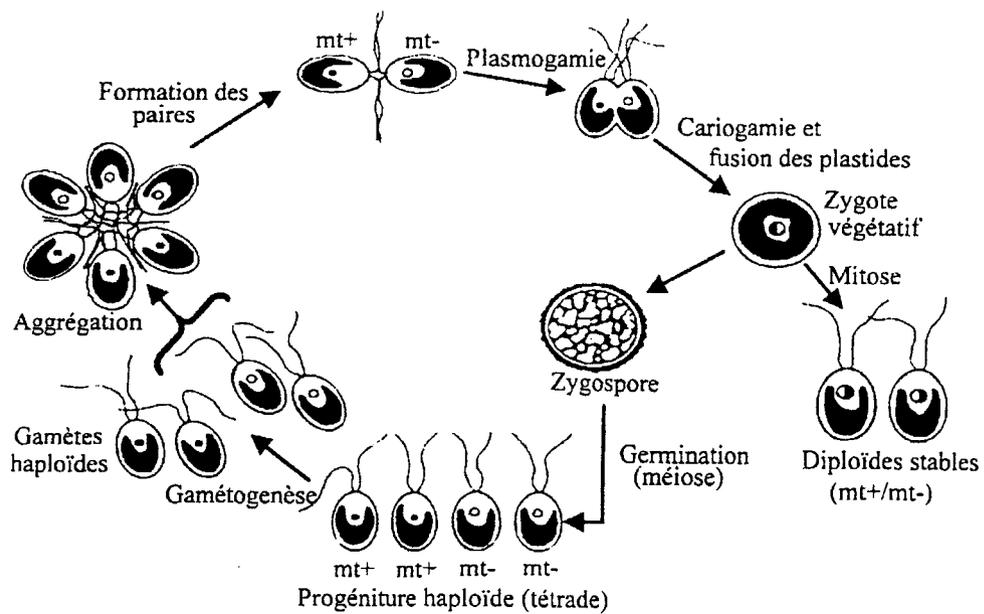


Figure 10 : Le cycle de reproduction sexuée de *Chlamydomonas reinhardtii*.

4) NOTRE MODELE D'ETUDE : CHLAMYDOMONAS REINHARDTII.

C. reinhardtii se rencontre dans les eaux douces ou à la surface des sols. De forme ovoïde, elle mesure environ 10 µm de diamètre et possède deux flagelles nécessaires aux déplacements et à la reconnaissance lors de la reproduction sexuée (figure 9). L'unique chloroplaste, siège de la synthèse, de l'amidon peut occuper jusqu'au deux tiers du volume cellulaire.

Le choix de *C. reinhardtii* comme modèle d'étude de la biosynthèse de l'amidon ne s'est pas fait au hasard. Cette algue présente en effet, plusieurs avantages par rapport aux végétaux supérieurs. L'infrastructure nécessaire à sa croissance est, tout d'abord, beaucoup plus réduite et plus simple, et par conséquent, moins onéreuse. Alors qu'un délai de plusieurs semaines à plusieurs mois est requis pour obtenir un amidon exploitable chez les végétaux supérieurs, il suffit de 5 à 7 jours avec *C. reinhardtii*. De plus, la détection des mutations est beaucoup plus aisée chez cette algue qui est une haplonte stricte.

4.1) Importance de *Chlamydomonas reinhardtii* pour l'étude de la biosynthèse de l'amidon.

L'assimilation du carbone chez les végétaux supérieurs se fait sous forme de saccharose et d'amidon. Mais, chez *C. reinhardtii*, le produit final est uniquement de l'amidon. Dans la cellule, les grains se localisent dans le stroma et autour du pyrénoloïde. La présence d'amidon n'est absolument pas requise pour la survie de l'algue. Cette caractéristique importante permet d'isoler des mutants sévèrement touchés dans la voie de biosynthèse.

En condition de carence azotée, les cellules ne se divisent plus, et le flux carboné est orienté vers la synthèse d'amidon. Une quantité 10 à 50 fois supérieure d'amidon est accumulée dans ces conditions de culture (Ball et coll., 1990). L'amidon extrait des cultures carencées en azote est similaire à l'amidon de réserve de l'albumen des céréales (Delrue et coll., 1992; Maddelein et coll., 1994; Libessart et coll., 1995; Buléon et coll., 1997). De plus, jusqu'à maintenant, toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon sont retrouvés chez *C. reinhardtii* (Ball, 1998) et toutes les mutations affectant le métabolisme de l'amidon chez cette algue conduisent aux mêmes phénotypes existant chez les végétaux supérieurs.

Enfin, nous disposons d'un crible performant et rapide de détection des mutants, affectés aussi bien dans la synthèse que la dégradation de l'amidon. Le crible est basé sur la

DP moyen	22.2	28.9	31.3	36.4	50.7	71	93	105	134	1500
λ_{\max}(nm)	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642

Tableau 6 : La variation de la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}) du complexe oligosaccharide linéaire/iode en fonction du degré de polymérisation (DP) du glucane (Banks et coll., 1971).

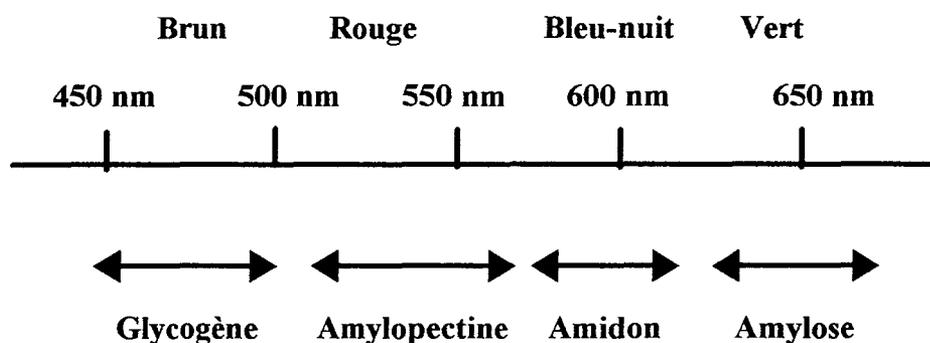


Figure 11 : Les domaines d'absorption des complexes iode-polysaccharide et leurs couleurs caractéristiques.

capacité des molécules d'iode à se lier à l'amidon. Les chaînes de glucanes forment une hélice simple et emprisonnent dans la cavité centrale hydrophobe les molécules d'iode.

Banks et coll. (1971) ont établi une relation directe entre le degré de polymérisation (DP) de glucanes linéaires et la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) (tableau 6). Les chaînes, dont le DP est inférieur à 12 résidus de glucose, ne peuvent interagir avec l'iode. Elles sont, de ce fait, "invisibles".

Les polysaccharides branchés interagissent aussi avec l'iode. A chaque polysaccharide correspond une couleur spécifique de complexation (figure 11). La λ_{max} des polysaccharides branchés dépend de la longueur des chaînes externes (Thorn et Mohazebb, 1990). Ainsi, une variation de la λ_{max} reflète une modification de la structure du polysaccharide étudié.

Cette propriété est utilisée pour cribler les mutants. Les cellules sont repiquées sur un milieu gélosé carencé en azote. Quand l'accumulation est suffisante (au bout d'une semaine), les colonies sont soumises à une coloration aux vapeurs d'iode. Les pigments chlorophylliens sont détruits, et la coloration visible est exclusivement le fait de l'interaction polysaccharide-iode.

La couleur caractéristique pour un amidon de type sauvage est bleue nuit. Un amidon enrichi en amylose prend une teinte verte, tandis qu'un amidon enrichi en amylopectine est plutôt rouge. Enfin, une teinte jaune traduit une accumulation d'amidon inférieure à 10%.

Jusqu'à maintenant, les enzymes intervenant dans la synthèse de l'amidon sont situées dans le chloroplaste, mais sont codées par le génome nucléaire (Ball et coll., 1990). La forme immature de ces protéines doit donc posséder un peptide de transit.

4.2) *Chlamydomonas reinhardtii* : un formidable outil génétique.

C. reinhardtii se reproduit majoritairement de manière asexuée. Son temps de génération dans des conditions optimales de croissance est de huit heures. Toutefois, dans des conditions de carence nutritive, les cellules se différencient en gamètes de polarité sexuelle mt^- et mt^+ (mating type ou type de conjugaison). Deux gamètes de polarité opposée fusionnent pour donner naissance à un zygote végétatif diploïde (figure 10). Celui-ci peut s'orienter vers deux voies différentes. La majorité se différencie en zygospores dont la germination (méiose) engendre quatre cellules haploïdes regroupées en tétrade. Une analyse de ségrégation peut alors être réalisée sur cette population méiotique. Une partie minoritaire de ces zygotes évolue vers la forme diploïde stable. Ceux-ci se divisent par mitose et nous sont très utiles pour les études de dominance/récessivité des mutations et les tests de complémentation, et possèdent une polarité sexuelle mt^- .

Il est intéressant de noter que ces diploïdes végétatifs sont sexués mt⁻. Il est donc possible de les croiser avec une souche mt⁺ pour engendrer un zygote triploïde. La germination de ce zygote donnera naissance à une descendance aneuploïde sur laquelle une analyse de ségrégation peut être envisagée. Cette particularité a été utilisée par Eves et Chiang (1982) pour démontrer le caractère diploïde d'une de leur souche. En complément des techniques de comptage des corpuscules de chromatine et de mesure du contenu en ADN de la cellule, ils ont réalisé une étude de ségrégation de cinq marqueurs appartenant à des groupes de liaison différents, dans la descendance aneuploïde. Malgré la forte létalité observée chez les ségrégeants (elle peut atteindre 80%), ces cinq marqueurs ségrégent selon la fréquence trisomique attendue (cette analyse trisomique a été effectuée six fois sur une période de treize mois et a abouti toujours à l'obtention des mêmes fréquences dans la population méiotique). Il semble donc que dans un tel croisement, la fréquence de transmission de chaque chromosome pris individuellement soit identique et que la forte mortalité observée soit plutôt le fait d'un déséquilibre chromosomique important dans la cellule.

Ce résultat nous a incités à utiliser dans ce travail le même type d'analyse trisomique pour contourner la stérilité d'un de nos mutants d'intérêt. Il est à noter que *C. reinhardtii* n'est pas le seul organisme chez lequel un tel type d'analyse génétique a été employé. En effet, avant l'apparition de la technique d'électrophorèse en champ pulsé, cette technique fut largement utilisée chez la levure pour cartographier les gènes sur les chromosomes (Mortimer et Hawthorne, 1973; Wickner, 1979).

La première carte génétique publiée pour le génome nucléaire de *C. reinhardtii* (Levine et Goodenough, 1970) comprenait des mutants paralysés (*pf*, paralyzed flagella), des mutants n'effectuant pas la photosynthèse (*ac*, besoin d'acétate pour croître), des mutants résistants aux antibiotiques (streptomycine, cycloheximide) et des mutants d'auxotrophie (ne synthétisant pas l'arginine, le nicotinamide, la thianine ou l'acide para-amino benzoïque). Bien que ces mutations spécifiques soient maintenant mieux comprises et que de nombreux autres mutants ont été identifiés, elles restent les catégories de mutations les plus largement utilisées lors d'analyses génétiques. Dix-neuf groupes de liaisons ont maintenant été identifiés chez *C. reinhardtii*.

4.3) *Chlamydomonas reinhardtii* un formidable outil de biologie moléculaire.

Pendant longtemps, la transformation de *C. reinhardtii* s'est avérée difficilement réalisable. De nombreuses équipes ont essayé de transformer *C. reinhardtii* avec des gènes hétérologues contenus dans un plasmide. Malheureusement, le taux de transformation est généralement faible et/ou le plasmide est instable dans la cellule (Rochaix et VanDillewijn,

1982 ; Rochaix et coll., 1984 ; Davies et Smith, 1978; Hasnain et coll., 1985; Bingham et coll., 1989).

Ce n'est qu'avec les gènes propres à *C. reinhardtii* que des résultats concluants ont été obtenus. En effet, en 1989, Kindle et coll. transforment avec succès le génome nucléaire par introduction de la copie sauvage du gène de la nitrate réductase chez des mutants au locus *NIT1*. De même, Debuchy et coll. (1989) ont complété des mutants déficients pour l'argininosuccinate lyase par introduction stable du gène sauvage *ARG7*.

Différentes techniques sont utilisées pour la transformation. La première consiste à bombarder les cellules avec des particules de tungstène ou d'or sur lesquelles l'ADN exogène est précipité (Klein et coll., 1987). La seconde consiste à agiter des cellules dépourvues de paroi en présence de billes de verre et d'ADN (Kindle, 1990). Récemment, Shinogawara et coll. (1998) ont obtenu une haute fréquence de transformation par électroporation ($2,5 \cdot 10^{-3}$ par cellules) de cellules dépourvues de paroi avec un plasmide de 12 kB portant le gène *ARG7*.

Chez *C. reinhardtii*, l'intégration de l'ADN exogène s'effectue le plus fréquemment par recombinaison hétérologue à des endroits quelconques du génome nucléaire (Debuchy et coll., 1989 ; Kindle et coll., 1989). L'intégration aléatoire s'accompagne généralement de délétions plus ou moins importantes dans l'ADN hôte (Tam et Lefebvre, 1993). De ce fait, la transformation nucléaire peut alors être utilisée comme méthode de mutagenèse d'insertion. Pour cela, on utilise un marqueur de sélection restaurant par exemple l'auxotrophie à l'arginine ou qui permet la croissance sur nitrate pour transformer des souches mutantes dépourvues de ces propriétés. Le gène inactivé par insertion devient repérable et peut être cloné par exemple en utilisant la technique de "plasmid rescue".

D'un point de vue phylogénique, *C. reinhardtii* est très éloignée des végétaux supérieurs. Malgré cette position éloignée, elle synthétise, en carence en azote, un amidon dont la structure est en tout point comparable à l'amidon de réserve des plantes (Ball, 1998). De plus, toutes les enzymes impliquées dans la biosynthèse du polysaccharide chez les plantes sont retrouvées chez cette algue. Elle possède notamment une ADP-Glc PPase dont la structure hétérotétramérique est typique des végétaux (Iglésias et coll., 1994).

Dans un travail précédent (Van den Koornhuysse et coll., 1996), l'importance de la régulation de l'enzyme a été démontrée *in vivo*. En effet, le mutant *sta1-1* dont l'enzyme est

insensible à l'activateur accumule de 5 à 10% de la quantité normale d'amidon. En faisant un parallèle avec les plantes, nous pensons que chez ce mutant la grande sous-unité régulatrice est affectée. Nous possédons un autre mutant (*sta6-1::ARG7*) chez lequel aucune activité ADP-Glc PPase n'est observable. Chez les végétaux, la petite sous-unité porte l'activité de catalyse; nous pensons qu'il en est de même pour l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* et, que la petite sous-unité est touchée chez ce dernier mutant. Une partie de notre travail consistera à démontrer nos hypothèses, ce qui renforcera la validité de *C. reinhardtii* comme modèle pertinent pour la biosynthèse de l'amidon chez les végétaux.

MATERIELS ET METHODES

1) LES SOUCHES DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*.

Souches	Génotype	Ploïdie
137C	<i>mf nit1 nit2</i>	n
330	<i>mt⁺ nit1 nit2 cw15 arg7-7</i>	n
cw 15	<i>mt⁺ nit1 nit2 cw15</i>	n
A35	<i>mf nit1 nit2</i>	n
37	<i>mt⁺ pab2 ac14</i>	n
I7	<i>mf nit1 nit2 stal-1</i>	n
NV314	<i>mf pab2 stal-1</i>	
BAF J3	<i>mt⁺ nit1 nit2 cw15 arg7-7 stal-2::ARG7</i>	n
BAF J5	<i>mt⁺ nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta6-1::ARG7</i>	n
DP1	fusion de NV314 et BAF J5 au PEG	2n

mt⁺/mf : polarité sexuelle (groupe de liaison VI). Le parent de polarité *mt⁺* transmet son génome chloroplastique à la descendance. Les souches *mf* transmettent le génome mitochondrial.

ac14 : mutation nucléaire entraînant une auxotrophie pour l'acétate (groupe de liaison I).

pab2 : mutation nucléaire qui confère l'auxotrophie pour l'acide para-amino benzoïque (PAB) (groupe de liaison I).

nit1 et *nit2* : les souches touchées aux loci *NIT1* (groupe de liaison IX) et *NIT2* (groupe de liaison II) sont incapables de croître avec du nitrate comme unique source d'azote.

cw15 : cette mutation nucléaire est responsable de l'absence de paroi (groupe de liaison inconnu).

arg7-7 : souches incapables de synthétiser l'arginine (groupe de liaison I). Cette mutation est nucléaire.

sta? : mutation affectant la voie de biosynthèse de l'amidon.

2) LES MILIEUX ET LES CONDITIONS DE CULTURE.

2.1) Les milieux liquides.

Trois types de milieux liquides ont été utilisés dans ce travail :

- le milieu TAP (Tris minimum Acétate Phosphate) : il contient de l'acétate comme source de carbone ce qui permet à *C. reinhardtii* de pousser en mixotrophie (lumière et acétate) ou en hétérotrophie (obscurité et acétate).
- le milieu TAP-N (Tris minimum Acétate Phosphate carencé en azote) : le chlorure d'ammonium dans ce milieu est remplacé par du chlorure de sodium à la même concentration. Dans ces conditions, les cellules accumulent une quantité d'amidon 10 à 50 fois plus importante.
- le milieu de Sueoka (1967) : c'est un milieu minimum dans lequel la source de carbone est le CO₂. Il a été utilisé pour cultiver *C. reinhardtii* dans des conditions de photosynthèse en alternance jour/nuit.

Composition des milieux pour un litre

- **TAP** : NH₄Cl 0,4 g; MgSO₄·7H₂O 0,3 g; CaCl₂·2H₂O 0,05 g; KH₂PO₄ 0,32 g; K₂HPO₄ 1,47 g; Tris 2,4 g.

1 mL de la solution d'oligo-éléments est ajouté et le pH est ajusté à 7 avec de l'acide acétique

- **TAP-N** : le NH₄Cl est remplacé par du NaCl à 7,5 mM,

- **milieu de Sueoka** : NH₄Cl 0,5 g; MgSO₄·7H₂O 0,02 g; CaCl₂·2H₂O 0,01 g; KH₂PO₄ 0,72 g; K₂HPO₄ 1,44 g; oligo-éléments 1 mL.

- **oligo-éléments** : EDTA 50 g; H₃BO₃ 11,4 g; ZnSO₄·7H₂O 22 g; MnCl₂·4H₂O 5,1 g; FeSO₄·7H₂O 4,2 g; CoCl₂·6H₂O 1,6 g; CuSO₄·5H₂O 1,6 g; MoO₃ 1,8 g.

Les milieux peuvent être supplémentés en arginine (100 µg/mL), en PAB (1 mg/L) ou en acétate de sodium (1 g/L).

2.2) Les milieux solides.

Le milieu de base est un milieu minimum supplémenté selon les besoins de la cellule avec de l'acétate, du PAB ou une source de nitrate. Il est solidifié par de l'agar à 1,5% (agar Difco) ou à 4% pour la maturation des zygotes.

Composition des milieux pour un litre

- **milieu minimum (HS)** : NH_4Cl 0,4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,3 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g; KH_2PO_4 0,18 g; K_2HPO_4 0,36 g; oligo-éléments 1mL.
- **milieu minimum carencé en azote (HS-N)** : milieu minimum sans source d'azote. Celui-ci est remplacé par du NaCl en même proportion.
- **milieu nitrate minimum** : le NH_4Cl est remplacé par du KNO_3 à 0,4 g/L.
- **milieu riche** : le milieu minimum est supplémenté par du PAB (1 mg/mL), de l'acétate de sodium (1 g/L) et de l'extrait de levure (4 g/L).

2.3) La mise en culture des souches.

La conservation des souches se fait sur milieu riche gélosé, en lumière continue, (~ 3 000 lux) à une température comprise entre 20 et 25°C. Elles sont repiquées environ toutes les huit semaines.

Avant de démarrer la culture, il est nécessaire de préparer les cellules en préculture (50 mL de milieu TAP supplémenté en arginine ou en PAB, le cas échéant). Cette étape permet l'adaptation des cellules au milieu de culture, leur amplification et le contrôle du nombre de cellules pour l'inoculation de la culture. Les précultures comme les cultures sont mises sous agitation moyenne (120 rpm avec un excentrique de 3 cm), en lumière continue (4 000 lux), à une température de 20 à 25°C.

L'estimation du nombre de cellules est réalisée par comptage au détecteur de particules (compteur-coulter type ZF). Avant ensemencement de la culture, une observation au microscope optique permet d'apprécier une éventuelle contamination et l'état physiologique des cellules.

La densité d'inoculation diffère selon les conditions de culture :

Conditions de culture	Densité de l'inoculat (cellules/mL)	Densité en fin de culture (cellules/mL)
Mixotrophie (acétate, lumière)	$5 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^6$
Autotrophie (CO ₂ , lumière)	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6$
Carence azotée	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$

Pour la culture en carence azotée, les cellules de préculture sont rincées deux fois avant l'ensemencement avec le milieu de culture TAP-N.

3) LES TECHNIQUES GENETIQUES.

3.1) Les croisements.

Avant le croisement proprement dit, les cellules doivent se différencier en gamètes. L'induction de la gamétogénèse est réalisée en resuspendant des cellules fraîches dans 2 mL de milieu carencé en azote. Elles sont laissées 12 heures, sans agitation, et en lumière continue intense (5000 lux).

Une proportion identique de cellules de polarité opposée est alors mise en présence. Une heure plus tard, les figures de fusion sont visibles au microscope optique.

Des diploïdes végétatifs ou des descendants méiotiques seront sélectionnés en fonction de l'étude génétique envisagée.

3.2) L'obtention de diploïdes végétatifs.

Les diploïdes végétatifs s'avèrent indispensables aux études de complémentation et à l'étude de dominance ou de récessivité des mutations.

Ils sont sélectionnés sur milieu minimum gélosé par complémentation des caractères des souches parentales (dans notre cas *ac14*, *pab2*, *nit1* et *nit2*). Parmi les zygotes formés, 5% évoluent de façon stable vers cette voie.

3.3) L'analyse de la descendance méiotique.

Les produits de fusion cellulaire sont déposés sur un milieu riche à 4% d'agar. Les boîtes sont alors maintenues en lumière atténuée pendant 24 heures puis, placées à l'obscurité pendant au moins une semaine, période nécessaire à la maturation et à l'enkystement des zygotes.

Les cellules végétatives non fusionnées se situent à la surface de la gélose. Elles sont enlevées délicatement avec une lame de rasoir. Sous loupe binoculaire, une région avec une cinquantaine de zygotes est découpée puis, transférée sur milieu riche à 1,5% d'agar. Cette boîte est soumise à des vapeurs de chloroforme pendant 45 secondes pour éliminer les cellules végétatives résiduelles. La mise en lumière entraîne, de manière irréversible, la méiose conduisant à la formation de quatre cellules filles haploïdes regroupées en tétrades.

L'analyse génétique est effectuée de manière aléatoire, ou après dissection des tétrades sous loupe binoculaire. L'étude de manière aléatoire nécessite de connaître les caractéristiques d'un grand nombre de ségrégeants (au moins 200).

3.4) La fusion cellulaire.

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

3.4.1) La préparation de l'autolysine.

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

Tout d'abord des boîtes couvertes d'un tapis cellulaire pour la souche *mt* et *mt*⁺ sont préparées. Puis, les cellules sont récoltées et lavées dans un milieu minimum carencé en azote et enfin resuspendus dans le milieu à une densité de $5 \cdot 10^7$ cellules/ml. Les suspensions cellulaires sont maintenues 4 heures en chambre de culture sous agitation vive. Ensuite, les cellules de polarité opposée sont mélangées et incubées ensemble 15 minutes. Le mélange est

centrifugé 10 minutes à 4 000 g puis le surnageant est clarifié par centrifugation à 27 000 g pendant 20 minutes. Il est ensuite conservé sous forme d'aliquots à -20°C .

3.4.2) Le traitement lytique.

Les cellules fraîches sont mises en suspension dans l'extrait lytique brut, à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml. La suspension cellulaire est placée 30 minutes à 34°C puis centrifugée. Le culot est à nouveau traité puis lavé dans le milieu de culture liquide TAP. A ce stade, les cellules sont prêtes à fusionner.

Le rendement des cellules débarrassées de leur paroi peut être déterminé rapidement. Pour cela, 700 μL de cellules traitées à l'autolysine sont mélangées à 1,4 mL de triton X-100 à 0,1 %. Le mélange est vortexé pendant 1 minute puis centrifugé brièvement à 12 000 g. Ensuite, des mesures de l'absorbance à 435 nm du surnageant de l'échantillon traité et non traité sont effectuées. Les 100 % de lyse sont définis en mesurant l'absorbance d'un échantillon de 1 mL de cellules soniquées traitées par 2 mL de triton.

3.4.3) La fusion au PEG.

La technique a été décrite par Matagne en 1979. La solution de fusion dont le pH est ajusté à 8 par la soude est stérilisée par filtration. Elle est composée de 85 mM de PEG 8 000 (Sigma), 20 mM de CaCl_2 et 20 mM de glycine.

Les suspensions cellulaires de chacun des partenaires ($5 \cdot 10^7$ cellules) sont mélangées sur le milieu HS à l'aide d'une anse de platine. A ce mélange, 0,1 mL de solution de fusion est ajouté. Des gouttes de ce mélange sont étalées sur le milieu HS et les diploïdes apparaissent au bout de 5 jours.

4) LA PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES.

4.1) La préparation d'extraits bruts pour le dosage d'activités enzymatiques.

La préparation des extraits cellulaires a été effectuée de deux manières dans ce travail, selon les conditions classiques utilisées par chaque laboratoire.

1) Les cellules sont cultivées en milieu TAP jusqu'à atteindre une densité cellulaire de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. Elles sont ensuite centrifugées à 3 000 g, pendant 15 minutes, à 4°C . Les culots cellulaires sont lavés à l'eau puis, concentrés jusqu'à environ 10^8 cellules/mL. Cette suspension est passée à la presse de French (10 000 psi). Le broyat obtenu est centrifugé à

9 000 g pendant 15 minutes, à 4°C, pour le débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est utilisé pour visualiser les activités enzymatiques par dosage ou en zymogramme.

2) Les cultures sont réalisées en grand volume, de manière à prélever plusieurs échantillons, à différents moments du jour et de la nuit.

Deux cultures de cinq litres de milieu de Sueoka sont inoculées en même temps, et cultivées en forte concentration en CO₂ (air enrichi par 4% de CO₂). Les cultures sont synchronisées en alternance jour/nuit (12h/12h), pendant 60 heures. Le CO₂ est fourni par bullage, et l'illumination par des lampes fluorescentes (250 μmol photon m⁻² sec⁻¹ à la surface des fioles de culture).

Au bout des 60 heures de croissance (début du troisième cycle d'illumination), un premier prélèvement est réalisé pour les dosages d'amidon, de chlorophylle, d'activités enzymatiques et pour les extractions d'ARN totaux. Deux heures après, une des cultures est placée en basse teneur en CO₂ (CO₂ atmosphérique).

Durant la phase d'illumination, 200 mL de culture sont prélevés toutes les trois heures et durant la phase obscure, toutes les quatre heures. Les cellules sont centrifugées à 9 000 g, pendant 10 minutes, à 4°C, et le culot est congelé dans l'azote liquide. Il est alors conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

L'extrait cellulaire congelé est broyé dans un mortier, dans l'azote, liquide jusqu'à obtenir une fine poudre. A cette fine poudre est ajouté 2mL du tampon d'extraction. Celui-ci congèle immédiatement. Quand le tampon d'extraction est décongelé, l'extrait est aliquoté et centrifugé à 17 500 g, pendant 10 minutes, à 4°C, pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et peut être stocké à -20°C.

Tampon d'extraction : Hepes/NaOH 100 mM pH 7,6; MgCl₂·6H₂O 20 mM; NaF 5mM; DTT 5mM; CaCl₂·2H₂O 2 mM; glycérine 10%; PEG 6000 3%. Le DTT doit être ajouté au moment de l'extraction.

4.2) La préparation de l'amidon.

L'extraction d'amidon a été aussi réalisée de deux manières

1) Les premières étapes sont identiques à la préparation d'extraits bruts pour le dosage d'activités enzymatiques. Après passage à la presse de French, le broyat cellulaire est centrifugé à 9 000 g, pendant 30 minutes, à 4°C. Le culot contenant les débris cellulaires et l'amidon doit être purifié. Il est remis en suspension dans un volume d'eau, pour neuf volumes de Percoll

(Pharmacia). Le Percoll forme un gradient de densité lors de la centrifugation. L'amidon très dense sédimente, alors que les lipides et les protéines forment une galette à la surface. L'amidon est ensuite rincé trois fois avec de l'eau désionisée.

2) A chaque prélèvement, 1 mL de culture est utilisé pour le dosage d'amidon. Celui-ci est centrifugé à 17 500 g, pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot est incubé une nuit en présence d'un mL d'acétone 80%, à 4°C. Après centrifugation à 17 500 g, pendant 10 minutes, à 4°C, le culot d'amidon est lavé deux fois dans 500 µL d'eau désionisée à 4°C. Le surnageant est gardé pour effectuer le dosage des chlorophylles.

5) LES ANALYSES BIOCHIMIQUES.

5.1) Le dosage d'amidon.

1) Le dosage de l'amidon est réalisé à l'aide du kit de dosage de Boehringer-Mannheim. Après rupture des grains d'amidon dans l'eau à 100°C, l'amyloglucosidase hydrolyse les liaisons α -1,4 et α -1,6. L'hexokinase transforme en G6P les molécules de glucose libérées. Le G6P est oxydé par la glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6PDH). La production de NADPH produit lors de l'oxydation du G6P est estimée par la lecture de l'absorbance à 365 nm.

2) L'amidon extrait est resuspendu dans 200 µL d'eau désionisée et 500 µL de KOH 1N. Après chauffage 30 min à 95°C, le pH est ajusté à 5 avec 500 µL d'acide acétique 1 N.

Une quantité de 300 µL est incubée toute la nuit, à 37°C, dans le mélange réactionnel décrit ci-dessous.

Dans une plaque de microtitration, 75 µL du volume réactionnel précédent, 75 µL du tampon 1 et 200 µL du tampon 2 sont mélangés. La mesure du blanc est prise à 340 nm. Puis, 6 µL d'hexokinase (Boehringer-Mannheim) sont ajoutés. Comme précédemment du G6P est formé et celui-ci est oxydé par la G6PDH (Sigma) contenue dans le tampon 2. Le NAD du tampon 2 est réduit en NADH et sa production est mesurée à 340 nm.

<u>Mélange réactionnel :</u>	tampon acétate de sodium 50 mM pH 5	250 µL
	amyloglucosidase (Boehringer-Mannheim)	5 µL
	α -amylase (Boehringer-Mannheim)	0,125 µL
<u>Tampon 1 pour 1 échantillon :</u>	NaOH 1N	25 µL
	tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,0	25 µL

	eau désionisée	5 µL
<u>Tampon 2 pour 1 échantillon :</u>	triéthanolamine/HCl 750 mM	182 µL
	MgSO ₄ 10 mM pH 6,0	
	NAD 11,5 mM	6 µL
	ATP 81 mM	6 µL
	suspension de G6PDH	6 µL
<u>Suspension de G6PDH :</u> 100 µL d'enzyme + 900 µL d'ammonium sulfate 3,2 M		

5.2) La détermination de la longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode-polysaccharide.

L'amidon est dissous dans le diméthylsulfoxyde 100% (DMSO) à 100°C 20 min. La solution est diluée alors à 10% de DMSO. Le spectre d'absorption est réalisé de 400 à 700 nm sur 400 µL d'amidon dissout, additionnés de 100 µL de solution d'iode (0,02% I₂ et 0,2% KI).

5.3) Le dosage de la quantité de chlorophylle.

La teneur en chlorophylle est mesurée par spectrophotométrie sur le surnageant chlorophylle/acétone (voir l'extraction d'amidon point 4.2). La quantité de chlorophylle en µg/mL est estimée grâce à la formule suivante : $Abs_{645} \times 20,2 + Abs_{663} \times 8,02$.

6) LES ANALYSES ENZYMOLOGIQUES.

6.1) Le dosage de protéines.

Les protéines sont dosées à l'aide du kit de dosage Biorad (Richmond) (méthode de Bradford). L'absorbance est lue à 595 nm et, la quantité de protéine est déduite d'une courbe étalon établie avec la sérumalbumine bovine (0 à 20 µg/mL). Alternativement, les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry.

6.2) Le dosage de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase.

L'activité de l'enzyme est dosée dans le sens dégradation par spectrophotométrie.



L'extrait (1 à 10 μL) est incubé 15 minutes, à 30°C, dans 500 μL final du mélange réactionnel. Le NADP peut être remplacé par du NAD à la même concentration. La réaction est arrêtée par ébullition 10 minutes.

<u>Mélange réactionnel :</u>	glycylglycine/NaOH pH 7,5	80 mM
	PPi	1 mM
	MgCl ₂	60 mM
	glucose-1,6 diphosphate	0,05 mM
	NADP	0,25 mM
	NaF	10 mM
	ADP-glucose	1 mM
	3PGA	1,5 mM

Le G1P produit est transformé en G6P par la phosphoglucomutase (Sigma) et ce dernier est oxydé par la G6PDH. Le NADPH résultant de l'oxydation du G6P est dosé à 365 nm (340 nm dans le cas du NADH).

6.3) Le zymogramme activité de débranchement.

La technique du zymogramme consiste à séparer les activités enzymatiques en gel de polyacrylamide et ensuite, à révéler spécifiquement l'activité en incubant le gel dans un mélange réactionnel adéquat.

L'extrait brut (400 μg de protéines) est porté à ébullition durant 5 minutes, en présence de SDS 1% et de β -mercaptoéthanol 5%, dans un volume final de 115 μL . L'échantillon est ensuite, déposé sur un gel de polyacrylamide à 7,5% (p/v) contenant de l'amidon soluble de pomme de terre à 1 g/L. Le gel est préparé dans un tampon 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 40 mM 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 le mélange réactionnel Tris-glycine 25 mM pH 8,3, DTT 20 mM, une nuit à température ambiante sous agitation lente. La révélation se fait à l'aide d'une solution d'iode (KI 0,5%, I₂ 0,05%).

lacZ alpha fragment: bases 1-571
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-339
 T7 promoter/priming site: bases 346-365
 M13 Forward (-20) priming site: bases 373-388
 M13 Forward (-40) priming site: bases 392-408
 f1 origin: bases 530-944
 Kanamycin resistance ORF: bases 1278-2072
 Ampicillin resistance ORF: bases 2090-2950
 ColE1 origin: bases 3095-3768

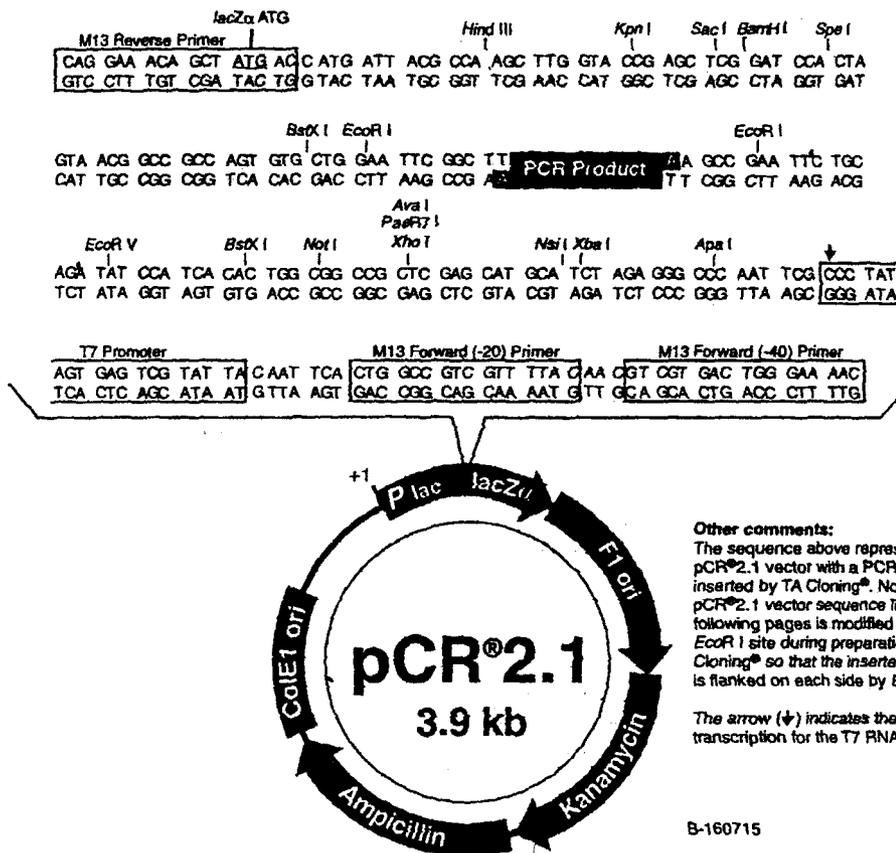


Figure 12 : Le schéma du plasmide pCR 2.1 utilisé pour cloner un fragment de l'ADNc de la petite sous-unité de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii* amplifié par PCR.

7) LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.

7.1) Les souches d'*E. coli* et les techniques de base en biologie moléculaire.

DH5 α F' j80d *lacZ* Δ M15 *endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1*
 Δ (*lacZYA-argF*) U169

XL1-blue F' *lacZ* Δ M15 *endA1 recA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

Tout ce qui concerne les techniques de manipulation de bactéries, comme le choix des milieux de culture, la préparation de cellules compétentes, la transformation, la préparation de plasmides ainsi que l'utilisation des enzymes de restriction, la préparation des gels d'agarose sont décrits dans l'ouvrage Sambrook et coll. (1989).

Nous avons utilisé des kits, notamment ceux de la société QIAGEN pour les extractions de plasmide (miniprep et maxiprep), et le plasmide pCR 2.1 de la société Invitrogen, permettant le "TA cloning". Cette méthode est basée sur le fait que la *Taq* polymérase ajoute à l'extrémité 3' du fragment amplifié par PCR, une déoxyadénosine. Le vecteur pCR 2.1 (figure 12) est donc fourni linéarisé, avec une déoxythymidine additionnelle à chaque extrémité 3'. Si le fragment est amplifié avec une polymérase créant des bouts francs (*Pfu* DNA polymérase), il peut être traité, pendant 10 minutes à 72°C, par la *Taq* polymérase qui lui ajoute les déoxyadénosines.

7.2) L'extraction de l'ADN génomique de *C. reinhardtii*.

Le protocole d'extraction de l'ADN génomique est celui de Rochaix et coll. (1991) :
"Rapid mini-preps of *Chlamydomonas* DNA".

- 50 mL de culture à 3-5 10⁶ cellules/mL sont centrifugés, pendant 10 min, à 3 500 g.
- le culot de cellules est resuspendu dans 1,75 mL de tampon de lyse, auxquels sont ajoutés 50 μ L de protéinase K à 2 mg/mL et 25 μ L de SDS 20%. Les cellules aliquotées en eppendorf sont incubées à 55°C pendant 2 heures et agitées de temps en temps.

<u>Tampon de lyse :</u>	Tris/HCl pH 8,0	20 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	100 mM

- après ajout de 2 μ L de diéthylpyrocarbonate (DEPC) sous hotte chimique, le lysat est incubé pendant 15 minutes à 70°C.

- les tubes sont refroidis brièvement dans la glace et 50 µL d'une solution d'acétate de potassium à 5 M sont ajoutés. Après avoir mélangé, une incubation, d'au moins 30 minutes, dans la glace, est nécessaire (l'extraction peut être arrêtée et les tubes placés à 4°C jusqu'au lendemain).
- les tubes sont centrifugés à 9 000 g, pendant 15 minutes, à 4°C, et le surnageant est récupéré. Celui-ci est extrait par une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1).
- après centrifugation à 9 000 g, pendant 15 minutes, à 4°C, l'ADN contenu dans la phase supérieure est précipité par 1 mL d'éthanol 96% à température ambiante. Un précipité sous forme de "cheveux d'ange" doit apparaître à ce stade.
- l'ADN est précipité par une centrifugation de 5 min à 9 000 g. Deux rinçages par 1 mL d'éthanol 70% sont nécessaires pour éliminer les sels.
- les culots d'ADN sont séchés à 37°C, pendant 5 minutes, et dissous dans 50 à 100 µL d'eau contenant de la RNAase à 1 µg/mL.

La quantité d'ADN génomique est estimée par spectrophotométrie à 260 nm (une absorbance de 1 à 260 nm équivaut à 50µg/mL) et par dépôt de dilutions en gel d'agarose.

7.3) L'extraction des ARN totaux de *C. reinhardtii*.

Le culot de cellules (entre 1 et 5 10⁶ cellules/mL) congelées est broyé, dans un mortier, dans l'azote liquide jusqu'à obtenir une fine poudre. On ajoute alors 2 mL du tampon d'extraction qui congèle instantanément.

<u>Tampon d'extraction :</u>	Guanidine HCl pH 7,2	8M
	MES	20 mM
	EDTA	20 mM

Quand le tampon est décongelé, 16 µL de β-mercaptoéthanol sont ajoutés. L'extrait est réparti en eppendorf (environ 3 eppendorfs avec 1 mL chacun).

- 600 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique sont additionnés et, le mélange est centrifugé, à 17 500 g, pendant 10 minutes, à 4°C. Une deuxième extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est réalisée sur la phase supérieure.
- 700 µL d'éthanol 96% et 200 µL d'acide acétique 1M permettent de précipiter les ARN contenus dans la phase supérieure. Le mélange est laissé au moins 1 heure à -80°C.
- après centrifugation, à 17 500 g, pendant 15 minutes, à 4°C, le culot d'ARN est resuspendu dans 1 mL d'acétate de sodium 3 M.

- le culot, après centrifugation à 17 500 g, pendant 15 minutes, à 4°C, est rincé une fois par 1 mL d'éthanol 70% et une fois par de l'éthanol 96%. Le culot d'ARN est séché à 37°C, environ 2 minutes, puis dissous dans 400 µL d'eau stérile.

La quantification des ARN totaux est effectuée au spectrophotomètre à 260 nm (une absorbance de 1 à 260 nm équivaut à 40 µg/mL d'ARN).

Alternativement, la préparation des ARN totaux a été réalisée avec le kit Trizol Reagent (GibcoBRL).

7.4) La préparation d'une sonde nucléotidique marquée.

La première étape avant le marquage est la purification du fragment d'ADN choisi comme sonde. Celui-ci est généralement inséré dans un plasmide. L'utilisation d'enzymes de restriction adéquates permet d'isoler ce fragment. Il est ensuite séparé du reste du plasmide par électrophorèse en gel d'agarose. L'excision du gel d'agarose a été effectuée avec alternativement les kits QIAEXII (QIAGEN) et GENECLEANII (BIO 101 *INC.*). Le principe d'extraction est identique pour les deux kits. Le bloc d'agarose avec le fragment d'intérêt est d'abord dissout dans une solution d'iodure de sodium 6 M. L'ADN est ensuite adsorbé sur des billes de silice. Après des lavages pour éliminer l'agarose et les sels, l'ADN est élué par de l'eau stérile.

marquage de la sonde au ³²P.

Le kit "Oligo labelling kit" de Pharmacia a été utilisé pour marquer 50 à 100 ng d'ADN. La technique de marquage est l'amorçage aléatoire. Pour chaque réaction 50 µCi de α-[³²P]-dCTP sont nécessaires.

marquage de la sonde à la biotine.

La sonde peut être marquée à la biotine par PCR. Les dTTps biotinylés sont incorporés dans le fragment à amplifier. Après l'hybridation, la révélation est effectuée à l'aide d'un complexe streptavidine/phosphatase alcaline (amplification du signal) et d'un composé bioluminescent. Les proportions pour la réaction de PCR sont les suivantes :

plasmide contenant le fragment à amplifier	10 à 50 ng
amorçeur 1	1 µL d'une solution à 100 pmol/µL
amorçeur 2	1 µL d'une solution à 100 pmol/µL
mélange de dTTP biotinylés et de dNTP	10 µL de la solution stock
tampon de réaction	5 µL

Taq polymérase 0,5 µL
solution stock de dTTP biotinylés 6 µL dTTP biotinylés + 1,25 µL dNTP 100 mM +
42,75 µL Tris pH 7,5.

7.5) Le criblage des banques d'ADN complémentaires.

La souche XL1-Blue est infectée par environ 50 000 phages, pendant 20 minutes, à 37°C. Le milieu Top-agarose à 0,7% d'agarose à 48°C est ajouté et le mélange est étalé sur du milieu LB avec tétracycline. Les boîtes sont incubées une nuit, à 37°C.

Les plages de lyse sont transférées sur un premier filtre de nitrocellulose, pendant 1 min, puis sur un deuxième, pendant 3 min. Les filtres sont ensuite traités par les solutions suivantes :

- solution dénaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) pendant 2 minutes,
- solution de neutralisation (Tris/HCl 0,5 M pH 7,0; NaCl 1,5 M) pendant 2 minutes,
- solution de rinçage (tampon SSC 2X) pendant 2 minutes.

Les filtres sont séchés à 80°C pendant 2 heures dans un four sec.

7.6) Les hybridations moléculaires.

7.6.1) Les analyses en Southern Blot.

Dans un premier temps, 10 à 15 µg d'ADN sont digérés par les enzymes de restriction adéquates. Les produits de restriction sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8% TBE 1X). Le gel est incubé 15 minutes, dans le tampon de dépurination (HCl 0,25 N), et 30 minutes dans la solution de dénaturation (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M). L'ADN fragmenté et dénaturé est transféré par capillarité, avec une solution de SSC 20X, sur une membrane de nylon. L'ADN est fixé à 80°C pendant 2 heures.

La membrane est préhybridée, au moins deux heures, dans le tampon d'hybridation à 42° C. La sonde est ajoutée et, la membrane est incubée une nuit à la même température. Selon la stringence désirée, différents tampons et différents temps de lavage sont définies. Après le lavage, la membrane est mise à -80°C en présence d'un film Kodak X-OMAT AR.

<u>Tampon SSC 20X :</u>	NaCl	175,3 g
	Citrate de sodium	88,2 g

le pH est ajusté à 7,0 avec du NaOH 10 N et le volume ajusté à 1 litre.

<u>Tampon d'hybridation :</u>	Formamide	50%
	Denhardt's	5X
	SDS	0,5%
	tampon phosphate de sodium pH 7,0	50 mM
	ADN de sperme de saumon	100 µg/mL
	Sérum albumine bovine	0,5%
<u>Denhardt's 100X (pour 500 mL) :</u>	Ficoll 400	10 g
	Polyvinylpyrrolidone 40	10g
	Sérum albumine bovine	10 g
<u>Tampon phosphate de sodium 1 M pH 7,0 (pour 100 mL de tampon) :</u>		
	Na ₂ HPO ₄ 1 M	57,7 mL
	NaH ₂ PO ₄ 1 M	42,3 mL
<u>Tampons de lavage :</u>	stringence faible	SSC 2X, SDS 0,2%
	stringence moyenne	SSC 1X, SDS 0,5%
	stringence forte	SSC 0,5X, SDS 0,5%
		SSC 0,1X, SDS 0,5%

7.6.2) Les analyses en Northern Blot.

Le principe est le même que pour l'analyse en Southern. Une membrane préparée à partir d'un gel d'ARN totaux est hybridée avec la sonde marquée. Le traitement des échantillons et la composition du gel d'agarose sont sensiblement différents afin éviter les structures secondaires des ARN.

Préparation de la membrane

De l'agarose à 1,4% est dissout dans le tampon MOPS 1X. Après dissolution, du formaldéhyde est ajouté pour atteindre une concentration de 2,2 M. Avant dépôt, les composés suivants sont ajoutés à environ 10 µg d'ARN totaux :

ARN totaux	10 µg
Formaldéhyde	3,3 µL
Tampon MOPS 20X	1 µL
Tampon de chargement	2 µL
Formamide	jusqu'à 20 µL

Ce mélange est chauffé à 65°C, pendant 10 minutes, pour dénaturer les structures secondaires, puis placé 2 minutes dans la glace avant d'être déposé dans le gel.

Après la migration, le gel et la membrane de nylon sont traités deux fois 10 min, dans une solution de SSC 5X, NaOH 10 mM. Le transfert des ARN totaux se fait par capillarité avec du tampon SSC 10X. La membrane est ensuite lavée 5 minutes dans du SSC 5X, et les ARN sont fixés par exposition 1 minute sous ultraviolet.

<u>Tampon MOPS 20X :</u>	MOPS	0,4 M
	Acétate de sodium	100 mM
	EDTA	20 mM

Le pH est ajusté à 5,0 avec du NaOH 5 N.

Hybridation et lavage de la membrane

La membrane est lavée 10 minutes dans du SSC 2X, 1% SDS à température de la pièce puis mise en préhybridation à 42°C pendant 2 heures. L'hybridation s'effectue durant 14 à 18 heures à la même température.

Après l'hybridation, la membrane est lavée successivement dans les solutions suivantes :

- SSPE 2X, SDS 0,5% deux fois 15 minutes à température de la pièce,
- SSPE 0,2X, SDS 0,5% pendant 30 minutes à 54-60°C selon la stringence désirée,

Les étapes suivantes se déroulent toutes à température de la pièce

- Solution de blocage : PBS 1X, caséine 0,2%, SDS 0,5% deux fois 5 minutes,
- Solution de blocage pendant 30 minutes,
- Solution de conjugaison : solution de blocage contenant le complexe streptavidine-phosphatase alcaline (1/6000) pendant 60 minutes,
- Solution de blocage pendant 5 minutes,
- Solution de lavage : PBS 1X, SDS 0,5% quatre fois 5 minutes,
- Tampon de réaction deux fois 5 minutes.

La membrane est ensuite recouverte par une fine couche de tampon de réaction contenant le CSPD® (1/100) (fourni par la société Tropix, Inc.), substrat chimioluminescent de la phosphatase alcaline. Le film X-OMAT AR est mis en présence de la membrane de 3 heures à 12 heures.

Tampon SSPE 20X (composition pour 1 litre) :

NaCl	175,3 g
Na ₂ HPO ₄	27,6 g

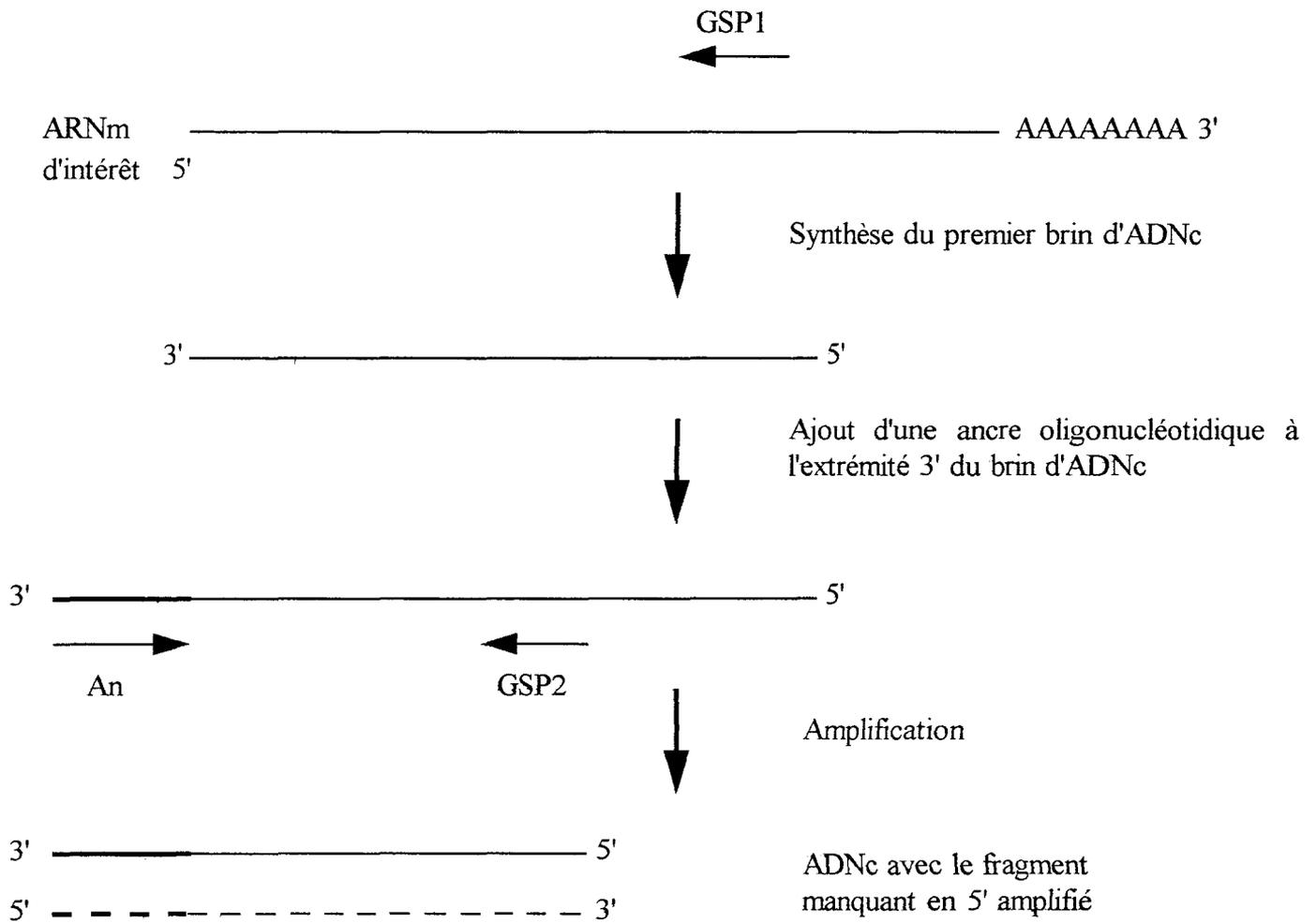


Figure 13 : La stratégie de RACE-PCR pour amplifier l'extrémité 5' manquante d'un ADNc.

GSP1 et GSP2 sont des amorces complémentaires de la séquence déjà connue.

An est une amorce complémentaire à l'ancre oligonucléotidique rajoutée à l'extrémité 3' du premier brin d'ADNc.

EDTA	7,4 g
------	-------

Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH 10 N.

Tampon PBS 10X (composition pour 1 litre) :

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g

Le pH est ajusté à 7,0 avec de l'HCl

<u>Tampon de réaction :</u>	Diéthanolamine	0,1 M
	MgCl ₂	1 mM

Le pH est ajusté à 10,0 avec de l'HCl

7.7) La technique de RACE-PCR.

La technique de RACE-PCR permet d'amplifier les extrémités 5' ou 3' des ADNc. Dans le cadre de notre travail, seul un fragment en 5' a été amplifié avec le kit 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 commercialisé par GibcoBRL.

La stratégie employée est illustrée dans la figure 13.

7.8) Le séquençage nucléotidique.

Les séquences nucléotidiques ont été déterminées par la méthode de terminaison des chaînes, par incorporation de didésoxynucléotides. Les réactions de séquence ont été effectuées à l'aide du kit Sequenase Version 2.0 commercialisé par la société Amersham.

Les produits de réaction sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6% contenant de l'urée à une concentration de 8 M dans le tampon TBE 1X. Le gel est transféré sur papier Whatman 3MM, séché et exposé une nuit avec un film Kodak BioMax MR.

RESULTATS

L'ADP-glucose pyrophosphorylase de *C. reinhardtii* migre en une protéine unique de 210 kDa. Elle est composée de deux sous-unités de 50 et 53 kDa (Iglesias et coll., 1994). Comme l'ADP-Glc PPase des végétaux supérieurs, elle est régulée de manière allostérique par le 3PGA et le Pi (Ball et coll., 1991). Des mutations conduisant à des déficiences spécifiques de cette enzyme ont été obtenues pour deux loci distincts : *STA1* et *STA6*.

le locus *STA1*

Deux allèles au locus *STA1* ont été produits : l'allèle *sta1-1* par une mutagenèse aux rayons X (Ball et coll., 1991), et l'allèle *sta1-2::ARG7* (Bellanger, 1994) par intégration aléatoire du plasmide pARG7-8 codant l'argino-succinate lyase de *C. reinhardtii*. Les mutants porteurs de ces mutations présentent tous un phénotype identique. La seule activité mise en cause dans ces souches est l'activité ADP-Glc PPase. Les propriétés cinétiques de l'enzyme mutante ont été caractérisées par Van den Koornhuysse et coll. (1996). En l'absence d'activateur, les activités de l'enzyme mutante et de l'enzyme sauvage sont comparables. Par contre, l'enzyme mutante est devenue complètement insensible au 3PGA. Elle reste, néanmoins, sensible au Pi. Ceci suffit à diminuer de 90% la synthèse d'amidon en carence azotée. **Cette mutation au locus *STA1* a été la première, à démontrer *in vivo*, l'importance de la régulation allostérique de l'ADP-Glc PPase.**

le locus *STA6*

Un seul mutant au locus *STA6* (Bellanger, 1994) a été isolé suite à une mutagenèse d'insertion. Après coloration aux vapeurs d'iode, la souche mutante (*sta6-1::ARG7*) présente une teinte jaune typique des souches accumulant moins de 10% d'amidon. Effectivement, en carence azotée, cette souche produit moins de 0,1% de la quantité d'amidon produite par la souche sauvage. Cet effondrement de la synthèse d'amidon n'affecte aucunement la croissance de la souche, que ce soit sur milieu gélosé ou en milieu liquide (Van den Koornhuysse, 1996).

Seules deux modifications enzymatiques ont été mises en évidence dans la souche mutante. Tout d'abord, aucune activité ADP-Glc PPase n'est détectable, que ce soit en présence ou non de 3PGA. Enfin, une activité de débranchement surnuméraire apparaît en zymogramme (Van den Koornhuysse, 1996). **La disparition de la synthèse d'amidon est vraisemblablement imputable à la disparition de l'activité ADP-Glc PPase.**

Qui plus est, la mutation *sta6-1::ARG7* semble être pléiotrope, puisque la souche mutante est paralysée et stérile.

Aucune analyse génétique poussée n'a pour l'instant été réalisée afin de caractériser les loci *STA1* et *STA6*. Nous savons, seulement, grâce à un diploïde obtenu par fusion au polyéthylèneglycol entre deux mutants *sta1-1* et *sta6-1::ARG7*, que les deux gènes n'appartiennent pas au même groupe de complémentation (Van den Koornhuyse, 1996). Par contre, nous ne connaissons rien de la cosegrégation entre les phénotypes observés et les mutations. L'ADNc de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* a été cloné et séquencé (Van den Koornhuyse et coll., 1996).

La première partie de cette étude a consisté au clonage de l'ADNc de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase. Ce travail a été réalisé dans le laboratoire du professeur Jack Preiss, à l'Université du Michigan, aux Etats-Unis. Cet ADNc complet, ainsi que celui de la grande sous-unité, ont été utilisés pour la caractérisation moléculaire des mutants *sta1-1* et *sta6-1::ARG7*.

Nous avons également étudié l'expression du transcrit de la petite sous-unité en condition de photosynthèse au cours d'un cycle jour/nuit (12h/12h). Cette étude a été effectuée dans le laboratoire du professeur Giersch, à l'institut de botanique de l'université de Darmstadt, en Allemagne.

Puis, de manière à vérifier la cosegrégation des différents phénotypes avec les mutations, nous avons réalisé une analyse génétique originale en phase triploïde permettant de contourner la stérilité du mutant *sta6-1::ARG7*. Grâce au diploïde de fusion, la fertilité a pu être restaurée (il est de polarité sexuelle mt^- comme un diploïde végétatif normal). Nous l'avons donc croisé avec une souche sauvage et, obtenu un triploïde, dont les descendants méiotiques déficients pour la synthèse d'amidon ont été étudiés.

1) LE CLONAGE DE L'ADNc CORRESPONDANT AU GENE DE STRUCTURE DE LA PETITE SOUS-UNITE DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE.

1.1) La stratégie de clonage.

La première étape de ce travail a consisté à obtenir une sonde nucléotidique spécifique de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*. En vue d'amplifier une telle sonde par PCR, des amorces oligonucléotidiques correspondants à des régions hautement conservées chez les petites et les grandes sous-unités de différentes espèces ont été sélectionnées.

Les séquences consensus ont été définies, en se basant sur l'alignement des séquences peptidiques de Smith-White et Preiss (1992). Le choix s'est arrêté sur deux séquences utilisées par Villand et coll. (1992), pour cloner les ADNc des petites et grandes sous-unités chez l'orge. La détermination des séquences nucléotidiques correspondantes a pris en compte les codons préférentiels de *C. reinhardtii*.

Nom	séquence peptidique	séquence nucléotidique
JP 308	IDKNARV (antisens)	5'CCA ACG CGG GCG TTC TTG TCA ATG ^{3'}
JP 309	EKPYIASMG	5'GAG AAG CCG TAC ATC GCC TCC ATG GGC ^{3'}

L'amorce JP308 appartiendrait vraisemblablement à la région impliquée dans l'activation allostérique par le 3PGA.

1.2) L'obtention de la sonde.

La PCR a été réalisée sur l'ADN génomique de *C. reinhardtii*. Les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase sont suspectées d'être très proches évolutivement. Pour éviter l'amplification d'un fragment spécifique de la grande sous-unité, l'ADN génomique du mutant *sta1-2::ARG7* a servi de cible. Le gène de la grande sous-unité chez ce mutant est probablement interrompu ou délété.

La PCR a été menée sur 100 ng d'ADN génomique, à l'aide de la Pfu DNA polymérase (Stratagene). Un seul fragment, dont la longueur est environ 550 paires de bases (pb), a été amplifié. Cette taille est celle retrouvée, dans toutes les séquences d'ADNc homologues, chez

les végétaux supérieurs. Il faut alors supposer, que ce fragment, s'il est apparenté aux gènes des ADP-Glc PPases, ne contient pas d'introns.

1.3) Vérification que le produit de PCR n'est pas spécifique du gène de la grande sous-unité.

La digestion par des enzymes de restriction du produit de PCR permet, tout d'abord, de vérifier son homogénéité. Puis, les profils de restriction obtenus du fragment amplifié rendent compte de la relation possible avec l'ADNc de la grande sous-unité.

Des enzymes connues pour couper et ne pas couper le fragment homologue de l'ADNc de la grande sous-unité ont été utilisées (tableau 7).

Enzymes	fragment homologue de l'ADNc de la grande sous-unité (pb)	produit de PCR (pb)
Hinf I	109,442	pas de coupure
Pst I	59,492	pas de coupure
Pvu II	60,491	pas de coupure
Hae III	35, 84, 159, 273	< 75, 149, 160, 205

Tableau 7 : La comparaison des tailles des fragments de restriction obtenus pour le fragment amplifié par PCR, et des tailles attendues pour la région homologue de l'ADNc de la grande sous-unité de C. reinhardtii.

A ce stade du travail, nous pouvons affirmer que ce produit de PCR est homogène et qu'il ne correspond pas au gène de la grande sous-unité de C. reinhardtii.

1.4) Le séquençage du fragment amplifié par PCR.

Après extraction du gel d'agarose (avec le kit QIAEX II de QIAGEN), le produit de PCR a été inséré dans le plasmide pCR 2.1 (Invitrogen). Le séquençage a été effectué avec des amorces spécifiques à pCR 2.1, à l'aide du kit Thermosequenase (Pharmacia).

L'insert a été séquencé complètement. La séquence peptidique déduite, de 185 acides aminés a été comparée avec les séquences contenues dans les banques de données GenBank et EMBL. **Elle présente des homologies caractéristiques avec les petites et grandes**

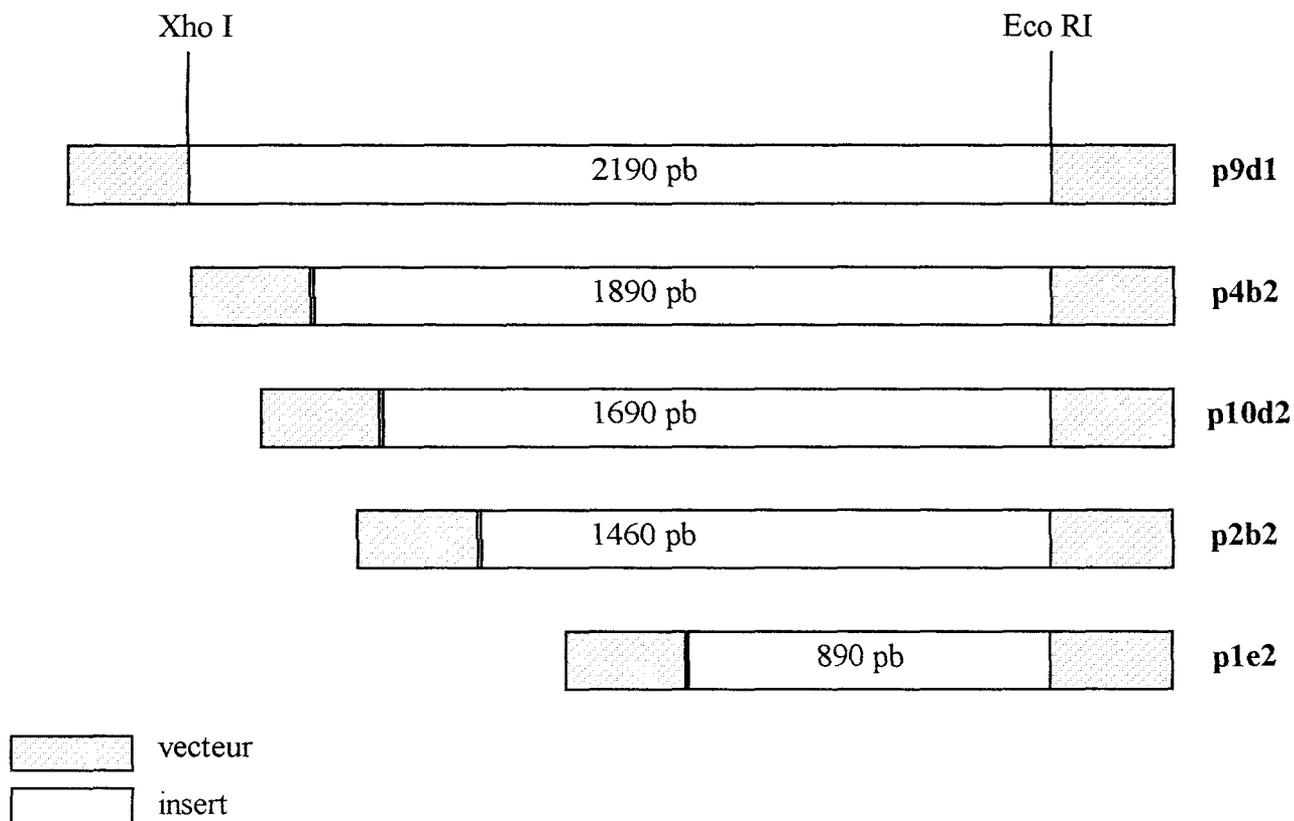


Figure 14 : La taille des différents inserts obtenus après criblages des banques d'ADN complémentaire.

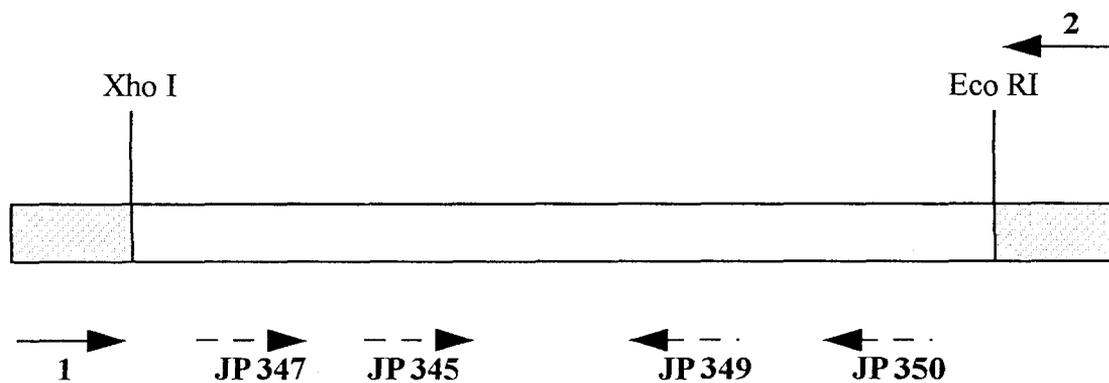


Figure 15 : La stratégie de séquençage des différents clones obtenus après criblage des banques d'ADNc..

1 et 2 sont des amorces spécifiques au vecteur pBluescript SK.

JP 345 et JP 347 sont des amorces spécifiques de la sonde utilisée pour le criblage.

JP 349 et JP 350 ont été utilisés pour terminer le séquençage de la phase ouverte de lecture sur p9d1.

sous-unités des ADP-Glc PPases de différentes espèces. Elle ne correspond pas à la séquence de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*.

1.5) Le criblage des banques d'ADN complémentaires.

Le produit de PCR marqué au α -[^{32}P]-dCTP a servi de sonde pour cribler six banques d'ADNc de *C. reinhardtii* (D'Hulst, 1997), dans le vecteur d'expression λ zap (Stratagene). Le vecteur λ zap renferme le phagemide pBluescript SK contenant les ADNc de chaque ARNm. En présence du "ExAssist helper phage" (phage M13), pBluescript SK subit l'excision *in vivo* permettant sa manipulation comme un plasmide.

Parmi 50 000 phages criblés pour chaque banque, 11 plages de lyse positives ont été sélectionnées. Après quatre cycles de purification, 5 sur les 11 ont finalement été retenues (figure 14).

1.6) Le séquençage des différents inserts.

Chaque insert a été séquençé avec des amorces spécifiques à pBluescript SK, ainsi qu'avec des oligonucléotides complémentaires de la sonde utilisée pour le criblage. De plus, à chaque résultat de séquençage, de nouvelles amorces ont été désignées pour avoir la séquence complète (figure 15).

Tous les inserts renferment une phase ouverte de lecture, et leurs séquences nucléotidiques se chevauchent. Ces insertions sont donc des formes d'un même ADNc. Ils contiennent tous la fin de la séquence codante, ce qui permet d'estimer la taille de la séquence non codante en 3' à environ 1200 pb. La queue polyA est présente dans tous les inserts. La fin du séquençage a été réalisée sur le plasmide p9d1 par la société Genosphère (Paris) et, les séquences obtenues précédemment ont été confirmées.

Le produit du plus grand insert est une protéine de 345 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée (28 kDa) est de loin inférieure à celle de la protéine mature (50 kDa). De plus, le codon d'initiation ATG n'apparaît pas à l'extrémité 5' de l'insert. Par conséquent, cet ADNc est partiel.

1.7) Le clonage de l'extrémité 5'.

Sans tenir compte de la séquence codante pour le peptide de transit, la comparaison des séquences des petites et grandes sous-unités des ADP-Glc PPases de différentes espèces (Smith-White et Preiss, 1992) nous apprend, qu'environ 375 nucléotides sont manquants à

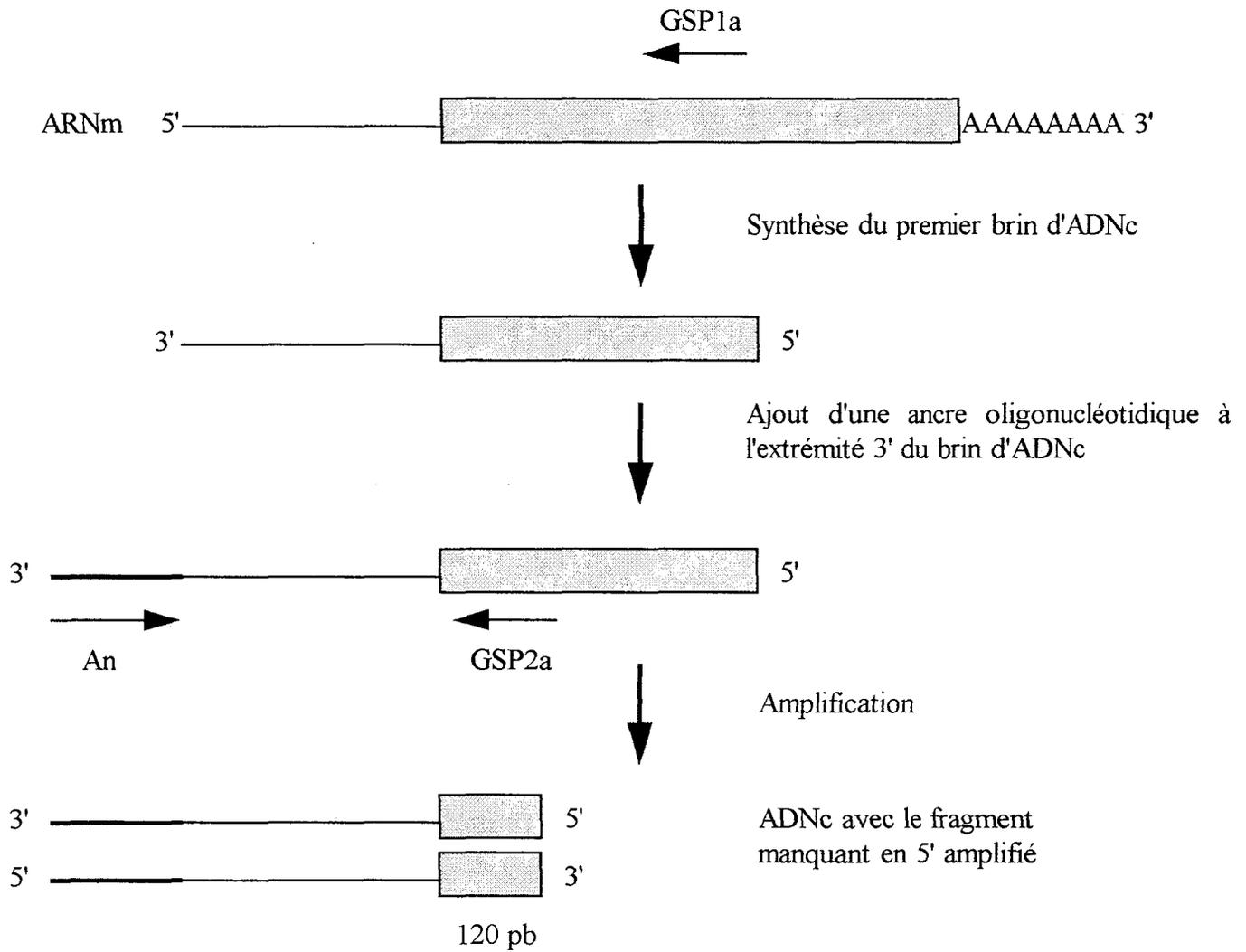


Figure 16 : La stratégie de RACE-PCR

GSP1a et GSP2a sont des amorces complémentaires de l'insert contenu dans p9d1

An est une amorce complémentaire à l'ancre oligonucléotidique rajoutée à l'extrémité 3' du premier brin d'ADNc

 *séquence déjà connue par le séquençage de l'insert de p9d1*

l'extrémité 5'. Sachant que le peptide de transit comprend en moyenne 29 acides aminés chez *C. reinhardtii* (Franzén et coll., 1990), il manquerait, par conséquent, au moins 460 nucléotides pour obtenir l'ADNc complet de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase.

La technique de RACE-PCR en 5' permet d'amplifier un fragment de cette taille. Deux amorces oligonucléotidiques complémentaires de l'insert le plus grand (contenu dans le plasmide p9d1) ont été employées. L'amplification est schématisée dans la figure 16. Les oligonucléotides suivants ont été désignés.

Séquence peptidique	Séquence nucléotidique dérivée	Nom
FVRKH (antisens)	5'GGT GCT TGC GGA CAA A ^{3'}	GSP1a
LILSGD (antisens)	5'GTC GCC CGA CAG GAT GAG GA ^{3'}	GSP2a

Un fragment entre 700 et 750 pb a été amplifié à partir des ARN totaux. La spécificité de ce produit de PCR a été vérifiée par hybridation moléculaire, avec l'insert de p9d1 utilisé comme sonde (résultat non montré). **Ce fragment est spécifique de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase.**

Ce fragment a été séquencé (société Genosphere). Il comporte une phase ouverte de lecture de 626 pb, et chevauche la séquence de l'insert de p9d1 de 120 pb (figure 16).

1.8) La nature de l'ADNc cloné.

Deux codons ATG dans cet ADNc cloné sont susceptibles de jouer le rôle de codon d'initiation (figure 17).

5'AGA CCG ATC CTT AGC ATG GCC CTG AAG ATG CGG GTG AGC^{3'}
 R P I L S M A L K M R V S

Figure 17 : Les deux codons d'initiation possibles de l'ADNc de la petite sous-unité de *Chlamydomonas reinhardtii*

La grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* possède un peptide de transit permettant son transfert dans le chloroplaste. Cela doit être aussi le cas pour la petite sous-unité. Les peptides de transit de *C. reinhardtii* possèdent, à leur extrémité amino-terminale, une courte région non chargée (Franzén et coll., 1990). Or, le second résidu méthionine de notre peptide est suivi immédiatement par un résidu arginine chargé positivement, rendant la séquence non chargée trop courte. La comparaison des séquences de différents peptides de transit chez *C. reinhardtii* (figure 18) montre une prédominance d'un

PSI P28	MALVARPVL SARVAASRPRVAARKAVRVSA^KYGEN
PSI P30	MQALSSRVNIAAKPQRAQRLVVRA^EEVKA
PSI P35	MQTLASRPSLRASARVAPRRAPRVAVVTKA^ALDPQ
PSI P37	MQALATRPSAIRPTKAARRSSVVVRA^DGFIG
Rubisco SS	MAAVIAKSSVSAAVARPARSSVRPMAALKPAVKAAPVAAPAQANQ^MMVWT
ATPase γ	MAAMLASKQGAFMGRSSFAPAPKGVASRGS LQVVA^GLKEV
PRK	MAFTMRAPAPRATAQSRVTANRARRSLVVRA^DKDKT
Rubisco activase	MQVTMKSSAVSGQRVGGARVATRSVRRALQV^VAPSR
Gln synthétase	MAFALRGVTAKASGRTAGARSSGRTLTVRVQAYG^MAAEY
AGPase large	MALAVRPAVASRRAAGKVNLRSGSAAACRVVRLSVSA^EPATK

Figure 18 : La comparaison des peptides de transit de différentes protéines chloroplastiques de Chlamydomonas reinhardtii.

^ correspond au site de clivage du peptide de transit.

PSI P28, P30, P35, P37 : sous-unités 28, 30, 35 et 37 du photosystème I.

Rubisco SS : petite sous-unité de la Rubisco. ATPase γ : sous -unité γ de l'ATPase.

PRK : phosphoribulokinase. Gln synthétase : glutamine synthétase.

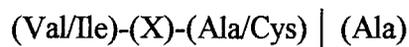
AGPase large : grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

résidu alanine en deuxième position; jamais un résidu arginine n'a été trouvé. De plus, le premier codon ATG trouvé en 5' est généralement le codon d'initiation.

Nous pouvons supposer que le premier codon ATG de la séquence nucléotidique est le codon d'initiation.

La phase ouverte de lecture code pour un peptide de 514 acides aminés, dont la masse moléculaire calculée est de 55 kDa. Or, la masse moléculaire estimée en Western Blot de la petite sous-unité est de 50 kDa (Iglésias et coll., 1994). Une partie de la séquence nucléotidique doit, par conséquent, coder pour le peptide de transit de la protéine.

Contrairement à la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*, la séquence amino-terminale de la petite sous-unité mature n'a pas été déterminée par la dégradation d'Edman (Iglésias et coll., 1994). Toutefois, le consensus de la région de clivage du transit de peptide chez les végétaux supérieurs est :



La région soulignée suivante pourrait correspondre à cette séquence consensus :

46 47

MALKMRVSRQALGSQTFVCPHGSVVRKAVSSKARAVSRQAQVVRA|QAVSTP

Qui plus est, la masse moléculaire calculée de la protéine mature, débutant à l'acide aminé 47, est de 50 kDa. Cette masse correspond à celle estimée en Western Blot (Iglésias et coll., 1994).

Le premier acide aminé après le site de clivage ne serait pas conservé. Le cas se présente pour d'autres protéines de *C. reinhardtii* : l'alanine est remplacée par une méthionine dans la petite sous-unité de la Rubisco, et remplacée par un acide glutamique dans la grande sous-unité de l'ADP-Glc Ppase (Van den Koornhuyse, 1996).

La séquence nucléotidique complète et la séquence peptidique déduite sont présentées dans la figure 19. Cet ADNc se caractérise par un contenu important en GC (63%) typique des gènes de *C. reinhardtii*. Il contient une longue séquence non codante en 3' (1199 pb) et une séquence non codante en 5' de 62 pb. La séquence codante montre un biais typique pour les codons en usage dans la plupart des gènes de *C. reinhardtii*.

Pour 90% des gènes de *C. reinhardtii*, le signal hypothétique de polyadénylation TGTA est retrouvé 10 à 20 pb en amont de la séquence de polyadénylation. Dans quelques cas, le signal TGTA est remplacé par TGTA ou TGTA (Silflow, 1998). Ces trois signaux sont absents dans notre séquence. Les deux gènes *Fus1* et *Mid* trouvés au locus de conjugaison ainsi que les gènes des histones partagent également cette caractéristique (Ferris et

1 tgtgacctgaggtcgaggaaccttcttaggttagtcaaaacagaggaagaccgatccttagc

63 atggccctgaagatgcggggtgagccagcgcagggcgctgggctcgcagaccttcgtctgccccacggctcagtggtgogcaaggccgtgagctccaaggcccgcgcgctgogcgccag
M A L K M R V S Q R Q A L G S Q T F V C P H G S V V R K A V S S K A R A V S R Q 40

183 gctcaggtcgcttcgggctcaggctgtgtcgacccccogttgagaccaaggtcgcgaaacgggggtggcgcatcctctgctgcgggcactgggcagaacgcccggtggcgacatcagcaag
A Q V V R A Q A V S T P V E T K V A N G V A A S S A A G T G Q N D P A G D I S K 80

303 acgggtgctgggtattattctgggtgggtgocggcaaccogtctgtatcctctgaccaagaagcgtgccaagccggcggtgcccctgggcgccaactatcgctgatcgatattccogtt
T V L G I I L G G G A G T R L Y P L T K K R A K P A V P L G A N Y R L I D I P V 120

423 agcaatgcctgaacagcaatgtcaccaagatttactgcctcaccagttcaactcggcgtcgctgaaccgccacctgtcccaggcctacaactcgtctgtgggcggtacaacagccgc
S N C L N S N V T K I Y C L T Q F N S A S L N R H L S Q A Y N S S V G G Y N S R 160

543 ggcttcgtggaggtgctggcgccagcagctcgtccgccaacaagagctggttccagggcaccgcccagcgcogtgcgccagtacatgtggctgttcgaggaggcgggtgocgagggcgctg
G F V E V L A A S **Q S S A N K** S W F Q G T A D A V R Q Y M W L F E E A V R E G V 200

663 gaggacttcctcatcctgtcgggocgaccacctgtacgcgatggactaccgcgactttgtccgcaagcaccgcaactcgggocgcccacatccatcgcgcgctgccctgocgagagaag
E D F L I L S G D H L Y R M D Y R D F V R K H R N S G A A I T I A A L P C A E K 240

783 gaggccagcgccttcggcctgatgaagatcgacgagggggccgctgatcgagttcgcggagaagccaaggcggagggcgtgaccaagatgocgctggacaccggcatcctgggctc
E A S A F G L M K I D E E G R V I E F A E K P K G E A L T K M R V D T G I L G V 280

903 gacccccgccaccgocgocccaagccctacatcgcctccatgggcatctacgtcatgtccgccaaggcgtgocgocagctgctgttgaaccgcatgocggggcccaaccgacttcggaac
D P A T A A A K P Y I A S M G I Y V M S A K A L R E L L L N R M P G A N D F G N 320

1023 gaggctcatccccggcgaaggacgocggcttcaaggtgagggccttcgoccttgacggctactgggaggacatcggtaaccgtggagoccttctacaacgccaaccctggocgtgaccgat
E V I P G A K D A G F K V Q A F A F D G Y W E D I G T V E A F Y N A N L A L T D 360

1143 cccgagaaggcgcagttctcgttctacgacaaggacgocccgatctacaccatgtcgcgcttctcgcocccccaaggtgatggactgocgacgtgaacatgtccatcatcggcgcagggc
P E K A Q F S F Y D K D A P I Y T M S R F L P P S K V M D C D V N M S I I G D G 400

1263 tgcgtgatcaaggccggctccaagatccacaactccatcatcggcatccgctcgcgtgatcggctccgactgcatcatcgacagcgcgatgatgatgggctcggactactacgagaccctg
C V I K A G S K I H N S I I G I R S L I G S D C I I D S A M M M G S D Y Y E T L 440

1383 gaggagtgcgagtagcgtgcccggctgcctgcctatgggctgggocgatggctccatcatcogtgcgcattgtggacaagaacgocgcatgggtcccaagtgccagatcatcaacaag
E E C E Y V P G C L P M G V G D G S I I R R A I V D K N A R I G P K C Q I I N K 480

1503 gacggcgtcaaggaggccaaccgocgaggaaccaggcttcgtgatcaaggacggcattgtcgtcgtgatcaaggactocgacatccccgocggcaccatcatctaaacgtgatggctcggg
D G V K E A N R E D Q G F V I K D G I V V V I K D S H I P A G T I I 514

1623 ccgggaagaggcggcgcgocgocgagacccggccggcgcgocggcagccggcggcgcgocggcgtgtggcggagacgttggtagggagcagacggaggtggcggaccctcaggcacattt
1743 cggcagctgccgtagcagaggacgtggagagccgagcgtgtgtgggtgcacacgctagcgcgcaactcacgacctgcagcagcagcagccgtggcggagatggcgggagctgctcgggta
1863 ctgttgaagcagggcggcccttgctcgtttttgggttggaaatgttgocagtgacgggactctatagagtgggggattgagtgctccttgggtcgggggaaacgccaatggaacgggt
1983 gcggcagcggcgtggcgtggcactgocgttgctgocgaaocgcaagctgocgoccttcccgcaacgggtgcagcagccgatocggaocgcaacccccaggagcggcagtagctgocagtcogct
2103 gcggctgttttgagggagagcgccttttcgggagcgtgaaocggtcoggaaccaagcaocggcgggtggcagcggcagggccttcggccccccggcccttaaagctgocggcgcgcaaaagcaocgc
2223 gcgagggcgtgtgttcccgaggtgcagccggcgggtggcggctgcaggggtgggtgcgagccagctggcgtgccaatccagcaocggcggcgggtgttgocggctcggcgggtggggaaggtgg
2343 agcactgagcggcgtgggtcgggaocgttcgocggctcacgcggcgggtggcggctgccttccgtgggatgocgtaggagggcgggtccttactcgtcgcgtcccacctcggg
2463 gggttgtagtttcttaatttagcgtgtaccatgctcaacattgtttgactccccagaccctgcgaacocctgcatctgcggaggtagagagggctccttgggtgtgtgcagatttttggtg
2583 tttggtttgggtgatgggtcaacagttttgcocgtggcaggtgtgtgocctctcagatgaggagaattgtttgtcctatgcagagtttgaggtgagaggaagacttttgggcagcagctg
2703 caccgtgatccatggagcacagctgcatagaagcaocgtgggcaacgcacacggcttgaaa

Figure 19 : Les séquences nucléotidique et peptidique de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *Chlamydomonas reinhardtii*. La séquence en caractère gras correspond au peptide de transit supposé. La séquence en rouge est l'extrémité du fragment cloné dans p9d1. La séquence en vert correspond au fragment HincII-BstXI utilisé pour les caractérisations moléculaires des mutants *stal-1* et *sta6-1::ARG7* (partie suivante paragraphe 2.1). Enfin, la séquence en magenta est la sonde, amplifiée par PCR, pour la mise en évidence des transcrits de la petite sous-unité (partie suivante, paragraphe 2.2).

coll., 1996 ; Ferris et coll., 1997). L'absence d'un signal de polyadénylation est problématique : cela pourrait conduire à une baisse du nombre de transcrits. Le transcrit pourrait être de ce fait moins stable et donc l'expression de l'ARNm plus faible.

1.9) L'analyse de la séquence nucléotidique et peptidique de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase.

1.9.1) Le peptide de transit.

Le peptide de transit (TP pour transit peptide) de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase comprend 46 acides aminés pour une masse moléculaire de 4964 Da. Les peptides de transit chloroplastiques (cTP) des végétaux supérieurs se caractérisent, généralement par une longueur de 60 à 100 acides aminés. La taille relativement courte de notre séquence est à mettre en rapport avec celles d'autres cTPs de *C. reinhardtii*. Franzén et coll. (1990) ont montré que, chez *C. reinhardtii*, leur longueur est en moyenne de 29 résidus : pour exemple, 24 et 30 résidus respectivement pour les sous-unités P30 et P28 du photosystème I, 35 résidus pour la sous-unité γ de l'ATPase, 36 pour la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase et 45 pour la petite sous-unité de la Rubisco.

La région amino-terminale des cTPs de *C. reinhardtii* est, généralement, non chargée comme celle des plantes. Néanmoins, elle semblerait plus courte, se limitant en moyenne à 5 résidus au lieu d'une dizaine chez les plantes. En ce qui nous concerne, elle comprend 3 acides aminés.

Enfin, les cTPs de *C. reinhardtii* n'apparaissent quasiment jamais chargés négativement, ce qui se vérifie avec notre peptide de transit putatif.

1.9.2) La protéine mature.

Les comparaisons de séquence mettent en évidence, chez les ADP-Glc PPases de différentes espèces, de nombreuses régions conservées. Toutes n'ont pas une fonction bien définie. Néanmoins, certaines d'entre elles ont été identifiées comme appartenant au site catalytique ou au site de liaison des effecteurs allostériques.

La lysine 195 de l'ADP-Glc PPase d'*E. coli* est impliquée dans la liaison au G1P. La plupart des ADP-Glc PPases de plantes ont conservé ce résidu, aussi bien dans les grandes que dans les petites sous-unités. Cette lysine est nécessaire à la liaison au G1P de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase de tubercule de pomme de terre (Fu et coll., 1998a). La petite sous-

Organismes	site de liaison au G1P	site de liaison à l'ATP
<i>Escherichia coli</i>	I I E F V E <u>K</u> P - A N	W Y R G T A D A V
<i>Anabaena</i>	V * D * S * * * K G E	* F Q * * * * * *
Petites sous-unités		
feuille d'épinard, 51 kDa	* * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
tubercule de pomme de terre, 50 kDa	* * * * A * * * Q G E	* F Q * * * * * *
albumen de maïs, 54 kDa	* * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
<i>C. reinhardtii</i> , 50 kDa	V * * * A * * * K G E	* F Q * * * * * *
Grandes sous-unités		
feuille d'épinard, 54 kDa	V L S * S * * * K G D	* F Q * * * * * *
tubercule de pomme de terre, 51 kDa	V V Q * A * * * K G F	* F Q * * * * * *
albumen de maïs, 60 kDa	V L Q * F * * * K G A	* F Q * * * * S I
<i>C. reinhardtii</i> , 53 kDa	V T S * A * * * K T Q	* F Q * * * * * *

Conservation des séquences des sites de liaison au G1P et à l'ATP de l'ADP-glucose pyrophosphorylase d'*E.coli*. Le résidu lysine entouré est celui fortement conservé parmi les ADP-Glc PPases de différentes espèces.

* : acide aminé identique à celui trouvé chez *E.coli*.

Organisme	Site d'activation 1	Site d'activation 2
<i>Anabaena</i>	SGIVVVL <u>K</u> NAVITDGTI	QRRAIID <u>K</u> NAR
Petites sous-unités		
feuille d'épinard, 51 kDa	SGIVTVIKDALIPSGTV	IKRAIID <u>K</u> NAR
tubercule de pomme de terre, 50 kDa	SGIVTVIKDALIPSGII	IKRAIID <u>K</u> NAR
albumen de maïs, 54 kDa	GGIVYVIKDALLPSGTV	IKRAIID <u>K</u> NAR
<i>C. reinhardtii</i> , 50 kDa	DGIVVVIKDSHIPAGTI	IRRAIV <u>D</u> KNAR
Grandes sous-unités		
feuille d'épinard, 54 kDa	SGITVIFKQATIKDGVV	IKRAIID <u>K</u> NAR
tubercule de pomme de terre, 51 kDa	SGIIIIILEKATIRDGTV	IRKCIID <u>K</u> NAK
albumen de maïs, 60 kDa	SGIVVILKNATINECLV	IRNCIIDM <u>N</u> AR
<i>C. reinhardtii</i> , 53 kDa	SGILVIDKDALVPTGTT	ITNAIID <u>K</u> NAR

Sites de liaison au 3PGA des ADP-glucose pyrophosphorylases de cyanobactéries, de *C. reinhardtii* et de plantes. Les résidus lysine soulignés sont ceux protégés par le 3PGA et le Pi ou, ceux identifiés par mutagenèse dirigée comme intervenant dans la liaison au 3PGA.

Figure 20 : Les sites actifs des ADP-glucose pyrophosphorylases d'entérobactéries, de cyanobactéries et de plantes se retrouvent dans la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii*.

unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* contient aussi cette lysine en position 264 (figure 20).

Chez *E. coli*, la tyrosine 114 se lie à la partie adénylée de l'ATP (Lee et Preiss, 1986). Elle appartient à une région de neuf acides aminés retrouvée chez toutes les ADP-Glc PPases des plantes supérieures. Il en est de même pour la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* (figure 20) (Van den Koornhuyse, 1996).

Enfin, deux régions vraisemblablement impliquées dans la liaison au 3PGA sont présentes chez la petite sous-unité de *C. reinhardtii* (figure 20).

Les séquences primaires des petites et grandes sous-unités de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* ont été comparées entre elles. Elles ont été, également, comparées avec les séquences peptidiques des ADP-Glc PPases des végétaux supérieurs et des bactéries (figure 21). Les deux sous-unités de *C. reinhardtii* présentent une homologie de 50,7%. Une telle identité est trouvée, généralement, entre les deux sous-unités des végétaux supérieurs (40 à 60%). La petite sous-unité partage plus d'homologie avec les petites sous-unités des plantes qu'avec les grandes.

L'identité entre les petites sous-unités apparaît de loin supérieure à celle observée entre les grandes. La pression de sélection semble bien avoir été plus forte, pour la petite sous-unité, au cours de l'évolution (Smith-White et Preiss, 1992).

La petite sous-unité présente autant d'homologies avec celles des végétaux supérieurs qu'avec l'unique sous-unité des cyanobactéries. Il en est de même pour la grande sous-unité. Ceci confère à l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*, une place intermédiaire entre celle des cyanobactéries et celle des végétaux supérieurs. Contrairement aux conclusions de Van den Koornhuyse (1996), il n'existe pas une plus grande similitude entre la grande sous-unité de *C. reinhardtii* et les petites des végétaux supérieurs. Nous pouvons expliquer cela, par le fait que certaines séquences utilisées dans son travail n'étaient encore que partielles.

Un arbre phylogénique a été construit à partir des séquences primaires utilisées pour les comparaisons précédentes (figure 22). Quatre groupes de liaison apparaissent nettement : celui des entérobactéries, celui des cyanobactéries, celui des petites sous-unités et celui des grandes sous-unités. Les résultats de Smith et Preiss (1992) sont corroborés : les petites sous-unités sont séparées en deux familles: les monocotylédones et les dicotylédones.

Les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* sont clairement apparentées à leur famille respective chez les végétaux supérieurs. Toutefois, elles sont plus proches de l'unique sous-unité des cyanobactéries que ne le sont les sous-unités des plantes supérieures.

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Synechocystis</i>	Petite <i>C. reinhardtii</i>	Grande <i>C. reinhardtii</i>	Petite <i>A. thaliana</i>	Grande <i>A. thaliana</i>
Petite <i>C. reinhardtii</i>	32,4 %	32,6 %	56,5 %	54,3%	/	50,7 %	56,3 %	47,6 %
Grande <i>C. reinhardtii</i>	29,2	29,5	52,8	52,8	50,7	/	49,9	54,5

	Petite pomme de terre	Grande pomme de terre	Petite maïs	Grande maïs	Petite Riz	Grande Riz
Petite <i>C. reinhardtii</i>	56,5 %	46,1 %	59,7 %	40,3 %	59,1 %	40,5 %
Grande <i>C. reinhardtii</i>	50,8 %	51,8 %	53,2 %	45,5 %	51,2 %	46,8 %

Figure 21 : Les homologues entre les séquences peptidiques des petite et grande sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii* et les séquences des sous-unités chez les végétaux supérieurs et les bactéries.

Les séquences utilisées pour les comparaisons sont issues de GenBank, exceptées celle de la petite sous-unité BT2 de l'ADP-Glc PPase du maïs tirée de Smith-White et Preiss (1992), et celle de la grande sous-unité de *Chlamydomonas reinhardtii* tirée de Van den Koornhuyse (1996).

Les numéros d'accès sont les suivants

417056 : ADP-glucose pyrophosphorylase d'*Escherichia. coli*

232170 : ADP-glucose pyrophosphorylase d'*Anabaena*

1575754 : petite sous-unité d'*Arabidopsis thaliana*

232164 : petite sous-unité du tubercule de pomme de terre

444329 : grande sous-unité SH2 de l'albumen de maïs

2149019 : grande sous-unité de l'albumen de riz

121299 : ADP-glucose pyrophosphorylase *Salmonella typhimurium*

1653912 : ADP-glucose pyrophosphorylase de *Synechocystis*

4586350 : grande sous-unité d'*Arabidopsis thaliana*

1707929 : grande sous-unité du tubercule de pomme de terre

121289 : petite sous-unité de l'albumen de riz

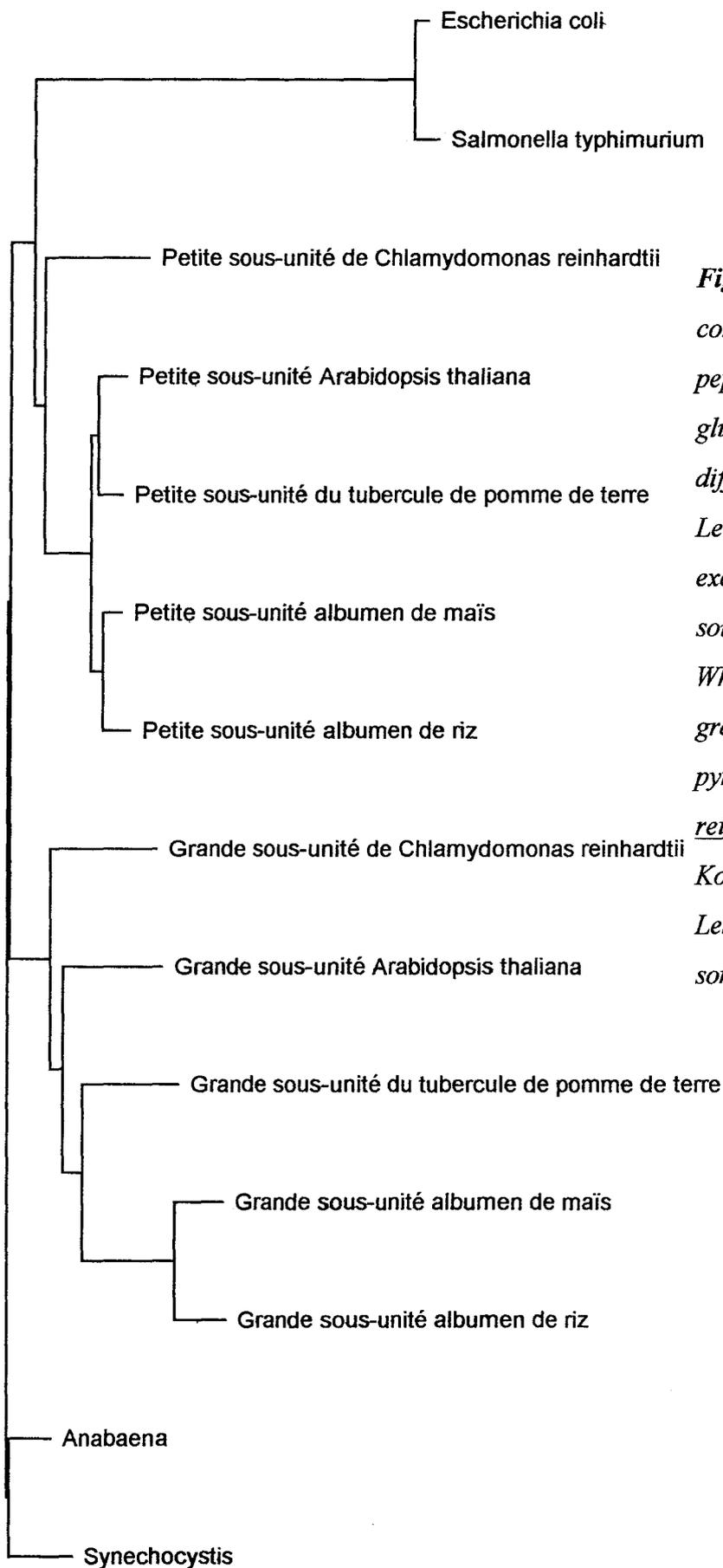


Figure 22 : L'arbre phylogénique construit à partir des séquences peptidiques des sous-unités de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de différents organismes.

Les séquences sont issues de GenBank, excepté pour la séquence de la petite sous-unité BT2 du maïs tirée de Smith-White et Preiss (1992), et celle de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii* tirée de Van den Koornhuyse (1996).

Les numéros d'accès dans GenBank sont identiques à ceux de la figure 21.

Les deux sous-unités proviendraient d'un même gène ancestral qui se serait dupliqué au cours de l'évolution. L'ADP-Glc PPase *C. reinhardtii* est plus proche de celle des cyanobactéries que l'ADP-Glc PPase des plantes. Les petites sous-unités des végétaux supérieurs se rapprochent plus de la sous-unité des cyanobactéries que les grandes sous-unités. Or, pour *C. reinhardtii*, l'homologie avec la sous-unité des cyanobactéries est quasiment la même pour les deux sous-unités. **L'ADP-glucose pyrophosphorylase de *C. reinhardtii* occuperait, par conséquent, dans l'évolution, une position pour laquelle, la duplication du gène donnant naissance à la seconde sous-unité, est assez récente.**

L'ADNc de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*, comme l'ADNc de la grande sous-unité (Van den Koornhuysse, 1996), a été cloné grâce aux homologies de séquences partagées avec l'ADP-Glc PPase des plantes. Nous pouvons d'ailleurs constater, en phylogénie, que ces deux sous-unités sont apparentées à leurs homologues végétaux.

La structure de l'amidon de *C. reinhardtii*, accumulé en carence azoté, est en tout point comparable à celle de l'amidon de réserve des plantes (Ball, 1998). En outre, toutes les enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon chez les végétaux sont présentes chez cette algue. La présence de deux sous-unités pour l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*, leurs homologies avec celles des végétaux et, l'existence d'une régulation par le 3PGA et le Pi de l'enzyme apportent des éléments supplémentaires quant à la validité de notre modèle pour la biosynthèse de l'amidon.

Il est intéressant de constater que des organismes ayant suivi des voies évolutives différentes possèdent un matériel commun permettant de synthétiser le même polysaccharide.

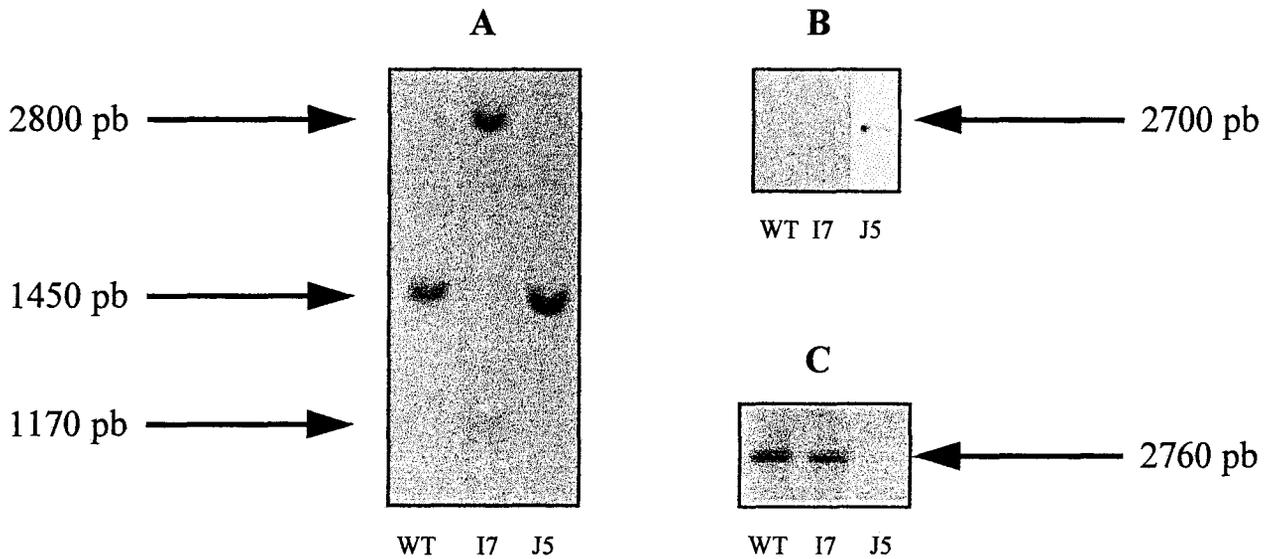


Figure 23 : La caractérisation moléculaire des souches I7 (*sta1-1*) et BAF J5 (*sta6-1::ARG7*).

WT est la souche sauvage de référence. J5 représente la souche BAF J5. L'ADN génomique (10 à 15 µg) de chaque souche est digéré par *Pst*I.

A : hybridation avec un fragment *Pvu* II de 356 pb, interne à la région codante de l'ADNc de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

B : hybridation avec un fragment bactérien *Nru*I-*Sal*I de 323 pb, du plasmide pARG7-8 utilisé pour la mutagenèse d'insertion.

C : hybridation avec un fragment *Hinc*II-*Bst*XI de 322 pb, interne à la région codante de l'ADNc de la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

2) LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES I7 (*sta1-1*) ET BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) ET L'ETUDE DU TRANSCRIT DU GENE DE LA PETITE SOUS-UNITE.

2.1) La caractérisation moléculaire des souches I7 et BAF J5.

Les souches I7 (*sta1-1*) et BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) ont été obtenues respectivement, par mutagenèse aux rayons X et par insertion de plasmide. Ces techniques de mutagenèse sont généralement responsables d'importants remaniements aux loci touchés.

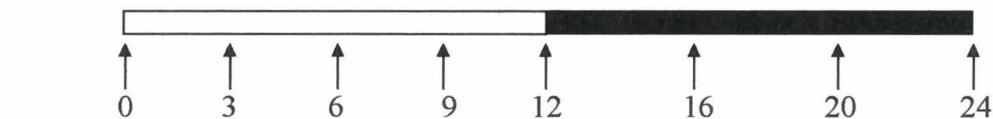
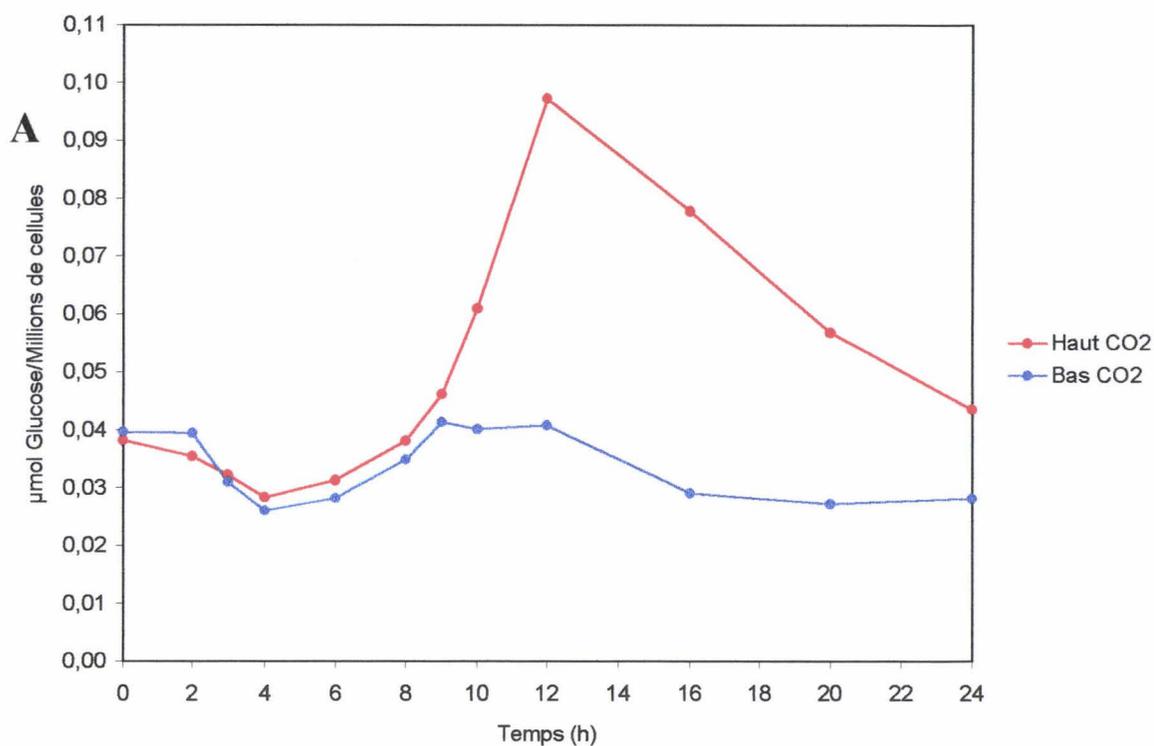
Trois sondes ont été utilisées pour l'hybridation moléculaire : une correspondant à un segment codant de l'ADNc de la grande sous-unité (un fragment *PvuII* de 356 pb), une correspondant à un segment codant de l'ADNc de la petite sous-unité (un fragment *HincII-BstXI* de 322 pb) et une correspondant à un fragment *NruI-SalI* de 323 pb issu de pARG7-8 utilisé pour la mutagenèse. Dans le dernier cas, le plasmide contient le gène de l'arginino-succinate lyase de *C. reinhardtii*. La sonde correspond à une partie bactérienne du plasmide, de manière à éviter une hybridation croisée entre les copies sauvages et mutées du gène ASL présentes chez les parents. Les profils d'hybridation sont visualisés dans la figure 23.

L'hybridation avec la sonde correspondant à la grande sous-unité fait apparaître une bande unique à 1450 pb chez la souche sauvage et la souche BAF J5 (*sta6::ARG7*). Par contre, elle est remplacée dans la souche I7 (*sta1-1*) par deux signaux à 2800 et 1170 pb.

Un signal unique correspondant à la sonde plasmidique pour la souche BAF J5 laisse supposer qu'elle ne possède qu'une copie du plasmide intégré dans son génome. Ce signal est absent pour la souche sauvage et I7 qui n'ont pas été transformées avec pARG7-8.

Une bande à 2760 pb est visible en hybridation avec la sonde de la petite sous-unité chez la souche sauvage et I7 (*sta1-1*). Par contre, elle est absente chez la souche BAF J5 (*sta6-1::ARG7*), ce qui laisse présager une délétion importante du gène de la petite sous-unité.

Chaque ADNc met en évidence une modification de profil pour une souche mutante distincte. Nous pouvons alors supposer que *STA1* est le gène de structure de la grande sous-unité, tandis que *STA6* est le gène de structure de la petite sous-unité. Le plasmide



B 0H 0B 3H 3B 6H 6B 9H 9B 12H 12B 16H 16B 20H 20B 24H 24B

C

		Temps (heures)							
		0	3	6	9	12	16	20	24
Cultures	Bas CO ₂	2,9	2,6	5,9	5,6	11	3,4	4,2	3,2
	Haut CO ₂	2,6	5,5	5,6	5,6	5,3	6,2	5,8	5,3

Figure 24 : L'accumulation d'amidon, l'expression du transcrite de la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase et la mesure de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase chez *Chlamydomonas reinhardtii* durant un cycle jour/nuit.

A : Accumulation d'amidon durant un cycle 12H jour/12H nuit. La barre sous le graphe indique les périodes jour/nuit correspondantes : en blanc, le jour et en noir, la nuit. Haut CO₂ indique les cellules cultivées en haute concentration de CO₂ (4 %) et bas CO₂, les cellules cultivées en basse concentration en CO₂ (CO₂ atmosphérique).

B : Expression du transcrite de la petite sous-unité durant un cycle 12H jour/12H nuit. Les flèches et les nombres sous la barre indiquent les temps de prélèvement pour l'extraction des ARN totaux. H signifie haut CO₂ et B, bas CO₂. Une quantité de 30 µg d'ARN totaux est déposée.

C : Activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase durant un cycle 12H jour/12H nuit. Le dosage a été effectué dans le sens dégradation par mesure du G1P formé. les activités ont été mesurées en présence de 1,5 mM 3PGA et sont exprimées en nmol de G1P incorporé mg protéine⁻¹ min⁻¹ (×10⁻²).

pARG7-8, présent à une seule copie dans le génome de BAF J5, pourrait être responsable de la délétion importante du gène de la petite sous-unité.

Ces résultats préliminaires se doivent d'être vérifiés par une analyse de coségrégation entre les mutations et les modifications de profil observées.

2.2) L'expression des ARN messagers de la petite sous-unité.

Nous avons examiné, sur une culture en condition de photosynthèse active, l'expression temporelle des ARNm correspondants aux petites et grandes sous-unités de l'ADP-Glc PPase.

Les cellules divisées en deux cultures ont été préalablement cultivées en forte concentration en CO₂ (air enrichi par 4 % de CO₂) et synchronisées en cycle jour/nuit (12h lumière/12h obscurité), pendant 60 heures. Ces 60 heures correspondent au début du troisième cycle d'illumination pour lequel un premier échantillon est prélevé. Deux heures après, une des cultures est placée en basse concentration en CO₂. A partir du premier prélèvement, durant 24 heures, les échantillons ont été pris toutes les 3 heures, durant la phase d'illumination, et toutes les 4 heures, durant la phase obscure. Pour chaque point, nous avons extrait les ARN totaux et effectué en parallèle un dosage de l'activité ADP-Glc PPase ainsi qu'un dosage d'amidon.

La courbe d'accumulation d'amidon est présentée dans la figure 24A. Pendant les quatre premières heures de la phase lumière, l'amidon est dégradé. Puis, l'amidon commence à être accumulé, jusqu'à atteindre un pic à la fin de la phase lumière. Il est ensuite dégradé à l'obscurité. Les cellules se comportent exactement comme des organes photosynthétiques de plantes. La synthèse d'amidon, grâce au CO₂ fixé par la photosynthèse, est effectuée le jour et, la dégradation a lieu la nuit.

La fourniture de carbone est limitante pour la synthèse d'amidon, puisque les cellules cultivées en atmosphère enrichie en CO₂ accumulent en fin de phase lumière 2,5 fois plus d'amidon.

Pour chaque sous-unité, une sonde spécifique a été désignée pour éviter en Northern Blot, une hybridation croisée. Pour la petite sous-unité, des signaux très faibles ont pu être obtenus. Toutefois, la mise en évidence par hybridation moléculaire du transcrite de la grande sous-unité a échoué. Deux tentatives précédentes, dans deux laboratoires différents, n'avaient pas abouti, laissant supposer un faible niveau d'expression de cet ARNm. Le résultat d'hybridation est présenté dans la figure 24B.

Au début de la phase lumière, les ARNm ne semblent pas exprimés puisque aucun signal n'apparaît. Trois heures après, un signal faible entre 2800 et 2900 pb est présent pour les cellules cultivées en haute et en basse concentration en CO₂. Ce signal se maintient avec la même intensité tout au long de la phase d'illumination quelle que soit la concentration en CO₂. Durant la phase obscure, ce signal n'est plus observable.

Il semblerait que chez *C. reinhardtii*, il existe une première régulation transcriptionnelle par l'horloge circadienne et/ou par la lumière.

Nous avons mesuré l'activité ADP-Glc PPase au cours des phases lumineuses et obscures (figure 24C). Bien que le gène de la petite sous-unité ne soit pas transcrit durant la nuit, l'enzyme est encore présente puisqu'il reste de l'activité. Celle-ci est comparable à l'activité observée le jour. Or, l'amidon n'est plus synthétisé mais dégradé. Nous pouvons supposer qu'intervient ici la régulation allostérique de l'ADP-Glc PPase. Durant le jour, le 3PGA est formé, suite à la photosynthèse. Le rapport 3PGA/Pi augmente : l'enzyme est alors activée, ce qui se traduit par une accumulation d'amidon. Par contre, la nuit, la balance 3PGA/Pi s'inverse et l'enzyme est inhibée.

Au début du cycle lumineux, l'activité est plus faible; néanmoins, elle est présente. Or, la dégradation de l'amidon continue les quatre premières heures du cycle lumineux. Nous pouvons imaginer l'existence d'une balance d'activité ADP-Glc PPase/enzymes de dégradation qui est encore favorable à ces dernières, pendant les quatre premières heures du cycle lumineux.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase serait donc régulée de deux façons chez *C. reinhardtii* : par une régulation transcriptionnelle dépendante du rythme circadien et/ou de la lumière et par une régulation post-traductionnelle qui est l'activation allostérique par le 3PGA.

3) L'ANALYSE GENETIQUE DES LOCI *STA1* ET *STA6*.

La souche 330 sans paroi et mutante pour l'argino-succinate lyase (ASL; les mutants ne peuvent synthétiser l'arginine) a été soumise à des expériences de transformation avec le plasmide pARG7-8. Ce plasmide code l'ASL de *C. reinhardtii*. Les mutants d'insertion ont donc été sélectionnés pour leur faculté à croître sur un milieu sans arginine. Parmi ceux-ci, la souche BAF J5 a été isolée et retenue, car elle présentait un phénotype "jaune" après coloration aux vapeurs d'iode. Cette coloration caractérise les souches accumulant moins de 10% d'amidon. BAF J5 accumule, en fait, moins de 0,1% d'amidon et ne renferme plus d'activité ADP-Glc PPase (Van den Koornhuyse, 1996). Qui plus est, une activité de débranchement surnuméraire apparaît en zymogramme et, cette souche est paralysée (Van den Koornhuyse, 1996).

De nombreuses tentatives ont été réalisées pour croiser cette souche en vue d'une analyse génétique. Toutes sans exception se sont révélées vaines. **Le mutant BAF J5 apparaît donc complètement stérile.**

Pour outrepasser cette stérilité, nous avons décidé de tenter une analyse génétique en phase triploïde. La souche BAF J5 a été fusionnée au PEG avec la souche NV314 (*sta1-1*) et le diploïde obtenu sexué *mt* a été croisé avec une souche sauvage *mt*⁺. Se lancer dans une analyse de ségrégation trisomique peut sembler hasardeux en raison de la forte mortalité des ségrégeants issus de la méiose d'un zygote triploïde. Mais, nous avons été conforté dans l'idée d'utiliser une telle technique par les travaux de Eves et Chiang (1982). Ce type particulier d'analyse en complément d'autres techniques leur a permis de démontrer le caractère diploïde d'une de leur souche. Ils ont réalisé une étude de ségrégation de cinq marqueurs appartenant à des groupes de liaison différents, dans la descendance aneuploïde. Malgré la forte létalité observée chez les ségrégeants (elle peut atteindre 80%), ces cinq marqueurs ségrégent selon la fréquence trisomique attendue (qui est de 5/6 pour un marqueur présent à raison de deux copies dominantes pour une copie récessive et de 1/6 pour un marqueur présent à raison de deux copies récessives pour une copie dominante). Cette analyse trisomique a été effectuée six fois sur une période de treize mois et a toujours abouti à l'obtention des mêmes fréquences dans la population méiotique. Il semble donc que dans un tel croisement, la fréquence de transmission de chaque chromosome pris individuellement soit identique et que la forte mortalité observée soit plutôt le fait d'un déséquilibre chromosomique important dans la cellule.

	137C	I7	BAF J5	DP1
quantité d'amidon	41 µg	2,5 µg	non détectable	55 µg
facteur d'activation de l'ADP-Glc PPase	8	1	non détectable	10
coloration à l'iode	noire	jaune	jaune	noire

Tableau 8 : La comparaison des phénotypes de quelques souches haploïdes et de DP1. Les souches I7 et BAF J5 contiennent respectivement les mutations *sta1-1* et *sta6-1::ARG7*. 137 C est la souche sauvage de référence. La quantité d'amidon est exprimée en µg de polysaccharide par million de cellules. Le facteur d'activation de l'ADP-Glc PPase représente le rapport des activités mesurées en présence de 1,5 mM 3-phosphoglycérate sur celles estimées en absence de l'activateur. La coloration à l'iode constitue le phénotype, après vaporisation à l'iode, des plages cellulaires carencées en azote et cultivées pendant 5 jours en lumière continue.

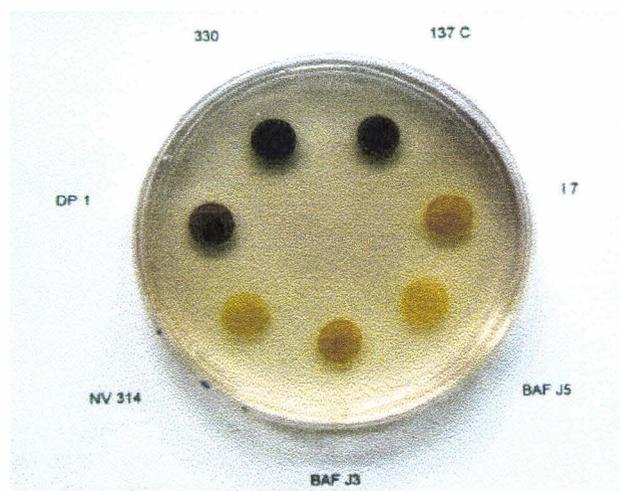


Figure 25 : Les phénotypes des souches colorées aux vapeurs d'iode.

137C, 330 : souches sauvages de référence

I7, NV314 : mutants *sta1-1*

BAF J3 : mutant *sta1-2::ARG7*

BAF J5 : mutant *sta6-1::ARG7*

DP1 : diploïde de fusion BAF J5×NV314

L'analyse génétique d'un tel croisement s'est avérée complexe sur le plan théorique. Nous avons choisi de la détailler car, elle a apporté des renseignements qui n'auraient jamais été obtenus par une analyse génétique traditionnelle (si celle-ci avait été possible).

3.1) La réalisation du croisement triploïde.

Le recours à la fusion somatique a été nécessaire pour déterminer si les mutations *sta1-1* et *sta6-1::ARG7* étaient alléliques. La souche BAF J5 stérile et NV314 *sta1-1* (obtenue par mutagenèse aux rayons X) ont donc été fusionnées au PEG, pour engendrer le diploïde DP1. La souche NV314 possédant une paroi a préalablement été traitée à l'autolysine pour engendrer un protoplaste. Cette technique entraîne des fusions multiples. Néanmoins, le faible nombre de clones obtenus (quatre) laisse présumer que la fusion a engendré uniquement des diploïdes. De plus, le volume cellulaire moyen de DP1 est le double de celui d'une souche haploïde (Van den Koornhuysse, 1996). Comme nous le verrons ultérieurement, les proportions observées pour chaque caractère trophique dans la descendance du croisement valident la nature diploïde de ce clone. Le génotype de DP1 est le suivant :

<i>mt</i> ⁺	+	<i>nit1</i>	<i>nit2</i>	<i>sta6-1:ARG7</i>	+	<i>arg7-7</i>	<i>cw15</i>
<i>mf</i>	<i>pab2</i>	+	+	+	<i>sta1-1</i>	+	+

DP1 a été sélectionné, par complémentation des marqueurs trophiques parentaux, sur milieu minimum. Les phénotypes de DP1, de ses parents et des souches de référence sont résumés dans le tableau 8 et la figure 25.

La souche DP1 apparaît "noire", après coloration aux vapeurs d'iode (souche accumulant une quantité normale d'amidon), laissant supposer que la complémentation des mutations a eu lieu. En effet, la quantité d'amidon accumulé (55 µg) est équivalente à celle d'une souche haploïde sauvage et l'activité ADP-Glc PPase est restaurée.

Chez *C. reinhardtii*, la polarité sexuelle *mf* est dominante, et les diploïdes végétatifs sont sexués. Nous espérons que DP1 soit fertile, le génome de la souche *sta1-1* complétant la stérilité supposée récessive. Toutefois, avant de lancer le croisement avec une souche haploïde sauvage, nous avons contrôlé que DP1 renfermait les génomes de la souche *sta1-1* et de la souche *sta6-1::ARG7*. Cette vérification a été réalisée par hybridation moléculaire. Les trois sondes utilisées pour la caractérisation moléculaire des souches I7 (*sta1-1*) et BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) ont été employées. Le résultat est présenté figure 26.

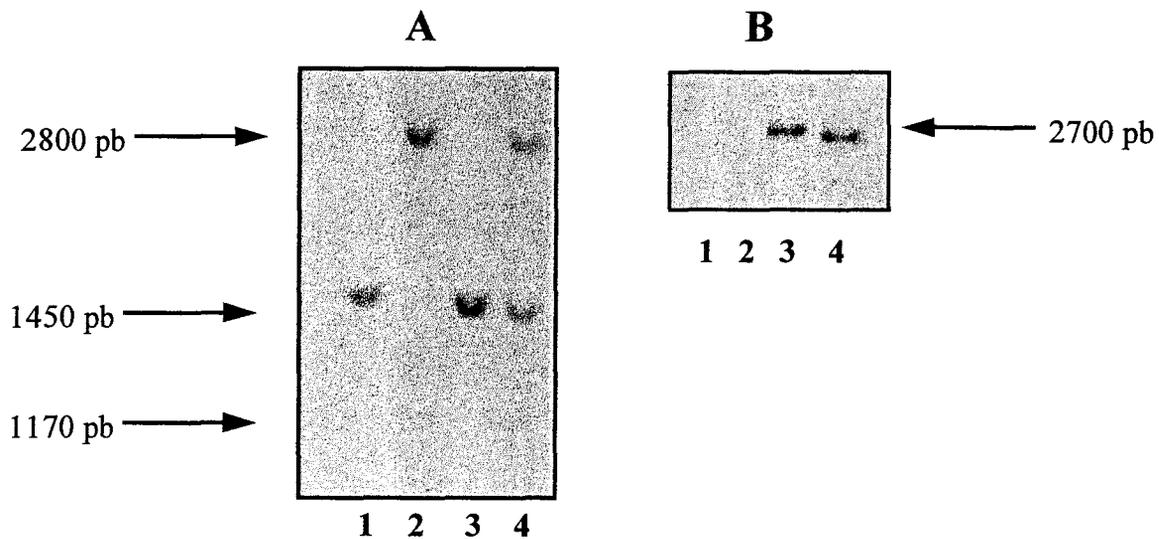


Figure 26 : Les profils d'hybridation moléculaire obtenus pour la souche sauvage, la souche I7 (*stal-1*), la souche BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) et le diploïde DP1 (*stal-1/sta6-1::ARG7*).

A : hybridation avec un fragment interne de la région codante de la grande sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase.

B : hybridation avec un fragment bactérien du plasmide pARG7-8.

1 : souche sauvage 2 : I7 3 : BAF J5 4 : DP1

L'hybridation avec la sonde correspondant au gène de la grande sous-unité fait apparaître le profil mutant de la souche I7 et, la bande à 1450 pb visible chez la souche sauvage et BAF J5. DP1 possède en hybridation avec l'ADNc de la petite sous-unité, la bande à 2760 pb trouvée chez la souche sauvage et I7. Enfin, il renferme une copie du plasmide pARG7-8 typique du génome de BAF J5. **Le diploïde DP1 contient le génome des deux souches utilisées pour la fusion au PEG. Il peut donc servir pour engendrer un zygote triploïde.**

Le croisement avec la souche 37 sauvage haploïde donne naissance à un triploïde dont le génotype est le suivant :

<i>mt</i> ⁺	+	+	<i>nit1</i>	<i>nit2</i>	<i>sta6-1::ARG7</i>	+	<i>arg7-7</i>	<i>cw15</i>
<i>mt</i>	<i>pab2</i>	+	+	+	+	<i>sta1-1</i>	+	+
<i>mt</i> ⁺	<i>pab2</i>	<i>ac14</i>	+	+	+	+	+	+

Ce triploïde est susceptible de subir la méiose. Il donnera une descendance aneuploïde, qui se caractérisera par une variabilité phénotypique plus importante que la descendance d'un diploïde.

Le croisement a été réalisé par Anne Carton (1996), lors de son année de D.E.A. Seuls les mutants déficients pour la synthèse d'amidon ont été conservés (phénotype jaune après coloration à l'iode). La population recombinante sauvage (de phénotype noire) n'a pas été mise en collection. Toutefois, les informations concernant les caractères AC (besoin d'acétate pour la croissance), PAB (besoin d'acide para-amino benzoïque pour la croissance), et NIT (capacité d'assimiler les nitrates) de chaque clone "noir" sont encore disponibles. Malheureusement, l'analyse des recombinants mutants laisse supposer l'existence d'un certain nombre d'erreurs d'appréciation des phénotypes dues aux observations, effectuées une seule fois, par Anne Carton (1996).

Si les appréciations sur la population "jaune" d'intérêt ont pu être contrôlées, les phénotypes des recombinants sauvages n'ont pas pu être confirmés. Cette remarque explique un certain nombre d'imprécisions relevées dans l'analyse de la population "noire" recombinante. C'est pourquoi, nous avons donc choisi de débiter par l'analyse génétique de la population mutante et ensuite, d'interpréter avec prudence les données obtenues pour la population recombinante sauvage.

3.2) L'analyse de la population recombinante mutante "jaune"

Après vérification des phénotypes de la population recombinante mutante, nous avons observé quelques discordances. Parmi 61 clones, huit souches apparues "jaunes" en première appréciation sont en fait sauvages. Des erreurs sont apparues également dans l'interprétation des phénotypes. Les phénotypes de chaque souche sont placés en annexe 1.

3.2.1) Le contrôle de la qualité du croisement.

La qualité du croisement a été contrôlée grâce à la ségrégation des marqueurs AC et PAB (tableau 9); *ac14* et *pab2* appartiennent au même groupe de liaison et leur fréquence de recombinaison est de 0,21.

	Proportions observées	Proportions théoriques (trisomiques)
AC⁺	73,6%	83,3%
AC⁻	26,4%	16,7%
PAB⁺	45,3%	50%
PAB⁻	54,7%	50%
AC⁺PAB⁺	41,5%	48,2%
AC⁺PAB⁻	32,1%	35,1%
AC⁻PAB⁺	3,8%	1,8%
AC⁻PAB⁻	22,6%	14,9%

Tableau 9 : Comparaison des proportions observées et théoriques pour les marqueurs AC, PAB et ACPAB, dans la descendance "jaune" du croisement triploïde DP1×37.

Le test χ^2 (les calculs sont en annexe 2) ne permet pas de rejeter la ségrégation trisomique. Les distributions observées pour chaque marqueur sont donc conformes aux distributions théoriques attendues pour cette ségrégation particulière. **L'analyse génétique peut donc être réalisée sur cette sous-population recombinante.** De plus, les proportions observées valident la nature diploïde de la souche DP1.

3.2.2) L'étude du caractère arginine.

Le pourcentage de clones auxotrophes pour l'arginine est de 9,4% chez les recombinants "jaunes". Le locus *ARG7* est présent dans le triploïde, à raison d'une copie mutée pour deux copies sauvages. Les proportions obtenues en ségrégation trisomique seront donc de 1/6 de clones ARG^- pour 5/6 de clones ARG^+ . Mais, la souche BAF J5 contient, dans son génome nucléaire une ou plusieurs copies du plasmide pARG7-8 permettant la complémentation de l'auxotrophie pour l'arginine. Cette souche est donc hémizygote pour le caractère arginine. Selon le nombre de copies fonctionnelles intégrées, la proportion des clones ARG^- varie.

- une copie fonctionnelle : 1/12 (8,3%) de clones ARG^-

- deux copies fonctionnelles : 1/24 (4,16%) de clones ARG^-

Avec 9,4% de descendants arg^- , il semble qu'une seule copie fonctionnelle du plasmide soit intégrée dans le génome nucléaire. Il faut noter que si cette hypothèse est la plus vraisemblable, la taille de notre échantillon ne permet pas de rejeter la présence possible de deux copies avec un niveau de confiance très élevé (les calculs sont fournis en annexe 2). Néanmoins, la présence d'une seule copie est confirmée par les résultats d'hybridation moléculaire obtenus précédemment (paragraphe 2.1 et 3.1).

3.3) L'analyse de la population recombinante sauvage.

Comme c'est souvent le cas en analyse des spores au hasard chez *C. reinhardtii*, la population obtenue après méiose est contaminée par un certain nombre de génotypes parentaux n'ayant pas subi le croisement. Une correction d'effectif permet d'estimer le nombre réel de recombinants sauvages de phénotype parental (voir annexe 3).

Selon que la population recombinante initiale est de 95 de 105 clones (avec les erreurs d'appréciation, voir annexe 1), les corrections d'effectifs mettent en évidence une population recombinante totale de 132 ou 146 clones. L'analyse ci-dessous ne peut donc être qu'approximative contrairement à celle établie pour les recombinants "jaunes". La proportion de descendants "jaunes" varierait donc entre 40,1% et 36,3%. Examinons les proportions théoriques attendues en fonction de l'indépendance ou d'une liaison étroite des loci *STAI* et *STA6* (tableau 10).

	Proportions observées		Proportions théoriques
AC ⁺	68,6 %	67,9 %	83,3 %
AC ⁻	31,4 %	32,1 %	16,7 %
PAB ⁺	53,7 %	56 %	50 %
PAB ⁻	46,3 %	44 %	50 %
AC ⁺ PAB ⁺	44,6 %	44,8 %	48,2 %
AC ⁺ PAB ⁻	24 %	23,1 %	35,1 %
AC ⁻ PAB ⁺	9,1 %	11,2 %	1,8 %
AC ⁻ PAB ⁻	22,3 %	20,9 %	14,9 %
NIT ⁺	52,9 %	56 %	69,4 %
NIT ⁻	47,1 %	44 %	30,6 %

Tableau 11 : La comparaison des proportions observées et théoriques des marqueurs AC, PAB, ACPAB et NIT dans la population recombinante totale. Les proportions en rouge sont celles pour une population de 132 clones et en vert celles pour une population de 146 clones.

	Loci indépendants	Loci liés
Clones noirs	25/36	24/36
Clones jaunes avec amidon	6/36	6/36
Clones jaunes sans amidon	5/36	6/36
Total des clones jaunes	11/36 30,6%	12/36 33,4%

*Tableau 10 : Proportions théoriques, après coloration à l'iode, des descendants du croisement triploïde impliquant les mutations *sta1-1* et *sta6-1::ARG7*, selon l'indépendance ou la liaison des loci *STA1* et *STA6*.*

Nous constatons immédiatement, que les proportions sont trop proches entre elles pour permettre une distinction entre les deux hypothèses, dans la population observée, surtout si une partie de celle-ci est entachée d'imprécisions. Nous noterons simplement que les proportions observées comprises entre 40,1% et 36,1% sont compatibles avec chacune des hypothèses.

Attachons-nous aux proportions de chaque marqueur dans le cas d'une population recombinante de 132 clones ou de 146 clones. Elles sont résumées dans le tableau 11. Une petite imprécision est suffisante pour rendre très difficile l'interprétation des proportions observées. Toutefois, elles ne sont pas complètement aberrantes : elles suivent, en effet, "grosso modo" la ségrégation trisomique qui a été correctement éprouvée dans la population recombinante mutante.

Dans la population totale, les ségrégations des caractères AC, PAB et NIT ne souffrent pas d'un biais particulier. Nous verrons que le caractère NIT se comporte de manière totalement opposé dans la population recombinante "jaune".

3.4) L'analyse de ségrégation des gènes *STA1* et *STA6* parmi les recombinants défectueux pour la synthèse de l'amidon.

Cette analyse a été réalisée, d'une part, en test de complémentation, et d'autre part, par la caractérisation moléculaire des souches recombinantes mutantes.

3.4.1) Les tests de complémentation.

Les descendants mutants "jaunes" ACJ4, ACJ26, ACJ45, ACJ61 ($AC^- PAB^- NIT^+$) et ACJ36 ($AC^+ PAB^- NIT^+$) ont été croisés avec les souches I7 ($AC^+ PAB^- NIT^- STA1^-$) et BAF J3 ($AC^+ PAB^- NIT^- STA1^-$). Les souches I7 et BAF J3 sont de polarité sexuelle respective *mf* et *mt*⁺. Ces croisements préliminaires ont été choisis, parce qu'ils conduisaient à

Croisement	ACJ 4	ACJ 26	ACJ 45	ACJ 61	ACJ 36
ACJ 11	-	Jaune	-	-	-
ACJ 15	-	-	-	-	-
ACJ 16	-	Jaune	-	-	-
ACJ 17	Jaune	-	Jaune	Jaune	Jaune
ACJ 18	-	-	-	-	-
ACJ 19	-	Noire	-	-	-
ACJ 20	-	Noire	-	-	-
ACJ 21	-	Jaune	-	-	-
ACJ 22	-	Jaune	-	-	-
ACJ 23	Noire	-	Noire	Noire	Noire
ACJ 27	-	-	-	-	-
ACJ 28	Jaune	-	Jaune	Jaune	Jaune
ACJ 54	Noire	-	Noire	Noire	Noire
ACJ 55	-	-	-	-	-
ACJ 56	Noire	-	Noire	Noire	Noire

Tableau 13 : Les tests de complémentation entre des souches "jaunes" issues du croisement DP1×37. Les diploïdes végétatifs ont été sélectionnés sur milieu nitrate minimum. La coloration à l'iode a été effectuée après 7 jours de croissance sur milieu minimum carencé en azote.

Jaune et Noire sont les colorations prises par les diploïdes végétatifs après vaporisation d'iode.

la sélection positive de diploïdes végétatifs par l'entremise des marqueurs trophiques. Les croisements fertiles sont ceux pour lesquels les clones diploïdes sont apparus après trois jours.

La sélection des diploïdes végétatifs en combinaison avec I7 ou BAF J3 nous renseignera sur la polarité sexuelle (ou la stérilité) des recombinants mutants (tableau 12). Les fusions sexuelles, pour éprouver la stérilité ou la fertilité des souches, ont été réalisées à quatre reprises et, ont abouti au même résultat. La coloration à l'iode des plages cellulaires carencées en azote fournira le phénotype "amidon" des souches (tableau 12).

Croisement	ACJ4	ACJ26	ACJ45	ACJ61	ACJ36
I7	-	Jaune	-	-	-
BAF J3	Jaune	-	Jaune	Jaune	Jaune
polarité sexuelle	<i>mf</i>	<i>mt</i> ⁺	<i>mf</i>	<i>mf</i>	<i>mf</i>

Tableau 12 : Détermination du phénotype "amidon" partiels et de la polarité sexuelle de 4 souches "jaunes" (déficients pour la synthèse d'amidon) du croisement DP1×37. Les diploïdes végétatifs ont été sélectionnés sur milieu nitrate minimum. La coloration à l'iode a été effectuée après 7 jours de croissance sur milieu minimum carencé en azote. Jaune est la coloration prise après complexation de l'amidon résiduel avec l'iode.

Les diploïdes végétatifs apparaissent tous jaunes, après coloration à l'iode. Aucune complémententation de la mutation *sta1-1* n'a eu lieu. **Les cinq mutants testés sont donc soit *sta1-1* soit *sta1-1 sta6-1::ARG7*.** Nous avons sélectionné 16 descendants mutants AC⁻ PAB⁻ NIT⁺ pour effectuer un test de complémententation avec les 5 recombinants précédents. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

L'apparition d'un clone noir chez les diploïdes issus de la fusion de deux mutants défectueux pour *STA1* et/ou *STA6* nécessite que l'un soit porteur uniquement de la copie sauvage de *STA1*, et que l'autre possède uniquement la copie sauvage de *STA6* (comme le diploïde de fusion originale DP1).

Nous en déduisons que **ACJ4, ACJ26, ACJ36, ACJ45 et ACJ61 ne renferment que la mutation *sta1-1*. Leurs partenaires ACJ19, ACJ20, ACJ23, ACJ54 et ACJ56 ne possèdent que la mutation *sta6-1::ARG7*.** Ces souches ont désormais leur génotype attribué par test de complémententation en trans. Quant aux souches ACJ11, ACJ16, ACJ17, ACJ21, ACJ22 et ACJ28, elles doivent porter la mutation *sta1-1*, pour donner un diploïde "jaune" en complémententation. Nous ignorons, par contre, si elles contiennent en plus la mutation *sta6-1::ARG7*.

Plusieurs croisements ont été tentés avec les souches ACJ15, ACJ18, ACJ27 et ACJ55. Tous ont été improductifs. Ces quatre souches sont probablement stériles comme la souche mère BAF J5.

Dans l'ensemble les souches recombinantes *sta6-1::ARG7* se sont comportées normalement pour la production d'un diploïde végétatif, alors que la souche originale BAF J5 n'a jamais pu être croisée. **La stérilité observée chez BAF J5 n'est pas une conséquence directe et simple de la mutation *sta6-1::ARG7*.**

3.4.2) La caractérisation moléculaire des recombinants mutants.

3.4.2.1) Quels sont les profils attendus ?

Trois cas de figures, pour lesquels des profils d'hybridation moléculaire différents seront obtenus, sont à envisager.

cas n°1 : si les loci *STA1* et *STA6* sont étroitement liés, nous dénombrerons dans la population "jaune" une moitié de descendants *STA1 sta6-1::ARG7* et une moitié *sta1-1 STA6*; aucun clone "jaune" ne pourra contenir simultanément les signaux spécifiques d'hybridation Southern attribuables aux remaniements génomiques dus à la présence de *sta1-1* ou *sta6-1::ARG7*. Nous retrouverons donc systématiquement les profils de la souche I7 ou ceux de la souche BAF J5.

cas n°2 : si les loci sont sur des groupes de liaison différents, parmi les mutants nous dénombrerons 2/11 *+/sta1 sta6*, 1/11 *sta1 sta6*, 2/11 *+ sta6*, 1/11 *+/+ sta6*, 2/11 *sta1 +/sta6*, 2/11 *sta1 +* et 1/11 *sta1 +/+* (le génotype *sta1 +/sta6* signifie que la souche porterait un seul chromosome renfermant la mutation *sta1-1* et deux chromosomes pour le locus *STA6* dont un seul serait mutant).

cas n°3 : si les loci appartiennent au même groupe de liaison mais sont distants de plus de 50 unités de distance, le chromosome portant la (les) mutation(s) ne pourra être présent qu'à un seul exemplaire chez une souche mutante. Si la souche contient ce chromosome surnuméraire, elle présentera obligatoirement un phénotype sauvage. Ceci signifie que chez les recombinants *sta1-1*, on ne pourra jamais observer un signal propre à *sta6-1::ARG7*. De même, les recombinants *sta6-1::ARG7* n'exhiberont jamais un signal spécifique à *sta1-1*. Seules les souches authentifiées *sta1-1 sta6-1::ARG7* contiendront les profils spécifiques des deux mutations. Par contre, dans le cas n°2, une souche porteuse de *sta1-1* (ou *sta6-1::ARG7*) pourra renfermer à l'état aneuploïde un signal spécifique de *sta6-1::ARG7* (de *sta1-1*)

puisque un chromosome surnuméraire est susceptible de compléter cette dernière mutation (figure 27).

cas n°2 : *STA1* et *STA6* appartiennent à des groupes de liaison différents.

cas n°3 : *STA1* et *STA6* sont sur le même chromosome, à plus de 50 unités de distance.

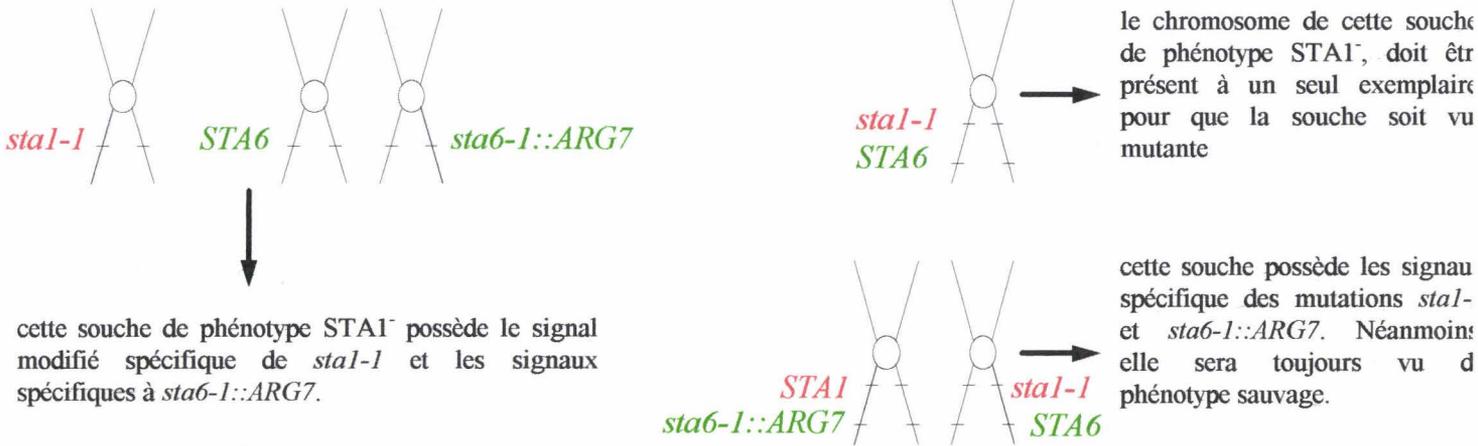


Figure 27 : Schéma explicitant les cas de figures n°1 et 2. Dans le cas n°2, nous voyons que si le chromosome porteur de la mutation *sta6-1::ARG7* est surnuméraire, la mutation *sta1-1* peut s'exprimer. Par contre, dans le cas n°3, sa présence complète la mutation *sta1-1*.

3.4.2.2) Les profils observés.

Les mêmes sondes que pour la caractérisation moléculaire des souches sauvage, I7 et BAF J5 ont été utilisées (paragraphe 2.1). Trois profils majeurs sont visualisés dans la descendance "jaune" déficiente pour la synthèse d'amidon (figure 28); les profils complets pour chaque souche sont placés en annexe 5.

Tous les clones définis en test de complémentation comme possédant uniquement la mutation *sta1-1* exhibent la configuration d'hybridation B. Tous sont caractérisés par les deux signaux d'hybridation de 1170 et 2800 pb propres à la mutation *sta1-1* (profil 1b). **Ce profil mutant coségrègeant toujours avec la mutation *sta1-1* dans le croisement, nous pouvons en conclure que *STA1* code la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*.**

Ce profil profondément modifié pour les souches *sta1-1* pourrait être le résultat d'une translocation ou d'une inversion chromosomique impliquant le gène de la grande sous-unité. En effet, cette mutation est issue d'une mutagenèse aux rayons X connue pour provoquer d'importants remaniements chromosomiques.

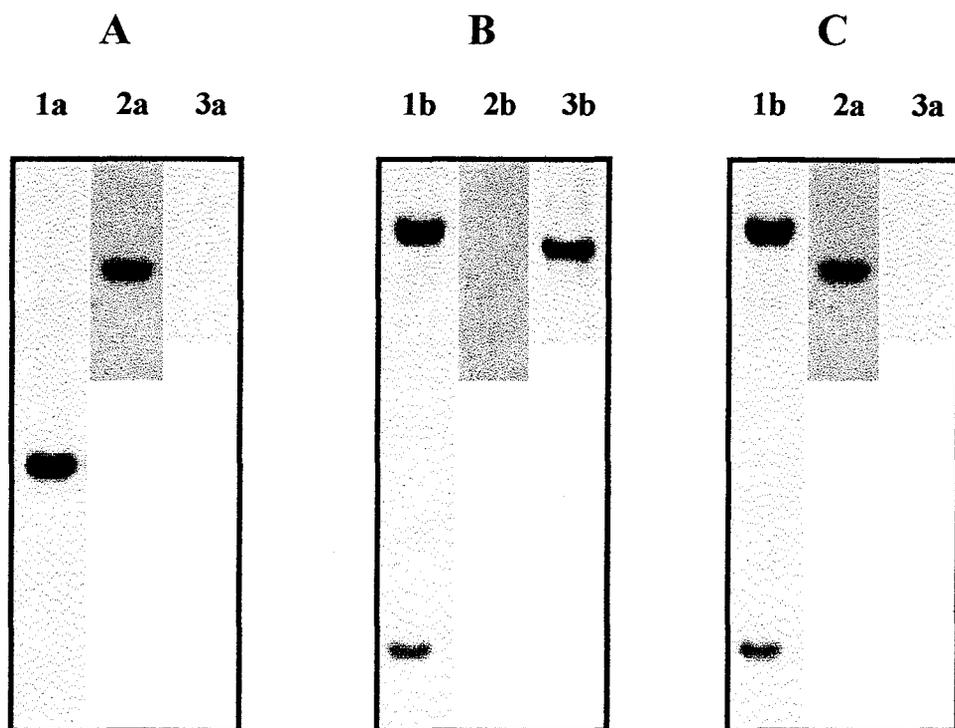


Figure 28 : Les trois profils d'hybridation moléculaire (A, B et C) obtenus pour les descendants "jaunes" du croisement DP1×37. L'ADN génomique (10 à 15 µg) a été digéré par PstI.

1 : profils d'hybridation avec la sonde PvuII de 356 pb, interne à la séquence codante de l'ADNc de la grande sous-unité.

a signal à 1450 pb spécifique de la souche sauvage et de BAF J5 (*sta6-1::ARG7*)

b signaux à 2800 et 1170 pb spécifiques de I7 (*sta1-1*)

2 : profils d'hybridation avec le fragment NruI-Sall de 323 pb, issu de pARG7-8.

a signal à 2700 pb spécifique de BAF J5

b absence de signal pour la souches sauvage et I7

3 : profils d'hybridation avec la sonde HincII-BstXI de 322 pb, interne à la séquence codante de l'ADNc de la petite sous-unité.

a absence de signal pour la souche BAF J5

b signal à 2760 pb spécifique de la souches sauvage et de I7

La configuration d'hybridation A caractérise les souches démontrées porteuses de la mutation *sta6-1::ARG7*, par le test de complémentation. La coségrégation est également nette entre les profils mutants (absence du signal correspondant au gène de la petite sous-unité et présence du signal spécifique du plasmide utilisé pour l'insertion) et la mutation *sta6-1::ARG7*. **STA6 est par conséquent le gène de structure de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase.**

En examinant plus en détail les résultats de l'annexe 5, nous nous apercevons que les mutants possédant uniquement *sta1-1* ou *sta6-1::ARG7* ne sont jamais porteurs des profils respectifs de *sta6-1::ARG7* et *sta1-1*. **Il faut alors exclure que les deux gènes STA1 et STA6 appartiennent à des groupes de liaison différents.** En effet, si cette hypothèse était correcte, 2/5 des souches pour chaque population auraient les deux profils simultanément. Sur 22 souches analysées, le cas ne s'est jamais produit.

Par contre, nous avons observé dans un certain nombre de cas, la présence simultanée des deux profils suggérant l'existence de double mutant *sta1-1 sta6-1::ARG7*. D'après l'ensemble des résultats obtenus sur l'ADP-Glc PPase, une double interruption *sta1-1 sta6-1::ARG7* doit conduire au même phénotype qu'un simple mutant *sta6-1::ARG7* (absence totale d'amidon et activité ADP-Glc PPase non détectable). Les résultats rapportés dans le chapitre 4 (mesure de la quantité d'amidon et de l'activité ADP-Glc PPase) confirment ceci.

La présence simultanée des signaux propres à *sta1-1* et à *sta6-1::ARG7* montre que les deux gènes STA1 et STA6 sont susceptibles de recombiner à haute fréquence entre eux. Nous en déduisons qu'ils sont présents sur un même groupe de liaison à plus de 50 unités de distance. Si la recombinaison avait pu être visualisée par un croisement traditionnel, nous n'aurions pu identifier la liaison de STA1 et STA6 sur un même chromosome. Néanmoins, ce résultat mériterait confirmation par une analyse génétique traditionnelle ultérieure.

La corrélation est parfaite entre les signaux d'hybridation moléculaire et les génotypes obtenus par test de complémentation. Nous avons considéré pouvoir utiliser les résultats d'hybridation moléculaire pour les souches dont le génotype n'avait pas encore été déterminé. La caractérisation moléculaire et les tests de complémentation ont permis d'établir, de manière non équivoque, les génotypes de 51 souches recombinantes "jaunes" du croisement (voir en annexe 1).

3.4.3) Le cas des souches ACJ38 et ACJ51.

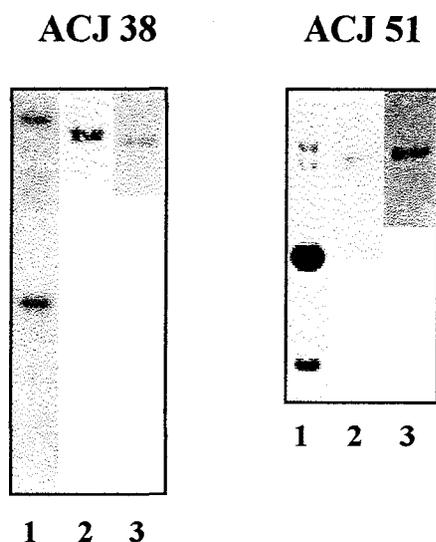


Figure 29 : Profils d'hybridation moléculaire obtenus pour les descendants ACJ38 et ACJ51

1 : profils d'hybridation avec le fragment *PvuII*, couvrant 356 pb de la région codante de l'ADNc de la grande sous-unité.

2 : profil d'hybridation avec le fragment *NruI-SalI* de 323 pb, issu de *pARG7-8*.

3 : profil d'hybridation avec la sonde *HincII-BstXI*, couvrant 322 pb de la région codante de l'ADNc de la petite sous-unité.

Pour les souches ACJ38 et ACJ51, les profils d'hybridation moléculaire atypiques, représentés dans la figure 29, ont été obtenus. Contrairement aux profils précédents, ces deux souches ont simultanément le signal de *pARG7-8* caractéristique d'une copie *STA6* mutée et le signal *STA6* sauvage. En outre, chacune possède le signal sauvage *STAI* et une des deux bandes correspondant au profil *STAI* muté. Ces profils laissent supposer l'existence d'importants remaniements chromosomiques. D'ailleurs, des événements tels que des inversions ou des translocations chromosomiques sont plus fréquemment observés sous l'action des rayons X.

La présence des signaux correspondant à la mutation *sta6-1::ARG7* et au locus *STA6* sauvage s'explique aisément par l'aneuploidie des deux souches. Chacune possède un chromosome surnuméraire avec une copie sauvage de *STA6* complétant la mutation. Les souches seraient donc aussi aneuploïdes pour *STAI* (les deux loci étant sur le même chromosome). Un événement de recombinaison à la méiose engendrerait alors un seul des signaux correspondant au profil mutant. De nombreuses configurations (inversions, translocation avec *STAI* et *STA6* du même côté ou de part et d'autre du centromère) ont été testées sur papier. Seule la configuration figurant dans la figure 30 a été retenue. Néanmoins, elle ne reste encore qu'une hypothèse. Il sera utile de tester sa validité en croisant les souches ACJ38 et ACJ51 avec une souche sauvage de polarité opposée. Si cette hypothèse s'avère vraie, nous ne devrions jamais dissocier par recombinaison, dans la descendance, le signal sauvage de *STAI* du signal unique provenant de la mutation *sta1-1*. En effet, de telles

recombinaisons conduirait à l'apparition de chromosomes ne renfermant pas l'entièreté de l'information indispensable à la survie de la cellule.

Ces deux souches avec de tels profils doivent être de phénotype sauvage. C'est en effet le cas de ACJ51, qui se colore en noire avec l'iode, et accumule une quantité d'amidon comparable à celle d'une souche sauvage (34,3 μg par 10^6 cellules). Par contre, ACJ 38 prend une coloration jaune avec l'iode, et synthétise une quantité d'amidon typique d'une souche *sta1-1* (1,4 μg par 10^6 cellules). Il est possible qu'une mutation se soit produite lors de l'événement de recombinaison à l'intérieur des chromosomes remaniés.

3.4.4) Le marqueur NIT dans la descendance "jaune".

La capacité de pousser avec le nitrate comme source d'azote est sous la dépendance des deux gènes nucléaires *NIT1* et *NIT2*. *NIT1* code la nitrate réductase et *NIT2* code un transactivateur contrôlant l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du nitrate dont *NIT1*. *nit2⁻* est épistasique sur *nit1⁻* (Fernández et coll., 1998). Pour qu'une souche puisse pousser sur nitrate, les deux loci doivent être sauvages. Les deux gènes sont présents dans le zygote triploïde à raison de deux copies sauvages pour une copie mutée. En ségrégation trisomique, les proportions théoriques de clones NITRATE⁺ et nitrate⁻ s'élèvent respectivement à 69,4 et 30,6% dans la population recombinante. Chez les recombinants "jaunes" déficients pour la synthèse d'amidon, ces proportions apparaissent complètement inversées : 79,2% des clones sont nitrate⁻ pour 21,8% de clones NITRATE⁺.

Dans le zygote triploïde, *nit1⁻* et *nit2⁻* sont en couplage avec l'allèle *sta6-1::ARG7*. Le locus *STA6* doit donc être lié génétiquement à un des deux gènes. Nous pouvons déterminer lequel par à un test de croissance sur nitrites caractérisant les souches *nit2⁺*.

- si *STA6* est lié à *NIT1*, une majorité des clones *sta6-1::ARG7* et *sta1-1 sta6-1::ARG7* seront NITRATE⁻. Parmi ces derniers, une grande partie sera NITRITE⁺ (en effet, la ségrégation trisomique de *NIT2* est 5/6 de *nit2⁺* pour 1/6 de *nit2⁻*). En outre, très peu de clones *sta1-1* seront NITRATE⁻.

- si *STA6* est lié à *NIT2*, une forte majorité des clones *sta6-1::ARG7* ou *sta1-1 sta6-1::ARG7* NITRATE⁻ seront NITRITE⁻ et dans la population *sta1-1*, la plupart des NITRATE⁻ seront NITRITE⁺.

Observons, la distribution des marqueurs NITRATE et NITRITE en fonction des génotypes des recombinants mutants (tableau 14).

		Phénotypes				
		NITRATE ⁺ NITRITE ⁺	NITRATE ⁻ NITRITE ⁻	NITRATE ⁻ NITRITE ⁺	NITRATE ⁻ ?	??
Génotypes	<i>staI⁻</i>	7	0	2	0	0
	<i>sta6</i>	1	9	1	1	0
	<i>staI⁻-sta6</i>	0	19	2	0	1
	<i>Sta6</i> ou <i>staI⁻-sta6</i>	0	2	0	0	0

Tableau 14 : Relation entre la capacité à pousser sur nitrates et nitrites et les génotypes des souches "jaunes", déficientes pour la synthèse d'amidon, issues du croisement DP1×37. *staI⁻* signifie *sta1-1*; *sta6* signifie *sta6-1::ARG7*. Le point d'interrogation signifie qu'un des deux caractères ou les deux n'ont pas été déterminés.

Nous constatons, que peu de souches *sta1-1* sont NITRATE⁻ (2/9) et, que la majorité des souches porteuses de la mutation *sta6::ARG7* sont NITRATE⁻ (34/36). Ceci confirme la liaison du locus *STA6* avec un des loci *NIT*. Parmi les souches possédant l'allèle muté de *STA6*, environ 90% sont NITRITE⁻, ce qui est loin des 16,7% attendus en cas d'indépendance des loci *STA6* et *NIT2*.

Ces résultats suggèrent que *STA6* et *NIT2* appartiennent au même groupe de liaison. Nous avons précédemment placé *STA6* et *STAI* sur le même chromosome. L'analyse génétique en phase triploïde permet alors de positionner *STAI*, *STA6* et *NIT2* sur le chromosome III avec une liaison significative entre *STA6* et *NIT2*.

4) LES CARACTERISTIQUES DES SOUCHES MUTANTES "JAUNES" ISSUES DU CROISEMENT DP1×37.

4.1) La quantité de polysaccharide accumulé.

Un dosage d'amidon a été effectué sur la majorité des souches de phénotype apparent "jaune" (déficientes pour la synthèse d'amidon), ainsi que sur des souches apparues "noires" (accumulant une quantité normale d'amidon) en deuxième appréciation. Elles ont été cultivées en milieu carencé en azote permettant pour une souche sauvage, une accumulation massive d'amidon. Le tableau 15 met en rapport les différents génotypes des souches avec la quantité de polysaccharide accumulé.

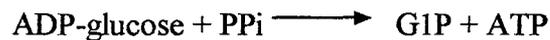
	SOUCHES								
	137C noir	I7	BAF J5	ACJ1	ACJ2	ACJ3	ACJ4	ACJ5	ACJ7
Quantité d'amidon	41 µg	2,5 µg	/	/	/	/	0,8 µg	/	/
λmax	590	570	/	/	/	/	576	/	/
Génotype	WT	<i>stal</i>	<i>sta6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal</i>	<i>stal-6</i>	?
	ACJ9	ACJ10	ACJ11	ACJ12	ACJ13	ACJ14	ACJ15	ACJ16	ACJ17
Quantité d'amidon	/	/	/	/	/	2,3 µg	0,9 µg	/	/
λmax	/	/	/	/	/	583,5	584	/	/
Génotype	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal</i>	<i>stal</i>	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i> ou <i>stal-6</i>
	ACJ18	ACJ19	ACJ20	ACJ21	ACJ22	ACJ23	ACJ24	ACJ25	ACJ26
Quantité d'amidon	/	/	/	/	/	/	/	/	0,75 µg
λmax	/	/	/	/	/	/	/	/	561
Génotype	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>	<i>sta6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal</i>
	ACJ27	ACJ28	ACJ29	ACJ30 noir	ACJ31	ACJ32	ACJ33	ACJ34	ACJ35
Quantité d'amidon	/	/	/	16 µg	76 ng	/	0,29 µg	/	/
λmax	/	/	/	604,5	582,5	/	604	/	/
Génotype	<i>sta6</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	WT	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>	<i>stal</i>	<i>sta6</i> ou <i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>
	ACJ36	ACJ37 noir	ACJ38	ACJ39	ACJ40	ACJ41 noir	ACJ42	ACJ43	ACJ44
Quantité d'amidon	0,6 µg	50 µg	1,4 µg	/	/	30 µg	/	/	1,2 µg
λmax	581	591,5	571	/	/	612,5	/	/	583,5
Génotype	<i>stal</i>	?	étrange	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>	WT	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>	<i>stal</i>
	ACJ45	ACJ46	ACJ47 noir	ACJ48	ACJ50 noir	ACJ51 noir	ACJ53 noir	ACJ55	ACJ54
Quantité d'amidon	0,5 µg	60 ng	22 µg	/	16 µg	34,3 µg	23 µg	/	/
λmax	565	570,5	604	/	601,5	613	603,5	/	/
Génotype	<i>stal</i>	<i>sta6</i>	WT	?	WT	étrange	WT	<i>stal-6</i>	<i>sta6</i>
	ACJ56	ACJ57	ACJ58	ACJ59	ACJ60 noir	ACJ 61			
Quantité d'amidon	/	0,8 µg	/	/	15,5 µg	0,68 µg			
λmax	/	579,5	/	/	595,5	563			
Génotype	<i>sta6</i>	<i>stal</i>	<i>stal-6</i>	<i>stal-6</i>	WT	<i>stal</i>			

Tableau 15 : Les relations entre le génotype, la quantité (en ng ou en µg par 10⁶ cellules) et la longueur d'onde au maximum d'absorption (λmax en nm) du polysaccharide accumulé par les descendants du croisement DPI×37. Toutes les souches sont jaunes après coloration à l'iode exceptées celles annotées "noir". / signifie que la quantité de polysaccharide était en dessous de la limite de détection du kit de dosage utilisé. Les génotypes en rouges ont été obtenus par le test de complémentation; ceux en vert ont été fournis par les résultats d'hybridation moléculaire.

Les génotypes trouvés par test de complémentation ou par hybridation sont en accord complet avec les quantités de polysaccharide accumulé. En effet, les souches *sta1-1* synthétisent entre 0,5 et 2,5 µg d'amidon. Par contre, les souches *sta6-1::ARG7* et *sta1-1 sta6-1::ARG7* accumulent des quantités d'amidon qui, lorsqu'elles sont détectables, n'excèdent guère une dizaine de nanogrammes.

4.2) L'activité ADP-glucose pyrophosphorylase des recombinants mutants.

Les activités ont été mesurées dans le sens dégradation par mesure du G1P formé.



Les souches répertoriées comme sauvage ont une activité de base (en absence de 3PGA) moyenne de $3,6 \cdot 10^{-2}$ nmol de G1P incorporé mg protéine⁻¹ min⁻¹ avec un facteur d'activation par le 3PGA compris entre 3 et 8.

Comme nous l'espérons, les souches porteuses uniquement de *sta1-1* possèdent une activité de base moyenne de $4,2 \cdot 10^{-2}$ équivalente à celle d'une souche sauvage et, l'enzyme n'est pas sensible à l'activation (le facteur d'activation est compris entre 0,8 et 1).

D'après Van den Koornhuysse (1996) qui a mesuré la formation de [³²P]-ATP à partir de [³²P]-PPi, l'activité présente chez la souche BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) se révèle nulle. Par contre, le test employé dans ce travail (la production de G1P), ne nous permet pas de confirmer avec le même niveau de précision l'absence d'activité. En effet, le test met en évidence l'activité de base d'une pyrophosphatase organique capable de cliver la liaison pyrophosphate de l'ADP-Glc et de libérer du G1P.

4.3) Les effets pléiotropes de la mutation *sta6-1::ARG7*.

4.3.1) La mobilité des souches mutées au locus *STA6*.

La souche mère BAF J5 s'avère stérile et immobile. Nous avons démontré que la stérilité et *sta6-1::ARG7* ne coségrégeaient pas. Nous avons observé au microscope optique la mobilité des descendants *sta6-1::ARG7*. Sur 12 souches *sta6-1::ARG7*, 9 sont mobiles et 3 sont incapables de se mouvoir. Par contre, chez les souches *sta1-1*, 4 sur 10 sont paralysées. **La paralysie n'est donc pas un effet simple et direct de la mutation *sta6-1::ARG7*.**

4.3.2) L'activité de débranchement surnuméraire.

Les activités de branchement, de débranchement et de dégradation sont visualisées en zymogramme amidon (gel de polyacrylamide 7,5% contenant de l'amidon à 1 g/l). Elles entraînent une modification de la structure de l'amidon qui est mise en évidence grâce à l'interaction iode-polysaccharide. L'action des enzymes de débranchement conduit par exemple à l'apparition de bandes bleues.

La souche BAF J5 présente en zymogramme une activité de débranchement surnuméraire par rapport à une souche sauvage. Nous avons vérifié si elle coségrégait avec la mutation *sta6-1::ARG7*, dans la descendance du croisement triploïde (figure 31).

Sur le nombre réduit de souches testées en zymogramme, nous remarquons que certaines souches *sta6-1::ARG7* ne possèdent pas l'activité de débranchement surnuméraire. Néanmoins, l'activité supplémentaire n'est présente chez aucune souche *sta1-1*. Une analyse sur un nombre plus important de souches s'avère donc nécessaire. En effet, il est possible que dans un environnement génétique particulier, l'activité s'exprime quand la mutation *sta6-1::ARG7* est présente. **Quoiqu'il en soit, l'apparition de cette activité n'est pas une conséquence simple et directe de la mutation *sta6-1::ARG7*.**

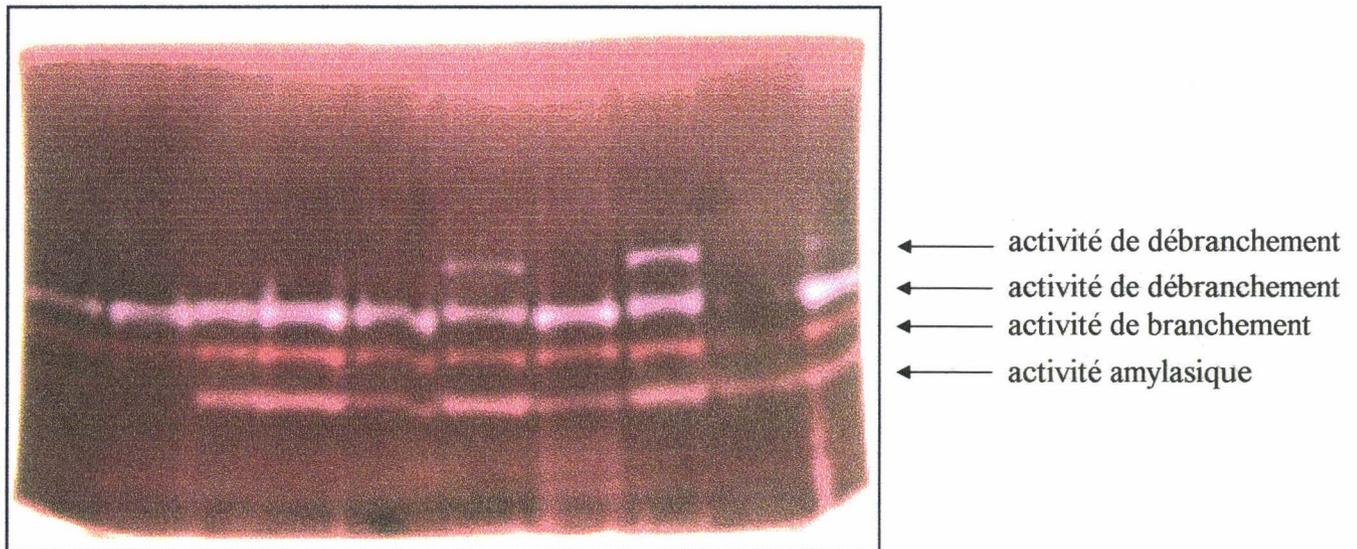


Figure 31 : Détection des activités hydrolytiques de l'amidon, en gel de polyacrylamide contenant de l'amidon soluble de pomme de terre (technique du zymogramme). Les extraits bruts (100 µg) issus du mutant *sta6-1::ARG7* original (BAF J5), de la souche sauvage de référence (137C), de trois descendants méiotiques *sta1-1* (ACJ4, 36 et 45), de trois descendants *sta6-1::ARG7* (ACJ19, 22 et 27) et d'un descendant *sta1-1 sta6-1::ARG7* (ACJ55) ont été déposés sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante.

CONCLUSION

De manière générale, l'analyse génétique en phase triploïde est utilisée seulement en dernier recours, pour obtenir des aneuploïdes qui seront croisés de nouveau pour réaliser une étude génétique traditionnelle. Pour notre part, nous avons choisi d'exploiter toute l'information contenue dans ce croisement non "classique" ayant permis d'obtenir des recombinants de chaque classe génotypique.

Les phénotypes observés dans la descendance mutante coségrégent parfaitement avec les génotypes observés en test de complémentation, ou obtenus par hybridation moléculaire. Nous pouvons ainsi affirmer que *STAI* et *STA6* sont les gènes de structure des deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase. Une liaison entre *STA6* et *NIT2* a également pu être mise en évidence. Ces résultats auraient pu être obtenus, bien sûr, par une analyse génétique traditionnelle.

Par contre, deux résultats n'auraient jamais pu être décelés par une analyse génétique traditionnelle. En effet, cette analyse en phase triploïde a permis de placer *STAI* et *STA6* sur un même chromosome à plus de 50 unités de distance. Elle a aussi détecté la recombinaison existant entre deux régions du gène *STAI* normalement contiguës dans une souche sauvage, mais très probablement déplacées dans l'allèle *stai-1*. Cette recombinaison donne lieu à l'apparition de chromosomes qui dans un contexte haploïde ne fournirait pas de souches viables.

Pour parfaire cette analyse et réduire la variabilité phénotypique due aux déséquilibres chromosomiques, il serait souhaitable de diminuer l'aneuploïdie, en réalisant un ou deux croisements supplémentaires. Des croisements pourront également être entrepris pour vérifier la liaison de *STA6* et *NIT2* et la liaison entre *STAI* et d'autres marqueurs du chromosome III. Enfin, il serait intéressant de vérifier que les profils particuliers observés chez les souches ACJ38 et ACJ51 sont uniquement visibles à l'état aneuploïde.

DISCUSSION

1) L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ADOPTE DEJA LES CARACTERISTIQUES DE L'ENZYME HETEROTETRAMERIQUE DES VEGETAUX SUPERIEURS.

Ce travail s'est axé sur l'étude de deux loci affectant l'activité ADP-Glc PPase chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Le première allèle *sta1-1*, issu d'une mutagenèse aux rayons X, est responsable de la baisse considérable de la sensibilité de l'ADP-Glc PPase à l'activation par le 3PGA. Toutefois, l'enzyme reste toujours inhibée par le Pi (Van den Koornhuysse et coll., 1996). La synthèse d'amidon chez les souches mutantes est réduite de 90 %. Le deuxième allèle *sta6-1::ARG7*, engendré par une mutagenèse d'insertion, conduit à la disparition de l'amidon et de l'activité ADP-Glc PPase.

Ces phénotypes sont à rapprocher des résultats, obtenus *in vitro*, par Iglésias et coll. (1993) et Ballicora et coll. (1995). Les ADNc de la petite et de la grande sous-unité de l'ADP-Glc PPase du tubercule de pomme de terre ont été exprimés séparément chez une souche d'*E. coli* déficiente pour l'activité ADP-Glc PPase. L'expression de la grande sous-unité seule se traduit par une activité très faible. En revanche, la présence de la petite sous-unité seule conduit à la formation d'un homotétramère, avec une l'affinité plus faible pour le 3PGA, et une sensibilité accrue à l'inhibition par le Pi. Ces résultats laissent supposer que la petite sous-unité possède la fonction de catalyse, et que la grande sous-unité intervient pour réguler l'activité de la petite, via le contrôle allostérique.

A peu de choses près, les phénotypes observés, *in vivo* chez *C. reinhardtii*, pour nos deux mutations, sont identiques. Il était donc raisonnable de penser, que les souches porteuses de la mutation *sta1-1* soient affectées pour la grande sous-unité régulatrice, et que la mutation *sta6-1::ARG7* touche la petite sous-unité catalytique.

L'hybridation avec les ADNc de la petite et de la grande sous-unité fait apparaître des modifications de profil importantes pour, respectivement, les souches BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) et I7 (*sta1-1*). Ces modifications coségrègent parfaitement avec les mutations, chez les descendants issus du croisement triploïde, déficients dans la synthèse d'amidon,. Ce dernier résultat confirme que *STAI* et *STA6* codent respectivement la grande sous-unité régulatrice et la petite sous-unité catalytique de l'ADP-Glc PPase.

Les caractéristiques de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* en font une enzyme fortement similaire à celles des plantes. Elle possède une structure hétérotétramérique composée de deux sous-unités distinctes (Iglésias et coll., 1994). Sa régulation est identique aux ADP-Glc PPases de plantes (Ball et coll., 1991). La petite sous-unité possède la fonction catalytique et la grande, la fonction régulatrice. En outre, d'après l'analyse phylogénique, les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* sont apparentées clairement à leurs homologues végétaux.

Nous savons déjà que l'amidon obtenu en carence azotée chez *C. reinhardtii* possède une structure comparable à l'amidon de réserve des végétaux (Ball, 1998). De plus, il est maintenant clair que toutes les activités enzymatiques, impliquées dans la synthèse de l'amidon chez les plantes supérieures, sont retrouvées chez *C. reinhardtii* (Ball, 1998). Toutes les informations obtenues sur l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* constituent donc un élément supplémentaire confirmant la représentativité de notre algue comme modèle pour la biosynthèse de l'amidon chez les végétaux.

2) ADPGLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE, AMIDON ET EVOLUTION.

Les ADP-Glc PPases des algues vertes et des plantes sont toutes des hétérotétramères composés de deux sous-unités distinctes. Par contre, une protéine unique constitue l'enzyme tétramérique des entérobactéries et des cyanobactéries.

Selon la théorie endosymbiotique, les cyanobactéries sont à l'origine des plastes. Une cyanobactérie ancestrale (plusieurs ?) aurait d'abord vécu en symbiose avec une cellule eucaryote simple (sans organites), et aurait été transformée en organite.

Durant l'endosymbiose, la majorité des gènes nécessaires à l'autonomie de l'endosymbiote ont vraisemblablement été transférés vers le noyau de l'hôte. En effet, le génome des plastes code seulement 10% des protéines nécessaires à leur autonomie (Ohyama et coll., 1986; Shinozaki et coll., 1986; Hiratsuka et coll., 1989). De plus, des séquences plastidiques ont été retrouvées dans le génome nucléaire de l'épinard (Timmis et Scott, 1983). Au point de vue évolutif, les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase des plantes sont apparentées à l'unique sous-unité des cyanobactéries. Elles possèdent notamment en commun, des sites de liaison au 3PGA très conservés typiques de cellules effectuant la photosynthèse. Cette homologie laisse supposer que l'ADP-glucose pyrophosphorylase des végétaux supérieurs est issu du transfert de gènes de l'endosymbiote vers le noyau de la cellule hôte.

Comment expliquer la présence de deux sous-unités chez les plantes et d'une seule chez les cyanobactéries ? Le gène transféré a-t-il été dupliqué ? Y a-t-il eu des symbioses multiples et transfert subséquent d'au moins deux gènes différents (mais proches) ?

Les mêmes questions se posent pour toutes les enzymes du métabolisme de l'amidon. En effet, chez les plantes et *C. reinhardtii*, de nombreuses isoformes existent pour chaque type d'enzyme. Ainsi, chez *C. reinhardtii*, la pomme de terre, le pois et le maïs, trois isoformes d'amidon-synthétases solubles sont détectées. Deux types d'enzymes de branchement sont répertoriés et nous savons qu'il existe aussi plusieurs enzymes de débranchement.

Qu'elles proviennent de duplication de gènes ou d'événements d'endosymbiose multiples, ces nombreuses isoformes ont été conservées au cours de l'évolution. C'est donc, qu'elles apportaient un bénéfice aux cellules eucaryotes photosynthétiques. Leurs différentes spécificités ont permis d'aboutir à un polysaccharide qui peut cristalliser. Or, cette cristallinité est particulièrement avantageuse pour la plante. Le glucose, sorti de sa phase soluble, sort également de l'équilibre chimique de cette phase. L'amidon représente donc une sorte de puit à carbone pour la cellule. L'intérêt est évident pour les plantes qui ont un temps de génération beaucoup plus long que les bactéries.

La voie de l'amidon a été "sélectionnée" par les algues vertes et les plantes. Parmi les algues, d'autres polysaccharides de réserve ont été privilégiés. Ainsi, certaines classes d'algues accumulent du chrysolaminaran ou du paramylon, qui sont des polymères de glucoses liés en β -1,3. Malgré une structure et une voie de biosynthèse différentes, ces polysaccharides sont aussi stockés sous forme cristalline. Nous voyons donc ici, un bel exemple d'évolution convergente.

L'ADP-Glc pyrophosphorylase n'intervient pas, bien sûr, dans l'édification de la structure cristalline du grain. La présence de deux sous-unités a permis, probablement, de réguler plus finement l'activité de l'enzyme.

3) LA REGULATION DE L'ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase semble être régulée de deux façons selon le type de tissu.

Dans les tissus de réserve, l'augmentation de l'activité ADP-Glc PPase et de la quantité de polypeptides correspondante à chaque sous-unité est parallèle à l'augmentation de la quantité de transcrits. La transcription apparaît, par conséquent, comme le mécanisme dominant de régulation de l'expression de l'ADP-Glc PPase.

Cependant, le contrôle semble différent pour les tissus photosynthétiques. Les résultats de Nakata et Okita (1995), chez la feuille de pomme de terre, suggèrent que le mécanisme de régulation le plus important est le contrôle allostérique de l'enzyme. En effet, la quantité en protéines pour chaque sous-unité ne varie pas, et l'activité de l'ADP-Glc PPase reste constante au cours du cycle lumineux. Ceci est cohérent avec l'accumulation diurne de l'amidon dans les feuilles, chez lesquelles les concentrations en 3PGA et Pi augmentent et diminuent respectivement en réponse à la photosynthèse (Heldt et coll., 1977).

Chez *C. reinhardtii*, pour des cultures synchronisées en cycle jour/nuit, la transcription du gène de la petite sous-unité a lieu seulement lors de la photopériode. La transcription de ce gène semble donc être sous le contrôle de la lumière et/ou de l'horloge circadienne. La quantité de transcrit, quoique faible, ne semble pas varier durant la phase lumineuse. Ceci est reflété par l'activité enzymatique qui reste relativement constante au cours du temps. Malgré la persistance de l'activité tout au long de la phase nocturne, l'amidon est dégradé. Nous pouvons voir ici, l'importance de la régulation allostérique de l'enzyme par le 3PGA et le Pi. En condition de photosynthèse, la régulation de l'ADP-Glc PPase est similaire à celle de feuille de pomme de terre.

Les transcrits pour la grande sous-unité n'ont pu être observés. Nakata et Okita (1995) ont remarqué que ceux-ci étaient moins abondants que ceux de la petite sous-unité dans la feuille de pomme de terre. Il en est peut-être de même chez *C. reinhardtii*. L'expression du gène de la petite sous-unité étant déjà très faible, celle de la grande sous-unité ne serait alors pas décelable. Nous nous proposons de réaliser cette détection par RT-PCR.

L'existence d'une horloge circadienne chez les plantes est vitale pour le contrôle d'activités physiologiques variées (dont la photosynthèse), durant une période donnée. Un des moyens de contrôle est l'expression des gènes. De plus en plus de gènes, dont l'expression est régulée par l'horloge circadienne, sont découverts chez les plantes. C'est le cas du gène *cab2* codant une protéine se liant aux chlorophylles a/b, chez *C. reinhardtii* et *A. thaliana* (Jacobshagen et coll., 1996; Millar et Kay, 1991). Chez *A. thaliana*, l'expression de *cab2* augmente juste avant l'aurore, ce qui est un bon exemple de l'anticipation des changements environnementaux par l'horloge circadienne. Chez *C. reinhardtii*, l'expression de la ferrédoxine, des thiorédoxines cytosoliques et plastidiales, de la phosphoribulokinase (PRK) et de la ferrédoxine-NADP réductase semble également sous le contrôle de l'horloge circadienne (Lemaire, 1999). Or, la PRK est une des enzymes permettant de régénérer l'accepteur de CO₂, lors de la photosynthèse. La synthèse d'amidon étant étroitement liée à la photosynthèse, il ne

serait pas étonnant, que l'expression des gènes de l'ADP-Glc PPase soit aussi soumise au rythme circadien. D'ailleurs, très récemment, Mérida et coll. (1999), ont montré, que dans les feuilles de gueule de loup (*Antirrhinum majus*), la transcription de la GBSSI est régulée par l'horloge circadienne.

Fu et coll. (1998b), ont observé *in vitro*, en absence de 3PGA, que l'ADP-Glc PPase de feuille de pomme de terre est activée par la présence de DTT et des substrats de l'enzyme : ADP-Glc ou ATP et G1P. Le DTT mime l'action des thiorédoxines qui réduisent les ponts disulfures. La réduction cible un pont disulfure entre les deux Cys 12 des petites sous-unités catalytiques de l'enzyme. Chez beaucoup d'enzymes, la réduction est fortement accélérée par un changement de conformation induit par le substrat. Ici, ce n'est pas le cas. L'activation de l'enzyme a lieu, d'abord, par la réduction puis, par la liaison des substrats entraînant le changement de conformation. Si le 3PGA est ajouté au milieu d'incubation, l'activité de l'enzyme est beaucoup plus importante en présence de DTT. Il semblerait, en fait, que dans la feuille de pomme de terre, une réduction de l'enzyme par une thiorédoxine activerait l'ADP-Glc PPase ce qui augmenterait son affinité pour le 3PGA.

Dans le chloroplaste, plusieurs enzymes sont la cible des thiorédoxines. Beaucoup d'entre elles jouent un rôle important dans le flux du carbone dans la cellule. C'est le cas de la phosphoribulokinase, la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase. Elles sont associées au cycle de Calvin et permettent la régénération du ribulose-1,5-bisphosphate qui est l'accepteur de CO₂ au cours de la photosynthèse. La FBPase catalyse la formation du F6P à partir du F1,6P₂ qui est à l'origine du G1P utilisé comme substrat par l'ADP-Glc PPase. La synthèse de l'ADP-Glc représente une étape majeure de la biosynthèse de l'amidon. L'orientation du flux de carbone vers l'amidon dépend directement de l'ADP-Glc PPase. Il ne serait pas étonnant qu'elle soit également régulée via une réduction par la thiorédoxine.

Les alignements de séquence indiquent que la Cys 12 et la séquence l'entourant (SQTCLDP) sont conservées dans les petites sous-unités de toutes les plantes dicotylédones, mais également dans la petite sous-unité de l'albumen de maïs. Remarquons, que pour aucune des sous-unité de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*, cette cystéine n'est conservée (ainsi que la séquence auquel elle appartient; figure 32). Si l'activation, par réduction, de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* existe *in vivo*, une ou plusieurs autre(s) cystéine(s) doivent être impliquées dans la création de pont(s) disulfure.

Pomme de terre (feuille)	SQTCLDP
<i>Vicia faba</i> (cotylédon)	SQTCLDP
Pois (cotylédon)	SQTCLDP
Epinard (feuille)	SQTCLDP
<i>C. reinhardtii</i> (petite ssu)	GQNDPAG
<i>C. reinhardtii</i> (grande ssu)	ASDSKNV

Figure 32 : La conservation de la séquence contenant la Cys 12, de la petite sous-unité de l'ADP-Glc PPase de feuille de pomme de terre, dans les petites sous-unités de plantes dicotylédones. Comparaison avec les deux sous-unités de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii*. La cystéine de la petite sous-unité de feuille de pomme de terre impliquée dans le pont disulfure est indiquée en rouge. "ssu" signifie sous-unité.

4) PERSPECTIVES.

Nous allons, dans un premier temps, étudier à nouveau, l'expression de l'ADP-Glc PPase chez des cellules cultivées en alternance jour/nuit, pour confirmer notre résultat préliminaire. Le gène de la petite sous-unité semble exprimé faiblement et le transcrit de la grande sous-unité n'a pas pu être observé. Ceci nous incite à abandonner la technique de Northern Blot, et d'utiliser plutôt la technique de RT-PCR quantitative pour mettre en évidence les ARNm de chaque sous-unité. En parallèle, avec les anticorps adéquats, nous aimerions, par Western Blot, mettre en évidence les polypeptides correspondants à chaque sous-unité.

Une attention toute particulière sera prêtée à la mesure de l'activité ADP-Glc PPase. Pour se délivrer de l'activité pyrophosphatase organique contaminante, le dosage de l'activité ne sera plus réalisée par estimation du GIP formé. Nous allons plutôt estimer la quantité d'ATP formé à partir de PPi marqué au ³²P.

Le facteur d'activation (rapport de l'activité en présence de 3PGA sur l'activité en absence de 3PGA) sera aussi examiné au cours du temps, pour déceler le moment où l'enzyme est la plus activable. Au cours des quatre premières heures de la phase lumineuse, l'amidon est dégradé. Toutefois, l'activité ADP-Glc PPase est présente. Est-ce la balance ADP-Glc PPase/enzymes de dégradation qui est favorable à ces dernières ou est ce l'ADP-Glc PPase qui est moins activable ?

Enfin, nous aimerions vérifier, si la régulation transcriptionnelle des gènes des deux sous-unités est dépendante de l'horloge circadienne. Tout d'abord, sur plusieurs cycles

jour/nuit, les transcrits devront toujours être exprimés le jour. Dans un second temps, les périodes d'obscurité ou de lumière seront allongées et nous regarderons si la transcription suit toujours un cycle 12h/12h.

Nous avons pu obtenir, après méiose du zygote triploïde, des mutants dans chaque classe génotypique : *sta1-1*, *sta6-1::ARG7* et *sta1 1 sta6-1::ARG7*. Ces mutants constituent des outils très précieux car ils sont interrompus dans les gènes de structure des deux sous-unités. Nous possédons, en plus, les ADNc de la petite et de la grande sous-unité. Il faut ajouter à cela qu'il est possible de transformer le génome nucléaire de *C. reinhardtii*. Nous sommes donc maintenant fin prêts, pour étudier les relations structure-fonction de l'ADP-Glc PPase de *C. reinhardtii* chez *C. reinhardtii*.

De telles études, jusque maintenant réalisées chez *E. coli*, ne permettent pas d'observer l'impact physiologique de la mutation dans un organisme photosynthétique. *C. reinhardtii* pourrait très bien servir de modèle végétal, pour les études de relation structure-fonction des ADP-Glc PPases d'espèces différentes.

En ce qui nous concerne, nous pourrions étudier une possible régulation de l'enzyme par les thiorédoxines, en remplaçant par mutagenèse dirigée, les cystéines de chaque sous-unité par d'autres acides aminés.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, G., Springer, F., Willmitzer, L., and Kossmann J.** (1996). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **10**, 981-991.
- Anderson, J. M., Hnilo, J., Larson, R., Okita, T. W., Morell, M., and Preiss, J.** (1989). The encoded primary sequence of a rice seed ADP-glucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. *J. Biol. Chem.* **264**, 12238-12242.
- Anderson, J. M., Okita, T. W., and Preiss, J.** (1991). Enhancing carbon flow into starch : the role of ADP-glucose pyrophosphorylase. In "Molecular and Cellular Biology of the Potato" Park, W.C. and Vayda, M.E. eds., pp. 159-180. C.A.B. International, Wallingford, UK.
- Ball, K. L., and Preiss, J.** (1992). Evidence for an arginine residue at the allosteric sites of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Protein Chem.* **11**, 231-237.
- Ball, K. L., and Preiss, J.** (1994). Allosteric sites of the large subunit of the spinach leaf adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24706-24711.
- Ball, S.G.** (1998). Regulation of starch biosynthesis. In "Molecular Biology of *Chlamydomonas* : Chloroplasts and Mitochondria", pp. 549-567 eds : Rochaix, J.D., Goldschmidt- Clermont, M., Merchant, S. Kluwer Academic Publishers.
- Ball, S., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J-C., and Matagne, R.** (1990). Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **66**, 1-9.
- Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B., and Decq, A.** (1991). A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17-26.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., and Preiss, J.** (1996). From glycogen to amylopectin : a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* **86**, 349-352.
- Ball, S.G., van de Wal, M.H.B.J., and Visser, R.G.F.** (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Sci.* **3**, 462-467.
- Ballicora, M.A., Laughlin, M.J., Fu, Y., Okita, T.W., Barry, G.F., and Preiss, J.** (1995). ADP-glucose from potato tuber. Significance of the N-terminal of the small subunit for catalytic properties and heat stability. *Plant Physiol.* **109**, 245-251.
- Ballicora, M.A., Fu, Y., Nesbitt, N., and Preiss, J.** (1998). ADP-glucose pyrophosphorylase from potato tubers. Site-directed mutagenesis studies of the regulatory sites. *Plant Physiol.* **118**, 265-274.
- Banks, W., Greenwood, C., and Khan, K.** (1971). The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydrate Research* **17**, 25-33.
- Bellanger, F.** (1994). La mutagenèse par insertion d'ADN chez *Chlamydomonas reinhardtii* : une nouvelle voie pour l'élucidation de la biosynthèse de l'amidon. **Thèse de Doctorat.** Université de Technologie de Compiègne.

Bingham, S.E., Cox, J.C., and Striem, M.D. (1989). Expression of foreign DNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEMS Microbiol. Lett. **65**, 77-82.

Borchert, S., Grosse, H., and Heldt, H.W. (1989). Specific transport of inorganic phosphate, glucose 6-phosphate, dihydroxyacetonephosphate and 3-phosphoglycerate into amyloplasts from pea roots. Fed. Eur. Biochem. Soc. **253**, 183-186.

Borchert, S., Harbroth, J., Schünemann, D., Hoferichter, P., and Heldt, H.W. (1993). Studies of the enzymic capacities and transport properties of pea root plastids. Plant Physiol. **101**, 303-312.

Boyer, C.D., and Preiss, J. (1981). Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases. Plant Physiol. **67**, 1141-1145.

Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J., and Ball, S. (1997). *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. Plant Physiol. **115**, 949-957.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Starch granules : structure and biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecules **23**, 85-112.

Burton, R.A., Bewley, J.D., Smith, A.M., Bhattacharyya, M.K., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilto, W.D.P., and Martin, C. (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. Plant J. **7**, 3-15.

Cao, H., Sullivan, T.D., Boyer, C.D., and Shannon, J.C. (1995). *Bt1*, a structural gene for the major 39-44 kDa amyloplast membrane polypeptides. Physiol. Plant. **95**, 176-186.

Cao, H., Imparl-Radosevitch, J., Guan, H., Keeling, P., James, M., and Myers, A. (1999). Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm. Plant Physiol. **120**, 205-215.

Carton, A. (1996). Caractérisation de *STAI* et *STA6* : deux gènes conditionnant l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Mémoire de DEA (Université des Sciences et Technologies de Lille).

Charng, Y.-Y., Iglesias, A.A., and Preiss, J. (1994). Structure-function relationships of cyanobacterial ADP-glucose pyrophosphorylase : site-directed mutagenesis and chemical modification of the activator binding sites of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Anabaena* PCC 7120. J. Biol. Chem. **269**, 24107-24113.

Chen, B.-Y., Wang, Y., and Janes, H.W. (1998). ADP-glucose pyrophosphorylase is localized to both the cytoplasm and plastids in developing pericarp of tomato fruit. Plant Physiol. **116**, 101-106.

Coates, S.A., and ap Rees, T. (1994). Metabolism of glucose monophosphates by leucoplasts and amyloplasts from soybean suspension cultures. Phytochemistry **35**, 881-883.

Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., and Smith, A.M. (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. Plant Cell **10**, 413-426.

Davies, J., and Smith, D.I. (1978). Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**, 469-518.

Debuchy, R., Purton, S., and Rochaix, J.-D. (1989). The arginino-succinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* : an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the *ARG7* locus. *EMBO J.* **8**, 2803-2809.

Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J.-M., Van Den Koornhuysse, N., Maddelein, M.-L., Fournet, B., and Ball, S. (1992). Waxy *Chlamydomonas reinhardtii* : monocellular algal mutants defective in amylose synthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**, 3612-3620.

Denyer, C., and Smith, A. (1988). The capacity of plastids from developing pea cotyledons to synthesize acetylCoA. *Planta* **173**, 172-182.

Denyer K., and Smith A. (1992). The purification and characterization of the two forms of soluble starch synthase from developing pea embryos. *Planta* **186**, 609-617.

Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjørnsen, T., Keeling, P., and Smith, A.M. (1996a). The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial. *Plant Physiol.* **112**, 779-785.

Denyer, K., Barber, L.M., Burton, R., Hedley, C., Hylton, C., Johnson, S., Jones, D., Marshall, J., Smith, A., Tatge, H., Tomlinson, K., and Wang, T. (1996b). The isolation and characterisation of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum*. *Plant Cell Environ.* **18**, 1019-1026.

D'Hulst, C. (1997). L'amidon-synthétase soluble II : l'enzyme responsable de l'édification des cristaux d'amylopectine chez *Chlamydomonas reinhardtii*. **Thèse de doctorat.** Université des Sciences et Technologies de Lille.

Dickinson, D.B., and Preiss, J. (1969). Presence of ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunk-2* and *brittle-2* mutants of maize endosperm. *Plant Physiol.* **44**, 1058-1062.

Echeverria, E., Boyer, C.D., Liu, K.-C., and Shannon, J.C. (1985). Isolation of amyloplasts from developing maize endosperm. *Plant Physiol.* **77**, 513-519.

Echeverria, E., Boyer, C.D., Thomas, P.A., Liu, K.-C., and Shannon, J.C. (1988). Enzyme activities associated with maize kernel amyloplasts. *Plant Physiol.* **86**, 786-792.

Edwards, A., Marshall, J., Sidebottom, C., Visser, R., Smith, A., and Martin, C. (1995). Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers. *Plant J.* **8**, 283-294.

Edwards, A., Marshall, J., Denyer, K., Sidebottom, C., Visser, R., Martin, C., and Smith, A. (1996). Evidence that a 77-kilodalton protein from the starch of pea embryo is an isoform of starch synthase that is both soluble and granule bound. *Plant Physiol.* **112**, 89-97.

- Edwards A., Fulton D.C., Hylton C.M., Jobling S.A., Gidley M., Roessner U., Martin C., and Smith A.** (1999). A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J.* **17**, 251-261.
- Entwistle, G., and ap Rees, T.** (1988). Enzyme capacities of amyloplasts from wheat (*Triticum aestivum*) endosperm. *Biochem. J.* **255**, 391-396.
- Entwistle, G., Tyson, R.H., and ap Rees, T.** (1988). Isolation of amyloplasts from wheat endosperm. *Phytochem.* **25**, 2033-2039.
- Erlander, S.** (1958). Proposed mechanism for the synthesis of starch by glycogen. *Enzymologia* **19**, 273-283.
- Eves, E.M., and Chiang, K.-S.** (1982). Genetics of *Chlamydomonas reinhardtii* diploids I. Isolation and characterization and meiotic segregation pattern of a homozygous diploid. *Genetics* **100**, 35-60.
- Ferris, P.J., Woessner, J.P., and Goodenough, U.V.** (1996). A sex recognition glycoprotein is encoded by the plus mating-type gene *fus1* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biol. Cell.* **7**, 1235-1248.
- Ferris, P.J., and Goodenough, U.V.** (1997). Mating type in *Chlamydomonas* is specified by *mid*, the minus-dominance gene. *Genetics* **146**, 859-869.
- Flipse, E., Suurs, L., Keetels, C., Kossmann, J., Jacobsen, E., and Visser R.** (1996). Introduction of sense and antisense cDNA for branching enzyme in the amylose-free potato mutant leads to physico-chemical changes in the starch. *Planta* **198**, 340-347.
- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.-L., Routier, F., Pepin, T.M., Decq, A., Wieruszkeski, J.-M., Delrue, B., Van Den Koornhuyse, N., Bossu, J.-P., Fournet, B., and Ball, S.** (1993). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268**, 16223-16230.
- Franzén, L.G., Rochaix, J.D., and von Heijne, G.** (1990). Chloroplast transit peptides from green alga *Chlamydomonas reinhardtii* share features with both mitochondrial and higher plant chloroplast presequences. *FEBS Lett.* **260**, 165-168.
- Fu, Y., Ballicora, M.A., and Preiss, J.** (1998a). Mutagenesis of the glucose-1-phosphate-binding site of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **117**, 989-996.
- Fu, Y., Ballicora, M.A., Leykam, J.F., and Preiss, J.** (1998b). Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **273**, 25045-25052.
- Fujiwara, S., Fukuzawa, H., Tachiki, A., and Miyachi, S.** (1990). Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9779-9783.

- Furukawa, K., Tagaya, M., Inouye, M., Preiss, J., and Fukui T.** (1990). Identification of lysine 15 at the active site in *Escherichia coli* glycogen synthase. Conservation of a Lys-X-Gly-Gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes. *J. Biol. Chem.* **265**, 2086-2090.
- Gao, M., Wanat, J., Stinard, P., James, M., and Myers, A.** (1998). Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell* **10**, 399-412.
- Ghosh, H.P., and Preiss, J.** (1966). Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaves chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **241**, 4491-504.
- Giroux, M.J., and Hannah, L.C.** (1994). Coordinated transcriptional regulation of storage product genes in the maize endosperm. *Plant Physiol.* **106**, 713-722.
- Giroux, M.J., Shaw, J., Barry, G., Cobb, B.G., Greene, T., Okita, T. and Hannah, L.C.** (1996). A single gene mutation that increases maize seedweight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5824-5829.
- Greene, T.W., Chantler, S.E., Kahn, M.L., Barry, G.F., Preiss, J., and Okita, T.W.** (1996). Mutagenesis of the potato ADP-glucose pyrophosphorylase and characterization of an allosteric mutant defective in 3-phosphoglycerate activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1509-1513.
- Greene, T.W., and Hannah, L.C.** (1998). Maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase *SHRUNKEN2* and *BRITTLE2* subunit interactions. *Plant Cell* **10**, 1295-1306.
- Gross, P., and apRees, T.** (1986). Alkaline inorganic pyrophosphatase and starch synthesis in amyloplasts. *Planta* **167**, 140-145.
- Guan, H.-P., and Preiss, J.** (1993). Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* **102**, 1269-1273.
- Guan, H.-P., Kuriki, T., Sivak, M., and Preiss, J.** (1995). Maize branching enzyme catalyzes synthesis of glycogen-like polysaccharide in *glgB*-deficient *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 964-967.
- Guan, H.-P., Li, P., Imparl-Radosevitch, J., Preiss, J., and Keeling, P.** (1997). Comparison of the properties of *Escherichia coli* glycogen branching enzyme and maize starch branching enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 92-98.
- Harris, E.H.** (1989). "A starches and storage methods. The *Chlamydomonas* source book. A comprehensive guide to biology and laboratory use." E. Harris ed., Academic Press, San Diego, Calif.
- Hasnain, S.E., Manavathu, E.K., and Leung, W.C.** (1985). DNA-mediated transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* cells : use of amino-glycoside 3'-phosphotransferase as a selectable marker. *Moll. Cell. Biol.* **5**, 3645-3650.
- Hatzfeld, W.D., and Stitt, M.** (1990). A study of the rate of recycling of trioses phosphates in heterotrophic *Chenopodium rubrum* cells, potato tuber, and maize endosperm. *Planta* **180**, 198-204.

Heber, U., and Heldt, H.W. (1981). The chloroplast envelope : structure, function and role in leaf metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **25**, 393-421.

Heldt, H.W., Chon, J., Maronde, D., Stan Kovic, Z.S., Walker, D.A., Kraminer, A., Kirk, M.R., and Heber, V. (1977). Role of orthophosphate and other factors in the regulation of starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **59**, 1146-1155.

Hill, L.M., and Smith, A.M. (1991). Evidence that glucose-6-Phosphate is imported as the substrate for starch synthesis by the plastids of developing pea embryos. *Planta* **185**, 91-96.

Hill, M.A., Kaufmann, K., Otero, J., and Preiss, J. (1991). Biosynthesis of bacterial glycogen: mutagenesis of a catalytic site residue of ADPglucose pyrophosphorylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 12455-12460.

Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C.R., Meng, B.Y., Li, Y.Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Hirai, A., Shinozaki, K., and Sugiura, M. (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome : intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. and Gen. Genet.* **217**, 185-197.

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

Hovenkamp-Hermelink, J.H.M., Jacobsen, E., Ponstein, A.S., Visser, R.G.F., Vos-Scheperkeuter, G.H., Bijmolt, E.W., de Vries, J.N., Witholt, B., and Feenstra, W.J. (1987). Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **75**, 217-221.

Hylton, C., and Smith, A.M. (1992). The *rb* mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP-glucose pyrophosphorylase from developing embryos. *Plant Physiol.* **99**, 1626-1634.

Iglesias, A.A., Barry, G.F., Meyer, C., Bloksberg, L., Nakata, P.A., Greene, T., Laughlin, M.J., Okita, T.W., Kishore, G.M., and Preiss, J. (1993). Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 1081-1086.

Iglesias, A.A., Charng, Y.-Y., Ball, S.G., and Preiss, J. (1994). Characterization of the kinetic regulatory and structural properties of ADP-glucose pyrophosphorylase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **104**, 1287-1294.

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

Jacobshagen, S., Kindle, K.L., and Johnson, C.H. (1996). Transcription of *CAB II* is regulated by the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1173-1184.

James, M.G., Robertson, D.S., and Meyers, A.M. (1995). Characterization of the maize gene *sugary 1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**, 417-429.

- Jenkins, P.J., Cameron, R.E., and Donald, A.M.** (1993). A universal feature in the starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke* **45**, 417-420.
- Journet, E.P., and Douce, R.** (1985). Enzymatic capacities of purified cauliflower bud plastids for lipid synthesis and carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* **79**, 458-467.
- Journet, E.P., Bligny, R., and Douce, R.** (1986). Biochemical changes during sucrose deprivation in higher plant cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 3193-3199.
- Kampfenkel, K., Möhlmann, T., Batz, O., van Montagu, M., Inzé, D., and Neuhaus, H.E.** (1995). Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Lett.* **374**, 351-355.
- Keeling, P.L., Wood, J.R., Tyson, R.H., and Bridges, I.G.** (1988). Starch biosynthesis in developing wheat grain. Evidence against the direct involvement of triose phosphates in the metabolic pathway. *Plant Physiol.* **87**, 311-319.
- Kim, W.T., Franceschi, V.R., Okita, T.W., Robinson, N.L., Morell, M., and Preiss, J.** (1989). Immunocytochemical localization of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing potato tuber cells. *Plant Physiol.* **91**, 217-220.
- Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernández, E., and Lefevre, P.A.** (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.* **109**, 2589-2601.
- Kindle, K.L.** (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1228-1232.
- Kleczkowski, L.A., Villand, P., Lüthi, E., Olsen, O.-A., and Preiss, J.** (1993). Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiol.* **101**, 179-186.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C.** (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature (London)* **327**, 70-73.
- Krishnan, H.B., Reeves, C.D., and Okita, T.W.** (1986). ADP-glucose pyrophosphorylase is encoded by different mRNA transcripts in leaf and endosperm of cereals. *Plant Physiol.* **81**, 642-645.
- Kruckeberg, A.L., Neuhaus, H.E., Feil, R., Gottlieb, L.D., and Stitt, M.** (1989). Decreased-activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana*. Impact on mass-action ratios and fluxes to sucrose and starch and estimation of flux control coefficients and elasticity coefficients. *Biochem. J.* **261**, 457-467.
- Kumar, A., Tanaka, T., Lee, Y.M., Hill, M.A., and Preiss, J.** (1988). Biosynthesis of bacterial glycogen : use of site-directed mutagenesis to probe the role of tyrosine 114 in the catalytic mechanism of ADP-glucose synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 14634-14639.

La Cognata, U., Willmitzer, L., and Müller-Röber, B. (1995). Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 538-548.

Lee, Y.M., and Preiss, J. (1986). Covalent modification of substrate binding sites of *E.coli* ADP-glucose synthetase : Isolation and structural characterization of 8-azido ADP-glucose incorporated peptides. *J. Biol. Chem.* **261**, 1058-1064.

Lemaire, S. (1999). Etude structurale et fonctionnelle des systèmes ferrédoxine et thiorédoxine dépendants chez *Chlamydomonas reinhardtii*. **Thèse de doctorat.** Université de Paris-Sud.

Levi, C., and Preiss, J. (1978). Amylopectin degradation in pea chloroplast extracts. *Plant Physiol.* **61**, 218-220.

Levine, R.P., and Goodenough, U.W. (1970). The genetics of photosynthesis and the chloroplast in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annu. Rev. Genet.* **4**, 397-408.

Li, L., and Preiss, J. (1992). Characterization of ADP-glucose pyrophosphorylase from a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.). *Carbohydr. Res.* **227**, 227-239.

Libessart, N., Maddelein, M.-L., Van den Koornhuysse, N., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S. (1995). Storage, photosynthesis and growth : the conditionnal nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **7**, 1117-1127.

Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988a). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**, 1131-1135.

Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988b). A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiol.* **88**, 1175-1181.

Lloyd, J.R., Landschuetze, V., and Kossmann, J. (1999). Simultaneous antisens inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochem. J.* **338**, 515-521.

MacDonald, F.D., and apRees, T. (1983). Enzymatic properties of amyloplasts from suspension cultures of soybean. *Biochim. Biophys. Acta* **755**, 81-89

MacDonald, P.W., and Strobel, G.A. (1970). Adenosine diphosphate-glucose pyrophosphorylase control of starch accumulation in rust-infected wheat leaves. *Plant Physiol.* **58**, 753-756.

Macheral, D., Kobayashi, H., Akazawa, T., Kawano, S., and Kuioiwa, T. (1985). Amyloplast nucleoids in sycamore cells and presence of amyloplast DNA of homologous sequence to chloroplast genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 140-146.

Maddelein, M.L., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van den Koornhuysse, N., Fontaine, T., Wieruszeski, J.M., Decq, A., and Ball, S.G. (1994). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule : determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 25150-25157.

Manners, D.J. (1997). Observations on the specificity and nomenclature of starch debranching enzymes. *J. Appl. Glycosci.* **44**, 83-85.

Mares, D.J., Hawker, J.S., and Possingham, J.V. (1978). Starch synthesizing enzymes in chloroplasts of developing leaves of spinach (*Spinacea oleracea* L.). *J. Exp. Bot.* **29**, 829-835.

Marshall, J., Sidebottom, C., Debet, M., Martin, C., Smith, A., and Edwards A. (1996). Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant Cell* **8**, 1121-1135.

Martin, C., and Smith, A. (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985.

Matagne, R.F., Deltour, R., and Ledoux, L. (1979). Somatic fusion between cell wall mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature (London)* **278**, 344-346.

Mérida, A., Rodríguez-Galán, J., Vincent, C., and Romero, J.M. (1999). Expression of the granule-bound starch synthase I (*Waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated. *Plant Physiol.* **120**, 401-409.

Millar, A.J., and Kay, S.A. (1991). Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**, 541-550.

Mohabir, G., and John, F. (1988). Effect of temperature on starch synthesis in potato tissue and in amyloplasts. *Plant Physiol.* **88**, 1222-1228.

Morell, M.K., Bloom, M., Knowles, V., and Preiss, J. (1987). Subunit structure of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **85**, 185-187.

Morell, M., Bloom, M., and Preiss, J. (1988). Affinity labeling of the allosteric activator site of spinach leaf ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **263**, 633-637.

Morell, M.K., Blennow, A., Kosar-Hashemi, B., and Samuel, M. (1997). Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiol.* **113**, 201-208.

Mortimer, R.K., and Hawthorne, D.C. (1973). Genetic mapping in *Saccharomyces*. IV. Mapping of temperature-sensitive genes and use of disomic strains in localizing genes. *Genetics* **74**, 33.

Mouille, G., Maddelein, M.L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S.G. (1996). Phytoglycogen processing : a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**, 1353-1366

- Müller-Röber, B.T., Sonnewald, U., and Willmitzer, L.** (1992). Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238.
- Naeem, M., Tetlow, I., and Emes, M.J.** (1997). Starch synthesis in plastid purified from developing potato tubers. *Plant J.* **11**, 1229-1238.
- Nakamura, Y., and Kawaguchi, K.** (1992). Multiple forms of ADP-glucose pyrophosphorylase of rice endosperm. *Physiol. Plant.* **84**, 336-342.
- Nakata, P.A., and Okita, T.W.** (1995). Differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the sink and the source tissues of potato. *Plant Physiol.* **108**, 361-368.
- Neuhaus, H.E., Kruckeberg, A.L., Feil, R., and Stitt, M.** (1989). Reduced activity mutants of phosphoglucose isomerase in the cytosol and chloroplast of *Clarkia xantiana* II. Studies of the mechanisms which regulate photosynthate partitioning. *Planta* **178**, 110-122.
- Neuhaus, H.E., Henrichs, G., and Scheibe R.** (1993). Characterization of glucose-6-phosphate incorporation into starch by isolated intact cauliflower-bud plastids. *Plant Physiol.* **100**, 573-578
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., and Ozeki, H.** (1986). Chloroplast genome organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**, 572-574.
- Okita, T.W., Greenberg, E., Kuhn, D.N., and Preiss, J.** (1979). Subcellular localization of the starch degradative and biosynthetic enzymes of spinach leaves. *Plant Physiol.* **64**, 187-192.
- Okita, T.W., Nakata, P.A., Anderson, J.M., Sowokinos, J., Morell, M., and Preiss, J.** (1990). The subunit structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **93**, 785-790.
- Pan, D., and Nelson, O.E.** (1984). A debranching enzyme deficiency in endosperms of the *sugary 1* mutants of maize. *Plant Physiol.* **74**, 324-328.
- Parsons, T.F., and Preiss J.** (1978). Biosynthesis of bacterial glycogen. Incorporation of pyridoxal phosphate into the allosteric activator site and an ADP-glucose protected pyridoxal phosphate binding site of *Escherichia coli* B ADP-glucose synthase. *J. Biol. Chem.* **253**, 6197-6202.
- Perez, C.M., Perdon, A.A., Resurreccion, A.P., Villareal, R.M., and Juliano, B.O.** (1975). Enzymes of carbohydrate metabolism in developing rice grain. *Plant Physiol.* **56**, 579-586.
- Pettersson, G., and Ryde-Pettersson, U.** (1989). Metabolites controlling the rate of starch synthesis in the chloroplast of C₃ plants. *Eur. J. Biochem.* **179**, 169-172.
- Pozueta-Romero, J., Ardila, F., and Akazawa, T.** (1991a). ADP-glucose transport by the chloroplast adenylate translocator is linked to starch biosynthesis. *Plant Physiol.* **97**, 1565-1572.

- Pozueta-Romero, J., Frehner, M., Viale, A.M. and Akazawa, T.** (1991b). Direct transport of ADP-glucose by an adenylate translocator is linked to starch biosynthesis in amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5769-5773.
- Preiss, J.** (1982). Biosynthesis of starch and its regulation. In: Tanner, W. and Loewus, F., (eds.). *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Plant Carbohydrates*, Vol 13A. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp 397-417.
- Preiss, J.** (1988). Biosynthesis of starch and its regulation. In "The Biochemistry of plants", vol. 14. edited by J. Preiss (Academic Press, San Diego) pp. 181-254.
- Preiss, J., Danner, S., Summers, P.S., Morell, M., Barton, C.R., Yang, L., and Nieder, M.** (1990). Molecular characterization of the *brittle-2* gene effect on maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Physiol.* **92**, 881-885.
- Preiss, J., Ball, K., Charng, Y.Y., and Iglesias, A.** (1992). Structure-function relationships of ADP-glucose pyrophosphorylase regulatory sites and *in vivo* evidence that ADP-glucose is synthesized only in the chloroplast via ADP-glucose pyrophosphorylase. In "Research in Photosynthesis", vol. III edited by N. Murata, Kluwer Academic Pub., Dordrecht the Netherlands, pp. 697-700.
- Prioul, J.-L., Jeannette, E., Reyss, A., Grégory, N., Giroux, M., Hannah, L.C. and Causse, M.** (1994). Expression of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize (*Zea mays* L.), grain and source leaf during grain filling. *Plant Physiol.* **104**, 179-187.
- Quesada, A., Galván, A., Schnell, R.A., Lefebvre, P.A., and Fernández, E.** (1993). Five nitrate assimilation-related loci are clustered in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 387-394.
- Reeves, C.D., Krishnan, H.B., and Okita, T.W.** (1986). Gene expression in developing wheat endosperm. accumulation of gliadin and ADP-glucose pyrophosphorylase messenger RNAs and polypeptides. *Plant Physiol.* **82**, 34-40.
- Robinson, N., and Preiss, J.** (1987). Localization of carbohydrate metabolizing enzymes in guard cells of *Commelina communis*. *Plant Physiol.* **85**, 360-364.
- Rochaix, J.D., and van Dillewijn, J.** (1982). Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature* **296**, 70-72.
- Rochaix, J.D., van Dillewijn, J., and Rahire, M.** (1984). Construction and characterization of autonomously replicating plasmids in the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell* **36**, 925-931.
- Rochaix, J.D., Mayfield, S., Goldschmidt-Clermont, M., and Erickson, J.** (1991). Molecular biology of *Chlamydomonas*. In *Plant Molecular Biology: a Practical approach*, pp 253-275, ed. Shaw C., IRL Press, Oxford, Washington DC.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed. C. Nolan, Second Edition.

Schott, K., Borchert, S., Müller-Röber, B., and Heldt, H.W. (1995). Transport of inorganic phosphate, and C₃ and C₆ sugar phosphates across the envelope membranes of potato tuber amyloplasts. *Planta* **196**, 647-652.

Schünemann, D., Borchert, S., Flügge, U.L., and Heldt, H.W. (1993). ADP/ATP translocator from pea root plastids. Comparison with translocators from spinach chloroplasts and pea leaf mitochondria. *Plant Physiol.* **103**, 131-137.

Shannon, J.C., Pien, F.-M., and Lui, K.-C. (1996). Nucleotides and nucleotide sugars in developing maize endosperms. *Plant Physiol.* **110**, 835-843.

Shannon, J.C., Pien, F.-M., Cao, H., and Lui K.-C. (1998). Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP-glucose into amyloplasts of maize endosperm. *Plant Physiol.* **117**, 1235-1252.

Sheng, J., and Preiss, J. (1998). Arginine 294 is essential for the inhibition of *Anabaena* PCC 7120 ADP-glucose pyrophosphorylase by phosphate. *Biochemistry* **36**, 13077-13084.

Shinogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A.R., and Usuda, H. (1998). High efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, in press.

Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, T., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chungwonse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H., and Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome : its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**, 2043-2049.

Silflow, C.D. (1998). Organization of the nuclear genome. In "Molecular Biology of *Chlamydomonas* : Chloroplasts and Mitochondria", pp. 25-40 eds : Rochaix, J.D., Goldschmidt- Clermont, M., Merchant, S. Kluwer Academic Publishers.

Smith-White, B.J., and Preiss, J. (1992). Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Molec. Evolu.* **34**, 449-464.

Sowokinos, J.R., and J. Preiss. (1982). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. III. Purification, structural and catalytic properties of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **69**, 1459-1466.

Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., and Kishore, G.M. (1992). Role of ADP-glucose pyrophosphorylase in regulating starch levels in plant tissues. *Science* **258**, 287-292.

Sueoka, N., Chiang, K.S., and Kates, J.R. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Mol. Biol.* **25**, 44-67.

Sullivan, T.D., Strelow, L.L., Illingworth, C.A., Phillips, R.L., and Nelson, O.E. (1991). Analysis of maize *brittle-1* alleles and a defective suppressor-mutator-induced mutable allele. *Plant Cell* **3**, 1337-1348.

- Sullivan, T.D., and Kaneko, (1995).** The maize *brittle 1* gene encodes amyloplast membrane polypeptides. *Planta* **196**, 477-484.
- Summer, J.B., and Somers, G.F. (1944).** The water soluble polysaccharide of sweet corn. *Arch. Biochem.* **4**, 4-7.
- Takeda Y., Guan H.P., and Preiss J. (1993).** Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* **240**, 253-263.
- Tam, L.-W., and Lefebvre, P.A. (1993).** The use of DNA insertional mutagenesis to clone genes in *Chlamydomonas*. *Genetics* **135**, 375-384.
- Tetlow, I.J., Blissett, K.J., and Emes, M.J. (1993).** A rapid method for the isolation of purified amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* **189**, 597-600.
- Tetlow, I.J., Blissett, K.J., and Emes, M.J. (1994).** Starch synthesis and carbohydrate oxidation in amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* **194**, 454-460.
- Thorbjørnsen, T., Villand, P., Kleczkowski, L.A., and Olsen, O.-A. (1996a).** A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.* **313**, 149-154.
- Thorbjørnsen, T., Villand, P., Denyer, K., Olsen, O.-A., and Smith, A. (1996b).** Distinct isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *Plant J.* **10**, 243-250.
- Thorn, W., and Mohazzeb, S. (1990).** α -D-polyglucane-iodine complexes. *Starch/Stärke* **42**, 455-459.
- Timmis, J.N., and Scott, N.S. (1983).** Spinach nuclear and chloroplast DNA have homologous sequences. *Nature* **305**, 65-67.
- Tjaden, J., Möhlmann, T., Kampfenkel, K., Henrichs, G., and Neuhaus, H.E. (1998).** Altered plastidic ATP/ADP transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant J.* **16**, 531-540.
- Tsai, C.Y. (1974).** The function of the *waxy* locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem. Genet.* **11**, 83-96.
- Tsai, C.Y., and Nelson, O.E. (1966).** Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* **151**, 341-343.
- Tyson, R.H., and apRees, T. (1988).** Starch synthesis by isolated amyloplasts from wheat endosperm. *Planta* **175**, 33-38.
- Van den Koornhuysse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J., and Ball, S. (1996).** Control of starch composition and structure supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16281-16287.

Van den Koornhuise, N. (1996). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'approvisionnement en substrat par l'ADP-glucose pyrophosphorylase conditionne à la fois la quantité et la structure de l'amidon. **Thèse de doctorat**. Université des Sciences et Technologies de Lille.

van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buléon, A., Visser, R., and Ball, S.G. (1998). Amylose is synthesized *in vitro* by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.* **273**, 22232-22240.

Villand, P., Olsen, O.-A. Kilian, A., and Kleczkowski, L.A. (1992). ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA from barley endosperm. *Plant Physiol.* **100**, 1617-1618.

Villand, P., and Kleczkowski, L.A. (1994). Is there an alternative pathway for starch biosynthesis in cereal seeds? *Z. Naturforsch* **49c**, 215-219.

Viola, R., Davies, H.V., and Chudeck, A.R. (1991). Pathways of starch and sucrose biosynthesis in developing tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) and seeds of faba bean (*Vicia faba* L.): elucidation by ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Planta* **183**, 202-208.

Wang, S.-M., Lue, W.-L., Yu, T.-S., Long J.-H., Wang, C.-N., Eimert, K., and Chen, J. (1998). Characterization of *ADG1*, an *Arabidopsis* locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstrates that the presence of the small subunit is required for large subunit stability. *Plant J.* **13**, 63-70.

Weber, H., Heim, U., Borisjuk, L., and Wobus, U. (1995). Cell-type specific, coordinate expression of two ADP-glucose pyrophosphorylase genes in relation to starch biosynthesis during seed development in *Vicia faba* L. *Planta* **195**, 352-361.

Weiner, H., Stitt, M., and Heldt, H.W. (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochem. Biophys. Acta.* **893**, 13-21.

Wickner, R. (1979). Mapping chromosomal genes of *Saccharomyces cerevisiae* using an improved genetic mapping method. *Genetics* **2**, 134.

ANNEXES

ANNEXE 1

A) Les phénotypes des souches sauvages recombinantes.

Seules les informations sur les souches "noires" du croisement DP1×37 ont été gardées et non les souches elles-même. Nous n'avons donc pas pu contrôler si des erreurs avaient été commises dans l'appréciation des phénotypes. Les 42 souches "noires" recombinantes se répartissent ainsi :

AC ⁺ PAB ⁺ NIT ⁻	AC ⁺ PAB ⁻ NIT ⁺	AC ⁺ PAB ⁻ NIT ⁻	AC ⁻ PAB ⁻ NIT ⁻	AC ⁻ PAB ⁺ NIT ⁺	AC ⁻ PAB ⁺ NIT ⁻
9	11	1	12	6	3

Pour dix souches, le doute persistait en ce qui concerne certains caractères trophiques. Nous leur avons choisi arbitrairement un phénotype recombinant, pour obtenir un deuxième effectif de 52 souches sauvages. Cette deuxième population se répartit ainsi :

AC ⁺ PAB ⁺ NIT ⁻	AC ⁺ PAB ⁻ NIT ⁺	AC ⁺ PAB ⁻ NIT ⁻	AC ⁻ PAB ⁻ NIT ⁻	AC ⁻ PAB ⁺ NIT ⁺	AC ⁻ PAB ⁺ NIT ⁻
12	13	1	13	10	3

B) Les phénotypes et les génotypes "amidon" des souches "jaunes" (déficientes pour la synthèse d'amidon).

Les génotypes des souches ACJ 6 et ACJ 52 n'ont pu être définis car ces deux souches ont été perdues avant l'analyse génétique et moléculaire. Les quelques souches dont le génotype n'est pas sûr sont généralement des souches dont la croissance est mauvaise en milieu liquide. Les caractères NITRATE et NITRITE des souches auxotrophes pour l'arginine n'ont pu être déterminés. En effet, l'arginine ajouté au milieu est utilisé comme source d'azote ce qui masque ces deux caractères. Les phénotypes et les génotypes sont présentés dans le tableau suivant.

Nous avons hérité de huit souches apparues noires en deuxième appréciation, après coloration à l'iode.

Souches	Coloration à l'iode	AC	PAB	NITRATE	NITRITE	ARG	Génotype "amidon"
ACJ 1	jaune	+	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 2	jaune	+	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 3	jaune	+	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 4	jaune	-	-	+	+	+	<i>stal</i>
ACJ 5	jaune	+	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 6	jaune	-	-	+	?	+	?
ACJ 7	jaune	+	+	?	?	-	?
ACJ 8	jaune	+	+	?	?	-	<i>stal</i> ou <i>WT</i>
ACJ 9	jaune	-	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 10	jaune	+	-	?	?	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 11	jaune	+	+	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 12	jaune	-	+	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 13	jaune	-	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 14	jaune	+	-	+	+	+	<i>stal</i>
ACJ 15	jaune	-	+	-	+	+	<i>stal</i>
ACJ 16	jaune	+	+	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 17	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta6</i> ou <i>stal-sta6</i>
ACJ 18	jaune	+	+	-	-	+	<i>stal-sta6</i>

Souches	Coloration à l'iode	AC	PAB	NITRATE	NITRITE	ARG	Génotype "amidon"
ACJ 19	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 20	jaune	+	+	-	+	+	<i>sta6</i>
ACJ 21	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 22	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 23	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 24	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 25	jaune	+	+	-	+	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 26	jaune	-	-	+	+	+	<i>sta1</i>
ACJ 27	jaune	+	+	-	?	+	<i>sta6</i>
ACJ 28	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 29	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 30	noire	-	-	+	+	+	<i>WT</i>
ACJ 31	jaune	+	+	?	?	-	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 32	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 33	jaune	+	+	?	?	-	<i>sta1</i>
ACJ 34	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta6</i> ou <i>sta1-sta6</i>
ACJ 35	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 36	jaune	+	-	+	+	+	<i>sta1</i>
ACJ 37	noire	+	+	+	+	+	?

Souches	Coloration à l'iode	AC	PAB	NITRATE	NITRITE	ARG	Génotype "amidon"
ACJ 38	jaune	+	+	+	+	+	étrange
ACJ 39	jaune	-	-	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 40	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 41	noire	-	-	+	+	+	<i>WT</i>
ACJ 42	jaune	-	-	-	-	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 43	jaune	+	+	+	+	+	<i>sta6</i>
ACJ 44	jaune	+	-	-	+	+	<i>sta1</i>
ACJ 45	jaune	-	-	+	+	+	<i>sta1</i>
ACJ 46	jaune	+	-	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 47	noire	-	-	+	+	+	<i>WT</i>
ACJ 48	jaune	+	+	?	?	-	<i>sta1</i> ou <i>WT</i>
ACJ 49	jaune	-	-	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 50	noire	-	-	+	+	+	<i>WT</i>
ACJ 51	noire	+	+	+	+	+	étrange
ACJ 52	jaune	-	-	-	-	+	?
ACJ 53	noire	-	-	+	+	+	<i>WT</i>
ACJ 54	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta6</i>
ACJ 55	jaune	+	+	-	+	+	<i>sta1-sta6</i>
ACJ 56	jaune	+	+	-	-	+	<i>sta6</i>

Souches	Coloration à l'iode	AC	PAB	NITRATE	NITRITE	ARG	Génotype "amidon"
ACJ 57	jaune	-	-	+	+	+	<i>stal</i>
ACJ 58	jaune	+	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 59	jaune	-	-	-	-	+	<i>stal-sta6</i>
ACJ 60	noire	-	-	+	+	+	<i>WT</i>
ACJ 61	jaune	+	-	+	+	+	<i>stal</i>

Récapitulatif

population "jaune" de 53 clones

AC⁺ 39 AC⁺PAB⁺ 22 NIT⁺ 10

AC⁻ 14 AC⁺PAB⁻ 17 NIT⁻ 37

PAB⁺ 24 AC⁻PAB⁻ 12 NIT? 1

PAB⁻ 29 AC⁻PAB⁺ 2

ANNEXE 2

A) Le tableau de la distribution χ^2 .

Degrés de liberté	Probabilité											
	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001	
1	0,004	0,02	0,06	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83	
2	0,10	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	3,22	4,60	5,99	9,21	13,82	
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,66	4,64	6,25	7,82	11,34	16,27	
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47	
5	1,14	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52	
6	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,23	8,56	10,64	12,59	16,81	22,46	
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32	
8	2,73	3,49	4,59	5,53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,12	
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88	
10	3,94	4,86	6,18	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59	
	Non significatif								Significatif			

Le degré de liberté est le nombre de classes phénotypiques moins une.

B) Le test χ^2 pour la ségrégation des marqueurs AC et PAB dans la sous-population de recombinants "jaunes".

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

o_i et e_i représentent respectivement les effectifs observés et attendus de la classe i , n étant le nombre de classes. Quand le degré de liberté est de 1, il est nécessaire de calculer un χ^2 corrigé. Cette correction dite de Yates peut jouer un rôle important au voisinage de la valeur critique, significative d'une déviation incompatible avec les proportions attendues.

$$\chi^2 \text{ corrigé} = \sum_{i=1}^n \frac{((o_i - e_i) - 0,5)^2}{e_i}$$

caractère AC

$$\chi^2 = \frac{(39-44,17)^2}{44,17} + \frac{(14-8,83)^2}{8,83} = 3,62 \quad \chi^2 \text{ corrigé} = 3,2$$

caractère ACPAB

$$\chi^2 = \frac{(22-25,546)^2}{25,546} + \frac{(17-18,603)^2}{18,603} + \frac{(12-7,897)^2}{7,897} + \frac{(2-0,954)^2}{0,954} = 3,9$$

C) Le test χ^2 pour la ségrégation du marqueur ARG dans la sous-population de recombinants jaunes.

Parmi 53 recombinants jaunes, nous en avons 5 qui sont auxotrophes pour l'arginine.

Test χ^2 dans l'hypothèse d'une copie fonctionnelle de pARG7-8 intégrée dans le génome

a = recombinants ARG⁻

b = recombinants ARG⁺

r = a/b théorique

$$\chi^2 = (a-rb)^2/r(a+b)$$

proportion théorique de clones ARG⁻ : 1/12

taille de l'effectif : 53

proportion théorique de clones ARG⁺ : 11/12

r = 0,09

$$\chi^2 = (5-48r)^2/53r = 0,084 \quad \chi^2 \text{ corrigé} = 0,025$$

Test χ^2 dans l'hypothèse de deux copies fonctionnelles de pARG7-8 intégrées dans le génome

proportion théorique de clones ARG⁻ : 1/24

proportion théorique de clones ARG⁺ : 23/24

r = 0,043

$$\chi^2 = (5-48r)^2/53r = 3,68 \quad \chi^2 \text{ corrigé} = 2,59$$

ANNEXE 3

A) La correction de l'effectif des recombinants du croisement DP1×37.

Nous allons tout d'abord calculer la proportion théorique de recombinants avec un phénotype parental dans la descendance. Il suffit de faire le produit des proportions théoriques pour chaque marqueur. Nous choisissons arbitrairement une proportion de 25/36 de clones "noirs" dans ce croisement.

$$\text{Proportion de clones } AC^+PAB^+NIT^+ARG^+ \text{ noirs : } \frac{0,482 \times 0,694 \times 25 \times 11}{36 \times 12} = 0,213$$

$$\text{Proportion de clones } AC^-PAB^-NIT^+ARG^+ \text{ noirs : } \frac{0,149 \times 0,694 \times 25 \times 11}{36 \times 12} = 0,066$$

La population recombinante observée s'élève à 95 (105) clones. Nous pouvons poser les équations suivantes :

$$0,066 = x/(N + x + y) \quad x : \text{recombinants } AC^-PAB^-NIT^+ARG^+ \text{ noirs observés}$$

$$0,213 = y/(N + x + y) \quad y : \text{recombinants } AC^+PAB^+NIT^+ARG^+ \text{ noirs observés}$$

N représente la population recombinante observée

La résolution de ce système de deux équations à deux inconnues nous donne

$$9 \text{ (10) clones } AC^-PAB^-NIT^+ARG^+ \text{ noirs recombinants}$$

$$28 \text{ (31) clones } AC^+PAB^+NIT^+ARG^+ \text{ noirs recombinants}$$

L'effectif de recombinants corrigé s'élève donc à 132 (146) clones

Estimation de la proportion des clones auxotrophes pour l'arginine

La population "noire" n'a pas été testée pour l'auxotrophie à l'arginine. Parmi les clones $AC^-PAB^-NIT^-$ peuvent donc se cacher des souches ARG^- . Avec l'hypothèse d'une copie fonctionnelle de pARG7-8, les clones ARG^- doivent représenter 8,3% de la population recombinante. Sur 132 (146) clones, cela correspond à 11 (12) souches. Sachant que 5 souches jaunes ont été identifiés ARG^- , 6 (7) parmi la population $AC^-PAB^-NIT^-$ noire doivent être auxotrophe pour l'arginine.

Les souches ARG^- seront ôtées pour estimer les proportions de chaque marqueur dans la population totale.

ANNEXE 4

1) Les profils d'hybridation moléculaires obtenus pour les descendants du croisement triploïde déficients pour la synthèse d'amidon.

L'ADN génomique de chaque souche a été digéré par Pst I. Par manque de place, le nom des souches est réduit à un numéro. Ainsi ACJ1 est représenté par 1, ACJ2 par 2 et ainsi de suite. Les seules exceptions sont pour la souche de référence sauvage notée WT, la souche I7 (*sta1-1*) notée I7, La souche BAF J5 (*sta6-1::ARG7*) notée J5 et le diploïde de fusion noté DP1. Le symbole \emptyset signifie que la digestion était mauvaise et que le résultat d'hybridation n'a pas été pris en compte.

1.1) L'hybridation avec l'ADNc de la grande sous-unité.

La sonde utilisée est un fragment *PvuII* de 356 pb, situé dans la région codante de l'ADNc de la grande sous-unité.

Deux types de profils sont visualisés. Une seule bande à 1450 pb caractérise les souches sauvages (accumulant une quantité d'amidon normale) ou les souches portant uniquement la mutation *sta6-1::ARG7*. Les souches porteuses de la mutation *sta1-1* possèdent deux bandes à 1170 et 2800 pb.

WT I7 J5 DP1 36 4 15 28 25 19 1 J5 1 2 3 5 8 9 11 43 14 16 17 22

25 28 30 31 39 37 38 41 43 49 55 58

WT 21 2 3 5 9 10 13 14 16 11

53 50 47 32 57 51 46 45 44 43 40

12 18 20 23 24 26 27 29 35 39

I7 DP1 4 15 18 19 21 29 36

49 41 38 37 30 43 55

WT 56 38 61 59 54 60

1.2) L'hybridation avec le plasmide pARG7-8 utilisé pour la mutagenèse d'insertion.

Le plasmide pARG7-8 contient le gène de l'argino-succinate lyase de *C. reinhardtii*. La souche sauvage et la souche I7 en possèdent une copie sauvage. La souche BAF J5 est mutée pour ce gène. Pour éviter des hybridations croisées, une sonde *NruI-SalI* de 323 pb, appartenant à la partie bactérienne du plasmide a été choisie.

Si pARG7-8 est dans le génome nucléaire, une bande à 2700 pb apparaît. Dans le cas contraire, aucun signal positif est visible.

WT I7 25 58 36 21 57 19 28

WT DP1 I7 4 15 31 21 25 28 33 37 38 49

J5 10 12 13 20 23 24 26

WT 21 2 3 5 9 1 18 14 16 11

27 29 35 39 40 42 44 45 46 51 37 32 47 50

17 53 43 41 56 61 59 60 30 54 34 55 22

1.3) L'hybridation moléculaire avec l'ADNc de la petite sous-unité.

La sonde utilisée est un fragment *HincII-BstXI* de 322 pb, appartenant à la région codante de l'ADNc de la petite sous-unité.

Les souches sauvages ou porteuses uniquement de la mutation *stal-1* présentent un bande à 2760 pb. Par contre, chez les souches mutées pour *STA6*, cette bande est absente.

DP1 I7 WT J5

DP1 1 2 3 4 9 10 11 13 17 Ø 19

26 27 50 43 7 51 61 40 58 31 55 59

16 18 20 21 22 25 28 34 35

44 Ø Ø 39 Ø 45 46 Ø 42 Ø 49 Ø 54

12 14 Ø 20 21 Ø 25 34

15 27 47 5 7 Ø 32 53 Ø 8 36 40

14 23 41 18 38 Ø Ø Ø 24 36 32 Ø 29

60 55 30 57 46 Ø 33 Ø 56 Ø 48

Control of Starch Composition and Structure through Substrate Supply in the Monocellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii**

(Received for publication, January 31, 1996, and in revised form, April 3, 1996)

Nathalie Van den Koornhuyse‡, Nathalie Libessart‡, Brigitte Delrue‡, Christophe Zabawinski‡, André Decq‡, Alberto Iglesias¶, Anne Carton‡, Jack Preiss§, and Steven Ball‡¶

From the ‡Laboratoire de Chimie Biologique, Unité Mixte de Recherche du CNRS 111, Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France 59655, §Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824, and ¶INTECH, Instituto Tecnológico Chascomus, 7130 Chascomus, Argentina

In *Chlamydomonas*, as in higher plants, synthesis of ADP glucose catalyzed by ADP-glucose pyrophosphorylase is rate-limiting for the building of starch in the chloroplast. We have isolated disruptions of the *STA1* ADP-glucose pyrophosphorylase structural gene that rendered the enzyme less responsive to the allosteric activator 3-phosphoglycerate. The structure and composition of the residual starch synthesized by all mutants of the *STA1* locus is dramatically altered. The residual polysaccharide is shown to be devoid of amylose despite the presence of granule-bound starch synthase, the amylose biosynthetic enzyme. In addition, the fine structure of the mutant amylopectin revealed the presence of an altered chain-length distribution. This distribution mimics that which is observed during growth and photosynthesis and differs markedly from that observed during storage. We therefore propose that low nucleotide sugar concentrations are either directly or indirectly responsible for the major differences observed in the composition or structure of starch during storage and photosynthesis.

Starch is usually defined as a mix of two distinct polymer fractions, amylopectin and amylose. Amylopectin, the major compound, is composed of intermediate size $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked glucans that are organized in clusters of parallel chains (the crystal lamella) by a dense packing of $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages (the amorphous lamella). The sum of both lamellae in a unit cluster is precisely 9 nm in all plants analyzed to date, which is suggestive of a highly ordered and well conserved biosynthetic pathway (Jenkins *et al.*, 1993). Amylose is often referred to as a smaller linear molecule with very few $\alpha(1\rightarrow6)$ branches (for review, see Manners (1989)).

ADP-glucose is now firmly established as the sole precursor for starch synthesis and ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27) as the rate-limiting step in the pathway (Tsai and

Nelson, 1966; Lin *et al.*, 1988a; Smith *et al.*, 1989; Ball *et al.*, 1991; Müller-Röber *et al.*, 1992; Stark *et al.*, 1992). This enzyme has been shown to be a heterotetramer composed of 2 distinct subunits both in higher plants and in *Chlamydomonas* (Iglesias *et al.*, 1994). In most cases ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by 3-phosphoglycerate and inhibited by orthophosphate (Ghosh and Preiss, 1966) (for review, see Preiss (1993) and Preiss and Sivak (1996)).

Starch in plants accumulates either in the chloroplast of the leaf cell during photosynthesis (photosynthetic starch) or in the amyloplast of non-photosynthetic storage organs (storage starch) (for reviews, see Shannon and Garwood (1984), Preiss (1991), Müller-Röber and Kossmann (1994), Nelson and Pan (1995), and Preiss and Sivak (1996)). All structural investigations performed to date have dealt with storage starch. We have shown that growth-arrested (nitrogen-starved) *Chlamydomonas* cells accumulate a polysaccharide that bears a strong structural resemblance to maize endosperm storage starch (Ball *et al.*, 1990; Fontaine *et al.*, 1993; Maddelein *et al.*, 1994). Moreover we have demonstrated that it is synthesized by similar enzymes and that it responds in an identical fashion to mutations affecting these activities (Ball *et al.* 1991; Delrue *et al.* 1992). We have recently reported that the starch accumulated during growth and photosynthesis differs markedly from storage starch (Libessart *et al.*, 1995). The polysaccharide harbors little or no amylose and the amylopectin displays an altered chain-length distribution. Moreover, storage starch synthesis requires an additional function encoded by the *STA4* gene product (Libessart *et al.*, 1995). This function is not needed for starch synthesis during growth. We now demonstrate that the *STA1* locus that we had previously reported to be necessary for allosteric regulation of this enzyme is an ADP-glucose pyrophosphorylase structural gene. We show that mutants at the *STA1* locus accumulate during storage a polysaccharide whose structure and composition display precise phenocopies of photosynthetic starch. We further show that this is a general property of mutants defective for ADP glucose supply. We therefore conclude that unlike other biological polymers such as proteins or nucleic acids, storage polysaccharides can display wide variation in structure through control of substrate supply.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—[U-¹⁴C]Glucose 1-phosphate and [D-U-¹⁴C]adenosine diphosphate glucose were purchased from Amersham Corp. (UK). ADP glucose, maize amylopectin, and *Pseudomonas amyloideramosa* isoamylase were from Sigma. Glucose 1-phosphate, rabbit muscle glycogen, and rabbit muscle phosphorylase *a* were obtained from Boehringer Mannheim (Germany). DEAE-trisacryl type M was from IBF Biotechnics (Villeneuve la Garenne, France).

Chlamydomonas Strains, Growth Conditions, and Media—The ref-

* This work was supported by the European Union Grant (FAIR PL95-568), by the Région Nord Pas-de-Calais, by the starch processing company Roquettes Frères (Lestrem, France), by the Université des Sciences et Technologies de Lille, by the Ministère de l'Éducation Nationale, by the Centre National de la Recherche Scientifique (Unité Mixte de Recherche du CNRS 111, Director André Verbert), by the United States Department of Agriculture/Department of Energy/National Science Foundation 88-37271-3964 Plant Science Center Grant, and United States Public Health Service, National Institutes of Health Grant AI 022385. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 20.43.65.43; Fax: 20.43.65.55; E-mail: steven.ball@univ-lille1.fr.

erence strains of *C. reinhardtii* used in this study are wild-type with respect to starch and are 137C (*mt⁻ nit1 nit2*), 37 (*mt⁺ pab2 ac14*), and 330 (*mt⁺ cw15 arg7-7 nit1 nit2*) that was used for transformation. I7, carrying the *sta1-1* defect, was generated by x-ray mutagenesis from 137C and was described previously (Ball *et al.*, 1991). NV314 (*mt⁻ pab2 ac14 sta1-1*) was generated by crossing I7 and 37. BAFJ3 (*mt⁺ cw15 arg7-7 nit1 nit2 sta1-2::ARG7*) was derived from strain 330 by random integration of pARG7 as described below. Genetic techniques are described in Harris (1989a). The GBSS¹-defective strain 18 (*mt⁻ nit1 nit2 sta2-1*) was generated by UV mutagenesis and is described in Delrue *et al.* (1992). GST⁻ (*mt⁻ nit1 nit2 sta5-1*) is a spontaneous low starch mutant isolated by F. A. Wollman and L. Buité. Standard media are fully detailed in Harris (1989b), while growth conditions, nitrogen-starved media, and diploid clone selection are described in Ball *et al.* (1990, 1991), Delrue *et al.* (1992), and Libessart *et al.* (1995).

Measures of Starch Levels, Starch Purification, and Spectral Properties of the Iodine-Starch Complex—A full account of amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradients, and λ_{\max} measures can be found in Delrue *et al.* (1992).

Crude Extract Preparation, Enzyme Assays, Purification of Mutant ADP-glucose Pyrophosphorylase Activities—Granule-bound starch synthase assays and extraction and analysis of granule-bound proteins are described in Delrue *et al.* (1992). Phosphoglucosmutase assays are described in Ball *et al.* (1991). Standard zymogram techniques are detailed in Maddelein *et al.* (1994). Phosphoglucosmutase zymograms were incubated in a buffer containing Tris-HCl 200 mM, pH 8.0, 50 mM MgCl₂, 20 mg·ml⁻¹ Glc-1-P, 0.03 mg·ml⁻¹ Glc-1,6-P₂, 0.4 mg·ml⁻¹ NAD, 0.2 mg·ml⁻¹ NADP, 0.4 mg·ml⁻¹ 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 0.2 mg·ml⁻¹ phenazine methosulfate. Gels were incubated at 20 °C in darkness for 15–60 min and immediately photographed. Soluble crude extracts were always prepared from late log phase cells (2.10⁶ cells·ml⁻¹) grown in high salts acetate under continuous light (80 μ E·m⁻²·s⁻¹). ADP-glucose pyrophosphorylase activity was followed by four distinct assays. Crude extracts assays (synthesis or pyrophosphorolysis) can be found in Ball *et al.* (1991). Pyrophosphorolysis (assay A) and synthesis assays (assay B) that were used during and after purification are described in Iglesias *et al.* (1994). A detailed account of the purification procedure and yield can be found in Iglesias *et al.* (1994). The wild-type and mutant enzymes from 30 g of frozen *Chlamydomonas* pellets were purified, respectively, 2033- and 1180-fold by four chromatographic steps (DEAE-Sepharose, Mono Q, Green A Dye-Ligand, Mono Q) with yields of 32 and 27%. In a second series of purifications, the mutant enzyme withstood only the first two chromatographic steps (DEAE-Sepharose and Mono Q) which gave a 160-fold purification and 8% yield. In both cases the mutant enzyme displayed identical kinetics. Other enzyme assays or zymograms of starch synthases, branching enzymes, phosphoglucosmutases, and phosphorylases were previously described (Fontaine *et al.* (1993), Maddelein *et al.* (1994), and Libessart *et al.* (1995)).

Starch Fractionation—Separation of starch fractions on TSK-HW-75(S) columns (Merck) was as previously detailed (Delrue *et al.* (1992)). Methylation of total starch was performed according to Delrue *et al.* (1992) and Fontaine *et al.* (1993) after modification of the method designed by Paz-Parente *et al.* (1985).

Debranching Analysis—Isoamylase-mediated debranching of gel permeation chromatography-purified fractions was achieved as described previously (Libessart *et al.*, 1995). After completion of the debranching reaction, samples were kept at 80 °C in 10% dimethyl sulfoxide to avoid retrogradation of the long glucans into insoluble material. Half of the debranched polysaccharide was subjected to TSK-HW-50(F) chromatography while the other sample half was subjected to high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD) on a Carbo-Pac PA-100 column. Details of those procedures can be found in Libessart *et al.* (1995).

Matrix-associated Laser Desorption/Ionization Mass Spectra—Matrix-associated laser desorptions have been measured on a Vision 2000 time-of-flight mass spectrometer (Finnigan MAT, Bremen) using 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix (10 mg ml⁻¹ in MeCN:H₂O, 70:30), 1 μ l of sample (1.5 μ g· μ l⁻¹) was mixed with 1 μ l of matrix solution on a stainless steel target. Desorption/ionization was performed using a N₂ laser at 337 nm. 20 spectra have been summed in order to enhance the

signal to noise ratio.

NMR and Methylation Analysis—NMR analysis was performed as described in Fontaine *et al.* (1993). The level of branching was estimated by integration of the same regions of proton resonances of the mono- and disubstituted glucose (δ 5.2 and 4.85 parts/million, respectively) (Gidley, 1985). Methylation of total starch and of fractions dialyzed and freeze-dried after TSK-HW-75 chromatography was performed according to Paz Parente *et al.* (1985) and adapted to starch analysis (Delrue *et al.*, 1992). The branching percentage was assayed as the ratio of methyl ether derivatives of $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked Glc either to those of $\alpha(1\rightarrow4)$ - and $\alpha(1\rightarrow6)$ -linked Glc or to those of Glc in a terminal nonreducing position (Delrue *et al.*, 1992; Fontaine *et al.*, 1993).

Transformation-mediated Gene Disruption—Standard glass beads-mediated transformation (Kindle, 1990) was performed on the cell wall deficient arginine requiring strain 330 with 1 μ g of pARG7.2 carrying the wild-type arginosuccinate lyase gene. Transformants were selected by complementation of the arginine auxotrophy present in the recipient strain. The transformants were screened for starch structure and amount by spraying iodine directly on replica plates (Fontaine *et al.* (1993)). Those mutants that stained yellow contained less than 5% of the wild-type starch amount. They were selected and subjected to routine complementation analysis. The frequency of mutant selection in the starch pathway was in the order of 4×10^{-4} .

Chlamydomonas DNA Purification, Cloning and Sequencing, Accession Number—Algal DNA extraction was as described by Weeks *et al.* (1986). RNA extraction and purification was adapted from phenol extraction procedure described in Maniatis *et al.* (1982). Cloning of the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase was performed using a λ EXlox (10⁹ plaque-forming units·ml⁻¹) library. The oligonucleotides 5'-AAG AT(CT) TAC GT(ACGT) CT(GT) AC(GTC) GAG TT-3' and the antisense 5'-(GAC)GT (AG)CC (AG)AT (AG)T(CT) CTC CCA GTAT-3' generated a 650-base pair polymerase chain reaction fragment that was used to rescreen the library. Five positive clones were then partly or fully sequenced. All clones displayed extensive sequence overlap. Subclones were generated either by the use of standard restriction sites or by that of *ExoIII*. The rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction kit from Perkin-Elmer was used to generate the 5' end of the cDNA sequence. The amplification was performed using the 5'-GGC ATC AGC AAG ATC TA-3' antisense nucleotide corresponding to the GTRLFP peptide. Sequencing was performed by the dideoxy chain termination method using the Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit (U. S. Biochemical Corp.). The EMBL accession number for the sequence reported and used in this study is X91736.

RESULTS

Absence of the STA1 Gene Product Leads to Lower Sensitivity of ADP-glucose Pyrophosphorylase to Allosteric Regulation by 3PGA—We had previously characterized the *sta1-1* mutant allele as leading to a lower sensitivity of ADP-glucose pyrophosphorylase to the allosteric effectors 3PGA and orthophosphate (Ball *et al.*, 1991). To confirm these conclusions we purified the mutant activity from 95- to 1180-fold and made kinetic comparisons with the wild-type enzyme that was purified to homogeneity. Results shown in Fig. 1B clearly show that the mutant enzyme activity is less sensitive to 3PGA activation. However in contrast to what was initially reported for crude extracts (Ball *et al.*, 1991), it remained sensitive to orthophosphate inhibition (Fig. 1A). The mutant S_{0.5} values measured in the presence of 2.5 mM 3PGA were 0.25 mM and 0.15 mM for ATP and Glc-1-P, respectively. These values, which are in the physiological range for ADP-glucose synthesis, are significantly higher than those reported for the wild-type activity in the presence of 2.5 mM 3PGA (S_{0.5} for ATP and Glc-1-P, were of 0.08 mM and 0.03 mM, respectively). However, they remain very close to those of the wild-type unactivated enzyme (S_{0.5} for ATP and Glc-1-P of 0.48 and 0.22, respectively) (Iglesias *et al.*, 1994). Moreover, no significant decrease in the amount of total activity (in the absence of 3PGA) was found in crude extracts. In order to understand if these defects were specific of the x-ray generated *sta1-1* allele, we selected gene disruptions of the *STA1* locus. Strain BAFJ3 carrying the *sta1-2::ARG7* disrupted allele failed to complement *sta1-1* in diploids (Fig. 2). The disrupted strain showed the same phenotype as the original

¹ The abbreviations used are GBSS, granule-bound starch synthase; DP, degree of polymerization; 3PGA, 3-phosphoglycerate; HPAE-PAD, high performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection; λ_{\max} , maximal absorbance wavelength of the iodine polysaccharide complex.

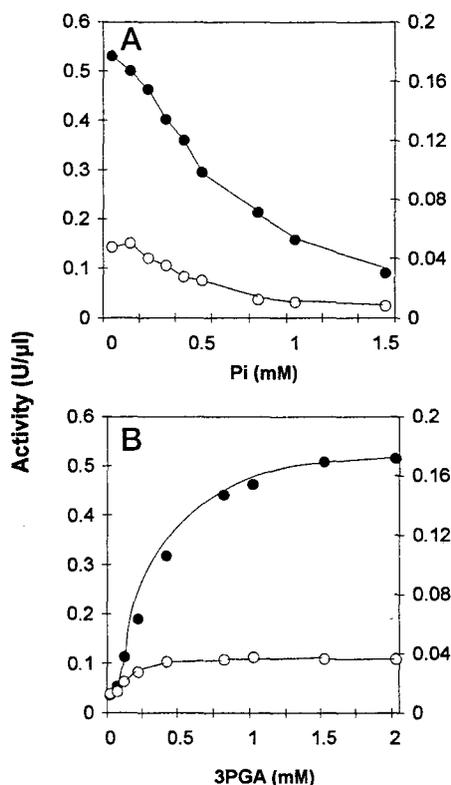


FIG. 1. Kinetic parameters for 3PGA and P_i inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase from wild-type and mutant strains (pyrophosphorolysis direction). A, display of the P_i inhibition curve of wild-type strain 137C (●) compared to that of the *sta1-1* carrying strain I7 (○). $I_{0.5}$ values of 0.56 mM and 0.47 mM P_i were measured, respectively, for the wild-type and the mutant with h values of 1.7 and 2.4. P_i concentration estimated by Kloock and Kreuzberg (1991) in the *Chlamydomonas* chloroplast amounted to 8 mM both in the light or during anaerobiosis in the dark. Inhibition was measured using substrate concentrations of 1 mM ATP and 0.5 mM Glc-1-P in the presence of 2.5 mM 3PGA. The left and right y axis display the enzyme activity scales used respectively for the wild-type and the mutant strains. B, display of the 3PGA activation curve of 137C (●) and I7 (○). $A_{0.5}$ values of 0.3 mM and 0.15 mM 3PGA were measured, respectively, for the wild-type and the mutant with g_H values of 2.0 and 1.8. 137C and I7 gave, respectively, 15- and 3-fold maximal activation. 3PGA concentration estimated by Kloock and Kreuzberg (1991) in the *Chlamydomonas* chloroplast amounted to 1.6 mM in the light (0.5 mM during anaerobiosis in the dark). Activation was measured using substrate concentrations of 1 mM ATP and 0.5 mM Glc-1-P in the absence of inhibitor. Units are expressed in nanomoles of ADP glucose synthesized per min. The purified enzyme fractions were adjusted with respect to the amount of protein (1 μ l of adjusted fraction contained 16 ng of protein). The left and right y axes display the enzyme activity scales used, respectively, for the wild-type and the mutant strains.

sta1-1 carrying mutants. It contained 5% of the wild-type starch amounts while ADP-glucose pyrophosphorylase became selectively unresponsive to 3PGA activation.

Evidence That *STA1* Encodes an ADP-glucose Pyrophosphorylase Subunit Structural Gene—The lower sensitivity to 3PGA activation could be explained either by the absence of a regulatory protein responsible for switching the enzyme to a sensitive form or the absence or modification of one of the two subunits of the *Chlamydomonas* heterotetramer enzyme. In order to distinguish between these possibilities, we have cloned and sequenced a full-length ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA. Southern analysis using the *PvuII* fragment in the middle of the cDNA coding sequences showed that all strains carrying *sta1* deletions displayed major alterations (Fig. 3). Moreover, the size of the smallest fragments that appeared modified confirm that enzyme coding sequences are altered in the mutants. In addition Southern analysis was

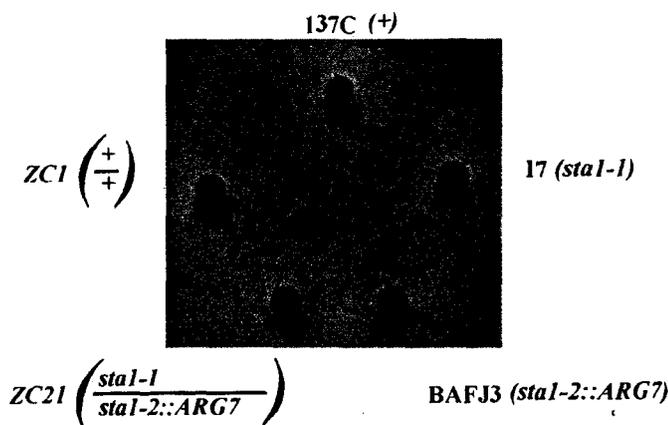


FIG. 2. Phenotypes of wild-type and mutant haploid and diploid strains. The genotypes corresponding to each haploid or diploid strain with respect to starch are listed between parentheses. ZC1 and 137C are, respectively, wild-type diploid and haploid references. ZC21 is a diploid strain generated for the complementation test between NV314 (*sta1-1*) and BAFJ3 (*sta1-2::ARG7*). Cell patches were incubated for 5 days on solid nitrogen-deprived medium and sprayed twice with iodine vapors.

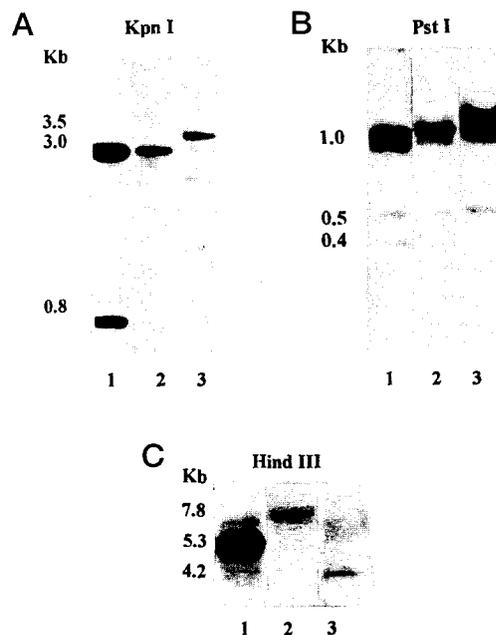


FIG. 3. Southern analysis of wild-type and mutant strains carrying defects for the *STA1* locus. The probe covers the 356-base pair *PvuII* fragment from the coding region of the 52.3-kDa ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit cDNA. Cross-hybridization with both large and small subunit structural genes is to be expected. Lanes 1, 2, and 3 represent 8–12 μ g of DNA extracted, respectively, from strains 137C (wild-type reference), I7 (carrying the x-ray generated deletion *sta1-1*), and BAFJ3 (carrying the *sta1-2::ARG7* disruption). A, *KpnI* digestion; B, *PstI* digestion; C, *HindIII*. Both x-ray and insertional mutagenesis are expected to generate rather extensive deletions in the DNA. The same qualitative (presence, absence, or modification of restriction fragments) and quantitative (reduction of the hybridization signal intensity in the mutants) were seen to cosegregate with *sta1* mutations in crosses. Possible cross-hybridization between large and small subunit structural genes does not allow us to distinguish which of the two polypeptides is encoded by *STA1*.

carried out on the meiotic progeny of a cross between I7 and wild-type strain 37, establishing cosegregation between the altered response and the mutant phenotype. While the results prove that *STA1* encodes an ADP-glucose pyrophosphorylase subunit sequence, they do not distinguish yet between loci encoding large or small subunits of the enzyme.

TABLE I
Granule-bound starch synthase activity in wild-type and *sta1-1* carrying strains

Strain	Genotype	Activity	
		Per mg of starch	Per 10 ⁶ cells
137C	(+)	3.2	82
I7	(<i>sta1-1</i>)	18	33

^a nmol of ADP glucose incorporated into glucan per min per mg starch or per 10⁶ cells.

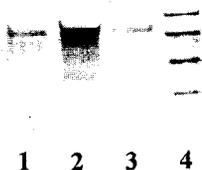


FIG. 4. Starch-bound proteins. A Coomassie Brilliant Blue R-250-stained 5–7.5% SDS-acrylamide gel of starch-bound protein. Lane 1 and 3 are starch-bound proteins from the nitrogen-starved wild-type 137C strain while lane 2 displays starch-bound protein extracted from strain I7 carrying the *sta1-1* allele. Lane 4 displays molecular size standards (from top to bottom: 94, 67, 43, and 30 kDa). Proteins simultaneously extracted from equal amounts of polysaccharide (1 mg) were loaded onto the gel. The major 76-kDa band corresponds to the GBSS protein and displayed the typical GBSS N-terminal sequence (Delrue *et al.* 1992).

Mutants of the STA1 Locus Are Devoid of Amylose Despite the Presence of Higher Granule-bound Starch Synthase Specific Activities—Both *sta1-1* and *sta1-2::ARG7* carrying strains contain highly selective defects. We have assayed the level and whenever possible the kinetics of all enzymes known to be involved in starch metabolism in the mutant strains. We found no indirect effect of the drop of nucleotide sugar supply on enzymes involved in starch metabolism. Total levels of GBSS, the enzyme known to be responsible for amylose biosynthesis, expressed per 10⁶ cells showed a mere 2–3-fold reduction (Table I). However, a spectacular increase of this enzyme-specific activity expressed per μ g of starch comes as a consequence of the decrease in polysaccharide amounts (Table I and Fig. 4). Despite this increase, the decrease in the λ_{\max} (from 600 to 570 nm) of the iodine polysaccharide complex of purified starch granules suggested a large decrease in amylose content. The chromatograms displayed in Fig. 5 clearly show the absence of low molecular weight amylose in the residual starch stored by nitrogen starved *sta1* carrying strains. In fact the storage polysaccharide chromatograms from the mutants are exact phenocopies of those of photosynthetic starch extracted from nitrogen supplied wild-type cultures. The absence of a contaminating amylose fraction in the purified amylopectin was confirmed by methylation analysis performed on unfractionated starch samples. Table II clearly shows that the starch from *sta1* carrying mutants contain slightly more branches (6%) than mutants defective for amylose biosynthesis. The λ_{\max} of the high molecular weight amylopectin purified in these chromatograms displayed a small increase in the mutants. We therefore embarked in a more detailed structural characterization of the mutant amylopectin.

The Amylopectin Chain-length Distribution Is Modified and Identical to That of Photosynthetic Starch—The chain-length distribution of the mutant amylopectins purified by gel filtration were further compared to wild-type starches both from starch-storing cells (growth-arrested cultures exhibiting low levels of photosynthesis) and from growing cultures actively engaged in photosynthesis. These physiological conditions are very simply obtained by supplying or not a nitrogen source to

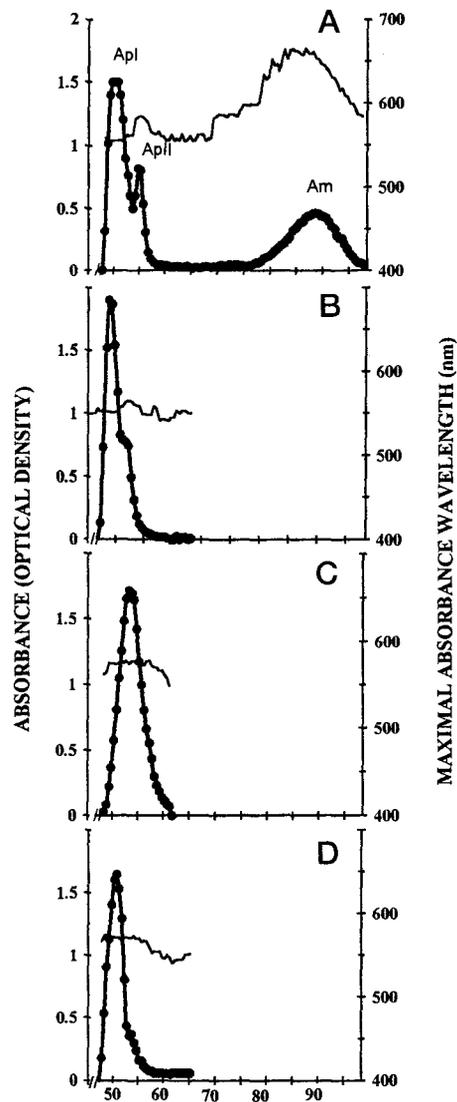


FIG. 5. Separation of amylopectin and amylose by TSK-HW75 chromatography. The optical density (●) was measured for each 3-ml fraction at λ_{\max} ; λ_{\max} is displayed as an unbroken thin line. All samples were loaded on the same column setup as described by Delrue *et al.* (1992). The wild-type haploid 137C strain starch extracted from nitrogen-starved cultures (storage starch) (panel A) can be seen to carry the standard type I (*ApI*) and type II (*ApII*) amylopectins and amylose (*Am*). Panel B displays starch from the same strain extracted from nitrogen-supplied growing and photosynthesizing cultures (photosynthetic starch). Panel C displays the starch extracted from a nitrogen-starved *sta1-2::ARG7*-carrying strain (BAFJ3). Panel D shows the starch extracted from nitrogen-starved I7 cells containing the *sta1-1* mutation. Identical conclusions were reached using CL2B Sepharose in 10 mM NaOH. No amylose could be extracted from *sta1* (both *sta1-1* and *sta1-2::ARG7*)-carrying strains whatever solvent or pretreatment was used. Notice that both I7 starch from nitrogen-starved cultures and 137C starch from nitrogen-grown cultures carry amylopectins of identical λ_{\max} .

the medium (Libessart *et al.*, 1995). The purified amylopectins were debranched using isoamylase. The small glucans (up to 20 Glc residues long) were separated by HPAE-PAD (Fig. 6), while the longer chains were analyzed by TSK-HW50 chromatography (Fig. 7). While the long chains did not display major differences in their size distribution, the chain-length distributions of the small glucans were clearly different, a fact which was further confirmed by mass spectroscopy. The increase in frequency of the small glucans correlates with the increase in branching that we had measured (see above). We therefore assayed branching of photosynthetic starch by proton NMR

TABLE II
Structural properties of wild-type and mutant starches

Strain	Genotype	λ_{\max}^a	2,3,4,6-Glc ^b	2,3,6-Glc ^b	2,3-Glc ^b
137C	(+ +)	590	0.8	31	1
18B	(+ <i>sta2-1</i>)	550	0.9	19	1
I7	(<i>sta1-1</i> +)	560	0.9	17	1

^a The λ_{\max} is expressed in nm rounded to the nearest decimal.

^b 2,3,6-Glc, 2,3-Glc, 2,3,4,6-Glc represent the methyl ether derivatives, respectively, of an $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked glucose, an $\alpha(1\rightarrow4)$ - and $\alpha(1\rightarrow6)$ -linked glucose, and a glucose in terminal nonreducing position. The amounts were compared taking 2,3-Glc as an arbitrary standard.

and found the same 6.5% estimate. By of all these criteria, the starch purified during storage from the *sta1*-containing mutants was identical to the polysaccharide isolated from wild-type cultures actively engaged in photosynthesis and cell division. Both polysaccharides are markedly different from standard storage starch.

Mutants Lacking a Specific Isoform of Phosphoglucomutase Accumulate a Storage Polysaccharide Devoid of Amylose with a Modified Amylopectin Chain-length Distribution—Standard nucleotide sugar assays were not sufficiently sensitive to allow detection of ADP glucose in standard volumes of wild-type algal cultures. We could, however, predict that if nucleotide sugar concentrations were indeed involved, mutations inactivating or lowering other enzyme activities essential to ADP glucose supply should lead to similar defects in starch structure. We therefore embarked in characterization of storage starch structure from mutants lacking the major plastidic fast-migrating phosphoglucomutase isoform. These mutants harbor 20% residual activity due to the presence of a minor cytoplasmic phosphoglucomutase isoform and accumulate from 4 to 12% of the wild-type amount of starch during storage. The defect was shown to be due to a single nuclear gene defining a novel *Chlamydomonas* locus (*STA5*) necessary for normal starch accumulation. As shown in Fig. 8, the starch accumulated during storage by *sta5-1* carrying mutants lacks the low molecular weight amylose fraction and accumulates an amylopectin with a λ_{\max} identical to those reported for both the storage starch of *sta1*-carrying mutants or the photosynthetic starch from wild-type cultures. Moreover, the chain-length distribution of the amylopectin from *sta5-1*-carrying mutants was identical to those displayed in Fig. 6, panels B and C. By comparison, low starch mutants carrying defects in the *STA3* gene affected in soluble starch synthase activities (downstream from ADP glucose synthesis) do not show these modifications during storage and accumulate substantially higher amounts of low molecular weight amylose (Fontaine *et al.*, 1993). We therefore conclude that it is the supply of ADP glucose that controls both the differences in composition and structure occurring between plant cells engaged in photosynthesis or starch storage.

DISCUSSION

The absence of an ADP-glucose pyrophosphorylase subunit structural gene product renders the *Chlamydomonas* enzyme selectively less sensitive to 3PGA activation. The activation defect being the only consequence on the kinetics of the enzyme, this result distinguishes *Chlamydomonas* from other plants such as *Arabidopsis* (Lin *et al.*, 1988b; Li and Preiss, 1992). Since the total amount of enzyme activity in the absence of 3PGA is the same in wild-type or mutant cells, *Chlamydomonas* offers a unique opportunity to investigate the physiological relevance of this regulation. As opposed to our initial observations (Ball *et al.*, 1991), the purified mutant enzyme is shown to remain equally sensitive to orthophosphate inhibition. Therefore we suspect that, because it is not counteracted by 3PGA activation anymore, it is this inhibition which is chiefly responsible for the large decrease observed in starch synthesis.

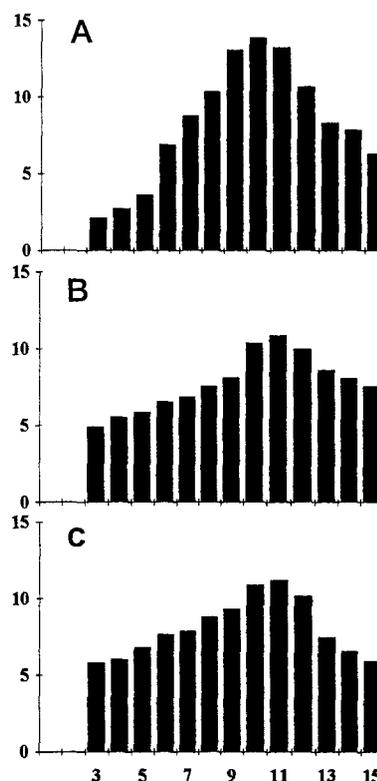


FIG. 6. High performance anion exchange with pulsed amperometric detection chromatography of water-soluble debranched glucans. Glucans differing by only one glucose residue in length are clearly separated up to the degree of polymerization 25 (DP 25). Results are given in relative frequencies histograms of chains ranging from DP 3 to 15. These frequencies were computed from the chromatogram peak surfaces with the total amount of chains from 3 to 15 adjusted to 100%. A, wild-type type I amylopectin from nitrogen-starved cultures (storage starch). B, amylopectin from the wild-type strain 137C from nitrogen-supplied growing cultures (photosynthetic starch). C, amylopectin from the I7 strain (*sta1-1*).

No other enzyme activity assayed (starch synthases, branching enzymes, phosphorylases, phosphoglucomutases, amylases) appear modified as an aftermath of the drop in nucleotide sugar supply (Ball *et al.*, 1991). The decrease in starch content observed in *sta1* mutants (Ball *et al.*, 1991) (this work) is an expected consequence of the reduction in ADP glucose synthesis. However, the dramatic changes in structure and composition of the residual mutant starch that occurred under storage conditions were totally unexpected. They also are to be entirely explained by a decrease in substrate supply. Moreover, these changes are identical to those that distinguished storage starch from the polysaccharide that can be found predominantly around the pyrenoid of growing and photosynthesizing algae (photosynthetic starch) (Libessart *et al.*, 1995). That ADP glucose supply is lowered during growth, and photosynthesis is further suggested by a decrease both in the rate of starch synthesis and in polysaccharide content. We therefore reason that a decrease in ADP glucose concentration might be suffi-

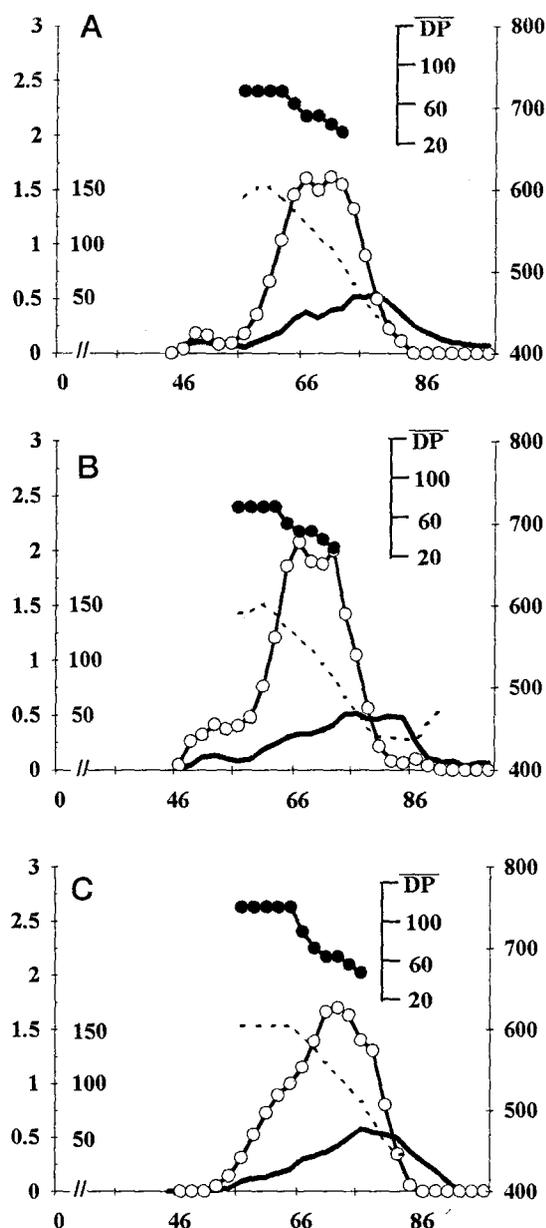


FIG. 7. Separation of isoamylase debranched glucans by TSK-HW-50 chromatography. Four milligrams of starch fractions purified by gel filtration were loaded on each column after debranching. The optical density (○) of the iodine polysaccharide complex was measured for each 2-ml fraction at λ_{\max} . The OD scale is shown on the left on the y axis. The amount (micrograms) of glucose per ml of fraction is scaled on the inner side of the y axis at the left. The y axis at the right represents the wavelength (nm) scale. The x axis shows the elution volume scale (ml). A λ_{\max} value is displayed for all fractions where it could be determined (broken line). The column setup and debranching conditions are described under "Experimental Procedures." The DP scale (●) was generated by using the λ_{\max} values of the debranched glucans as internal standards according to Banks *et al.* (1971). A, wild-type amylopectin from nitrogen-supplied cultures (photosynthetic starch). B, wild-type type I amylopectin from nitrogen-starved cultures (storage starch). C, amylopectin from nitrogen-starved BAFJ3 cells (*sta1-2::ARG7*).

cient to explain the major differences between the two types of starches. Conclusive evidence, however, will be brought only after technical procedures allowing for detection of low levels of nucleotide sugar from standard volumes of algal cultures have been devised.

High and low supplies of substrate may render different proteins rate-limiting for the building of distinct starch substructures. For instance, a number of studies have established

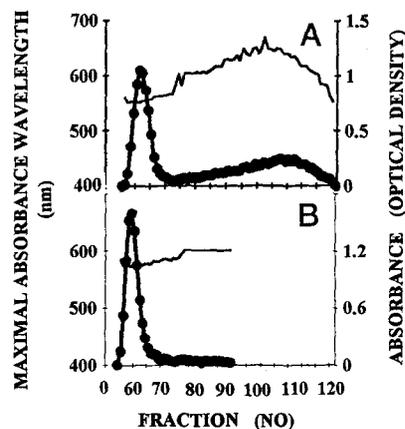


FIG. 8. Separation of amylopectin and amylose by CL2B-Sepharose chromatography. The optical density (●) was measured for each 3-ml fraction at λ_{\max} ; λ_{\max} is displayed as an unbroken thin line. All samples were loaded on the same column setup as described by Delrue *et al.* (1992). The wild-type haploid 137C strain starch extracted from nitrogen starved cultures (storage starch) (panel A) displays both amylopectin and low molecular weight amylose. CL2B does not separate types I and II amylopectin. Panel B displays starch from the mutant strain GST- defective for phosphoglucomutase activity. Starch was also extracted under nitrogen starvation (storage starch).

that the amount of GBSS is rate-limiting for amylose biosynthesis during storage (Nelson and Rines, 1962; Tsai, 1974; Visser *et al.*, 1991; Kuipers *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). We have already shown that this is not the case during growth and photosynthesis (Libessart *et al.*, 1995). We can now extend these observations and predict that amylose synthesis will not occur when the supply of ADP glucose is low.

Substrate-controlled modifications in starch structure can be explained through at least three different mechanisms. One is to suppose that the decrease in ADP glucose could trigger a regulatory mechanism that will modify, induce, or repress starch biosynthetic enzymes. As far as we can tell from our various enzyme assays, such a mechanism does not seem to be at work.

Another explanation can be found if one compares the different K_m values of the starch synthases for ADP glucose. It is striking to note that GBSS the amylose biosynthetic enzyme has a 5-fold higher K_m (5 mM) than the soluble starch synthases that are solely involved in amylopectin synthesis (Macdonald and Preiss, 1985; Delrue *et al.*, 1992). This difference disappears upon solubilization of the enzyme and can be accounted for by the burying of the enzyme inside the granule leading to its physical isolation from the branching enzymes. The GBSS at the surface would on the other hand be involved in amylopectin synthesis. Thus both a decrease in amylose content and redistribution of chain lengths in amylopectin are to be expected when the supply of ADP glucose is low.

Finally, all the modifications observed could be explained if one assumes the existence of a critical balance existing at the surface of the granule between branching and elongation activities. If the amount of enzyme activities are kept more or less constant, then the increase of the starch stroma interface that occurs during storage could lead to the physical isolation of GBSS from the branching enzymes. This in turn would lead to amylose synthesis.

Whatever mechanism will turn out to be operating, the differences in structure and composition that are controlled by the supply of substrate are to be considered major for a polysaccharide as simple as starch. Substrate control offers a convenient and direct way to optimize the structure with respect of the plant cell's metabolic state. It is our opinion that the importance of such simple mechanisms regulating biological polymers

structures has been underestimated. Clearly information and functional constraints that apply to proteins and nucleic acids will not allow for the control of primary structures by the relative and absolute concentrations of nucleotides and amino acids. However, it has not escaped us that in the case of complex polymers, such as oligosaccharides of *N*-glycans or polysaccharides composed of different sugars, the decrease of the supply of one particular nucleotide sugar might be sufficient to generate major primary structure modifications.

REFERENCES

- Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J. C., and Matagne, R. F. (1990) *Plant Sci.* **66**, 1-9
- Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B., and Decq, A. (1991) *Planta* **185**, 17-26
- Banks, W., Greenwood, C. T., and Khan, K. M. (1971) *Carbohydr. Res.* **17**, 25-33
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Van Den Koornhuysse, N., Maddelein, M.-L., Fournet, B., and Ball, S. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 3612-3620
- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Delrue, B., Van Den Koornhuysse, N., Bossu, J. P., Fournet, B., and Ball, S. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16223-16230
- Gidley, M. J. (1985) *Carbohydr. Res.* **139**, 85-93
- Ghosh, H. P., and Preiss, J. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 4491-4504
- Harris, E. H. (1989a) in *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use* (Harris, E., ed) pp. 25-63, Academic Press, San Diego, CA
- Harris, E. H. (1989b) *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use* (Harris, E., ed), pp. 399-446, Academic Press, San Diego
- Iglesias, A. A., Charng, Y. Y., Ball, S., and Preiss, J. (1994) *Plant. Physiol.* **104**, 1287-1294
- Jenkins, P. J., Cameron, R. E., and Donald, A. M. (1993) *Staerke* **45**, 417-420
- Kindle, K. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1228-1232
- Kloeck, G., and Kreuzberg, K. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 410-415
- Kuipers, A. G. J., Jacobsen, E., and Visser, R. G. F. (1994) *Plant Cell* **6**, 43-52
- Li, L., and Preiss, J. (1992) *Carbohydr. Res.* **227**, 227-239
- Libessart, N., Maddelein, M.-L., Van Den Koornhuysse, N., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S. G. (1995) *Plant Cell* **7**, 1117-1127
- Lin, T.-P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988a) *Plant Physiol.* **86**, 1131-1135
- Lin, T.-P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J. (1988b) *Plant Physiol.* **88**, 1175-1181
- Macdonald, F. D., and Preiss, J. (1985) *Plant Physiol.* **78**, 849-852
- 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) *J. Biol. Chem.* **269**, 25150-25157
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Manners, D. J. (1989) *Carbohydr. Polym.* **11**, 87-112
- Müller-Röber, B., and Kossmann, J. (1994) *Plant Cell Environ.* **17**, 601-613
- Müller-Röber, B., Sonnwald, U., and Willmitzer, L. (1992) *EMBO J.* **11**, 1229-1238
- Nelson, O. E., and Rines, H. W. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 297-300
- Nelson, O. E., and Pan, D. (1995) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **B 46**, 475-496
- Paz Parente, J., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B., and Ricart, G. (1985) *Carbohydr. Res.* **141**, 41-47
- Preiss, J. (1991) *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol.* **7**, 59-114
- Preiss, J. (1993) *Denpun Kagaku* **40**, 117-131
- Preiss, J., and Sivak, M. N. (1996) in *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships* (Zamski, E., and Schaffer, A. A., eds) pp. 63-96, Marcel Dekker, New York
- Shannon, J. C., and Garwood, D. L. (1984) in *Starch: Chemistry and Technology* (Whistler, R. L., Bemiller, J. N., and Paschall, E. F., eds) 2nd Ed., pp. 25-86, Academic Press, Orlando, FL
- Smith, A. M., Bettey, M., and Bedford, I. D. (1989) *Plant Physiol.* **89**, 982-985
- Stark, D. M., Timmerman, K. P., Barry, G. F., Preiss, J., and Kishore, G. M. (1992) *Science* **258**, 287-292
- Tsai, C.-Y. (1974) *Biochem. Genet.* **11**, 83-96
- Tsai, C.-Y., and Nelson, O. E. (1966) *Science* **151**, 341-343
- Visser, R. G. F., Somhorst, I., Kuipers, G. J., Ruys, N. J., Feenstra, W. J., and Jacobsen, E. (1991) *Mol. Gen. Genet.* **225**, 289-296
- Wang, Z.-Y., Zheng, F.-Q., Shen, G.-Z., Gao, J.-P., Snustad, D. P., Li, M.-G., Zhang, J.-L., and Hong, M.-M. (1995) *Plant J.* **7**, 613-622
- Weeks, D. P., Beerman, N., and Griffith, O. M. (1986) *Anal. Biochem.* **152**, 376-385

