

50376  
1999  
479

Université des Sciences et Technologies de Lille

**THESE DE DOCTORAT**

**spécialité: Génétique microbienne**

présentée par

Christophe COLLEONI



en vue de l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

**L' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase est impliquée dans la biosynthèse de  
l'amidon chez l'algue verte unicellulaire  
*Chlamydomonas reinhartii***

présentée le 16 décembre 1999, devant la commission d'examen composée de:

**Président:** A. Verbert

**Rapporteurs:** A. Buléon  
J-P. Jacquot

**Examineurs:** A. Myers  
T. Barsby

**Directeur de thèse:** S.G. Ball

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Steven Ball dans le Laboratoire de Chimie Biologique-UMR 8576, Université des Sciences et des Technologies de Lille (directeur: Professeur André Verbert).

Au terme de ce travail, je voudrais exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.

J'exprime ma sincère gratitude envers Monsieur le Professeur Steven Ball pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et conseillé tout au long de cette étude. Je profite enfin de ce travail pour vous exprimer ma profonde reconnaissance pour la confiance que vous m'avez témoigné.

Je remercie sincèrement à Monsieur le Professeur André Verbert qui m'a fait le très grand honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur J-P. Jacquot, Professeur à l'Université de Nancy I et Monsieur Alain Buléon, Directeur de recherche à l'INRA de Nantes pour leur présence en qualité de rapporteurs au sein de ce jury.

Je remercie également le Professeur Alan Myers et le Professeur Tina Barsby d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je suis très reconnaissant à tous ceux qui m'ont accueilli dans leur laboratoire, initié et guidé en différentes techniques:

Monsieur le Professeur Mathieuw Morell (Australie, Canberra) pour les analyses en électrophorèse capillaire.

Au Docteur Christophe Bliard (Reims) pour les analyses en RMN.

Je remercie particulièrement à Christophe d'Hulst pour sa grande disponibilité et les remarques pertinentes apportées au cours de la rédaction de ce mémoire. En témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je remercie chaleureusement à toute l'équipe de 005 : André, Brigitte, David, Fabrice, Greg, Luc, Seb, Zab pour les bons moments passés ensemble et pour l'ambiance agréable dans laquelle nous avons pu travailler.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire de Chimie Biologique, pour leur soutien technique ou leurs conseils, mais aussi pour la sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée.

Enfin, je voudrais aussi associer à ces remerciements Mirela, ma femme, pour son amour et sa confiance. Merci à toute ma famille, qui sans arrêt m'ont aidé et soutenu tout au long de ce travail.

## RESUME

Nous savons maintenant que les enzymes de débranchement participent de manière active à la biosynthèse de l'amidon que ce soit pour former la structure finale en grappe de l'amylopectine ou pour prévenir la synthèse d'un polysaccharide soluble dans les plastes des cellules. Dans ce travail, nous décrivons une nouvelle mutation chez *Chlamydomonas reinhardtii* entraînant un effondrement de la synthèse d'amidon ainsi que des modifications structurales majeures du polysaccharide résiduel. De plus, cette défectuosité s'accompagne d'une accumulation de malto-oligosaccharides linéaires. Cette mutation ségrége avec l'absence d'une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase, encore appelée enzyme disproportionnante (enzyme D). Bien que l'enzyme D transfère des chaînes de glucoses liés en  $\alpha$ -1,4 provenant d'un donneur sur des malto-oligosaccharides accepteurs plus courts, nous montrons que l'enzyme catalyse aussi *in vitro* le transfert de malto-oligosaccharides sur les chaînes externes de l'amylopectine. Nous proposons, par conséquent, que l'enzyme D joue un rôle clef dans la biosynthèse de l'amidon. Celle-ci métabolise les malto-oligosaccharides libérés par les enzymes de débranchement, soit en les réincorporant sur les chaînes externes du précurseur de l'amylopectine (la préamylopectine), soit en facilitant leur dégradation par les voies hydrolytiques et phosphorolytiques.

## SUMMARY

Recently, debranching enzymes were shown to be required during starch synthesis either for shaping amylopectin structure or for preventing synthesis of abnormal soluble polysaccharides in the plastid stroma. We now describe a novel mutation in *Chlamydomonas* which results in significantly reduced granular starch deposition displaying major modifications in structure. This defect simultaneously leads to the accumulation of linear malto-oligosaccharides. The mutation co-segregates with the absence of an  $\alpha$ -1,4 glucanotransferase, known as disproportionating enzyme (D-enzyme). While the D-enzyme was known to transfer  $\alpha$ -1,4 linked chain segments between small-size acceptor and donor malto-oligosaccharides, we show that the missing enzyme readily catalyzes the incorporation of oligosaccharides into amylopectin external chains *in vitro*. We therefore propose that D-enzyme plays a key role in starch biosynthesis by efficiently clearing those malto-oligosaccharides released by debranching enzyme. Oligosaccharide clearance can proceed by either reinserting spliced glucans into external chains of the putative maturing preamylopectin molecule or by facilitating their hydrolytic or phosphorolytic degradation.

## ABREVIATIONS

<b>3-PGA:</b>	Acide 3-phosphoglycérique
<b>ADP-glucose:</b>	Adénosine diphospho-glucose
<b>Am:</b>	Amylose
<b>Ap:</b>	Amylopectine
<b>APTS:</b>	Acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic
<b>BE:</b>	Enzymes de Branchement
<b>D<sub>2</sub>O:</b>	Oxyde deutérium
<b>DMSO:</b>	Diméthyl sulfoxyde
<b>DO:</b>	Densité optique
<b>DP:</b>	Degré de polymérisation
<b>DTT:</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA:</b>	Acide éthylène diamine tétra acétique
<b>Enzyme D:</b>	Enzyme disproportionnante ou $\alpha$ -1,4 glucanotransférase
<b>G-1-P:</b>	Glucose-1-phosphate
<b>GBSS:</b>	Amidon synthétase liée au grain
<b>Gly:</b>	Glycogène
<b>HPAE-PAD:</b>	Chromatographie haute performance d'échange d'anions avec détection ampérométrique pulsée
<b>kD:</b>	KiloDalton
<b>K<sub>m</sub>:</b>	Constante d'affinité de Michaelis-Menton
<b><math>\lambda_{max}</math>:</b>	Longueur d'onde du maximum d'absorption (en nm)
<b>MEB:</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>MET:</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>NADP:</b>	Nicotamide adénosine diphosphate
<b>PGM:</b>	Phosphoglucomutase
<b>Pi:</b>	Phosphate inorganique
<b>PMS:</b>	Phenazine methosulfate
<b>p.s.i:</b>	Livre par pouce carré

<b>P/V:</b>	Poids/Volume
<b>SDS:</b>	Sodium dodécyl sulfate
<b>GBSS:</b>	Amidon-synthétase liée au grain
<b>SDS-PAGE:</b>	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
<b>SS:</b>	Amidon synthétase soluble
<b>Tris:</b>	Tris-(hydrométhyl)-aminométhane
<b>RMN:</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>RX:</b>	Rayons X
<b>U.V.:</b>	Ultra-violet
<b>V<sub>m</sub>:</b>	Vitesse maximale
<b>WSP:</b>	Polysaccharide soluble dans l'eau

# INTRODUCTION

## 1. COMPOSITION ET STRUCTURE D'UN GRAIN D'AMIDON

1.1 Amylose et amylopectine	1
1.2 Les autres constituants	2
1.3 Le granule	2
1.3.1 Les anneaux de croissance	2
1.3.2 La cristallinité	2

## 2. METABOLISME DE L'AMIDON

2.1 Synthèse du précurseur par l'ADP glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27)	4
2.2 Elongation des glucanes	5
2.3 Introduction des points de branchement	6
2.4 L'épissage de la préamylopectine: un intermédiaire de la biosynthèse de l'amidon	7

## 3. LE MODELE DE SYNTHESE DISCONTINUE 10

## 4. LE CATABOLISME DE L'AMIDON

4.1 Les voies amylolytique et phosphorolytique	11
4.1.1 La voie phosphorolytique	12
4.1.2 La voie amylolytique	12
4.1.2.1 Les amylases	12
4.1.2.2 Les $\alpha$ glucosidases (EC 3.2.1.20)	13
4.1.3 La $\alpha$ -1,4-glucane lyase (EC 4.2.2.-)	13
4.1.4 Les transglucosidases	14

## 5. LES $\alpha$ -1,4 GLUCANOTRANSFERASES VEGETALES: LES ENZYME D (EC 2.4.1.25)

5.1 Etablissement de la règle des " liaisons interdites "	15
5.1.1 Conséquences de l'existence des liaisons interdites	17
5.2 Le rôle du glucose et des autres accepteurs	18
5.3 Elucidation du mécanisme de transfert	18
5.4 La théorie des sous-sites	19

<b>6. LES <math>\alpha</math>-1,4 GLUCANOTRANSFERASES BACTERIENNES: AMYLOMALTASES (EC 2.4.1.25)</b>	
6.1 Les autres activités disproportionnantes	23
6.1.1 Les cyclodextrines glucanotransférases (CGTases)	23
6.1.2 Les $\alpha$ amylases et $\alpha$ glucosidases	24
<b>7. LES <math>\alpha</math>-1,4 GLUCANOTRANSFERASES APPARTIENNENT A LA FAMILLE DES AMYLASES</b>	<b>25</b>
<b>8. LES MUTANTS TOUCHES DANS UNE <math>\alpha</math>-1,4 GLUCANOTRANSFERASES</b>	
8.1 Le modèle bactérien	26
8.1.1 Phénotype du mutant malQ	27
8.1.2 Obtention d'un révertant à partir d'une souche malQ	27
8.2 Activité $\alpha$ -1,4 glucanotransférase réduite chez la pomme de terre	28
8.2.1 Phénotype des plantes transgénique de pomme de terre	28
8.2.2 Etude de l'expression de l'enzyme D	28
<b>9. <i>CHLAMYDOMONAS reinhardtii</i> : MODELE D'ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON</b>	
9.1 Présentation	29
9.2 Intêrets du modèle	31
9.3 Le crible phénotypique	32
<b>10. OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>34</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>35</b>

**Article 1 : Caractérisations génétiques et biochimiques suggérant  
l'implication des  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases dans la synthèse de  
l'amylopectine.**

<b>1. Résumé</b>	<b>36</b>
<b>2. Introduction</b>	<b>37</b>
<b>3. Matériels et méthodes</b>	<b>39</b>
3.1 Les souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , la mutagenèse U.V., les conditions de croissances, les observations cytologiques et les milieux.	39
3.2 Les mesures des niveaux d'amidon, la purification de l'amidon et les propriétés du complexe iode-amidon.	40
3.3 Analyses structurales des polysaccharides.	40
3.4 Préparation des extraits bruts, dosage enzymatique, purification partielle des activités, zymogrammes.	42
3.5 Purification des oligosaccharides.	44
3.6 Les expériences de dosage de gène.	45
<b>4. Résultats</b>	<b>46</b>
4.1 Caractérisation du matériel soluble dans l'eau, digestible par l'amyloglucosidase.	47
4.2 Caractérisation de l'amidon résiduel accumulé par les mutants <i>sta11-1</i> .	49
4.3 La découverte de l'étape enzymatique manquante.	52
4.4 Expériences de dosage de gène.	54
4.5 L'expression du phénotype mutant est partiellement conditionnelle	55
<b>5. Discussion.</b>	<b>56</b>

**Article 2 : La caractérisation biochimique de l' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase de *Chlamydomonas reinhardtii* conforte son rôle supposé dans l'édification de la structure de l'amylopectine**

<b>1. Résumé</b>	<b>59</b>
<b>2. Introduction</b>	<b>60</b>
<b>3. Matériels et méthodes</b>	<b>62</b>
3.1 Les souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , les conditions de culture et les milieux.	63
3.2 Analyses structurales des polysaccharides.	63
3.3 Purification enzymatique	64
3.4 Analyses par zymogrammes.	65
3.5 Traitement de l'amylopectine avec l'enzyme.	65
3.6 Expérience d'incorporation des oligosaccharides.	67
<b>4. Résultats</b>	<b>68</b>
4.1 L'activité de l'enzyme D sur les chaînes externes de l'amylopectine.	69
4.2 L'enzyme D favorise l'incorporation des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes du polysaccharide.	72
4.3 La spécificité requise de l'enzyme D pour l'incorporation des oligosaccharides sur les chaînes externes de l'amylopectine.	73
4.4 Amplification par l'enzyme D de la dégradation des malto-oligosaccharides par la phosphorylase	76
<b>5. Discussion.</b>	<b>77</b>

**Article 3 (en préparation) : Deux formes d'activités phosphorylases font preuve de spécificités différentes relativement au catabolisme des malto-oligosaccharides et des polysaccharides**

<b>1. Résumé</b>	<b>79</b>
<b>2. Introduction</b>	<b>80</b>
<b>3. Matériels et méthodes</b>	<b>82</b>
<b>3.1 Les souches de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>, les conditions de croissances.</b>	<b>82</b>
<b>3.2 Préparation des extraits bruts, dosage enzymatique, purification partielle des activités <math>\alpha</math>-glucane phosphorylase.</b>	<b>82</b>
<b>3.3 Suivi de activités phosphorylasiques au cours de la semi-purification.</b>	<b>83</b>
<b>3.4 Analyses par zymogrammes.</b>	<b>83</b>
<b>3.5 Détermination des paramètres cinétiques et inhibition par l'ADP-glucose.</b>	<b>83</b>
<b>4. Résultats</b>	<b>85</b>
<b>4.1 Isolement des deux formes de phosphorylases chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>.</b>	<b>85</b>
<b>4.2 Présence d'activités hydrolytiques dans les pic 1 et 2.</b>	<b>85</b>
<b>4.3 L'activité phosphorylasique du pic 1 représente 90% de l'activité phosphorylasique totale.</b>	<b>86</b>
<b>4.4 Détermination du <math>K_m</math> (Pi) pour les deux formes de phosphorylases.</b>	<b>87</b>
<b>4.5 Détermination des <math>K_m</math> pour le glycogène (gly) des pics 1 et 2.</b>	<b>87</b>
<b>4.6 Détermination des <math>K_m</math> pour le maltoheptaose (DP 7) des pics 1 et 2.</b>	<b>88</b>
<b>4.7 Effet de l'ADP-glucose sur les activités phosphorylasiques.</b>	<b>89</b>
<b>5. Discussion.</b>	<b>91</b>

## Discussion et Perspectives

### Les acquis expérimentaux de la thèse

1. Les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases définissent une classe nouvelle d'enzymes requise pour la synthèse normale de l'amidon. 93
2. L' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase de *Chlamydomonas reinhardtii* fonctionne selon trois modes distincts. 94

### Interprétation des résultats expérimentaux

1. L'enzyme D catalyse *in vivo* le transfert des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes de la préamylopectine, en cours de synthèse. 95
2. L'enzyme D catalyse *in vivo* exclusivement le transfert des malto-oligosaccharides entre eux. 96
3. Les 3 modes de fonctionnement de l'enzyme D décrits *in vitro* sont actifs *in vivo*. 98

### Spéculations concernant l'enzyme D et le catabolisme de l'amidon.

### Perspectives

1. Caractérisation du locus STA11. 100
2. Les fonctions physiologiques de l'enzyme D. 101
3. La fonction de l'enzyme D dans le catabolisme de l'amidon. 103

### BIBLIOGRAPHIE

104

## **Introduction**

# INTRODUCTION

L'amidon représente le principal polymère de réserve du règne végétal. Il est synthétisé sous forme de grains insolubles dans les plastes des végétaux. On distingue deux types d'amidon : " l'amidon transitoire " produit, au cours de la photosynthèse, dans les chloroplastes des feuilles et " l'amidon de réserve " qui s'accumule dans les amyloplastes des organes de réserve (graines, tubercules...)

## 1. COMPOSITION ET STRUCTURE D'UN GRAIN D'AMIDON

L'amidon est un homopolymère constitué de résidus d' $\alpha$ -D-glucose (98 à 99%) liés en  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6. Ce dernier type de liaison est couramment dénommé " point de branchement " ou encore " point de ramification ". Il est composé de deux macromolécules : l'amylose et l'amylopectine. L'amidon granulaire contient également un certain nombre de constituants mineurs (lipides, protéines, minéraux) dont la localisation au niveau du grain et la teneur varient selon l'origine botanique. Leurs rôles ne sont pas clairement définis mais ils peuvent se révéler importants pour la détermination des propriétés physico-chimiques de l'amidon.

### 1.1 Amylose et amylopectine

- **L'amylose**, considéré comme une molécule linéaire faiblement branchée (moins de 1% de points de branchement), constitue 20 à 30% du poids du grain d'amidon. Les chaînes en nombre limité (3 à 20) sont formées en moyenne de 500 à 6000 unités de glucose. Le degré de polymérisation (DP) dépend de l'origine végétale. Il est en moyenne de 940 pour le maïs, 1850 pour l'orge et 3200 pour la pomme de terre (Blanshard, 1987)

- **L'amylopectine** est le composant majoritaire puisqu'elle représente 70 à 80% du poids du grain. Contrairement à l'amylose, l'amylopectine possède un taux de branchement qui atteint 5 à 6%. Les chaînes constituant l'amylopectine sont en moyenne plus courtes que celles de l'amylose (15 à 60 résidus de glucose) et varient selon l'espèce végétale. Le degré de polymérisation de l'amylopectine est compris entre  $10^7$  et  $10^8$ .

## 1.2 Les autres constituants

- **Les lipides** représentent, comparativement aux autres constituants, la fraction la plus importante associée au grain (0,6 à 1,2%). Ils se répartissent en deux groupes : les lipides internes constitués principalement d'acides gras libres (C18 saturé ou insaturé) et les lipides de surface formés de triglycérides (Morrison, 1988).

- **Les protéines** sont divisées en deux groupes selon leur localisation au niveau du grain : les protéines adsorbées à la surface (puroindolines) de manière non-spécifique et les protéines emprisonnées ou liées spécifiquement au grain. Ce dernier type de protéines regroupe principalement celles impliquées dans la biosynthèse de l'amidon (Rahman et coll., 1995).

- **Le phosphore** est surtout présent sous la forme de phospholipides mais aussi sous forme d'esters de phosphate en position C6 et C3 d'un résidu glucosyle. L'amidon de pomme de terre appartient à la classe des amidons les plus phosphorylés. Le contenu en phosphate représente 0,089% du poids du grain. Récemment, le clonage de l'ADNc codant pour une protéine associée au grain (la protéine R1) de la pomme de terre et l'étude de sa fonction biologique ont montré qu'elle déterminait le contenu en phosphate de l'amidon (Lorberth et coll., 1998).

## 1.3 Le granule

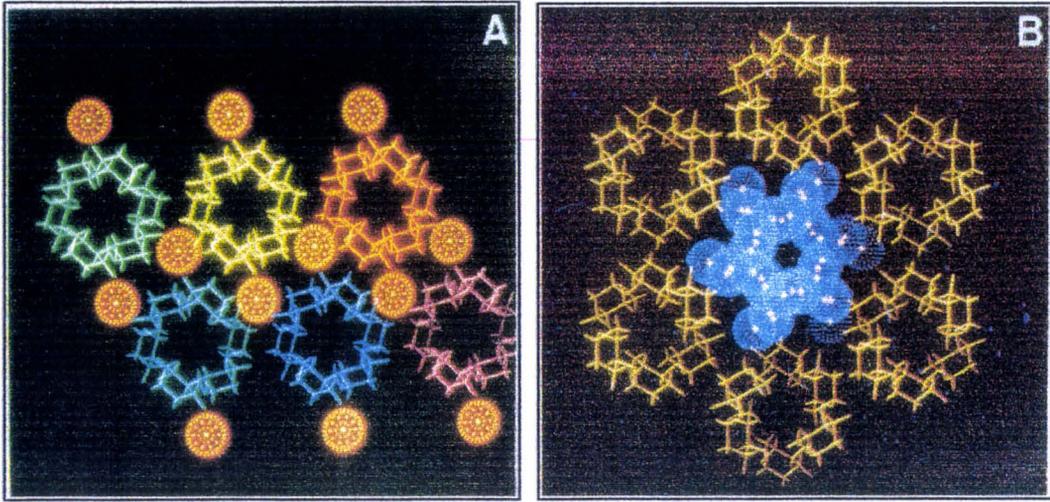
### 1.3.1 Les anneaux de croissance

Les grains d'amidon de plantes supérieures lorsqu'ils sont soumis à une dégradation ménagée par l'acide, présentent un motif répété à symétrie radiale appelé anneau de croissance qui témoigne d'une différence de résistance à la dégradation et donc d'une organisation particulière (Buléon et coll., 1998). Nous savons aujourd'hui, que l'apparition de ces anneaux résulte d'une alternance de zones cristallines et amorphes dont la taille et le nombre peuvent varier en fonction des conditions de culture.

### 1.3.2 La cristallinité

Le taux de cristallinité des grains d'amidon natifs varie de 15 à 45%. L'étude de mutants déficients pour la biosynthèse d'amylose révèle que seule l'amylopectine est responsable de la cristallinité du grain. Selon les diagrammes générés par diffraction des rayons X, les amidons affichent deux types de cristallinité :

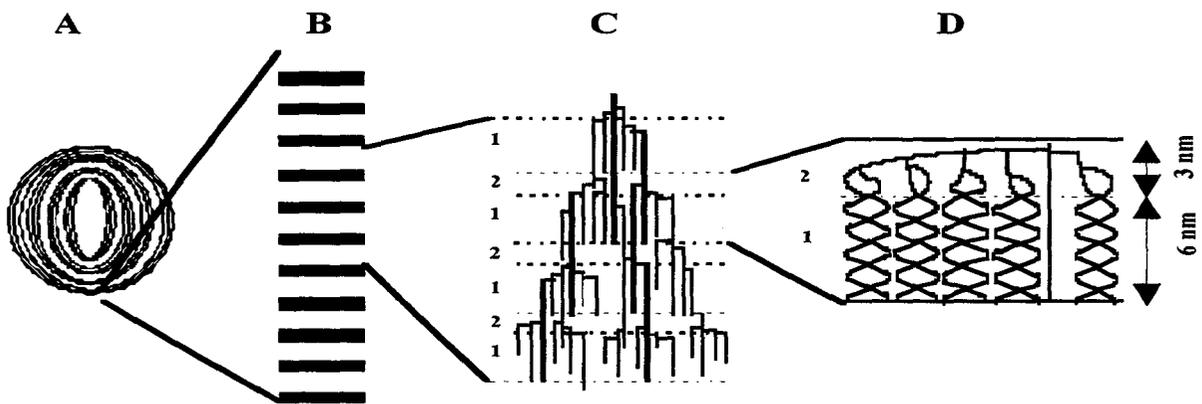
- Le type A est caractéristique des amidons de céréales.
- Le type B est caractéristique des amidons de tubercules et de céréales riches en amylose.



**Figure 2: Représentations tridimensionnelles des mailles cristallines des amylopectines de type A et B.** Les figures A et B proposent une coupe transversale des chaînes d'amylopectine de type A (A) et B (B). Les sphères oranges et bleues symbolisent les molécules d'eau (Buléon et al., 1998).

Un troisième type de cristallinité, le type C, est retrouvé dans les graines et tubercules d'origine tropicale ainsi que dans la plupart des amidons de légumineuses. Il s'agit d'un intermédiaire de cristallinité qui correspond soit à un mélange de cristallites de type A et B au sein d'une même structure granulaire, soit d'un mélange de grains de types A et B.

La modélisation moléculaire montre que la structure des chaînes de l'amylopectine s'organise en doubles hélices que le cristal soit de type A ou B (Fig. 1). La différence entre les polymorphes résiderait dans l'empilement des doubles hélices et du nombre de molécules d'eau enchâssées entre ces hélices (Fig. 2).



**Figure 1 : Agrandissements successifs d'une région d'un grain d'amidon représenté en tranche (A).** La projection en B reproduit l'agrandissement d'une région semi-cristalline. Les lamelles amorphes y sont figurées en noir et les lamelles cristallines en blanc. La partie C, succession de 7 lamelles amorphes et cristallines, représente une structure simplifiée de l'amylopectine (Hizukuri, 1986). Enfin, la zone D donne une idée de la structure secondaire d'une grappe de l'amylopectine.

## 2. METABOLISME DE L'AMIDON

L'étude de la biosynthèse de l'amidon a longtemps été délaissée en raison de la simplicité apparente de sa composition chimique (99% de glucose). Cette situation a évolué lorsque les biologistes ont observé que même de composition chimique simple, ce polysaccharide se relève d'une structure extrêmement complexe (Fig. 1). Paradoxalement, même si la plupart des activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme sont parfaitement connues, leurs modes d'action précis restent pour une large part à découvrir (Fig. 3). D'autre part, la multiplication des isoformes ne facilite pas le travail d'investigation et l'établissement des règles régissant le métabolisme du polysaccharide de réserve. Néanmoins, l'isolement de nouveaux mutants et le développement de la technologie des ARN antisens

chez les végétaux supérieurs se sont révélés très utiles pour la compréhension des mécanismes de biosynthèse au cours de la dernière décennie.

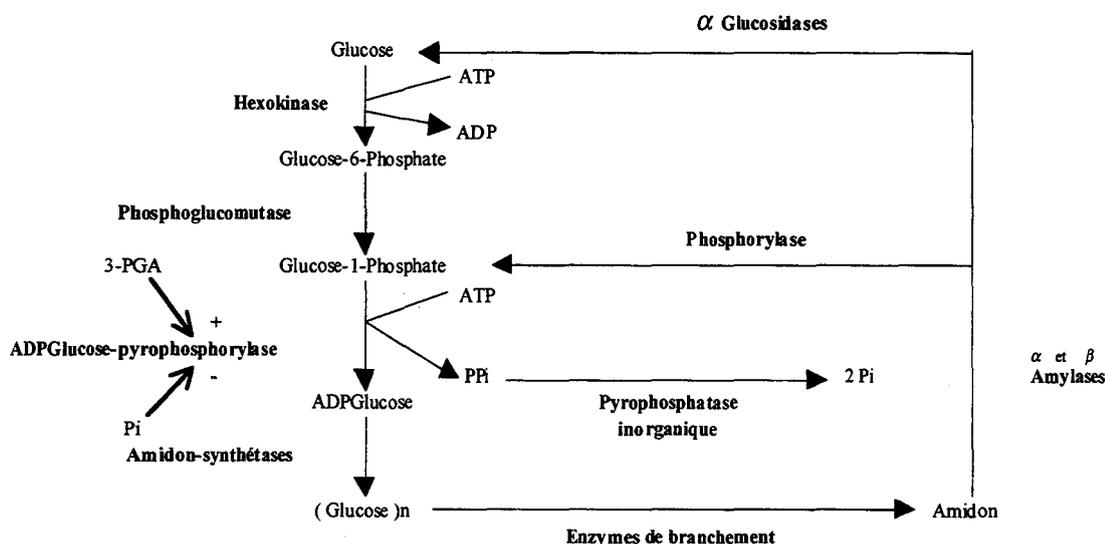


Figure 3 : schéma général de la biosynthèse de l'amidon chez les végétaux. Le nucléotide-sucré précurseur (ADP-glucose) est synthétisé par l'ADP-glucose pyrophosphorylase. Cette enzyme est régulée de manière allostérique par l'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA) et le phosphate inorganique (Pi). L'ADP-glucose formé est pris en charge par les amidon-synthétases qui catalysent le transfert du résidu de glucose sur l'extrémité non-réductrice d'une chaîne de glucoses liés en  $\alpha$ -1,4. Les enzymes de branchement, quant à elles, clivent et transfèrent une chaîne de glucose préexistante en position  $\alpha$ -1,6 (point de branchement). L'amidon est dégradé par les enzymes hydrolytiques telles les  $\alpha$ -amylases, les  $\beta$ -amylases et les  $\alpha$ -glucosidase en glucose ou en glucose-1-phosphate par les phosphorylases.

## 2.1 Synthèse du précurseur par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27)

L'ADP-glucose pyrophosphorylase synthétise l'unique nucléotide sucre nécessaire à la synthèse de l'amidon : l'ADP-glucose. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, comme chez les végétaux supérieurs, cette enzyme se présente sous la forme d'un hétérotétramère. Elle est en effet constituée de deux grandes et deux petites sous unités.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase représente l'enzyme clé de la régulation du métabolisme de l'amidon. Tous les mutants ou cultivars transgéniques déficients pour l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase (Lin et coll., 1988 ; Smith et coll., 1989 ; Ball et coll., 1991 ; Müller-Röber et coll., 1992 ; van den Koornhuysse et coll, 1996) montrent une chute sévère (voire une disparition totale) de la quantité d'amidon accumulée. A l'inverse l'expression d'une forme dérégulée de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chez certains cultivars transgénique conduit à l'accumulation de quantités accrues d'amidon dans les cellules (Stark et coll., 1992).

L'ADP-glucose pyrophosphorylase est soumise à une régulation très fine. Il s'avère que chez tous les végétaux, celle-ci est formée de deux homodimères : deux grandes sous-unités qui constituent la partie régulatrice et deux petites sous-unité qui portent l'activité catalytique. Deux métabolites régulent

cette enzyme de manière allostérique : il s'agit de l'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA) et du phosphate inorganique (Pi) qui représentent respectivement l'activateur et l'inhibiteur allostériques majeurs. Leur concentration étant liée à l'activité photosynthétique, c'est le rapport 3-PGA / Pi qui va favoriser ou non la synthèse de l'amidon. (Ghosh et Preiss 1966 ; Ball et coll., 1991).

Plus récemment, un autre type de régulation post traductionnelle a été décrit pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase des tissus chlorophylliens de la pomme de terre. En effet, la régulation par les thiorédoxines rendrait l'enzyme encore plus affine pour son activateur allostérique, le 3-PGA (Fu et coll., 1998).

## 2.2 Elongation des glucanes

La deuxième étape de la biosynthèse de l'amidon concerne l'élongation des glucanes. L'ADP-glucose précédemment synthétisé est pris en charge par les amidon-synthétases (EC 2.4.1.21) qui catalysent le transfert du résidu de glucose sur l'extrémité non-réductrice d'une chaîne glucanique préexistante par l'intermédiaire d'une liaison  $\alpha$ -1,4. Il existe deux grandes classes d'amidon-synthétases : les amidon-synthétases solubles (SS) et les amidon-synthétases liées au grain (GBSS).

### ● Les amidon-synthétases solubles.

Le nombre d'isoformes détectées est variable selon l'organisme étudié. Chez *C. reinhardtii* (Fontaine et coll., 1993 ; Buléon et coll., 1997) et le pois (Denyer et Smith, 1992) deux formes solubles d'amidon-synthétases sont détectées alors qu'au moins trois formes différentes sont présentes chez le maïs (Gao et coll., 1998) et la pomme de terre (Marshall et coll., 1996 ; Abel et coll., 1996). La contribution de chaque isoforme dans l'élaboration de la structure de l'amylopectine reste très difficile à apprécier. Seule l'étude approfondie de mutants ou de plantes transgéniques totalement dépourvus de l'une de ces isoformes permet de mieux saisir leurs mécanismes d'action respectifs. Par exemple, la caractérisation d'une souche mutante au locus *STA3* chez *C. reinhardtii* a permis de mettre en évidence une corrélation entre la disparition de l'activité amidon-synthétase III (SSIII) et une modification structurale de l'amidon accompagnée d'une réduction de la quantité d'amidon de 80%. Son phénotype, proche des phénotypes du mutant *dull* du maïs (Boyer et Preiss, 1981 ; Gao et coll., 1998) et du mutant *rug5* du pois (Craig et coll., 1998), se traduit par une diminution importante du nombre de chaînes intermédiaires de l'amylopectine (8 à 40 résidus de glucose) associée à une forte augmentation du nombre de courtes (DP < 8) et de longues chaînes (DP > 40).

Plus récemment, Edwards et coll. (1999) ainsi que Lloyd et coll. (1999) se sont attachés à réduire conjointement les activités des SSII et SSIII du tubercule de pomme de terre par la technologie des ARN antisens. Ces auteurs ont montré une corrélation entre l'absence des deux SS et une modification importante de la distribution des longueurs de chaînes de l'amylopectine accumulée par les cultivars transgéniques. Dans ce cas, la modification structurale de l'amylopectine s'apparente à celles que l'on trouve chez les mutants *sta3* et *rug5* précédemment cités.

### ● Les amidon-synthétases liées au grain

Deux amidon-synthétases sont liées au grain d'amidon chez les plantes supérieures : la GBSSI et la GBSSII. Cependant, seule la GBSSI apparaît liée spécifiquement au polysaccharide de réserve. Elle représente plus de 90% des protéines associées au grain. La liaison de la GBSSII au grain ne semble pas spécifique mais doit être le résultat du piégeage de cette enzyme dans le grain lors de sa croissance. Dans tous les cas, la GBSSII n'est active qu'en phase soluble et correspond à la SSII des plantes supérieures.

La caractérisation de plusieurs mutants montre que la GBSSI est l'unique responsable de la synthèse de l'amylose (Tsai, 1974 ; Hovenkamp-Hermelink et coll., 1987 ; Delrue et coll., 1992 ; Denyer et coll., 1995).

De nombreuses études se focalisant sur la synthèse *in vitro* de l'amylose ont permis d'établir que la GBSSI incorpore des résidus glucose à la fois sur l'amylopectine et l'amylose (Leloir et coll., 1961). En 1994, Maddelein et coll. montraient que la GBSSI chez *C. reinhardtii*, participait à l'élongation d'une certaine population de chaînes de l'amylopectine. Plus récemment, toujours chez *C. reinhardtii*, des expériences de chasse sont venues confirmer ces observations (van de Wal et coll., 1998). Cette étude réalisée *in vitro* par incubation de grains d'amidon natifs en présence d'ADP-glucose froid et marqué au  $^{14}\text{C}$ , montrent qu'il existe un transfert de radioactivité de l'amylopectine vers la fraction amylosique au cours du temps.

## 2.3 Introduction des points de branchement

Les enzymes de branchement ou BE (EC 2.4.1.21) sont classées parmi les transférases puisqu'elles hydrolysent une liaison  $\alpha$ -1,4 et transfèrent le groupe maltodextrinyle en position  $\alpha$ -1,6.

Dans la plupart des plantes analysées, on distingue deux familles d'enzymes de branchement : les familles A et B. La distinction entre ces isoformes a été établie sur plusieurs critères :

- la longueur du glucane transféré ;
- la nature du polysaccharide utilisé comme substrat
- le taux d'activation par l'orthophosphate (pour revue voir Buléon et coll., 1998).

La famille A regroupe les BE IIa et BE IIb du maïs, la BE I du pois et la BE III du riz. La famille B quant à elle comprend la BE II de la pomme de terre, la BE I de maïs, la BE II de pois, et la BE I du riz.

La première description d'un mutant dépourvu d'une activité de branchement remonte au XIX<sup>e</sup> siècle. Elle fut décrite chez le pois par Mendel sous le nom de mutant *rugueux (rugosus)*. Mendel ne connaissait toutefois pas les bases de la défektivité chez ce mutant ! C'est seulement un siècle plus tard, que Bhattacharya et coll. (1990) montrèrent que le locus *R* constitue le gène de structure de la BE II dans le mutant *rugosus*. Cette mutation s'accompagne principalement d'un enrichissement de l'amidon en amylose résultat probable d'un réarrangement de la distribution des chaînes de l'amylopectine. Un mutant du maïs présentant un phénotype analogue, le mutant *amylose extender (ae)*, a été caractérisé ensuite par Stinard et coll. (1993). Dans ce cas, c'est encore l'absence de la BE II qui induit l'accumulation d'un amidon enrichi en amylose.

L'expression des enzymes de branchement du maïs dans une souche mutante d'*E. coli* dépourvue de son activité de branchement endogène ne permet cependant pas la synthèse d'un polysaccharide présentant des propriétés physico-chimiques comparables à celles de l'amylopectine (Guan et coll., 1997). Malgré une distribution en longueur de chaînes comparable entre le polysaccharide synthétisé et l'amylopectine, la présence de fonctions complémentaires apparaît indispensable à l'élaboration d'une organisation structurale correcte de cette dernière.

## **2.4 L'épissage de la préamylopectine : un intermédiaire de la biosynthèse de l'amidon**

Deux types d'enzyme de débranchement (DBE) ont été identifiées chez les plantes : les pullulanases (EC 3.2.1.41) appelées aussi "enzymes R" ou "limite dextrinases" et les isoamylases (EC 3.2.1.68). Ces deux types d'enzyme hydrolysent spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -1,6, cependant on

les distingue selon la nature du substrat polysaccharidique préférentiellement utilisés par chacune d'elle.

Les pullulanases végétales hydrolysent à la fois le pullulan (un polymère de résidus maltotriosyles branchés en  $\alpha$ -1,6) et les  $\alpha$ -limite dextrines (produits finaux d'hydrolyse de l'amidon par l' $\alpha$ -amylase). Elles sont par contre nettement moins efficaces sur l'amylopectine ou le glycogène contrairement aux isoamylases qui utilisent préférentiellement ces deux types de substrat.

Les mutants affectés pour une DBE tels que les mutants *sugary1 (sul)* du maïs (Pan et Nelson, 1984) et du riz (Nakamura et coll., 1996) exhibent une activité de débranchement de type pullulanase réduite et accumulent un polysaccharide soluble très branché, dénommé phytoglycogène, dont la structure s'apparente à celle du glycogène.

Cependant, le clonage moléculaire et le séquençage du gène *sul* du maïs révèle que le produit SU1 s'avère fortement similaire aux isoamylases bactériennes (James et coll., 1995). De plus, la caractérisation enzymologique de la protéine SU1 avec des substrats variés, confirme son appartenance à la classe des isoamylases (Rahman et coll., 1998).

Bien que ces résultats soient contradictoires, une étude plus approfondie des activités de débranchement chez le mutant *sul* du maïs révèle que l'effondrement de l'activité de débranchement de type pullulanase est étroitement lié à la disparition de l'activité de type isoamylasique (Rahman et coll., 1998).

Récemment, l'identification du gène *zpu1* codant une des isoformes de pullulanase du maïs prouve bien que celles ci ne sont pas codées par le gène *sul* (Beatty et coll., 1999). Les auteurs n'indiquent cependant pas si le gène *zpu1* est l'unique responsable de la présence des trois isoformes d'activité pullulanase observées par Pan et Nelson (1984). La diminution de l'activité DBE de type pullulanase dans les mutants *sul* peut donc s'expliquer par un effet pléiotropique de la mutation dont on ne connaît pas pour l'instant les bases biochimiques et/ou génétiques.

La présence très précoce d'isoamylase et de pullulanase plastidiales au cours du développement de l'albumen suggère que ces enzymes jouent un rôle dans l'anabolisme du grain d'amidon. Ces deux activités ont été localisées et identifiées dans les albumens en cours de développement de différents organismes tels que le maïs (Doehlert et Knutson, 1991), le pois (Zhu et coll., 1998) et l'orge (Burton et coll., 1999).

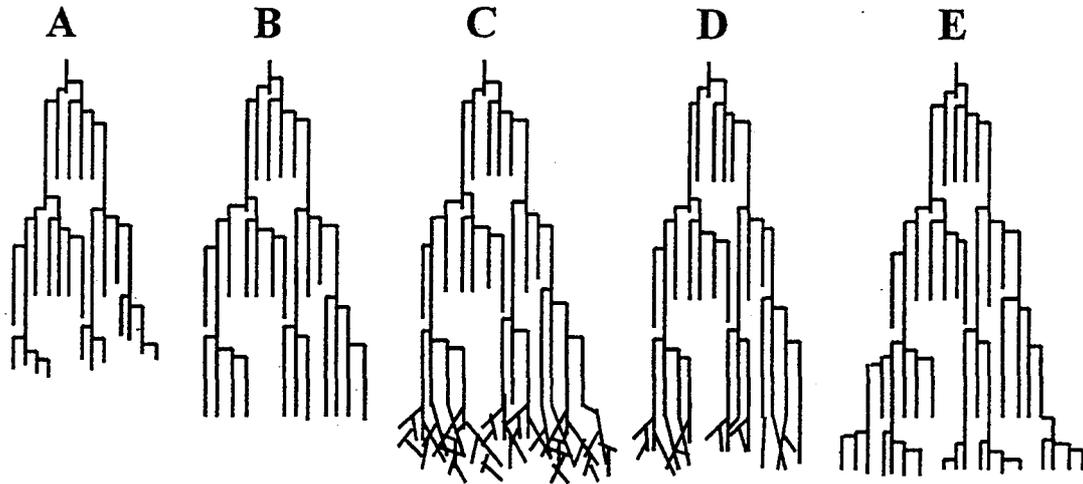
L'importance du rôle des DBE dans la biosynthèse de l'amidon s'est vue confirmée par l'étude du mutant au locus *STA7* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce mutant accumule du phytoglycogène (environ 1µg/10<sup>6</sup> cellules) et affiche une défectuosité pour une DBE (Mouille et coll., 1996).

Ainsi le mutant *sta7* accumule moins de 1% de la quantité d'amidon par rapport à une souche sauvage et synthétise un polysaccharide soluble dans l'eau de type phytoglycogène totalement indétectable dans une souche sauvage. Ce phénotype a été relié à la disparition d'une activité de débranchement catalysée par une protéine de 88 kD. Bien que le gène ne soit pas encore cloné, il a été récemment montré que cette enzyme de 88 kD possédait une activité de type isoamylase incapable de cliver le pullulan (David Dauvillée et coll., soumis à publication, voir annexe I). Un autre mutant, affecté au locus *STA8*, présente un phénotype moins sévère. En effet, même si ce mutant accumule aussi du phytoglycogène, il synthétise 20% de la quantité d'amidon par rapport à une souche sauvage. Des études biochimiques préliminaires montrent qu'un complexe protéique de haut poids moléculaire impliquant l'isoamylase est totalement déstabilisé dans les souches *sta8*. Même fortement affectée par la déstabilisation du complexe protéique, l'activité résiduelle de l'isoamylase serait suffisante pour expliquer l'accumulation conjointe d'amidon et de phytoglycogène dans les souches mutantes au locus *STA8*.

La sévérité du phénotype affiché par le mutant *sta7* indique que le débranchement d'un intermédiaire de la synthèse de l'amylopectine (la préamylopectine) pourrait être nécessaire afin d'obtenir une accumulation correcte d'amidon dans la cellule. Sur la base de ces résultats, un schéma probable expliquant le mode de synthèse de l'amylopectine a été proposé par plusieurs auteurs (Ball et coll., 1996). Dans le chapitre suivant nous tenterons d'expliquer ce modèle ainsi que les critiques qui lui ont été opposées.

### 3. LE MODELE DE SYNTHESE DISCONTINUE

Le modèle de synthèse discontinue proposé par Ball et coll. (1996) explique comment la distribution asymétrique des points de branchement de l'amylopectine peut être obtenue chez les végétaux (Fig. 4).



**Figure 4 : Modèle à deux dimensions de la biosynthèse de l'amidon se produisant à la surface du grain.** L'élongation démarre à la base de la lamelle amorphe (A) et passe par la forme (B) jusqu'à une longueur critique permettant aux enzymes de branchement d'agir. Les activités de branchement conduisent à une structure intermédiaire hyperbranchée (C). L'activité de débranchement entre simultanément en jeu pour éliminer certains points de branchement et donner la structure (D). C'est cette activité qui prévient la synthèse du phytyglycogène et épargnera les points de branchement trop proches qui généreront ensuite la prochaine lamelle amorphe.

La lamelle amorphe synthétisée antérieurement contient des points de branchement très rapprochés (Fig. 4A). Les amidon-synthétases allongent ces amorces (Fig. 4B). Aucun branchement ne se produit au cours de cette première étape. Ce fait peut se comprendre si l'on considère que les enzymes de branchement n'agissent que sur des glucanes dont la taille est suffisamment longue pour servir de substrat à l'enzyme. Cette caractéristique des enzymes de branchement a été mise en lumière par les travaux de Guan et Preiss (1993) et de Takeda et coll. (1993). Dès que la longueur critique est atteinte, le branchement et l'allongement des glucanes se produisent simultanément et de manière désordonnée (Fig. 4C). Les enzymes de débranchement épissent alors les points de ramification trop espacés favorisant ainsi l'apparition de la prochaine lamelle amorphe (Fig. 4D).

Le modèle proposé explique d'une part la distribution asymétrique des points de branchement et d'autre part le rôle des enzymes de branchement dans la détermination de la taille des lamelles cristallines. La contribution des enzymes de débranchement apparaît donc extrêmement importante au

cours du processus de synthèse de l'amylopectine. L'absence de cette activité conduit à l'accumulation d'une structure de type phytoglycogène.

Cependant, une autre théorie est avancée par Zeeman et coll. (1998) pour expliquer l'apparition de phytoglycogène chez certaines plantes mutantes. Cette théorie fait suite à la découverte de deux souches d'*Arabidopsis thaliana* mutées au locus *DBE1*. Le gène *DBE1* code une activité de débranchement de type " isoamylase ". Ces mutants produisent moins de 10% de la quantité d'amidon par rapport au sauvage et accumulent massivement un polysaccharide soluble dans l'eau de type phytoglycogène. Les auteurs proposent que l'isoamylase travaille de concert avec d'autres enzymes de dégradation afin de prévenir l'accumulation du phytoglycogène dans les souches sauvages. Dans ce modèle, l'isoamylase clive les malto-oligosaccharides branchés afin qu'ils puissent être métabolisés par les autres enzymes de dégradation (voir le chapitre concernant le catabolisme de l'amidon). En absence d'isoamylase, l'action conjuguée des amidon-synthétases et des enzymes de branchement sur ces malto-oligosaccharides conduit à la formation du phytoglycogène. Par ailleurs, les auteurs expliquent l'effondrement de la synthèse d'amidon suite à un effet compétitif avec la synthèse du phytoglycogène.

## **4. LE CATABOLISME DE L'AMIDON**

### **4.1 Les voies amylolytique et phosphorolytique**

Généralement, toutes les enzymes catalysant le transfert d'un résidu glucose donneur vers un accepteur qui peut être une molécule d'eau (glucanohydrolases) ou un phosphate inorganique (phosphorylases) sont considérées comme des enzymes de dégradation. Deux voies de dégradation sont principalement décrites dans la littérature. La voie amylolytique fait intervenir des  $\alpha$ -amylases, des  $\beta$ -amylases et des  $\alpha$ -glucosidases qui conduisent à la libération de glucose, de maltose ou encore de malto-oligosaccharides. La voie phosphorolytique, quant à elle, permet la production de glucose-1-phosphate (G-1-P) via l'action des phosphorylases (sens physiologique). *In vitro*, les phosphorylases catalysent aussi la réaction inverse. Un résidu de glucose est transféré à partir du G-1-P sur l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucanes liés en  $\alpha$ -1,4.

Une autre voie de dégradation, " la voie de l'anhydrofructose ", a été décrite chez certaines algues rouges. Elle se distingue des deux autres décrites précédemment par la production d'anhydro-1,5-D-fructose.

## 4.1.1 La voie phosphorolytique

Les phosphorylases ou  $\alpha$ -glucane phosphorylases (EC 2.4.1.1) végétales se distinguent des phosphorylases animales par l'absence de régulation allostérique. Deux formes de phosphorylases sont décrites chez la plupart des végétaux. Il s'agit des types I et II. Ces deux formes se distinguent selon leur  $K_m$  pour les glucanes ramifiés et les dextrines mais aussi selon leur localisation intracellulaire. La phosphorylase II se situe dans le chloroplaste. Elle n'est active que sur les dextrines linéaires d'un DP supérieur à 5 résidus de glucose. La phosphorylase I, localisée dans le cytoplasme, est pour sa part plus affine pour les polymères branchés (pour revue Steup, 1990).

## 4.1.2 La voie amylolytique

### 4.1.2.1 Les amylases

Les amylases se répartissent en deux classes selon leur mode d'action : les endo-amylases et les exo-amylases.

- les **endo-amylases**, telles que les  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1), sont capables de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,4 de manière aléatoire dans une molécule d'amylopectine solubilisée.
- les **exo-amylases**, telles que les  $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2), hydrolysent quant à elles de manière récurrente le même type de liaison à partir d'une extrémité non-réductrice.

#### -Mode d'action des endo-amylases :

Deux mécanismes d'attaque de l'amylose en solution par l' $\alpha$ -amylase ont été proposés (Mac Gregor et coll., 1985 ; pour revue Leloup et coll., 1991). Il s'agit des mécanismes dits d'attaque multiple et d'attaque préférentielle.

Au cours d'une attaque multiple, la rencontre de l'enzyme avec son substrat se fait au hasard et toutes les liaisons sont susceptibles d'être hydrolysées. Après hydrolyse, un des deux produits de la réaction est relâché, alors que l'autre est retenu au sein de l'enzyme. Celui-ci glisse le long du site actif pour y subir une nouvelle hydrolyse. C'est après plusieurs répétitions de ce processus, que le site catalytique de l'enzyme est définitivement libéré par les produits de la réaction.

L'attaque préférentielle se distingue de la précédente puisqu'elle ne conduit qu'à une hydrolyse unique. Les deux produits de la réaction sont relâchés après l'événement catalytique. Dans ce cas la susceptibilité des liaisons à l'hydrolyse enzymatique est variable. En général, les extrémités du glucane

sont plus résistantes. L'attaque préférentielle concerne principalement les malto-oligosaccharides utilisés comme substrats par l'endo-amylase.

Les  $\alpha$ -amylases sont présentes dans la plupart des organismes vivants. D'une manière générale, leurs rôles semblent se cantonner à la dégradation de l'amidon (Zeeman et coll., 1998).

#### -Mode d'action des exo-amylases:

L'action des  $\beta$ -amylases depuis l'extrémité non-réductrice d'un polymère de glucose provoque la libération de maltose. C'est le mécanisme d'attaque multiple présenté ci-dessus qui est utilisé par les  $\beta$ -amylases. L'action de l'enzyme étant bloquée par la présence des liaisons  $\alpha$ -1,6, la dégradation de l'amylopectine par celle-ci conduit à la production d'une  $\beta$ -dextrine limite de haut poids moléculaire.

#### **4.1.2.2 Les $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20)**

On classe les  $\alpha$ -glucosidases selon leur optimum de pH. Il en existe deux classes : les  $\alpha$ -glucosidases acides et les  $\alpha$ -glucosidases basiques. Dans les deux cas, il n'existe pas de spécificité de coupure. En effet, elles sont capables d'hydrolyser avec la même efficacité les liaisons  $\alpha$ -1,4 (de type maltose) et les liaisons  $\alpha$ -1,3 (de type nigérose). Cependant, c'est avec une moindre efficacité que les  $\alpha$ -glucosidases hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,1 (de type tréhalose), les liaisons  $\alpha$ -1,2 (de type kojibiose) et les liaisons  $\alpha$ -1,6 (de type isomaltose).

Leur rôle dans la dégradation de l'amidon reste à élucider. Certains auteurs suggèrent que ces enzymes interviennent en synergie avec les  $\alpha$ -amylases pour dégrader les grains d'amidon natifs (Sun et Henson, 1990; Sun et coll., 1995)

#### **4.1.3 L' $\alpha$ -1,4-glucane lyase (EC 4.2.2.13)**

Cette activité libère de l'anhydro-1,5-D-fructose à partir de l'extrémité non réductrice d'un glucane. Sa localisation chloroplastique chez l'algue rouge *Gracilariopsis lemaneiformis* suggère qu'il puisse exister d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon chez les végétaux supérieurs (Yu et Pedersen, 1993, Yu et coll., 1993, 1995).

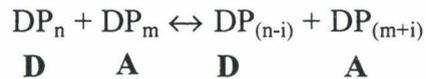
#### 4.1.4 Les transglucosidases

Avant 1950, deux transglucosidases avaient déjà été caractérisées : la phosphorylase et l'amylosucrase. Ces enzymes utilisent respectivement le G-1-P et le saccharose comme substrat pour donner un polymère de type amylose.

Un troisième type d'activité fut mis en évidence par Jacques Monod au cours de ses recherches sur l'adaptation enzymatique chez *Escherichia coli*. Cette nouvelle activité, appelée amyломaltase, se différencie des deux autres par la nature du substrat utilisé : le **maltose** (Monod et Torriani, 1950 ; Wiesmeyer et Cohn, 1960).

Cette activité fut décrite pour la première fois chez la pomme de terre, sous le terme d'enzyme disproportionnante ou enzyme D (Peat et coll., 1953 ; Takaha et coll., 1993). Elle fut ensuite trouvée chez d'autres organismes tels que la tomate et la carotte (Manners et Rowe, 1969), l'épinard (Linden et coll., 1974), *Arabidopsis thaliana* (Lin et Preiss, 1988), le pois (Kakefuda et Duke, 1989) ou encore la patate douce (Suganuma et coll., 1991).

Plus généralement dénommées  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases, elles catalysent le transfert d'un groupe maltodextrinyle provenant d'un donneur sur l'extrémité non-réductrice d'un accepteur comme illustré dans l'exemple ci-dessous.



$DP_n$  : maltodextrine avec n résidus de glucose liés en  $\alpha$ -1,4

$DP_m$  : maltodextrine avec m résidus glucose liés en  $\alpha$ -1,4

i : groupe maltodextrinyle transféré avec  $i \geq 2$ .

**D** : Donneur

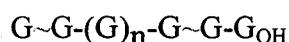
**A** : Accepteur

Les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases produisent des maltodextrines plus petites et plus longues que la maltodextrine initiale sans augmentation du nombre d'extrémités réductrices. Le pouvoir réducteur est donc théoriquement constant au cours de la réaction.

## 5. LES $\alpha$ -1,4 GLUCANOTRANSFERASES VEGETALES : LES ENZYMES D (EC 2.4.1.25)

La première caractérisation enzymatique d'une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase végétale fut réalisée à partir d'un extrait semi-purifié de pomme de terre (Peat et coll., 1956). Peat et coll. ont tiré quelques conclusions qui se sont révélées par la suite généralisables aux autres activités disproportionnantes d'origines végétales. Ces conclusions sont les suivantes :

- Le glucose sert uniquement d'accepteur.
- Le maltose n'est pas un donneur et représente un très mauvais accepteur.
- La première liaison de l'extrémité non-réductrice et l'avant dernière liaison du côté réducteur ne peuvent pas être coupées par l'enzyme D. Ces liaisons sont appelées " liaisons interdites " selon le schéma suivant :



G : résidu de glucose

~ : " liaisons interdites "

- : liaison  $\alpha$ -1,4

G<sub>OH</sub> : résidu de glucose en position réductrice

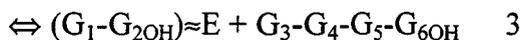
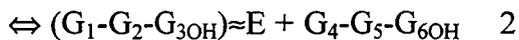
### 5.1 Etablissement de la règle des " liaisons interdites "

Bien que la notion de " liaisons interdites " fut introduite la première fois par Jones et Whelan en 1969, les travaux de Peat et coll (1956) laissaient déjà présager ce concept. En effet, ces auteurs notèrent que :

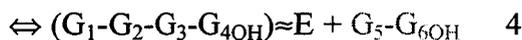
1-L'incubation de l'enzyme avec du maltose pur ne conduit pas à la production de glucose et de maltodextrines disproportionnées. En effet, le résidu de glucose de l'extrémité non-réductrice ne forme pas de complexe intermédiaire avec l'enzyme. La dernière liaison  $\alpha$ -1,4 ne peut donc pas être coupée quel que soit le type de maltodextrine utilisé.

2-Le maltose n'est pas produit au cours de la réaction de transfert. L'exemple ci-dessous représente les groupes maltodextrinyles susceptibles d'être transférés par l'enzyme D à partir de maltohexaose comme unique substrat (réactions 1, 2, 3, 4, 5). L'enzyme D clive une liaison  $\alpha$ -1,4, libère un malto-

oligosaccharide et forme un complexe transitoire avec le groupe maltodextrinyle retenu au sein du site catalytique schématisé par  $(G-(G)_n-G_{OH})\approx E$ .



**Ces produits ne se forment pas :**



G : résidu de glucose

- : liaison  $\alpha$ -1,4

$G_{OH}$ : résidu de glucose en position réductrice

E :  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase

$(G-(G)_n-G_{OH})\approx E$ : complexe maltodextrine-enzyme

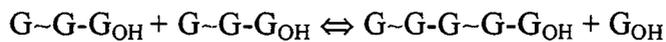
L'absence de maltose dans les produits d'incubation suggère que la réaction 4 ne s'effectue pas. Jones et Whelan (1969) confirmèrent ces observations en utilisant des malto-oligosaccharides marqués au  $^{14}C$ . En outre, ces auteurs montrèrent qu'en incubant différents malto-oligosaccharides en présence d'un large excès de glucose marqué au  $^{14}C$  (le glucose devient alors l'accepteur principal), les groupes maltosyles (réaction 3) étaient préférentiellement transférés par rapport aux groupes maltotriosyles (réaction 2), maltopentosyles (réaction 1),...

Ces deux conclusions définissent de manière générale les propriétés enzymatiques des  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases végétales.

### 5.1.1 Conséquences de l'existence des " liaisons interdites "

Comme nous venons de le voir, certaines liaisons ne sont pas hydrolysables par l'enzyme D. Cette propriété permet un dosage quantitatif de son activité. En effet, lorsque le maltotriose est utilisé comme substrat de la réaction, le transfert d'un groupe maltosyle entraîne systématiquement la libération d'une molécule glucose comme dans l'exemple montré ci dessous.

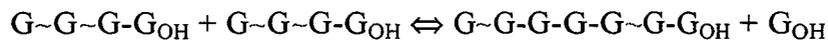
Au début de la réaction, le dosage du glucose ainsi libéré est directement proportionnel à l'activité de la  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase.



G : résidu de glucose  
 $\sim$  : " liaisons interdites "  
 $-$  : liaison  $\alpha$ -1,4

$G_{OH}$ : résidu de glucose en position réductrice.

Le même raisonnement avec les mêmes conséquences peut s'appliquer lorsque c'est le maltotétraose qui est utilisé comme substrat de la réaction. Cependant, dans ce cas-ci, c'est le transfert de groupements maltotriosyles qui conduira à la libération de glucose par l'enzyme D.

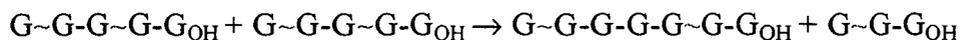


G : résidu de glucose  
 $\sim$  : " liaisons interdites "  
 $-$  : liaison  $\alpha$ -1,4

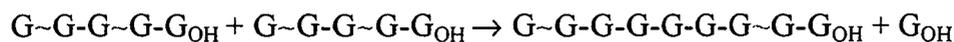
$G_{OH}$ : résidu de glucose en position réductrice.

Le transfert des groupes maltosyles est malgré tout privilégié par l'enzyme D. L'utilisation d'un substrat d'un  $DP \geq 5$  lors de l'incubation avec celle-ci ne favorisera donc pas systématiquement la production de glucose mais engendrera principalement des réactions de transfert interchaînes comme dans l'exemple suivant :

Réaction favorisée :



Réaction non favorisée :



G : résidu de glucose  
 $\sim$  : " liaisons interdites "  
 $-$  : liaison  $\alpha$ -1,4

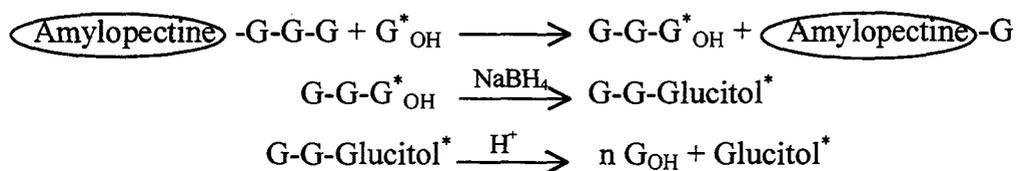
$G_{OH}$ : résidu de glucose en position réductrice.

## 5.2 Le rôle du glucose et des autres accepteurs

“Glucose cannot act as donor (i.e, is not itself "transferred" by the enzyme to an acceptor) but can "accept" glycosyl radicals...”. Peat et coll. (1956) sont arrivés à cette conclusion en constatant l’effet du glucose sur le complexe iode/polysaccharide. A l’équilibre, les maltodextrines ayant subi l’action disproportionnante de l’ $\alpha$ -1,4 glucanotransférase sont capables de former avec l’iode moléculaire des complexes qui absorbent fortement la lumière visible. Après addition de glucose, l’absorbance chute et la distribution des maltodextrines, après incubation, révèle l’apparition de petites maltodextrines. Grâce à cette propriété, les auteurs ont pu tester l’efficacité de différentes molécules susceptibles de jouer le rôle d’accepteur. Ils ont ainsi observé que le méthyle  $\alpha$ -D-glucoside, le maltose, le mannose, et le xylose peuvent jouer le rôle d’accepteur avec des efficacités de 44, 20, 17 et 15% respectivement par rapport à celle du glucose.

## 5.3 Elucidation du mécanisme de transfert

Le mode de transfert de l’enzyme disproportionnante a été élucidé grâce aux travaux de Walker et Whelan (1957). Ils ont incubé de l’amylopectine solubilisée (le nombre d’extrémités réductrices est négligeable par rapport à celui des extrémités non réductrices) et du glucose marqué au  $^{14}\text{C}$  en présence de  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase. L’analyse des produits d’incubation indique d’une part, que le maltotriose est la composante majoritaire du mélange (transfert préférentiel du groupe maltosyle sur le glucose) et d’autre part, que le résidu de glucose présent à l’extrémité réductrice du maltotriose est marqué au  $^{14}\text{C}$ . En effet, la réduction de ce dernier par le tétraborohydruure de sodium (schéma ci-dessous) et la mesure du taux de radioactivité indiquent que toute la radioactivité des maltotrioses produits au cours des réactions de transfert se retrouve au niveau du résidu de glucose réducteur.



$\text{G}^*_{\text{OH}}$  : glucose marqué au  $^{14}\text{C}$

$\text{Glucitol}^*$  : marqué au  $^{14}\text{C}$

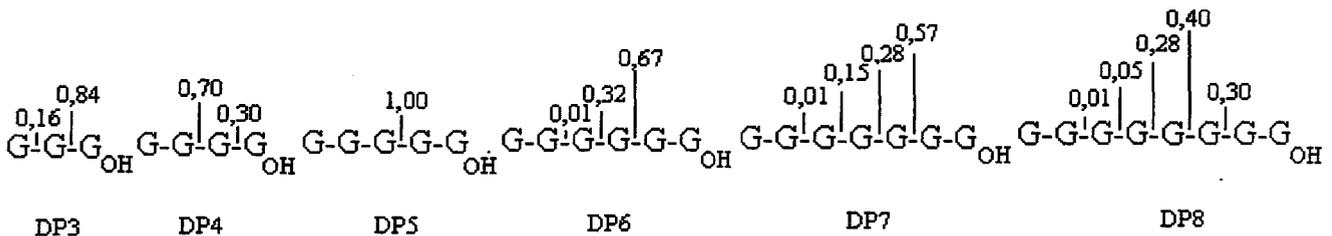
$\text{NaBH}_4$  : tétraborohydruure de sodium réduit la fonction aldéhyde en fonction alcool.

$\text{H}^+$  : hydrolyse acide des liaisons  $\alpha$ -1,4.

## 5.4 La théorie des sous-sites.

Suganuma et coll. (1991) ont tenté d'expliquer la présence des "liaisons interdites" en adaptant à l'enzyme D de patate douce la théorie des sous-sites utilisée pour les  $\alpha$ -amylases.

Selon cette théorie, le site actif d'une amylase est composé de plusieurs sous-sites et l'affinité de chaque sous-site pour un résidu glucosyle gouverne les interactions enzyme-substrat. La fréquence de coupure d'une liaison est donc proportionnelle à la probabilité de formation du complexe enzyme-substrat correspondant. Dans l'exemple ci-dessous, l'amylase pancréatique de porc (PPA) a été incubée avec différents malto-oligosaccharides.



G : résidu de glucose

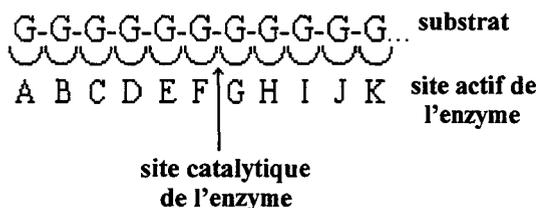
- : liaison  $\alpha$ -1,4

G<sub>OH</sub>: résidu de glucose en position réductrice

Les chiffres représentent les fréquences de coupures observées pour un malto-oligosaccharide donné (DP3 (maltotriose) à DP8 (maltooctaose)). Une fréquence de coupure égale 1,00 signifie que la liaison  $\alpha$ -1,4 est systématiquement clivée par l'enzyme.

Les vitesses et les fréquences de coupures ont été déterminées pour chaque substrat. Les résultats montrent que la fréquence d'attaque dépend de la position de la liaison dans la chaîne mais aussi de la longueur de la chaîne. Ces travaux ont permis de montrer que le site actif de la PPA est constitué de 5 sous-sites et que le site catalytique est situé entre les sous-sites 2 et 3.

Appliquée à d'autres amylases, cette méthode a conduit Mac Gregor (1988) à proposer un modèle d'organisation de leur site actif en sous-sites, chaque sous-site étant susceptible de fixer un résidu de glucose.



Représentation schématique d'un site catalytique d'une  $\alpha$ -amylase constitué de 11 sous-sites (A à K)

G-G-G-G-G... : représente une chaîne de résidus de glucose liés en  $\alpha$ -1,4.

A, B, ..., K : représentent les sous sites formant le sites actif de l'enzyme. Chaque sous-site accueille un résidu de glucose.

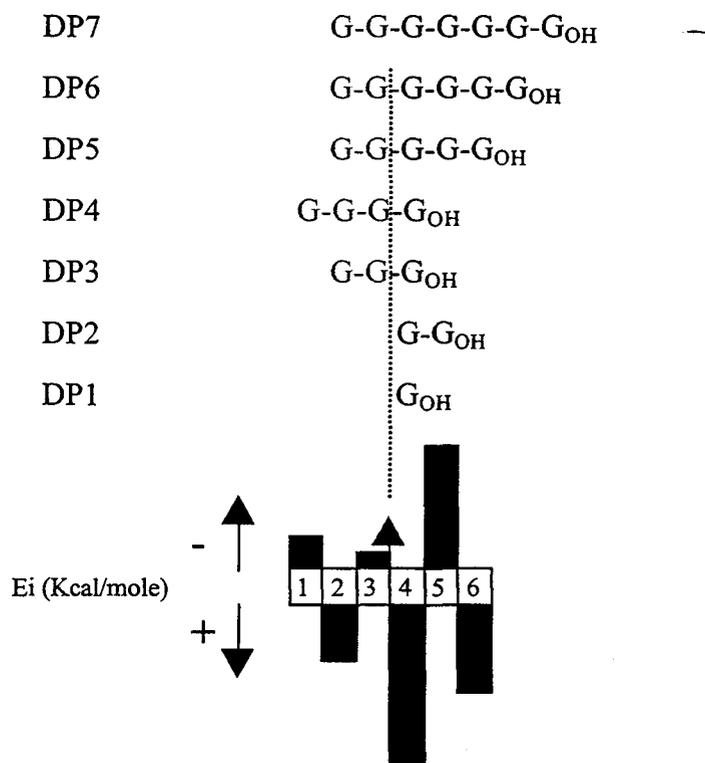
Selon l'origine de l'enzyme, les sites actifs des  $\alpha$ -amylases sont constitués de 5 à 11 sous-sites (A à K). Toutes les  $\alpha$ -amylases possèdent au moins les sous-sites D à  $\bar{H}$  et le site catalytique se situe entre les sous-sites F et G. Les énergies d'interaction d'un résidu glucosyle avec les différents sous-sites de fixation sont calculées à partir des paramètres cinétiques d'hydrolyse ( $K_m$ ,  $K_{cat}$ ) des systèmes composés de malto-oligosaccharides connus et d' $\alpha$ -amylases. Il en ressort pour toutes les  $\alpha$ -amylases que :

-Les énergies d'interactions des sous-sites A à E sont toutes positives. Elles favorisent le maintien de la chaîne au niveau du site actif après coupure de la liaison.

-L'énergie d'interaction du sous-site G étant positive, ceci favorise la formation de complexes entre l'enzyme et des malto-oligosaccharides d'un DP compris entre 2 et 4 unités de glucose. Non productif, ces complexes ont tendance à se substituer à ceux formés par l'enzyme et des chaînes plus longues lorsque la concentration en malto-oligosaccharides courts augmente dans le milieu réactionnel.

-L'énergie d'interaction du sous-site F varie de faiblement positive à largement négative selon l'enzyme étudiée.

De la même manière, en se basant sur la fréquence de coupure de différents malto-oligosaccharides et d'une modélisation informatique, les auteurs ont proposé un site actif constitué de 6 sous-sites pour l'enzyme D de patate douce (Fig. 5).



**Figure 5 : représentation du site catalytique de l'enzyme D de patate douce organisé en sous-sites (cases numérotées) d'après Suganuma et coll. (1991).** La flèche rouge montre le site catalytique de l'enzyme. Les barres verticales noires indiquent l'énergie d'interaction ( $E_i$ ) pour chaque sous-site avec les résidus de glucose. Une valeur négative pour un sous-site n'est pas favorable à la fixation d'un résidu glucosyle au sein de celui-ci. La droite en pointillée situe le point de clivage pour chaque malto-oligosaccharide. Les résidus de glucose en rouge formeront les groupes maltosyles ou maltotriosyles qui seront transférés sur l'accepteur.

L'attribution d'une énergie d'interaction légèrement négative au sous-site 1 rend compte du transfert préférentiel du groupe maltosyle pour les malto-oligosaccharides d'un DP supérieur à 5. En outre, une énergie d'interaction négative au cinquième sous-site forme une barrière qui empêche la production de maltose et favorise le transfert d'un groupement maltotriosyle pour le maltotétraose. Enfin le sous-site 4 possède une énergie d'interaction très positive pour que le glucose puisse servir d'accepteur.



Souches	Donneur	Accepteur	Particularité	Auteurs
<i>Thermogota maritima</i>	DP $\geq$ 4	DP $\geq$ 2	ne produit pas de glucose	Liebl et coll., 1992
<i>Thermococcus litoralis</i>	DP $\geq$ 2 <sup>(1)</sup>	DP $\geq$ 1	produit des cyclodextrines à partir de DP7	Jeon et coll., 1997
<i>Thermogota maritima</i>	DP $\geq$ 3	DP $\geq$ 1	Transfère uniquement des groupements maltosyles	Meissner et Liebl, 1998

Tableau I : Activités de transfert de trois enzymes disproportionnantes provenant de deux souches d'archaeobactéries. Pour chaque enzyme, le gène correspondant a été cloné. (1) les auteurs ne précisent pas si le maltose utilisé lors de l'incubation enzymatique est pur. La présence de malto-oligosaccharides contaminants peut fausser l'interprétation.

## 6.1 Les autres activités disproportionnantes

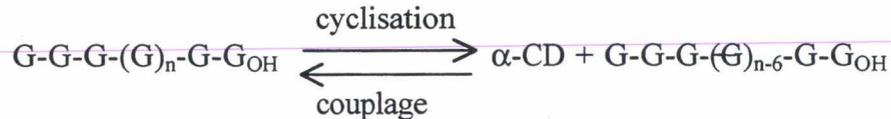
### 6.1.1 Les cyclodextrine glucano transférases (CGTase)

L'existence des cyclodextrines est connue depuis maintenant une centaine d'années. Elles furent isolées la première fois, par Villiers en 1891, à partir d'une culture de *Bacillus amylobacter* dont la source de carbone était l'amidon. Schardinger (1904) détermina par la suite la nature cyclique de ces composés. Les trois cyclodextrines les plus répandues sont les  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrines ( $\alpha$ -CD ;  $\beta$ -CD ;  $\gamma$ -CD) formées respectivement de 6, 7 et 8 unités de glucose liées en  $\alpha$ -1,4.

Il existe deux classes de CGTases : les  $\alpha$ -CGTases et les  $\beta$ -CGTases. La première forme préférentiellement des  $\alpha$ -CD, l'autre des  $\beta$ -CD. La spécificité n'est cependant pas totale car les deux types de CGTases sont capables de synthétiser les trois principales cyclodextrines, dans des rapports différents. Enfin, aucune CGTase ne forme la  $\gamma$ -CD comme produit majoritaire. Il est admis que les CGTases catalysent indifféremment trois réactions (cyclisation, couplage, disproportion), selon que la transglucosylation est intra- ou intermoléculaire (Bovetto, 1988).

#### ● cyclisation et couplage

La cyclisation est une transglucosylation intramoléculaire. La maltodextrine est à la fois donneur et accepteur. Le couplage est la réaction inverse : c'est une transglucosylation intermoléculaire dans laquelle une cyclodextrine joue le rôle de donneur et une extrémité non-réductrice constitue l'accepteur. La réaction enzymatique peut être déplacée dans le sens "couplage" en présence d'un accepteur comme le maltose.



Récemment, l'expression de l'enzyme D de pomme de terre, chez *E. coli*, a permis d'obtenir de manière illimitée une source importante d'enzyme. Les études menées *in vitro* sur son activité en présence d'amylopectine solubilisée (Takaha et coll., 1998b) et d'amylose (Takaha et coll., 1996 a et b) ont mis en évidence respectivement la production de structures cycliques branchées et non branchées et de cycloamyloses. L'obtention de telles structures nécessite des conditions d'incubation particulières (large excès d'enzyme, temps d'incubation très long) qui sont incompatibles avec celles rencontrées dans la cellule.

#### ● activité disproportionnante

L'activité disproportionnante des CGTases est une réaction de transglucosylation intermoléculaire comme celle décrite ci-dessous.



Cependant, la réaction de cyclisation des CGTases reste prédominante en début de réaction (Vetter et coll., 1992) contrairement à la cyclisation catalysée par l'enzyme D de pomme de terre qui apparaît plutôt à la fin de la réaction.

### 6.1.2 Les $\alpha$ -amylases et $\alpha$ -glucosidases

Outre la réaction principale d'hydrolyse, les  $\alpha$ -amylases catalysent dans une faible mesure des réactions de transglycosylation en  $\alpha$ -1,4. (Hehre et Genghof, 1971).

Quelques glucosidases sont aussi capables d'effectuer des réactions de transglycosylation. En présence de maltose, des glucosidases peuvent synthétiser de l'isomaltose (liaison  $\alpha$ -1,6), du maltotriose et du panose (résidu de glucose lié en  $\alpha$ -1,6 sur l'extrémité non-réductrice d'un maltose) (Yamasaki et Suzuki, 1980).

## 7. LES $\alpha$ -1,4 GLUCANOTRANSFERASES APPARTIENNENT A LA FAMILLE DES AMYLASES

Le terme "amylase" englobe les  $\alpha$ -amylases mais aussi toutes les enzymes qui agissent sur les liaisons O-glucosidiques de type amidon (enzymes de débranchement : pullulanases, isoamylases, les enzymes de branchement, les hydrolases : amylases, amyloglucosidases, néopullulanases, les transférases : amyloamylases, enzyme D, CGTases). Le nombre croissant d'informations sur les séquences en acides aminés, les structures spatiales, les mécanismes catalytiques de ces enzymes ont conduit Kuriki et Imanaka (1999) à élargir le concept de famille des amylases. En effet, une caractéristique commune à toutes ces enzymes est la conservation d'une structure de base du domaine principal en forme de tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> et d'un mécanisme catalytique, basé sur la présence de trois acides aminés indispensables à la catalyse (tableau II).

Enzyme	Origine	région 1	région 2	région 3	région 4
$\alpha$ -amylase	<i>A. oryzae</i>	117DVVANH	202GLRIDTVKH	230EVLVD	292FVENHD
isoamylase	<i>P. amylocladostoma</i>	292DVVYNH	371GFRFDLASV	435EPWA	505FIDVHD
isoamylase	maïs	295DVVFNH	365GFRFDLASV	425EAWD	494FVCAHD
pullulanase	maïs	476DVVYNH	546GFRFDLMGH	586EGWN	714VASAHD
pullulanase	orge	398DVVYNH	468GFRFDLMGH	508EGWD	646YVSAHD
amyloamylase	<i>S. pneumoniae</i>	224DMWAND	291IVRIDHFRG	332EDLG	391YTGTHD
enzyme D	<i>S. tuberosum</i>	304DVWANK	369EFRIDHFRG	420EDLG	469YTGTHD
BE II	blé	400DIVHSH	467GFRFDVTSM	526EDVS	589YAESH

**Tableau II : Comparaison de séquences en acides aminés des quatre régions conservées d'enzymes appartenant à la famille des amylases.** Les acides aminés en rouge correspondent aux résidus intervenant dans le site catalytique. Les séquences peptidiques des quatre régions conservées de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas amylocladostoma* sont issues de Kuriki et Imanaka (1999). Les séquences de l'isoamylase et de la pullulanase de maïs viennent respectivement de James et coll. (1995) et Beatty et coll. (1999). Les séquences en acides aminés de la pullulanase de l'orge et de l'enzyme de branchement II (BE II) du blé sont issues respectivement des articles de Burton et coll. (1999) et de Nair et coll., (1997).

Kuriki et Imanaka (1999) proposent d'inclure à la famille des amylases toute enzyme répondant aux quatre exigences suivantes :

1-Elle agit sur une liaison  $\alpha$ -O-glucosidique

2-Elle produit des mono-, ou malto-oligosaccharides ou forment des liaisons  $\alpha$ -glucosidiques par transglycosylation.

3-Elle possède quatre régions hautement conservées dans sa séquence primaire dont celle du site catalytique et celles des sites de liaison enzyme-substrat.

4-Elle présente les résidus Asp, Glu, Asp dans son site catalytique correspondant respectivement aux résidus Asp-206, Glu-230, Asp-297 de l' $\alpha$ -amylase d'*Aspergillus oryzae*.

## 8. LES MUTANTS AFFECTES POUR L'ACTIVITE 1,4- $\alpha$ -GLUCANOTRANSFERASE

### 8.1 Le modèle bactérien

Le premier mutant déficient pour une glucanotransférase fut décrit chez *Escherichia coli*. Le gène *malQ*, codant pour l'amylomaltase, appartient à l'opéron maltose. Historiquement, l'opéron maltose fut le premier décrit chez *E. coli* mais l'intérêt de son étude fut éclipsé par le succès spectaculaire de celui de l'opéron lactose. Heureusement, l'intérêt porté à celui-ci fut maintenu par la connection encore mal établie à l'époque entre le métabolisme du maltose et la susceptibilité d'infection par le phage  $\lambda$  (la maltose perméase étant le récepteur du phage  $\lambda$ ).

Aujourd'hui, nous savons que l'opéron est constitué d'une dizaine de gènes soumis à un contrôle positif par la protéine MalT. Parmi eux, le gène *malZ* code une maltodextrine glucosidase, *malS* code une  $\alpha$ -amylase extra-cellulaire, et enfin les loci *malQ* et *malP* codent respectivement l'amylomaltase et la maltodextrine phosphorylase. Cette dernière est une enzyme processive qui libère du G-1-P à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucane et s'arrête à un malto-oligosaccharide de quatre unités de glucose. Elle ne catabolise ni le maltotétraose, ni le maltotriose, ni même le maltose. L'analyse des mutants montre que ces deux enzymes jouent un rôle clef dans le métabolisme du maltose.

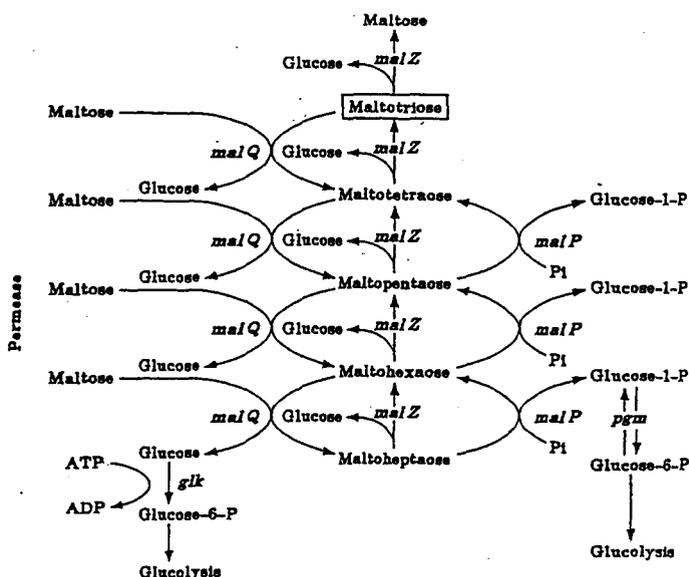


Figure 6 : Métabolisme du maltose chez *Escherichia coli* (d'après Boos et Schuman, 1998). Seules l'amylomaltase (MalQ), la maltodextrine phosphorylase (MalP), et la maltodextrine glucosidase (MalZ), sont indiquées sur ce schéma. Après le transport du maltose par le transporteur ABC, un résidu maltosyle, maltotriosyle ou maltotétraosyle provenant du

maltotriose, du maltotétraose ou du maltopentaose est transféré par l'amyloamylase sur une molécule de maltose libérant ainsi à chaque réaction de transfert une molécule de glucose. Le maltopentaose ainsi que les plus longs malto-oligosaccharides sont reconnus et catabolisés par la maltodextrine phosphorylase, en formant un G-1-P et une maltodextrine plus petite d'une unité de glucose. La maltodextrine glucosidase libère à partir de l'extrémité réductrice du maltotriose ou de maltodextrines plus longues, un résidu de glucose. Ce schéma montre que la dégradation du maltose nécessite la présence de maltodextrine endogène (3 résidus de glucose minimum) pour le métabolisme du maltose.

### 8.1.1 Phénotype du mutant *malQ*-

Une souche *malQ*- ne croît pas en présence de maltose, ni en présence de maltotriose ou de maltotétraose comme unique source de carbone. De plus la présence de malto-oligosaccharides s'avère cytotoxique pour la croissance (Hofnung et coll., 1971). Dans ces conditions, les bactéries accumulent du glucose, du maltose, du maltotriose et des dextrines plus longues.

En l'absence d'une source externe de maltose, la concentration intracellulaire en maltodextrines reste élevée chez ce mutant, ce qui conduit à une expression constitutive des gènes de l'opéron maltose. Cette constitutivité disparaît dans les souches double mutantes de type *malQ*- *glgC*- ou encore *malQ*- *glgA*-. Les loci *glgC* et *glgA* codent respectivement pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase et la glycogène-synthétase, deux enzymes indispensables à la synthèse normale de glycogène. La dégradation continue du glycogène serait donc à l'origine de l'accumulation des maltodextrines dans la souche *malQ*-.

### 8.1.2 Obtention d'un révertant à partir d'une souche *malQ*-

Peist et coll. (1996) ont obtenu à partir d'une souche mutante *malQ*- des révertants capables de croître à nouveau en présence de maltose. La cartographie de la mutation indique clairement qu'il n'y a pas eu de réversion au niveau du locus *malQ* mais que la réversion est le résultat du changement d'un seul acide aminé (Trp en Cys) dans le gène codant la maltodextrine glucosidase (*malZ*).

Dans une souche sauvage, une maltodextrine glucosidase hydrolyse une maltodextrine (DP $\geq$ 3) à partir de l'extrémité réductrice en libérant une molécule de glucose. L'incapacité de cette enzyme à hydrolyser le maltose expliquerait l'accumulation de maltose et son effet toxique dans les souches *malQ*-.

Chez ces pseudo-révertants, la maltodextrine glucosidase mutante s'avère en fait toujours incapable d'hydrolyser le maltose (comme dans le cas d'une souche sauvage) mais présente une nouvelle activité enzymatique de type "transférase" capable d'utiliser le maltose comme accepteur.

## **8.2 Activité $\alpha$ -1,4 glucanotransférase réduite chez la pomme de terre**

A ce-jour, aucun mutant affecté pour une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase n'a été décrit chez les plantes supérieures. Les seules données que nous avons à notre disposition, proviennent de l'étude de cultivars transgéniques de *Solanum tuberosum*. Grâce à la technologie des ARN antisens, il a été possible de réduire de plus de 98 % l'activité disproportionnante chez les cultivars transgéniques (Takaha et coll., 1998a).

### **8.2.1 Phénotype des plantes transgéniques de pomme de terre**

L'amidon accumulé dans les tubercules des plantes transgéniques n'est pas qualitativement ni quantitativement altéré. Les mêmes analyses concernant l'amidon transitoire des feuilles se sont révélées infructueuses suite à une trop grande variabilité des résultats pour un même cultivar.

Contrairement à ce qui a été décrit chez les bactéries, les auteurs n'ont pas observé d'accumulation de malto-oligosaccharides. Le seul phénotype observable concerne la croissance réduite de la plante. Les auteurs ont pu remarquer que plus l'activité de l'enzyme D était réprimée, plus la plante présentait une croissance altérée. Toutefois, il n'est pas possible de savoir si la croissance réduite des plantes transformées est directement imputable à la réduction de l'activité disproportionnante. En effet, il est généralement admis que l'enzyme D participe avec la maltodextrine phosphorylase au catabolisme des malto-oligosaccharides. En absence d'activité disproportionnante, le métabolisme des malto-oligosaccharides est orienté vers une dégradation amylolytique ( $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase) beaucoup moins intéressante sur le plan énergétique que la production directe de G-1-P. Cette perte énergétique expliquerait la croissance réduite des plantes transgéniques.

### **8.2.2 Etude de l'expression de l'enzyme D**

L'activité disproportionnante fut purifiée à partir des amyloplastes et des chloroplastes de différentes plantes. En ce qui concerne, la régulation de l'activité, très peu de travaux ont été effectués. Seuls les travaux de Takaha et coll. (1993) mentionnent que les ARNm d'enzyme D de pomme de terre s'accumulent au cours du développement au sein des organes de réserve.

## 9. CHLAMYDOMONAS REINHARDTII : UN MODELE D'ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DE L'AMIDON

L'isolement de nombreux mutants, surtout chez le maïs, a permis de créer des sources d'amidon avec des propriétés physico-chimiques particulières. Néanmoins, la recherche et l'obtention de nouveaux mutants sont restreintes par différents facteurs limitants tels que l'infrastructure nécessaire à la culture, le temps de croissance relativement long, la nature diploïde et parfois polyploïde du génome de l'organisme étudié ou encore l'absence de mutant totalement déficient pour la synthèse de l'amidon.

Pour toutes ces raisons notre laboratoire s'est orienté vers un autre modèle d'étude : *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce micro-organisme possède plusieurs avantages pratiques. Il se cultive très bien en milieu liquide et sur un milieu gélosé. Les techniques de microbiologie classiques (isolement de clones, empreinte sur velours,...) sont facilement applicables à ce modèle. De plus, avec un temps de génération relativement court (une division toutes les huit heures environ en lumière continue) et une accumulation importante d'amidon, il est possible d'entreprendre des études structurales de l'amidon synthétisé dans un délai très bref (5 jours de culture cellulaire).

### 9.1 Présentation

*Chlamydomonas reinhardtii* est une algue verte unicellulaire d'eau douce présente dans pratiquement tous les biotopes. Elle appartient à la famille des Chlamydomonodaceae dont le genre *Chlamydomonas* en est le principal représentant (33 genres au total).

Au microscope optique, la cellule se présente sous une forme ovoïde biflagellée (Fig. 7) d'une taille d'environ 10 à 15  $\mu\text{m}$  de long. Contrairement aux végétaux supérieurs, *C. reinhardtii* ne possède qu'un seul chloroplaste dont le volume peut atteindre deux tiers du volume cellulaire.

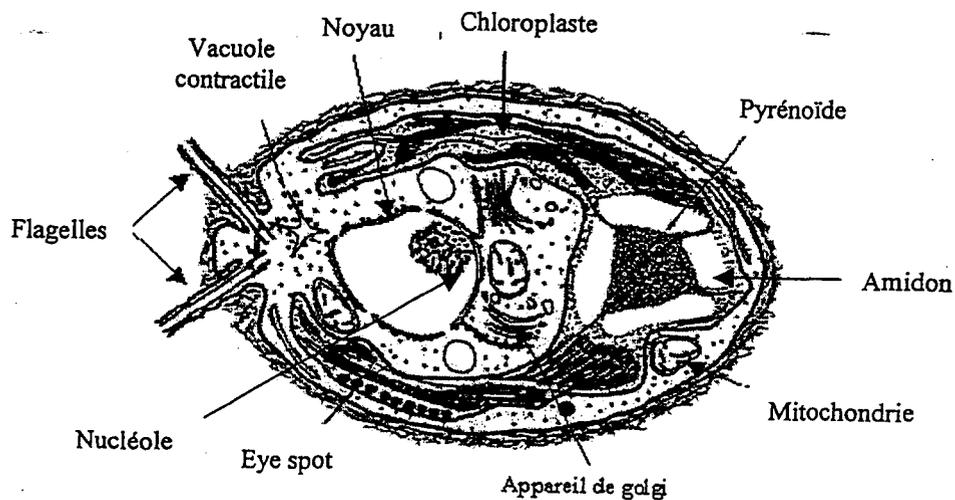


Figure 7 : Représentation schématique de *Chlamydomonas reinhardtii*

*C. reinhardtii* se développe essentiellement par division asexuée et se présente le plus souvent sous forme haploïde. Cependant, une carence en élément nutritif (carence en azote par exemple) peut amener l'algue à suivre un cycle de reproduction sexuée. Les deux polarités sexuelles opposées  $mt^+$  et  $mt^-$  ( $mt$  pour mating type ou type de conjugaison) fusionnent pour donner naissance à des zygotes. Ces derniers peuvent suivre deux voies de développement.

Dans 5% des cas, ces zygotes restent sous la forme de diploïdes végétatifs stables se divisant par mitose. De polarité sexuelle  $mt^-$ , ces diploïdes végétatifs peuvent à leur tour entrer dans un cycle de reproduction sexuée et fusionner avec une cellule haploïde de polarité sexuelle  $mt^+$ . Le produit de cette fusion est une cellule triploïde stable qui peut être utilisée lors d'expériences de dosage de gène. Les zygotes triploïdes générés peuvent aussi servir pour une analyse de ségrégation en phase triploïde.

Mais dans la majorité des cas, les zygotes se transforment en zygospores qui après méiose donnent des tétrades de cellules haploïdes (Fig.8) comprises de 4 à 16 zygospores.

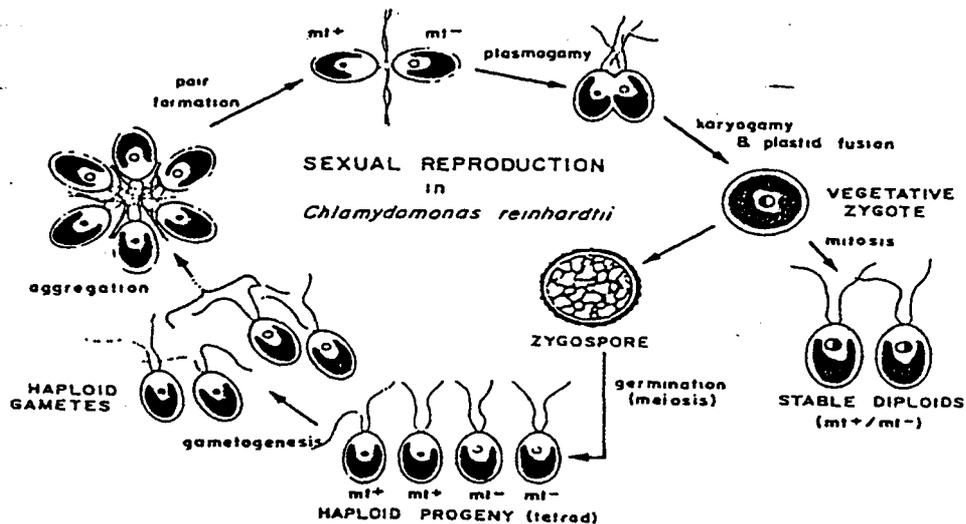


Figure 8 : cycle de reproduction sexuée de *Chlamydomonas reinhardtii* (Harris E.H., 1989a et b)

La facilité de l'analyse génétique, la sélection aisée de mutant favorisée par l'haploïdie de la cellule, la possibilité d'analyse tant en phase diploïde que triploïde font de *Chlamydomonas reinhardtii* un excellent outil pour élucider les mécanismes d'une voie de biosynthèse.

## 9.2 Intérêts du modèle

Dans des conditions de carences nutritives, (carence azotée par exemple) les cellules arrêtent de se diviser et accumulent de grandes quantités d'amidon (environ  $30 \mu\text{g} \cdot 10^{-6}$  cellules). Des analyses structurales détaillées de cet amidon montrent que celui-ci est analogue à l'amidon de réserve retrouvé dans les albumens de grains de céréales (Ball et coll., 1990 ; Fontaine et coll., 1993 ; Maddelein et coll., 1994 ; Libessart et coll., 1995). Dernièrement, les études de cristallographie et de calorimétrie réalisées par Buléon et coll. (1997) ont définitivement entériné cette ressemblance. Dans des conditions de croissance normale, la photosynthèse est maximale, les cellules se divisent activement et accumulent beaucoup moins d'amidon ( $1 \mu\text{g} \cdot 10^{-6}$  cellules). La structure de ce polysaccharide est similaire à l'amidon dit 'transitoire' que l'on retrouve dans les feuilles des plantes vasculaires (Ball et coll., 1990).

Toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon, bien que présentes dans le chloroplaste, sont codées par le génome nucléaire de l'algue. L'inactivation de ces enzymes induit des phénotypes analogues à ceux trouvés chez les plantes supérieures.

Deux atouts majeurs font de *Chlamydomonas* un excellent modèle pour l'étude spécifique de la biosynthèse de l'amidon. Le premier est lié à la mise au point d'un crible phénotypique sensible et

extrêmement simple à mettre en œuvre (voir plus loin). Le deuxième concerne la survie de l'algue même en l'absence totale d'amidon.

### 9.3 Le crible phénotypique

Thorn et Mohazzeb (1990) ont démontré que la longueur d'onde au maximum d'absorbance ( $\lambda_{max}$ ) du complexe iode/polysaccharide dépend fortement de la longueur des chaînes externes du polysaccharide engagé dans ce complexe. Des travaux similaires ont été réalisés sur des structures non-branchées. Banks et coll. (1971) ont montré une corrélation entre la longueur des chaînes de glucanes de type amylose et la longueur d'onde au maximum d'absorption. En effet celle-ci augmente avec le degré de polymérisation. Une variation de la  $\lambda_{max}$  peut donc traduire des modifications structurales du polysaccharide étudié.

<b>DP moyen</b>	22,2	28,9	31,3	36,4	50,7	71	93	105	134	1500
<b><math>\lambda_{max}</math></b>	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642

Tableau III : Relation entre la longueur des chaînes et la longueur d'onde au maximum d'absorption (Banks et coll. 1971)

L'identification de mutants défectueux pour la synthèse de l'amidon repose donc sur la capacité de l'iode à se complexer avec l'amidon. Une suspension cellulaire est déposée sur une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé carencé en azote. Comme il a été dit ci-dessus, dans de telles conditions de culture, les cellules arrêtent de se diviser et accumulent massivement de l'amidon. En outre, la majeure partie des pigments chlorophylliens est dégradée réduisant ainsi les risques d'interférences de coloration lors de la vaporisation à l'iode des boîtes de Pétri, cinq jours après le début de la culture.

Comme l'illustre le schéma ci-dessous (Fig. 9), la coloration du complexe iode/amidon dépend de la nature du polysaccharide synthétisé. Une coloration bleu-nuit sera caractéristique d'une souche sauvage. Une souche dont l'amidon est dépourvu d'amylose montrera une coloration rouge alors qu'une souche accumulant un amidon enrichi en amylose affichera une teinte verdâtre.

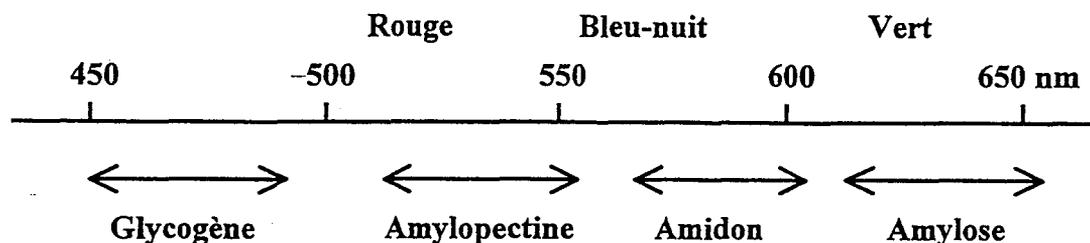


Figure 9 :  $\lambda_{max}$  et couleurs des complexes iode/polysaccharide (Thorn et Mozzaheb, 1990). La couleur que revêt le complexe iode/polysaccharide est caractéristique du polysaccharide.

## 10. OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE.

Les principales étapes enzymatiques de la biosynthèse de l'amidon sont connues et bien caractérisées. Cependant, à elles seules, elles ne permettent pas d'expliquer les mécanismes d'édification de la structure très organisée du grain d'amidon. Les analyses systématiques de mutants déficients pour la biosynthèse du polysaccharide de réserve chez *C. reinhardtii*, nous ont conduit à isoler et à caractériser de nouveaux phénotypes parfois sans équivalent chez les végétaux supérieurs. Citons par exemple le phénotype affiché par les mutants au locus *STA7* qui est à l'origine du modèle de synthèse discontinu (Ball et coll., 1996).

L'isolement après mutagenèse aux U.V. d'un nouveau mutant présentant une altération majeure de la biosynthèse de l'amidon a été réalisé par les étudiants du groupe de travaux pratiques dirigé par Brigitte Delrue en 1996. Ce mutant présente un phénotype jaune lors de la vaporisation à l'iode sur boîte de Pétri après une carence azotée. Ce phénotype très marqué caractérise des souches dans lesquelles la quantité d'amidon représente moins de 10% de celle du sauvage. Les seules altérations enzymatiques décrites jusqu'à présent pouvant conduire à un tel phénotype concernent un dysfonctionnement de la synthèse du précurseur ADP-glucose (mutations aux loci *STA1*, *STA5* et *STA6*) ou encore une défectuosité pour l'isoamylase (mutation au locus *STA7*). Mais les études préliminaires montrèrent que ce mutant ne présentait pas de défectuosité pour ces étapes enzymatiques. D'autre part l'accumulation de malto-oligosaccharides linéaires concomitante à la chute de l'accumulation d'amidon rend le phénotype de ce mutant parfaitement original.

Ainsi durant les trois années de thèse, cette souche mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* a fait l'objet de caractérisations génétique, biochimique et enzymologique approfondies qui seront détaillées dans la suite de ce mémoire.

## Avant-propos :

La thèse rédigée ci-après est constituée essentiellement de deux articles publiés en août 1999 dans la revue *Plant Physiology* et d'une ébauche d'article bâtie sur des résultats qui nous semble encore insuffisants. Nous avons également participé à deux autres projets au sein du laboratoire. Le premier porte sur une étude d'interaction génique entre mutations inactivant d'une part l'enzyme de débranchement, et d'autre part les activités d'élongation. Cette étude a été publiée en janvier 1999 dans la même revue. Le deuxième projet porte sur la purification et la caractérisation des enzymes débranchantes (pullulanase et isoamylase de l'algue). L'article concernant ces travaux a été soumis en novembre 1999. Tous ces articles sont fournis en annexe.

Le choix d'une thèse rédigée sur deux articles publiés et d'un article en préparation relève d'un souci de clarté et d'unicité de la thématique soutenue. Nous avons inclus dans la traduction de nos articles des données supplémentaires non publiées notamment les spectres de diffraction aux rayons x obtenus par l'INRA de Nantes, la caractérisation de la masse de l'amylose des mutants, le comportement de l'enzyme D vis à vis d'oligosaccharides de DP contrôlé, la détermination du pH optimal, l'influence de métabolites sur l'activité, l'action de la  $\beta$ -amylase sur les chaînes externes de l'amylopectine modifiée par incorporation d'oligosaccharides, la détection de la production de malto-oligosaccharides à partir d'amylopectine et d'enzyme D, l'incorporation de maltotriose et maltotétraose radio-marqués dans les chaînes externes de l'amylopectine et enfin la caractérisation détaillée des phosphorylases de *Chlamydomonas reinhardtii*. De même, les chapitres matériels et méthodes sont étayés de précisions supplémentaires.

**Article 1: Caractérisations génétiques et  
biochimiques suggérant l'implication des  $\alpha$ -1,4  
glucanotransférases dans la synthèse de  
l'amylopectine.**

## 1. Résumé

Nous décrivons dans ce chapitre une nouvelle mutation chez *Chlamydomonas reinhardtii* située au locus *STAI1*. Celle-ci entraîne une accumulation réduite d'amidon granulaire ainsi qu'une modification structurale de l'amylopectine et de la forme du grain. Ces anomalies s'accompagnent de l'accumulation de malto-oligosaccharides linéaires. La mutation *stall-1* conduit à l'absence d'une activité  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase, connue sous le terme d'enzyme disproportionnante ou enzyme D. Les expériences de dosage de gène ont permis de montrer que l'activité de l'enzyme D dosée en extrait brut est directement proportionnelle à la quantité d'allèles sauvages du locus *STAI1* présents dans la souche. Toutes les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon incluant l'ADP-glucose pyrophosphorylase, les enzymes de débranchement, les amidon-synthétases solubles et liées au grain, les enzymes de branchement, les phosphorylases, les  $\alpha$ -glucosidases (maltases) et les amylases ne sont pas perturbées par la mutation. Ces données indiquent que l'enzyme D est requise pour la synthèse normale du grain d'amidon chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

## 2. Introduction

L'amidon constitue l'un des polymères biologiques pondéralement les plus importants de la biosphère terrestre et reste la principale source énergétique dans l'alimentation humaine et animale.

Comme dans le cas du glycogène animal, fongique et bactérien, l'amidon est constitué uniquement de résidus de glucose liés en  $\alpha$ -1,4 et ramifiés en  $\alpha$ -1,6. Mais, contrairement au glycogène, les grains d'amidon présentent une structure semi-cristalline de taille illimitée (pour revue, Buléon et coll., 1998).

L'amylopectine, la fraction majoritaire de l'amidon est considérée comme la seule fraction moléculaire nécessaire pour générer des grains d'amidon normaux. Sa structure est déterminée par l'action des amidon-synthétases (SS) qui transfèrent en  $\alpha$ -1,4 un résidu de glucose à partir de l'ADP-glucose, sur l'extrémité non réductrice d'une chaîne glucanique. Les points de branchement apparaissent suite au clivage des glucanes préexistants liés en  $\alpha$ -1,4 et à leur transfert en position  $\alpha$ -1,6, par les enzymes de branchement (BE).

Il était généralement admis que les caractéristiques structurales de l'amidon dépendaient seulement de l'action concertée des multiples formes de SS et de BE. Cependant, d'autres enzymes sont probablement impliquées dans ce processus.

Notre stratégie consiste à isoler des mutants défectueux, afin de définir de nouvelles fonctions impliquées dans la biosynthèse du grain d'amidon. Par l'analyse de mutants provenant de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Mouille et coll., 1996), du maïs (James et coll., 1995), du riz (Nakamura et coll., 1996) et d'*Arabidopsis thaliana* (Zeeman et coll., 1998a), il a été montré que les enzymes de débranchement sont soit nécessaires à la maturation d'une molécule précurseur de l'amylopectine (la préamylopectine) (Ball et coll., 1996) soit nécessaires pour empêcher la synthèse improductive de glycogène par les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon (Zeeman et coll., 1998a).

Les algues eucaryotes définissent des modèles microbiens particulièrement bien adaptés à l'étude de la biosynthèse de l'amidon. En effet, comme il a été dit ci-dessus, l'amidon n'est présent ni chez les bactéries, ni chez les champignons. *Chlamydomonas reinhardtii* constitue de loin l'algue unicellulaire la plus intensivement étudiée par les généticiens. Elle offre, de ce fait, une opportunité unique pour comprendre les mécanismes de base de la synthèse du grain d'amidon. En effet, les cellules de *Chlamydomonas* cultivées en conditions de carence nutritive accumulent un polysaccharide qui est

similaire à celui de l'albumen des graines de céréales. En outre, la cellule renferme les mêmes enzymes participant à la biosynthèse de l'amidon et répond sur le plan du phénotype de manière analogue aux mutations affectant ces activités (pour revue voir Ball et coll., 1998).

Les enzymes disproportionnantes (enzymes D) définissent des  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases qui transfèrent des malto-oligosaccharides linéaires d'un donneur d'au moins trois résidus de glucose vers un autre oligosaccharide accepteur (Peat et coll., 1956). Jusqu'à ce jour, l'activité rapportée pour cette enzyme consiste à la disproportion de glucanes courts en oligosaccharides plus longs. Cette réaction de transfert faciliterait leur dégradation par les phosphorylases ou les hydrolases (Boos et Schuman, 1998).

Notre étude concerne la caractérisation de la mutation *stall-1* chez *Chlamydomonas*. Celle-ci entraîne une diminution de la teneur en amidon, une modification de la structure de l'amylopectine, une augmentation de la proportion en amylose, une modification de la taille et de la forme des grains et enfin l'accumulation d'oligosaccharides linéaires. Aucune enzyme antérieurement définie comme impliquée dans la biosynthèse de l'amidon n'est affectée par la présence de la mutation *stall-1*. Cependant, les mutants *stall-1* sont dépourvus de l'activité nécessaire à l'hydrolyse du maltotriose. L'analyse par zymogramme a permis d'établir, que l'enzyme manquante dans les souches mutantes au locus *STALL* est l'enzyme D.

Ces données indiquent que les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases constituent des éléments importants du mécanisme de synthèse de l'amylopectine chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Il semble donc, comme dans le cas des enzymes de débranchement, que l'enzyme D participe au processus de biosynthèse de l'amidon, même si de manière générale ce type d'enzymes fut le plus souvent décrit comme étant impliqué dans le catabolisme du polysaccharide de réserve.

### 3. Matériels et méthodes

U-<sup>14</sup>C glucose-1-phosphate, [D-glucose-U-<sup>14</sup>C] adénosine diphosphate glucose, [1,2-<sup>14</sup>C] acétate de sodium sont fournis par Amersham. L'ADP-glucose et l'amylopectine de maïs proviennent de Sigma. L'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* provient de Megazyme (Sydney-Australie). Le Glucose-1-phosphate, le glycogène de foie de lapin, l'hexokinase de levure, la glucose-6-P déshydrogénase de levure et la phosphorylase de muscle de lapin sont fournis par Boehringer-Mannheim.

#### 3.1 Les souches de *Chlamydomonas reinhardtii*, la mutagenèse U.V., les conditions de croissance, les observations cytologiques et les milieux.

Les souches sauvages de référence de *Chlamydomonas reinhardtii* utilisées dans cette étude sont 330 (*mt<sup>+</sup> arg7 cw15 nit1 nit2*) et 137C (*mt<sup>-</sup> nit1 nit2*). Selon le génotype des souches mutantes ou des ségrégeants, les diploïdes testés sont sélectionnés par complémentation sur un milieu minimal après croisement avec la souche A35 (*mt<sup>+</sup> pab2 ac14*), 37 (*mt<sup>-</sup> pab2 ac14*), NV314 (*mt<sup>-</sup> pab2 ac14 sta1-1*), la souche 37E-17 (*mt<sup>-</sup> pab2 ac14 sta3-1*), GST- (*mt<sup>-</sup> nit1 nit2 sta5-1*), BAF R1 (*mt<sup>+</sup> nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta2-29::ARG7*) ou 18B (*mt<sup>-</sup> nit1 nit2 sta2-1*). Les ségrégeants mutants et sauvages sont obtenus après croisement de la souche mutante JV45J et la souche sauvage A35. Les souches *sta11-1* communément utilisées sont CO 214 (*mt<sup>+</sup> nit1 nit2 sta11-1*), CO29 (*mt<sup>+</sup> pab2 ac14 sta11-1*) et JV45J (*mt<sup>-</sup> nit1 nit2 sta11-1*).

La mutagenèse U.V. est réalisée par irradiation des cellules (jusqu'à 20% de survie), avec un transilluminateur TS-15 (254 nm) (Ultra-violet Products, Inc., San gabriel, Calif.) montrant un pic d'intensité de 7,0mW.cm<sup>-2</sup>. L'irradiation est suivie par une incubation dans le milieu HS (High Salt) à l'obscurité.

Les cultures sont soumises à une illumination continue (40μE.m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) à une température de 24°C en présence d'acétate et sous agitation vigoureuse. Les cultures sont inoculées à 5.10<sup>4</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> et récoltées à 2.10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup>. Les cultures carencées en azote sont inoculées à 5.10<sup>5</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> et extraites après 7 jours, à une densité finale de 2.10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup>. Les techniques génétiques sont décrites par Harris (1989a). Le milieu standard TAP (Tris Acétate Phosphate) est détaillé dans Harris (1989b). Le milieu carencé en azote (TAP-N) et la sélection des diploïdes sont décrits dans Ball et coll., (1990), Ball et coll., (1991) et Delrue et coll., (1992).

Le milieu TP (Tris-Phosphate) carencé en azote a été utilisé pour préparer l'amidon radioactif de la souche mutante JV45J (*stai1-1*). La souche a été cultivée en présence de 500  $\mu\text{Ci}$  d'acétate de sodium [ $1,2\text{-}^{14}\text{C}$ ] à 702  $\mu\text{Ci}\cdot\text{mg}^{-1}$  pendant 5 jours sous agitation. Parallèlement, la souche sauvage 137C a été cultivée dans les mêmes conditions mais en remplaçant la quantité d'acétate de sodium  $^{14}\text{C}$  par de l'acétate de sodium non marqué.

Les protocoles de fixation et d'inclusion sont décrits dans Dauvillée et coll. (1999) (annexe 1)

### **3.2 L'estimation de la quantité d'amidon accumulé, la purification de l'amidon et les propriétés du complexe iode-amidon.**

La quantité d'amidon est déterminée à l'aide du kit " starch " commercialisé par Boehringer Mannheim. Le protocole détaillé est disponible avec le kit. L'amidon solubilisé à 100°C dans du DMSO 90% est hydrolysé jusqu'au stade de glucose par une amyloglucosidase thermostable. Le glucose ainsi produit est transformé par une hexokinase en glucose-6-phosphate qui est oxydé par une glucose-6-phosphate déshydrogénase. La quantité de NADPH,  $\text{H}^+$  ainsi produite est estimée par mesure spectrophotométrique à 365 nm.

L'amidon est extrait de cultures carencées ou non en azote. Les cellules sont concentrées de 1 à 2  $10^8$  cellules. $\text{mL}^{-1}$  avant d'être lysées à la presse de French (10000 p.s.i.). L'extrait cellulaire obtenu est centrifugé à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot contient les grains d'amidon et des débris cellulaires. Les grains d'amidon sont ensuite purifiés de la manière suivante : le culot est remis en suspension dans un volume d'eau, auquel nous ajoutons 9 volumes de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suède). Au cours de la centrifugation à 10000 g pendant 45 min à 4°C, le Percoll forme un gradient de densité qui permet de séparer les débris cellulaires et l'amidon. L'amidon dont la densité est importante ( $d=1,3$  à  $1,5$ ) sédimente au fond du tube. Le culot est ensuite rincé quatre fois avec de l'eau désionisée et stocké à 4°C.

La longueur d'onde au maximum d'absorbance ( $\lambda$  max) du complexe iode-polysaccharide est déterminée par spectrométrie. A 100  $\mu\text{L}$  de polysaccharide dissous dans de la soude 10 mM, nous ajoutons 400  $\mu\text{L}$  d'une solution d'iode (1% KI ; 0,1%  $\text{I}_2$ ). Un balayage de 400 à 700 nm est ensuite réalisé.

### **3.3 Analyse structurale des polysaccharides.**

La diffraction aux rayons X grand angle et les analyses par microscopie électronique de transmission (MET) et à balayage (MEB) sont détaillées dans Buléon et coll. (1997).

Le fractionnement de l'amidon est réalisé par chromatographie de tamisage moléculaire sur une matrice sépharose CL-2B. La colonne ( $\varnothing=1,8$  cm ; H=150cm) est équilibrée dans de la soude 10 mM à un débit de 20 mL.h<sup>-1</sup>. L'échantillon d'amidon est préparé de la manière suivante : 1 à 10 mg d'amidon sont dissous dans 500  $\mu$ L de DMSO 90% à 100°C pendant 30 min. Le polymère est ensuite précipité par 4 volumes d'éthanol pur une nuit à -20°C. Après centrifugation à 3000 g pendant 10 min, le culot est dissout dans 2 mL de soude 10 mM puis déposé sur la chromatographie de tamisage moléculaire. Les fractions sont analysées par spectrophotométrie à l'iode comme décrit précédemment. Les fractions contenant le même polysaccharide sont quantifiées, groupées, dessalées par dialyse, et lyophilisées.

La comparaison de la masse moyenne de la fraction amylosique de la souche sauvage (137C) et de la souche mutante (JV45J) a été réalisée par chromatographie de tamisage moléculaire (CTM) sur Sépharose CL-2B (les caractéristiques de la colonne ont été décrites ci-dessus). Les deux amidons sont mélangés et déposés sur la même colonne de tamisage moléculaire. Pour distinguer les deux profils d'éluion, nous avons mélangé 10mg d'amidon de la souche sauvage et 500  $\mu$ g d'amidon <sup>14</sup>C de JV45J marqué *in vivo*. La quantité d'amidon de la souche sauvage étant importante, le complexe polysaccharide-iode est détectable par spectrophotométrie. Pour détecter l'amidon de la souche mutante, nous avons prélevé 100 $\mu$ L de chaque fraction et additionnés de 2 mL de liquide scintillant. Le comptage radioactif est réalisé avec un compteur Beckman.

L'amylopectine et l'amylose purifiés par CTM sont analysés par les techniques de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton. L'échantillon lyophilisé (0,5 à 1 mg) est resuspendu dans 500  $\mu$ L de D<sub>2</sub>O et lyophilisé. Puis l'échantillon est dissout dans un mélange de DMSO-D6/D<sub>2</sub>O (80/20). Suivant les paramètres décrit par Fontaine et coll. (1993), les analyses RMN sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Bruker AM-400WB équipé d'une sonde <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C de 5 mm à une température de 80°C ( $\delta$ -CH<sub>3</sub> du DMSO=2,66 ppm pour le proton).

Le débranchement enzymatique à l'isoamylase est réalisé de la manière suivante 0,5 à 5 mg de polysaccharide sont dissous dans 250  $\mu$ L de DMSO 90% pendant 20 min à 100°C. Le volume est ajusté à 2 mL avec du tampon acétate de sodium 55mM pH 3,5. L'isoamylase (4 unités) de *Pseudomonas amyloclavata* (Megazyme, Sydney, Australie) est ensuite ajoutée. Le débranchement

s'accompagne de l'augmentation du pouvoir réducteur. Le débranchement total est atteint après 5 heures d'incubation. La réaction est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 min.

L'équivalent de 250µg de glucanes est mis en suspension dans 5 µL d'APTS (acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique) 0,2 M, solubilisés dans l'acide acétique 15% et 5 µL d'une solution de cyanoboroxyde de sodium 1 M fraîchement préparée. Les glucanes sont ensuite placés à 37°C à l'abri de la lumière pendant une nuit.

Pour l'analyse en électrophorèse de haute résolution dans un séquenceur d'ADN, les échantillons sont complétés avec 90µL de tampon TRIS 0,04 M, acide borique 0,04 M, urée 6 M pH 8,6. L'échantillon (1 µL) est alors déposé sur un gel de polyacrylamide 20% (acrylamide : bisacrylamide, 37,5:1) tamponné avec le tampon TRIS 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA 0,002 M urée 8,3 M pH 8,6. La migration est réalisée à 4°C dans le même tampon avec une puissance constante de 1250 W. L'appareil utilisé pour l'électrophorèse est un MacroPhor (Pharmacia). La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un fluoromètre Molecular Dynamics 595 et du logiciel Image Quant.

La séparation des glucanes marqués à l'APTS a aussi été effectuée avec un appareil d'électrophorèse capillaire (P/ACE 5510 ; Beckman Instruments) équipé d'un détecteur de fluorescence. Le capillaire eCAP™ et le tampon de migration sont fournis avec le Kit de séparation des oligosaccharides (Beckman). Les différents paramètres utilisés pour la séparation des oligosaccharides marqués sont décrits par O'Shea et coll. (1998).

### **3.4 Préparation des extraits bruts, dosage enzymatique, purification partielle des activités enzymatiques, zymogrammes.**

Les extraits bruts sont toujours préparés à partir de culture en fin de phase exponentielle de croissance ( $2 \cdot 10^6$  cellules par mL). Les cultures sont réalisées dans un milieu HSA (High Salts Acetate) sous illumination continue ( $40 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ). Tous les dosages d'activités enzymatiques sont réalisés en conditions de linéarité. La phosphoglucomutase (PGM), l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) et les activités phosphorylases (STP) sont dosées selon les protocoles standards décrits dans Ball et coll. (1991) et Van den Koornhuysen et coll. (1996). Pour les amidon-synthétases solubles (SS) et les enzymes de branchement (BE), les dosages sont décrits par Fontaine et coll. (1993) et Libessart et coll. (1995). La GBSS a été dosée selon le protocole de Delrue et coll. (1992) à partir d'amidon purifié d'une culture non carencée en azote. L'activité  $\alpha$ -glucosidase a été dosée en utilisant comme substrat du

maltose dans un tampon acétate de sodium 50 mM, pH 6.5. La production de glucose est suivie par le dosage standard à la glucose-6-phosphate déshydrogénase comme décrit dans Ball et coll. (1991). L'analyse a été complétée par les techniques de zymogramme (Buléon et coll., 1997 ; Mouille et coll., 1996).

L'activité de l'enzyme D a été suivie en mesurant la production de glucose à partir de maltotriose comme substrat. Les protéines totales (20 à 200 µg) d'un extrait brut sont tamponnées avec de l'acétate de sodium 50 mM, pH 6.5 (volume final de 1 mL). Les échantillons sont incubés 5 à 30 min à 30°C avec 50 mM de maltotriose. Le glucose libéré est phosphorylé par l'hexokinase, puis oxydé en acide 6-phosphogluconate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Au cours de cette réaction le NADP est réduit en NADPH, H<sup>+</sup> et l'absorbance de ce dernier est mesurée à 365 nm, comme il est décrit dans Ball et coll. (1991).

L'activité disproportionnante peut être suivie par zymogramme en conditions de migration native ou dénaturante. La dénaturation des extraits s'effectue dans un volume final de 100 µL. Les protéines (200 µg à 500 µg) sont dénaturées par chauffage à 100°C pendant 5 min dans un tampon de dénaturation (25 mM Tris/glycine pH 8,3, 1% SDS, 5% de β-mercaptoéthanol). L'équivalent de 200 à 500 µg de protéines d'un extrait brut dénaturé ou non est déposé sur un gel de polyacrylamide à 7,5% (30:1 acry/bis) et de 1,5 mm d'épaisseur. Le gel en conditions dénaturantes contient 0,1% SDS. La migration à 15 V.cm<sup>-1</sup> est réalisée pendant 90 min à 4°C. A la fin de la migration, les gels sont lavés quatre fois avec une solution de Tris 40 mM. Au cours des lavages, le SDS est éliminé et les protéines se renaturent. Les gels renaturés et natifs sont incubés une nuit à température ambiante dans 30 mL de maltotriose 3 mg.mL<sup>-1</sup> ; 200 mM Tris/HCl pH 8 ; 1 mM EDTA ; 42 mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,014% NADP ; 0,027%NAD ; 0,027% MTT ; 0,015% PMS ; 1,5 mM ATP ; 1 U.mL<sup>-1</sup> d'hexokinase, 0,5 U.mL<sup>-1</sup> glucose-6-phosphate déshydrogénase. Le gel est rincé à l'eau puis photographié.

Pour être certain que l'activité de la protéine de 62 kD correspond à une activité disproportionnante, nous avons coupé une bande de gel de 5 mm de large contenant l'activité renaturée. Le gel est incubé avec du maltotriose et du maltoheptaose à une concentration finale de 2 mM, dans un tampon acétate 50 mM, pH 6. Après une nuit d'incubation les morceaux de gel sont retirés et le tampon est lyophilisé. Le lyophilisat est dissout dans 50 µL d'eau distillée. Les échantillons sont analysés en chromatographie haute performance d'échange d'anions avec une détection ampérométrique à champ pulsée (HPAE-PAD). Les paramètres et les solvants utilisés sont décrits dans Fontaine et coll., (1993). La quantité

relative de chaque malto-oligosaccharide est appréciée en intégrant l'aire de chaque pic. Des incubations avec l'enzyme semi-purifiée ont aussi été réalisées avec différents malto-oligosaccharides : glucose, maltose, maltotriose, maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose et maltoheptaose, à une concentration finale de 2 mM dans un tampon acétate 50 mM pH 6. Après une nuit d'incubation, chaque échantillon (4 $\mu$ L) sont déposés sur une plaque de gel de silice 20 X 20 cm (Silica gel 60 : Merck). La migration s'effectue avec le mélange butanol/éthanol/eau (5/5/4) pendant 120 minutes. Les malto-oligosaccharides séparés sont révélés en vaporisant de l'orcinol sulfurique (2 g d'orcinol dissout dans 20% d'acide sulfurique) et en incubant la plaque 10 min à 80°C.

### 3.5 Purification des oligosaccharides.

Les malto-oligosaccharides sont préparés à partir de 3 L de cultures carencées en azote, inoculées à 5.10<sup>5</sup> cellules par mL et récoltées après 7 jours de culture, en conditions de lumière continue (40 $\mu$ E m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) en milieu HSA (Harris 1989 a et b) sous agitation. Les algues sont lysées par passage à la presse de French (10000 p.s.i.) à une densité de 10<sup>8</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> dans l'eau. L'extrait brut est immédiatement congelé à -80°C. Après décongélation, les débris cellulaires sont retirés par centrifugation à 10000 g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est bouilli pendant 5 minutes pour inactiver les activités enzymatiques et centrifugé à 10000 g pendant 15 min. Le surnageant est ensuite lyophilisé. Le matériel lyophilisé est resuspendu dans 1 mL d'eau distillée puis déposé sur une colonne Dowex 50:2 (1 x 6 cm) couplée en série à une colonne Dowex 1:2 (1 x 6 cm) équilibrée avec de l'eau. 4  $\mu$ L de chaque fraction (1 mL) sont déposés sur une couche mince (Silica gel 60 : Merck). Les malto-oligosaccharides sont révélés en vaporisant de l'orcinol sulfurique (2 g d'orcinol dissout dans 20% d'acide sulfurique). La couche mince est incubée à 80°C pendant 10 min. Après avoir rassemblé les fractions, une goutte d'hydroxyde d'ammonium 30% est ajoutée pour neutraliser l'échantillon. Celui-ci est ensuite concentré par évaporation sous vide puis dessalé sur une colonne de chromatographie de tamisage moléculaire TSK HW 40 (Merck) équilibrée avec de l'acide acétique 0,5%. Le produit dessalé est concentré par évaporation sous vide et lyophilisé. L'échantillon est conservé à température ambiante jusqu'à l'analyse en RMN du proton.

### 3.6 Les expériences de dosage de gène.

Les diploïdes et les triploïdes sont construits de la manière suivante. Pour obtenir les diploïdes homozygotes mutants, nous avons croisé CO216 (*mt<sup>-</sup> ac14 nit1 nit2 stall-1*) et CO27 (*mt<sup>+</sup> pab2 nit1 nit2 stall-1*) et sélectionné les diploïdes après 4 jours de croissance sur un milieu minimum supplémenté en ammonium. Les diploïdes hétérozygotes montrent une polarité sexuelle de type *mt<sup>-</sup>*. Après un contrôle du phénotype, du volume cellulaire, du contenu en protéine et de la polarité sexuelle, nous avons croisé le mutant homozygote avec la souche CO29 pour obtenir un triploïde homozygote mutant ou avec la souche 37 pour obtenir le triploïde *stall-1/stall-1/+*. Pour obtenir le diploïde homozygote sauvage, nous avons croisé les souches CO218 (*mt<sup>-</sup> ac14 nit1 nit2*) et CO42 (*mt<sup>+</sup> pab2 ac14*). Les colonies sont sélectionnées sur milieu minimum supplémenté en acétate (Ball et coll., 1991). Le diploïde homozygote sauvage est croisé avec la souche CO35 (*mt<sup>+</sup> pab2 nit1 nit2*) pour obtenir le triploïde sauvage (+/+/) et avec la souche CO 26 (*mt<sup>+</sup> pab2 nit1 nit2 stall-1*) pour obtenir le génotype +/+/*stall-1*. Les souches triploïdes sont sélectionnées sur milieu minimum avec du nitrate comme source d'azote. Le diploïde hétérozygote a été obtenu en croisant la souche mutante JV45J et la souche sauvage 37. Les diploïdes hétérozygotes ont été sélectionnés sur milieu minimum avec du nitrate comme source d'azote. Après sélection sur les milieux appropriés, la nature haploïde, diploïde, triploïde des clones est confirmée en testant les phénotypes et en mesurant à la fois la distribution moyenne du volume cellulaire et du contenu protéique des cellules en culture asynchrone. Nous avons confirmé les polarités sexuelles des clones. Pour chaque construction, nous avons sélectionné trois clones indépendants. Les dosages de gène représentent ainsi la moyenne de trois colonies séparées pour chaque génotype. L'activité phosphoglucomutase a été dosée (Ball et coll., 1991) et utilisée comme standard interne durant ces expériences.

## 4. Résultats

5.10<sup>4</sup> colonies ont été criblées par la technique de coloration aux vapeurs d'iode après mutagenèse aux U.V. de la souche sauvage (137C). Nous avons isolé un mutant appauvri en amidon (JV45J) de phénotype jaune. Ce dernier accumule seulement 8 ± 3 % de la quantité normale d'amidon relativement à une souche normale, dans les conditions optimales de synthèse (Fig.1). La quantification de l'amidon accumulé a été réalisée en culture liquide carencée en azote grâce au dosage du glucose libéré par digestion du polysaccharide à l'amyloglucosidase.

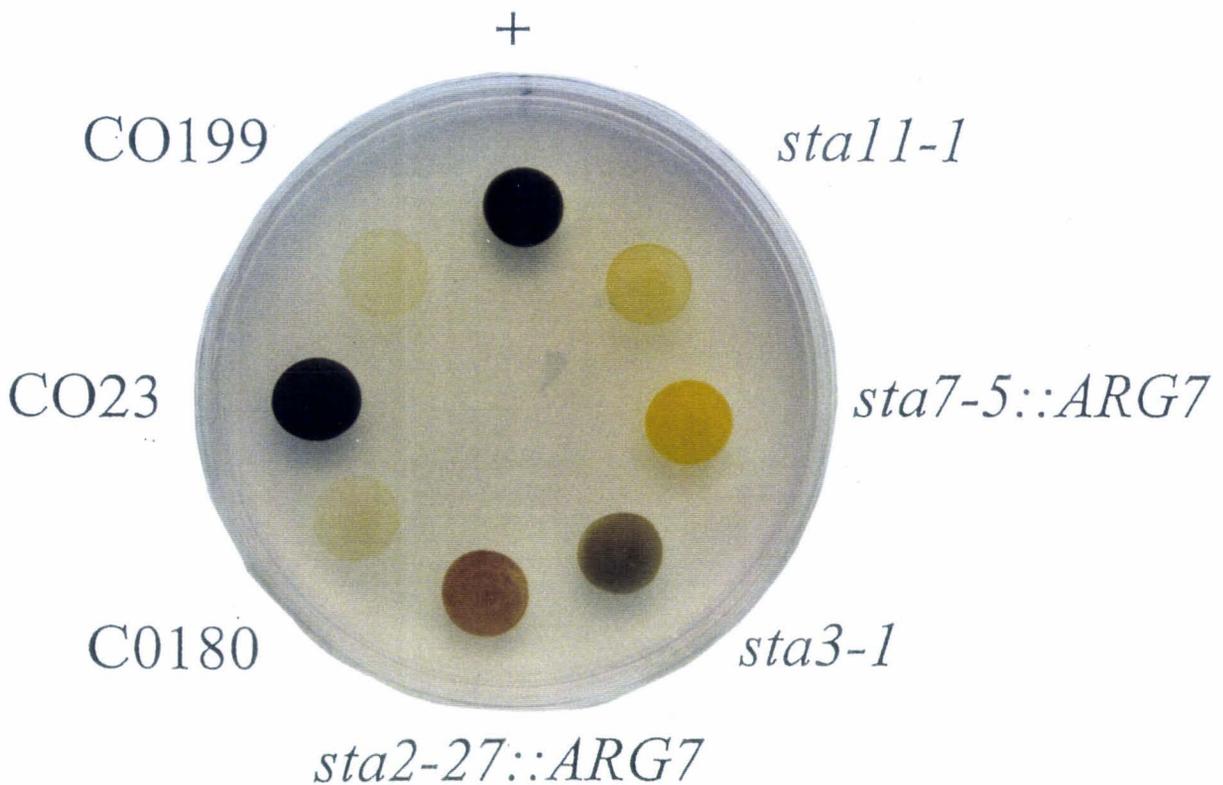
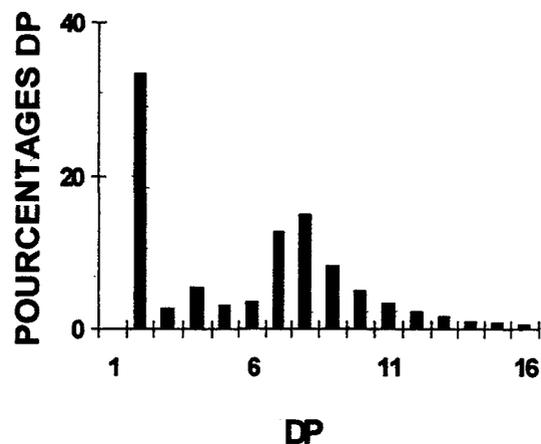


Figure 1 : Phénotypes de souches sauvages et mutantes après coloration aux vapeurs d'iode

Les suspensions cellulaires sont déposées puis cultivées pendant 7 jours sur un milieu gélosé dépourvu en azote. Les génotypes *sta2-27::ARG7*, *sta3-1*, *sta7-5::ARG7* correspondent respectivement aux déficiences pour la GBSSI, la SSIII, l'enzyme de débranchement (Delrue et coll., 1992 ; Fontaine et coll., 1993 ; Mouille et coll., 1996). La souche mutante d'origine JV45J (*sta11-1*) et deux ségrégeants CO199 et CO180 montrent la même coloration typique d'un mutant à faible teneur en amidon tandis que le ségrégeant sauvage CO23 montre une coloration bleu-noir typique de la souche de référence sauvage (+).

La mutation portée par la souche JV45J est récessive et montre une ségrégation Mendélienne normale après croisement avec une souche de phénotype sauvage. Des tests de complémentation ont

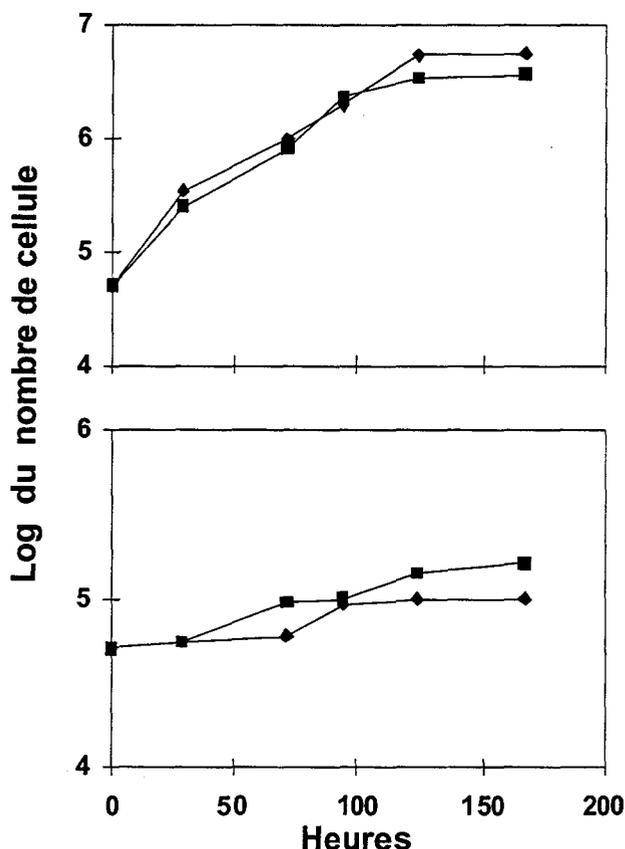


**Figure 3. Distribution relative des malto-oligosaccharides produits par la souche mutante JV45J *sta11-1*.**

Les malto-oligosaccharides linéaires accumulés par la souche de référence JV45J sont marqué à l'APTS. Ils sont ensuite séparés selon leur longueur de taille sur un gel de séquence d'ADN. Le degré de polymérisation de 1 à 16 et le pourcentage relatif de chaque malto-oligosaccharide est indiqué respectivement sur l'axe des abscisses et des ordonnées.

été entrepris en croisant les souches portant une défectuosité pour les gènes *STA1*, *STA2*, *STA3*, *STA4*, *STA5*, *STA6*, *STA7* et *STA8* avec des souches *stall-1*. Tous les diploïdes engendrés lors ces croisements accumulent une quantité normale d'amidon. Cette série de test définit donc un nouveau groupe de complémentation que nous dénommerons *STAl1*.

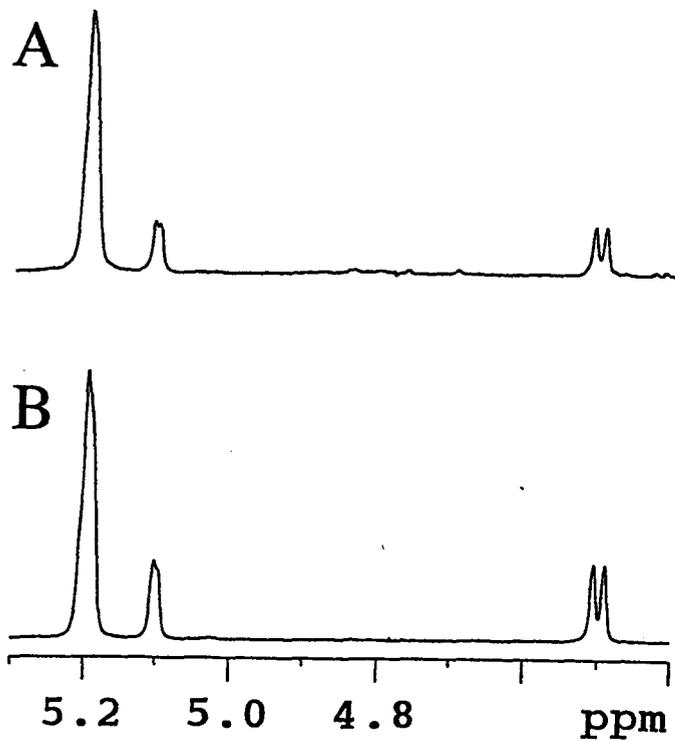
Nous avons noté la présence dans le surnageant des souches mutantes *stall-1* d'une quantité accrue de matériel dosable par l'amyloglucosidase. Ce matériel soluble représente 2% de la quantité de référence correspondant à l'amidon accumulé par une souche sauvage (soit 0,1 à 0,7 µg de matériel soluble pour 10<sup>6</sup> cellules). Pour compléter l'étude sur la mutation *stall-1*, une étude de croissance a été réalisée pendant une semaine en lumière continue ou en cycle jour-nuit (12H/12H) en présence ou non d'acétate. Quelles que soient les conditions de culture utilisées, nous n'avons pas observé de différence de croissance entre les souches sauvages et mutantes au locus *STAl1* (Fig. 2).



**Figure 2: Courbes de croissance des souches sauvages et mutantes *stall-1* en cycle jour-nuit.** Les précultures non synchronisées de 3 ségrégeants mutants et 3 ségrégeants sauvages provenant du croisement impliquant JV45J et 37 sont cultivées en milieu TAP (Harris, 1989b) jusqu'à la phase stationnaire ( $2 \cdot 10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>). Les cultures sont inoculées à  $5 \cdot 10^4$  cellules.mL<sup>-1</sup> et soumises à un cycle jour-nuit (12H/12H) à 20°C sous agitation vigoureuse. (A) Milieu TAP (avec acétate). Les moyennes des comptages cellulaires des mutants (■) et des sauvages (◆) sont indiquées comme le log du nombre de cellules en fonction du temps. (B) Milieu TP (sans acétate). Les moyennes des comptages cellulaire des mutants (■) et des sauvages (◆) sont indiquées comme le log du nombre de cellules en fonction du temps. La quantité de CO<sub>2</sub> disponible est fortement limitante dans ces conditions de culture. Cependant, même si la croissance des souches s'avère réduite dans ces conditions, les courbes sont parfaitement comparables pour les deux souches.

#### 4.1 Caractérisation du matériel soluble dans l'eau, digestible par l'amyloglucosidase

Aucun matériel de haut poids moléculaire (DP>100) soluble dans l'eau n'a été détecté dans les souches *stall-1*. En effet, la quantité de matériel exclu lors de la chromatographie de tamisage moléculaire sur gel TSK HW40 représente moins de 1% de la quantité totale de polysaccharide trouvée



**Figure 4 : Analyse RMN du proton des malto-oligosaccharides produits par la souche mutante JV45J (*sta11-I*).** Partie du spectre RMN du proton de l'amylopectine dans le diméthyl-sulfoxyde-d<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O (80/20) à 80°C. La résonance des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  des extrémités réductrices sont respectivement à 5,1 et 4,5 ppm. Les protons anomériques de la liaison  $\alpha$ -1,6 auraient du être à 4,85 ppm si elles étaient présentes. L'intégration des signaux des anomères  $\alpha$  et  $\beta$  divisés par l'intégration des signaux des protons anomériques des liaisons  $\alpha$ -1,4 à 5,2 ppm donne un DP moyen de trois résidus de glucose. Les conditions de RMN sont similaires à ceux décrit dans Delrue et coll., (1992).  
 (A) Malto-oligosaccharides purifiés de la souche JV45J.  
 (B) Maltotriose de référence.

dans l'extrait brut. Le matériel soluble dans l'eau accumulé par les souches mutantes au locus *ST11*, est donc formé uniquement de glucanes courts liés en  $\alpha$ -1,4 dont la distribution de taille est visualisée dans la figure 3.

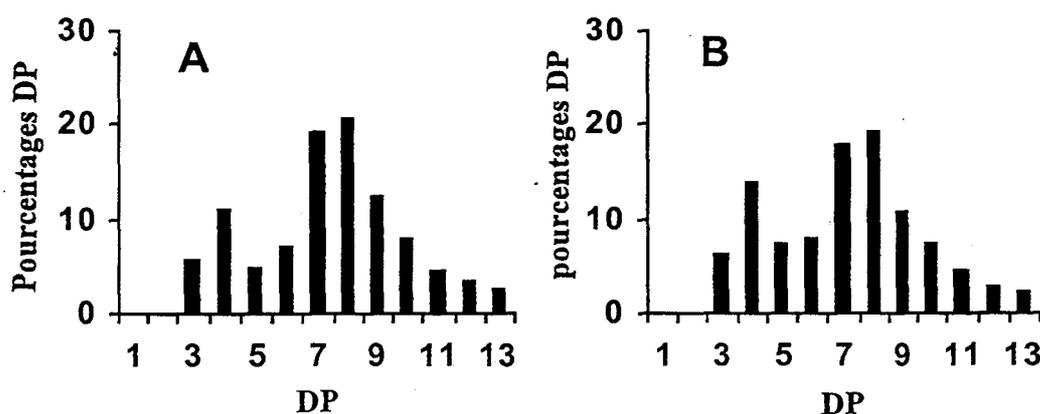
Ceux-ci ont été purifiés (tableau I) afin de les soumettre à une caractérisation structurale détaillée. Cette étape de purification ne modifie pas le profil de distribution de la longueur des chaînes de ces glucanes. Après purification, le mélange d'oligosaccharides extrait de la souche *st11-1* génère un spectre de RMN du proton équivalent à celui du maltotriose standard (Fig. 4).

Extrait	Quantité de polysaccharide <sup>a</sup>	Rendement
Extrait brut	3,1 mg	100%
Lyophilisat	2 mg	65%
Dowex 50:1, 1:2	1,5 mg	50%
TSK HW40	1,43 mg	46%

**Tableau I: Table de purification des malto-oligosaccharides.**

<sup>a</sup> : Les quantités de polysaccharide sont mesurées par le kit de dosage à l'amyloglucosidase. La purification rapportée a été menée sur 3 L de cultures carencées en azote de la souche mutante JV45J.

Comme le démontre l'analyse RMN, le taux de branchement des oligosaccharides tombe très en dessous du seuil de détection (1 %). De plus les profils de distribution de taille des oligosaccharides traités ou non par une enzyme de débranchement (l'isoamylase) ne montrent pas de différences majeures (Fig. 5).



**Figure 5 : Incubation des malto-oligosaccharides de JV45J avec une isoamylase.**

(A) Distribution des malto-oligosaccharides accumulés par la souche JV45J. Les malto-oligosaccharides sont séparés selon leur longueur sur un gel de séquence d'ADN après marquage fluorescent à l'APTS.

(B) Distribution des malto-oligosaccharides accumulés par la souche JV45J, après incubation avec l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*. Les malto-oligosaccharides sont séparés selon leur longueur sur un gel de séquence d'ADN après marquage fluorescent à l'APTS.

Souche	Génotype	Ap $\lambda$ max <sup>a</sup>		amidon <sup>b</sup>		MOS <sup>c</sup>		Am% <sup>d</sup>	
		-N	+N	-N	+N	-N	+N	-N	+N
CO 23	+	560	566	13	1,2	0,018	0,011	14	1
CO 65	+	542	570	24,7	0,4	0,001	0,007	15	2
CO 35	+	554	564	22,8	0,91	0,017	0,012	25	5
CO 99	+	543	ND	20	ND	0,011	ND	19	ND
CO 192	+	542	ND	36	ND	0,053	ND	18	ND
CO 176	+	540	ND	40	ND	0,05	ND	16	ND
CO 218	+	550	ND	27,8	ND	0,02	ND	20	ND
CO 29	<i>stall-1</i>	570	576	1,7	1	0,45	0,45	38	7
CO 137	<i>stall-1</i>	564	572	0,83	2	0,17	0,3	25	10
CO 214	<i>stall-1</i>	562	575	0,78	0,31	0,2	0,2	24	12
CO 180	<i>stall-1</i>	575	ND	1,4	ND	0,62	ND	28	ND
CO 13	<i>stall-1</i>	573	ND	1,3	ND	1	ND	23	ND
CO 216	<i>stall-1</i>	570	ND	2,29	ND	0,55	ND	22	ND
CO 27	<i>stall-1</i>	575	ND	3,6	ND	0,6	ND	25	ND

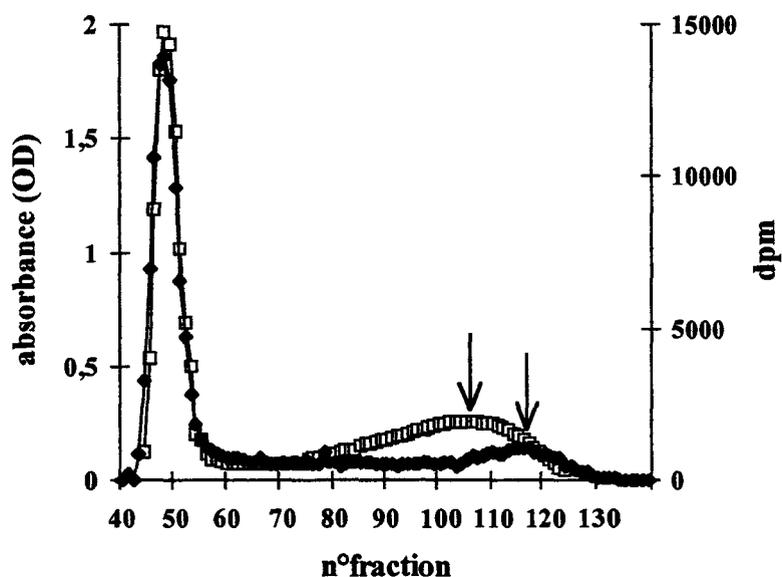
**Tableau II. Phénotypes des souches sauvages et mutantes au cours de la synthèse de l'amidon de réserve et de l'amidon transitoire.** Les valeurs indiquées sont obtenues par trois mesures différentes lors de la même expérience.

<sup>a</sup> : longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode-polysaccharide de l'amylopectine purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire.

<sup>b</sup> : quantité de polysaccharide insoluble (amidon) exprimée en  $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$  cellules, purifié par sédimentation et mesuré par dosage à l'amyloglucosidase.

<sup>c</sup> : quantité de malto-oligosaccharides solubles exprimée en  $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$  cellules.  $0,5 \mu\text{g} \cdot 10^{-6}$  cellules correspond à une concentration plastidiale calculée de 10 mM si tous les MOS étaient du maltotriose.

<sup>d</sup> : le pourcentage d'amylose a été calculé après chromatographie de tamisage moléculaire d'un amidon purifié et dispersé



**Figure 7: Comparaison des fractions amylosiques de la souche sauvage (137C) et de la souche mutante (JV45J).** 10 mg d'amidon de 137C ont été mélangés avec 500  $\mu\text{g}$  d'amidon de JV45J marqué au  $^{14}\text{C}$ . Les deux amidons ont été préparés à partir de cultures carencées en azote ne contenant pas d'acétate. L'amylopectine et l'amylose ont été séparées par chromatographie de tamisage moléculaire (gel sépharose CL-2B). Pour chaque fraction (300  $\mu\text{L}$ ), l'absorbance (□) est déterminée à la  $\lambda_{\text{max}}$  et les taux de radioactivité (◆) sont mesurés par scintillation. Rappelons que le coefficient d'extinction du complexe amylose-iode est plus élevé que celui de l'amylopectine, la souche sauvage n'accumule donc pas plus d'amylose que la souche mutante. Les flèches indiquent les maxima d'absorbance et de radioactivité des amyloses provenant respectivement de la souche sauvage (137C) et de la souche mutante (JV45).

Il semble donc que les malto-oligosaccharides produits par la souche JV45J soient non ramifiés. La coségrégation entre la présence de la fraction malto-oligosaccharidique et la faible teneur en amidon a été établie pour tous les ségrégeants portant la mutation *stall-1* (n=50).

#### 4.2 Caractérisation de l'amidon résiduel accumulé par les mutants *stall-1*.

La séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie de tamisage moléculaire de l'amidon résiduel des souches mutantes *stall-1* montre un enrichissement de celui-ci en amylose (tableau II). De plus, les profils chromatographiques présentés dans la Figure 6A et 6B suggèrent que la fraction amylosique de la souche mutante *stall-1* se caractérise par une masse moyenne plus faible. Nous avons confirmé cette observation en déposant sur la même colonne un mélange d'amidon formé d'une faible quantité d'amidon marqué au  $^{14}\text{C}$  de la souche mutante *stall-1* avec une quantité 20 fois plus importante d'amidon extrait de la souche sauvage (Fig. 7).

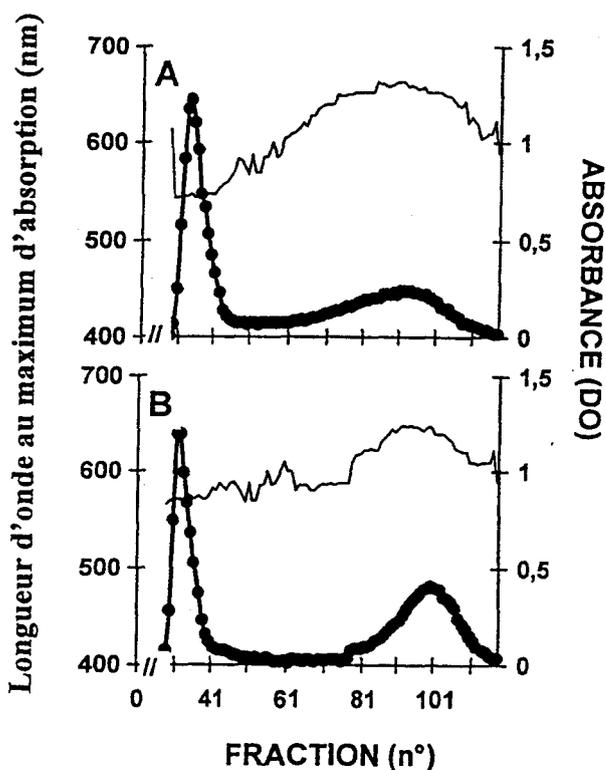
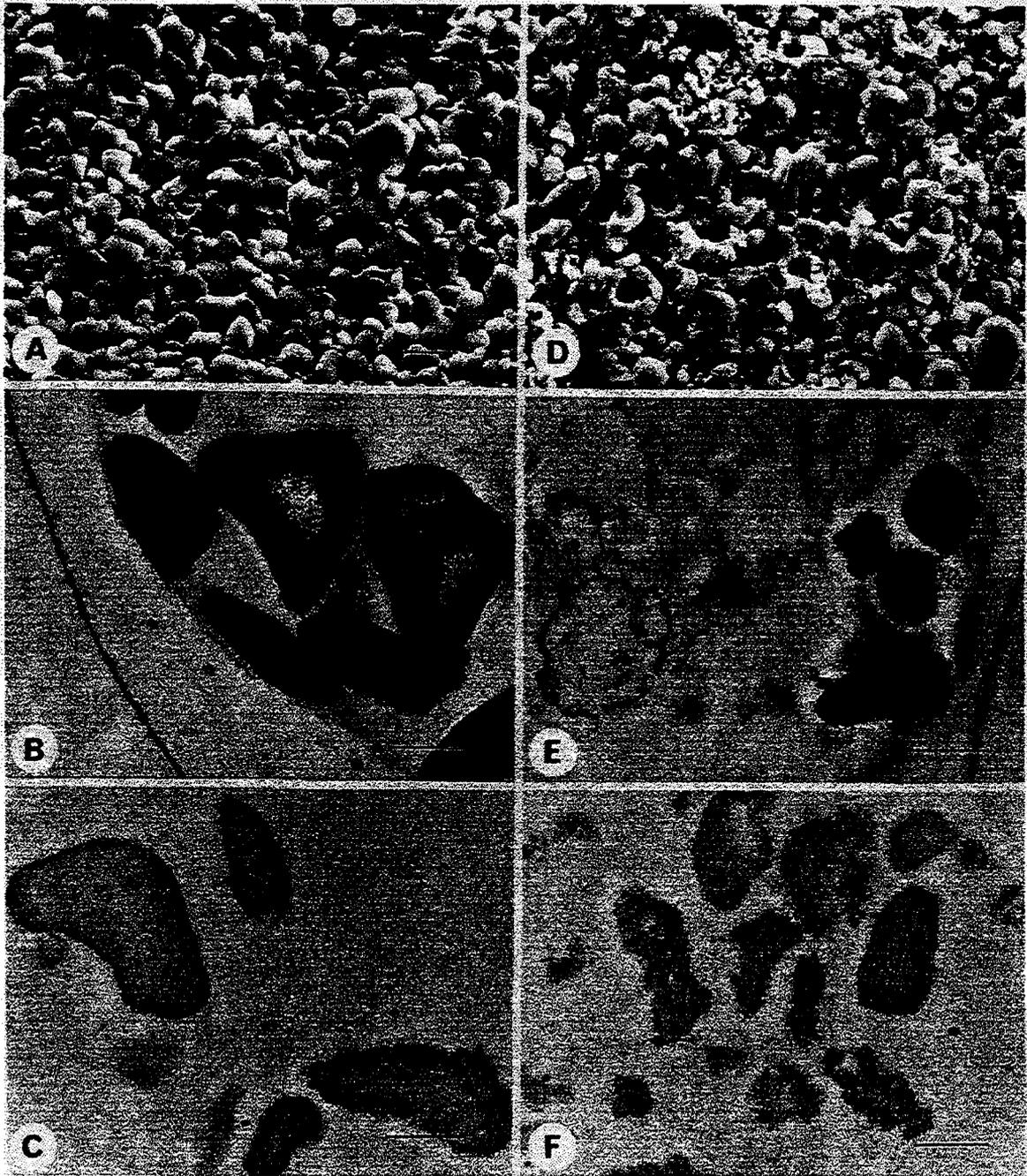


Figure 6 : Séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie sur Sépharose CL-2B.

La  $\lambda_{\text{max}}$  (trait fin continu) et l'absorbance correspondante (●) sont mesurées pour chaque fraction (2 mL). L'amidon de la souche haploïde sauvage 137C (A) et de la souche mutante JV45J (*stall-1*) (B) sont extraits à partir de cultures carencées en azote. Le taux d'amylose et d'amylopectine est déterminé pour chaque souche après avoir rassemblé les fractions correspondantes et mesuré la quantité de glucose par dosage à l'amyloglucosidase.

La diffraction des rayons X sur l'amidon résiduel révèle un changement de cristallinité (Fig. 9). En effet, celui-ci passe d'une cristallinité de type A, caractéristique d'un amidon sauvage, vers une cristallinité plus faible (mélange de type A et B). En outre, la microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB) montrent que la forme des grains d'amidon est particulièrement affectée comme



**Figure 8: Microscopies électroniques à transmission et à balayage des amidons provenant de la souche sauvage et de la souche mutante.** Les figures représentent des grains d'amidon purifiés et des coupes microscopiques de cellules carencées en azote de la souche sauvage 137C (de A à C) et de la souche mutante JV45J (de D à E) de *C.reinhardtii*. A et D représentent les microscopies électroniques à balayage des grains d'amidon purifiés. (B et E) et (C et F) représentent des observations en microscopie électronique à transmission de coupes de cellules contenant de l'amidon (B et E) (barre=0.5 $\mu$ m) et des amidons purifiés (C et F) (barre=0.5 $\mu$ m) après coloration au PATAg.

l'illustre la Figure 8. Les grains d'amidon de la souche mutante *sta11-1* ont une taille moyenne plus petite et une surface rugueuse et hautement irrégulière, contrairement à la souche sauvage où la surface des grains est lisse et régulière.

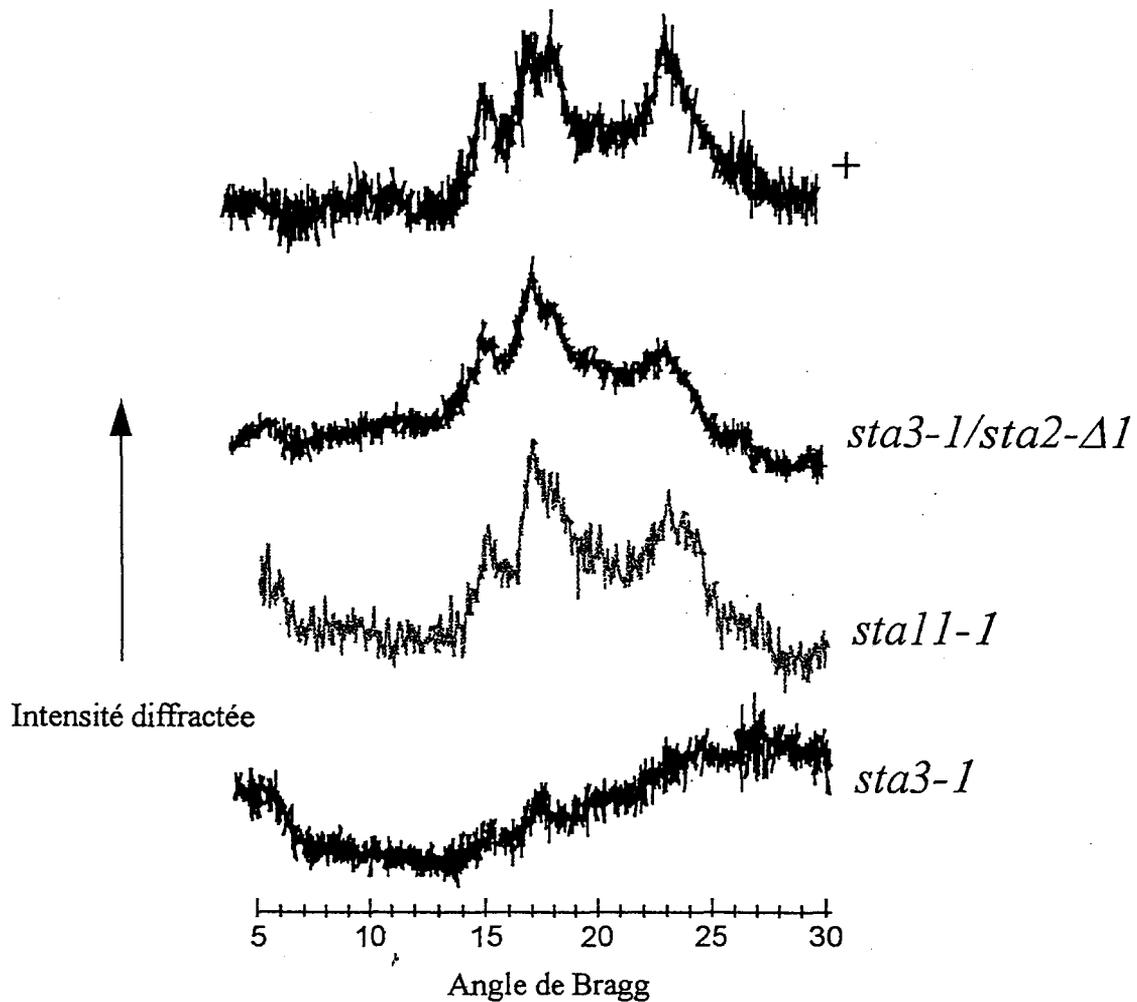
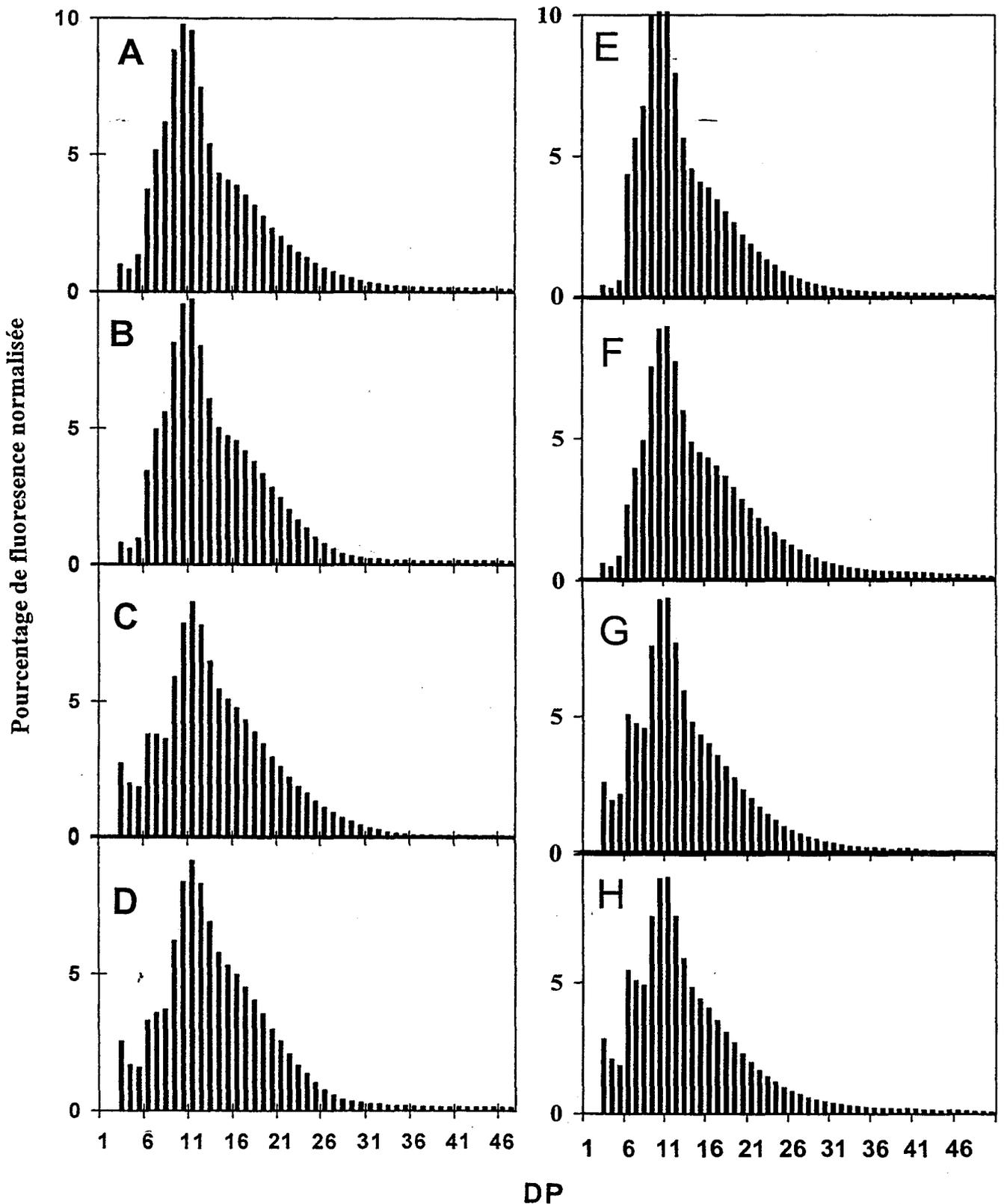
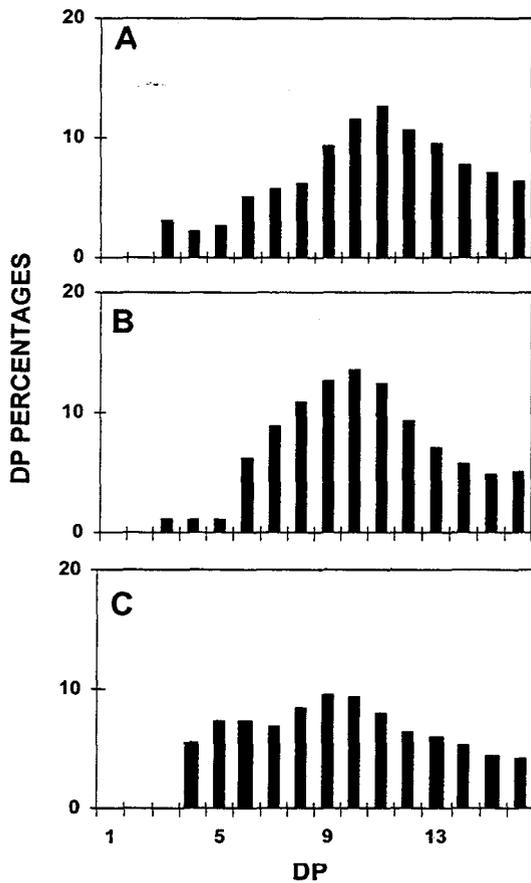


Figure 9: Spectres de diffraction des rayons X à grand angle des amidons produits par quatre souches de *Chlamydomonas reinhardtii* (expériences réalisées par A. Buléon). Les profils de la souche sauvage 137C (+) et de la souche I152 affectée dans l'amidon-synthétase III ou SSIII (*sta3-1*) donnent respectivement un profil de diffraction de type A et de type B. La souche mutante JV45J (*sta11-1*) et le double mutant dépourvu des activités SSIII et GBSS (*sta3-1/sta2-Δ1*) affichent un même profil de diffraction de type C qui est un intermédiaire entre les profils A et B. La cristallinité la plus élevée (28 %) est toujours associée au profil de diffraction de type A alors que la cristallinité la plus faible (5 à 10 %) est associée au profil de diffraction de type B. Le profil de diffraction de type C représente un intermédiaire de cristallinité (20 %).

L'amylopectine (Fig. 10) et l'amylose purifiées ont été soumises au débranchement enzymatique. Les chaînes obtenues ont été marquées à l'APTS puis séparées selon leur longueur sur un gel de séquence d'ADN. Cette analyse a été menée lors d'un séjour de deux mois passés au laboratoire de Matthew Morell au CSIRO de Canberra.



**Figure 11 : Distributions en longueur de chaînes de l'amylopectine provenant de souches sauvages et mutantes.** Les profils de distributions en longueur de chaînes des amylopectines débranchées de souches sauvages et mutantes sont confirmés par l'électrophorèse capillaire. Les glucanes sont marqués suivant la procédure décrite par O'Shea et al., (1998). Le pourcentage relatif des chaînes correspondant à chaque DP est strictement équivalent au pourcentage de fluorescence normalisée. A, B, E et F correspondent aux souches sauvages 137C (A), CO65 (B), CO218 (E) et CO99 (F), tandis que C, D, G et H correspondent aux souches JV45J (C), CO29 (D), CO13 (G), CO216 (H) portant la mutation *stall-1*.



**Figure 10: Distributions en longueur de chaîne de l'amylopectine sauvage et mutante.**

Les chaînes obtenues après débranchement à l'isoamylase sont séparées selon leur longueur sur un gel de séquence d'ADN, après un marquage à l'APTS. Le pourcentage de chaque chaîne (de DP1 à 16) est représenté sur l'axe des ordonnées

(A) Amylopectine purifiée du mutant JV45J après débranchement

(B) Amylopectine de référence (extrait de la souche BAFR1 sans-amylose) après débranchement

(C) Profil de distribution en longueur de chaînes de l'amylose débranchée de la souche mutante JV45J. Comme dans le cas d'une souche sauvage, nous retrouvons une distribution bimodale de la répartition des chaînes avec des maxima aux DP 6 et DP9 (Maddelein et coll., 1994).

Pour l'amylose nous n'avons pas noté, après débranchement, de changement dans la distribution en longueur de chaînes. Par contre, pour l'amylopectine nous observons (Fig.10 A et B) une modification significative de cette distribution conduisant à l'augmentation des DP 3, 4, 5, ainsi que des DP12 à 16 aux dépens des DP 6 et 11.

L'électrophorèse capillaire confirme ces différences pour deux souches mutantes et deux souches sauvages (Fig. 11).

Les profils de distribution sont résumés dans l'analyse soustractive de la Figure 12. Celle-ci montre clairement que l'amylopectine des mutants est enrichie en chaînes courtes (DP3-5 aux dépens des DP 6-11). L'augmentation notée précédemment pour les DP 12 à 14, bien qu'elle soit significative, s'encadre dans les variations naturelles observées pour chaque classe de génotype.

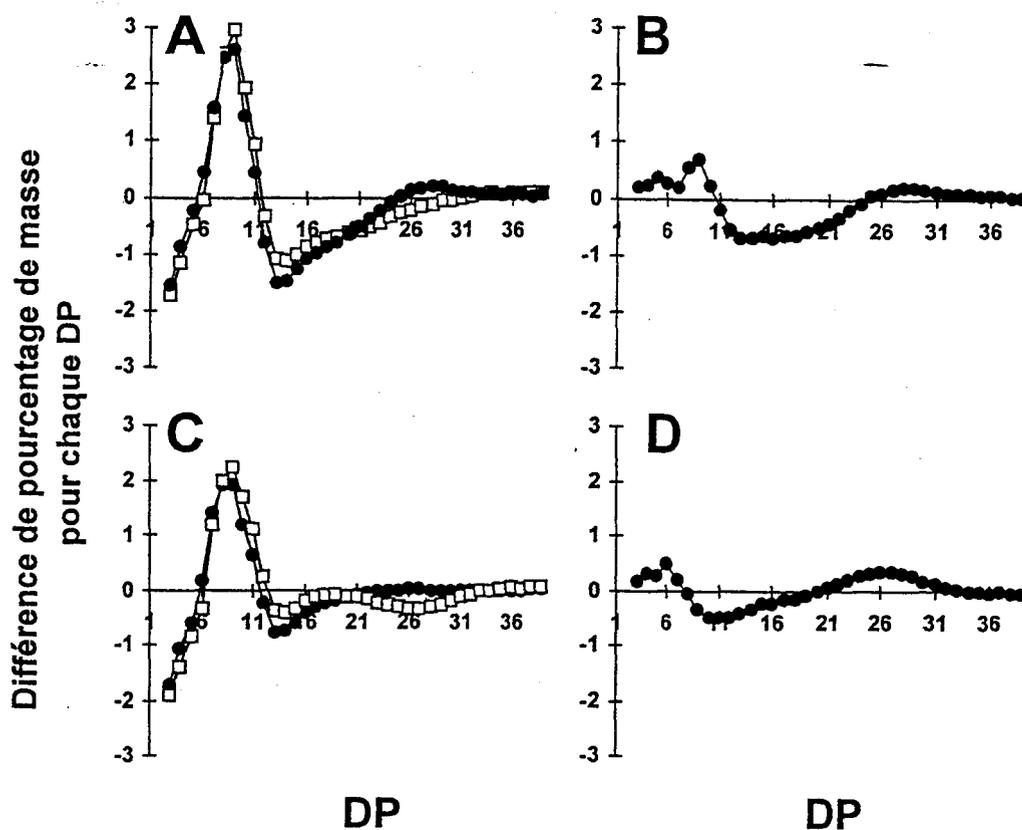
Enzyme	Souches sauvages <sup>a</sup>	Souches mutantes <sup>a</sup>	Zymogrammes <sup>b</sup>
AGPase	3.2 ± 0.2 (4)	4.2 ± 0.2 (6)	no
STP	20 ± 4 (6)	20 ± 2 (4)	yes (7,15)
Pgm	6.7 ± 2.9 (6)	6 ± 2 (4)	yes (10,8)
SS	2.4 ± 1(5)	2.3 ± 0.7(4)	yes (9,9)
BE	0.6 ± 0.2 (6)	0.5 ± 0.2 (6)	yes (6,4)
GBSS	45 ± 10 (2)	42 ± 8 (3)	no
α-glucosidase	5.8 ± 0.8 (9)	4.6 ± 1 (7)	no
Limit-dextrinase	0.37 ± 0.1 (6)	0.34 ± 0.1 (6)	no
α-amylase	N/A	N/A	yes (22, 20)
Isoamylase	N/A	N/A	yes (22, 20)
D-enzyme	83 ± 4 (10)	1.3 ± 0.5 (10)	yes (36, 39)

**Tableau III : Activités enzymatiques de ségrégeants sauvages et mutants *stall-1*.**

L'activité AGPase (dosée dans la direction de pyrophosphorolyse en présence de 1,5 mM 3-PGA), les activités STP et Pgm sont exprimées en nmoles de G-1-P produit par minute et par mg de protéine. Les activités SS et GBSS sont exprimées en nmoles d'ADPG incorporé sur le polysaccharide par minute par mg de protéine (SS) ou mg d'amidon (GBSSI). L'activité BE est exprimée en nmoles de G-1-P incorporés sur le polysaccharide.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéine (dosage amplifié à la phosphorylase). La limit dextrinase et l'enzyme D sont exprimées respectivement en nmoles de maltotriose formés du pullulan. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéine et en nmoles de glucose formés du maltotriose. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéine. L'activité α-glucosidase est exprimé en nmoles de glucose formés du maltose. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protein.

<sup>a</sup>: Les nombres entre parenthèse correspondent aux nombres de souches examinées.

<sup>b</sup>: Les deux nombres entre parenthèse correspondent respectivement aux nombres de souches sauvages et mutantes examinées.



**Figure 12 : Comparaison de la différence de masse normalisée des oligosaccharides marqués à l'APTS.** Les différences de pourcentage de masse pour chaque oligosaccharide ont été obtenues par soustraction de la distribution en longueur de chaînes de chaque amylopectine débranchée. A, analyses soustractives de la souche de référence 137C moins le mutant *stall-1* JV45J (□) puis de la souche sauvage 137C moins le mutant *stall-1* CO29 (●). B, analyse soustractive de la souche de référence 137C moins la souche sauvage CO65 (●). C, analyses soustractives de la souche sauvage CO65 moins le mutant *stall-1* JV45J (□) puis de la souche sauvage CO65 moins le mutant *stall-1* CO29 (●). D, analyse soustractive de la souche de référence mutante JV45J moins la souche mutante CO29 (●).

### 4.3 La découverte de l'étape enzymatique manquante.

Une analyse enzymologique détaillée des principales activités impliquées dans la biosynthèse de l'amidon a été réalisée sur extrait brut et partiellement purifié. Ces études comprennent des mesures quantitatives et qualitatives des activités enzymatiques. Les enzymes testées incluent l'ADP-glucopyrophosphorylase (AGPase), la phosphoglucomutase (PGM), les amidon synthétases solubles I et II (SS), l'amidon synthétase liée au grain (GBSS), les enzymes de branchement (BE) et de débranchement (limite dextrinase et l'isoamylase), les phosphorylases (STP), maltase ( $\alpha$ -glucosidase) et toutes les hydrolases susceptibles d'être détectées sur un zymogramme d'activités en gel PAGE contenant de l'amidon (tableau III). Aucune différence qualitative ou quantitative n'a été observée pour ces enzymes, dans les ségrégeants sauvages et mutants. Cependant, lorsque nous avons entrepris le dosage de l'activité de l'enzyme D, selon le protocole utilisé pour les plantes, nous avons eu la surprise

de noter une décroissance de plus de 98 % de la vitesse de production de glucose à partir du maltotriose (tableau III). Les mutants sont également défectueux pour la production de glucose lorsque le maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose et maltoheptaose sont utilisés comme substrats (Fig.13).

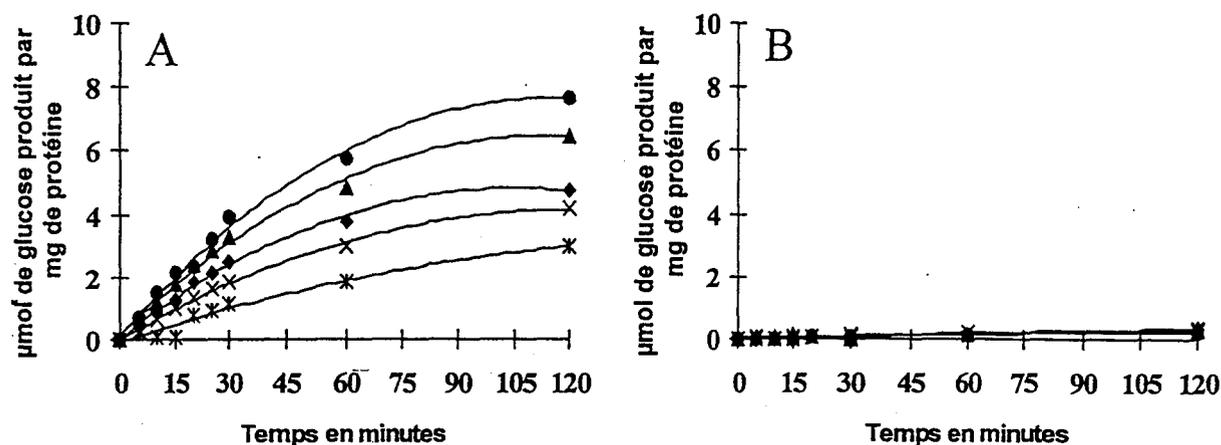


Figure 13 : Production de glucose à partir d'un extrait brut de la souche sauvage (137C) et de la souche mutante (JV45J) avec différents malto-oligosaccharides. Les incubations sont réalisées avec 400  $\mu\text{g}$  de protéine totale d'un extrait brut de la souche sauvage 137C (A) et de la souche mutante JV45J (B). Les concentrations finales de maltotriose (●), maltotétraose (▲), maltopentaose (◆), maltohexaose (×), maltoheptaose (\*) sont de 26 mM. Le glucose produit ( $\mu\text{mole}$ ) au cours du temps est mesuré par l'intermédiaire du NADPH,  $\text{H}^+$  à 365 nm (voir matériels et méthodes).

Cependant la production de glucose, à partir de maltose pour les souches sauvages et les souches mutantes est comparable. Cette production représente moins de 5% de ce que nous avons mesuré avec le maltotriose dans les souches sauvages. Puisque le maltose ne se définit pas comme un substrat de l'enzyme D mais le demeure pour les  $\alpha$ -glucosidases végétales, nous avons par conséquent extrapolé que la production de glucose à partir du maltotriose par l' $\alpha$ -glucosidase ou par d'autres hydrolases est négligeable (<2%) par rapport à la quantité d'enzyme D présente dans notre extrait. Ce résultat peut se comparer à celui rapporté pour les extraits de feuilles des plantes supérieures (Zeeman et coll., 1998b). La production de glucose à partir du maltotriose définit ainsi un dosage quantitatif et spécifique de l'enzyme D dans un extrait brut de *Chlamydomonas*. Nous avons donc adapté la technique du zymogramme pour détecter la production de glucose à partir de maltotriose (Figure 14).

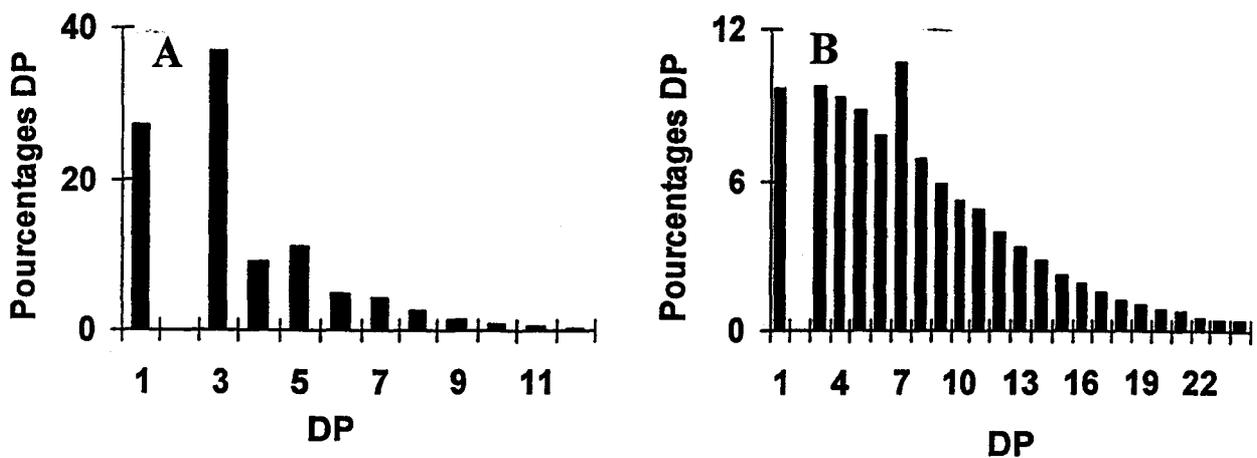


Figure 15 : Histogrammes de répartition en longueur de chaînes (DP) après incubation de l'activité de 62 kD avec du maltotriose (A) et du maltoheptaose (B). L'analyse des produits de l'incubation a été effectuée grâce à une technique de HPAE-PAD décrit dans matériels et méthodes. La quantité relative de chaque DP a été appréciée en intégrant l'aire de chaque pic visible sur le spectre issu de la détection ampérométrique pulsée.

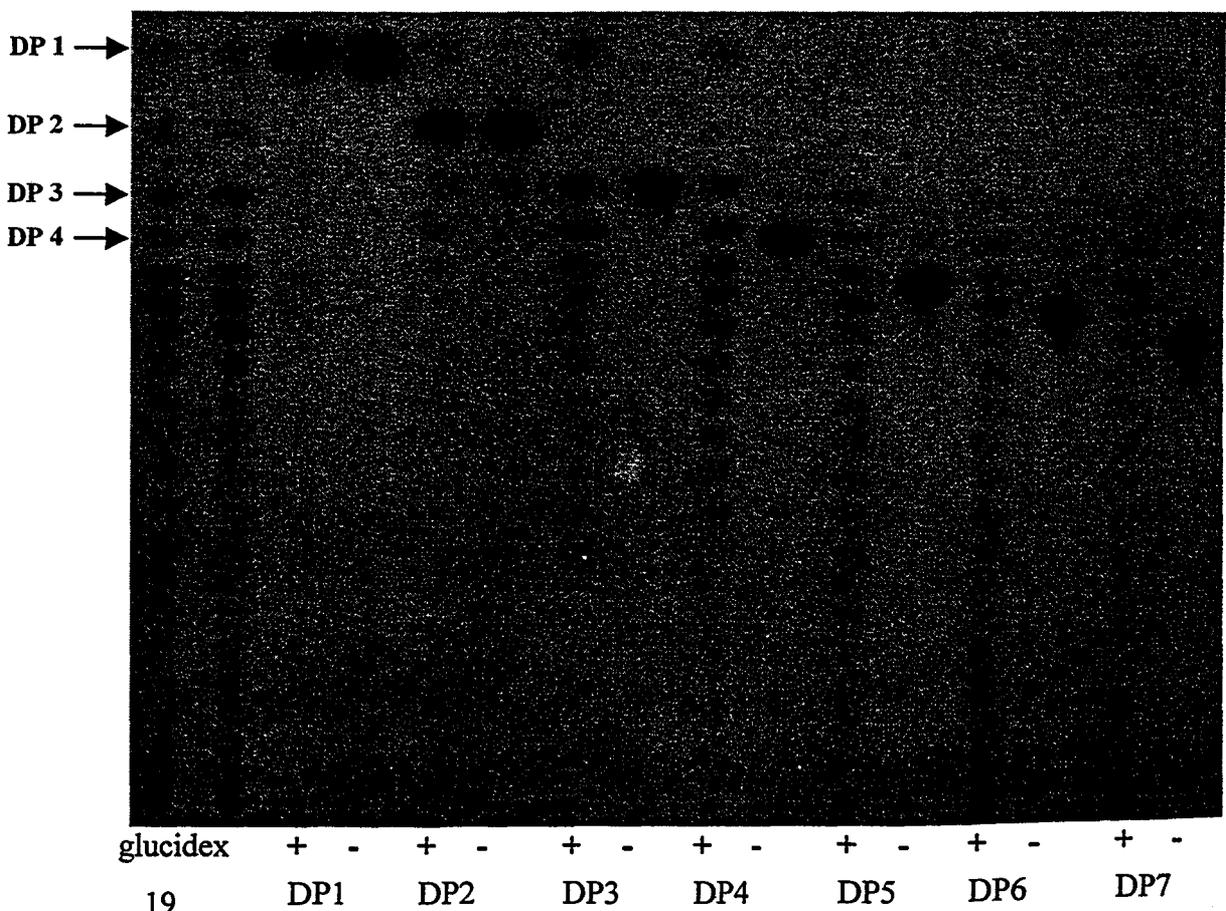
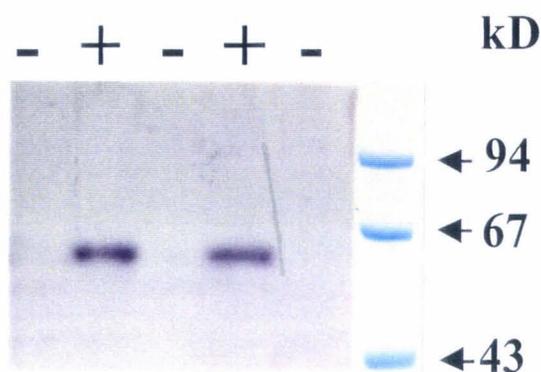


Figure 16 : Chromatographie en couche mince des malto-oligosaccharides révélés par vaporisation à l'orcino-sulfurique. 2mM de glucose (DP1), de maltose (DP2), de maltotriose (DP3), de maltotétraose (DP4), de maltopentaose (DP5), de maltohexaose (DP6), de maltoheptaose (DP7) ont été incubés (+) ou non (-) avec l'enzyme disproportionnante de 62 kD. Après une nuit d'incubation à 30°C, 4 µL d'échantillon sont déposés sur une plaque de gel de silice. La migration s'effectue avec le mélange buanol/éthanol/eau.



**Figure 14 : Déficience enzymatique des souches mutantes *stall-1*.**

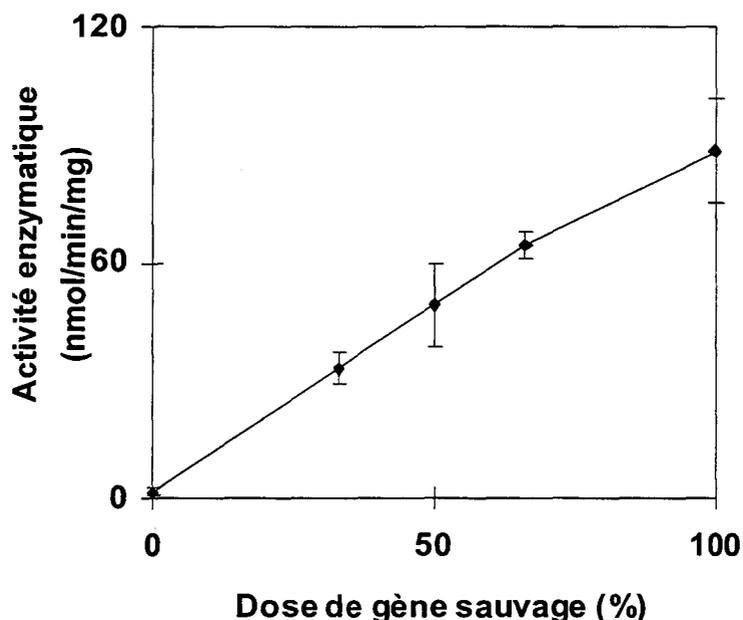
Les extraits bruts (100 $\mu$ g) de deux souches sauvages (+) et de trois souches mutantes *stall-1* (-) sont déposés sur un gel polyacrylamide dénaturant. Les protéines sont renaturées après électrophorèse et incubées une nuit. La production de glucose a été révélée par l'apparition de formazan due à la réduction du MTT (voir matériels et méthodes) après une nuit d'incubation avec 2 mg.mL<sup>-1</sup> de maltotriose. La bande bleue de 62 kD se distingue aisément dans les souches sauvages.

Nous avons détecté cette activité après dénaturation et renaturation ; ce qui nous a permis d'estimer la taille de l'enzyme à 62 kD. Cette bande est absente dans tous les ségrégeants méiotiques portant la mutation (n=75) et présente systématiquement dans les souches sauvages. Pour vérifier que la bande de 62 kD contient l'activité disproportionnante, nous avons incubé des morceaux de gel dans un tampon contenant différents oligosaccharides : glucose, maltose, maltotétraose, maltopentaose, maltohexaose et maltoheptaose. Les échantillons ont été ensuite analysés par la technique d'HPAED-PAD (Fig.15). La bande de 62 kD renferme bien l'activité D. Pour montrer que la protéine de 62 kD obéit bien aux lois qui définissent les enzymes disproportionnantes (Peat et coll., 1956). Nous avons incubé de l'enzyme semi-purifiée (selon la technique détaillée page 61) avec différents oligosaccharides. Les produits ont ensuite été séparés sur couche mince (Fig. 16). Après migration, les oligosaccharides produits ont été révélés à l'orcinol sulfurique. L'enzyme de 62 kD n'utilise pas le glucose et le maltose comme substrat mais peut disproportionner des oligosaccharides d'au moins 3 résidus glucoses liés en  $\alpha$ -1,4.

#### 4.4 Expériences de dosage de gène

Nous avons effectué des expériences de dosage de gène à partir de cellules diploïdes et triploïdes. L'activité enzymatique est corrélée avec la quantité d'allèle sauvage qui pourrait être

attendue si le gène *STAI1-1* code pour l'enzyme D (Fig.17). Une telle relation n'aurait probablement pas été obtenue si le gène *STAI1* n'était pas le gène de structure de l'enzyme D.



**Figure 17. Dosage de gène.**

Les dosages de gène sont exprimés de 0 (homozygote mutant) à 100% (homozygote sauvage). 50% correspond aux diploïdes hétérozygotes tandis que 33% et 66% correspondent respectivement aux triploïdes de génotype *stai1-1/stai1-1/+* et *stai1-1/+/+*. Les haploïdes, les diploïdes, les triploïdes ont donné des résultats identiques lorsque l'activité est exprimée par mg de protéine. Les activités (losanges) et les déviations standard de 3 différents diploïdes ou des triploïdes construits ont été calculées pour chaque dose de gène. Les activités spécifiques de la phosphoglucomutase ont été suivies comme contrôle interne et sont similaires dans toutes les constructions ( $2.5 \pm 0.4$  nmoles de G-6-P formé de G-1-P  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéine).

Connaissant les volumes des cellules et des organites des souches utilisées dans ce travail, nous avons calculé les concentrations physiologiques de l'enzyme (Shötzt et coll., 1972). Nous avons calculé la quantité d'enzyme présente dans les plastes ( $8,7 \mu\text{moles}$  de glucose formés à partir du maltotriose  $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) et avons estimé la quantité d'oligosaccharides dans les souches sauvages ( $50$  à  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de chloroplaste) et mutantes ( $0,5$  à  $1 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

#### 4.5 L'expression du phénotype mutant est partiellement conditionnelle.

Nous avons noté antérieurement que l'expression des phénotypes mutants pouvait varier lorsque l'amidon transitoire (accumulé le jour et dégradé la nuit par les cellules des feuilles) était comparé avec la forme classique dite de "réserve" de ce polysaccharide (Libessart et coll., 1995). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la synthèse de l'amidon de réserve se produit en conditions de carence d'un nutriment conduisant à l'arrêt de la croissance cellulaire et à l'accumulation de l'amidon. D'autre

part la synthèse de l'amidon transitoire se produit au cours de la photosynthèse et de la division cellulaire. Les phénotypes mutants de *Chlamydomonas* se présentent en 3 classes. La première classe concerne les mutations dont le phénotype s'exprime de manière équivalente dans les deux conditions physiologiques. Les mutations affectant la grande et la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, l'amidon-synthétase liée au grain et les enzymes de débranchement appartiennent à cette classe (Ball et coll., 1991 ; Delrue et coll., 1992 ; Libessart et coll., 1995 ; Mouille et coll., 1996 ; Dauvillée et coll., 1999). Ces fonctions sont nécessaires pour la synthèse de l'amylose ou de l'amidon. La deuxième classe concerne les mutations exprimées dans les deux conditions de culture mais avec une plus faible expression pour l'amidon transitoire. Cette classe inclut les mutations affectant l'amidon-synthétase soluble majeure (Libessart et coll., 1995). Ces fonctions sont aussi impliquées dans le processus normal de synthèse de l'amidon mais ne semblent pas être absolument requises chez *Chlamydomonas*. Ce fait pourrait être le résultat des redondances fonctionnelles dues à la présence de formes multiples d'une enzyme appartenant à la même famille ou à la présence de voies alternatives. Finalement, quelques loci ne conduisent à un phénotype détectable que dans les conditions de mise en réserve. Leur expression peut être dite conditionnelle. Cela s'applique au mutant *sta4* riche en amylose pour lequel aucune défectuosité enzymatique n'a été à ce jour rapportée (Libessart et coll., 1995). Nous avons par conséquent comparé les phénotypes entre les ségrégeants sauvages et mutants, obtenus en conditions de carence et de non carence en azote. Un exemple d'une telle analyse est montré dans le tableau II. Ce résultat définit la mutation *sta11-1* comme partiellement conditionnelle. Elle appartient donc à la deuxième classe. L'expression maximale du phénotype est obtenue sous carence en azote où la quantité d'amidon chute de 90% avec une augmentation du pourcentage d'amylose et de malto-oligosaccharides. Cependant, l'augmentation de la concentration des malto-oligosaccharides et du pourcentage d'amylose sont systématiquement conservés dans le milieu non carencé. Nous pensons que *STA11* est nécessaire mais pas indispensable à la biosynthèse normale de l'amidon.

## 5. Discussion

Takaha et coll. (1998 a) ont publié récemment qu'une réduction de 98% de l'activité de l'enzyme D n'affecte ni la biosynthèse ni la structure de l'amidon de pomme de terre. Cependant, dans plusieurs cas, la technologie des ARN antisens exploitée chez *Solanum tuberosum* n'a pas permis d'aboutir à l'émergence d'un phénotype modifié (les cultivars transgéniques possèdent les mêmes

caractéristiques que les cultivars sauvages). Ceci peut s'expliquer lorsque la fonction ciblée par l'antisens ne définit pas une étape limitante de la voie de synthèse. En effet, on ne peut éviter par cette technique la présence d'une activité enzymatique résiduelle souvent suffisante pour assurer une fonction normale.

Notre étude établit une corrélation entre la disparition de l'enzyme D et des altérations majeures de la structure et de l'accumulation de l'amidon, et indique aussi la possibilité que cette enzyme soit partie prenante dans la voie de biosynthèse de l'amidon. L'analyse de coségrégation dans la descendance d'un croisement entre la souche sauvage et la souche mutante *stall-1* montre que la déficience pour l'enzyme D, l'accumulation de malto-oligosaccharides, et la modification structurale spécifique de l'amidon suivent toujours la mutation au locus *STALL*. L'accumulation de malto-oligosaccharides linéaires dans les ségrégeants mutants s'explique si l'on considère que ces derniers représentent des substrats de choix pour l'enzyme D. L'abondance relative de maltose par rapport aux oligosaccharides plus longs fluctue selon la présence plus ou moins abondantes des hydrolases. La production de maltose résulte probablement de l'action d'une  $\alpha$ -amylase sur les oligosaccharides plus longs qui auraient pu s'accumuler dans les souches mutantes. Cependant, les changements majeurs dans la synthèse de l'amidon en condition de carence azotée sont assez inattendus puisque à la lumière des connaissances actuelles concernant les enzymes D, celles-ci sont habituellement considérées comme participant au catabolisme des malto-oligosaccharides non branchés. La déficience en enzyme D ne coségrège pas seulement avec la réduction de l'accumulation du polysaccharide de réserve, mais aussi avec une taille et une forme anormale des grains d'amidon, un rapport amylose/amylopectine altéré et un changement de la répartition de la longueur de chaînes constitutives de l'amylopectine. Pour expliquer ces observations, nous proposons que la fonction de l'enzyme D soit indispensable au processus normal de biosynthèse de l'amidon.

Si l'absence de l'enzyme D n'est pas responsable des défauts de biosynthèse de l'amidon, on pourrait alors expliquer le phénotype des souches mutantes *stall-1* par un effet pléiotropique de la mutation induisant l'altération de plusieurs enzymes. Cette situation pourrait résulter, par exemple, de l'éclatement d'un complexe multi-enzymatique ou de la désorganisation d'un mécanisme complexe de régulation par rétroaction (feed-back), agissant sur des enzymes qui n'ont pas encore été caractérisées. Dans ce cas, une enzyme non encore identifiée autre que l'enzyme D, mais néanmoins nécessaire à la biosynthèse de l'amidon normal, serait aussi affectée par une mutation au locus *STALL*. Notons que

cette hypothèse reste improbable puisque toutes les activités connues de la voie de biosynthèse de l'amidon se sont révélées intactes dans toutes les souches mutantes. En fait, quelques fluctuations qualitatives et quantitatives mineures ont été observées mais de manière identique dans les ségrégeants mutants et sauvages. Elles ne sont donc pas significatives du phénotype de biosynthèse d'amidon observé. En outre, les tests de complémentation phénotypique ont permis d'établir que le locus *ST11* est distinct des autres loci impliqués dans la biosynthèse du polysaccharide de réserve chez *C. reinhardtii*. Il s'agit en particulier des gènes codant ou conditionnant la présence de la GBSSI (*STA2*), la SSIII (*STA3*), la phosphoglucomutase (*STA5*), la grande (*STA1*) et la petite (*STA6*) sous-unité de l'AGPase et l'enzyme de débranchement (*STA7*). Bien qu'une explication alternative ne puisse pas être définitivement écartée, l'explication la plus simple du phénotype conditionné par la mutation du gène *ST11* reste que l'enzyme D soit elle-même requise pour la biosynthèse normale de l'amidon.

Les expériences de dosage de gène effectuées dans des fonds génétiques diploïdes et triploïdes ont montré une très bonne corrélation entre les niveaux d'activité de l'enzyme D et la dose d'allèle sauvage *ST11* présent dans le génome de la souche analysée. Bien que des analyses complémentaires sont nécessaires pour caractériser définitivement la nature du gène *ST11*, ces données suggèrent que celui-ci représente le gène de structure de l'enzyme D. Même s'il est prouvé que le gène *ST11* code l'enzyme D, nous ne pouvons pas définitivement écarter la possibilité qu'un effet pléiotropique puisse occasionner les défauts structuraux de l'amidon résiduel des souches *stal1-1*.

L'activité de l'enzyme D a été étudiée de manière plus approfondie dans le chapitre II du présent mémoire afin de déterminer si celle-ci pouvait être directement impliquée dans l'élaboration de la structure de l'amylopectine sauvage. Ce travail s'avère indispensable si l'on veut apprécier la nature exacte du rôle tenu par l'enzyme D dans le métabolisme de l'amidon.

**Article 2: La caractérisation biochimique de l' $\alpha$ -1,4  
glucanotransférase de *Chlamydomonas reinhardtii*  
confirme son rôle supposé dans l'édification de  
la structure de l'amylopectine.**

## 1. Résumé.

Les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases de plantes (enzymes disproportionnantes ou enzyme D) transfèrent des chaînes de glucanes sur d'autres oligosaccharides avec libération concomitante de glucose. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'analyse de mutants porteurs de l'allèle *sta11-1* a révélé l'existence d'une corrélation entre la déficience d'une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase et des altérations importantes de la synthèse et de la structure de l'amidon. Ceci suggère l'implication de nouvelles fonctions jusqu'alors inconnues dans le métabolisme de l'amidon. Notre étude caractérise l'activité biochimique de l' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase manquante chez les mutants. L'enzyme D de *Chlamydomonas* disproportionne les glucanes et produit du glucose comme les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases d'origine végétale. Elle transfère de surcroît des glucanes entre les chaînes externes de l'amylopectine. Les chaînes externes du polysaccharide servent simultanément de donneur et d'accepteur. L'enzyme D montre aussi la capacité d'incorporer des malto-oligosaccharides dans les chaînes externes de l'amylopectine et du glycogène. Contrairement aux réactions de transfert qui s'effectuent facilement avec des malto-oligosaccharides courts (maltotriose), le transfert sur des polysaccharides nécessite des donneurs plus longs et ce pour des raisons inconnues. Les trois activités développées ci-dessus, production de glucose à partir de malto-oligosaccharides, transfert entre chaînes externes d'un polysaccharide et transfert de glucanes sur des polysaccharides, sont supportées simultanément par une même protéine de 62 kD. L'absence des trois activités coségrégent avec la mutation au locus *sta11-1*, qui est connue pour causer une accumulation anormale d'oligosaccharides non branchés au détriment de l'amidon. Pour expliquer ces données, nous proposons que l'enzyme D soit directement impliquée dans la construction de la structure de l'amylopectine.

## 2. Introduction

Chez les plantes, les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases présentes au cours de la synthèse de l'amidon sont regroupées sous le nom d'enzymes D (Peat et coll., 1956 ; Takaha et coll., 1993). Les enzymes disproportionnantes agissent sur des oligosaccharides solubles, d'au moins trois résidus de glucose (maltotriose) et les disproportionnent en oligosaccharides de longueur variable, avec production de glucose. Dans une telle réaction, une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un oligosaccharide linéaire donneur est clivée et le segment de chaîne résultant est transféré à un autre glucane accepteur, formant une nouvelle liaison  $\alpha$ -1,4. Les résidus maltosyles sont souvent transférés par l'enzyme D, mais le maltose n'est pas un produit de la réaction de transfert. Cependant, le glucose et le maltose peuvent être utilisés comme accepteurs (Jones et Whelan, 1969). Dans les feuilles d'*Arabidopsis*, l'enzyme D est la principale enzyme qui métabolise le maltotriose (Lin et Preiss, 1988 ; Zeeman et coll., 1998). La présence de cette activité durant le développement du tubercule de pomme de terre avait conduit les auteurs à suggérer que l'enzyme D puisse être requise dans un aspect particulier de la biosynthèse de l'amidon (Takaha et coll., 1993). Comme dans le cas des enzymes de branchement (Takaha et coll., 1996a), l'enzyme D, en excès et sur des périodes très longues (plusieurs jours), forme des composés cycliques à partir de l'amylose ou de l'amylopectine. (Takaha et coll., 1996b ; Takaha et coll., 1998). Nous ignorons la signification physiologique de cette propriété.

Il est généralement admis que l'enzyme D est impliquée dans la voie de dégradation de l'amidon. Elle disproportionnerait dans ce contexte des petits malto-oligosaccharides en glucanes plus long, facilitant leur dégradation, par les maltodextrine phosphorylases et les glucosidases. Une autre  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase, l'amyломaltase, enzyme nécessaire pour l'assimilation des malto-oligosaccharides chez *E. coli*, agit de manière similaire (pour revue voir Boos et Shuman, 1998).

Nous avons montré précédemment que l'absence de l'enzyme D dans les mutants *stall-1* est corrélée à l'accumulation de malto-oligosaccharides non ramifiés. Cependant, nous avons aussi trouvé une diminution importante du contenu en amidon, dans les conditions normales de synthèse, un résultat qui ne correspond pas du tout à la fonction catabolique envisagée pour les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases. Nous avons été surpris de trouver une modification de la distribution en longueurs de chaînes de l'amylopectine. Cette modification correspond à une augmentation relative des chaînes courtes, qui se distingue facilement des distributions trouvées pour d'autres mutants (Fontaine et coll., 1993 ; Libessart et coll., 1995). Ce changement surprenant est corrélé à une altération de la morphologie et de

la cristallinité du grain d'une part et à une augmentation significative du rapport amylose/amylopectine, d'autre part. Etant donné qu'aucune autre enzyme connue de la biosynthèse de l'amidon n'était altérée dans ce mutant, nous pensions que tous ces phénotypes étaient liés à la disparition de l'enzyme D. L'explication la plus simple était d'attribuer à l'enzyme D, une fonction directe dans l'édification de la structure de l'amylopectine.

Dans ce travail, nous montrons que l'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* agit au niveau des chaînes externes de l'amylopectine et du glycogène. Nous proposons une fonction nouvelle pour les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases de plantes qui a le mérite d'expliquer tous les phénotypes observés simultanément chez les mutants *stall-1* de *Chlamydomonas*.

### 3. Matériels et méthodes.

L'acétate de sodium [1,2-<sup>14</sup>C] est fourni par Amersham. L'AMT (Maltotriose forming amylase) provient de Unipex (Reuil-Malmaison-France). La β-amylase de pomme de terre douce et l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* proviennent de Megazyme International (Sydney ; Australie). Le glucose et les glucanes sont dosés avec le kit de dosage d'amidon de Boehringer-Mannheim. Le glucose, le maltose, le maltotriose, le maltotétraose, le maltopentaose, le maltohexaose et le maltoheptaose sont fournis par Sigma.

Les malto-oligosaccharides (MOS) <sup>14</sup>C sont préparés par débranchement de l'amylopectine <sup>14</sup>C extrait de la souche mutante BAFR1 (*mt<sup>+</sup> nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta2-29::ARG7*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette souche mutante dépourvue de l'activité GBSSI (responsable de la synthèse de l'amylose) ne synthétise que de l'amylopectine (Delrue et coll., 1992). La culture a été réalisée dans un milieu TP (Tris-Phosphate) carencé en azote et en présence de 500 μCi d'acide acétique [1,2-<sup>14</sup>C] à 702 μCi.mg<sup>-1</sup> comme unique source d'acétate. Après 5 jours de culture, les cellules sont concentrées à une densité cellulaire de 1 à 2.10<sup>8</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> et lysées à la presse de French (10000 p.s.i.). L'extrait cellulaire est centrifugé 10 min à 10000 g à 4°C. Le culot d'amidon est purifié par sédimentation dans un gradient de Percoll à 10000 g pendant 45 min à 4°C et ensuite lavé 4 fois à l'eau avant d'être conservé à -20°C. La mesure du taux de radioactivité révèle que 15% de la radioactivité mise en jeu est incorporée dans l'amidon. Les malto-oligosaccharides <sup>14</sup>C (MOS) sont obtenus, après débranchement de 10 mg d'amylopectine marquée *in vivo* au <sup>14</sup>C par l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*. La radioactivité spécifique des MOS est estimée à 1,8 μCi.mg<sup>-1</sup>.

Le maltotriose et le maltotétraose <sup>14</sup>C n'étant pas commercialisés, ils ont été préparés de la manière suivante : 0,06 unités de AMT (Maltotriose forming amylase) de *Microbacterium. sp.* ont été incubés avec 500 μg de malto-oligosaccharides <sup>14</sup>C (1,8 μCi.mg<sup>-1</sup>) dans un volume final de 1 mL de tampon Tris/HCl 10 mM à pH 7 ; CaCl<sub>2</sub> 10 mM. L'incubation a eu lieu pendant 15 min à 55°C et arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 min. Le maltotriose et le maltotétraose produits ont été purifiés par chromatographie d'échange d'anions de haute performance, avec une détection ampérométrique à champ pulsé (HPAEC-PAD). Les paramètres et les solvants utilisés sont décrits dans Fontaine et coll., (1993). Le rendement et la pureté sont respectivement de 46% et 95% pour le maltotriose et de 13% et 95% pour le maltotétraose. Les malto-oligosaccharides lyophilisés sont conservés à température ambiante.

### 3.1 Les souches de *Chlamydomonas reinhardtii*, les conditions de cultures et les milieux.

La souche sauvage 137C (*mt nit1 nit2*) et la souche mutante JV45J (*mt<sup>-</sup> nit1 nit2 sta11-1*) constituent les souches de référence dans cette étude. Les ségrégeants sauvages et mutants sont issus du croisement entre la souche mutante JV45J et la souche sauvage 37 (*mt<sup>+</sup> pab2 ac14*). L'amidon de la souche mutante BAFR1 (*mt<sup>+</sup> nit1 nit2 cw15 arg7-7 sta2-29::ARG7*) est la source principale d'amylopectine pure. Toutes les cultures sont réalisées en lumière continue (40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ), sous agitation, à 24°C, en présence d'acétate. Les cultures sont inoculées à  $10^5$  cellules. $\text{mL}^{-1}$  et arrêtées à  $2\cdot 10^6$  cellules. $\text{mL}^{-1}$ . Le milieu standard TAP (Tris-Acétate-Phosphate) utilisé dans ce travail est décrit par Harris (1989).

### 3.2 Analyses structurales des polysaccharides

Pour la Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- $^1\text{H}$ ), l'échantillon lyophilisé (0,5 à 1 mg) est dissout dans 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  puis de nouveau lyophilisé. L'échantillon est ensuite solubilisé dans un mélange de DMSO- $\text{D}_6/\text{D}_2\text{O}$  (80/20). Les analyses de RMN- $^1\text{H}$  sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Bruker AM-400WB équipé d'une sonde  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  de 5 mm à une température de 80°C ( $\delta\text{-CH}_3$  du DMSO=2.66 ppm pour le proton). Les paramètres de réglage sont décrits par Fontaine et coll., (1993).

Le débranchement enzymatique par l'isoamylase est réalisé de la manière suivante : 0,5 à 5 mg de polysaccharide sont dissous dans 250  $\mu\text{L}$  de DMSO 90% pendant 20 min à 100°C. Le volume est ajusté à 2 mL avec du tampon acétate de sodium 55 mM pH 3,5. Ensuite, 4 unités d'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* (Megazyme, Sydney Australie) sont ajoutées. Le débranchement s'accompagne de l'augmentation du pouvoir réducteur. Le débranchement total est atteint après 5 heures d'incubation. La réaction est arrêtée par chauffage pendant 5 min à 100°C.

L'équivalent de 250  $\mu\text{g}$  de glucanes est mis en suspension dans 5  $\mu\text{L}$  d'APTS (acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique) 0,2 M, solubilisés dans l'acide acétique 15 % et 5  $\mu\text{L}$  d'une solution de cyanoborohydrure de sodium 1 M fraîchement préparée. Les glucanes sont ensuite placés à 37°C à l'obscurité pendant une nuit.

Pour l'analyse en électrophorèse de haute résolution dans un séquenceur d'ADN, les échantillons sont complétés avec 90  $\mu\text{L}$  de tampon TRIS 0,04 M, acide borique 0,04 M, urée 6 M pH 8,6. L'échantillon (1  $\mu\text{L}$ ) est alors déposé sur un gel de polyacrylamide 20% (acrylamide : bisacrylamide, 37,5:1), ajusté à pH 8,6 avec le tampon TRIS 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA

0,002 M urée 8,3 M. La migration est réalisée à 4°C dans le tampon TRIS 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA 0,002 M urée 8,3 M pH 8,6 avec une puissance constante de 1250 W. L'appareil utilisé pour l'électrophorèse est fabriqué par MacroPhor (Pharmacia). La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un fluorimètre Molecular Dynamics 595 et du logiciel Image Quant.

Lors des expériences d'incorporation, l'amylopectine est séparée des MOS  $^{14}\text{C}$  à l'aide d'une chromatographie de tamisage moléculaire, sur une matrice Sépharose CL-2B. La colonne ( $\varnothing=0,5$  cm ; H=50 cm; débit de 10 mL.h<sup>-1</sup>) est équilibrée dans de la soude 10 mM. 100  $\mu\text{L}$  de chaque fraction (300  $\mu\text{L}$ ) sont mélangés à 2 mL de liquide scintillant. Le taux de radioactivité est mesuré avec un compteur de scintillation.

### 3.3 Purification enzymatique.

Un extrait brut de protéine (500 mg) est clarifié par centrifugation et précipité avec de la protamine sulfate 10% à 4°C pendant 20 min. Le surnageant est déposé sur une colonne Mono Q d'échange d'anions (Pharmacia) équilibrée avec un tampon acétate de sodium 50 mM, DTT 2 mM ajusté à pH 6 avec de l'acide acétique. Les protéines non retenues sont précipitées au sulfate d'ammonium 30%. Après 30 min d'agitation à 4°C, l'échantillon est centrifugé à 10000 g pendant 15min à 4°C. Le surnageant est ensuite amené à 50 % de sulfate d'ammonium. Le culot est repris dans le même tampon et déposé sur une colonne S100 (chromatographie de tamisage moléculaire). Les fractions contenant l'enzyme D sont regroupées et déposées sur une colonne d'échange de cation UnoS12 (Bio-Rad). La colonne est équilibrée dans le même tampon acétate de sodium 50 mM, DTT 2 mM ajusté à pH 6 avec de l'acide acétique. L'activité enzymatique peut être suivie soit par les zymogrammes décrits ci-dessous, soit par un dosage quantitatif. Ce dosage consiste à mesurer la production de glucose à partir de maltotriose, en incubant 50  $\mu\text{L}$  de fraction (2 mL) avec 75  $\mu\text{L}$  d'acétate de sodium pH 6 et 25  $\mu\text{L}$  d'une solution de maltotriose à 80 mg.mL<sup>-1</sup>. Le mélange est incubé 15 min à 30°C et arrêté en chauffant 3 min dans un bain-marie à 100°C. L'échantillon est centrifugé 2 min à 10000 g et le glucose est mesuré par la production de NADPH, H<sup>+</sup> au cours des réactions mettant en jeu l'hexokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

### 3.4 Analyses par zymogramme.

Nous avons utilisé les techniques de zymogramme adaptées de la méthode développée par Lacks et Springhorn (1980), qui utilisaient une  $\alpha$ -amylase comme modèle enzymatique pour étudier la renaturation et la détection de la protéine. Une discussion plus approfondie sur les techniques de renaturation et détection peut être trouvée dans Gabriel et Gerstern (1992). Les extraits bruts solubles sont toujours préparés à partir de cellules en fin de phase exponentielle de croissance ( $2.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>) dans un milieu HSA sous une lumière continue ( $40 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ ). Les algues sont éclatées par passage à la presse de French (10.000 p.s.i.) à une densité de  $10^9$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Le lysat est immédiatement congelé à  $-80^\circ\text{C}$ . Après décongélation, le lysat cellulaire est centrifugé à 10.000 g pendant 15 min à  $4^\circ\text{C}$ . La quantité de protéine est mesurée à l'aide du kit de dosage des protéines de Bio-Rad.

Dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{g}$  à 500  $\mu\text{g}$  de protéines sont dénaturées à  $100^\circ\text{C}$  pendant 5 min, dans un tampon de dénaturation (25 mM Tris/glycine pH 8,3, 1% SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol).

Les protéines dénaturées sont déposées sur un gel de polyacrylamide 7,5% (30:1 acry/bis ; 1.5 mm d'épaisseur) contenant 0.1% SDS. Selon le zymogramme souhaité, le gel contient soit 0,3% de glycogène de foie de lapin (Sigma) pour le zymogramme d'incorporation de malto-oligosaccharides soit 0,3% d'amidon de pomme de terre pour visualiser les activités hydrolytiques.

L'électrophorèse (Mini-Protean II cell ; Bio-Rad) se déroule à température ambiante, à  $15 \text{ V.cm}^{-1}$  pendant 90 min dans un tampon Tris/glycine 25 mM pH 8,3, 1 mM DTT, et 0.1% SDS. A la fin de la migration, le gel est lavé deux fois sous agitation douce avec 100 mL de Tris 40 mM pendant une heure. Au cours de ce lavage, le SDS est éliminé et les protéines se renaturent. Le zymogramme d'incorporation de malto-oligosaccharides est incubé une nuit avec 50 mM de Tris, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 2 mM maltoheptaose (Sigma) à  $25^\circ\text{C}$ . Le zymogramme d'amidon est incubé dans un tampon Tris/glycine 25 mM pH 8,3, 10 mM DTT une nuit à  $25^\circ\text{C}$ . Après l'incubation, les gels sont colorés avec une solution d'iode (0,25% KI, 0,025% I<sub>2</sub>).

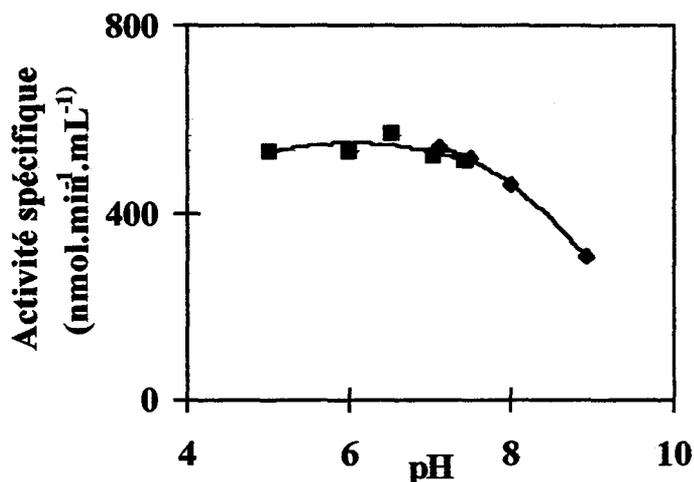
### 3.5 Traitement de l'amylopectine avec l'enzyme.

L'équivalent de 5 mg d'amylopectine *waxy* de maïs est dissout dans 100  $\mu\text{L}$  de DMSO 90%. Le volume de l'échantillon est ajusté à 700  $\mu\text{L}$  avec le tampon acétate de sodium 50 mM à pH 6, après

avoir ajouter une activité enzymatique correspondant à 2 nmoles de glucose produit par minute à partir du maltotriose. L'échantillon est ensuite incubé une nuit à 30°C. L'équivalent de 500 µg d'amylopectine subit un traitement à la β-amylase (17 U) dans 50 µL de tampon acétate de sodium 50 mM à pH 4. Après une heure d'incubation, l'échantillon est incubé une deuxième fois avec une nouvelle quantité de β-amylase (17 U) pendant une heure. L'enzyme est inactivée en chauffant l'échantillon 5 min dans un bain-marie à 100°C. Les échantillons traités à la β-amylase et ainsi que ceux non traités sont ensuite débranchés et analysés.

### 3.6 Expérience d'incorporation des oligosaccharides.

De 50 à 500  $\mu\text{g}$  d'oligosaccharides  $^{14}\text{C}$  (voir description ci-dessus) sont ajoutés à 50  $\mu\text{g}$  à 5 mg d'amylopectine non radioactive (purifiée de la souche BAFR1) ou de glycogène de foie de lapin dans un volume final de 1 mL d'acétate de sodium 50 mM pH 6. Les échantillons sont incubés pendant 150 min à 30°C avec une activité d'enzyme D correspondant à 106 nmoles de Glucose produit par minute à partir du maltotriose. Les conditions d'incubation ont été préalablement définies avec 500  $\mu\text{g}$  d'oligosaccharides, afin de rester dans les domaines de proportionnalité en temps (supérieur à 4 heures) et en quantité d'activité disproportionnante (supérieure à 400 nmoles de Glc par minute de maltotriose). Les polysaccharides marqués sont séparés des oligosaccharides non incorporés sur une CTM de type Sépharose CL-2B pour l'amylopectine ou sur une matrice TSK HW 50 (Pharmacia) pour le glycogène. La réaction inverse, c.à.d. le transfert de radioactivité des chaînes externes de l'amylopectine radioactive vers les oligosaccharides non marqués, a été suivie pour des concentrations physiologiques de malto-oligosaccharides (200 à 500  $\mu\text{g}$  MOS.mL<sup>-1</sup>) en utilisant la CTM de type Sépharose CL-2B.



**Figure 1 : Détermination du pH optimal de l'enzyme D semi-purifiée.** Deux tampons ont été utilisés pour couvrir la gamme de pH 5 à 9. Le tampon acide citrique/sodium phosphate (■) et le tampon TRIS/HCl (◆) couvrent respectivement la gamme de pH 5 à 7,5 et 7,1 à 8,9. Deux valeurs de pH 7 et 7,5 sont communes aux deux tampons. Pour chaque valeurs de pH 5; 6; 6,5; 7; 7,1; 7,5; 7,4; 8; 9 les activités spécifiques de l'enzyme D ont été mesurées de la manière suivante: 10mM de maltotriose sont incubés à 30°C pendant 15 min. avec une activité d'enzyme D correspondant à 30 nmol de glucose produit par minute. Après arrêt de la réaction (5 min. à 100°C), le glucose produit est mesuré selon le protocole décrit dans le matériel et méthode.

	Concentrations en mM	% d'activité
ADP-glu	1	93,85
ATP	1	100,61
3-PGA	1	93,51
Mg <sup>2+</sup>	10	99,35
Ca <sup>2+</sup>	1	99,66
P-Pi	1	79,76

**Figure 2 : Influences de quelques métabolites sur l'activité disproportionnante de *Chlamydomonas reinhardtii*.** Ces métabolites sont connus pour modifier l'activité de certaines enzymes participant à la biosynthèse de l'amidon. L'enzyme D a été incubée en présence d'une concentration finale de 1 mM, d'ADP-glucose (ADP-glu), ATP, 3-phosphoglyceraldéhyde (3-PGA), d'ions magnésium (Mg<sup>2+</sup> ; 10mM) et calcium (Ca<sup>2+</sup>) et pyrophosphate (P-Pi) pendant 15 min. à 30°C. Le glucose produit à partir de maltotriose 10 mM est dosé selon le matériel et méthode. Le pourcentage d'activité résiduelle est déterminé en effectuant le rapport suivant : (activité de l'enzyme D en présence d'un métabolite sur l'activité de l'enzyme D sans métabolite) x 100.

#### 4. Résultats

L'enzyme D a été partiellement purifiée en trois étapes impliquant une chromatographie d'échange d'anions, une chromatographie de tamisage moléculaire et une chromatographie d'échange de cations. L'activité purifiée se caractérise par une zone large de pH optimum comprise entre pH 5 et pH 7.5. L'activité diminue significativement au-dessus de pH 9 (Fig. 1). De plus, elle ne semble pas être inhibée par les différents métabolites rencontrés dans la cellule (Fig. 2).

Dans nos conditions standards de dosage d'activité nous ne détectons pas de manière significative la production de glucose à partir du maltotriose dans un extrait brut du mutant *stall-1*. Ce résultat suggère que l'enzyme D soit la seule enzyme présente capable de métaboliser de petits oligosaccharides, dans les conditions physiologiques. Après ces étapes chromatographiques, nous obtenons des rendements d'activité pour l'enzyme D d'environ 2.4% (Tableau I).

Etapes de purification	Facteurs de purification	rendement
Extrait brut	1	100%
Protamine sulfate	2.8	40%
Mono Q	5	22%
S100 + UnoS	32	2.4%
Fraction 24	135	0.5%

**Tableau I : Purification de l'enzyme D.**

L'activité de l'enzyme D a été mesurée par le dosage du glucose libéré à partir du maltotriose comme substrat (voir matériels et méthodes)

Si toutes les fractions contenant l'activité sont rassemblées, le facteur de purification mesuré est de 32. Par contre, si nous ne sélectionnons que les fractions contenant peu de protéines, nous arrivons à un facteur de purification de 135, avec un rendement de 0.5% (tableau I). Comme toutes les activités hydrolytiques sont retenues sur la chromatographie d'échange d'anions (MonoQ), l'enzyme D est dépourvue de ces activités. Celles-ci ont été suivies en déposant chaque fraction sur un zymogramme amidon. L'enzyme D semi-purifiée est stable 6 mois lorsqu'elle est stockée à -20°C dans le tampon de purification.

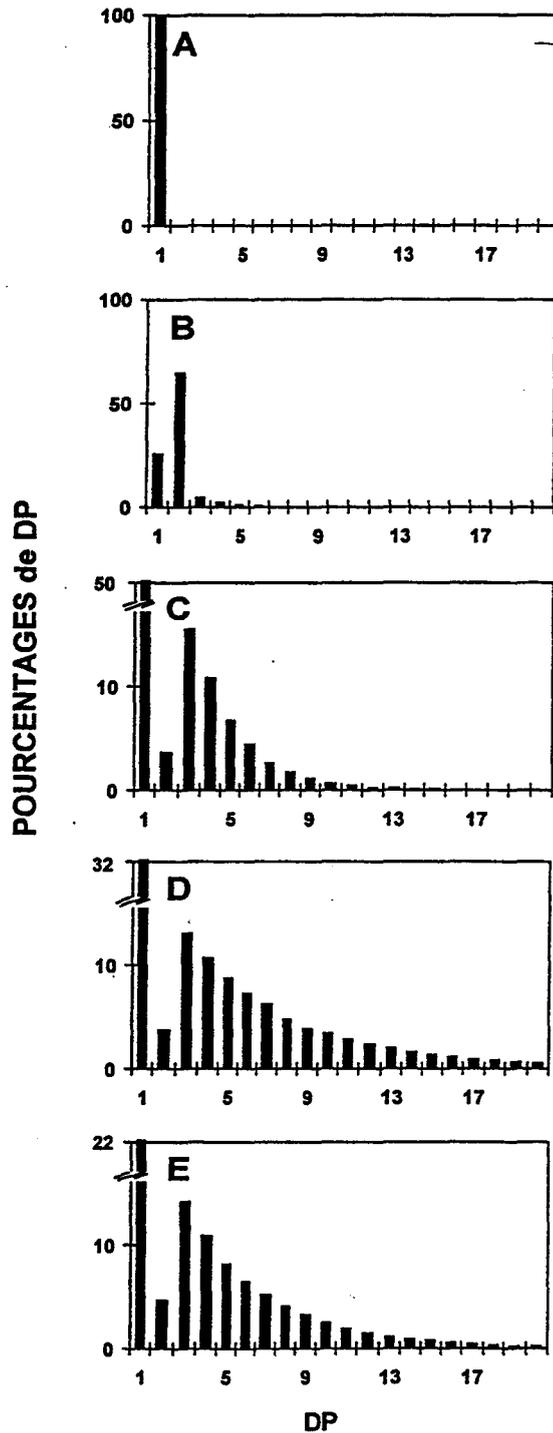


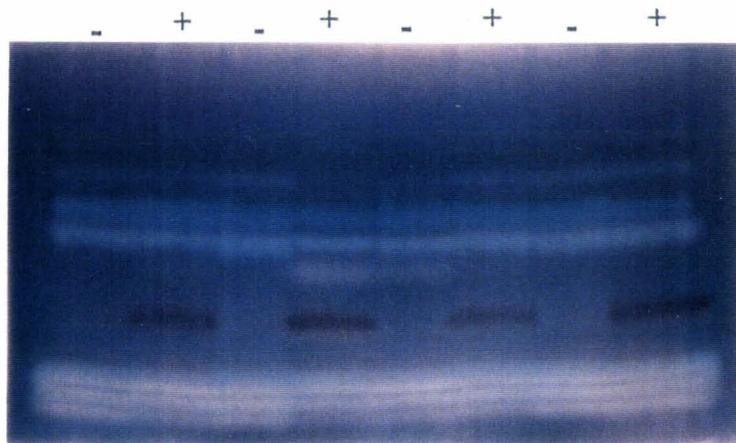
Figure 3 : Distributions en longueur de chaîne d'oligosaccharides incubés avec l'activité disproportionnante de 62 kDa. Les oligosaccharides linéaires sont séparés selon leur longueur après marquage à l'APTS et séparation sur un séquenceur d'ADN. Les pourcentages de chaque chaîne de DP 1 à 20 (1 à 20 unités de glucose) sont indiqués sur l'axe des ordonnées. (A), malto-oligosaccharides linéaires générés par l'incubation de glucose avec l'enzyme semi-pure de *C. reinhardtii*. (B) malto-oligosaccharides linéaires générés par l'incubation de maltose avec l'enzyme semi-pure de *C. reinhardtii*. (C) malto-oligosaccharides linéaires générés par l'incubation de maltotriose avec l'enzyme semi-pure de *C. reinhardtii*. (D) malto-oligosaccharides linéaires générés par l'incubation de maltopentaose avec l'enzyme semi-pure de *C. reinhardtii*. (E) malto-oligosaccharides linéaires générés par l'incubation de maltoheptaose avec l'enzyme semi-pure de *C. reinhardtii*

Nous avons testé l'activité disproportionnante de 62 kD avec du glucose, du maltose, du maltotriose, du maltotétraose et du maltoheptaose (Fig. 3). Nous constatons que l' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase de 62 kD n'agit pas sur le glucose, mais qu'elle disproportionne parfaitement tous les oligosaccharides supérieurs à 3 DP comme le montre la Figure 3.

La faible, mais significative, activité disproportionnante détectée avec le maltose, est due à la présence contaminante reconnue de maltotriose et de maltotétraose, dans la source commerciale de maltose. La très faible quantité de maltose, détectée dans tous les cas où les oligosaccharides sont disproportionnés, confirme que l'enzyme obéit aux règles établies, pour définir l'enzyme D (Jones et Whelan, 1969).

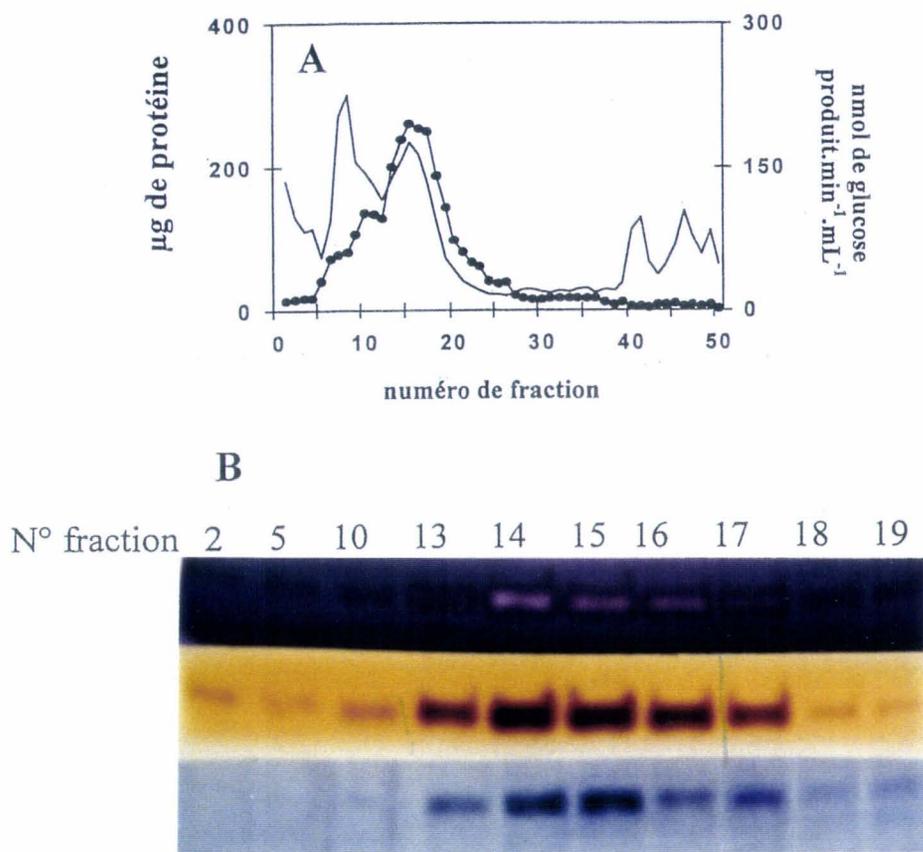
#### 4.1 L'activité de l'enzyme D sur les chaînes externes de l'amylopectine.

Les zymogrammes en PAGE sur des gels renfermant de l'amidon (conditions dénaturantes), réalisés pour détecter les différentes activités hydrolytiques dans la souche d'origine JV45J (*stall-1*) révèlent l'absence d'une bande rouge-foncé dont la masse correspond à une protéine de 62 kD. L'étude de ségrégation sur les descendants méiotiques mutants (*stall-1*) et sauvages (n=75)(Fig. 4) confirme que cette bande est systématiquement absente dans les souches mutantes. En outre, cette protéine de 62 kD a la même masse que l'enzyme D de *Chlamydomonas*, rapportée précédemment (Colleoni et coll., 1999).



**Figure 4 : Analyse par zymogramme amidon.** Des extraits bruts dénaturés (100  $\mu$ g de protéine) de quatre ségrégeants sauvages (+) et quatre ségrégeants *stall-1* (-) ont été déposés sur un gel de polyacrylamide contenant de l'amidon de pomme de terre soluble. Les protéines sont renaturées après électrophorèse et incubées une nuit. Les amidons hydrolases sont révélées par coloration à l'iode. La bande bleue de 88 kD a été antérieurement décrite comme une enzyme de débranchement (Mouille et coll., 1996). L'absence d'éclaircissement au niveau de la bande rouge-foncé signifie probablement que l'activité ne produit pas d'oligosaccharides au cours de la modification du polysaccharide contrairement aux activités hydrolytiques "classiques".

De plus, nous avons observé au cours de la purification, une co-élution entre d'une part la protéine correspondant à cette bande rouge, le dosage quantitatif de l'enzyme D et d'autre part le zymogramme permettant la révélation de la production de glucose à partir de maltotriose comme substrat (Colleoni et coll., 1999). Un exemple de cette co-purification est illustré dans la Figure 5.

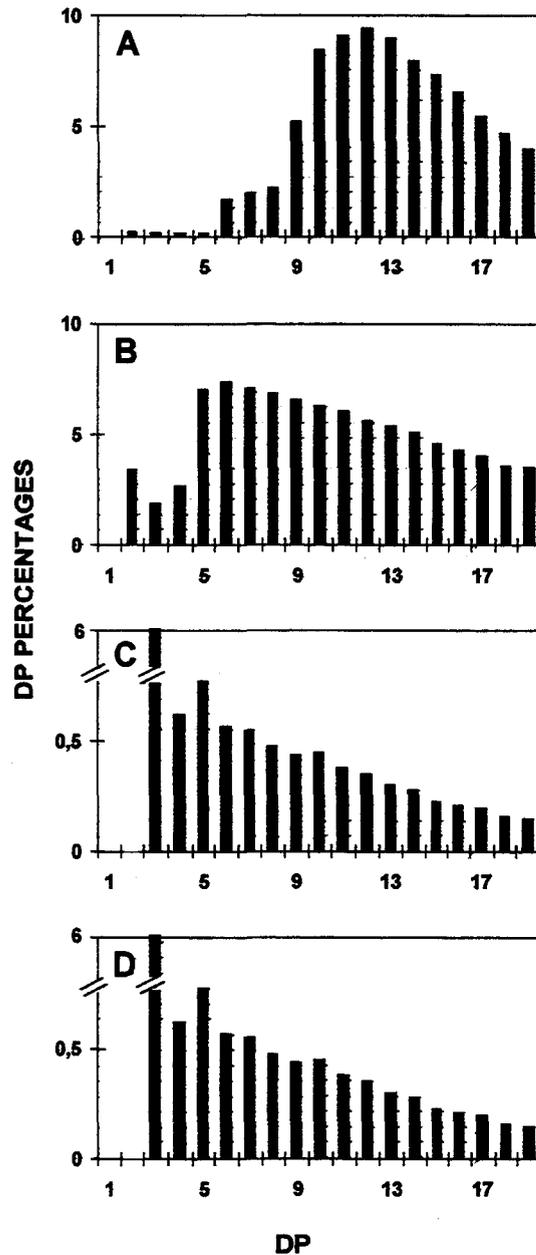


**Figure 5 : Co-purification des activités, de modification de la structure d'amylopectine, de production de glucose à partir de maltotriose et d'incorporation de maltoheptaose sur les chaînes externes du glycogène.**

(A) Profil d'élution, d'une chromatographie d'échange de cations (Uno S12 ; Bio-Rad) intégrée dans un système FPLC. L'équivalent de 60 mg de protéine d'un extrait brut a été chargé, après précipitation à la protamine sulfate, sur une colonne MonoQ (Pharmacia), couplée directement à une chromatographie d'échange de cations (Uno S12). Seules les protéines fixées sur la colonne Uno S12 ont été éluées au plateau de NaCl 5% (p/v). Des fractions de 2 mL ont été collectées à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Les protéines (trait fin) ont été dosées pour chaque fraction à l'aide du kit Bio-Rad. L'activité de l'enzyme D (●) a été suivie par la production de glucose à partir de maltotriose (voir Matériels et méthodes).

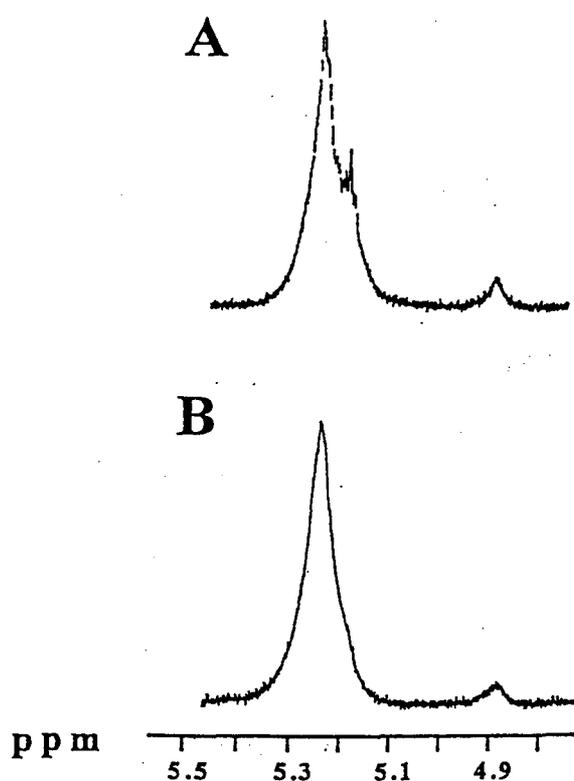
(B) Seules les fractions contenant de l'activité disproportionnante sont montrées. Trois zymogrammes différents sont présentés. Le premier (haut de la Figure) révèle une modification structurale de l'amylopectine, le deuxième (milieu) une incorporation de maltoheptaose sur les chaînes externes du glycogène et le troisième, une production de glucose à partir de maltotriose (bas de la Figure). Toutes les activités correspondent à une protéine de 62 kD. A noter, que la bande rouge-foncé qui caractérise l'enzyme D dans le zymogramme contenant de l'amidon, devient blanche avec un excès d'enzyme correspondant au pic d'activité.

Etant donné que la protéine de 62 kD et l'enzyme D copurifient, nous concluons que la modification de la structure de l'amidon et l'activité disproportionnante sont attribuées à la même protéine de 62 kD. Le polysaccharide modifié par la protéine de 62 kD est élué du gel de polyacrylamide contenant de l'amylopectine. Celui-ci est analysé par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN), selon la



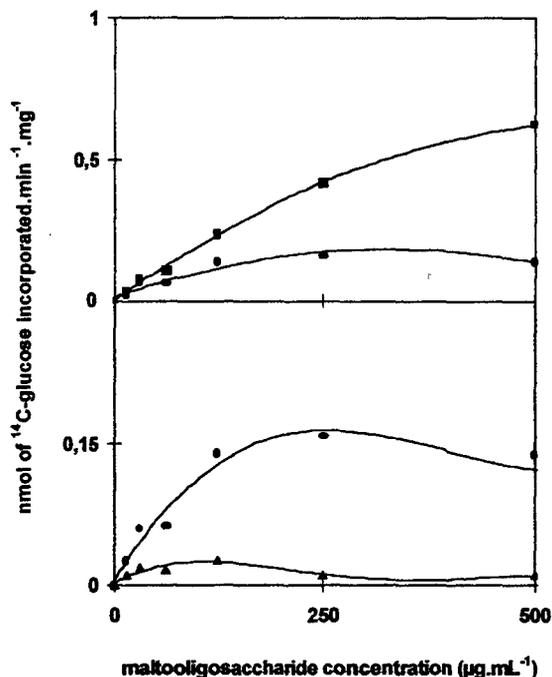
**Figure 6: Distribution en longueur de chaîne de l'amylopectine après incubation avec la  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase de 62 kD. Les chaînes débranchées avec l'isoamylase sont séparées sur un gel de séquence d'ADN selon leur longueur après marquage à l'APTS. Le pourcentage de chaque chaînes (DP1 à 19) est indiqué sur l'axe des Y. (A), chaînes débranchées de l'amylopectine de référence de *C. reinhardtii* (extrait de la souche BAFR1) purifié par chromatographie de tamisage moléculaire. (B), chaînes débranchées de l'amylopectine de référence de *C. reinhardtii* (extrait de la souche BAFR1) purifié par chromatographie de tamisage moléculaire après incubation avec l'enzyme D semi-pure de *C. reinhardtii*. (C), chaînes débranchées de l'amylopectine de référence de *C. reinhardtii* (extrait de la souche BAFR1) purifié par chromatographie de tamisage moléculaire après incubation avec l'enzyme D semi-pure de *C. reinhardtii* et suivie d'une digestion par une  $\beta$ -amylase. (D), chaînes débranchées de l'amylopectine de référence de *C. reinhardtii* (extrait de la souche BAFR1) purifié par chromatographie de tamisage moléculaire suivie d'une digestion par une  $\beta$ -amylase. En C et D, le polysaccharide n'a pas été séparé du maltose généré la  $\beta$ -amylase. Le maltose n'est pas représenté.**

technique établie par Mouille et coll., (1996). Une analyse similaire a été réalisée en incubant de l'amylopectine avec de l'enzyme D semi-purifiée (135 fois). Le spectre de résonance des protons de l'amylopectine incubée montrent des changements majeurs. Les signaux bimodaux des protons entre 5,1 à 5,4 ppm pour l'amylopectine témoin ne donnent plus qu'un signal monomodal pour l'amylopectine incubé (Fig 7).

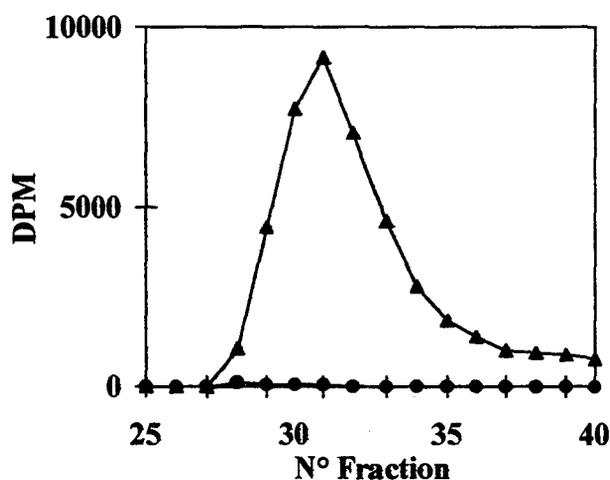


**Figure : 7** Analyse RMN du proton de l'amylopectine incubée avec ou sans la  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase de 62 kDa. Dix milligrammes d'amylopectine de maïs ont été incubés une nuit dans 1 mL de tampon acétate de sodium pH 6, en absence (A) ou en présence (B) d'une activité de 2 nmol de glucose produit par minute d'enzyme D semi-pure. La partie du spectre RMN du proton montre les signaux spécifiques des résidus de glucose liés en  $\alpha$ -1,4 (5,4 à 5,1 ppm) et liés en  $\alpha$ -1,6 (4,9 ppm). L'analyse RMN a été décrite dans Mouille et coll., (1996).

Les hauteurs relatives de ces deux signaux bimodaux caractérisent le glycogène et l'amylopectine (Mouille et coll., 1996) et sont, par conséquent, supposées refléter les différences de distribution en longueur de chaîne de ces polysaccharides. En effet, le débranchement enzymatique de l'amylopectine ou du glycogène n'affecte pas les hauteurs relatives de ces deux signaux, confirmant qu'il s'agit d'une différence dans la distribution en longueur de chaîne, plutôt qu'une différence du nombre de points de branchement (Mouille et coll., 1996). Après incubation de l'amylopectine avec l'enzyme partiellement pure, nous observons des changements dans la distribution en longueur de chaîne (Fig. 6A et Fig. 6B). Nous n'avons pas mis en évidence la production d'oligosaccharides dans l'échantillon analysé par couche mince ni lorsque de l'amylopectine  $^{14}\text{C}$  a été incubée avec l'enzyme D partiellement purifiée. Etant donné qu'aucun oligosaccharide n'a été libéré pendant l'incubation avec l'enzyme de 62 kD et que la quantité de liaisons  $\alpha$ -1,6 reste constante (5%), nous concluons que l'enzyme se comporte avec l'amylopectine, comme une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase. Elle clive les liaisons  $\alpha$ -1,4 à partir des chaînes



**Figure 8 : Dosages d'incorporation de malto-oligosaccharides.** L'amylopectine (2.5 mg ■; 1 mg, ●; 0.25 mg ▲) a été incubé avec des concentrations croissantes de malto-oligosaccharide marqués produit par débranchement de l'amylopectine radio-active de *C.reinhardtii*. L'axe des y représente deux échelles différentes donnant l'incorporation nette des oligo-saccharides sur le polysaccharide. Une activité enzymatique de 2 nmol de glc produit à partir du maltotriose par minute a été utilisé dans ces expériences. L'incorporation était strictement proportionnelle à l'activité enzymatique pour des activités allant de 0.5 à 20 nmol de glc produit du maltotriose par minute. Le marquage est confiné aux chaînes externes de l'amylopectine, puisque toutes le matériel radio-actif a été libéré après un traitement à la  $\beta$ -amylase



**Figure 9 : Digestion à la  $\beta$ -amylase de l'amylopectine BAFR1 incubé avec les MOS <sup>14</sup>C.** 1 mg d'amylopectine de BAFR1 et 250µg de MOS <sup>14</sup>C ont été incubés avec une activité d'enzyme D correspondant à 2nmol de glucose produit par min à partir de maltotriose comme substrat. Après 4 heures d'incubation à 30°C la réaction est arrêtée (5 min. à 100°C), l'échantillon est divisé en deux. 500µg d'amylopectine incubée (▲) sont déposés sur une chromatographie de tamisage moléculaire (CL-2B), les 500µg restant (●) sont incubés avec 3 unités de  $\beta$ -amylase pendant 2 heures à 30°C, puis une nuit avec 3 unités supplémentaire de  $\beta$ -amylase. La réaction est arrêtée (5 min. à 100°C) et l'amylopectine limite est déposé sur une chromatographie de tamisage moléculaire (sépharose CL-2B). Pour chaque fraction (300µL), 100µL sont prélevés et mélangés avec 2 mL de liquide scintillation. Le taux de radioactivité est mesure à l'aide d'un compteur de scintillation..

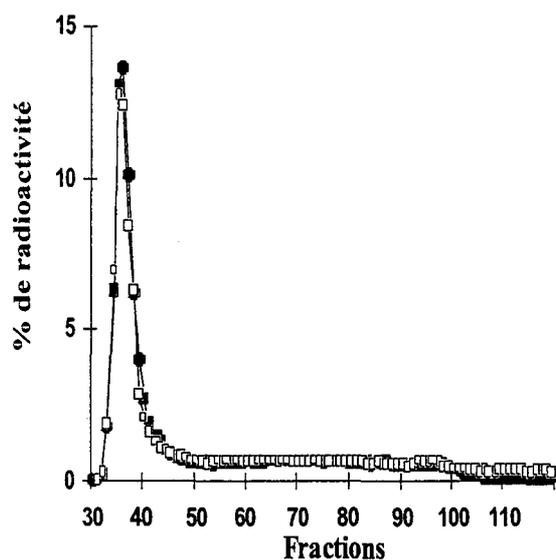
“donneur” et les transfèrent sur les extrémités non-réductrices d’une chaîne “accepteur” voisine. Pour prouver que les réactions de transfert impliquent les chaînes externes de l’amylopectine, nous avons soumis les polysaccharides traités et non traités avec l’enzyme D à une digestion par la  $\beta$ -amylase suivie d’un débranchement enzymatique. Les distributions en longueur de chaîne des échantillons traités et non traités sont identiques (Fig.6C et Fig. 6D). Comme les  $\beta$ -amylases sont des enzymes processives qui digèrent sélectivement les chaînes externes du polysaccharide, ce résultat prouve que les modifications majeures vues à la Figure 6B sont limitées aux chaînes externes du polysaccharide. Ces changements sont suffisamment importants pour expliquer la modification de coloration du complexe iode/polysaccharide de l’amylopectine contenue dans le gel. Banks et coll. (1971) ont montré que la  $\lambda_{\max}$  du complexe iode/polysaccharides décroît avec la diminution du degré de polymérisation moyen des chaînes linéaires de glucanes liées en  $\alpha$ -1,4. Par conséquent, les changements observés dans les distributions en longueur de chaîne de l’amylopectine traitée à l’enzyme D, ont comme effet un déplacement de la  $\lambda_{\max}$  du polysaccharide résultant. Ceci pourrait expliquer aisément la coloration typique rouge-foncé détectée en zymogrammes avec les gels renfermant de l’amidon.

#### **4.2 L’enzyme D favorise l’incorporation des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes du polysaccharide.**

Nous avons caractérisé l’action de l’enzyme D en présence simultanée d’amylopectine et de malto-oligosaccharides non-branchés (MOS). Pour cela, nous avons produit des MOS marqués  $^{14}\text{C}$  en débranchant de l’amylopectine marquée *in vivo*. La distribution en longueur de chaîne des MOS est identique à la Figure 6A.

L’incorporation des malto-oligosaccharides sur l’amylopectine (Fig. 8) ou sur le glycogène de foie de lapin a été suivie après séparation par chromatographie de tamisage moléculaire (CL-2B) des MOS non incorporés. L’incorporation est linéaire pour une période d’incubation allant de 15 min à 6 heures. Nous avons ensuite traité les polysaccharides avec de la  $\beta$ -amylase (Fig 9). La disparition de la radioactivité indiquent que l’enzyme D transfère efficacement des MOS sur les chaînes externes de l’amylopectine. Afin de savoir si la réaction est réversible dans les conditions expérimentales utilisées, nous avons incubé de l’amylopectine radioactive ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) avec  $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  de MOS non marqués (produits par débranchement de l’amylopectine). La séparation par tamisage moléculaire de l’amylopectine  $^{14}\text{C}$  et des MOS révèle aucun transfert de radioactivité vers la fraction malto-

oligosaccharidique (Fig.10). La mesure du taux de radioactivité est assez sensible pour détecter un transfert d'au moins 5% de radioactivité dans la fraction malto-oligosaccharidique.



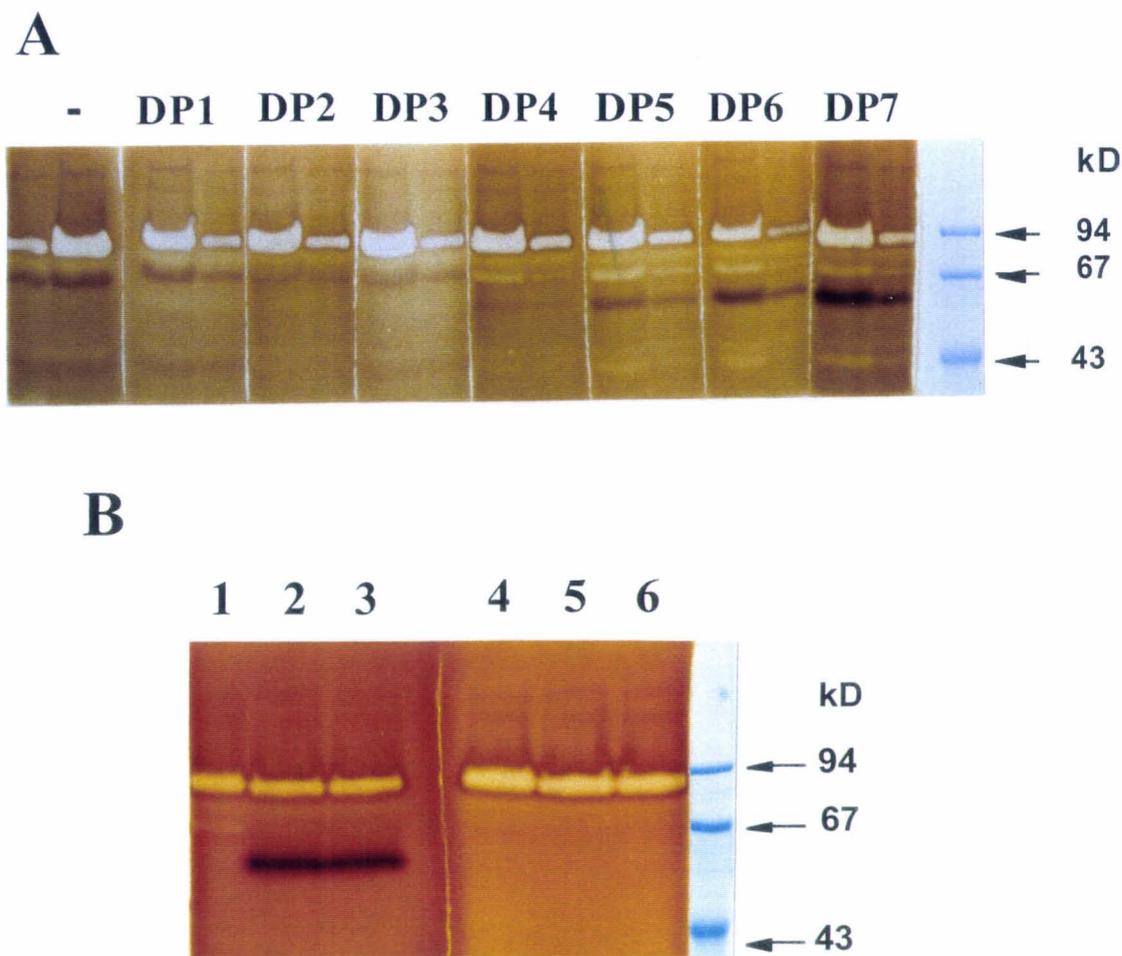
**Figure 10 : Chromatographies de tamisage moléculaire (Sépharose CL-2B) de l'amylopectine  $^{14}\text{C}$ , de la souche de référence BAF R1 incubée ou non avec des MOS froid. 1 mg d'amylopectine  $^{14}\text{C}$  et 500  $\mu\text{g}$  de MOS froid sont incubés 4 heures à 30°C dans un tampon acétate de sodium 50mM pH 6 (volume final 1 mL) avec une activité finale de 80 nmol de glucose produit par minute d'enzyme D (●). Dans les mêmes conditions d'incubation, cette expérience a été réalisée sans ajouter de MOS (□). Après arrêt de la réaction, les échantillons sont déposés sur une chromatographie de tamisage moléculaire CL-2B équilibrée dans la soude 10 mM. Pour chaque fraction (300  $\mu\text{L}$ ), 100 $\mu\text{L}$  sont prélevés et mélangés avec 2 mL de liquide de scintillation. Le taux de radioactivité est mesuré à l'aide d'un compteur de scintillation.**

La concentration physiologique dans le plaste des petits malto-oligosaccharides, que nous avons mesuré chez *Chlamydomonas* est comprise entre 50 à 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Nous concluons par conséquent qu'à la surface d'un grain d'amidon (au moins 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'amylopectine et une concentration bien inférieure à 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de MOS) l'incorporation des oligosaccharides débranchés tels que ceux générés par le débranchement de la préamylopectine serait fortement favorisée.

#### 4.3 La spécificité requise de l'enzyme D pour l'incorporation des oligosaccharides sur les chaînes externes du polysaccharide.

L'incorporation de malto-oligosaccharides sur le glycogène nous a fourni une méthode supplémentaire pour détecter sur zymogramme l'enzyme D (Fig.11). Une nouvelle fois nos gels dénaturants nous ont permis d'estimer la masse de l'enzyme à 62 kD. La co-élution de cette activité est visible avec les deux autres techniques de zymogrammes et avec le dosage quantitatif de l'enzyme D au cours de la purification (Fig. 5). Nous avons aussi trouvé une coségrégation entre la présence de ces trois types d'activités (production de glucose à partir de maltotriose, modification de l'amylopectine et incorporation de glucanes sur le glycogène) et l'allèle sauvage *ST11* dans le croisement impliquant une souche sauvage et une souche mutante de *Chlamydomonas*. Nous avons alors procédé au suivi de l'incorporation de malto-oligosaccharides de longueur donnée sur les chaînes externes du glycogène en utilisant cette nouvelle technique. Les résultats montrent (Fig. 12A) que l'efficacité de transfert sur les

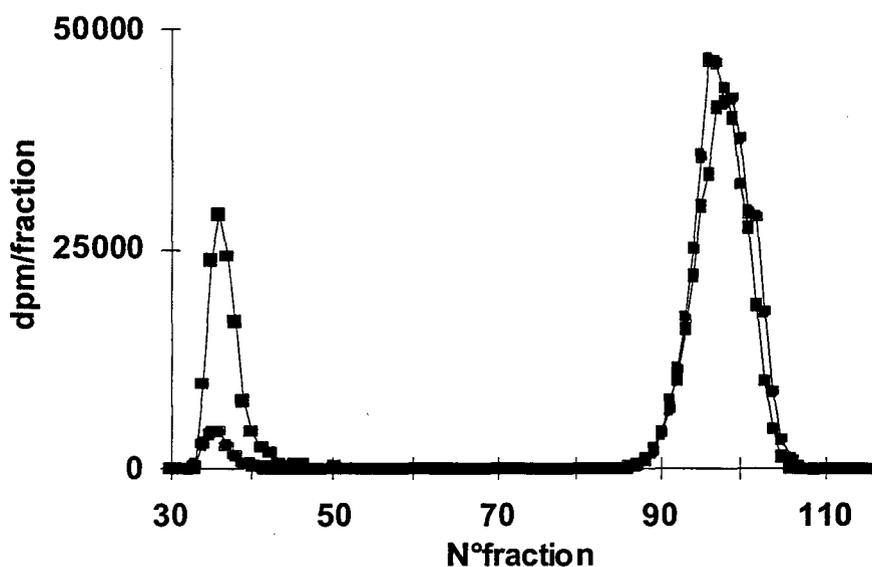
chaînes externes du glycogène augmente avec la longueur de la chaîne agissant comme “donneur” dans la réaction de transfert. De plus, nous avons été fortement surpris de constater l’absence de coloration lorsque le maltotriose est utilisé comme substrat “donneur”, même avec des concentrations très élevées et après une incubation prolongée (Fig.12B).



**Figure 12 : Comparaisons de l'incorporation de différents malto-oligosaccharides sur le glycogène.** (A) Deux quantités de protéine 100 et 300 µg d'un extrait brut de la souche sauvage 137C ont été déposés huit fois sur deux gels contenant du glycogène (des témoins sans glycogène dans le gel ne montre bien sûr pas d'incorporation). Après la migration, les gels sont coupés en huit fragments et incubés séparément avec 2 mM de DP1 (glucose) à DP7 (maltoheptaose). Un fragment a été incubé sans malto-oligosaccharides (-). Les gels sont incubés une nuit à température ambiante. (B) 200µg d'extrait brut de protéines dénaturées de la souche sauvage 137C (puits 2 et 3 ; 5 et 6) et de la souche mutante JV45J (puits 1 et 4) sont déposés sur un gel de polyacrylamide contenant du glycogène et incubés pendant 48 H avec 2 mM de maltoheptaose (puits 1 à 3) ou 20 mM de maltotriose (puits 4 à 6).

Pour être sûr qu'il ne s'agit pas d'un artefact de coloration, nous avons préparé du maltotriose radioactif et comparé l'efficacité de transfert à celle obtenue avec les MOS <sup>14</sup>C. Nous avons trouvé une faible incorporation du maltotriose <sup>14</sup>C sur les chaînes externes de l'amylopectine. Le taux d'incorporation ne représente que 10% par rapport au taux mesuré avec le mélange de malto-oligosaccharides <sup>14</sup>C (Fig.8). Le maltotétraose <sup>14</sup>C donne, par contre, un taux d'incorporation similaire à

celui du mélange de malto-oligosaccharide  $^{14}\text{C}$  (Fig. 13), bien que sur les zymogrammes l'incorporation du maltotétraose donne toujours une bande très faiblement colorée.



**Figure 13 :** Comparaison de l'incorporation du maltotriose et du maltotétraose  $^{14}\text{C}$  sur de l'amylopectine solubilisée de la souche de référence BAFR1. 2 mg d'amylopectine solubilisée sont incubés avec 200  $\mu\text{g}$  de maltotriose  $^{14}\text{C}$  ou 200  $\mu\text{g}$  de maltotétraose  $^{14}\text{C}$  préparés par nos soins. Les incubations se sont effectuées à  $30^\circ\text{C}$  pendant 4 heures avec une activité finale correspondant à 80 nmol de glucose produit par minute par l'enzyme D. L'incorporation des malto-oligosaccharides  $^{14}\text{C}$  sur l'amylopectine est estimée après séparation de l'amylopectine (fractions 30 à 50) et des malto-oligosaccharides sur une chromatographie de tamisage moléculaire équilibrée dans la soude 10 mM. 100  $\mu\text{L}$  de chaque fraction (300  $\mu\text{L}$ ) sont mélangés avec 2 mL de liquide scintillant. Le taux de radioactivité est mesuré avec un compteur de scintillation.

Pour expliquer cette différence d'incorporation entre les deux techniques (zymogramme et incorporation *in vitro*), nous devons souligner que les malto-oligosaccharides ajoutés lors des expériences d'incorporation, sont toute suite disproportionnés par l'enzyme D, en oligosaccharides plus longs. Par contre, pour les zymogrammes cette modification est plus lente, du fait que le substrat se trouve en large excès dans un grand volume de tampon. Dans ces mêmes zymogrammes, l'enzyme est immobilisée et concentrée sur une petite surface de gel et les malto-oligosaccharides disproportionnés à la surface de la bande active de gel sont dilués dans un volume important de tampon d'incubation (30 mL). Par conséquent, nous pensons les glucanes plus longs que le maltotétraose représentent les substrats optimaux pour les réactions d'incorporation.

Dans la cellule, nous nous attendons à ce que les glucanes de longueurs requises soient produits par l'épissage de la préamylopectine *via* les isoamylases. Nous devons ajouter que les réactions d'incorporation de MOS  $^{14}\text{C}$  sur l'amylopectine solubilisée, bien que quantitativement fiables, ne reflètent pas vraiment les conditions physiologiques rencontrées dans la cellule. En effet, dans ce contexte, les MOS, l'amylopectine et l'enzyme D purifiée diffusent facilement dans le milieu

réactionnel. Alors que la situation rencontrée *in vivo* et dans les zymogrammes est différente. Les MOS seuls continuent à diffuser librement dans un grand volume mais le polysaccharide est retenu au niveau soit du gel de polyacrylamide lors de zymogrammes, soit à la surface du grain d'amidon *in vivo* en présence, dans les deux situations, d'une activité spécifique élevée d'enzyme.

#### 4.4 Amplification par l'enzyme D de la dégradation des malto-oligosaccharides par la phosphorylase.

L'amyloamylase, une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase bactérienne, similaire à l'enzyme D, est connue pour travailler de concert avec la maltodextrine phosphorylase. L'amyloamylase génère à partir de courts glucanes (inférieur à DP 4) des glucanes plus longs que la maltodextrine phosphorylase transforme en glucose-1-phosphate (G-1-P) (pour revue voir Boos et Shuman, 1998). Nous avons vérifié cette hypothèse, en mesurant la production de G-1-P produit à partir de maltotriose, maltotétraose, maltopentaose et maltoheptaose dans les extraits bruts de souches sauvages et mutantes *stall-1* de *Chlamydomonas*.

Comme le montre la Fig. 14, il est évident que la présence de l'enzyme D augmente au moins 5 fois la vitesse de dégradation du maltotétraose et du maltotriose par la phosphorylase. De plus, comme chez les bactéries et les plantes, le maltopentaose (DP5) reste le plus petit substrat permettant la production de G-1-P.

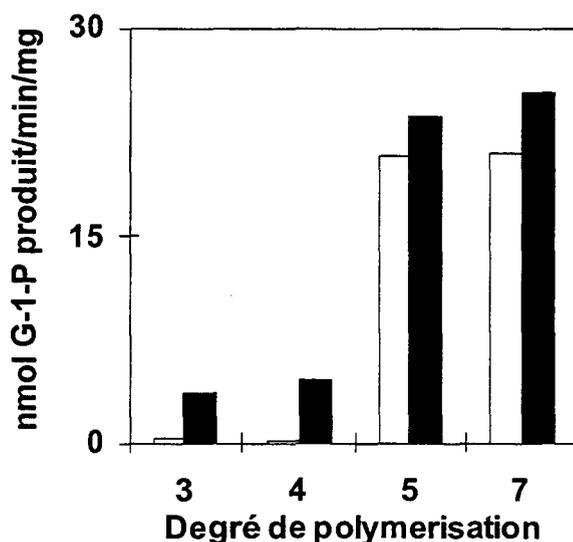


Figure 14 : Stimulation de la phosphorolyse des malto-oligosaccharides par l'enzyme D. 100  $\mu$ g d'extrait brut de la souche sauvage 137C (barre noire) et souche mutante JV45J (barre blanche) sont incubés pendant 1 H à 30°C en présence de maltotriose, maltotétraose, maltopentaose, et maltohexaose, à 2,5 mM.

## 5. Discussion

L'enzyme D a été initialement décrite comme une enzyme qui utilise et produit des oligosaccharides solubles (Peat et coll., 1956 ; Jones et Whelan, 1969). Il est admis, mais non prouvé, qu'elle fait partie intégrante de la voie d'assimilation des malto-oligosaccharides au cours de la dégradation de l'amidon. Récemment, plusieurs auteurs ont montré que l'enzyme était capable de produire des glucanes cycliques branchés ou non, de longueur variable à partir d'amylose ou d'amylopectine. Néanmoins, ces composés ne sont obtenus que lors d'incubations prolongées et avec de grandes quantités d'enzyme D de pomme de terre (Takaha et coll., 1996b ; Takaha et coll., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus avec les enzymes de branchement (Takaha et coll., 1996a). Dans aucune de ces expériences, les auteurs n'étudient l'effet de l'enzyme D sur la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine, pour des concentrations plus faibles (physiologiques) d'enzyme et des durées d'incubation plus courtes. Pour notre part, dans les conditions favorables à la formation de ces composés (glucanes cycliques), nous avons détecté moins de 1 % de matériel résistant à l'amyloglucosidase (après 48 heures d'incubation à 30°C, l'amylopectine est dégradée à 99% en glucose après incubation avec l'amyloamylase).

La première réaction, que nous avons observé sur l'amylopectine seule, n'a pas abouti à la production de malto-oligosaccharides. Nous savons maintenant que l'enzyme utilise à la fois les chaînes externes du polysaccharide comme glucanes "donneur" et "accepteur". La chaîne externe "donneur" de l'amylopectine étant liée au polymère par une liaison  $\alpha$ -1,6, les réactions de transfert inter-chaînes ne conduisent pas à la libération de malto-oligosaccharides.

La concentration des chaînes externes de l'amylopectine à l'intérieur du grain a été estimée à 450 mM (van de Wal et coll., 1998). Même si nous ignorons la concentration effective de la portion encore suffisamment hydrosoluble pour réagir à la surface du grain, une concentration locale qui ne peut être que très élevée, nous laisse présager que l'amylopectine devient l'unique destinataire (accepteur) des malto-oligosaccharides présents à la surface du grain d'amidon dans le plaste. Si les malto-oligosaccharides non branchés et la préamylopectine coexistent dans la cellule de la plante, l'enzyme D devrait alors agir comme une " polymérase " utilisant les oligosaccharides comme donneurs et produisant une incorporation nette sur la préamylopectine jusqu'à ce qu'elle devienne insoluble. Par la concentration locale élevée des chaînes "accepteur" potentielles de l'amylopectine ou de ses

précurseurs (préamylopectine) le glucane une fois incorporé, ne sera que très lentement libéré du polysaccharide. La perte d'énergie d'une telle réaction de polymérisation devrait être excessivement faible et nécessiterait seulement deux ATP pour régénérer un ADP-glucose pour chaque glucane incorporé sur le polysaccharide. Nous avons donc démontré dans cette étude, que l'enzyme D de *Chlamydomonas* (et probablement celle des plantes) est capable d'incorporer, rapidement et efficacement, des malto-oligosaccharides non branchés sur les chaînes externes de l'amylopectine. Nous sommes cependant incapables d'observer la réaction inverse (transfert de chaînes externes de l'amylopectine vers les malto-oligosaccharides) à des concentrations physiologiques, en substrat. Cette fonction n'est pas surprenante puisque les fructosyles transférases, enzymes avec des propriétés analogues, ont été décrites comme ayant une fonction polymérisante dans la biosynthèse des fructanes (van der Meer et coll., 1998). Les taux d'incorporation que nous avons mesuré sont proches de la situation physiologique, si nous supposons que la réaction a lieu à la surface du grain d'amidon en croissance.

Nous pensons que l'ensemble de nos données prouvent l'implication de l'enzyme D dans la synthèse normale de l'amylopectine. Nous pensons également avoir donné de nouvelles perspectives dans notre compréhension de la biosynthèse de l'amidon chez les plantes. Ces perspectives relèvent du lien fonctionnel que nous avons établi entre la synthèse du polysaccharide d'une part et le métabolisme des oligosaccharides d'autre part, lors de l'édification de la structure de l'amylopectine. En retour, la découverte de tels liens chez les plantes peut être encourageante pour des investigations plus approfondies sur l'amylopectase, le produit du gène *MALQ* d'*E. coli*, l'analogue bactérien de l'enzyme D. En effet, nous avons observé de haut taux d'incorporation du maltoheptaose sur les chaînes externes du glycogène via le produit du gène *MALQ*, une observation que nous pensons être intéressante pour la compréhension du métabolisme du glycogène bactérien.

## 1. Résumé

Deux formes d' $\alpha$ -1,4 glucane phosphorylase (EC 2.4.1.1) ont été partiellement purifiées chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Ces deux formes sont séparées par un gradient NaCl (0 à 10%) sur une colonne échange d'anions (MonoQ; pharmacia). Une caractérisation sommaire de ces activités a été entreprise uniquement dans le sens physiologique de la dégradation (production de glucose-1-phosphate (G-1-P) à partir d' $\alpha$ -1,4 glucane). La forme majoritaire (90% de l'activité phosphorylasique totale) se distingue de la forme mineure, d'une part par le  $K_m$  pour le glycogène, respectivement de 2,4 mg.mL<sup>-1</sup> et de 9,5 mg.mL<sup>-1</sup>, et d'autre part, par la sensibilité à l'inhibition par l'ADP-glucose. Seule l'activité phosphorylasique majoritaire peut être inhibée avec des concentrations physiologiques en ADP-glucose (70% d'inhibition avec 200  $\mu$ M d'ADP-glucose).

## 2. Introduction

La voie de dégradation reste la partie du métabolisme de l'amidon la moins bien étudiée, bien que les enzymes que l'on soupçonne impliquées dans cette voie soient connues. Il est largement admis que la dégradation de l'amidon peut s'effectuer selon deux voies distinctes : la voie amylolytique et la voie phosphorytique. La première conduite par les hydrolases ( $\alpha$ -amylases,  $\beta$ -amylases) produit du glucose et du maltose. Dans la deuxième voie, du glucose-1-phosphate est produit par les  $\alpha$ -glucane phosphorylases (EC 2.4.1.1) à partir d'une extrémité non-réductrice d'un glucane lié en  $\alpha$ -1,4 et de phosphate inorganique (Pi).

Différentes isoformes ont été décrites chez les plantes supérieures (Steup et Latzko, 1979 ; Burr et Nelson, 1970), et dans d'autres organismes tels que chez l'algue verte unicellulaire *Dunalliella maritima* (Kombrink et Wöber, 1980), ou encore chez *Escherichia coli* (Schwartz et Hofnung, 1967). Par contre, une seule forme a été isolée chez *Chlorella vulgaris* (Nakamura et Imamura, 1983 a et b). Chez les Chlorophyceae (algues vertes), les phosphorylases ont été localisées uniquement dans le plaste.

Les études de fractionnement cellulaire, chez les plantes, ont montré que les activités sont localisées aussi bien dans le cytoplasme, que dans le chloroplaste (Steup, 1981). Néanmoins les formes chloroplastiques et cytoplasmiques ont des propriétés enzymologiques très différentes. Par exemple, dans la feuille d'épinard, la phosphorylase cytoplasmique (Pho 2) (Steup et Latzko, 1979) fait preuve d'une meilleure affinité, contrairement à la forme chloroplastique (Pho 1) (Steup, 1981), pour les polymères branchés de type glycogène. Une caractérisation plus approfondie révèle que ces deux enzymes possèdent des propriétés immunologiques différentes (Steup et Schächtele, 1986). Deux phosphorylases, une cytoplasmique et une chloroplastique, ont également été purifiées des tubercules de pomme de terre. Cette fois encore, les deux formes présentent des spécificités différentes pour les substrats branchés (Nakano et Fukui, 1986). Le rôle de l'activité cytoplasmique (Pho 2) dans le métabolisme de l'amidon n'est pas clair. D'autant plus, que des cultivars transgéniques de pomme de terre dont l'activité Pho 2 est réduite de plus de 95 %, ne sont pas affectées dans le métabolisme de l'amidon. Les seules modifications observées résident dans une augmentation du nombre de bourgeons par tubercule et une stimulation ainsi qu'une accélération de la floraison (Duwenig et coll., 1997). Ces effets ne sont nullement liés au métabolisme de l'amidon mais résulteraient plutôt de l'interférence occasionnée par un catabolisme décré d'oligosaccharides complexes pouvant, chez les plantes, avoir une activité de second messenger.

Hormis les glycogènes phosphorylases de mammifères ou de levures, toutes les phosphorylases végétales et bactériennes se caractérisent par une cinétique de type Michaelienne et se présentent sous la forme d'homodimère (Lee et Braun, 1973 ; Burr et Nelson, 1975 ; Albrecht et coll., 1998).

La régulation des activités phosphorylasiques par différents métabolites, tels que l'ADP-glucose, a été étudiée chez le pois (Graves et Wang, 1972), le maïs (Burr et Nelson, 1975), la pomme de terre (de Fekete, et Cardini, 1964) et chez *Chlorella vulgaris* (Nakamura et Imamura, 1983 a). L'effet de l'ADP-glucose s'est révélé variable. Dans le cas, de la pomme de terre, des graines matures de pois, ainsi que des organes photosynthétiques, la phosphorylase ne répond pas à l'inhibition par le nucléotide-sucré. Par contre, les phosphorylases de maïs et de graines de pois germées sont inhibées à 50% par une concentration en ADP-glucose fluctuant de 1 à 2 mM (Burr et Nelson, 1975 ; Graves et Wang, 1972). Chez l'algue verte unicellulaire *Chlorella vulgaris*, les auteurs rapportent que l'ADP-glucose agit à des concentrations physiologiques (50 % d'inhibition avec 1,6 mM d'ADP-glucose) à la manière d'un inhibiteur compétitif de l' $\alpha$ -glucane phosphorylase (Nakamura et Imamura, 1983 a).

Cette étude, qui reste préliminaire, a pour but d'une part de déterminer le nombre d'activités phosphorylase de spécificité distinctes potentiellement présentes chez *Chlamydomonas reinhardtii* et d'autre part de valider ou d'invalider le rôle possible d'une phosphorylase dans le métabolisme des malto-oligosaccharides. En effet, nous avons constaté, *in vitro*, que l'activité disproportionnante permet de métaboliser des malto-oligosaccharides avec un degré de polymérisation inférieure à quatre comme cela a été décrit dans pour le métabolisme du maltose chez *E. coli*. De plus, chez la pomme de terre l'enzyme D et la phosphorylase sont spécifiquement associées dans un complexe multienzymatique (Steup, communication personnelle).

### 3. Matériels et méthodes

Le glycogène de foie de lapin, l'ADP-glucose, le maltoheptaose proviennent de Sigma. La phosphoglucomutase de muscle de lapin, la glucose-6-phosphate déshydrogénase de levure ont été fournis par Boehringer-Mannheim.

#### 3.1 Les souches de *Chlamydomonas reinhardtii*, les conditions de croissances.

La souche sauvage 330 (*mt+ arg7 cw15 nit1 nit2*) de *Chlamydomonas reinhardtii* constitue la souche sauvage de référence utilisée dans cette étude. La croissance s'effectue en lumière continue ( $40 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ ) en présence d'acétate à 24°C. Les cultures liquides sont agitées vigoureusement sans bullage de CO<sub>2</sub>. Les cultures sont inoculées à  $5.10^5$  cellules par millilitre et récoltées à  $2.10^6$  cellules par millilitre. Le milieu standard TAP (Tris-Acétate-Phosphate) est détaillé dans Harris (1989b).

#### 3.2 Préparation des extraits bruts, dosage enzymatique, purification partielle des activités $\alpha$ -glucane phosphorylases.

Les extraits bruts sont toujours préparés à partir de cultures en fin de phase exponentielle de croissance ( $2.10^6$  cellules.mL<sup>-1</sup>). Les cellules concentrées à  $2.10^8$  cellules.mL<sup>-1</sup> par centrifugation (3000g pendant 15 min) sont lysées avec la presse de French à 10000 p.s.i.. L'extrait brut est immédiatement congelé à -80°C. Les dosages protéiques sont réalisés selon le mode opératoire fourni avec le Kit de dosage Bio-Rad. Après décongélation, l'extrait brut est centrifugé à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant obtenu est précipité avec de la protamine sulfate grade X de Sigma à une concentration finale de 0,5 % (poids/volume) pendant 15 min. Les tubes sont maintenus dans la glace. Après centrifugation, le surnageant est déposé sur une colonne échange d'anions de type Mono Q (HR10/10 : Pharmacia) préalablement équilibrée avec le tampon acétate de sodium 50 mM pH 6. Le dépôt des protéines s'effectue avec le système de chromatographie FPLC (Pharmacia) à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Les protéines sont éluées avec le tampon acétate de sodium 50 mM pH 6, 1 M NaCl de la manière suivante : un gradient linéaire de NaCl (0 à 10 %) est appliqué pendant 90 min suivi d'un plateau NaCl de 10 % pendant 45 min. Les fractions de 1mL sont immédiatement placées dans la glace. Avant congélation, 100  $\mu\text{L}$  sont prélevés pour un dosage d'activité et déterminer les activités hydrolytiques contaminantes, le reste des fractions est conservé à -80°C.

### **3.3 Zymogramme des activités hydrolytiques en conditions dénaturantes (zymogramme amidon)**

Chaque fraction (50 $\mu$ L) est dénaturée à 100°C pendant 5 min avec un tampon de dénaturation (25 mM Tris/glycine pH 8,3, 1% SDS, 5% de  $\beta$ -mercaptoéthanol) dans un volume final de 100  $\mu$ L.

Les protéines dénaturées sont déposées sur un gel polyacrylamide 7.5% (30:1 acry/bis ; 1,5 mm d'épaisseur) contenant 0,1% SDS et 0,3% d'amidon de pomme de terre. L'électrophorèse (Mini-Protean II cell ; Bio-Rad) se déroule à la température ambiante, à 15 V.cM<sup>-1</sup> pendant 90 min dans un tampon de migration Tris/glycine 25 mM pH 8,3, 1 mM DTT 0,1% SDS. A la fin de la migration, le gel est lavé deux fois sous agitation douce avec 100 mL de Tris 40 mM pendant une heure. Au cours de ces lavages, le SDS est éliminé et les protéines se renaturent. Le zymogramme amidon est incubé une nuit avec un tampon Tris/glycine 25 mM pH 8,3, 10 mM DTT une nuit à 25°C. Après l'incubation, le gel est coloré avec une solution d'iode (0,25% KI, 0,025% I<sub>2</sub>).

### **3.4 Suivi des activités phosphorylasiques au cours de la semi-purification**

L'activité phosphorylase est dosée dans le sens dégradation dans un tampon HEPES/NaOH 50mM Ph 7,8 (volume final de 0,5mL) contenant 10 mg.mL<sup>-1</sup> de glycogène, 10 mM de phosphate inorganique et 50  $\mu$ L de fraction. Les échantillons sont incubés pendant 1 heure à 30°C. La réaction est arrêtée en plaçant les échantillons 5 min à 100°C. Après centrifugation 2 min à 10000 g, le Glucose-1-phosphate (G-1-P) produit, au cours de l'incubation, est dosé en ajoutant 0,5 mL de mélange réactionnel composé de tampon Tris/HCl 50mM pH 7, MgCl<sub>2</sub> 120 mM, glucose-1,6 bisphosphate 0,05 mM, NADP 0,5 mM. L'absorbance du NADPH, H<sup>+</sup> est suivie à 365 nm après ajout de 0,5 U de phosphoglucomutase et 1 U de glucose 6 phosphate désydrégénase. L'activité de la phosphorylase est exprimée en nombre de nmol de G-1-P formé.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>d'échantillon.

### **3.5 Détermination des paramètres cinétiques et inhibition par l'ADP-glucose.**

Toutes les mesures d'activité réalisées pour déterminer les paramètres cinétiques respectent les conditions de linéarité de temps et de quantité d'extraits. Le K<sub>m</sub> (Pi) a été déterminé en fixant la concentration en glycogène à 2 mg.mL<sup>-1</sup> et en faisant varier la concentration en Pi de 0 à 10 mM.

Le K<sub>m</sub> (glycogène) et le K<sub>m</sub> (maltoheptaose) ont été déterminés en fixant la concentration d'orthophosphate à 5 mM.

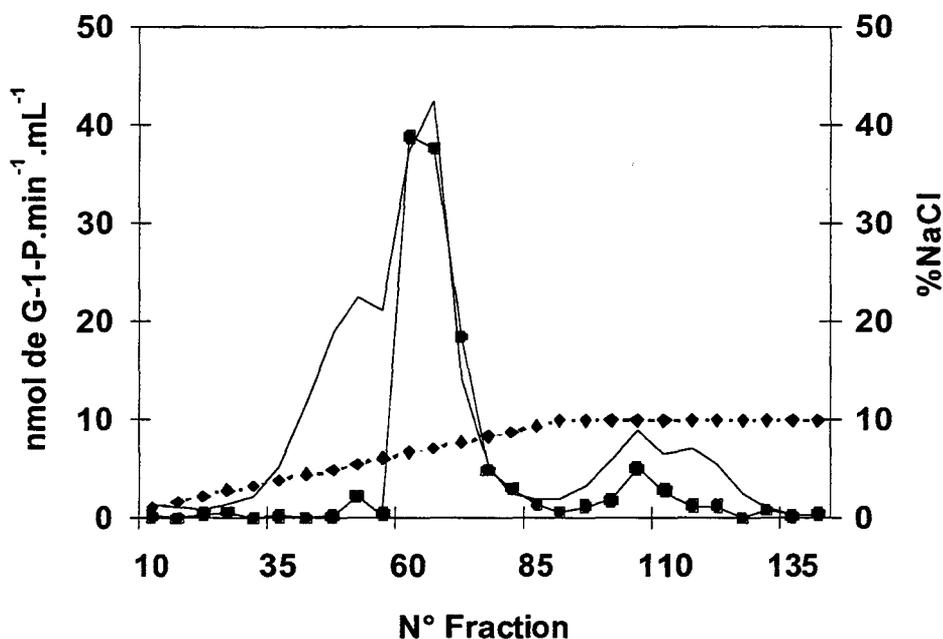
L'inhibition par l'ADP-glucose a été réalisée en incubant différentes concentrations en ADP-glucose (de 0 à 500 $\mu$ M) avec du glycogène et du Pi. Après 2 heures d'incubation, la réaction est stoppée en plaçant les échantillons 5 min à 100°C et la production de G-1-P est mesurée. Le rapport activité résiduelle sur activité témoin (sans ADP-glc) est déterminé pour chaque essai.

**Article 3 (en préparation): Deux formes d'activités phosphorylases font preuve de spécificités différentes relativement au catabolisme de des malto-oligosaccharides et des polysaccharides chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.**

## 4. Résultats

### 4.1 Isolement des deux formes de phosphorylase chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Un extrait brut de protéines provenant de la souche sauvage 330 est déposé sur une chromatographie d'échange d'anions (Mono Q HR10/10 ; Pharmacia). Les protéines sont éluées avec un gradient NaCl (de 0 à 10% (poids/volume)) puis avec un plateau NaCl de 10%. Le dosage de l'activité phosphorylasique, dans chaque fraction, révèle la présence de deux pics d'activités phosphorylasiques. Nous avons regroupé les fractions d'un même pic formant ainsi le pic 1 (fractions de 59 à 71) et le pic 2 (fractions de 101 à 110). L'activité phosphorylasique du pic 1 étant largement plus importante que celle du pic 2, nous avons voulu vérifier que ces deux pics d'activités correspondent réellement à deux activités distinctes.

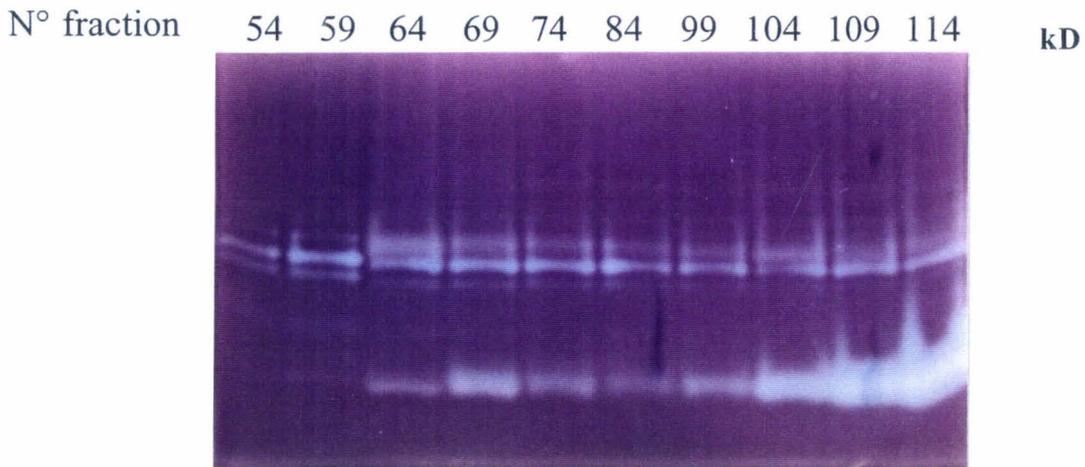


**Figure 1 :** Profil d'éluion des phosphorylases éluées avec un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6, 1M NaCl d'une colonne d'échange d'anions (MonoQ HR10/10). Dans cette expérience, 300 mg de protéine totale (après une étape de précipitation à la protamine sulfate) d'un extrait brut de la souche sauvage 330, sont déposés sur une colonne échangeuse d'anion de type MonoQ HR10/10 (Pharmacia). Les phosphorylases sont éluées pendant 90 minutes avec un gradient linéaire de NaCl jusque 10%. Un plateau NaCl 10% est alors maintenu pendant 45 minutes. Un mL par fraction est collecté à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Le profil d'éluion des protéines suivi à 280 nm et le gradient NaCl (poids/volume) sont respectivement représentés par un trait fin continu (-) et un losange (◆). L'activité phosphorylasique (●) est suivie une fraction sur cinq en dosant le G-1-P produit à partir du glycoène comme substrat (voir matériels et méthodes).

### 4.2 Présence d'activités hydrolytiques dans les pic 1 et 2.

Seules les fractions (54 à 114) contenant de l'activité phosphorylasique ont été déposées sur un gel SDS-PAGE contenant 0,3 % d'amidon (zymogramme amidon). Les protéines dénaturées migrent en

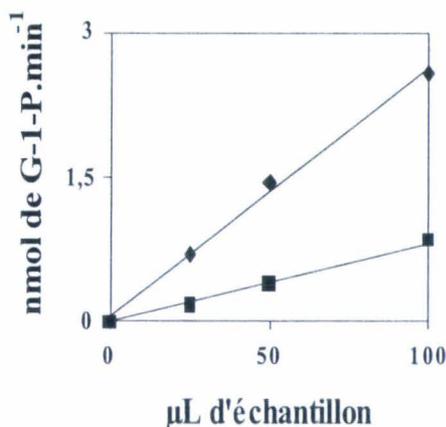
fonction de leur taille. Après renaturation et une nuit d'incubation à température ambiante, les activités hydrolytiques sont révélées avec une solution d'iode (KI 5%, I<sub>2</sub> 0,5%). Sur le zymogramme-amidon, nous observons principalement deux activités (Fig. 2). Celles-ci sont bien connues, il s'agit de l'activité hydrolytique de type amylase et l'activité débranchante de type isoamylase (Mouille et coll., 1996). D'après ces données, nous savons que le pic 1 est moins contaminé que le pic 2.



**Figure 2 : Détection des activités hydrolytiques présentes dans les fractions contenant de la phosphorylase.** La détection des activités hydrolytiques est réalisée sur une dizaine de fractions. 50  $\mu\text{L}$  de fraction sont dénaturés 5 min. à 100°C avec un tampon de dénaturation (SDS,  $\beta$ -mercaptoethanol). Les échantillons migrent ensuite dans un gel SDS-PAGE contenant 0,3% d'amidon de pomme de terre. Les protéines sont renaturées au cours des quatre lavages successifs avec un tampon Tris 40 mM. Le gel est ensuite incubé une nuit à température ambiante avec un tampon Tris-glycine 40mM, DTT 10mM. Les activités hydrolytiques sont révélées en colorant le gel avec une solution d'iode (KI 5% ; I<sub>2</sub> 0,5%). La bande blanche (absence d'amidon) de 53 kD renferme l'activité de type "amylase" (Mouille et coll., 1996). Par contre la bande bleue de 88 kD renferme une activité de débranchement" (Mouille et coll., 1996).

#### 4.3 L'activité phosphorylasique du pic 1 représente 90% de l'activité phosphorylasique

Nous avons déterminé les activités spécifiques du pic 1 à  $27 \pm 1$  nmol de G-1-P formé.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup> et du pic 2 à  $7,7 \pm 0.2$  nmol de G-1-P formé.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>. Les phosphorylases n'étant pas pures, il semble plus juste de rapporter l'activité spécifique des phosphorylases en mL d'extrait plutôt qu'en mg de protéine. Connaissant le volume de chaque fraction, nous avons calculé que l'activité phosphorylasique du pic 1 représente 90% de l'activité phosphorylasique totale.



**Figure 3 : Dosage des activités phosphorylasiques pour chaque pic.** Nous avons mesuré l'activité phosphorylasique pour chaque pic avec différents volumes d'échantillons (25, 50 et 100  $\mu\text{L}$ ) après 1 heure d'incubation à 30°C. Le G-1-P produit à partir du glycogène (10 mg.mL<sup>-1</sup>) et de l'orthophosphate (10 mM) a été dosé. Les losanges (◆) et les carrés (■) correspondent respectivement aux dosages d'activités phosphorylasiques du pic 1 et du pic 2.

#### 4.4 Détermination du $K_m$ (Pi) des deux formes de phosphorylases.

Les représentations de Lineweaver-Burk et de Michaelis-Menten des vitesses initiales de la phosphorylyse du glycogène pour les deux pics de phosphorylases de *C. reinhardtii* sont obtenues en variant la concentration d'orthophosphate (Pi) et en maintenant la concentration finale de glycogène à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Fig. 4). Nous avons calculé que les  $K_m$  pour l'orthophosphate sont respectivement de 2,7 mM et 1,1 mM pour le pic 1 et le pic 2.

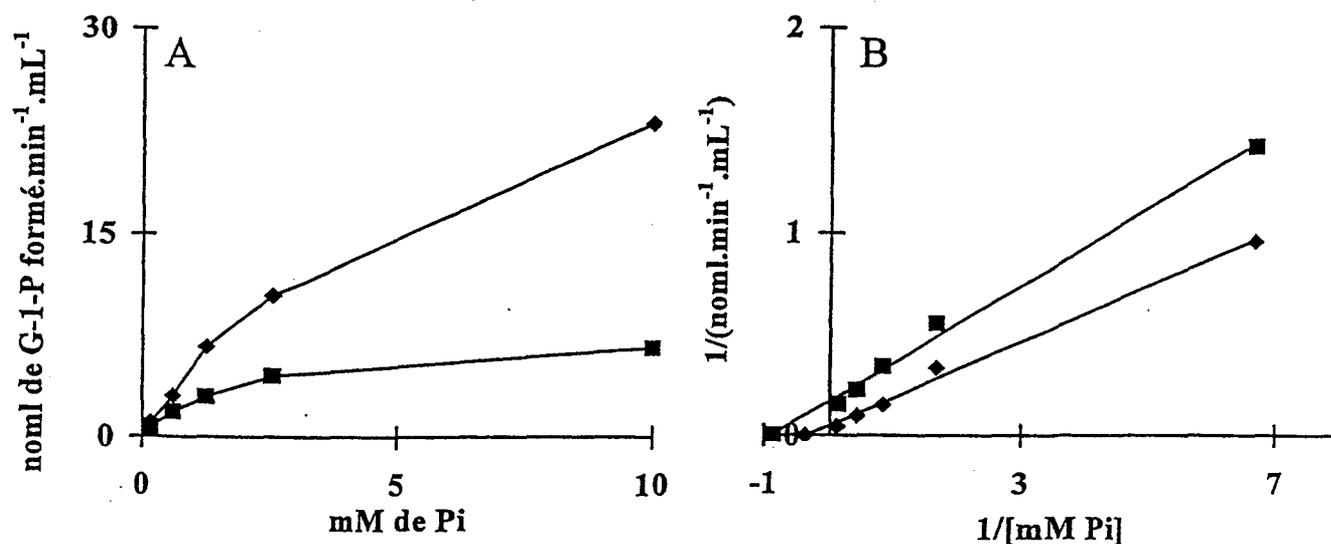
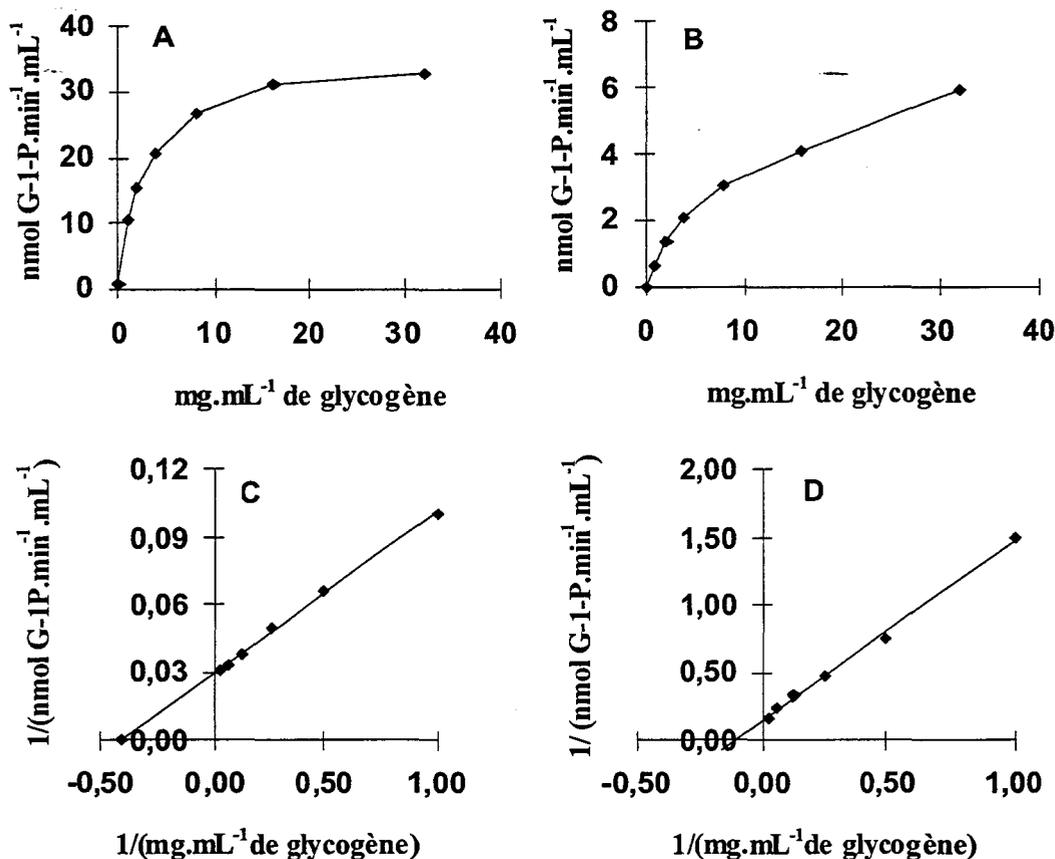


Figure 4 : Déterminations des  $K_m$  pour l'orthophosphate des pic 1 et 2. Les activités phosphorylases sont mesurées dans le sens dégradation à partir d'une concentration fixe de glycogène ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et de concentrations variables de Pi (0,35 à 10 mM). Les vitesses initiales sont représentées selon Michaelis-Menten (A) et Lineweaver-Burk (B). La production de G-1-P est dosée après un heure d'incubation à 30 °C avec une activité finale de 1,3 nmol de G-1-P par minute pour le pic 1 (◆) et de 0,7 nmol de G-1-P par minute pour le pic 2 (■).

Les valeurs de  $K_m$ (Pi) (1,1 et 2,7 mM) sont du même ordre que celui rapporté pour la phosphorylase de *Chlorella vulgaris* (2,4 mM) (Nakamura et Imamura, 1983 a et b). Ces valeurs correspondent à la concentration en orthophosphate (2,7 mM) rencontré dans le chloroplaste de *Chlamydomonas* (Hebeler et coll., 1992).

#### 4.5 Détermination des $K_m$ pour le glycogène (gly) des pic 1 et 2.

Les représentations de Michaelis-Menten (figure 5A et 5B) des vitesses initiales des phosphorylases avec des concentrations variables de glycogène de foie de lapin indiquent que l'activité correspondant au pic 2 (figure 5B) ne semble pas être saturée par le glycogène.

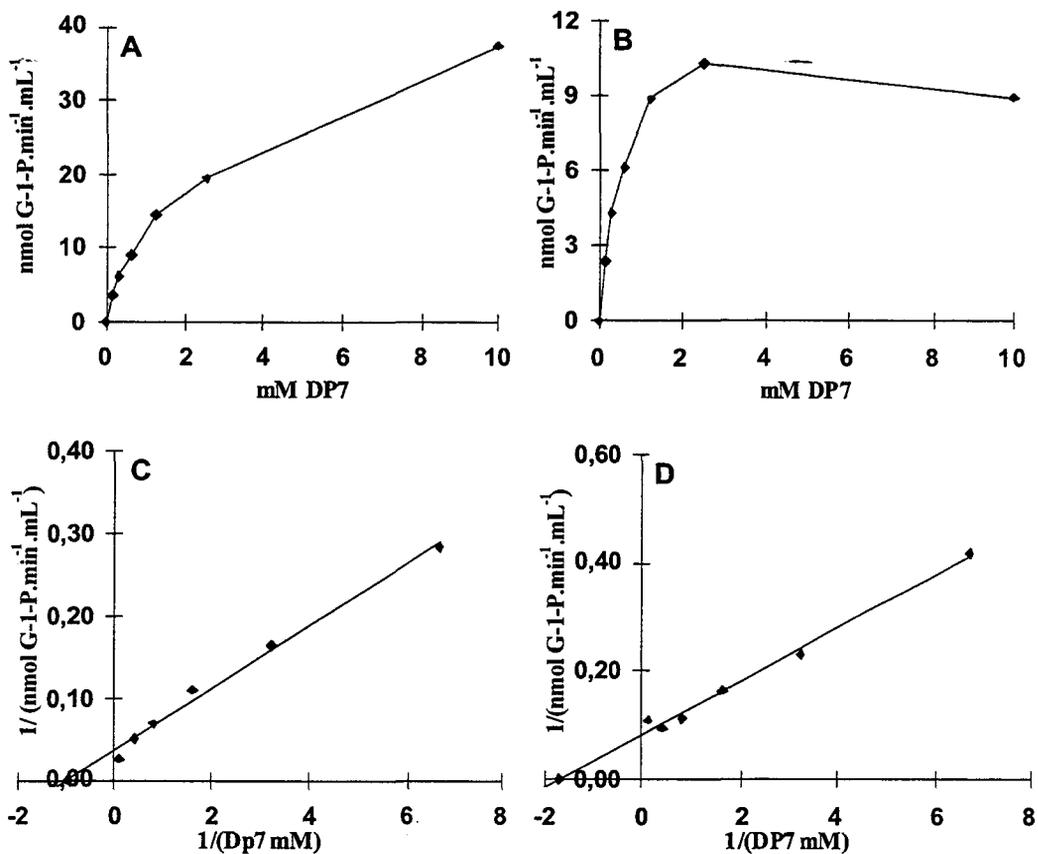


**Figure 5 : Représentations de Michaelis-Menten (A) et (B) et de Lineweaver-Burk (C) et (D) des cinétiques d'incubation des activités phosphorylasiques du pic 1 (A) et (C) et du pic 2 (B) et (D).** Les vitesses initiales ont été calculées à partir du G-1-P produit pour différentes concentrations finales de glycogène (1 à 32 mg.mL<sup>-1</sup>) après une heure d'incubation à 30°C. La concentration de l'orthophosphate (Pi) a été fixée à 10 mM. Les activités phosphorylasiques mises en jeu sont respectivement de 1,3 nmoles de G-1-P produit par min et de 0,7 nmoles de G-1-P produit par minute pour le pic 1 et le pic 2. Les vitesses sont exprimées en nmoles de G-1-P produit par minute et par millilitre d'échantillon.

Les  $K_m$  (gly) ont été déterminés d'après les représentations de Lineweaver-Burk. Les activités phosphorylasiques du pic 1 et 2 affichent respectivement un  $K_m$  égale à 2,4 mg.mL<sup>-1</sup> et à 9,5 mg.mL<sup>-1</sup> pour le glycogène. Néanmoins, nous devons rester prudents sur ces valeurs. En effet nous avons déjà mentionné le niveau de contamination des fractions utilisées pour nos caractérisations

#### 4.6 Déterminations du $K_m$ pour le maltoheptaose (DP7) des activités des pics 1 et 2.

Nous avons fait varier la concentration de maltoheptaose de 0,15 mM à 10 mM, la concentration en Pi a été fixée à 10 mM. Les représentations de Michaelis-Menten (figures 6A et 6B) indiquent qu'à 10 mM de maltoheptaose, l'activité phosphorylasique correspondant au pic 1 ne semble pas être saturée. L'activité phosphorylasique du pic 2 semble quant à elle, diminuer à 10 mM.



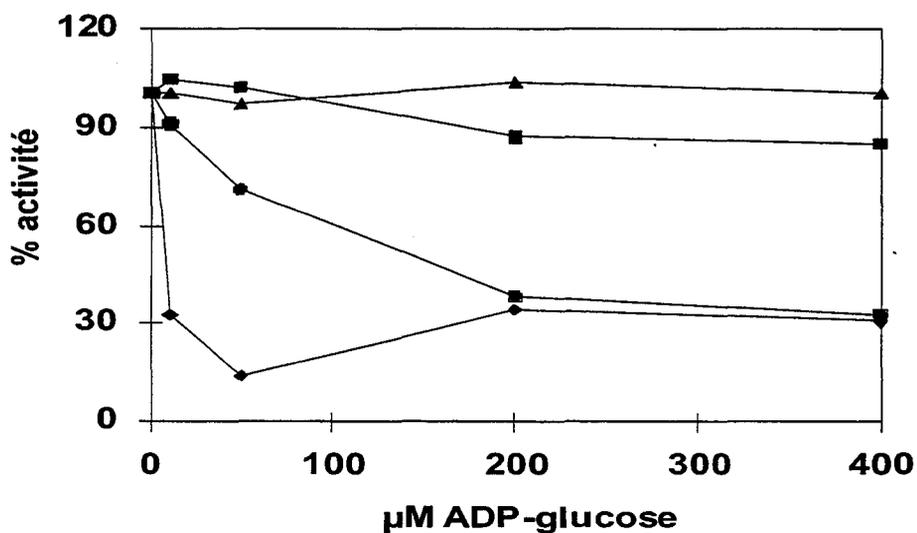
**Figure 6 : Représentations de Michaelis-Menten (A) et (B) et de Lineweaver-Burk (C) et (D) des activités phosphorylasiques du pic 1 (A) et (C) et du pic 2 (B) et (D).** La concentration de maltoheptaose (DP 7) varie de 0,15 à 10 mM et la concentration de Pi a été fixée à 10 mM. . Les activités phosphorylasiques mises en jeu sont respectivement de 1,3 nmoles de G-1-P produit par min et de 0,7 nmoles de G-1-P produit par minute pour le pic 1 et le pic 2. Les vitesses sont exprimées en nmol de G-1-P produit par minute et par millilitre d'échantillon

Les Km (DP 7) sont respectivement de 1 mM et de 0,5 mM pour le pic 1 et le pic 2. Nous constatons que l'affinité pour le maltoheptaose est pratiquement identique pour les deux formes. Malgré cela nous voyons que l'activité du pic 2 augmente beaucoup plus rapidement pour les concentrations physiologiques rapportées pour les malto-oligosaccharides en phase de synthèse d'amidon (si tous les oligosaccharides plastidiaux étaient constitués de maltoheptaose cette concentration serait au maximum de 100  $\mu$ M).

#### 4.7 Effet de l'ADP-glucose sur les activités phosphorylasiques.

L'ADP-glucose a été décrit comme un inhibiteur compétitif de la phosphorylase de *Chlamydomonas reinhardtii* (Ball et coll., 1991). Nous constatons que pour une même concentration en ADP-glucose, l'effet de celui-ci est différent. A 50  $\mu$ M d'ADP-glucose, l'activité phosphorylasique du pic 1 est inhibée alors que l'activité du pic 2 semblerait soit insensible soit encore très légèrement

activée (l'expérience a été répétée deux fois). De plus, l'inhibition de l'activité du pic 1 est différente lorsque le glycogène est utilisé comme substrat, il apparaît en effet qu'à 50  $\mu\text{M}$  d'ADP-glucose l'activité est inhibée à 70% alors qu'elle n'est inhibée qu'à 10% avec le maltoheptaose comme substrat.



**Figure 7 : influence de l'ADP-glucose sur les activités phosphorylasiques.** Les activités phosphorylasiques du pic 1 (●, ◆) et du pic 2 (▲, ■) ont été incubées avec différentes concentrations d'ADP-glucose (0 à 400  $\mu\text{M}$ ) et soit avec du glycogène à raison de 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (▲, ◆) ou du maltoheptaose à 5  $\text{mM}$  (■, ●), la concentration de  $\text{P}_i$  est fixée à 2  $\text{mM}$ . Après une heure d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée et le G-1-P produit est mesuré. Le pourcentage d'activité résiduelle est déterminé par le rapport de l'activité mesurée (avec ADP-glucose) sur l'activité initiale sans ADP-glucose.

## 5. Discussion.

D'après ces résultats préliminaires, il semble qu'il existe au moins deux formes d' $\alpha$ -glucane phosphorylase chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce résultat s'accorde à ceux obtenus, chez une autre algue verte appartenant au même ordre : *Dunaliella marina* (Kombrink et Wöber, 1980). Les études de compartimentation, chez *Dunaliella marina*, révèlent qu'au moins une des deux formes est présente dans le chloroplaste. Bien que dans notre étude, nous n'ayons pas, nous même, localisé ces activités, nous pouvons tout de même affirmer que la forme majeure se trouve dans le plaste. En effet, d'après les travaux de fractionnement cellulaire de Levi et Gibbs (1984) et Klein (1986), pratiquement toute l'activité phosphorylasique de *Chlamydomonas* se retrouve dans le chloroplaste. La détection d'une inhibition marquée de l'activité par l'ADP-glucose, retrouvée uniquement dans le plaste, confirme la localisation de la phosphorylase principale.

Malheureusement, il n'est pas possible de conclure quant à la localisation de la forme mineure. Les valeurs de  $K_m$  trouvées pour le glycogène ( $9,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et le DP 7 ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) et l'absence d'inhibition avec l'ADP-glucose la rapproche de la phosphorylase chloroplastique des plantes (Steup, 1990).

L'inhibition de la forme principale de l'enzyme à des concentrations physiologiques d'ADP-glucose a déjà été décrite pour *Chlorella marina* (Nakamura et Imamura, 1983 a et b). Les auteurs ont déterminé que l'ADP-glucose agissait comme un inhibiteur compétitif avec un  $K_i$  (ADP-glucose) estimé à  $0,10 \text{ mM}$  (pour l'activité dosée dans le sens de la dégradation). Pour *C. reinhardtii*, nous pouvons seulement constater que pour des concentrations faibles d'ADP-glucose oscillant entre  $0,010 \text{ mM}$  à  $0,4 \text{ mM}$ , il se produit une diminution du  $V_{\max}$  et une augmentation du  $K_m$ . Mais il n'est pas possible de conclure avec certitude sur le type d'inhibition sans de nouvelles expériences.

Nos résultats, encore très préliminaires, suggèrent que l'activité mineure serait plus active et efficace envers les maltodextrines qu'envers les polysaccharides. Inversement la forme majeure semble plus adaptée au catabolisme des polymères ramifiés. Il nous paraît particulièrement important dans ce contexte de prouver que la forme mineure de phosphorylase de l'algue est bien intraplastidiale et non pas cytoplasmique comme dans le cas rapporté pour une des deux formes de phosphorylase décrites chez les plantes supérieures.

La présence possible d'une activité de type maltodextrine phosphorylase chez *C. reinhardtii* nous amène à faire le rapprochement avec le métabolisme du glycogène et du maltose chez *E. coli*. En effet la

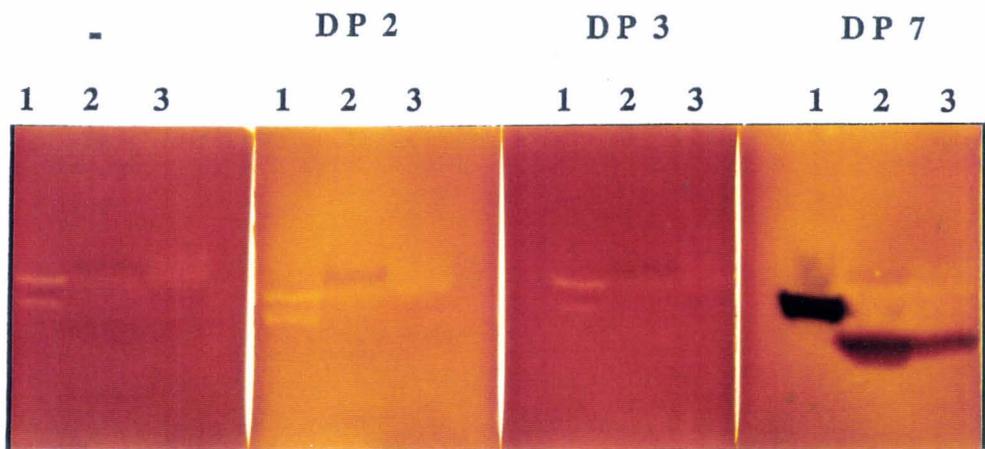


figure 15 : Zymogrammes d'incorporation de différents malto-oligosaccharides sur du glycogène avec des extraits bruts de *Chlamydomonas reinhardtii* et d'*Escherichia Coli*. Les extraits bruts (100 $\mu$ L) ont été dénaturés et déposés sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % de glycogène de foie de lapin. Après migration et renaturation des protéines, les morceaux de gel sont incubés séparément avec 2 mM de maltose (DP2), 2 mM de maltotriose (DP 3) et 2mM de maltoheptaose (DP 7) dans un volume final de 30mL de tampon d'incubation Tris/EDTA (50 mM/5mM). Un fragment a été incubé sans malto-oligosaccharide (-). Après une nuit d'incubation à température ambiante, les activités disproportionnantes correspondant aux extraits bruts d'*E. coli* (1) et de *Chlamydomonas reinhardtii* (2 et 3) sont révélées avec une solution d'iode.

bactérie renferme deux type d'activités phosphorylase : la maltodextrine phosphorylase et la glycogène phosphorylase. Cette dernière (GlgP) est chargée de concert avec l'isoamylase (GlgX) du catabolisme du glycogène. Par ailleurs, la maltodextrine phosphorylase codée par *malP* contribuerait à la phosphorolyse des malto-oligosaccharides rendus accessibles par l'amyloamylase (rappelons que l'amyloamylase catalyse la même réaction que l'enzyme D) (Boos et Schuman, 1998). Il serait dès lors tentant d'attribuer à la forme mineure de phosphorylase une fonction synergique à celle de l'enzyme D lors de la biosynthèse de l'amylopectine chez les plantes. Cette fonction s'accorde particulièrement bien à l'insensibilité de l'enzyme à l'inhibition par l'ADP-glucose produit massivement lors de la biosynthèse. Par contre la phosphorylase principale pourrait fort bien jouer un rôle analogue à celui de la glycogène phosphorylase en assistant les enzymes de débranchement lors de la dégradation de l'amidon et en absence d'ADP-glucose.

## **Discussion et Perspectives**

Nous avons résumé les acquis de notre thèse en 2 propositions. Nous formulerons ensuite les interprétations qu'elles permettent et spéculerons enfin sur la fonction possible des  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases dans la dégradation *sensu stricto* de l'amidon.

## Les acquis expérimentaux de la thèse

### 1. Les $\alpha$ -1,4 glucanotransférases définissent une classe nouvelle d'enzymes requise pour la synthèse normale de l'amidon.

Dans cette étude nous avons montré que la souche mutante JV45J n'était affectée dans aucune des activités documentées jusqu'aujourd'hui comme intervenant dans la synthèse de l'amidon. Les tests de complémentation nous ont amené à définir un nouveau locus appelé *ST11*.

L'analyse de toutes les activités enzymologiques participant au métabolisme de l'amidon, a révélé l'absence d'une activité disproportionnante (enzyme D) dans les mutants *st11-1*.

L'étude de coségrégation, menée sur plus de 50 ségrégeants méiotiques, a montré une corrélation parfaite entre le phénotype pauvre en amidon, l'absence d'activité disproportionnante et la présence de glucanes solubles dans l'eau.

La première partie de ce travail a été consacré à la caractérisation des glucanes solubles et à l'analyse structurale de l'amidon résiduel. L'étude de la fraction soluble par différentes approches telles que la RMN ou l'électrophorèse capillaire, a montré que les souches *st11-1* accumulent des malto-oligosaccharides linéaires de DP compris entre 2 et 16 résidus de glucose.

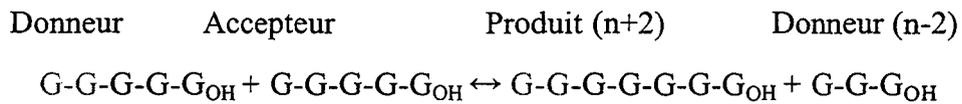
L'étude de la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine révèle une modification de la distribution des chaînes courtes. L'observation en microscopie électronique de transmission ou de balayage montre aussi une modification de la forme des grains.

Afin de connaître le rôle de l'enzyme D dans le processus de biosynthèse, nous avons entrepris une caractérisation enzymatique de l'activité disproportionnante de *C. reinhardtii*. Nous avons montré non seulement que l'enzyme D agit selon les règles établies par Jones et Whelan (1969) mais qu'elle était aussi capable de modifier la structure de l'amylopectine solubilisée. De plus, nous avons montré que l'enzyme D était capable de transférer des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes de l'amylopectine ou du glycogène.

Nous sommes arrivés à la conclusion que l'enzyme D de *Chlamydomonas reinhardtii* pouvait agir selon trois modes de fonctionnement que nous reprenons ci-dessous.

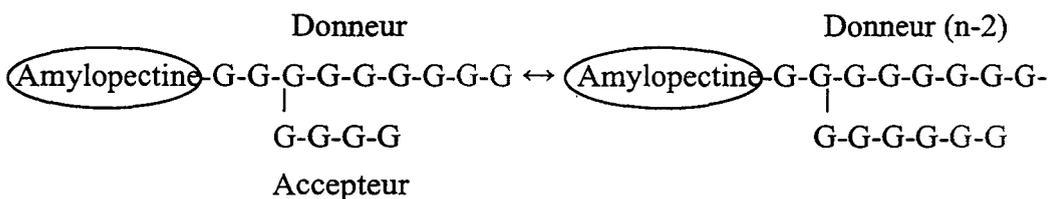
## 2. L' $\alpha$ -1,4 glucanotransférases de *Chlamydomonas reinhardtii* fonctionne selon trois modes distincts

- Le mode de fonctionnement (A) correspond aux réactions de transfert entre malto-oligosaccharides.

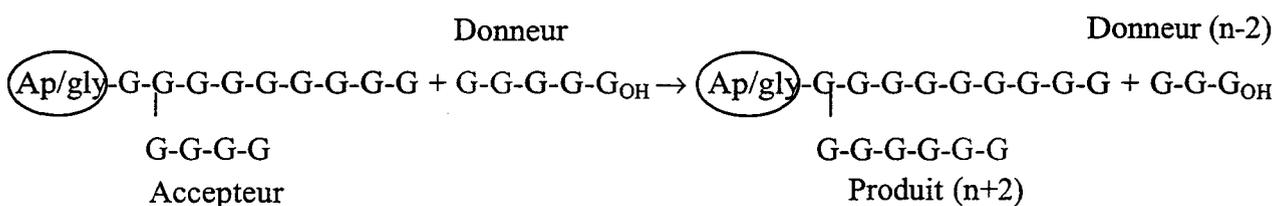


Dans cet exemple, deux molécules de maltopentaose produisent une molécule de maltoheptaose et une molécule de maltotriose.

- Le mode de fonctionnement (B) consiste en une nouvelle distribution des chaînes externes de l'amylopectine. En absence de malto-oligosaccharides, les chaînes externes de l'amylopectine servent de "donneur" et "d'accepteur". Les chaînes externes étant liées en  $\alpha$ -1,6, la réaction de transfert ne conduit pas à la production de malto-oligosaccharides.



- Le mode de fonctionnement (C) est un transfert de malto-oligosaccharides vers les chaînes externes de l'amylopectine ou du glycogène. La nature quasi irréversible de la réaction est liée à la très forte concentration locale d'extrémités non-réductrices acceptrices dans le polysaccharide.



Ce dernier mode de fonctionnement apporte une réponse à la critique principale opposée au modèle de synthèse discontinu proposé par Ball et coll. (1996). Cette critique reposait sur la perte d'énergie considérable, résultant de la libération de malto-oligosaccharides linéaires, provoquée par les enzymes de débranchement, lors de la maturation de l'amylopectine. Dans le mode de fonctionnement C, la quasi totalité de l'énergie libérée sous forme d'oligosaccharides au cours de l'épissage de la préamylopectine est récupérée par réinsertion sur les chaînes externes du polysaccharide. Le coût énergétique global, dans ce cas, n'est que de deux ATP (1 glucose libéré) par chaîne transférée, quelle que soit sa longueur.

Signalons que les trois modes de fonctionnement signalés ci-dessus sont compatibles avec les concentrations de substrats et de produits mesurés dans les plastes des souches sauvages.

### **Interprétation des résultats expérimentaux**

Nous proposons deux explications différentes concernant la fonction de l'enzyme D dans la biosynthèse de l'amylopectine. Ces deux explications ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusives. C'est pourquoi, nous proposons également un troisième modèle tenant compte simultanément de ces deux explications en apparence contradictoires.

#### **1. L'enzyme D catalyse *in vivo* le transfert des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes de la préamylopectine, en cours de synthèse.**

Selon la première explication, plus simple et plus directe, l'enzyme D catalyserait le transfert des malto-oligosaccharides sur l'amylopectine en cours de synthèse selon le mode précité de fonctionnement C. Dans ce cas les malto-oligosaccharides se comportent comme donneurs et les chaînes externes de l'amylopectine comme acceptrices. L'énergie utilisée pour un tel recyclage nécessite seulement 2 ATP par chaîne (quelle que soit la longueur de la chaîne). Cette hypothèse explique de manière directe l'ensemble des phénotypes observés en apparence sans connexion chez les mutants défectueux pour l'enzyme D.

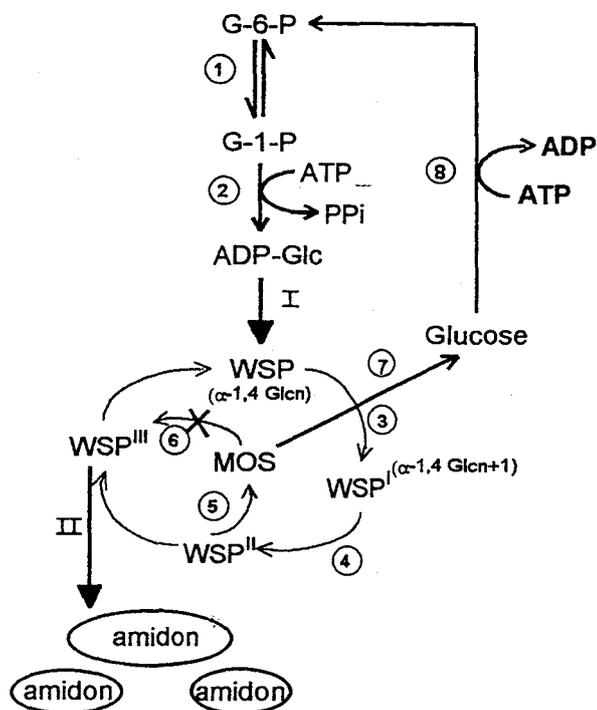
En effet, la modification structurale de l'amylopectine s'explique aisément par un défaut de transfert des malto-oligosaccharides sur des chaînes acceptrices courtes. Ce même défaut explique l'accumulation de malto-oligosaccharides de petites tailles chez le mutant.

De plus l'enrichissement sélectif en amylose et la diminution de la quantité totale d'amidon laisse supposer un défaut spécifique dans l'édification de la structure de l'amylopectine. Cette diminution de la synthèse de l'amylopectine peut refléter deux phénomènes distincts :

- 1) Le transfert des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes pourrait définir une étape facilitant l'édification d'une structure requise pour la cristallisation du polymère. Si cette interprétation s'avère correcte nous pouvons prévoir une accumulation du substrat précurseur (l'ADP-glucose) chez les mutants.
- 2) Le transfert des malto-oligosaccharides sur les chaînes externes pourrait s'avérer essentiel de par la récupération d'énergie qu'elle permet. Dans ce cas l'effondrement de la synthèse proviendrait d'une

chute de la concentration d'ATP se répercutant directement sur celle du nucléotide-sucre (l'ADP-glucose). Signalons à ce titre que *Chlamydomonas* constitue un système certainement plus limité en ATP que les organes de réserve des végétaux. En effet dans ce dernier cas le saccharose et par conséquent l'ATP qui en découle est fourni constamment par les tissus chlorophylliens. Dans cette optique, l'action de l'enzyme D sur la structure de l'amylopectine n'est pas requise pour une cristallisation normale du polymère.

En conclusion, l'enzyme D est indispensable à la synthèse de l'amidon et le recyclage des oligosaccharides entraîne de manière directe ou indirecte, une baisse quantitative de la synthèse de l'amidon.



**Explication 1.** L'enzyme transfère les malto-oligosaccharides (MOS) sur le polysaccharide en cours de synthèse. En absence d'enzyme D, les MOS s'accumulent, la synthèse de l'amylopectine est réduite et une partie des MOS est métabolisée principalement par la voie amylolytique très coûteuse en énergie.

- 1: Phosphoglucomutase plastidiale
- 2: ADP-glucose pyrophosphorylase
- 3: Amidon synthétases solubles et liées au grain
- 4: Enzymes de branchement
- 5: Enzymes de débranchement
- 6: Recyclage des  $\alpha$ -1,4 glucanes débranchés en 5 par réinsertion sur les chaînes externes de la préamylopectine
- 7:  $\alpha$ -amylases  $\alpha$ -glucosidase
- 8: Hexokinase plastidiale

L'entrée dans le cycle est symbolisée par I et constitue l'étape limitante de la synthèse.

La sortie du cycle se fait par cristallisation de l'amylopectine (II) et son insolubilisation. Cette dernière pourrait être facilitée sur le plan structural

## 2. L'enzyme D catalyse *in vivo* exclusivement le transfert des malto-oligosaccharides entre eux

Dans cette hypothèse les malto-oligosaccharides sont utilisés comme donneurs et accepteurs de glucanes et le polysaccharide n'interviendrait pas *in vivo* dans les réactions.

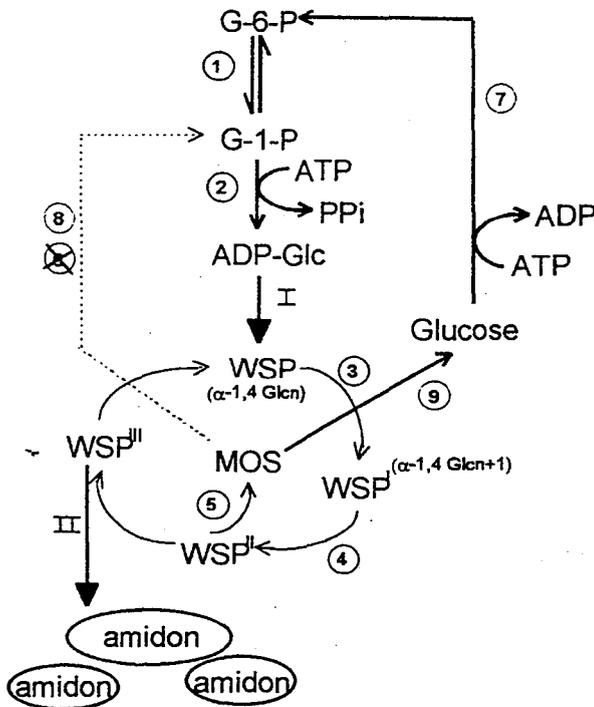
L'explication des phénotypes multiples présentés par les mutants s'avère dans ce cas indirecte et repose essentiellement sur des considérations énergétiques. Les malto-oligosaccharides sont dans cette

hypothèse dégradés par la phosphorylase plastidiale. Cette dernière produit du G-1-P pour chaque résidu clivé. La phosphorolyse récupère donc 1 des 2 ATP consommés par unité de glucose initialement incorporée dans le polysaccharide (pour ajouter un glucose à l'amidon il faut d'abord phosphoryler l'hexose (1<sup>er</sup> ATP consommé) et l'activer en ADP-glucose (2<sup>ème</sup> ATP consommé)). Si l'on substitue la phosphorolyse par l'hydrolyse, les 2 ATP initialement consommés seront perdus. Nous avons établi *in vitro*, au cours de notre thèse, que l'enzyme D couplée à la phosphorylase permet la production de G-1-P à partir de maltotriose, maltotétraose et maltopentaose. En effet, en absence d'enzyme D, la phosphorylase n'est pas capable de cliver un malto-oligosaccharide de DP inférieur à 5. Par contre, en sa présence, les DP 3, 4 et 5 seront disproportionnés en chaînes plus longues, permettant de ce fait la phosphorolyse. Ces résultats sont analogues à ceux concernant la maltodextrine phosphorylase chez *E. coli* (pour revue voir Boos et Schuman, 1998). Dans le cadre de cette deuxième explication, un défaut en enzyme D provoquerait l'incapacité des mutants à métaboliser les petits malto-oligosaccharides par phosphorolyse. Ce défaut provoquerait une accumulation de ces composés qui ne pourront être dégradés que par la voie hydrolytique peu efficace. La chute du rendement énergétique due au catabolisme hydrolytique des MOS provoquerait une décroissance de la concentration plastidiale d'ATP qui en retour conduirait à un effondrement de la concentration en ADP-glucose.

Enfin, l'effondrement de la concentration en précurseurs conduirait à son tour à une modification de la distribution des longueurs de chaînes de l'amylopectine. En effet, de telles modifications ont déjà été observées chez un mutant de *C. reinhardtii*, affectés au locus *STAI* (sous-unité régulatrice de l'ADP pyrophosphorylase). Chez ce mutant, l'amidon résiduel représente moins de 5% de la quantité normale de polysaccharide du fait d'un ralentissement important de la synthèse de l'ADP-glucose. L'analyse structurale révèle que l'amylopectine est modifiée par rapport à la souche sauvage (van den Koornhuyse et coll., 1996). Les mutants analogues chez le pois, les mutations *rb* et *rug3*, présentent le même phénotype. Dans ces situations, les modifications structurales de l'amidon sont supposées résulter de différences d'affinités présentées par les enzymes d'élongation, les amidon-synthétases, pour leur substrat commun l'ADP-glucose. Chaque isoforme d'amidon synthétase fait preuve de spécificités différentes relativement à la structure des substrats et des produits de la réaction. Par conséquent, des affinités distinctes de chaque amidon synthétase pour l'ADP-glucose aboutiront *in fine* à une modification structurale du polysaccharide lorsque la concentration en nucléotide-sucre varie.

Si l'effet sur la structure de l'amylopectine semble très indirect dans cette hypothèse, cette dernière n'en reste pas moins vraisemblable. En effet, les modifications structurales rapportées par van den Koornhuysen et coll., 1996 sont en accord avec celles que l'on observe au sein de l'amylopectine des mutants *stall-1*.

L'hypothèse 2 exposée ci-dessus prévoit une chute des concentrations d'ATP et d'ADP-glucose. Contrairement à l'hypothèse 1, il n'est pas possible d'observer une augmentation de la concentration d'ADP-glucose dans ces conditions.



**Explication 2.** L'enzyme D participe au cycle futile qui se déroule pendant la synthèse de l'amylopectine. En absence d'enzyme D, les MOS sont principalement dégradés par la voie amylolytique (trait épais) et dans une moindre mesure par la voie phosphorolytique (trait pointillé).

- 1: Phosphoglucomutase plastidiale
- 2: ADP-glucose pyrophosphorylase
- 3: Amidons synthétases solubles et liées au grain
- 4: Enzymes de branchement
- 5: Enzymes de débranchement
- 6: L'enzyme D dispropotionne les malto-oligosaccharides courts facilitant leur phosphorolyse
- 7: Hexokinase
- 8: Phosphorylase de type II
- 9:  $\alpha$ -amylases,  $\alpha$ -glucosidases

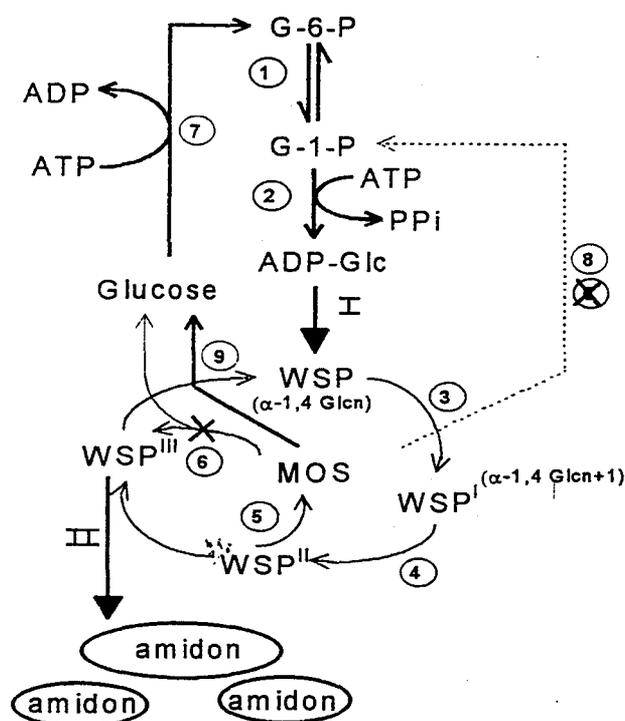
L'entrée dans le cycle est symbolisée par I et constitue l'étape limitante de la synthèse.

La sortie du cycle se fait par cristallisation de

### 3. Les 3 modes de fonctionnement de l'enzyme D décrits *in vitro* pour l'enzyme D sont actifs *in vivo*

Nous pouvons envisager un modèle intermédiaire dans lequel l'enzyme D participe au recyclage des glucanes longs par leur réinsertion sur les chaînes externes du polysaccharide et au métabolisme des petits malto-oligosaccharides par dispropotionnement et phosphorolyse. Nous avons vu, dans les expériences d'incorporation réalisées *in vitro* sur le glycogène et sur l'amylopectine, que le maltotriose de même que le maltotétraose et le maltopentaose sont très faiblement (voire pas du tout) transférés sur les chaînes externes selon le mode C que nous avons décrit page 74. Ils doivent donc être dispropotionnés, afin que les produits de la réaction soient, à leur tour, transférés sur la

préamylopectine ou hydrolysés en G-1-P, par une maltodextrine phosphorylase. L'implication d'une activité phosphorolytique, dans le catabolisme du maltotriose, expliquerait la présence d'une forme mineure (10% de l'activité totale) de phosphorylase qui reste insensible à l'inhibition par l'ADP-glucose. En effet, le nucléotide-sucre abolit plus de 95 % de l'activité phosphorylase des algues à des concentrations physiologiques en inhibiteur (<1 mM ADP-glucose) et en substrat (~3 mM Pi). Nous pensons que l'existence d'une forme insensible à cette inhibition reflète la nécessité de maintenir un catabolisme des malto-oligosaccharides actif lors de la biosynthèse. Ceci ne se comprend aisément que si l'on stipule l'existence d'un mécanisme d'épissage des glucanes conduisant à la libération de MOS qui doivent être métabolisés lors de la biosynthèse. Nous spéculons donc que la maltodextrine phosphorylase soit, elle aussi, impliquée dans le métabolisme biosynthétique pris dans son sens le plus large.



### L'enzyme D participe au recyclage des longs glucanes et au métabolisme des petits glucanes.

En absence d'enzyme D, les longs glucanes ne sont plus transférés sur les chaînes externes de la préamylopectine. Ils sont alors métabolisés principalement par la voie amylolytique (trait épais) et la voie phosphorolytique (trait pointillé).

- 1: Phosphoglucosmutase plastidiale
  - 2: ADP-glucose pyrophosphorylase
  - 3: Amidons synthétases solubles et liées au grain
  - 4: Enzymes de branchement
  - 5: Enzymes de débranchement
  - 6: L'enzyme D transfère les longs glucanes et disproportionne les malto-oligosaccharides courts
  - 7: Hexokinase
  - 8: Phosphorylase de type II
  - 9:  $\alpha$ -amylases  $\alpha$ -glucosidase
- L'entrée dans le cycle est symbolisée par I et constitue l'étape limitante de la synthèse.  
La sortie du cycle se fait par cristallisation de l'amylopectine (II) et son insolubilisation

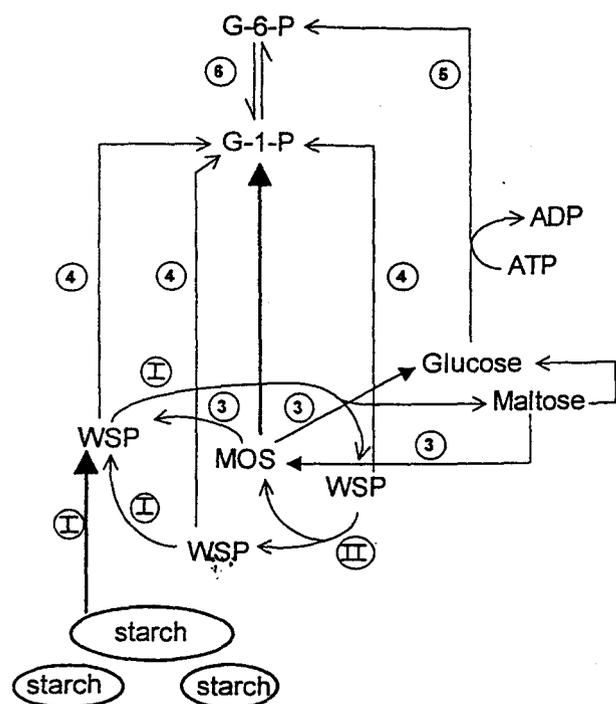
### Spéculations concernant l'enzyme D et le catabolisme de l'amidon

Les résultats obtenus au cours de cette thèse n'excluent absolument pas une fonction de l'enzyme D dans le processus normal de dégradation de l'amidon à l'obscurité ou lors de la germination. Cette enzyme constituant de loin l'activité prédominante capable de métaboliser les glucanes de DP



inférieur à 5 nous pensons qu'elle serait aussi impliquée dans les processus cataboliques. Récemment mais postérieurement à notre travail, un mutant d'*Arabidopsis thaliana*, dépourvu d'enzyme D a été isolé. Les travaux préliminaires ont révélé que les mutants accumulent des oligosaccharides à la fin de la phase obscure et ont un retard dans leur croissance. Aucune donnée précise sur la structure de l'amylopectine n'a été pour l'instant obtenue si ce n'est qu'elle est à priori normale. Néanmoins, l'étude en cycle jour-nuit indique que les mutants accumulent plus d'amidon par rapport au sauvage. L'explication la plus simple est que ces mutants dépourvus d'activité disproportionnante dégradent moins efficacement l'amidon. D'après nos propres résultats préliminaires il pourrait en être de même chez *Chlamydomonas*.

Le schéma proposé ci-dessous illustre la fonction potentielle de l'enzyme D dans la dégradation de l'amidon.



### Implication de l'Enzyme D dans la dégradation de l'amidon.

3: enzyme D

4:Phosphorylases

5:Hexokinase

6: Phosphoglucomutase

Les grains d'amidon se solubilisent (I) sous l'action des enzymes de dégradation pour donner un polysaccharide soluble dans l'eau (WSP). Celui-ci devient accessible à de nouvelles enzymes de dégradation telles que les phosphorylase, les enzymes de débranchement et l'enzyme D.

## Perspectives

Les perspectives abordées dans ce chapitre font suite aux résultats récents obtenus dans notre laboratoire sur la caractérisation moléculaires du locus *ST11* et aux expériences complémentaires qui découlent directement des modèles proposés. Celles-ci abordent un aspect plutôt fonctionnel et physiologique de l'enzyme D dans le métabolisme de l'amidon.

### 1. Caractérisation du locus *ST11*.

Très récemment Fabrice Wattebled a obtenu un fragment de PCR amplifié sélectivement à partir de l'ADN génomique de *Chlamydomonas*, à l'aide d'oligonucléotides dérivés de régions très conservées chez les  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases bactériennes et végétales. Un ADNg de 1557 nucléotides, dont 56% de la séquence représente des exons, code pour une protéine putative de 290 acides aminés partageant 45 % d'identité du côté correspondant (plutôt N-terminal) de l'enzyme D de la pomme de terre. Cet ADN génomique a été utilisé comme sonde d'hybridation moléculaire lors de caractérisations moléculaires par hybridations Southern de l'ADN génomique de nouveaux mutants. Ces derniers (porteur de l'allèle *sta11-2::ARG7*) obtenus par interruption génique du locus *STAI1* par le gène de l'argininosuccinate lyase (gène ARG7) a mis en évidence des altérations importantes de profil chez ces mutants. Ces résultats démontrent que le locus *STAI1* de *Chlamydomonas reinhardtii* code pour une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase montrant 45% d'identité de séquences avec l'enzyme D de *Solanum tuberosum*. Ceci conforte nos résultats de dosage de gène et prouve que *STAI1* définit le gène de structure de l'enzyme D. Puisqu'il s'agit bien d'un gène de structure et non d'un gène régulateur il devient difficile de ne pas attribuer le phénotype observé chez les mutants à la seule absence de l'enzyme D. A court terme, nous devrions être capable de compléter une souche mutante *sta11-1* sans paroi et présentant une auxotrophie pour l'arginine avec un vecteur plasmidique portant l'ADNc du gène *STAI1* et le gène fonctionnel pour l'arginino-succinate lyase. Les transformants seront sélectionnés sur un milieu dépourvu d'arginine puis testés sur un milieu carencé en azote. Les clones ayant intégré une ou plusieurs copies fonctionnelles du gène *STAI1* seront aisément reconnaissable par leur coloration bleue-nuit après vaporisation aux vapeurs d'iode. Toutes les études structurales pourront être entreprises pour montrer que l'amylopectine synthétisée ressemble à l'amylopectine sauvage. Parce que l'intégration du vecteur chez l'algue s'accompagne fréquemment d'une multiplication de copies placées en tandem au site d'insertion, nous serons probablement aussi en mesure d'examiner l'impact d'une surexpression de l'enzyme D sur le métabolisme de l'amidon.

## 2. Les fonctions physiologiques de l'enzyme D

Nous avons vu précédemment que le phénotype rencontré dans les souches mutantes *sta11-1* s'explique différemment selon le mode de fonctionnement de l'enzyme D au cours de la biosynthèse de l'amidon. Dans l'explication 1, l'enzyme D participe directement à la maturation de l'amylopectine alors que dans l'explication 2, l'enzyme D métabolise les glucanes courts pour la phosphorolyse. Nous

avons vu que seule l'explication 1 pouvait s'accorder avec l'observation d'une augmentation de la teneur en ADP-glucose chez les mutants. Par contre les deux hypothèses sont compatibles avec une chute de la concentration en nucléotide sucre et en ATP. Le simple dosage de ces deux métabolites, au cours de la synthèse de l'amidon, pourrait donc nous amener éventuellement à rejeter l'hypothèse 2.

Les études d'interactions géniques entre les différents locus *STA2* (GBSS), *STA3* (SSIII), *STA7* (enzyme de débranchement) devraient nous apporter des renseignements complémentaires sur le rôle de l'enzyme D dans la synthèse de l'amylopectine et plus particulièrement l'étude du polysaccharide soluble produit par les doubles mutants *sta7sta11-1*. D'après le modèle de synthèse discontinu, les malto-oligosaccharides (MOS) sont produits au cours de l'épissage de la préamylopectine. En absence d'activité isoamylasique (mutation au locus *STA7*), les MOS ne devrait pas être présents. Il s'en suit que dans les doubles mutants *sta7sta11-1*, nous devrions observer uniquement une accumulation du phytoglycogène.

### 3. La fonction de l'enzyme D dans le catabolisme de l'amidon.

Nous avons vu que l'activité disproportionnante est essentielle pour le métabolisme des glucanes courts. Chez les plantes supérieures, l'analyse de cultivars avec une activité réduite ou absente de l'enzyme D a surtout mis en évidence un retard de croissance qui s'explique facilement par une voie catabolique défectueuse. Contrairement à ces résultats, les souches mutantes *stall-1* de *Chlamydomonas*, ne font pas preuve lors de cycles jour-nuit d'une augmentation du temps de génération. Néanmoins, nous n'excluons pas que l'enzyme D soit aussi impliquée dans la dégradation de l'amidon. Pour vérifier cette hypothèse, les souches mutantes *stall-1* seront cultivées en cycle jour-nuit. Nous devrions observer au cours des cycles jour-nuit une augmentation progressive de la quantité d'amidon dans les souches mutantes *stall-1*. En effet, la vitesse de dégradation étant ralentie nous devons observer à chaque nouveau cycle de synthèse (le jour) une quantité d'amidon supérieure au cycle précédent.

## **Bibliographie**

- Abel, G., Springer, F., Willmitzer, L. and Kossman, J. (1996) *Plant J.* 10 (6), 981-991 "Cloning and Functional Analysis of a cDNA Encoding a Novel 139kDa Starch Synthase From Potato (*Solanum tuberosum* L.)"**
- Albrecht, T., Greve, B., Kossman, J., Buchner, P., Wobus, U. and Steup, M. (1998) *Eur. J. Biochem.* 251, 343-352 " Homodimers and Heterodimers of Pho1-Type Phosphorylase Isoforms in *Solanum tuberosum* L. as Revealed by Sequence-Specific Antibodies"**
- Ball, S. (1998) J.-D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant, eds. *Advances in Photosynthesis*, Vol 7, Godwinjee ed (Dordrecht, NL: Kluwer Academic Publishers), pp. 549-567 "Regulation of starch biosynthesis. In *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*".**
- Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J-C. and Matagne, R. (1990) *Plant Science* 66, 1-9 "Physiology of Starch Storage in the Monocellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii*"**
- Ball, S.G., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P. and Preiss, J. (1996) *Cell*, 86, 349-352 "From Glycogen to Amylopectin: a Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule"**
- Ball, S.G., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. and Decq, A. (1991) *Planta* 185, 17-26 "A *Chlamydomonas reinhardtii* Low-Starch Mutant is Defective for 3-Phosphoglycerate Activation and Orthophosphate Inhibition of ADP-Glucose Pyrophosphorylase"**
- Banks, W., Greenwood, C. and Khan, K. (1971) *Carbohydr. Res.* 17, 25-33 "The Interaction of Linear Amylose Oligomers with Iodine"**
- Beatty, M.K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A.M. and James, M.G. (1999) *Plant Physiol.* 119, (1) 255-266 "Purification and Molecular Genetic Characterization of ZPU1, a Pullulanase-Type Starch-Debranching Enzyme from Maize"**
- Bhattacharya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.H.N., Hedley, C. and Martin, C. (1990) *Cell* 60, 115-121 "The Wrinkled-Seed Character of Pea Described by Mendel is Caused by a Transposon-Like Insertion in a Gene Encoding Starch Branching Enzyme"**
- Blanshard, J. (1987) In *Starch : Properties and Potential*, eds Gaillard, T., Wiley, J., Michester, S., 16-54 "Starch Granule Structure and Function: a Physicochemical Approach"**
- Boos, W., and Shuman, H. (1998) *Microbiol. Mol. Biol.Rev.*, 204-229 "Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation"**
- Bovetto, L.J. (1988) Thèse d'université, Lille-Flandre Artois "La Cyclodextrine Glucosyltransférase de *Bacillus circulans*, I-Propriétés Physicochimiques, II-Paramètres Enzymatiques, III-Etude du mécanisme réactionnel"**

- Boyer, C.D. and Preiss, J. (1981) *Plant Physiol* 67, 1141-1145**  
 "Evidence for Independent Genetic Control of the Multiple Forms of Maize Endosperm Branching Enzymes and Synthases "
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998) *Int. J. Biol. Macromol.* 23, 85-112**  
 "Mini review Starch Granules: Structure and Biosynthesis"
- Buléon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossman, J. and Ball, S. (1997) *Plant Physiol.* 115, 949-958**  
 "Starches from A to C: *Chlamydomonas reinhardtii* as a Model Microbial System to Investigate the Biosynthesis of the Plant Amylopectin Crystal"
- Burr, B. and Nelson, O.E. (1975) *Annals New York Academy of Sciences*, 129-138**  
 "The Phosphorylases of Developing Maize Seeds"
- Burton, R.A., Zhang, X.Q., Hrmova, M. and Fincher, G.B. (1999) *Plant Physiol.* 119, 859-871**  
 "A Single Limit Dextrinase Gene is Expressed Both in the Developing Endosperm and in Germinated Grains of Barley"
- Caspar, T., Lin, T.P., Kakefuda, G., Benbow, L., Preiss, J., and Sommerville, C. (1991) *Plant Physiol.* 95, 1181-1188** "Mutants of *Arabidopsis* with Altered Regulation of Starch Degradation"
- Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D-J., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J-M., Ball, S. (1999) *Plant Physiol* 120, 993-1003**  
 "Genetic and biochemical evidence for the involvement of  $\alpha$ -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. "
- Craig, J., Lloyd, J., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A. Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L. and Smith, A.M. (1998) *The Plant Cell* 10, 413-426**  
 "Mutations in the Gene Encoding Starch Synthase II Profoundly Alter Amylopectin Structure in Pea Embryos"
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Shaw, E., Mouille, G., D'Hulst, C., Morell, M., Samuel, M.S., Bouchet, B., Gallant, D.J., Sinskey, A., Ball, S. (1999) *Plant Physiol* 119, 321-330** "Novel starch-like polysaccharides are synthesized by a soluble form of granule-bound starch synthase in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*"
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J-M., van den Koornhuise, N., Maddelein, M-L., Fournet, B. and Ball, S (1992) *J. Bacteriol.* 174, (11) 3612-3620**  
 "Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: Monocellular Algal Mutants Defective in Amylose Biosynthesis and Granule-Bound Starch Synthase Activity Accumulate a Structurally Modified Amylopectin"

- Denyer, K. Barber, L., Burton, R., Hedley, C., Hylton, C. Johnson, S., Jones, D., Marshall, J., Smith, A.M., Tatge, H., Tomlinson, K. and Wang, T. (1995) *Plant, Cell and Environment* 18, 1019-1026**  
 "The Isolation and Characterization of Novel Low-Amylose Mutants of *Pisum sativum* "
- Denyer, K. and Smith, A. M. (1992) *Planta* 186, 609-617**  
 "The Purification and Characterization of the Two Forms of Soluble Starch Synthase From Developing Pea Embryos"
- Doehlert, D.C. and Knutson, C.A (1991) *J. Plant. Physiol.* 138, 566-572**  
 "Two Classes of Starch Debranching Enzymes from Developing Maize Kernels"
- Duwenig, E., Steup, M., Lothar, W. and Kossman, J. (1997) *Plant. J.* 12 (2), 323-333**  
 "Antisense Inhibition of Cytosolic Phosphorylase in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Affects Tuber Sprouting and Flower Formation with Only Little Impact on Carbohydrate Metabolism"
- Edwards, A., Fulton, D.C., Hylton, C.M., Jobling, S.A., Gidley, M., Rössner, U., Martin, C. and Smith, A.M. (1999) *The Plant Journal* 17 (3), 251-261**  
 "A combined Reduction in Activity of Starch Synthases II and III of Potato has Novel Effects on the Starch of Tubers"
- Fekete, M. A. R. and Cardini, C.E. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 104, 173**  
 "Mechanism of Glucose Transfer from Sucrose into the Starch Granule of Sweet Corn"
- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M-L., Routier, F., Marianne-Pépin, T., Decq, A., Wieruszeski, J-M., Delrue, B., van den Koornhuise, N., Bossu, J-P., Fournet, B. and Ball, S (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (22), 16223-16230**  
 "Toward an Understanding of the Biogenesis of the Starch Granule: Evidence that *Chlamydomonas reinhardtii* Soluble Starch Synthase II Controls the Synthesis of Intermediate Size Glucans of Amylopectin"
- Fu, Y., Ballicora, M.A., Leykam, J.F. and Preiss, J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (39), 25045-25052**  
 "Mechanism of Reductive Activation of Potato Tuber ADP-Glucose Pyrophosphorylase"
- Gabriel, O. and Gersten, D.M. (1992) *Anal. Biochem.* 203, 1-21**  
 "Staining for Enzymatic Activity after Gel Electrophoresis, I. "
- Gao, M., Wanat, J., Stinard, P.S., James, M.G. and Myers, A. (1998) *Plant Cell* 10, 399-412**  
 "Characterization of *dull1*, a Maize Gene Coding for a Novel Starch Synthase"
- Ghosh, H.P. and Preiss, J. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4491-4504**  
 "Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase: a Regulatory Enzyme in the Biosynthesis of Starch in Spinach Leaf Chloroplasts"
- Graves, D.J. and Wang, J.H. (1972) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), 3rd edn. Vol. 3 p 435. Academic Press. New York.**

- Guan, H-P., Ping, L., Imparl-Radosevitch, J., Preiss, J. and Keeling, P. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* 342, 92-98**  
 "Comparing the Properties of *Escherichia coli* Branching Enzyme and Maize Branching Enzyme"
- Guan, H-P., and Preiss, J. (1993) *Plant Physiol.* 102, 1269-1273**  
 "Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes From Maize (*Zea Mays*) "
- Harris, E.H. (1989a) E., Harris, ed (San Diego: Academic Press), pp. 399-446**  
 "Genetic analysis. In The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use"
- Harris, E.H. (1989b) E., Harris, ed (San Diego: Academic Press), pp. 25-63**  
 "Culture and storage methods. In The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use"
- Hebeler, M., Hentrich, S., Mayer, A., Leibfritz, D. and Grimme, L.H. (1992) *Research in Photosynthesis in Photosynthesis* 111, 717-720** "Phosphate Regulation and Compartmentation in *Chlamydomonas reinhardtii* Studied by *in vivo* <sup>31</sup>P-NMR"
- Hehre, E.J. and Genghof, D.G. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 382-393**  
 "The  $\alpha$ -amylases as Glycosylases, with Wider Catalytic Capacities than Envisioned or Explained by their Representation as Hydrolases"
- Hizukuri, S. (1986) *Carbohydr. Res.* 147, 342-347**  
 "Polymodal Distribution of the Chain Lengths of a Amylopectins, and its significance"
- Hofnung, M., Schwartz, M. and Hatfield, D. (1971) *J. Mol. Biol.* 61, 681-694**  
 "Complementation Studies in the Maltose-A Region of *Escherichia coli* K12 Genetic Map"
- Hovenkamp-Hermelink, J., Jacobsen, E., Ponstein, A., Visser, R., Vos-Scheperkeuter, G., Bijmolt, E., de Vries, J., Witholt, B; and Feenstra, W. (1987) *Theoretical and Applied Genetics* 75, 217-221**  
 "Isolation of an Amylose-Free Starch Mutant of the Potato (*Solanum tuberosum* L.)
- James, M.G., Robertson, D.S. and Myers, A. (1995) *The Plant Cell* 7, 417-429**  
 "Characterization of the Maize Gene *sugary1*, a Determinant of Starch Composition in Kernels"
- Jeon, B.S., Taguchi, H., Sakay, H., Oshima, T., Wakagi, T. and Matsuzawa, H. (1997) *Eur. J. Biochem.* 248, 171-178**  
 "4- $\alpha$ -Glucanotransferase from Hyperthermophilic Archeon *Thermococcus littoralis*: Enzyme Purification and Characterisation, and Gene Cloning, Sequencing and Expression in *Escherichia coli*"
- Jones, G., and Whelan, W.J. (1969) *Carbohydr. Res.* 9, 483-490**  
 "The action Pattern of D-Enzyme, a Transmaltodextrinylase from Potato"
- Kakefuda, G., and Duke, S.H. (1989) *Plant Physiol.* 91, 136-143**  
 "Characterization of Pea Chloroplast D-Enzyme (4- $\alpha$ -D-Glucanotransferase)"
- Klein, U. (1986) *Planta* 167, 81-86**  
 " Compartmentation of Glycolysis and the Oxydative Pentose-Phosphate Pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*"

- Kombrink, E. and Wöber, G. (1980) *Planta* 149, 130-137**  
 "Identification and Subcellular Localization of Starch-Metabolizing Enzymes in the Green Alga *Dunaliella marina*"
- Kuriki, T. and Imanaka, T. (1999) *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, (5), 557-565** "The Concept of the  $\alpha$ -Amylase Family : Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism"
- Lacks, S.A., Springhorn, S.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7467-7473**  
 "Renaturation of Enzymes after Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate"
- Lee, E.Y.C and Braun, J.J. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 256-286**  
 "Sweet Corn Phosphorylase : Purification and Properties"
- Leloir, L., De Fekete, M. and Cardini, C. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 636-641**  
 "Starch and Oligosaccharide Synthesis from Uridine Diphosphate Glucose"
- Leloup, V., Colonna, P. et Buléon, A. (1991) Collection Sciences & Techniques alimentaire (I.N.R.A.) : Biotransformation des produits céréaliers. Chapitre III: 79-128** "Les Transformations Enzymatiques des Glucides":
- Levi, C. and Gibbs, M. (1984) *Plant Physiol.* 74, 459-463**  
 "Starch Degradation in Synchronously Grown *Chlamydomonas reinhardtii* and Characterization of the Amylase"
- Libessart, N., Maddelein, M-L., van den Koornhuise, N., Decq, A., Delrue, B., Mouille, G., D'Hulst, C. and Ball, S. (1995) *The Plant Cell* 7, 1117-1127**  
 "Storage, Photosynthesis, and Growth: the Condition Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in *Chlamydomonas*"
- Liebl, W., Feil, R., Gabelsberger, J., Kellermann, J. and Schleifer, K.H. (1992) *Biochem.* 207, 81-88**  
 "Identification and Characterization of a Novel Thermostable 4- $\alpha$ -Glucanotransferase *Thermotoga maritima* cloned in *Escherichia coli*"
- Lin, T.P., Caspar, T. Somerville, C. and Preiss, J. (1988a) *Plant Physiol.* 86, 1131-1135**  
 "Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* L. Henryh !lacking ADP-glucose pyrophosphorylase Activity"
- Lin, T.P., and Preiss, J. (1988) *Plant Physiol.* (Bethesda) 86, 260-265**  
 "Characterization of D-Enzyme (4-a-Glucanotransferase) in *Arabidopsis* Leaf"
- Linden, J.C., Tanner, W. and Kandler, O. (1974) *Plant Physiol.* 54, 752-757**  
 "Properties of Glucosyltransferase and Glucan Transferase from Spinach. "

- Lloyd, J.R., Landschuetze, V. and Kossman, J. (1999) *Biochem. J.* 338 (2), 515-521**  
 "Simultaneous Antisense Inhibition of Two Starch-Synthase Isoforms in Potato Tubers Leads to Accumulation of Grossly Modified Amylopectin "
- Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L. and Kossman, J. (1998) *Nature Biotechnology* 16, 473-477**  
 "Inhibition of a Starch-Granule-Bound Protein Leads to Modified Starch and Repression of Cold Sweeting"
- 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 (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (40) 25150-25157**  
 "Toward an Understanding of the Biogenesis of the Starch Granule: Determination of Granule-Bound and Soluble Starch Synthase Functions in Amylopectin Synthesis"
- Manners, D.J. and Rowe, K.L. (1969) *Carbohydr. Res.* 9, 441-450**  
 "Studies on Carbohydrate-Metabolising Enzymes Part XXI. The A-glucosidase and D-enzyme Activity of Extracts of Carrots and Tomatoes"
- Marshall, J., Sidebottom, C., Debet, M., Martin, C., Smith, A. and Edwards, A. (1996) *The Plant Cell* 8, 1121-1135**  
 "Identification of the Major Starch Synthase in the Soluble Fraction of Potato Tubers"
- Mac Gregor, E.A. (1988) *J. Protein Chem.* 7, 399-405**  
 " $\alpha$ -Amylase Structure and Activity"
- Mac Gregor, E.A. and Mac Gregor, A.W. (1985) *Carbohydr. Res.* 142, 223-236**  
 "A Model for the Action of Cereal Alpha-Amylases on Amylose"
- Meissner, H. and Liebl, W. (1998) *Eur. J. Biochem.* 250, 1050-1058**  
 "*Thermotoga maritima* Maltosyltransferase, a Novel Type of Maltodextrin Glycosyltransferase Acting on Starch and Malto-oligosaccharides"
- Monod, J., and Torriani, A. M. (1950) *Ann. Inst. Pasteur* 78, 65-77**  
 "De l'amylo maltase d' *Escherichia coli*."
- Morrison, W. (1988) *Journal of Cereal Science* 8 (1), 1-16**  
 "Lipids in Cereal Starches a Review"
- Mouille, G., Maddelein, M-L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B. and Ball, S. (1996) *The Plant Cell* 8, 1353-1366**  
 "Preamylopectin Processing: a Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants"
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L. (1992) *EMBO J.* 11, 1229-1238**  
 "Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in Transgenic Potatoes Leads to Sugar-Storing Tubers and Influences Tuber Formation and Expression of Tuber Storage Protein Genes"
- Nair, R.B, Baga, M., Scoles, G.J., Kartha, K.K. and Chibbar, R. (1997) *plant Science* 122, 153-163**  
 "Isolation, Characterization and Expression Analysis of a Starch Branching Enzyme II cDNA from Wheat"

- Nakamura, Y. and Imamura, M. (1983a) *Phytochemistry* 22 (4), 835-840**  
 "Characteristics of  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase from *Chlorella vulgaris*"
- Nakamura, Y. and Imamura, M. (1983b) *Phytochemistry* 22 (11), 2395-2399**  
 "Characterization of *Chlorella* Phosphorylase : the Glucan Specificity and Effect of Temperature"
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E. and Satoh, H. (1996) *Physiologia Plantarum* 97, 491-498**  
 "Changes in Structure of Starch and Enzyme Activities Affected by *sugary* Mutations in Developing Rice Endosperm. Possible Role of Starch Debranching Enzyme (R-Enzyme) in Amylopectin Biosynthesis"
- Nakano, K. and Fukui, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 (18), 8230-8236**  
 "The Complete Amino-Acid Sequence of Potato  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase"
- O'Shea, M.G., Morell, M.K. (1996) *Electrophoresis* 17, 681-688**  
 "High resolution slab gel electrophoresis of 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) tagged oligosaccharides using a DNA sequencer"
- O'Shea, M.G., Samuel, M.S., Konik, C.M., Morell, M.K. (1998) *Carbohydr. Res.***  
 "Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation"
- Pan, D. and Nelson, O., (1984) *Plant Physiol.* 74, 324-328**  
 "A Debranching Enzyme Deficiency in Endosperms of the sugary-1 Mutant of Maize"
- Palmer, T. N., Ryman, B. E., and Whelan, W.J. (1976) *Eur. J. Biochem.* 69, 105-115**  
 "The Action Pattern of Amylomaltase from *Escherichia coli* "
- Peat, S., (1953) *Nature* 172, 158**  
 "D-enzyme : a Disproportionating Enzyme in Potato Juice"
- Peat, S., Whelan, W.J., and Rees, W.R. (1956) *J. Chem. Soc. (Lond.)* 1956, 44-53**  
 "The Enzymic Synthesis and Degradation of Starch, part 20, The Disproportionating Enzyme of Potato"
- Peist, R., Scheinder-Fresenius, C. and Boos, W. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 10681-10689**  
 "The MalT-Dependent and *malZ*-Encoded Maltodextrin Glucosidase of *Escherichia coli* Can Be Converted into a Dextrinyltransferase by a Single Mutation"
- Rahman, A., Wong, K-S., Jane, J-L., Myers, A.M. and James, M.G. (1998) *Plant Physiol.* 117 : 425-435**  
 "Characterisation of SU1 Isoamylase, a Determinant of Storage Starch Structure in Maize"
- Rahman, S., Kosar-Hasmeni, B., Samuel, M.S., Hill, A., Abott, D.C., Skerrit, J.H., Preiss, P. Appels, R. and Morell, M.K. (1995) 22,793-803**  
 "The Major Protein of Wheat Endosperm Starch Granules"
- Schardinger, F. (1904) *Wien Klin. Wochenschr.* 17, 207-209**  
 "Azetongärung"

- Schötz, F., Bathelt, H., Arnold, C.G., Schimmer (1972).** *Protoplasma* 75, 229-254  
 "Die architektur und organisation der Chlamydomonas-zelle. Ergebnisse der elektronenmikroskopie von serienschnitten und der daraus resultierenden dreidimensionalen rekonstruktion".
- Schwartz, M. and Hofnung, M. (1967)** *European J. Biochem.* 2, 132-145  
 "La Maltodextrine Phosphorylase d'*Escherichia coli*"
- Smith, A.M., Bettey, M. and Bedford, L.D (1989)** *Plant Physiol.* 89, 1175-1181  
 "Evidence that the *rb* Locus Alters The Starch Contents of Developing Pea Embryos Through an Effect on ADP-glucose pyrophosphorylase"
- Starck, D.M., Timmermann, K.P., Barry, G.F. Preiss, J. and Kishore, G.M. (1992)** *Science* 258, 287-292  
 "Regulation of Amount of Starch in Plant Tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase"
- Steup, M. (1988)** in "The Biochemistry of Plant" (J. Preiss ed.), Vol. 14, 255-296. Academic Press, New York.
- Steup, M. (1990)** in "Methods in Plant Biochemistry", Vol. 3, 103-128. Academic Press Limited.
- Steup, M. and Latzko, E. (1979)** *Planta* 145, 69-75  
 "Intracellulaire Localisation of Phosphorylases in Spinach and Pea Leaves"
- Steup, M. and Schächtele, C. (1986)** *Planta* 168, 222-231  
 "II. Peptide Patterns and Immunological Properties. A comparison with other Phosphorylase Forms"
- Stinard, P.S., Robertson, D.S. and Schnable, P.S. (1993)** *Plant Cell* 5, 1555-1566  
 "Genetic Isolation, Cloning and Analysis of a *Mutator*-induced Dominant Antimorph of Maize *amylose extender1* Locus"
- Suganuma, T., Setoguchi, S., Fujimoto, S., and Nagahama, T. (1991)** *Carbohydr. Res.* 212, 201-212  
 "Analysis of the characteristic action of D-enzyme from sweet potato in terms of subsite theory"
- Sun, Z., and Henson C.A. (1990)** *Plant Physiol.* 94, 320-327  
 "Degradation of Native Starch Granules by Barley  $\alpha$ -glucosidases"
- Sun, Z., Duke, S.H. and Henson C.A. (1995)** *Plant Physiol.* 108, 211-217  
 "The Role of Pea Chloroplast  $\alpha$ -glucosidase in Transitory Starch Degradation"
- Takaha, T., Critchley, J., Okada, S., and Smith, S. M. (1998)** *Planta* 205, 445-451  
 "Normal starch content and composition in tubers of antisense potato plants lacking D-enzyme (4- $\alpha$ -Glucanotransferase)"

- Takaha, T., Yanase, M., Okada, S., and Smith, S. M. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 1391-1396**  
 "Disproportionating Enzyme (4- $\alpha$ -Glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of Potato"
- Takaha, H., Takaha, T., Okada, S., Takagi, M., Imanaka, T. (1996a) *J. Bacteriol.* 178 1600-1606**  
 "Cyclic Reaction Catalyzed by Branching Enzyme"
- Takaha, T., Yanase, M., Okada, S., Takata, H., and Smith, S. M. (1996b) *J. Biol. Chem.* 271, 2902-2908**  
 "Potato D-Enzyme Catalyzes the Cyclisation of Amylose to Produce Cycloamylose, a Novel Cyclic Glucan"
- Takaha, T., Yanase, M., Takata, H., Okada, S. and Smith, S. M (1998b) *Biochim. Biophys. Acta* 247, 493-497**  
 "Cyclic Glucans Produced by Intramolecular Transglycosylation Activity of Potato D-Enzyme on Amylopectin"
- Takeda, Y., Guan, H.P. and Preiss, J. (1993) *Carbohydr. Res.* 240, 253-263**  
 "Branching of Amylose by the Branching Isoenzymes of Maize Endosperm"
- Thorn, W. and Mohazzeb, S. (1990) *Starch* 42, 455-459**  
 " $\alpha$ -D-Polyglucane-Iodine Complexes"
- Tsai, C-Y, (1974) *Biochemical Genetics* 11, 83-95**  
 "The Function of the Waxy Locus in Starch Synthesis in Maize endosperm"
- Taylor, M.A., George, L.A., Ross, H.A. and Davies, H.V. (1998) *Plant J.* 13(3), 419-425** "cDNA cloning and characterisation of an  $\alpha$ -glucosidase gene from potato (*solanum tuberosum* L.)"
- van den Koornhuise, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Preiss, J. and Ball, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 16281-16287**  
 "Control of Starch Composition and Structure Through Substrate Supply in the Monocellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii*"
- van der Meer, I., Koops, A.J., Hakkert, J.C., van Tunen, A.J. (1998) *Plant J.* 15, 489-500**  
 "Cloning of the Fructan Biosynthesis Pathway of Jerusalem Artichoke. "
- van den Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J-P., Buléon, A., Visser, R. and Ball, S. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (35), 22232-22240** "Amylose is Synthesized *in vitro* by Extension of and Cleavage from Amylopectin"
- Villiers, A. (1891) *C. R. Acad. Sci.* 112, 536-538**  
 "Chimie Organique : Sur la Fermentation de la Féculé par l'Action du Ferment Butyrique"
- Walker, G.J. et Whelan, W.J. (1957) *Biochem. J.* 67, 548-**
- Wiesmeyer, H., and Cohn, M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 39, 427-439**  
 "The Characterization of the Pathway of Maltose Utilization by *Escherichia coli*.  
 II. General Properties and Mechanism of Action of Amylomaltase"
- Yamasaki, Y. and Suzuki, Y. (1980) *Planta* 148, 354-361**  
 "Two Forms of  $\alpha$ -Glucosidase from Sugar Beet seeds"

**Yu, S., Ahmad, T., Kenne, L. et Pedersén, M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1156, 313-320**  
"α-1,4 Glucan Lyase, a New Class of Starch/Glycogen Degrading Enzyme  
I. Efficient Purification and Characterization from red seaweeds"

**Yu, S. et Pedersén, M. (1993) *Planta* 191, 137-142**  
"α-1,4 Glucan Lyase, a New Class of Starch/Glycogen Degrading Enzyme  
II. Subcellulaire Localisation and Partial Amino-Acid Sequence"

**Yu, S., Ahmad, T., Kenne, L. et Pedersén, M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* 1244, 1-9**  
"α-1,4 Glucan Lyase, a New Class of Starch/Glycogen Degrading Enzyme.  
III. Substrate Specificity, Mode of Action, and Cleavage Mechanism"

**Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith, A.M., Rees, T. (1998b) *Plant J* 15, 357-365**  
"A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch hydrolyzing enzyme".

**Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W.L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A.M. and Chen, J. (1998a) *The Plant Cell* 10, 1699-1712**  
"A Mutant of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulates Both Starch and Phytyglycogen"

**Zhu, Z-P., Hylton, M., Rössner, U. and Smith, A.M. (1998) *Plant Physiol.* 118, 581-590**  
"Characterization of Starch-Debranching Enzymes in Pea Embryos"

