

50376
2002
387

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Génétique Microbienne

Présentée par

Fabrice WATTEBLED

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

Contribution à la compréhension du métabolisme

de l'amidon et sa régulation chez

Chlamydomonas reinhardtii.

Présentée le 13 décembre 2002, devant la commission d'examen composée de :

Président : J-C. Michalski

Rapporteurs : S. Delrot

A. Myers

Examineurs : M. Chatterjee

C. D'Hulst

Directeur de thèse : S. G. Ball

Résumé

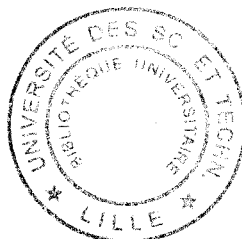
L'amylopectine, fraction majeure de l'amidon, est perçue comme seule responsable de la cristallinité du polysaccharide. L'amylose, produit par la GBSSI, apparaît quant à lui comme un polymère amorphe. Après avoir cloné les ADNc et ADNg encodant la GBSSI de *Chlamydomonas* (protéine de 69 kDa) nous avons démontré à l'aide d'analyses *in vitro* et *in vivo* qu'elle est capable d'induire la formation de cristaux de type B.

La deuxième partie de ce manuscrit concerne l' α -1,4 gluconotransférase ou encore enzyme D (EC: 2.4.1.25). D'après les travaux réalisés chez *Chlamydomonas reinhardtii*, cette protéine semble jouer un rôle essentiel dans la biosynthèse de l'amidon tandis que chez *Arabidopsis thaliana*, certains auteurs lui attribuent une fonction unique dans le catabolisme de la molécule de réserve. Avant de s'essayer à expliquer ce phénomène, il nous fallait démontrer que les phénotypes contradictoires dépendaient de mutations portant sur la même enzyme. Nous avons donc cloné et séquencé les ADNc et ADNg encodant l'enzyme D de *Chlamydomonas* et démontré que le locus *STAl1* correspond bien au gène de structure de cette enzyme. L'étude des quantités d'amidon et de maltooligosaccharides produits par des cellules cultivées en alternance jour/nuit renforcent l'idée d'un rôle important de l'enzyme D dans l'anabolisme de l'amidon.

Summary

Amylopectin, the major fraction of starch, is thought to be chiefly responsible for the crystallinity of starch. Amylose, the product of GBSSI synthesis, is usually considered an amorphous polymer. After cloning and sequencing the gDNA and cDNA coding for the *Chlamydomonas* GBSSI (69 kDa protein), we demonstrated that this protein was able to induce the formation of B-type crystals within starch.

In *Chlamydomonas* mutants lacking D-enzyme were previously shown to be defective for starch biosynthesis while the reverse (a defect in starch degradation) was witnessed in *Arabidopsis thaliana*. However the molecular nature of the *Chlamydomonas* mutations had not been defined and it remained unclear that both reports concerned exactly the same enzyme activity. In the second part of this thesis we have thus cloned and characterized both the cDNA and gDNA corresponding to the *Chlamydomonas* D-enzyme wild-type and mutant genes. We report the presence of allele specific modifications of the *stall* gene that encodes D-enzyme. The measure of starch and malto-oligosaccharide levels during day and night cycles in the wild-type and mutant strains confirms an important function of D-enzyme in starch biosynthesis in *Chlamydomonas*.



Remerciements

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Steven Ball dans l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle-UMR 8576, à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Directeur: Jean Claude Michalski).

Je tiens à remercier ici l'ensemble des personnes m'ayant aidé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Je remercie en premier lieu le Professeur Steven Ball pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance tout au long de ces années. Vous avez joué un rôle essentiel tant dans ma vie professionnelle que dans ma vie familiale. Je vous exprime ma profonde gratitude pour tout ce que vous avez fait pour moi..

Je remercie Monsieur S. Delrot, Professeur à l'université de Poitiers, pour sa présence en qualité de rapporteur au sein de ce jury, ainsi que Monsieur Chatterjee pour sa participation en tant qu'examineur.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance au Pr. Myers pour avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit mais surtout pour m'avoir accueilli pendant presque 1 an dans son laboratoire. La disponibilité et toute l'aide qu'il a su apporter, à moi comme à Gaëlle, tout au long de cette période font que notre passage en IOWA restera un souvenir inoubliable.

Je remercie à cette occasion les membres de son laboratoire qui sont devenus de merveilleux amis: Tracie, Jason et Courtney. Merci également à Martha pour son amabilité et sa gentillesse.

Merci à Ralf pour son accueil et son aide concernant l'étude du rythme circadien chez *Chlamydomonas*.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du 002 et 005 pour les bons moments passés au labo: Les anciens que sont Brigitte, André, Luc, Jean-Phi, David, comme la nouvelle génération représentée par Sylvain, Philippe et Jérôme. J'adresse un merci tout particulier à Christophe pour l'aide, le soutien constant et la patience dont il a su faire preuve à mon égard.

Enfin, j'adresse un grand merci à Gaëlle pour son amour, la confiance et la sérénité qu'elle m'apporte. Elle m'a offert le plus beau des cadeaux cette année en donnant naissance à notre fils Thomas qui est à mes yeux le plus merveilleux des bébés

Abréviations

3-PGA	3-phosphoglycerate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ADP-Glucose	Adénosine diphospho-Glucose
AGPase	ADP-glucose pyrophosphorylase
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BE	Enzyme de branchement
BSA	Serum albumine bovine
DBE	Enzyme de débranchement
DP	Degré de polymérisation
Enzyme D	Enzyme disproportionnante
GBSS	Amidon-synthétase liée au grain
Glc-1-P	Glucose-1-phosphate
Glc-6-P	Glucose-6-phosphate
kDa	kiloDaltons
K _m	Constante d'affinité
λ _{max}	Longueur d'onde au maximum d'absorption
nm	Nanomètre
P _i	Phosphate inorganique
PP _i	Pyrophosphate inorganique
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RFLP	Polymorphisme de longueur de fragments de restriction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SS	Amidon-synthétase soluble.
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
WSP	Polysaccharide soluble dans l'eau

I. Généralités.	1
A. L'Amidon.	2
1. Structure.	2
2. Les 2 principales composantes de l'amidon.	3
a) L'amylopectine.	3
b) L'amylose.	3
3. Cristallinité.	4
4. Synthèse du granule.	5
a) Synthèse du précurseur.	6
b) Elongation.	7
<i>(1) Amidon-synthétases liées au grain.</i>	7
(a) La GBSSI.	7
(b) La GBSSII.	10
<i>(2) Amidon-synthétases solubles (SS).</i>	10
c) Ramification.	13
5. Avancées dans la compréhension de la biosynthèse de l'amidon.	14
6. L'enzyme disproportionnante.	15
a) Qu'est-ce qu'une enzyme disproportionnante ?	15
b) Dosage de l'enzyme.	16
c) Appartenance de l'enzyme D à une super famille.	16
d) Rôle de l'enzyme D au sein de la cellule végétale.	16
7. Proposition d'un nouveau modèle de biosynthèse de l'amidon.	19
8. Dégradation de l'amidon.	21
9. L'amidon et le rythme circadien.	22
a) Définition.	22
b) La production d'amidon suit-elle une régulation circadienne ?	22

B. Chlamydomonas reinhardtii: un modèle pour l'étude de la biosynthèse de l'amidon. **24**

1. Présentation et cycle de vie. **24**

2. Outils moléculaires et génétiques. **25**

3. Chlamydomonas reinhardtii et l'amidon. **26**

a) Pourquoi Chlamydomonas ? **26**

b) Le crible à l'iode. **27**

c) Les mutants déjà isolés. **29**

II. Objectifs du travail de thèse **30**

III. Article I. **32**

Résumé. **33**

Introduction. **34**

Procédures expérimentales. **35**

Résultats. **37**

Discussion. **41**

Références **43**

IV. Article II **45**

Résumé. **46 et 48**

Introduction. **49**

Résultats. **52**

Discussion. **61**

Procédures expérimentales. **65**

Références **69**

V. Article III.	71
<i>Résumé.</i>	72
<i>Introduction.</i>	73
<i>Matériel et méthodes.</i>	76
<i>Résultats.</i>	77
<i>Discussion.</i>	82
 VI. Discussion générale	 84
<i>A. La synthèse de l'amylose par la GBSSI</i>	84
<i>B. Le rôle de l'α-1,4 glucanotransférase</i>	85
<i>C. La régulation circadienne du métabolisme de l'amidon chez Chlamydomonas. reinhardtii.</i>	87
 VII. Bibliographie générale	 88

I. Généralités

L'amidon constitue avec la cellulose et la chitine l'un des polysaccharides les plus répandus dans la biosphère. Sur le plan agronomique il définit la forme principale de réserve glucidique des plantes cultivées et détermine l'apport calorique le plus important en alimentation humaine ainsi que dans celle des animaux d'élevage. Depuis une centaine d'année des industries de biotransformation l'extraient sélectivement et le transforment en plusieurs centaines de sous-produits à vocation tant alimentaire que non-alimentaire. On retrouve les produits de transformation du polysaccharide dans des secteurs aussi variés que le bâtiment, la papeterie, les plastics biodégradables, le piégeage des arômes ou les gélifiants et les épaississants. L'ensemble des fonctionnalités industrielles des amidons de même que sa digestibilité dépendent directement de sa structure tandis que cette dernière reste principalement contrôlée par son métabolisme. C'est dire combien la connaissance de l'édification de l'architecture du grain constitue un enjeu économique considérable ! Sur le plan fondamental l'amidon est apparu avec l'acquisition de la photosynthèse par les cellules eucaryotes, il n'est retrouvé ni dans le règne animal ni chez les champignons, les bactéries ou les archaebactéries.

Deux types d'amidon sont retrouvés chez les organismes photosynthétiques eucaryotes. L'amidon floridéen est retrouvé dans le cytoplasme des algues rouges, des dinoflagellés et de leurs dérivés non photosynthétiques tels les parasites apicomplexa. L'amidon classique se localise uniquement dans les plastes des algues vertes et des végétaux verts (bryophytes, pteridophytes, spermatophytes). Ces plastes peuvent être photosynthétiques ou non tels les chloroplastes des cellules de feuille ou les amyloplastides des tissus de réserve. Il s'accumule sous la forme de granules insolubles dans l'eau dont la taille et la forme peuvent varier selon l'organisme étudié (Gallant *et al.*, 1992). Dans le tubercule de pomme de terre par exemple, les granules peuvent ainsi atteindre plusieurs dizaines de micromètres de diamètre alors que chez *Arabidopsis thaliana* la taille observée ne dépasse généralement pas 2 à 3 micromètres. C'est l'étude du métabolisme de ce type d'amidon que notre laboratoire a réussi à modéliser chez l'algue unicellulaire verte *Chlamydomonas reinhardtii*

A. L'amidon

1. Structure

Bien que composé uniquement de résidus de glucose, l'amidon se caractérise par des structures secondaires et tertiaires relativement complexes. Deux types de liaisons permettent de relier les sucres entre eux : celles de type α -1,4 et de type α -1,6. Ces dernières représentent ce que l'on appelle les « points de branchements » ou « points de ramifications ». La proportion respective des deux liaisons permet de définir 2 fractions polysaccharidiques distinctes présentes dans le grain : l'amylose et l'amylopectine. Le rapport existant entre l'organisation d'un grain d'amidon et celui de la molécule d'amylopectine est résumé dans la figure 1.

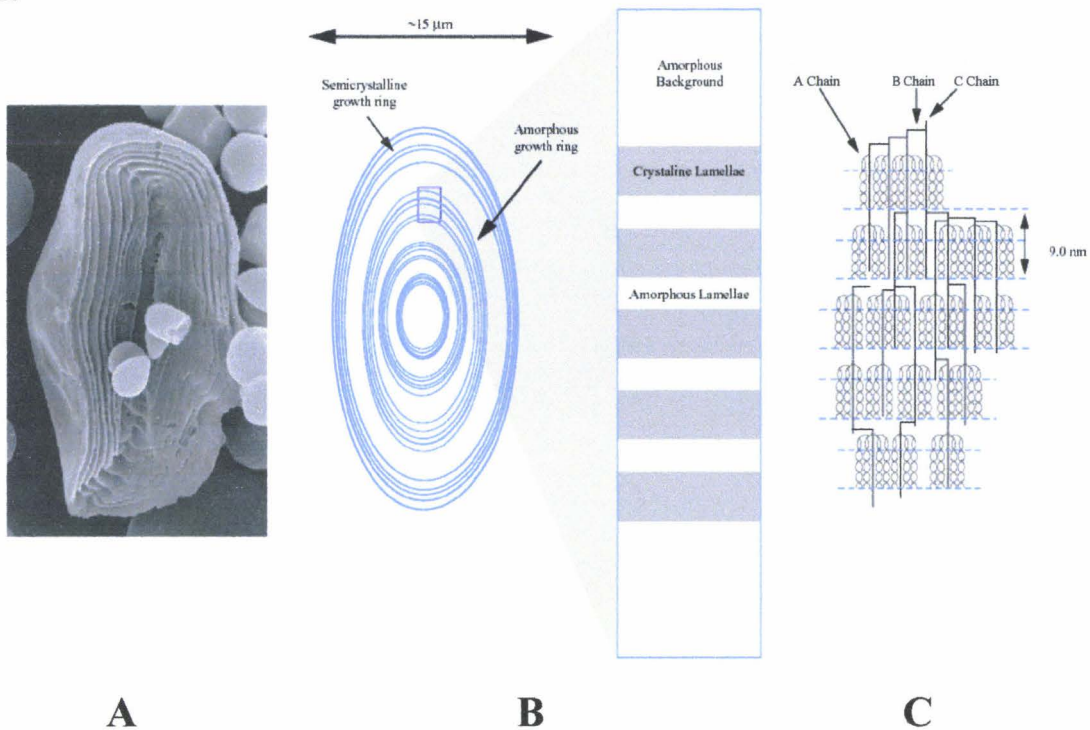


Figure 1 : Agrandissements successifs d'une région d'un grain d'amidon représenté en tranche (A). La projection en B reproduit l'agrandissement d'une région semi-cristalline. Les lamelles amorphes y sont figurées en blanc et les lamelles cristallines en gris. La partie C, succession de 5 lamelles amorphes et cristallines, représente une structure simplifiée de l'amylopectine.

La figure 1 représente un grain en tranche. On y distingue en son centre une zone amorphe localisée nommée hile puis une alternance de zones amorphes et de zones semi-cristallines dont la taille respective peut varier suivant les organismes et les conditions de

culture. L'analyse des zones semi-cristallines aux rayons X montre qu'elles se composent en réalité d'une succession de lamelles amorphes (en Blanc) et de lamelles cristallines (en gris, Figure 1-B). La taille cumulée d'une lamelle amorphe associée à la taille de la lamelle cristalline, déterminée par la diffraction des rayons X aux petits angles, fait très exactement 9 nm. Cette taille est une constante dans le règne végétal (Jenkins *et al.*, 1993).

2. Les 2 principales composantes de l'amidon

Outre l'amylopectine et l'amylose qui représentent les principales composantes polysaccharidiques de l'amidon, rappelons pour mémoire que le granule contient également des lipides, des sels minéraux ainsi que des protéines.

a) L'amylopectine

C'est la fraction majeure du granule d'amidon. En effet à elle seule, elle représente souvent plus de 70% de la masse du grain. Le degré de polymérisation (DP) y est élevé puisqu'il peut atteindre jusqu'à 500000 résidus de glucose tandis que son taux de ramification avoisine les 5%. Ces points de branchement sont répartis de façon asymétrique le long de la molécule. Cette distribution particulière lui donne une structure unique dite en grappe (Fig 1-C).

b) L'amylose

Avec un degré de polymérisation moyen de 100 à 10000 résidus de glucoses, couplé à un faible taux de branchement (<1%), cette molécule quasi-linéaire, arbore des chaînes pouvant comporter jusqu'à 1000 résidus. Ces tailles relativement grandes leur permet d'adopter une forme en spirale à l'intérieur de laquelle des molécules de petites tailles peuvent venir se loger. Bien que représentant jusqu'à 30% du poids sec du polysaccharide, cette fraction ne semble intervenir ni dans l'organisation structurale du granule ni dans sa cristallinité. La localisation exacte de l'amylose dans le grain d'amidon et son interaction avec l'amylopectine restent encore assez floues.

3. Cristallinité

L'étude de grains d'amidon par la diffraction des rayons X aux grands angles permet d'identifier 3 types de structures cristallines : les types A, B ou C. Les structures sont caractéristiques de l'organisme étudié. Ainsi l'albumen des céréales contient de l'amidon de type A, alors que le type B est plutôt retrouvé dans les tubercules de dicotylées. La figure 2 illustre les différences observables entre les types cristallins. La divergence réside essentiellement dans la taille et l'empilement des chaînes composant l'amidon ainsi qu'à la distribution des molécules d'eau (Buléon *et al.*, 1998). Le type C, qui est un intermédiaire entre le A et le B, est retrouvé chez le pois. Ces types représentent la maille cristalline correspondant aux double hélices schématisée en figure 1C. La figure 2 rend compte des structures A et B telles qu'on pourrait se les représenter en faisant une coupe dans ces doubles hélices.

Il est intéressant de constater que la structure cristalline du polysaccharide accumulé peut également dépendre du génotype des souches considérées. Nous pouvons prendre ici l'exemple du maïs ou de *Chlamydomonas* dont les lignées sauvages accumulent un amidon de type A. Dans ces organismes, l'obtention de lignées mutantes produisant un amidon enrichi en amylose, tels *amylose extender* chez le maïs ou *sta 3* chez *Chlamydomonas* conduit à l'accumulation d'un polysaccharide certes de plus faible cristallinité mais se rapprochant du type B (Shannon et Garwood, 1984; Buléon *et al.*, 1997). Buléon *et al.* expliquent ce changement non pas par la présence d'importante quantité d'amylose, molécule perçue jusqu'alors comme n'ayant aucun impact sur la structure cristalline de l'amidon, mais par le changement dans la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine.

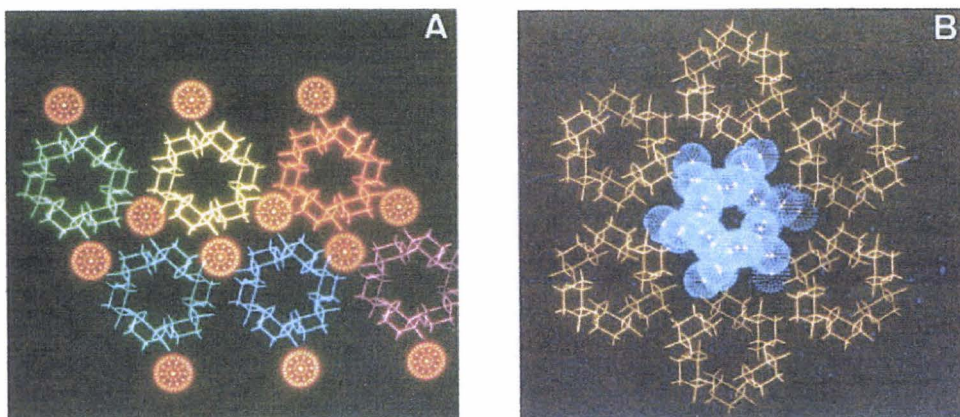


Figure 2 : Représentations tridimensionnelles des différentes structures cristallines de l'amylopectine. A, coupe transversale des chaînes d'une amylopectine de type A. Les molécules d'eau sont représentées sous forme de sphères oranges. B, coupe transversale des chaînes d'une amylopectine de type B. Les molécules d'eau sont ici représentées en bleu (Buléon *et al.*, 1997).

4. Synthèse du granule

Le schéma de biosynthèse de l'amidon tel qu'on le considérait il y a quelques années peut être résumé de façon relativement simplifiée par la figure 3. Ce schéma correspond parfaitement au métabolisme du glycogène chez les cyanobactéries. La filiation aux cyanobactéries ne doit nullement surprendre dans la mesure où le métabolisme de l'amidon qui nous intéresse est exclusivement plastidial.

Les 3 étapes anaboliques majeures y sont représentées :

La biosynthèse du précurseur ADP-glucose

L'élongation des glucanes linéaires

La ramification et la maturation de la structure

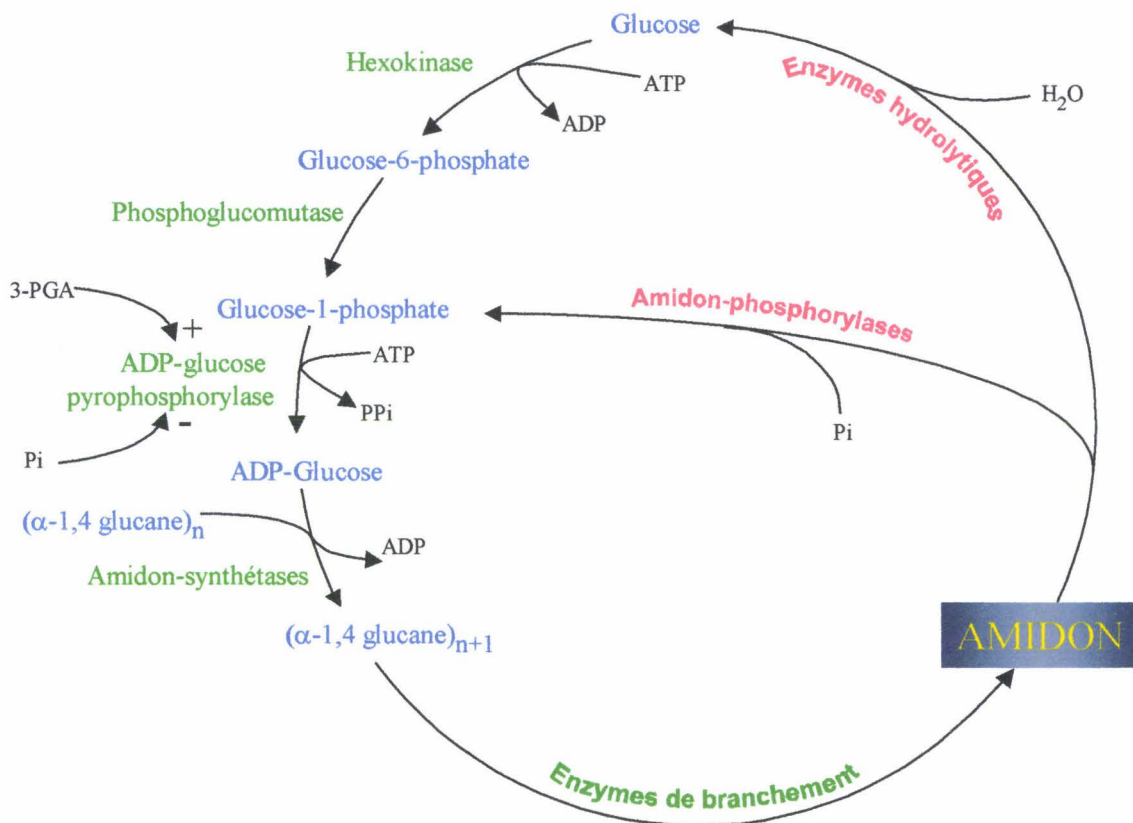


Figure 3 : Schéma général du cycle de biosynthèse de l'amidon chez les végétaux.

a) Synthèse du précurseur

La synthèse du précurseur ADP-glucose est assurée par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (ou AGPase, EC 2.7.7.27). Cette enzyme se définit, chez tous les végétaux étudiés, par un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ composé de 2 petites sous-unités catalytiques et de 2 grandes sous unités régulatrices de structures primaires apparentées. L'ADP-glucose pyrophosphorylase des plastes des dicotylées, monocotylées, algues vertes et cyanobactéries est activée par le 3-PGA et inhibée par l'orthophosphate. L'enzyme conditionne l'étape principale de contrôle du flux carboné dans la voie. En effet, quelque soit l'organisme photosynthétique étudié déficient pour l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase, on observe une baisse drastique, voire une disparition totale du polysaccharide de réserve (amidon pour les plantes, glycogène pour les cyanobactéries) (Tsai and Nelson, 1966 ; Lin *et al.*, 1988 ; Ball *et al.*, 1991 ; Müller-Rober *et al.*, 1992 ; Van den Koornhuyse *et al.*, 1996). A l'inverse, une plante exprimant une ADP-glucose pyrophosphorylase bactérienne à activité spécifique anormalement élevée, accumule de plus grandes quantités d'amidon que le témoin sauvage. Ces expériences démontrent formellement que l'ADP-glucose représente l'unique précurseur du cycle de biosynthèse de l'amidon et que sa production par l'ADP-glucose pyrophosphorylase peut être considérée comme « limitante » (Stark *et al.*, 1992). Ballicora *et al.* (2000) et Fu *et al.* (1998) ont récemment mis en évidence l'existence d'un contrôle post-traductionnel impliquant la réduction de la cysteine 12 de la petite sous-unité de l'enzyme par des thioredoxines. La forme oxydée de l'enzyme formerait un dimère inactif. Des expériences réalisées *in vivo* chez la pomme de terre ont mis en lumière la réalité de ce contrôle. Mieux : la réduction de l'ADP-glucose pyrophosphorylase semblerait fortement corrélée à l'apport de saccharose qui en constituerait le signal amont. Précisons que le résidu incriminé (Cys12) n'existe pas chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce qui ne doit nullement surprendre puisque que le saccharose y est quasi inexistant. (Zabawinski *et al.* 2000) et que le contrôle redox du métabolisme commence seulement à apparaître chez les chlorophyceae. Outre l'ADP-glucose pyrophosphorylase plastidiale classique, les albumens de grains de céréales contiennent également une forme extraplastidiale de l'enzyme peu sensible au 3-PGA. Dans ce cas précis l'ADP-glucose est pour grande partie synthétisée en dehors du plaste et est importée par un transporteur particulier encore mal identifié.

b) Elongation

L'étape d'élongation des glucanes est assurée par les adénosine diphosphate glucose α -1,4-glucanotransférases (EC 2.4.1.11) également appelées amidon-synthétases. Leur nombre est variable (de 4 à 5) suivant l'organisme étudié. Il en existe 2 types : les amidon-synthétases solubles, encore appelés SS pour Soluble Starch Synthase, et les amidon-synthétases liées au grain ou GBSS pour Granule Bound Starch Synthase. Ces enzymes permettent le transfert du résidu de glucose du substrat ADP-glucose sur l'extrémité non réductrice des chaînes glucaniques en formation par création d'une liaison O-glycosidique de type α -1,4 (Recondo et Leloir, 1961). Les amidon-synthétases se reconnaissent également de part leur séquence peptidique primaire. En effet, toutes possèdent une séquence d'acides aminés de type KTGGL (parfois KVGGL) du côté N-terminal. C'est la présence de cette séquence dans la glycogène synthétase bactérienne qui a permis d'en identifier la fonction. En effet, l'obtention de protéines mutantes met en évidence l'implication de cette région de la protéine dans la fixation à son substrat ADP-Glucose (Furukawa *et al.*, 1990).

(1) Amidon-synthétases liées au grain.

Est qualifiée d'amidon-synthétase liée au grain une enzyme retrouvée en étroite association avec le granule d'amidon et capable de catalyser l'élongation de glucanes.

En 1985, MacDonald et Preiss sont les premiers à avoir purifié 2 isoformes répondant à ces critères chez le maïs. Quelques années plus tard les GBSS I et II sont également purifiées chez le pois, la pomme de terre ainsi que chez le blé (Smith, 1990 ; Dry *et al.*, 1992 ; Denyer *et al.*, 1995).

(a) La GBSSI

La GBSSI représente l'isoforme majeure des protéines liées au grain puisqu'elle constitue plus de 95% de toutes les protéines associées à l'amidon. Sa masse moléculaire, d'environ 60 kDa, est relativement constante à travers le règne végétal comme le montre le tableau 1. La seule exception connue est celle de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* dont la protéine arbore une masse nettement plus élevée. En effet, la migration sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante attribue à la protéine une taille de 76 kDa. Les

travaux menés par D'Hulst (1997) lors de sa thèse ont montré que la GBSSI de *Chlamydomonas* possède une extension C-terminale, absente dans les autres organismes, qui explique en partie la différence de masse observée. Néanmoins, ces travaux n'avaient pas permis de déterminer la masse moléculaire de l'enzyme avec précision.

Organisme considéré	Taille de la GBSSI (en kDa)
Maïs	58 ^a
Pomme de terre	57 ^b
Blé	60 ^c
Pois	58/58 ^d
Orge	56 ^e
Riz	55 ^f
Arabidopsis	58 ^g
<i>Chlamydomonas</i>	76 ^h

Tableau 1 : poids moléculaires de quelques GBSSI

a : Shure *et al.*, 1983 ; b : Vos Scheperkeuter *et al.*, 1986 ; c : Denyer *et al.*, 1995 ; d : Edwards *et al.*, 2002 ; e : Rohde *et al.*, 1988 ; f : Wang *et al.*, 1990 ; g : Zeeman *et al.*, 2002 ; h : cette taille correspond à une estimation effectuée à la suite d'un gel SDS/PAGE, Delrue *et al.*, 1992

Le rôle de la GBSSI a été mis en lumière par l'étude des mutants aux *loci WAXY* des céréales, *AMF* de la pomme de terre, *LAM* du pois et *STA2* de *Chlamydomonas* (Tsai, 1974 ; Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987 ; Denyer *et al.*, 1995 ; Delrue *et al.*, 1992). En effet, dans chacun de ces mutants où la GBSSI est absente ou tout au moins inactive, on observe la disparition de la fraction amylosique de l'amidon. La quantité produite et la cristallinité des granules restent cependant tout à fait normales. Ces études démontrent sans ambiguïté la responsabilité de la GBSSI dans la synthèse de l'amylose (il est à noter que par abus de langage la GBSSI est régulièrement nommée protéine Waxy, de même, un amidon produit dans un fond génétique mutant au locus *waxy* est appelé amidon waxy à cause de l'aspect cireux qu'il procure aux grains de maïs). Cependant la manière dont l'amylose est produite ainsi que sa localisation au sein du granule restent à éclaircir.

L'hypothèse selon laquelle la GBSSI puisse aussi jouer un rôle dans la synthèse de l'amylopectine fut avancée suite aux études menées par Baba *et al.* (1987), Maddelein *et al.* (1994) ainsi que ceux de Denyer *et al.* en 1996. Ce n'est cependant qu'en 1998 grâce aux travaux effectués par Van de Wal *et al.* qu'est apparue l'idée que l'amylose puisse être le résultat de l'extension des chaînes externes de l'amylopectine par la GBSSI, chaînes ensuite

clivées et libérées à l'intérieur du grain. En effet une expérience de chasse menée sur de l'amidon purifié de *Chlamydomonas reinhardtii* en utilisant de l'ADP-glucose radiomarqué et ensuite du substrat « froid » montre le passage du radioélément de l'amylopectine à l'amylose au cours de la synthèse de ce dernier. Ceci peut s'expliquer si on imagine que la GBSSI se sert des chaînes externes de l'amylopectine (relativement accessibles) comme substrat afin de les allonger jusqu'à l'obtention d'une taille critique à partir de laquelle il y aurait clivage d'une liaison α -1,4 et libération d'une chaîne linéaire. Il est difficile à ce niveau de savoir si c'est la GBSSI elle-même qui est responsable de ce clivage ou s'il y a intervention d'une autre enzyme. La libération du glucane aurait ainsi lieu à l'intérieur des cavités du granule en formation, cette localisation protégeant en grande partie la molécule de l'action des enzymes de branchement ce qui explique le faible taux de ramification de l'amylose.

Cette théorie expliquant comment la GBSSI utilise les chaînes externes de l'amylopectine pour produire l'amylose vient d'être remise en cause par les expérimentations de Zeeman *et al.* effectuées en 2002 sur *Arabidopsis*. En effet, dans cet organisme, les auteurs n'ont pu mettre en évidence le moindre transfert de matériel entre les deux fractions polysaccharidiques composant l'amidon. Signalons toutefois que l'activité spécifique de la GBSSI d'*Arabidopsis* est tellement basse dans ces expériences qu'il était peu probable d'observer de tels transferts même s'ils étaient massifs. Les auteurs proposent par conséquent un autre modèle dans lequel ce sont des malto-oligosaccharides présents dans la cellule qui servent d'amorce à la synthèse d'amylose par la GBSSI. Ces deux modèles pouvant refléter la réalité, il reste à déterminer si les deux systèmes coexistent ou si un seul d'entre eux (et dans ce cas, lequel) régit la synthèse d'amylose à travers les différentes espèces végétales.

Concernant la GBSSI, il est également important de noter que les derniers travaux réalisés chez le pois font état de deux GBSSI distinctes nommées GBSS Ia et Ib (Edwards *et al.*, 2002). Ces deux protéines se distinguent de par leur séquence protéique, leur expression tissulaire et par la taille de leur produit de synthèse. La GBSS Ib semble exprimée exclusivement dans les feuilles de la plante tandis que l'isoforme Ia se retrouve principalement dans l'embryon où elle produit un amylose d'une taille plus réduite que celui produit dans les feuilles conférant ainsi à l'amidon des propriétés physicochimiques différentes. De telles observations ne sont toutefois pas originales dans la mesure où Vrinten et Nakamura, avaient déjà conclu à l'existence de deux GBSSI chez le blé.

(b) La GBSSII

D'un poids moléculaire plus élevé que celui de la GBSSI (76 à 95 kDa contre environ 60 pour la GBSSI), cette protéine intervient dans la biosynthèse de l'amidon de façon plus obscure. Bien que qualifiée d'amidon-synthétase liée au grain, elle est généralement retrouvée de façon non négligeable dans le stroma ce qui a parfois donné lieu à quelques confusions. Chez le pois par exemple, l'amidon synthétase lié au grain de type II et l'amidon synthétase soluble II que l'on croyait distinctes de part leur localisation différente ne représente en fait qu'une seule et même protéine (Edwards *et al.*, 1996). Les quantités de SSII présentes dans le grain varient considérablement d'une espèce à l'autre. Chez *Chlamydomonas reinhardtii* la GBSSII contribuerait à moins 0.5 % de l'activité GBSS totale du grain tandis chez l'embryon de pois la GBSSII se monte à près de 10% de l'activité mesurable. Ces observations nous laissent penser que la SSII se laisse piéger au cours de la croissance du grain de manière éminemment variable et que sa localisation granulaire ne semble contrairement à la GBSSI nullement nécessaire à son activité biologique.

(2) Amidon-synthétases solubles (SS).

Différentes isoformes d'amidon-synthétases solubles coexistent au sein de la plante. Leur nombre apparent varie suivant l'organisme. Ainsi l'albumen de maïs compte deux activités principales SS distinctes (Cao *et al.*, 2000) tandis que la pomme de terre en compte 3 (Abel *et al.*, 1996 ; Marshall *et al.*, 1996) et l'orge 4 (Kreis, 1980). Ajoutons toutefois que certaines activités peuvent devenir particulièrement mineure dans certains tissus et que tous les génomes examinés à ce jour semblent bel et bien contenir 4 classes d'amidon synthétase soluble. Ces 4 classes sont reprises dans la figure 4 et sont définies par leur homologies de séquences. Vu la conservation du nombre et type de synthases de *Chlamydomonas* aux céréales nous avons revu la nomenclature de ces enzymes et rebaptisé le nom de ces enzymes en fonction de la figure 4. Les fonctions relatives de certaines de ces différentes isoformes restent à élucider. Afin de mieux comprendre le rôle de chacune de ces enzymes, différents moyens ont été employés. Le premier d'entre eux consiste à caractériser leurs propriétés biochimiques. C'est ce que l'équipe de Jack Preiss a réalisé sur les isoformes de maïs (pour revue Preiss, 1991). Il a ainsi montré que même si le K_m pour l'ADP-glucose est le même pour les 2 isoformes, l'affinité de la SSI pour l'amylopectine est 10 fois inférieure à celle de

la SSIII. Une autre différence tient à la réaction des isoformes face au citrate. En présence de citrate 0,5M, la SSI semble capable d'initier la synthèse glucanique sans ajout supplémentaire d'amorce dans le mix de synthèse *in vitro*. L'explication avancée par Preiss relativise quelque peu ces résultats: en réalité le Km de la SSI pour une éventuelle amorce deviendrait si bas en présence de citrate que le peu d'amorce endogène présent même après purification de l'enzyme suffirait à l'initiation. Ces différentes expérimentations ne nous apportent en réalité que peu de renseignements sur l'activité des protéines *in vivo*.

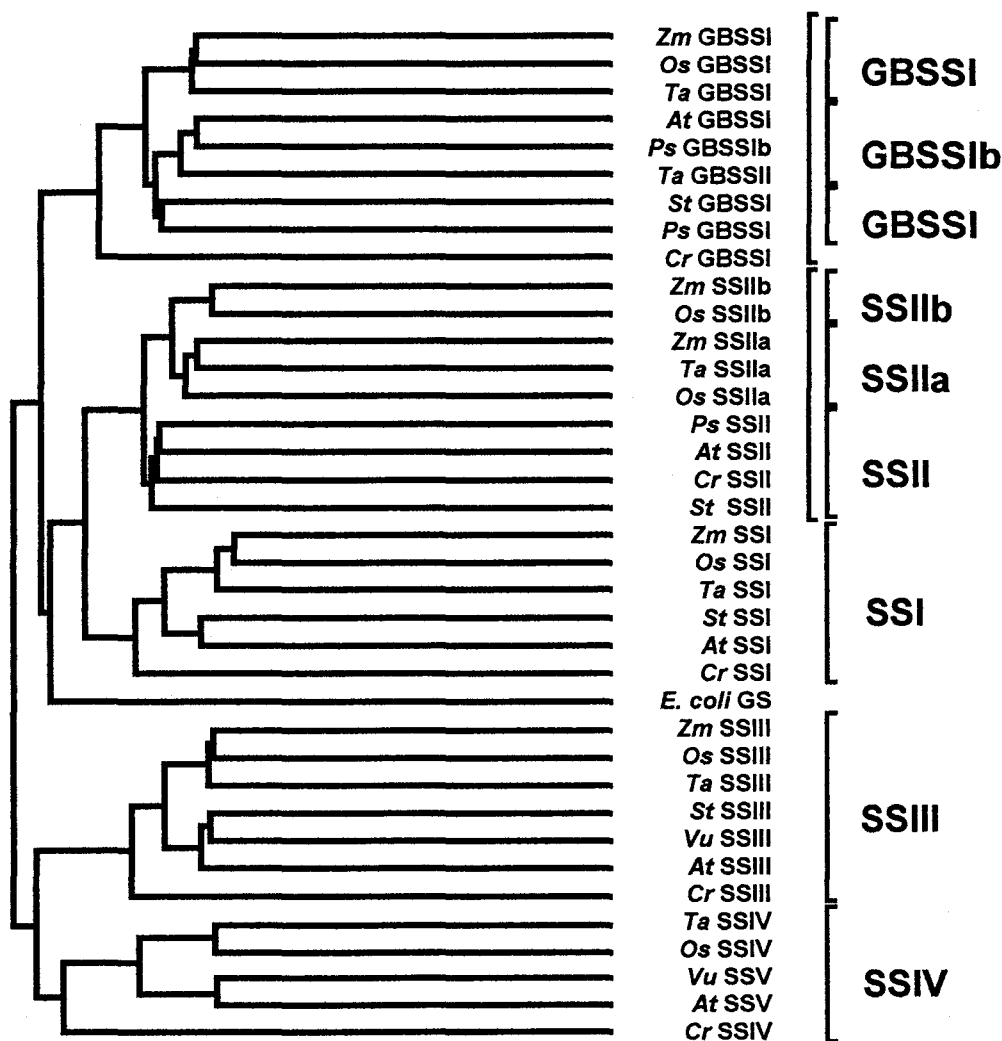


Figure 4: Arbre phylogénétique représentant les relations existantes entre les séquences protéiques des différentes amidon-synthétases. Les espèces incluses dans cette étude sont: le maïs (*Zea mays*, Zm); le blé (*Triticum aestivum*, Ta); le riz (*Oryza sativa*, Os); la pomme de terre (*Solanum tuberosum*, St); le niébé (*Vigna unguiculata*, Vu); Arabette de dames (*Arabidopsis thaliana*, At); Chlamydomonas (*Chlamydomonas reinhardtii*, Cr); et le pois (*Pisum sativum*, Ps). Les séquences protéiques utilisées sont les suivantes (le numéro d'accès genbank est indiqué lorsque aucune publication n'est référencée); Zm GBSSI (M24258), Os GBSSI (X62134), Ta GBSSI (X57233), At GBSSI (AC006424), Ps GBSSIb (AJ345045), Ta GBSSII (AF109395), St GBSSI (X58453), Ps GBSSI (X88789), Zm SSIIb (Harn *et al.*, 1998), Os SSIIb (AF395537), Zm SSIIa (Harn *et al.*, 1998), Os SSIIa (AF419099), Ta SSIIa (Li *et al.*, 1999b), Ps SSII (X88790), At SSII (AC008261), St SSII (X87988), Zm SSI (AF 036891), Os SSI (D16202), Ta SSI (Li *et al.*, 1999a), St SSI (Y10416), At SSI (AF121673), Cr SSI (AF433156), Zm SSIII (Gao *et al.*, 1998), Os SSIII (AY100469), Ta SSIII (Li *et al.*, 2000), St SSIII (X94400), Vu SSIII (AJ225088), At SSIII (AC007296), Ta SSIV (AY044844), Os SSIV (AY100471), Vu SSV (AJ006752) et At SSV (AL021713). Les séquences complémentaires de Chlamydomonas proviennent de communications personnelles du Dr Christophe D'Hulst.

Le meilleur moyen d'obtenir des informations sur le rôle d'une protéine est encore d'obtenir un organisme mutant pour la synthèse de cette protéine et d'étudier le phénotype que peut causer son absence. En 1980, Preiss et Boyer caractérisent le mutant *dull1* du maïs. On y observe une chute importante de l'activité d'une forme de SS (baisse de 60%). Cependant cette baisse semble associée à une chute de l'activité de branchement laissant supposer qu'il puisse s'agir d'un gène de régulation plutôt que d'un gène de structure. Une autre caractéristique du mutant *dull1* observée par Yeh *et al.* en 1981, consiste en une augmentation de la fraction amylosique comparativement à l'amylopectine.

En 1993 Fontaine *et al.* et Maddelein *et al.* rapportent l'existence d'un mutant déficient en amidon synthétase soluble chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les auteurs constatent une baisse de la quantité d'amidon accumulé comparativement au sauvage (diminution de 60 à 80%), ainsi qu'une augmentation de la proportion d'amylose contenue dans le grain. Enfin, l'analyse de la distribution en longueur de chaîne de la molécule d'amylopectine montre une baisse significative des glucanes dont le DP est compris entre 8 et 50 associée à l'augmentation du nombre de ceux de très faible taille ($2 < DP < 7$). Ces résultats suggèrent l'implication de la forme manquante de SS dans l'élaboration ou le maintien des chaînes de longueur intermédiaire de l'amylopectine. En 2000 des expériences encore non publiées ont précisé que l'enzyme manquante était du type SSIII.

En 1998 Gao *et al.* établissent que le gène *dull* code la SSIII et que celle ci semble conditionner la synthèse d'une partie des chaînes de longueur intermédiaire de l'amylopectine (entre 10 et 40 résidus de long). La fonction de la SSIII semble donc conservée de *Chlamydomonas* au maïs.

Le premier mutant obtenu pour une activité de type SSII le fut chez le pois. Les mutants *rug5* exhibent un phénotype apparenté aux mutants *dull* du maïs et *sta3* de *Chlamydomonas*. Il faut signaler toutefois que la répartition de longueurs des chaînes de l'amylopectine des mutants *rug5* se distinguent de celles des mutants *dull* et *sta3*. Des mutants de la SSII (GBSSII) ont été décrit depuis chez l'orge, le blé, le riz et le maïs (Umemoto *et al.*, 2002; Yamamori *et al.*, 2000). Encore une fois, les mutants déficients pour le même type de synthase font preuve de phénotypes similaires laissant présager l'existence de fonctions spécifiques conservées chez toutes les plantes.

Des analyses fonctionnelles du même type ont été entreprises sur des tubercules de pomme de terre contenant des constructions antisens dirigées contre la SSIII et la SSII-GBSSII avec des conclusions similaires. L'expressivité des phénotypes chez ces mutants était toutefois réduite relativement aux mutants décrits ci-dessus, peut-être à cause de la présence

de suffisamment d'activité résiduelle normale dans ces plantes transgéniques (Abel *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1999).

c) Ramification

L'introduction des points de ramification dans le polysaccharide en formation est assuré par les enzymes de branchement (EC 2.4.1.18). Ces protéines vont dans un premier temps hydrolyser une liaison α -1,4 d'un glucane puis réincorporer le produit par introduction d'une liaison α -1,6.

Ici encore, plusieurs isoformes d'enzymes de branchement (BE pour branching enzymes) coexistent au sein de la plante (2 à 3 isoformes selon la plante considérée). Ces isoformes peuvent être regroupées en 2 familles principales (pour revue : Martin and Smith, 1995). Les enzymes appartenant à la famille A (BEIIa et IIb du maïs, BEI du pois, BEIII du riz) se distinguent de ceux de la famille B (BE de pomme de terre, BEI du maïs, BEI du riz et BEII du pois) notamment par leur propriétés catalytiques. Les isoformes de la famille A montrent (du moins *in vitro*) une affinité accrue pour l'amylopectine et transfèrent préférentiellement de courtes chaînes alors que celles de la famille B sont plus actives sur des chaînes de type amylose et transfèrent de plus long glucanes (Takeda *et al.*, 1993 ; Guan et Preiss, 1993). Enfin, il est important de noter que pour être actives, les enzymes de la première famille ont besoin de glucanes d'une taille minimale de 12 résidus, alors que les isoformes de la deuxième famille ont besoins d'un DP minimum de 16 (Guan *et al.*, 1997). L'importance des isoformes appartenant à la famille A a été mise en lumière par l'étude des mutants *rugosus* du pois et *amylose extender* du maïs (pour revue : Shannon et Garwood, 1984). Ces mutants présentent une baisse significative de la quantité d'amidon mais contiennent un matériel fortement enrichi en amylose (autrement dit en chaînes peu ramifiées). D'un autre côté, nous pouvons noter qu'aucun organisme mutant pour une BE de la famille B n'a pu être isolé d'après son phénotype. Des expérimentations conduisant à l'inactivation de cette activité chez la pomme de terre, grâce à des constructions antisens (Kossmann *et al.*, 1991, Müller-Röber et Kossmann, 1994), conduisent à la production d'une quantité normale d'amidon ayant un ratio amylose/amylopectine de type sauvage. L'absence de phénotype pourrait, dans ce cas, découler de la technique d'inactivation génique employée. Très récemment Blauth *et al.* (2002), ont décrit des mutants de maïs dont le gène de la BEI a été interrompu par un élément mutateur. Ces mutants n'affichaient aucun phénotype

quantitatif ou qualitatif sur la synthèse de l'amidon posant de manière urgente la question de la fonction de la BEI dans le métabolisme de l'amidon.

5. Avancées dans la compréhension de la biosynthèse de l'amidon.

Jusqu'au début des années 80, le modèle de biosynthèse de l'amidon présenté en Figure 2 était généralement admis. Il l'est toujours à l'heure actuelle, bien qu'il semble très (voire trop) simplificateur au regard des résultats engrangés ces dix dernières années. En effet, la découverte de nouveaux mutants a conduit à l'élaboration d'un nouveau modèle beaucoup plus complexe et qui rend mieux compte de la réalité structurale du grain d'amidon.

Les enzymes de débranchement (EC 3.2.1.10), capables d'hydrolyser les liaisons α -1,6, ont longtemps été pressenties comme ayant un rôle strictement cantonné à la dégradation de la molécule de réserve. Deux types d'enzymes de débranchement coexistent au sein de la cellule végétale : les isoamylases (EC 3.2.1.68) et les pullulanases (EC 3.2.1.41), (Lee *et al.*, 1971 ; Doehlert et Knutson, 1991). Ces 2 enzymes ont des spécificités bien distinctes notamment vis à vis du substrat (Manners, 1997). Par exemple: contrairement à l'isoamylase, la pullulanase est capable de débrancher le pullulane (polymères de résidus maltotriosyles branchés en α -1,6).

La description du mutant *sugary* du maïs intrigua les chercheurs pendant plusieurs décennies. Il se caractérise par une forte diminution de la quantité d'amidon accompagnée par la présence d'un polysaccharide soluble apparenté de part sa structure au glycogène et ainsi dénommé phytoglycogène. Dans un premier temps, Pan et Nelson (en 1984) associent la mutation à une baisse de l'activité pullulanase avant que James *et al.* clonent en 1995 le gène correspondant et démontrent qu'il code une isoamylase. Cette conclusion fût ensuite corroborée par les analyses enzymologiques réalisées par Rahman *et al.* en 1998.

Le même type de mutant a pu être isolé chez le riz (mutant *sugary* de riz) ainsi que chez *Chlamydomonas reinhardtii* (mutant *sta 7*). Dans tous les cas, la mutation conduit à une forte diminution de la quantité d'amidon (voire une disparition totale dans le cas de *Chlamydomonas reinhardtii*) et à l'apparition concomitante de phytoglycogène (Fujita *et al.*, 1999 ; Mouille *et al.*, 1996 ; Dauvillée *et al.*, 2000)

L'étude de ces mutants dépourvus d'activité isoamylasique conduisant à la disparition de l'amidon oblige à imaginer un modèle de biosynthèse dans lequel l'enzyme de débranchement joue un rôle déterminant. Dans cet esprit l'isoamylase serait une enzyme d'épissage de la structure qui hydrolyserait les points de ramification mal placés qui empêcheraient le polymère de s'aggréger et de s'incorporer dans le grain sous forme semi-cristalline. En absence de cette enzyme le polysaccharide demeurerait hydrosoluble et accessible aux enzymes du métabolisme qui continueraient à agir jusqu'à formation de particules de glycogène. En ce sens le système végétal sur base d'une seule déficience enzymatique retournerait à son stade évolutif précédent : celui de la synthèse du glycogène chez les cyanobactéries.

6. L'enzyme disproportionnante

a) Qu'est-ce qu'une enzyme disproportionnante ?

L'enzyme disproportionnante, encore appelée enzyme D (EC : 2.4.1.25), fut découverte par Peat *et al.* en 1953 dans un broyat de pomme de terre. Cette enzyme catalyse une réaction de type α -1,4 glucanotransférase. Elle permet le transfert d'une partie d'un oligosaccharide linéaire donneur (par clivage d'une liaison α -1,4) sur un oligosaccharide accepteur (par création d'une nouvelle liaison α -1,4). Ainsi l'incubation d'une population homogène de maltooligosaccharides avec l'enzyme D conduit à l'obtention de glucanes de tailles variables. C'est cette propriété qui a donné son nom d'enzyme disproportionnante à la protéine.

Cependant, le transfert de résidus répond à certaines exigences. En effet, Peat *et al.* (1953) observent que le maltose ne peut être utilisé comme substrat et qu'il ne peut en aucun cas être le produit d'une réaction de transfert. Le glucose quant à lui, bien que ne pouvant pas servir de substrat, peut servir d'accepteur. Trois ans plus tard, Peat *et al.* (1956) établissent ce qu'ils appellent « la règle des liaisons interdites ». Cette règle stipule que certaines liaisons α -1,4 ne peuvent être clivées par l'enzyme D. Il s'agit de la première liaison de l'extrémité non réductrice ainsi que de l'avant-dernière liaison du côté réducteur. Cette règle fût confirmée en 1969 par Jones et Whelan qui utilisèrent pour cela des composés radiomarqués au ^{14}C permettant le suivi des résidus lors des transferts.

b) Dosage de l'enzyme

Les interdits de clivage ont permis à Colléoni *et al.* (1999a) de développer une méthode de dosage spécifique de l'enzyme D en incubant un extrait brut de *Chlamydomonas reinhardtii* dans un tampon contenant du maltotriose. Chez l'algue, seule l'enzyme D est capable d'utiliser le maltotriose comme substrat. Du fait de la règle des liaisons interdites, seule la dernière liaison du côté réducteur peut être clivée. Il y a alors transfert de maltose sur un maltotriose accepteur et relargage de glucose. Le maltotriose présent en quantité très importante jouera, tout le temps du dosage, le rôle de donneur et d'accepteur. La réaction étant stoppée relativement vite, les produits de la réaction (glucose et oligosaccharides) n'atteindront pas une concentration suffisante pour devenir donneurs ou accepteurs. Ainsi chaque réaction consiste en l'utilisation de deux maltotrioses pour donner un maltopentose et un glucose. Ce glucose peut alors être quantifié par une méthode spectrophotométrique classique (Colleoni *et al.*, 1999a).

c) Appartenance de l'enzyme D à une super famille

L'idée de l'existence d'une super famille des α -amylases fut proposée en 1999 par Kuriki et Imanaka. Les enzymes y appartenant doivent répondre à certains critères notamment de séquence protéique. Elles doivent entre autre posséder 4 régions conservées caractéristiques de la super famille ainsi que 3 acides aminés jugés indispensables à la réaction catalytique.

La réaction catalytique elle-même doit agir sur une liaison α -O-glucosidique et conduire à la production d'oligosaccharides (ou former des liaison α -glucosidique par transglycosylation).

L'obtention de la séquence de l'enzyme D de pomme de terre ainsi que les résultats biochimiques accumulés depuis les travaux de Peat *et al.* en 1953 ont permis de classer cette protéine parmi la super famille des α -amylase.

d) Rôle de l'enzyme D au sein de la cellule végétale.

Le rôle exact de l'enzyme D au sein du plaste a longtemps été discuté et le reste encore fortement aujourd'hui. En 1953 lors de sa découverte, Peat et coll avancent 2

hypothèses quant au rôle de la protéine. Elle serait responsable soit de la production d'un substrat utilisable par la phosphorylase soit de la synthèse d'amylose.

Cette deuxième hypothèse est rapidement tombée dans l'oubli au profit de la première. En effet, le schéma qui s'est rapidement imposé est celui de l'enzyme D disproportionnant de petits maltooligosaccharides en glucanes de longueurs plus importantes afin de faciliter leur dégradation par les phosphorylases. En effet ces enzymes ne peuvent dégrader des maltooligosaccharides linéaires (non branchés) de moins de 5 résidus glucose. L' α -1,4 glucanotransferase est dès lors cataloguée comme enzyme de dégradation de l'amidon. Les travaux menés par Kakefuda et Duke en 1989 ont conduit à la purification de l'enzyme D du pois. Suite aux différentes études biochimiques réalisées, les auteurs proposent également un rôle dans la dégradation. En 1993 Takaha *et al.* relancent le débat en montrant que l'ARNm de l'enzyme disproportionnante de pomme de terre s'accumule préférentiellement lors des phases de synthèse d'amidon. Or ils n'ont pu mettre en évidence aucune molécule pouvant jouer un rôle dans une éventuelle régulation post-transcriptionnelle. Les auteurs envisagent donc pour cette enzyme une implication dans la biosynthèse de l'amidon. Afin de vérifier cette hypothèse, ils ont produit plusieurs plants contenant des constructions sens ou antisens de l'ADNc de l'enzyme D. Parmi les plants ayant la dépression d'activité la plus sévère (quelques pourcents seulement de l'activité sauvage), aucun effet quant à la quantité ou la qualité de l'amidon accumulé n'a pu être observé. Néanmoins une corrélation évidente entre la baisse d'activité de l'enzyme D et un retard de croissance des plantes concernées a pu être constatée. Il reste cependant hasardeux d'avancer une hypothèse quant au rôle de cette protéine dans le développement des plantes.

Un mutant pour l'activité disproportionnante a été isolé chez *Chlamydomonas reinhardtii* après un cycle de mutagenèse aux UV. Il s'agit cette fois d'un mutant dans lequel aucune activité résiduelle n'a pu être dosée *in vitro* ou observée sur gel d'activité. Le phénotype de cette souche est très sévère puisqu'elle n'accumule plus que 8% de la quantité d'amidon d'une souche sauvage (Colleoni *et al.*, 1999a). La seule explication envisageable est que cette enzyme intervient dans la biosynthèse d'amidon. En effet, si elle se cantonnait à un rôle de dégradation, le phénotype attendu de la souche mutante serait une suraccumulation d'amidon mais en aucun cas une baisse aussi drastique de la quantité de polysaccharide. Les auteurs proposent que l'enzyme soit aussi impliquée dans la biosynthèse de la molécule de réserve.

Les expériences réalisées par Critchley *et al.* en 2001 contredisent cependant les conclusions précédentes. En effet des plants d'*Arabidopsis thaliana* mutants pour l'enzyme

disproportionnante plastidiale obtenus après mutagenèse insertionnelle présentent un phénotype de suraccumulation modéré mais significatif de l'amidon. Ces résultats conduisent naturellement ces auteurs à réfuter l'hypothèse de Colléoni *et al.* (1999b) et à limiter l'action de l'enzyme D au strict processus de dégradation. Les principales différences entre les 2 expérimentations pouvant expliquer ces résultats contradictoires viennent de l'utilisation d'organismes et de conditions d'observation différents. En effet chez *Arabidopsis* l'accumulation d'amidon a été mesurée dans les feuilles (où se trouve l'amidon qualifié de transitoire) alors que chez *Chlamydomonas* l'amidon a été extrait de cellules soumises à un stress azoté (dans ce cas, les cellules miment ce qu'il se passe dans les organes de réserves des plantes supérieures).

Nous avons vu comment l'enzyme D pouvait éventuellement intervenir dans la dégradation en fournissant à partir de petits maltooligosaccharides un substrat utilisable par les phosphorylases. Nous allons maintenant voir comment Colleoni *et al.* (1999b) envisagent le rôle que pourrait jouer cette même enzyme dans la synthèse de l'amidon.

Les auteurs ont montré le potentiel de l'enzyme disproportionnante à pouvoir greffer des maltooligosaccharides sur de l'amylopectine (Colléoni *et al.*, 1999b). Si, comme nous l'avons déjà supposé, l'isoamylase libère des maltooligosaccharides par hydrolyse de liaisons α -1,6 lors de la formation de l'amylopectine (cf. p14-15), il devient possible d'imaginer que ceux-ci servent de substrat à l'enzyme D. Ils seront alors réincorporés sur les chaînes externes de l'amylopectine en formation. Cette hypothèse permet de comprendre pourquoi l'absence de cette enzyme conduit à l'effondrement de la quantité d'amidon produit. En effet sans réutilisation des oligosaccharides produits lors de l'étape d'épissage, le métabolisme du polysaccharide de réserve rentre dans un cycle futile : allongement de glucanes, ramification, débranchement, hydrolyse des oligosaccharides. Dans un milieu de culture où l'apport énergétique est limité (milieu carencé en azote ne permettant pas la photosynthèse), la perte engendrée par ce cycle futile peut expliquer la baisse drastique de la quantité d'amidon accumulé.

Afin de valider les conclusions abordées suite à l'observation de la souche mutante au locus *STA11*, il reste à démontrer que ce dernier représente bien le gène de structure de l'enzyme disproportionnante de *Chlamydomonas reinhardtii* et bien sûr qu'il s'agit bien de la même forme d'enzyme D que celle qui a été étudiée chez *Arabidopsis*.

7. Proposition d'un nouveau modèle de biosynthèse de l'amidon

Le schéma de biosynthèse d'amidon présenté en figure 5 se base sur le modèle d'épissage par les isoamylases présenté par Ball *et al.* en 1996. Il améliore ainsi celui introduit sur la figure 3 (page 5) en y incluant les étapes d'épissage et de recyclage des malto-oligosaccharides. De fait, la perte énergétique consécutive à la maturation de l'amylopectine en formation par les enzymes de débranchement se voit en grande partie atténuée par la réincorporation directe des malto-oligosaccharides sur cette "pré-amylopectine" au détriment d'un seul résidu de glucose.

On peut alors détailler le cycle de biosynthèse de la manière suivante (Figure 5):

L'ADP-glucose (nucléotide-sucre précurseur de la synthèse d'amidon) est utilisé par les amidon-synthétases (solubles ou liées au grain) afin d'allonger les chaînes glucaniques en formation (I).

Les enzymes de branchement introduisent les liaisons α -1-6 de façon aléatoire sur la structure existante (II).

Les enzymes de débranchements permettent l'épissage de la molécule prévenant ainsi la formation de phytoglycogène. Cette étape génère d'un côté un polysaccharide mature très organisé qui va éventuellement pouvoir cristalliser, de l'autre des malto-oligosaccharides linéaires solubles (III).

L'enzyme disproportionnante utilise ces malto-oligosaccharides comme substrat afin de les réincorporer sur l'amylopectine en formation. Cette étape limite une perte énergétique qui peut s'avérer fatale pour une production normale d'amidon en condition d'apport énergétique extérieure faible voire nul (comme lors de la carence azoté chez *C. reinhardtii*). La seule perte enregistrée provient alors de la production de résidus de glucose facilement métabolisable par la cellule (IV).

Le glucose produit sera recyclé par l'hexokinase, la phosphoglucomutase et l'ADP-glucose pyrophosphorylase pour donner un nouveau substrat utilisable par les amidon-synthétases.

Le polysaccharide mature (noté: polysaccharide soluble³ sur le schéma) produit lors de l'étape d'épissage va pouvoir cristalliser ou entrer dans un nouveau cycle de synthèse jusqu'à sa cristallisation.



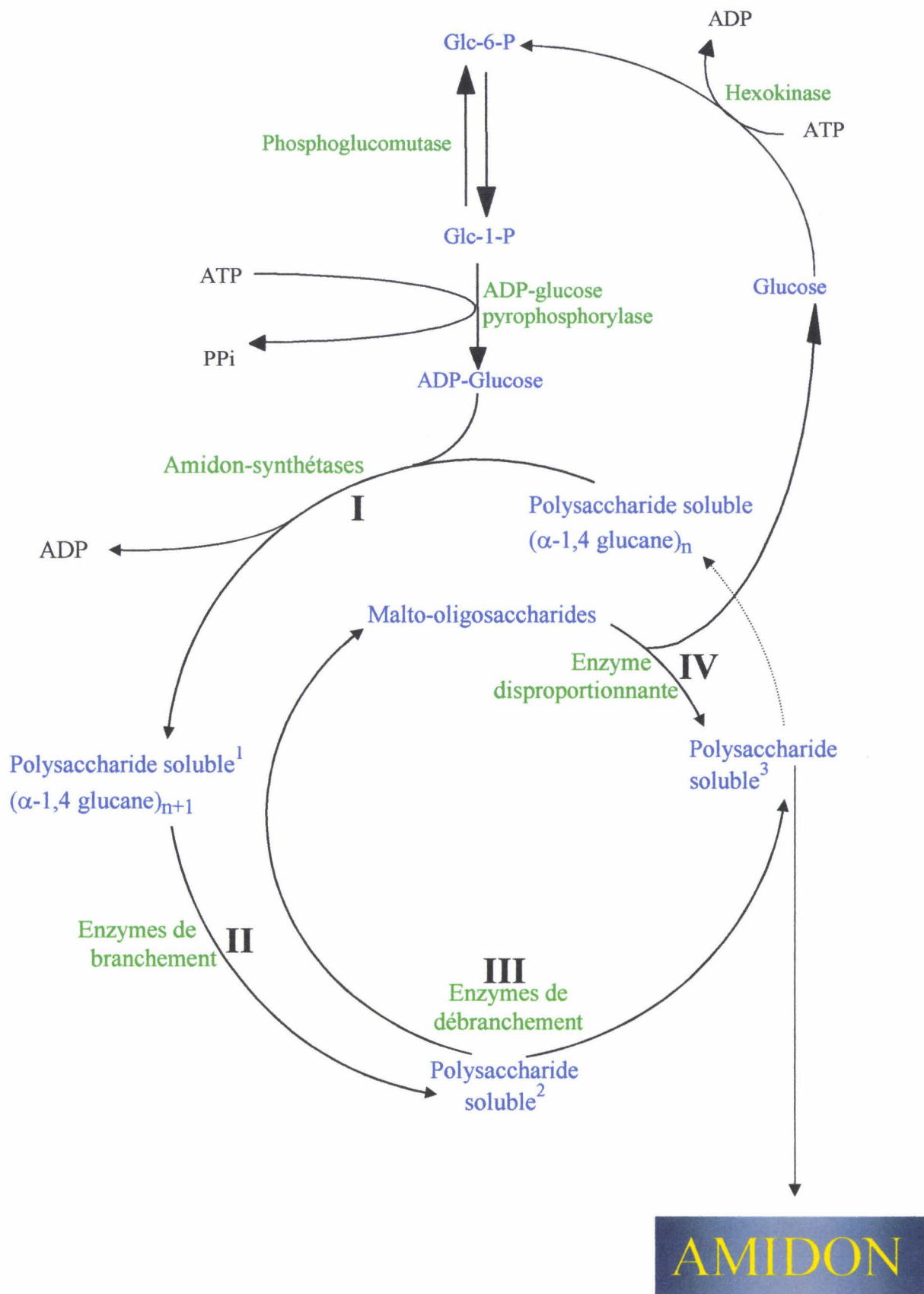


Figure 5 : Cycle de biosynthèse de l'amidon (voir commentaires détaillés dans le texte).

Les annotations 1, 2 et 3 représentent différentes étapes de maturation des polysaccharides solubles.

8. Dégradation de l'amidon

Les enzymes intervenant dans la dégradation de l'amidon sont nombreuses. Il est possible de les regrouper en 2 grandes familles : Les enzymes phosphorolytiques et les enzymes hydrolytiques (pour revue Steup, 1990).

Parmi les enzymes phosphorolytiques on retrouve les α -glucanes phosphorylases (EC 2.4.1.1) dont plusieurs isoformes ont été caractérisées chez les végétaux supérieurs. Chez la pomme de terre par exemple, 2 types d'enzymes ont été caractérisés : les enzymes de type I, plastidiales, possèdent une affinité accrue sur les glucanes ramifiés, alors que celles appartenant au type II (composé de 2 isoformes distinctes) sont principalement actives sur les dextrines linéaires (Steup, 1990).

La famille des enzymes hydrolytiques est beaucoup plus vaste. Les différentes enzymes y appartenant sont regroupées dans le tableau 2.

Enzymes	EC	activité
α -amylase	3.2.1.1	Hydrolyse les liaisons α -1,4 à l'intérieur de glucanes
β -amylase	3.2.1.2	Hydrolyse des liaisons α -1,4 depuis l'extrémité non réductrice de glucanes (libération de maltose)
γ -amylase	3.2.1.3	Hydrolyse les liaisons α -1,4 depuis l'extrémités non réductrices de glucanes accompagné du relargage de β -D glucose
enzyme de débranchement	3.2.1.10	Hydrolyse les liaisons α -1,6
α -glucosidase	3.2.1.20	Hydrolyse les liaisons α -1,4 depuis l'extrémité non réductrice de glucanes accompagné du relargage de D-glucose
D-enzyme	2.4.1.25	Permet le transfert de glucanes (par clivage d'une liaison α -1,4) vers une autre chaîne glucanique (par création d'une liaison α -1,4)

Tableau 2 : liste des différentes enzymes hydrolytiques susceptibles d'intervenir dans la dégradation de l'amidon, ainsi que leur mode d'action.

L'implication de la β -amylase dans le processus de dégradation vient d'être mise en évidence (Scheidig *et al.*, 2002). En effet, des plants de pommes de terre pour lesquels l'utilisation de la technique "ARN antisens" a permis de réduire l'activité β -amylase voient leur quantité d'amidon contenue dans les feuilles augmentée. Cette accumulation excessive est en réalité causée par un défaut de dégradation lors des phases obscures. Ces résultats démontrent le rôle prépondérant de l'enzyme dans le catabolisme de la molécule de réserve.

9. L'amidon et le rythme circadien

a) Définition

Un rythme circadien est un phénomène biologique ayant une période d'environ 24 heures permettant aux organismes de vivre en harmonie avec l'alternance naturelle du jour et de la nuit. Cette horloge interne, qui a besoin d'être synchronisée avec le monde extérieur (c'est l'étape d'entraînement) devient ensuite indépendante et permet à l'organisme d'anticiper les variations à venir telles que l'arrivée de la nuit ou une baisse de température. Néanmoins, en l'absence de facteurs externes, la période du cycle peut varier quelque peu. Il n'est pas rare de voir ainsi les cycles varier d'une heure ou deux par période.

Une régulation circadienne passe, une fois par cycle, par un maximum (Acrophase) et un minimum (Nadir). Les cycles vont persister même en l'absence de facteur externe pour les stimuler (Figure 6).

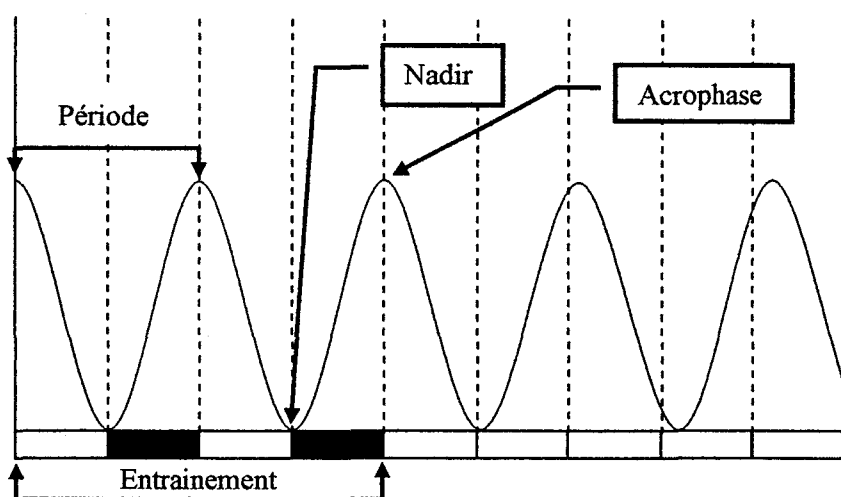


Figure 6 : Représentation schématique d'une régulation circadienne.

La durée d'entraînement représente le temps pendant lequel le rythme : "alternance jour / nuit" (barre blanche / barre noire) est appliquée à l'organisme considéré. On observe qu'en dehors de la période d'entraînement, la régulation cyclique persiste, même si elle n'est plus exactement de 24 heures. L'acrophase représente le point maximal par lequel passe l'activité, le Nadir, son point d'activité minimale.

b) La production d'amidon suit-elle une régulation circadienne ?

La quantité d'amidon présente dans les chloroplastes de plantes varie en fonction de l'heure de la journée. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, elle est maximale en fin de journée et minimale en fin de phase obscure (Zeeman *et al.*, 1998a). Cependant, comme nous l'avons

vu, ceci ne suffit pas pour affirmer que la production d'amidon est régulée de manière circadienne, encore faut-il démontrer que cette variation persiste en l'absence d'alternance jour/nuit. Des études préliminaires menées par Bin *et al.* en 1992 montrent que des feuilles de betteraves, placées en lumière continue suite à une période d'entraînement en cycle jour/nuit, arrêtent de produire de l'amidon pendant ce qui aurait dû être la phase obscure. Ces résultats peuvent faire penser à une régulation circadienne néanmoins, comme les auteurs arrêtent leur étude après un simple cycle de 24 heures, on ne peut observer la reprise de synthèse d'amidon dans le cycle suivant. Ainsi il est difficile de dire si l'arrêt de la production du polysaccharide répond à un rythme circadien ou s'il s'agit d'un simple problème intrinsèque à la plante (défaut de substrats...).

D'autres études portant sur les enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon ont également été réalisées. En 1999, Mérida *et al* montrèrent que dans les feuilles d'*Antirrhinum majus* (ou mufler) l'expression de l'ARNm de la GBSSI est régulée de manière circadienne. Cette constatation permet aux auteurs de supposer que la transition entre le jour et la nuit puisse être accompagnée par l'arrêt de l'expression des différents gènes impliqués dans la biosynthèse de l'amidon. Ceci ne peut être vrai que pour les organes aériens pouvant être entraînés par l'alternance jour/nuit. De fait, Mérida *et al* ne constatent aucune régulation de l'expression de la GBSSI dans les racines de la plante.

C'est en 2001 que Zabawinski *et al.* apportent un nouvel élément en faveur d'un contrôle circadien de la production d'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les auteurs montrent que l'expression de l'ARNm de la petite sous unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chute d'environ 90% lors du passage des cellules à l'obscurité (les cellules étant cultivées en condition de 12 heures d'illumination pour 12 heures d'obscurité). L'activité enzymatique baisse dans le même temps d'environ 60%. Afin de savoir si cette régulation était de type circadienne, les auteurs ont laissé les cellules dans des conditions d'obscurité continue et ont observé l'augmentation de la production d'ARNm en même temps que l'augmentation de l'activité enzymatique durant ce qui aurait dû correspondre à la phase lumineuse.

Il est à noter que plusieurs gènes de plantes possèdent une régulation de leur transcription similaire à ce qui vient d'être montré pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase de *Chlamydomonas* sans que l'activité enzymatique elle-même n'y soit soumise. Le produit métabolique final ne va dans ce cas pas fluctuer de façon circadienne. Sachant que l'ADP-glucose pyrophosphorylase représente l'enzyme impliquée dans l'étape limitante de la biosynthèse de l'amidon et que son activité pourrait varier de manière circadienne, il devient

tout à fait raisonnable d'imaginer que la production d'amidon puisse suivre le même type de régulation.

B. Chlamydomonas reinhardtii : un modèle pour l'étude de la biosynthèse de l'amidon.

1. Présentation et cycle de vie.

Algue verte unicellulaire biflagellée appartenant à l'ordre des Volvocales, *Chlamydomonas reinhardtii* vit à l'état naturel en eau douce. De forme ovoïde, sa taille atteint 10 à 15 μm de long (Figure 7). Outre le noyau et les différents composants cytoplasmique, la cellule contient un chloroplaste unique volumineux dans lequel se trouve le pyrénôïde impliqué dans la concentration du CO_2 . C'est dans ce chloroplaste que se dérouleront les différentes étapes aboutissant à la production d'amidon.

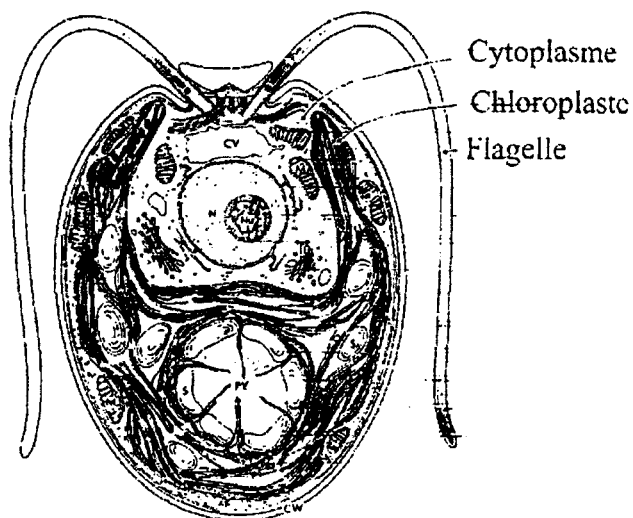


Figure 7 : représentation schématique de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*

Le mode de développement préférentiel de l'algue est la division asexuée, le temps de génération est relativement court puisqu'en conditions de croissance optimales il est d'environ 8 heures. Notons toutefois que toutes les divisions (1, 2 ou 3 divisions successives) ont lieu à la fin de la phase obscure lors d'un cycle jour-nuit.

Il existe cependant 2 polarités sexuelles distinctes ($mt+$ et $mt-$) permettant aux cellules d'entrer dans un cycle de reproduction sexuée (Figure 8). Lors de ce cycle deux cellules de

polarité sexuelle opposée vont fusionner et donner naissance à un zygote végétatif diploïde. Ce dernier va, dans moins de 5% des cas, conduire à la formation d'un diploïde stable se divisant de manière asexuée. Ces diploïdes, de polarité *mt-*, peuvent fusionner avec des cellules haploïdes *mt+* engendrant des triploïdes. Néanmoins, dans la grande majorité des cas le zygote se différencie en zygospore qui, après germination, donne 4 cellules filles haploïdes regroupées en tétrade. Ce mode de reproduction prend place lorsque les conditions extérieures deviennent défavorables. En effet, la zygospore représente alors une forme de résistance qui supportera mieux les conditions extérieures difficiles. En laboratoire, ces conditions difficiles de gamétogénèse sont mimées par l'utilisation d'un milieu carencé en azote sous une forte luminosité.

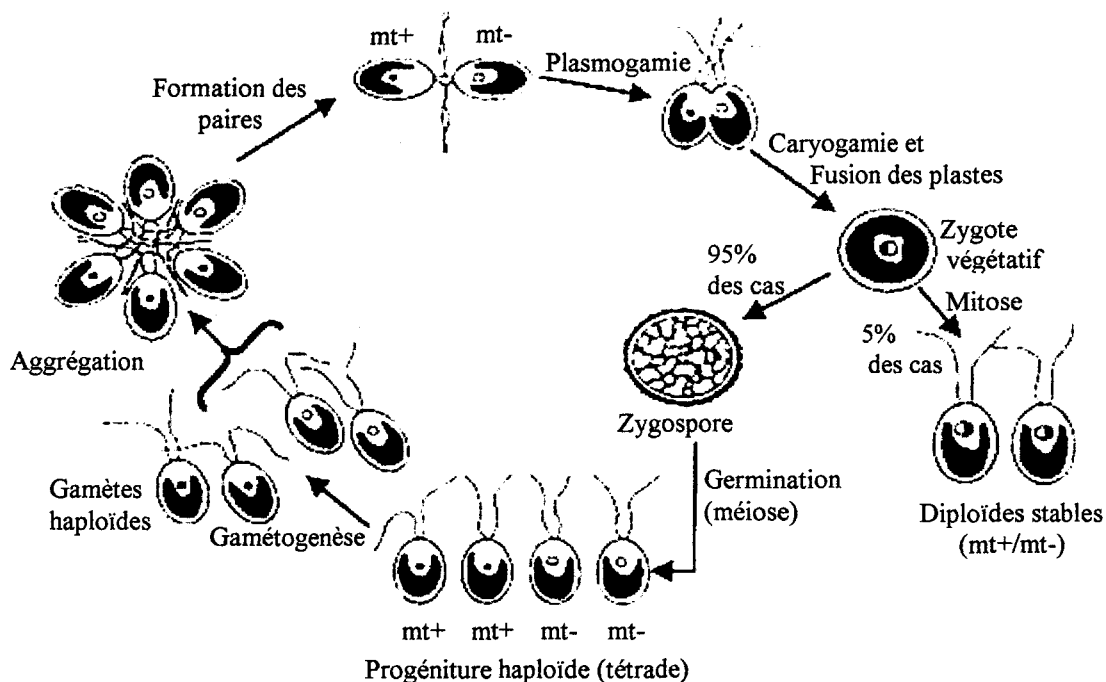


Fig 8 : cycle de reproduction sexuée de *Chlamydomonas reinhardtii*

2. Outils moléculaires et génétiques.

Les nombreux outils de biologie moléculaire applicables à *C. reinhardtii* font que cet organisme est parfois surnommé "la levure verte". Nous pouvons citer par exemple la possibilité de pouvoir transformer sélectivement le génome nucléaire ou chloroplastique. La première technique de transformation, développée par Boyton *et al.* en 1988, visait le génome

chloroplastique. Les auteurs utilisent pour cela des particules de tungstène, sur lesquelles se trouve la séquence d'intérêt, afin de bombarder les cellules cibles.

Concernant la transformation nucléaire, les premiers résultats rapportés par Kindle *et al.* en 1989, obtenus par bombardement de particules d'or, font état d'une intégration stable de l'exogène dans le génome nucléaire de l'algue. Une technique beaucoup moins coûteuse et plus simple fut rapidement développée. Il suffit désormais d'agiter fortement les cellules, qui doivent être dépourvues de parois, en présence de billes de verre et de la séquence d'intérêt (Kindle *et al.*, 1990). Une ou plusieurs copies s'intègrent de manière aléatoire dans le génome nucléaire. Ces événements de recombinaison non homologue furent dans un premier temps jugés comme un problème à l'utilisation de la technique avant de s'avérer particulièrement intéressant pour la production de souches mutantes. Les gènes interrompus par l'insertion aléatoire de l'ADN exogène pouvaient alors être étiquetés par des séquences parfaitement connues facilitant ainsi leur clonage ultérieur. Tam et Lefebvre en 1993 rapportent pour la première fois l'utilisation de cette technique pour le clonage d'un gène de *C. reinhardtii* impliqué dans la construction des flagelles.

Un autre avantage de l'algue concerne son haploïdie prédominante. En effet, après transformation il devient possible de cribler directement les colonies pour un phénotype donné. De plus, la réalisation des croisements et l'obtention de tétrades permet une analyse poussée de la ségrégation des caractères génétiques. Enfin, sachant qu'une souche diploïde garde une polarité sexuelle *mt-*, il reste possible de la croiser avec une cellule haploïde de polarité *mt+*. La germination de ce triploïde permettra l'analyse d'une descendance qui sera aneuploïde.

3. *Chlamydomonas reinhardtii* et l'amidon.

a) Pourquoi *Chlamydomonas* ?

L'algue verte unicellulaire qu'est *Chlamydomonas reinhardtii* regroupe un nombre important d'avantages faisant de cet organisme un modèle pour la compréhension des mécanismes de biosynthèse de l'amidon.

En croissance exponentielle et en présence de lumière, l'algue mime parfaitement les tissus photosynthétiques des plantes supérieures pour ce qui est de l'amidon accumulé (Figure

9a). En milieu carencé en azote, l'organisme arrête de se diviser, dégrade ses pigments chlorophylliens et utilise l'acétate du milieu et ses propres composants cellulaires comme source de carbone afin d'accumuler de grandes quantités d'amidon (jusque 30 fois celle produite en phase exponentielle de croissance, Figure 9b). Dans ces conditions de culture, l'amidon synthétisé s'avère structuralement identique à celui de l'albumen de maïs (Ball *et al.*, 1990 ; Fontaine *et al.*, 1993 ; Maddelein *et al.*, 1994 ; Libessart *et al.*, 1995 ; Buléon *et al.*, 1997).

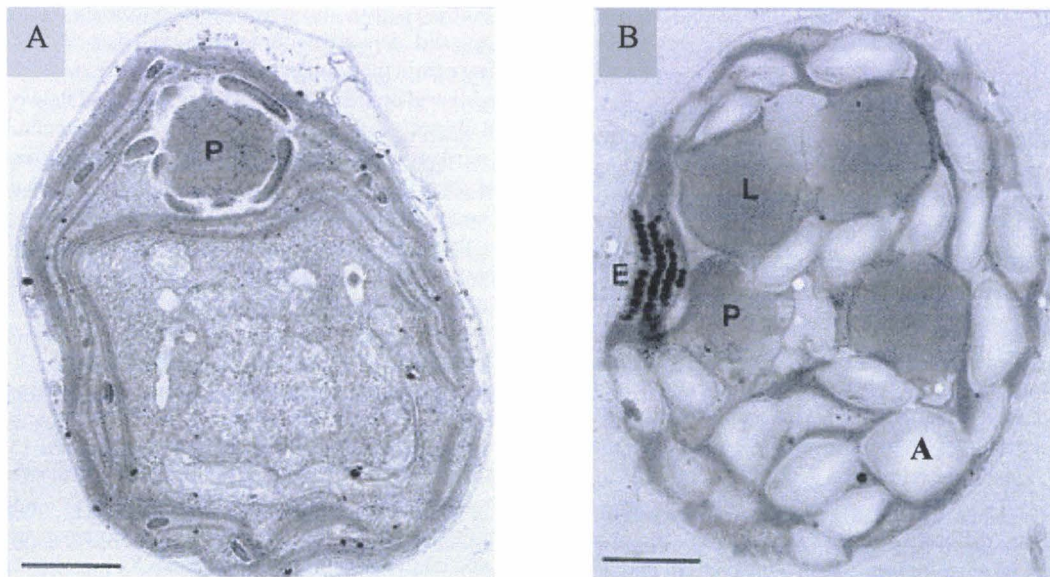


Figure 9 : Synthèse d'amidon transitoire ou de réserve chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Images obtenues par microscopie électronique à transmission de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*. A, coupe d'une cellule de *C. reinhardtii* cultivée dans un milieu non carencé. B, coupe d'une cellule de *C. reinhardtii* cultivée dans un milieu carencé en azote. P, Pyrenoïde ; L, Lipides ; E, Eyespot ; A, Amidon (Libessart *et al.*, 1995).

b) Le crible à l'iode

Afin d'isoler les souches contenant une mutation qui conduit à la production d'un amidon différent de la référence sauvage (en quantité et/ou en qualité), *Chlamydomonas* offre un crible très simple. Les cellules à tester sont dans un premier temps repiquées sur un milieu gélosé dépourvu d'azote. Dans ces conditions, elles dégradent leurs pigments chlorophylliens et accumulent de grandes quantités d'amidon. Après sept jours, les boîtes sont soumises à des vapeurs d'iode.

La quantité d'iode liée et la couleur du complexe formé sont en relation avec le degré de polymérisation (DP) des α -1,4 glucanes accumulés. Ainsi, l'amylose composé de glucanes ayant un degré de polymérisation élevé (DP>100) se colore en vert et exhibe une longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) supérieure à 600 nm. A l'inverse, l'amylopectine composée de glucanes à DP plus petit prend une teinte pourpre (λ_{max} de 550 nm).

La couleur des colonies de *C. reinhardtii* soumises aux vapeurs d'iode va nous informer sur la nature du polysaccharide accumulé: coloration vert-olive pour des souches dont l'amidon est enrichi en amylose (Figure 10, clone D), pourpre pour celles ne contenant que de l'amylopectine (type *waxy*; Figure 10, clone E). Le mélange des deux composés donne une coloration noire aux souches contenant un amidon de type sauvage (Figure 10, clone A et G) . Enfin, un clone pauvre ou dépourvu d'amidon prendra une teinte jaunâtre figure 10, clones B, C, F et H).

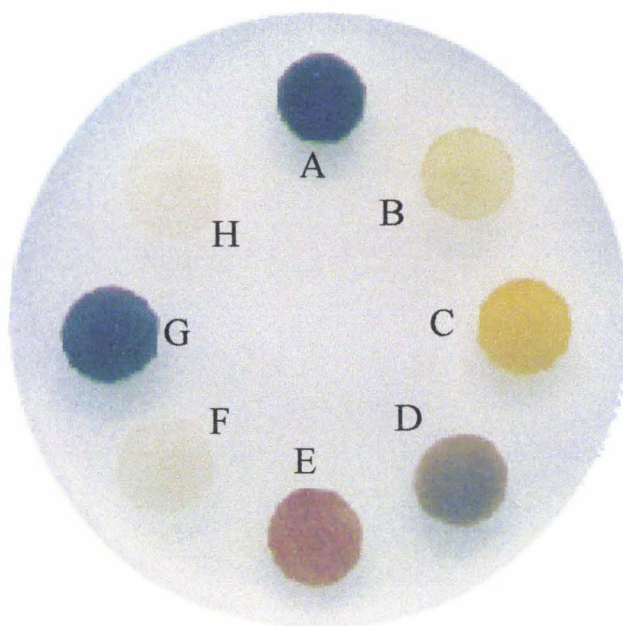


Figure 10 : coloration à l'iode de cellules de *Chlamydomonas*. Les cellules sont cultivées sur un milieu carencé en azote pendant sept jours en lumière continue avant d'être soumises à des vapeurs d'iode. A et G indiquent deux souches accumulant un amidon de type sauvage. E représente une lignée de type *waxy* (mutant *sta2-27::ARG7*), tandis que le clone D correspond à un mutant au locus *STA3* (*sta3-1*). B, F et H sont des souches dont l'enzyme D est déficiente (mutants *sta11-1*). Enfin le clone C possède une isoamylase inactivée (mutant *sta7-5::ARG7*). (Colléoni *et al.*, 1999a).

c) Les mutants déjà isolés.

Par la technique du crible à l'iode, de nombreux mutants ont déjà pu être isolés puis caractérisés (cf tableau 3).

souche	Coloration à l'iode	Activité enzymatique défectueuse	Pourcentage d'amidon accumulé par rapport au sauvage
<i>sta 1</i>	jaune	Grande sous unité ADP-G pyrophosphorylase	2%
<i>sta 2</i>	rouge	GBSSI	100%
<i>sta 3</i>	vert	SSIII	30%
<i>sta 4</i>	vert	Enzyme de branchement?	25%
<i>sta 5</i>	jaune	phosphoglucomutase	5%
<i>sta 6</i>	jaune	Petite sous unité ADP-G pyrophosphorylase	0%
<i>sta 7</i>	jaune	Isoamylase	0%
<i>sta 8</i>	vert	Isoamylase	20%
<i>sta 11</i>	jaune	Enzyme disproportionnante	8%

Tableau 3 : Souches mutantes du métabolisme de l'amidon isolés chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Sont indiqués : le nom des souches, la coloration de la colonie suite au crible à l'iode, l'enzyme pour laquelle la souche est mutante (si elle est connue), ainsi que la quantité d'amidon que ces mutants sont capables d'accumuler en carence en azote (indiqué en pourcentage par rapport à la souche sauvage).

II. Objectifs du travail de thèse

Deux objectifs principaux font l'objet de ce travail de thèse. Le premier concerne la poursuite de l'étude de la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii*. En effet, D'Hulst (1997) indiquait dans son mémoire de thèse l'isolement d'un ADNc incomplet (dénommé à l'époque CD142) dont la séquence partageait de grandes similitudes avec celles des GBSSI des plantes supérieures. Il était alors fort probable que cet ADNc était un produit du gène de structure de la GBSSI. C'est ce que nous nous sommes attachés à démontrer au cours de ce travail. Nous avons complété la séquence de l'ADNc puis isolé et séquencé un clone d'ADNg correspondant, et finalement démontré par deux techniques différentes (RFLP et complémentation fonctionnelle) la liaison génétique entre l'ADNc CD142 et le gène *STA2* dont une mutation conduit à l'absence d'amylose et d'activité GBSSI dans le grain d'amidon. Une analyse complète des structures du gène *STA2* et de la protéine GBSSI est présentée dans ce mémoire. Par ailleurs, nous avons poursuivi les travaux engagés par Van de Wal et coll. (1998) qui concernaient la synthèse d'amylose *in vitro*. Ces auteurs avaient pu proposer un modèle de biosynthèse de l'amylose par la GBSSI à partir de l'utilisation de l'amylopectine comme amorce de réaction. Néanmoins même si ce travail annonçait le changement de type cristallin de l'amidon après la synthèse massive d'amylose *in vitro* (on passe d'un type cristallin A à un type B après synthèse), il ne permettait toutefois pas de conclure de manière précise sur le taux effectif de cristaux de type A et B après synthèse. C'est ce que nous avons fait pendant ce travail avec, en parallèle, une étude de la cinétique d'accumulation d'amylose lors de la synthèse *in vivo*. Ces travaux ont été publiés dans la revue « *European Journal of Biochemistry* » dont nous reproduisons le texte dans la partie « Résultats ».

La deuxième partie de ce mémoire traite de l'étude d'une autre enzyme du métabolisme de l'amidon : l' α -1,4 glucanotransférase, connue aussi sous le nom d'enzyme disproportionnante (enzyme D). L'étude des mutants au locus *STAl1* réalisée par Colleoni *et al.* (1999 a et b) suggérait de manière forte que l'enzyme D intervenait au cours de la synthèse du grain d'amidon chez *C. reinhardtii*. Cependant, ces travaux n'avaient pas permis de montrer si le gène *STAl1* représentait le gène de structure de l'enzyme D (même si certaines expériences comme le dosage de gènes laissaient entrevoir cette hypothèse). Nous avons alors entrepris non seulement de cloner les ADNc et ADNg de l'enzyme D, mais aussi de démontrer que le locus *STAl1* constitue effectivement le gène de structure de cette enzyme. Par des expériences de dosages de l'amidon et des malto-oligosaccharides effectuées sur des

cellules sauvages et mutantes soumises à une alternance jour-nuit, nous avons complété les résultats de Colleoni *et al.* en démontrant de manière plus évidente encore que l'enzyme D est directement impliquée dans la synthèse de l'amidon et non pas seulement dans sa dégradation. Ce travail dont nous présentons une description complète dans ce mémoire est actuellement soumis pour publication.

Enfin nous avons souhaité aborder, dans la dernière partie de ce travail de thèse, l'étude du contrôle de la synthèse de l'amidon par l'horloge circadienne. Ce travail encore préliminaire démontre que le métabolisme de l'amidon chez *C. reinhardtii* se trouve sous le contrôle d'un rythme circadien qui s'avère totalement indépendante du cycle de division cellulaire et de la transition jour/nuit. Même si divers auteurs avaient déjà pu montrer que certaines enzymes impliquées dans le métabolisme du polysaccharide de réserve étaient soumises à une régulation circadienne, c'est la première fois qu'on démontre que les variations des quantités d'amidon obéissent au même type de régulation.

III. Article I:

Granule-bound starch synthase I

A major enzyme involved in the biogenesis
of B-crystallites in starch granules

résumé

L'amidon se définit comme un polymère semi-cristallin composé de 2 fractions polysaccharidiques distinctes. Les lamelles cristallines de type A et B représentent des structures différentes présentes respectivement dans les amidons de céréales et de tubercules. L'amylopectine, fraction majeure de l'amidon, est perçue comme principalement responsable de cette organisation semi-cristalline tandis que l'on considère l'amylose comme un polymère amorphe n'ayant que peu ou pas d'impact sur celle-ci. *STA2* représente un gène de *Chlamydomonas reinhardtii* indispensable tant pour la biosynthèse de l'amylose que pour la présence de l'activité amidon-synthétase liée au grain I (GBSSI). Nous démontrons ici que ce locus encode une amidon-synthétase de 69 kDa et décrivons l'organisation du locus *STA2* correspondant. Cette enzyme arbore une activité spécifique bien supérieure à celles annoncées pour la plupart des plantes vasculaires. Cette propriété nous permet de présenter une caractérisation détaillée de la synthèse d'amylose à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nous avons ainsi démontré que la GBSSI était capable de synthétiser une quantité significative de structures cristallines dans l'amidon. La quantité ainsi que le nombre de cristaux synthétisés dans ces conditions montrent que la GBSSI induit la formation de cristaux de type B soit en étroite association avec de l'amylopectine amorphe préexistante soit par cristallisation d'un matériel entièrement synthétisé *de novo*.

Granule-bound starch synthase I

A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules

Fabrice Wattebled¹, Alain Buléon², Brigitte Bouchet², Jean-Philippe Rai¹, Luc Liénard¹, David Delvallé¹, Kim Binderup¹, David Dauvillée¹, Steven Ball¹ and Christophe D'Hulst¹

¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL n°8576, Unité Sous Contrat de l'INRA, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France; ²Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches Agroalimentaires, Nantes, France

Starch defines a semicrystalline polymer made of two different polysaccharide fractions. The A- and B-type crystalline lattices define the distinct structures reported in cereal and tuber starches, respectively. Amylopectin, the major fraction of starch, is thought to be chiefly responsible for this semicrystalline organization while amylose is generally considered as an amorphous polymer with little or no impact on the overall crystalline organization. *STA2* represents a *Chlamydomonas reinhardtii* gene required for both amylose biosynthesis and the presence of significant granule-bound starch synthase I (GBSSI) activity. We show that this locus encodes a 69 kDa starch synthase and report the organization of the corresponding *STA2* locus. This enzyme displays a specific activity an order of

magnitude higher than those reported for most vascular plants. This property enables us to report a detailed characterization of amylose synthesis both *in vivo* and *in vitro*. We show that GBSSI is capable of synthesizing a significant number of crystalline structures within starch. Quantifications of amount and type of crystals synthesized under these conditions show that GBSSI induces the formation of B-type crystals either in close association with pre-existing amorphous amylopectin or by crystallization of entirely *de novo* synthesized material.

Keywords: starch; amylose synthesis; granule-bound starch synthase; *Chlamydomonas reinhardtii*; *in vitro* synthesis.

Starch accumulates in plants as a complex granular mixture of α -glucans (α -1,4-linked and α -1,6-branched) consisting chiefly of amylopectin and amylose. In amylopectin, the major fraction is composed of small-size α -1,4-linked chains that are clustered together by the presence of 5% α -1,6 linkages [1] (starch structure reviewed in [2] and [3]; starch metabolism reviewed in [4]). Amylose is composed of longer chains with less than 1% α -1,6 branches. Plant starch can be further distinguished from glycogen by the presence of highly ordered parallel arrays of double helical glucans (reviewed in [5]). The origin of these arrays resides in the close packing of the α -1,6 linkages at the root of the unit amylopectin cluster. The

9 nm size of each repetitive unit or cluster is conserved throughout the plant kingdom [6]. Two major types of crystalline organization have been documented so far in native starch granules. A-type powder diffraction patterns can be recovered from most cereal endosperm and *Chlamydomonas reinhardtii* starches while B-type structures were reported for tuber starches or high amylose starches from mutants of algae and cereals. It is generally assumed that amylopectin plays a major role in establishing the crystalline organization of starch. Indeed, amylose-defective mutants or antisense constructs of maize and potato accumulate normal amounts of starch with the same A- or B-type granule organization and similar crystallinities to the corresponding wild-type references. In addition, starches with elevated amylose content are generally less crystalline suggesting that most, if not all, of the amylose remains amorphous within the granule. Amylose synthesis has been known since the foundation work laid by Nelson & Rines [7], to depend on the presence of granule-bound starch synthase I (GBSSI), an enzyme identified by de Fekete *et al.* [8], as associated with starch granules. GBSSI was first reported to use non-physiological concentrations of UDP-glucose [9] while ADP-glucose was shortly discovered thereafter as the preferred donor substrate [10]. Mutations leading to defects for GBSSI have been isolated in an ever-increasing number of species including waxy (*wx*) maize [11], *wx* rice [12], *wx* barley [13], *wx* wheat [14], amylose-free (*amf*) potato [15], low amylose (*lam*) pea [16], *wx* amaranth [17] and *sta2 C. reinhardtii* [18]. A number of studies approaching the synthesis of amylose *in vitro* [9,19–21],

Correspondence to C. D'Hulst, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche CNRS/USTL n°8576, Unité Sous Contrat de l'INRA, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex France.

Fax: + 33 3 20436555, Tel.: + 33 3 20434881,

E-mail: christophe.dhulst@univ-lille1.fr

Abbreviations: GBSSI, granule-bound starch synthase I; RFLP, restriction fragment length polymorphism.

Enzymes: soluble and granule-bound starch synthases:

ADP-glucose:1,4- α -D-glucan 4- α -D-glucosyltransferases (EC 2.4.1.21);

ADP-glucose pyrophosphorylase: ADP: α -D-glucose-1-phosphate adenyltransferase (EC 2.7.7.27).

Note: a web site is available at <http://www.univ-lille1.fr/ugsf/>

(Received 11 January 2002, revised 21 June 2002,

accepted 25 June 2002)

establish that GBSSI incorporates glucose both in amylopectin and amylose according to the conditions used. Leloir *et al.* [9] originally noted a stimulation of GBSSI by high concentrations of malto-oligosaccharides and found incorporation of radioactive glucose into both starch fractions. In a recent study, Denyer *et al.* [21] showed that in the absence of these oligosaccharides, the labelled product synthesized *in vitro* by GBSSI was confined to the amylopectin fraction. However in the presence of high malto-oligosaccharide concentrations, GBSSI incorporated glucose massively into amylose-like glucans. *In vivo* evidence supporting the involvement of GBSSI in amylopectin synthesis was produced in *Chlamydomonas* by Maddelein *et al.* [22]. Additional *in vitro* synthesis experiments performed with starch granules isolated from *C. reinhardtii* show that amylose synthesis can occur in the absence of malto-oligosaccharide priming by extension and cleavage of a nonreducing end available on an amylopectin molecule [23]. It has recently been shown that this mechanism also appears to be at work in the starches extracted from higher plants [24]. However the total amount of GBSSI activity measured in *Chlamydomonas* starch appeared 10- to 50-fold higher than that measured in vascular plant starches [24].

We now report the cloning and characterization of cDNAs and gDNAs corresponding to a granule-bound starch synthase from *C. reinhardtii*. We show that this sequence corresponds to the previously characterized *STA2* gene required for amylose synthesis. We show that this 69 kDa enzyme contains an extra 11.4 kDa at the C-terminus that is not found in the higher plant enzymes. Detailed *in vivo* investigations performed during the course of storage starch synthesis show that amylopectin and amylose synthesis are partly disconnected and that amylose synthesis persists when the rate of polysaccharide and amylopectin synthesis become minimal. *In vitro* synthesis experiments performed using wild-type *Chlamydomonas* starch with this high specific activity enzyme establish that GBSSI induces the formation of B-type crystalline structures.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

ADP[U-¹⁴C]glucose and α [³²P]dCTP were purchased from Amersham (Amersham, Buckinghamshire, UK). ADP-glucose was obtained from Sigma. CL-2B Sepharose® column and Percoll® were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. Starch assay kit was obtained from Roche (Germany).

Chlamydomonas strains, growth conditions and media

The reference strains of *C. reinhardtii* used in this study are 137C (*mt-nit1 nit2*) and 330 (*mt+ nit1 nit2 arg7-7 cw15*). CS9 (*mt+*) is a wild-type strain of *Chlamydomonas smithii*. Both *C. smithii* and *C. reinhardtii* are interfertile ecotypes that give rise to a fertile progeny. The GBSSI-defective strain BAFR1 (*mt+ nit1 nit2 sta2-29::ARG7*) contains a disruption of the *STA2* gene that was generated through random integration of the pARG7 plasmid in the nuclear DNA of *C. reinhardtii* [18]. Strain IJ2 has been already described elsewhere [22] and contains mutations at both the *STA2* and

STA3 loci. Mutation in the latter leads to the complete disappearance of the major soluble starch synthase enzyme. Strain 18B (*mt-nit1 nit2 sta2-1*) displays a mutation at the *STA2* locus which leads to synthesis of a truncated GBSSI (58 kDa) [18]. The adequate strain for phenotypic complementation is TERBD20 (*sta2-1 nit1 nit2 cw15 arg7-7*) and is a descendant from a cross involving strains 330 and 18B. Finally, strain I7 has been described by van den Koornhuysen *et al.* [25] and carries a mutation at locus *STA1* encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. I7 accumulates less than 5% of normal starch quantity. Standard media are fully detailed in [26] while growth conditions and nitrogen-starved media are described in [18,27–29].

Determination of starch levels, starch purification and spectral properties of the iodine–starch complex

A full account of amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradients, starch granule-bound proteins solubilization and $\lambda_{\max}$ (maximal absorbance wavelength of the iodine polysaccharide complex) measures can be found in [18].

In vitro synthesis of amylose

Starch (13.9 mg) was incubated with 3.2 mM ADP-glucose in the presence of 50 mM glycine (pH 9.0), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 0.4% 2-mercaptoethanol, 5 mM MgCl₂ and 0.05% BSA in a total volume of 52 mL at 30 °C for 4, 14, 24 and 48 h incubation and in a total volume of 78 mL for 72 h incubation. After incubation, the suspension was centrifuged at 4000 g for 10 min and the supernatant discarded. The starch pellet was then washed three times in 50 mL of sterile milliQ water. After the last wash, the starch pellet was stored at 4 °C awaiting further analysis.

Separation of starch polysaccharides by gel permeation chromatography

Starch (0.5–1.0 mg) dissolved in 10 mM NaOH (500 μ L) was applied to a column (0.5 cm internal diameter $\times$ 65 cm) of Sepharose CL-2B®, which was equilibrated and eluted with 10 mM NaOH. Fractions of 300–320 μ L were collected at a rate of one fraction per 1.5 min. Glucans in the fractions were detected by their reaction with iodine and the levels of amylopectin and amylose were determined by amyloglucosidase assays (Roche).

In vitro assay of GBSSI activity

This assay is fully described in both [18] and [22]. Briefly, 50 μ g of fresh starch granules were incubated at 30 °C for 30 min in 100 μ L of the following buffer: Glycyl (NaOH), pH 9, 50 mM; (NH₄)₂SO₄, 100 mM; 2-mercaptoethanol, 5 mM; MgCl₂, 5 mM; BSA, 0.25 g·L⁻¹; ADP-glucose 3.2 mM; and [U-¹⁴C]ADP-glucose (336 mCi·mm⁻¹), 0.75 nM. The reaction was stopped by addition of 2 mL of 70% ethanol. The resulting precipitate was subsequently filtered on a glass-fibre filter (Whatmann GF/C®), rinsed with 15 mL of 70% ethanol, dried for 30 min at room temperature and finally counted in a liquid scintillation counter.

Antibodies directed against whole starch-bound proteins: Western blots

To produce antisera raised against whole starch-bound proteins, native starch granules purified from strains IJ2 and 137C were applied to rabbits (New Zealand albinos) in three successive intramuscular injections of 20 mg spaced by 3 weeks. Before injection, one volume of complete Freund adjuvant (Difco, Detroit, MI, USA) was added to the starch-granule suspension. Antisera were then prepared from 20 to 50 mL of blood from immunized rabbit. After blood coagulation, clots were removed by centrifugation at 13 000 *g* for 15 min at 4 °C and the resulting supernatant (antiserum) was subsequently aliquoted into 1-mL samples and could be kept at -80 °C for several months.

Proteins bound to the starch granule were separated by electrophoresis on classical SDS/PAGE gel (7.5% acrylamide and 0.1% SDS; methods to extract starch granule-bound proteins are fully described in [18]). Before blotting proteins onto nitrocellulose membrane (Protean BA®, Schleicher & Schuell), the gels were incubated for 15 min in a Western blot buffer [48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.0375% (w/v) SDS and 20% methanol]. The transfer was carried out using the Mini Trans-Blot Cell (Biorad, Hercules, CA, USA) for 45 min at 250 mA with the same Western blot buffer. After blocking for 4 h in a 3% BSA solution made in Tris/NaCl/Tween buffer (Tris base, 20 mM; NaCl, 137 mM; 0.1% Tween20; pH 7.6 with 1 M HCl), membranes were incubated overnight at 4 °C with the specific antiserum diluted in Tris/NaCl buffer (Tris base, 20 mM; NaCl, 137 mM; pH 7.6 with 1 M HCl). After incubation, membranes were rinsed several times in Tris/NaCl/Tween buffer at room temperature before immunodetection with a biotin and streptavidin/alkaline phosphatase kit (Sigma) following the supplier's instructions.

Cloning of the full-length GBSSI cDNA

A partial cDNA clone corresponding to algal GBSSI was isolated as follows. Approximately 500 000 lysis plaques of a *Chlamydomonas* λZAP II cDNA library were screened with antisera SA137C and PA55 as described by Sambrook *et al.* [30]. A cDNA clone (named CD142) with an insert of 1696 bp was isolated and fully sequenced on both strands and submitted to GenBank (accession number AF026420). To obtain more information about the 5' end of this cDNA, an RT-PCR amplification was done using a specific primer 5'-CGCAAACACCTCGCTGGCAC and a degenerated primer 5'-AAGACSGGYGGYCT corresponding to the highly conserved KTGGL sequence found at the N-terminal part of all GBSSIs cloned to date. An amplified fragment of 1380 bp (named CD142#A) was cloned in pBluescriptII SK+ and fully sequenced on both strands. To obtain the 5' end of the GBSSI cDNA a RACE-PCR protocol was used (Life Technologies) following the supplier's instructions. A total fraction of RNA from the wild-type strain was reverse transcribed using the specific primer 5'-CACGCGGGCAGCCTCAATAG. A first PCR amplification of the subsequently produced cDNA was done using the specific primer 5'-CGAAGCGCTTGTGGTTGTC while the nested PCR amplification was carried out with the following specific primer 5'-CGTAGC GAGGGCAATGGTC. The complete cDNA obtained

was submitted to GenBank under the same previous accession number (AF026420). Total RNA was extracted from the wild-type strain 330 with RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the supplier's instructions.

Cloning of the full-length GBSSI gDNA

To isolate a genomic copy of the structural gene of *Chlamydomonas* GBSSI, 11280 *Escherichia coli* clones from a cosmid library [31] were screened using the CD142 insert as a radiolabelled probe. This genomic library is indexed in 120 microtitration plates and the corresponding *E. coli* clones were transferred onto nylon filters and consequently treated as described by Sambrook *et al.* [30] before hybridization with the specific nucleotide probe. From a total of 16 positives clones, three were selected for further analysis because of their strong hybridization with probe CD142 (GB911, GB1114 and GB1411). Only GB911 gave phenotypic complementation of the *sta2-1* mutant strain (see Results). This prompted us to use this cosmid for complete sequencing of the *STA2* gene.

Complementation of the *sta2-1* mutation

Strain TERBD20 was cotransformed with both GB911 cosmid clone and the plasmid pASL [32]. Approximately 10⁸ cells were transformed by the glass bead method with 1 µg of pASL mixed with 4 µg of cosmid GB911 as described by Kindle *et al.* [33]. Transformant clones were selected and purified on minimal medium (high salt acetate) prior to their analysis.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis

Standard protocols for molecular biology as described by Sambrook *et al.* [30] were used for RFLP analysis, including gDNA restriction and subsequent electrophoresis on agarose gel, transfer onto nylon membranes and hybridization with a specific probe. *Chlamydomonas* gDNA was prepared as described in [34]. Approximately 10 µg of gDNA was digested with 50 units of restriction enzyme. Restriction fragments were then separated on 0.8% agarose gel and transferred onto a nylon membrane (Porablott, NY Amp, Macherey-Nagel). Hybridization was performed overnight at 65 °C in the following hybridization buffer: 5 × NaCl/Cit, 5 × Denhardt's, 0.1% SDS, 0.1 g·mL⁻¹ denatured salmon sperm DNA where 1 × NaCl/Cit is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate and 1 × Denhardt's is 0.2 g·L⁻¹ Ficoll 400, 0.2 g·L⁻¹ PVP40 and 0.2 g·L⁻¹ BSA. Probes were radiolabelled by random primers method as described by supplier's instruction (Amersham Life Science). Membranes were typically washed twice in 2 × NaCl/Cit, 0.1% SDS at 65 °C for 10 min and twice in 0.5 × NaCl/Cit, 0.1% SDS at 65 °C for 10 min before exposure to X-ray film.

Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy experiments were performed as already described in [35]. Starch granules were stuck onto brass stubs with double-sided carbon-conductive adhesive tape and covered with a 30 nm gold layer using an 1100 ion-sputtering device (Jeol). Samples were then examined with a 840-A scanning electron microscope (Jeol) operating at an

accelerating voltage of 5 keV with a current probe of 0.1 nA. The working distance was 15 mm.

X-ray diffraction measurements

Samples (10 mg) were sealed between two aluminium foils to prevent any significant change in water content during the measurement. Diffraction diagrams were recorded using Inel (Orleans, France) X-ray equipment operating at 40 kV and 30 mA. $\text{CuK}_{\alpha 1}$ radiation ($\lambda = 0.15405$ nm) was selected using a quartz monochromator. A curved position-sensitive detector (Inel CPS120) was used to monitor the diffracted intensities using 2 h exposure periods. Relative crystallinity was determined, after bringing all recorded diagrams to the same scale using normalization of the total scattering between 3° and 30° (2θ) following a method derived from Wakelin *et al.* [36]. Dry extruded starch and spherulitic crystals of amylose were used as amorphous and crystalline standards, respectively.

RESULTS

Molecular cloning of cDNA encoding a protein recognized by an antibody directed against granule-associated proteins

Starch was purified from nitrogen-supplied cultures of both the wild-type 137C reference and a mutant strain carrying a gene disruption in the *STA2* locus of *C. reinhardtii* (strain IJ2). This *sta2-29::ARG7* mutation induces the simultaneous loss of GBSSI activity and of the major protein associated with starch. The latter migrates as a 76 kDa band on SDS/PAGE gels [18]. The *sta2-1* mutation was previously described as leading to the production of a truncated 58 kDa GBSSI protein. Microsequencing of both *sta2-1* and wild-type GBSSI have shown that both N-termini were strictly identical [18]. Moreover, several mass spectrometry analyses recently conducted on mutant and wild-type proteins showed the specific disappearance of C-terminal peptides in the truncated protein. Whereas all peptides upstream of the sequence EGLLEEV VYGKG (positions 502–513 on the mature protein) are present in both proteins, peptides downstream of the sequence IPGDLPA VSYAPNTLKPVSASVEGNGAAAPK (positions 531–561) are selectively absent in the *sta2-1* mutant polypeptide. The absence of the C-terminal tail in *sta2-1* mutants correlates with an increase in the ADP-glucose K_m from 4 to over 20 mM ADP-glucose [18].

Whole wild-type native starch granules were injected intramuscularly into rabbits (to give a total of 60 mg). Antisera were prepared from these animals as detailed in Experimental procedures. These antisera were analysed by Western blotting against starch-bound proteins isolated from the aforementioned wild-type and mutant *Chlamydomonas* strains. The blots gave results identical to those generated by the PA55 antibody directed against a synthetic peptide conserved at the C-terminal of all starch synthases examined to date [37]. This prompted us to use both the PA55 and the SA137C antibodies to screen for expression of corresponding epitopes within a λ ZAP II cDNA library. From a total of 25, we found one and four phage plaques reacting against PA55 and SA137C, respectively, and their sequences showed high similarities to GBSSI already cloned

in higher plants. These sequences covered a total of 1696 bp and were deposited in GenBank as CD142 (accession number AF026420).

Characterization of the GBSSI cDNA sequences

To obtain additional GBSSI sequences, we used RT-PCR and amplified a 1380-bp fragment that covers the N-terminal part of the protein. This was performed by selecting oligonucleotide primers derived from the conserved KTGGL sequence found towards the N-terminus of all GBSSI proteins studied to date. Finally, to generate the full GBSSI cDNA sequence we used RACE-PCR (as described in Experimental procedures) to generate an additional fragment of 435 bp. Three independent RACE-PCR experiments were performed in order to determine the +1 nucleotide for transcription. N-Terminal sequencing of the GBSSI protein solubilized from wild-type granules [18] established the transit peptide cleavage site at position 57. The full GBSSI protein contains an extra 11.4 kDa C-terminal tail with no significant homology to any previously published starch or glycogen-synthase sequence. The predicted mass of the mature protein appeared to be 7 kDa smaller than that inferred by the SDS/PAGE measurements (i.e. 69 and not 76 kDa). The sequence comparisons displayed in Fig. 1 using the CLUSTALW method with PAM (percent accepted mutation) series residue weight matrix (gap penalty = 10; gap length penalty = 0.2) have enabled us to build the phylogenetic tree shown in Fig. 2. It is clear from this analysis that divergence of GBSSI sequences found by comparing several plant species occurred at a very early stage during the evolution of photosynthetic eukaryotes.

Characterization of the GBSSI gDNA sequences

The cDNA clone CD142 was used to select for corresponding gDNAs from an indexed cosmid library [31]. A 6.5 kb fragment in cosmid GB911 covering most of the GBSSI coding sequences was subcloned in two overlapping parts of 3.0 and 4.5 kb and subjected to DNA sequencing thus generating a 5856 bp gDNA sequence deposited in GenBank (accession number AF433156). Figure 3 displays the length and position of the six introns within the GBSSI sequence compared with those of rice and potato. The number and position of the introns are unrelated to those present in vascular plant genes and suggest an ancient divergence of the GBSSI gene in green algae.

Establishing the nature of the STA2 locus

Two separate lines of evidence show that the cDNA and gDNA clones correspond to the *STA2* gene products. First, a gDNA clone obtained in an indexed cosmid library [31] complemented a *sta2-1* mutation. Figure 4 shows the various levels of phenotypic complementation obtained with six independent transformants. GBSSI specific activities (calculated with respect to the quantity of *Chlamydomonas* starch involved in the assay) in the complemented strains varied from 44 to 84% when compared with that of the wild-type strain. It is clear that six strains (out of three hundred) cotransformed with the GB911 gDNA restored both amylose biosynthesis (at least partially) and the

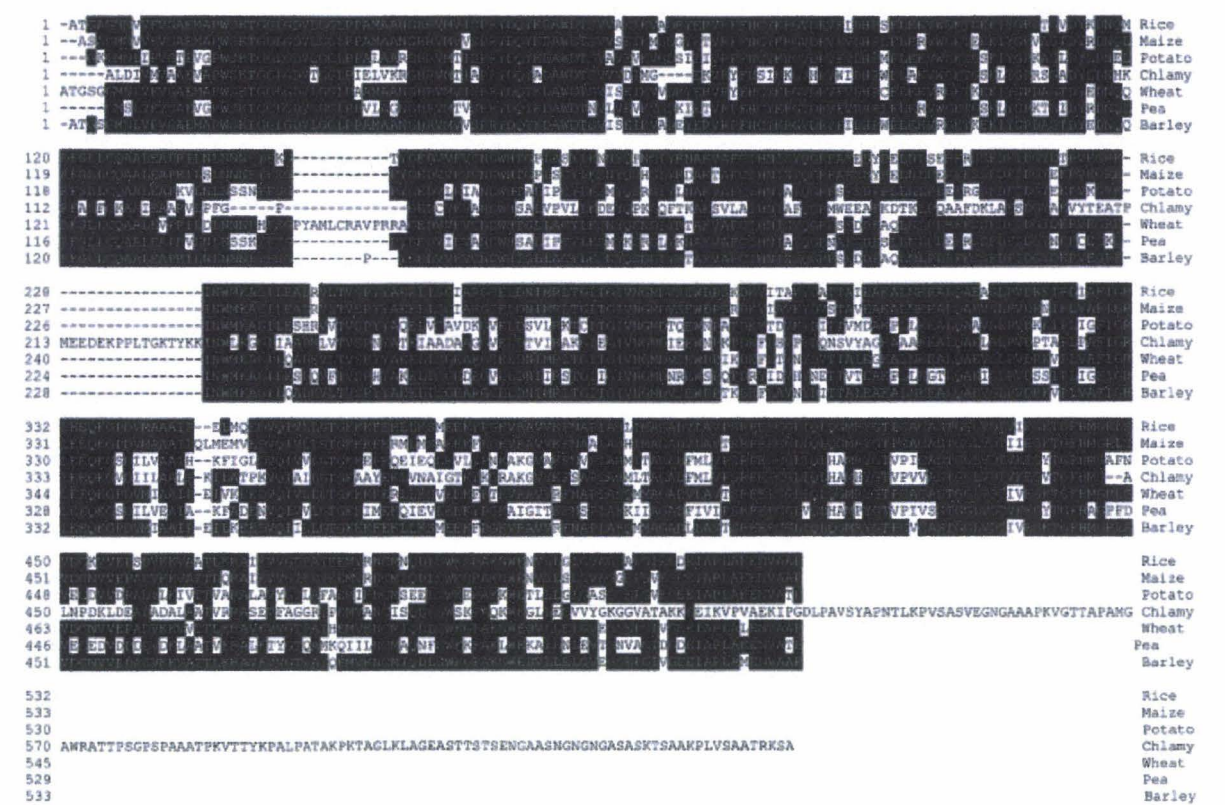


Fig. 1. Peptide sequence comparison of *Chlamydomonas* GBSSI with those of other plant species. This analysis was done using mature proteins only. Alignment was generated using the CLUSTALW method with PAM series residue weight matrix (gap penalty = 10; gap-length penalty = 0.2). Residues matching the consensus GBSSI sequence derived from this comparison are shaded in black. Accession numbers for the different GBSSI are as follows: wheat: P27736; *Chlamydomonas*: AF026420; maize: P04713; pea: X88789; rice: P19395; barley: X07931; potato: X58453.

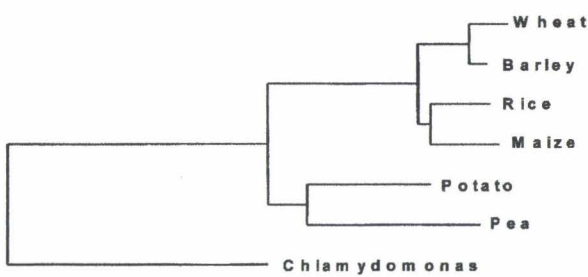


Fig. 2. Phylogenetic tree established from GBSSI proteins sequences alignment as shown in Fig. 1.

presence of the 69 kDa GBSSI protein (data not shown). Restoration of amylose synthesis is likely to come as a consequence of the random integration of the wild-type *STA2* gene in the nuclear genome of *Chlamydomonas*. Nevertheless, depending on the integration site, expression of this integrated wild-type copy of *STA2* might vary greatly. Indeed integrations in some genomic regions have been reported to trigger silencing of the DNA introduced [38–40]. These ‘position effects’ could therefore explain variation in phenotype between transformants and only partial restoration of amylose synthesis. It must be stressed that in control experiments involving cotransformation with

randomly selected cosmids we never observed complementation of the *sta2* mutations.

Second, the CD142 cDNA was used to find RFLPs in strains disrupted for the *STA2* gene (Fig. 5). We were able to show that these differences cosegregated in 22 independent meiotic recombinants in a cross involving strain IJ2 (*sta2-29::ARG7 sta3-1*) and an interfertile ecotype of *C. reinhardtii* known as *C. smithii* (strain CS9). This latter is wild-type regarding starch accumulation. Functional complementation of *sta2-1* mutation by the gDNA sequence together with the demonstration of allele-specific changes in this gDNA by particular *STA2* mutations demonstrates that the cloned gene defines *STA2* and that the latter encodes GBSSI.

Amylose in storage starch appears after a block in amylopectin synthesis

Nitrogen starvation in *Chlamydomonas* offers a good model with which to understand the basic physiology of storage starch synthesis. During nitrogen starvation cellular components including thylakoid membranes are broken down and converted into both lipid droplets and starch. We followed the kinetics of amylose synthesis over a 5-day period of nitrogen starvation and measured the amounts of starch, amylose, the λ_{max} of the starch fractions, the degree of crystallinity and the X-ray

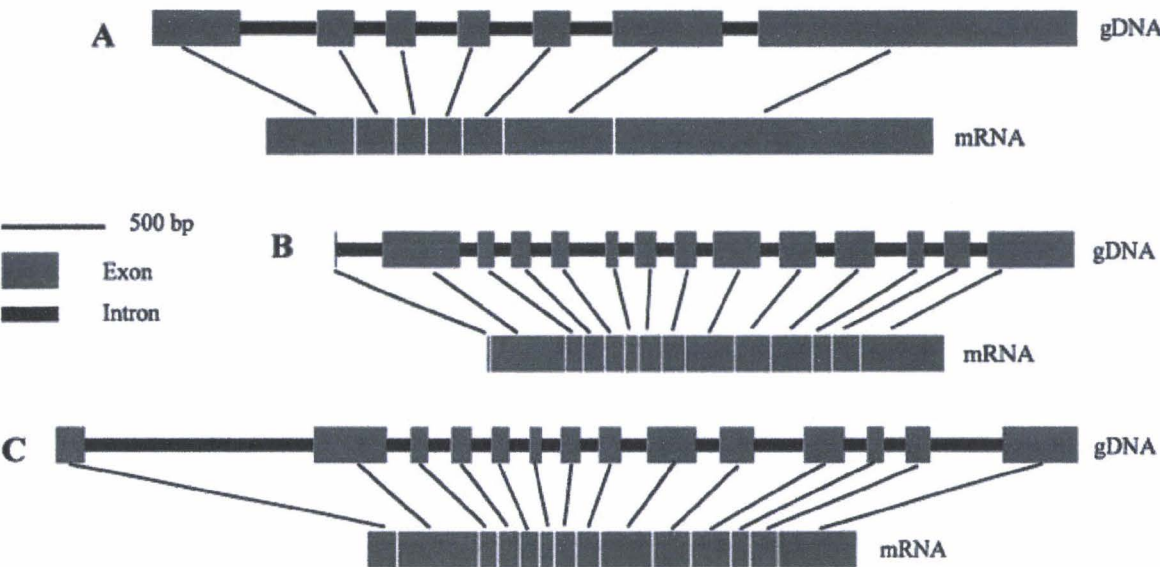


Fig. 3. Introns/exons organizations comparison of three different GBSSI genes including *Chlamydomonas reinhardtii* (A; accession number AF433156), *Solanum tuberosum* (B; accession number: X58453) and *Oryza sativa* (C; accession number: AF141955).

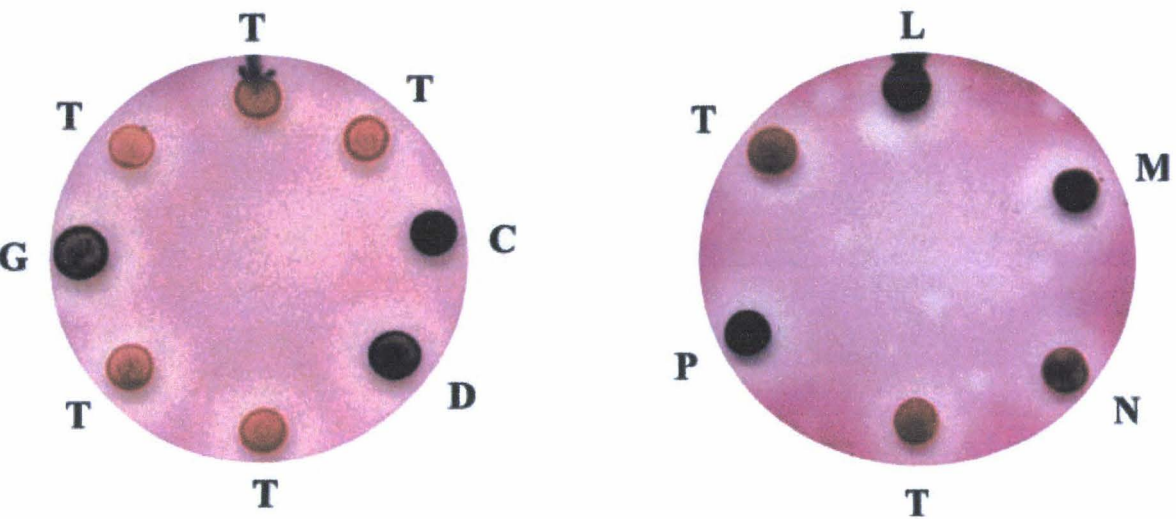


Fig. 4. Iodine staining of *Chlamydomonas* cell patches. Cells were grown under nitrogen starvation for 7 days under continuous light and were subsequently stained with iodine vapours. T indicates the untransformed reference strain (TERBD20: *sta2-1*) whereas C, D, G, L, M, N and P indicate independent strains derived from TERBD20 transformed with cosmid GB911. The T strain, devoid of amylose, displays a typical red iodine stain. Stains of others strains result from various levels of phenotypic complementation indicating, in most cases (except for strain N), a partial restoration of amylose biosynthesis within the cells. Strains C, D, G and P show, respectively, 84%, 58%, 44% and 81% of wild-type GBSSI activity as determined by *in vitro* incubation (not determined for strains L and M).

diffraction type. The granule morphology was also followed by scanning electron microscopy and transmission electron microscopy of slices of starch granules stained by Patag (data not shown). The results listed in Table 1 show that for the first 12 h the cells are actively engaged in amylopectin synthesis and that the overall rate of polysaccharide synthesis decreases strongly thereafter. The small amounts of transitory starch amylose present at $t = 0$ and after 12 h do not allow us to measure significant rates of amylose synthesis and we can only state that the latter certainly does not exceed the rate of

amylopectin synthesis. The increase in crystallinity witnessed during these first 12 h is in line with the high rates observed for amylopectin synthesis. However between 12 and 58 h the rate of amylose synthesis becomes significant. After an additional 63 h, the rate of polysaccharide synthesis decreases further and the rate of amylose synthesis accounts for most polysaccharide synthesis. At this stage the rate of amylopectin synthesis has become minimal and it is difficult to say if the residual amylopectin synthesis activity is due to a residual soluble starch synthase activity or to the previously described

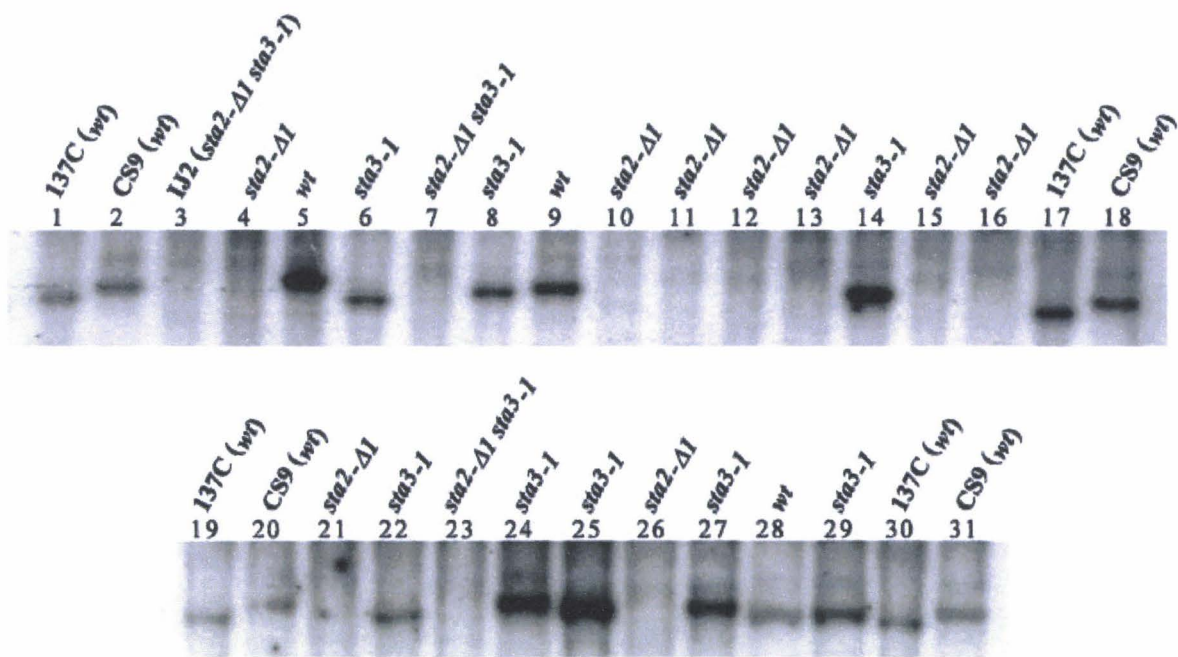


Fig. 5. Southern blot analysis of *sta2-29::ARG7* (indicated as *sta2-Δ1*) mutant and wild-type strains. Molecular hybridization was carried out with probe CD142 previously radiolabelled with $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP. Prior to migration on 0.8% agarose gel, gDNA was subjected to restriction with *Spe*I for 4 h at 37 °C. Whereas all *STA2* strains display a 4.0 kb band that specifically hybridizes with probe CD142, all *sta2-29::ARG7* mutant strains lack this band. 137C and CS9 are wild-type strains from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas smithii* ecotypes, respectively. IJ2 is the parental strain mutant for both *STA2* and *STA3* genes. Lanes 4–16 and 21–29 correspond to independent recombinant strains obtained from a cross involving CS9 and IJ2 parental strains.

ability of GBSSI to extend amylopectin outer chains. Again this coincides with a decrease in crystallinity. This situation closely mimics that which was reported for cereal endosperm storage starch where amylose continues to accumulate at the final stage of starch synthesis in the absence of concomitant amylopectin synthesis (reviewed in [41]).

***In vitro* synthesis of amylose**

Because in *Chlamydomonas* amylose synthesis remains active when amylopectin synthesis has become minimal, we have decided to resort to a semi *in vitro* system that contains all the native enzymes and structures required for

amylose synthesis but lacks the amylopectin synthesis machinery. This system consists of intact starch granules purified from *Chlamydomonas* strains under physiological conditions where the synthesis of amylose has remained minimal. These conditions are defined either by wild-type log phase growing *Chlamydomonas* cultures or by growth-arrested (nitrogen-starved) cultures where the synthesis of ADP-glucose has been lowered through a mutation in the ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit structural gene. These granules are packed with wild-type GBSSI protein, contain less than 2% amylose and display a starch structure identical to that defined at the start of the *in vivo* experiment described above. We had previously used this system to demonstrate that the *Chlamydomonas* GBSSI

Table 1. Kinetics of *in vivo* synthesis of amylose. In order to induce massive polysaccharides biosynthesis, *Chlamydomonas* cells were transferred from ammonium-supplied medium to nitrogen-free medium at *t* = 0 h. The resulting production of starch was followed over a 5-day period. Amylose percentage of starch weight was measured (amyloglucosidase assay; Roche) after gel filtration chromatography on a Sepharose CL-2B® column of starch dispersed in 10 mM NaOH. Crystallinity levels were measured for total starch. NA, not applicable.

Time of culture (h)	Total starch in 10 ⁻⁶ cells (μg)	λ _{max} of total starch (nm ^a)	% of amylose	% of crystallinity (± 3%)	Amylose synthesis rate (μg·h ⁻¹)	Amylopectin synthesis rate (μg·h ⁻¹)
0	2.1	563	< 2 ^b	25	NA	–
12	13.4	563	< 2 ^b	35	NA	942
48	15.8	572	3.6	34	16	51
58	23	574	10.3	32	180	540
121	26	590	15.3	27	25.5	22

^a λ_{max} is the wavelength at the maximal absorbance of iodine–polysaccharide complex. ^b < 2% represents the sensitivity of the starch fractionation technique.

readily synthesizes amylose *in vitro* by extending amylopectin chains and subsequently releasing these glucans after cleavage [23]. GBSSI from vascular plants behaved in a similar fashion [24]. However most vascular plant enzymes displayed 10- to 50-fold lower specific activities with respect to starch when assayed in comparison with *Chlamydomonas* GBSSI in the same set of experiments. Because of this high activity, we were able to double the amount of polysaccharide by a 24 h incubation of purified starch granules in the presence of 3.2 mM ADP-glucose. We thus used these conditions to investigate the consequences of amylose synthesis on granule organization and more specifically on starch crystallinity. *STA2* gene disruptions do not yield any measurable glucose residue incorporation under these conditions and the observed synthesis is therefore solely under GBSSI control. In our previous studies, we documented a switch from A- to B-type diffraction patterns after *in vitro* synthesis of amylose in the presence of 3.2 mM ADP-glucose. However the low amounts of starch analyzed allowed neither precise quantification of crystallinity levels nor determination of the ratio between the A- and the B-type structures amongst the crystals. We resolved to readdress this issue and to probe quantitatively the consequences of GBSSI action on granule crystallinity and morphology. The results listed in Table 2 show that GBSSI-mediated synthesis is able to lead to the appearance of a significant amount of crystalline material. The granules used for this analysis were extracted from nitrogen-supplied *Chlamydomonas* cultures and are similar to the transitory starch found in plant leaves. Before incubation with ADP-glucose this polysaccharide displays a high crystallinity of the A-type with few B-type crystals present. After a mere 24 h, crystallinity has decreased from 42 to 32% whilst B-type crystals have increased from 7 ± 5% of the crystalline material to 33 ± 5%, switching the whole pattern to what is generally defined as B-type starch. Table 2 shows that during the whole process the amount of A-type crystals stays remarkably constant, strongly suggesting that preformed A-type crystals from amylopectin are neither concerned with nor altered by the process of amylose synthesis. However the total amount of B-type crystal increases from 409 µg to over 2000 µg and accounts for up to 33% of the newly synthesized material. This strongly suggests that GBSSI induces *de novo* formation of B-type crystals and does not switch preformed A-type into B-type crystals. The results are consistent with either the

crystallization of GBSSI-synthesized material into B-type crystals or the conversion of amorphous amylopectin into crystalline B-type material. Sepharose CL-2B® gel filtration chromatography analysis performed on each sample after incubation (Fig. 6) show standard patterns of elution while amylose content goes up with time of incubation as witnessed by the increase in absorbance. Finally we examined the impact of massive amylose synthesis on granule morphology (Fig. 7). The transitory starch granules appear smooth, rounded and clearly separated at *t* = 0 while the starches subjected to 24 h *in vitro* synthesis of amylose appear highly distorted and partly fused into a network. This demonstrates that at least part of the synthesis can occur at the surface of the granule. The apparent polarized growth of the granules is consistent with either an anisotropic distribution of GBSSI or a filling of the amorphous regions of the granule leading to random distortions and subsequent polarized growth.

DISCUSSION

This work reports the molecular cloning and characterization of both the complete cDNA and gDNA of *C. reinhardtii* encoding GBSSI, the enzyme responsible for amylose biosynthesis in plants. A major difference between the algae and vascular plants consists of the presence of an extra 11.4 kDa at the C-terminus of the mature algal enzyme. When the specific activities (activity vs. amount of starch) were measured in comparison with potato, cassava, taro and wheat, the *Chlamydomonas* enzyme appeared at least 10-fold more active than the most active plant enzymes. However starch did not seem to be selectively enriched in GBSSI protein. The difference in activities can thus be attributed to the difference in starch structure, granule size distribution and (or) to a more active GBSSI protein *per se*. Whether the extra C-terminal 11.4 kDa are responsible for increasing the GBSSI activity remains to be demonstrated. Despite several attempts, no significant homology to any already known protein or 'protein domain' could be drawn from sequence comparison driven by this 11.4 kDa extension itself. Nevertheless this extension seems to be required for full activity of GBSSI because the *sta2-1* mutant allele that leads to the absence of amylose in the corresponding strain completely lacks this 11.4 kDa extension. This increase in activity enabled us to nearly double the amount of polysaccharide in 24 h upon incubation of purified starch granule in the

Table 2. *In vitro* synthesis of amylose. Initial starch (13.9 mg) was subjected to *in vitro* synthesis in the presence of ADP-glucose at 3.2 mM at 30 °C under continuous shaking in a total volume of 52 mL for the following incubation times: *t* = 4, 14 and 24 h. Amylopectin (second column) and amylose (third column) percentages of starch weight were determined after gel filtration chromatography on a Sepharose CL-2B® column of starch dispersed in 10 mM NaOH. Crystallinity levels (last three columns) were measured for total starch submitted to *in vitro* synthesis.

Time of incubation (h) ^a	Total starch (mg)	% Amylopectin	% Amylose	% of A-type crystals (± 5%)	% of B-type crystals (± 5%)	% of total crystallinity (± 3%)
0	13.9	87	13	93	7	42
4	20.6	69	31	67	33	34
14	22.9	59	41	67	33	34
24	22.5	55	45	67	33	32

^a ADP-glucose is known to be unstable at high pH in the presence of MgCl₂ (reviewed in [43]). After 14 h it is expected that most of the substrate would have been either incorporated or hydrolysed.

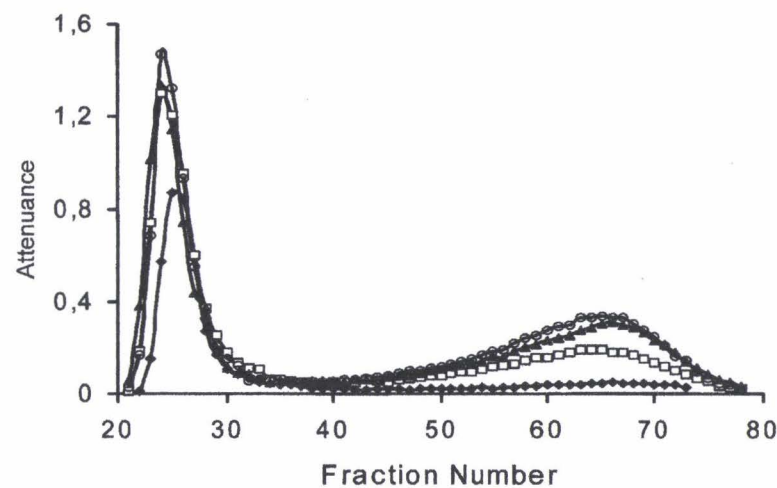


Fig. 6. Gel permeation chromatography of starch samples submitted to *in vitro* incubation in the presence of 3.2 mM ADP-glucose. One milligram of starch has been loaded onto the column and elution is carried out in 10 mM NaOH at a flow rate of 10 mL·h⁻¹. Each fraction represents a volume of 300 µL. Optical density of the iodine-polysaccharide complex was measured at λ_{max}. Elution patterns for t = 0 h (◆), t = 4 h (□), t = 14 h (▲) and t = 24 h (○) are shown.

presence of 3.2 mM ADP-glucose. We have shown previously that the material synthesized in this *in vitro* system is solely under GBSSI control because purified granules with a disrupted GBSSI gene display negligible background levels of enzyme activity (< 0.7% of wild-type activity). This very active semi *in vitro* system gave us a unique opportunity to look at the consequences of amylose synthesis on starch granule organization. Previous studies dealing with this topic relied mostly on the comparison of starches which differed in amylose content owing to mutations affecting the starch pathway [6,22,35]. However most of these mutations equally affected the structure of amylopectin. It was therefore impossible to ascertain how amylose participates in starch granule crystallinity.

In a previous study we demonstrated that this semi *in vitro* system reflects perfectly the *in vivo* synthesis of amylose. Indeed *in vivo* produced amylose is characterized by a typical mass distribution after GPC (gel-permeation chromatography) and by the presence of very short yet abundant branches situated towards the reducing ends of the molecules. The *in vitro* produced amylose cannot be distinguished by any of these criteria from the *in vivo* product. Such a distribution of branches and mass would not be produced in an *in vitro* system that would not perfectly match the *in vivo* conditions. Because GBSSI is known to be the major determinant of amylose synthesis we are confident that the semi *in vitro* system is a good reflection of the *in vivo* situation.

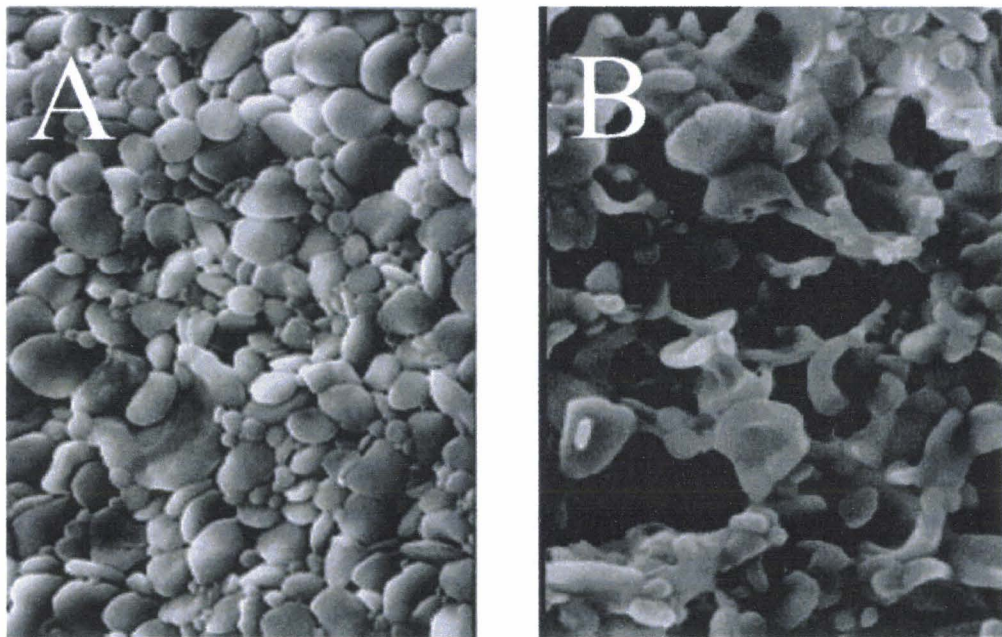


Fig. 7. Scanning electron microscopy of starch granules. (A) Starch granules extracted from the wild-type strain 137C grown in the presence of a nitrogen source in the medium. (B) The same starch-granule preparation subjected to 24 h *in vitro* synthesis in presence of 3.2 mM ADP-glucose. In both panels, bars = 1 µm.

It could still be argued that because the semi *in vitro* system dispenses with those soluble enzymes involved in amylopectin synthesis during granule formation, it therefore does not reflect a natural situation. However it can be seen from the results listed in Table 1 that most, if not all, of the amylose is synthesized *in vivo* when the rate of amylopectin synthesis becomes minimal. At these moments the rates of amylopectin synthesis are only 5% of their maximal values. In fact this low rate of amylopectin polymerization is consistent with what would be expected from the extension of amylopectin outer chains by GBSSI. This suggests that the soluble enzyme machinery responsible for amylopectin synthesis has become inactive. We therefore believe that the contribution of GBSSI to granule organization during our *in vitro* assays reflects that of the *in vivo* situation. This is further confirmed by our previously published observations on soluble starch synthase defective mutants that display strong decreases in the relative amylopectin-to-amylose synthesis ratios [42]. The structure of starch in these mutants closely mimics that obtained in the experiments reported here.

In the absence of amylopectin synthesis we were able to show that GBSSI synthesized predominantly amorphous material as suspected. The A-type crystals that were initially present in the granules during our *in vitro* experiments seemed unconcerned by the ongoing polysaccharide synthesis and their amount within the granule remained constant throughout the experiment. Surprisingly we were able to monitor a significant synthesis of B-type crystals. This synthesis can be explained through two distinct mechanisms. One of these would be through an indirect effect on amorphous amylopectin. The massive synthesis occurring within or around the granule could push pre-existing amorphous amylopectin into the formation of B-type crystals. Another mechanism would consist of crystallization of newly synthesized molecules into B-type material. This could involve only *de novo* synthesized products or a combination of the latter and pre-existing amorphous amylopectin. Whatever mechanism turns out to be at work, amylose must now be considered an important determinant of both B-type starch biogenesis and granule morphology and shape.

REFERENCES

- Robin, J., Mercier, C., Charbonnière, R. & Guilbot, A. (1974) Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.* **51**, 389–406.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. & Ball, S. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 85–112.
- Manners, D.J. (1989) Recent development in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydr. Polym.* **16**, 37–82.
- Preiss, J. & Sivak, M. (1998) Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genet. Eng. (N.Y.)* **20**, 177–223.
- Imberty, A., Buléon, A., Tran, V. & Pérez, S. (1991) Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch/Stärke* **43**, 375–384.
- Jenkins, P., Cameron, R. & Donald, A. (1993) A universal feature in the starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke* **45**, 417–420.
- Nelson, O.E. & Rines, H.W. (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant in maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 297–300.
- de Fekete, M.A.R., Leloir, L.F. & Cardini, C.E. (1960) Mechanism of starch biosynthesis. *Nature* **187**, 918–919.
- Leloir, L.F., De Fekete, M.A.R. & Cardini, C.E. (1961) Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.* **236**, 636–641.
- Recondo, E. & Leloir, L. (1961) Adenosine diphosphate glucose and starch biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 85–88.
- Weatherwax, P. (1922) A rare carbohydrate in waxy maize. *Genetics* **7**, 568–572.
- Murata, T., Sugiyama, T. & Akazawa, T. (1965) Enzymatic mechanism of starch synthesis in glutinous rice grains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 371–376.
- Eriksson, G. (1969) The waxy character. *Hereditas* **63**, 180–204.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S. & Nagamine, T. (1995) Production of waxy (amylose-free) wheats. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 253–259.
- Hovenkamp-Hermelink, J.H.M., Jacobsen, E., Ponstein, A.S., Visser, R.G.F., Vos-Scheperkeuter, G.H., Bijmolt, E.W., de Vries, J.N., Witholt, B. & Feenstra, W.J. (1987) Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* **75**, 217–221.
- Denyer, K., Barber, L.M., Burton, R., Hedley, C., Hylton, C., Johnson, S., Jones, D., Marshall, J., Smith, A., Tatge, H., Tomlinson, K. & Wang, T. (1995) The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Environ.* **18**, 1019–1026.
- Konishi, Y., Nojima, H., Asaoka, M. & Fuwa, H. (1985) Characterization of starch granules from waxy, nonwaxy and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1965–1971.
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszski, J.M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M.L., Fournet, B. & Ball, S. (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**, 3612–3620.
- Ponstein, A.S., Oosterhaven, K., Feenstra, W.J. & Witholt, B. (1991) Starch synthesis in potato tubers: identification of the *in vitro* and the *in vivo* acceptor molecules of soluble starch synthase activity. *Starch/Stärke* **43**, 208–220.
- Baba, T., Yoshii, M. & Kainuma, K. (1987) Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots. *Starch/Stärke* **39**, 52–56.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H. & Smith, A. (1996) The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.* **10**, 1135–1143.
- Maddelein, M.L., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van Den Koornhuyse, N., Fontaine, T., Wieruszski, J.M., Decq, A. & Ball, S.G. (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 25150–25157.
- van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buléon, A., Visser, R. & Ball, S. (1998) Amylose is synthesized *in vitro* by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.* **273**, 22232–22240.
- van de Wal, M. (2000) Amylose biosynthesis in potato: interaction between substrate availability and gbss activity, regulated at the allelic level, PhD Thesis, University of Wageningen, Wageningen, the Netherlands.
- van den Koornhuyse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J. & Ball, S. (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16281–16287.

26. Harris, E.H. (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use* (Harris, E., ed.), Academic Press, San Diego, CA.
27. Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. & Decq, A. (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17–26.
28. Libessart, N., Maddelein, M.L., Van Den Koornhuysse, N., Decq, A., Delrue, B. & Ball, S.G. (1995) Storage, photosynthesis, and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **7**, 1117–1127.
29. Ball, S.G., Dirick, L., Decq, A., Martiat, J.C. & Matagne, R.F. (1990) Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **66**, 1–9.
30. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
31. Zhang, H., Herman, P. & Weeks, D. (1994) Gene isolation through genomic complementation using an indexed library of *Chlamydomonas reinhardtii* DNA. *Plant Mol. Biol.* **24**, 663–672.
32. Adam, M. & Loppes, R. (1998) Use of the *ARG7* gene as an insertional mutagen to clone *PHON24*, a gene required for derepressible neutral phosphatase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **258**, 123–132.
33. Kindle, K., Schnell, R., Fernandez, E. & Lefebvre, P. (1989) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.* **109**, 2589–2601.
34. Rochaix, J.D., Mayfield, S., Goldschmidt-Clermont, M. & Erickson, J. (1991) Molecular biology of *Chlamydomonas*. In *Plant Molecular Biology: a Practical Approach*. (Shaw, C., ed.), pp. 253–275. IRL Press, Oxford, UK.
35. Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J. & Ball, S. (1997) Starches from A to C. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **115**, 949–957.
36. Wakelin, J.H., Virgin, H.S. & Crystal, E. (1959) Development and comparison of two X-ray methods for determining the crystallinity of cotton cellulose. *J. Appl. Phys.* **30**, 1654–1662.
37. Abel, G., Springer, F., Willmitzer, L. & Kossmann, J. (1996) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **10**, 981–991.
38. Blankenship, J.E. & Kindle, K.L. (1992) Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. A *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1-nit2* strain. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5268–5279.
39. Quinn, J., Li, H.H., Singer, J., Morimoto, B., Mets, L., Kindle, K. & Merchant, S. (1993) The plastocyanin-deficient phenotype of *Chlamydomonas* ac-208 results from a frame-shift mutation in the nuclear gene encoding preapoplastocyanin. *J. Biol. Chem.* **268**, 7832–7841.
40. Davies, J.P., Yildiz, F. & Grossman, A.R. (1994) Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. *Plant Cell* **6**, 53–63.
41. Shannon, J.C. & Garwood, D.L. (1984) Genetics and physiology of starch development. In *Starch: Chemistry and Technology*, 2nd edn (Whistler, R.L., Bemiller, J.N. & Paschall, E.F., eds), pp. 25–86. Academic Press, Orlando.
42. Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wierszeski, J.M., Delrue, B., Van Den Koornhuysse, N., Bossu, J.P., Fournet, B. & Ball, S.G. (1993) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268**, 16223–16230.
43. Baroja-Fernandez, E., Munoz, F.J., Akazawa, T. & Pozueta-Romero, J. (2001) Reappraisal of the currently prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: a proposal involving the cytosolic production of ADP-glucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in the chloroplast. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1311–1320.

III. Article II:

STAl1 a *Chlamydomonas* locus required
for normal starch granule biogenesis
encodes disproportionating enzyme:
further evidence for a function of α -1,4
glucanotransferases during starch granule
biosynthesis in green algae.

Résumé

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la présence d'une mutation au locus *STAlI* a pour conséquence l'accumulation réduite d'un amidon présentant d'importantes modifications de forme et de structure. Cette défectuosité s'accompagne dans le même temps d'une accumulation de malto-oligosaccharides linéaires. Les mutants au locus *STAlI* sont caractérisés par l'absence de l'enzyme D, une α -1,4 glucanotransférase végétale analogue à l'amyloamylase d'*E. coli*. Les ADNc et ADNg correspondant à l'enzyme D de *Chlamydomonas* ont été clonés et caractérisés. Nous présentons ici la découverte, dans les mutants *stAlI*, de modifications allèles spécifiques du gène de l'enzyme D coségrégant avec les mutations *stAlI* démontrant de ce fait que le locus *STAlI* encode l'enzyme D. La production de malto-oligosaccharides et l'accumulation d'amidon ont été suivies sur des souches de *Chlamydomonas* sauvages et mutantes cultivées en cycles jours / nuits. Nous avons ainsi démontré que, dans l'algue, les malto-oligosaccharides sont produits lors des phases synthèse d'amidon et dégradés lors des phases de catabolisme du polysaccharide.

STAI1 a *Chlamydomonas* locus required for normal starch granule biogenesis encodes disproportionating enzyme: further evidence for a function of α -1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae.

Fabrice Wattebled§, Jean-Philippe Ral§, David Dauvillée§, Alan Myers¶, Martha James¶, Ralf Schlichting‡, Christoph Giersch‡, Steven Ball§ and Christophe D'Hulst§*.

§ Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche CNRS / UST-Lille n°8576, USC de l'INRA, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 VILLENEUVE D'ASCQ Cedex, FRANCE.

¶ Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, Iowa 50011, USA

‡ Institut fuer Botanik, Technische Universität, D-64287 Darmstadt, GERMANY

* : To whom correspondence should be addressed

E-Mail : christophe.dhulst@univ-lille1.fr

Fax : + 33.3.20.43.65.55

1. Phone : + 33.3.20.43.48.81

Others authors e-mail addresses:

fabrice.wattebled@univ-lille1.fr; jean-philippe.ral@univ-lille1.fr; david.dauvillee@univ-lille1.fr; ammyers@iastate.edu; mgjames@iastate.edu; schlichting@bio.tu-darmstadt.de; giersch@bio.tu-darmstadt.de; steven.ball@univ-lille1.fr

Running title: α -1,4 glucanotransferase mutants of *Chlamydomonas*

Key-words: starch / D-enzyme / *Chlamydomonas reinhardtii* / *STAI1*

8 figures, 1 table, 6298 words

SUMMARY

In *Chlamydomonas reinhardtii*, the presence of a defective *STAl1* locus results in significantly reduced granular starch deposition displaying major modifications in shape and structure. This defect simultaneously leads to the accumulation of linear malto-oligosaccharides. The mutants of *STAl1* were showed to lack D-enzyme, a plant α -1,4 glucanotransferase analogous to the *E. coli* amylomaltase. We have cloned and characterized both the cDNA and gDNA corresponding to the *Chlamydomonas* D-enzyme. We now report allele specific modifications of the D-enzyme gene in the mutants of *STAl1*. These allele specific modifications cosegregate with the corresponding *stall* mutations, thereby demonstrating that *STAl1* encodes D-enzyme. Malto-oligosaccharides production and starch accumulation were investigated during day and night cycles in wild type and mutant *Chlamydomonas* cells. We demonstrate that in the algae malto-oligosaccharides are produced during starch biosynthesis and degraded during the phases of net polysaccharide catabolism.

INTRODUCTION

Until recently plant starch was believed to be synthesized from ADP-glucose solely through a combination of starch synthases and branching enzymes. However the finding of low starch or starchless mutants defective for a particular form of debranching enzyme in four different plant systems established that other enzymes of starch metabolism are equally important in ensuring normal starch granule biogenesis (James *et al.*, 1995, Mouille *et al.*, 1996, Nakamura *et al.*, 1996, Zeeman *et al.*, 1998b). This came as a surprise as debranching enzymes were initially thought to be enzymes involved solely in starch breakdown. Indeed mutants of the corresponding activities in yeast (Teste *et al.*, 2000) or *E. coli* (Kinderf *et al.*, 2002) are clear glycogen over producers confirming the initial suspicion. Although the detailed interpretation of the results obtained with the plant mutants vary somewhat, there is now a general agreement that isoamylases, the particular form of debranching enzyme affected in these studies, are enzymes required during starch biosynthesis exclusively. It has been comforting to realize that all mutants affected in starch metabolism behaved in a similar fashion in plants as different as *Chlamydomonas*, *Arabidopsis*, pea, maize or rice. Some discrepancies in expressivity of mutant phenotypes could be most of the times easily explained by subtle differences in the pathways. For instance the presence of extraplastidial and plastidial ADP-glucose pyrophosphorylases in cereals easily explains why mutants of cereals lacking the major enzyme form displayed reduced expressivity in their starch accumulation phenotype (for review see Kossmann and Lloyd, 2000). Indeed the starch accumulation phenotypes of the *Arabidopsis* or *Chlamydomonas* mutants defective for the catalytic subunit of their sole plastidial ADP-glucose pyrophosphorylase were much more severe (Lin *et al.*, 1988, Zabawinski *et al.*, 2001).

At variance with animals and fungi, plants including *Chlamydomonas reinhardtii* have retained the bacterial pathway of malto-oligosaccharide assimilation in the plastid stroma. Mutants of the plant D-enzyme (the equivalent of the *E. coli* *MalQ* encoded amylomaltase) display a strong phenotype on starch metabolism (Zeeman *et al.*, 1998a). D-enzyme is an α -1,4 glucanotransferase that transfers mostly maltosyl residues from a donor oligosaccharide to the non-reducing end of an acceptor. The donor and acceptor molecules can be glucans of identical length. D-enzyme thus disproportionates a homogenous population into a series of oligosaccharides of increasing length (Jones and Whelan, 1969,

Peat *et al.*, 1956). The first mutants defective for D-enzyme were reported in *Chlamydomonas* and synthesized ten-fold less starch while displaying modifications in starch structure and amylose content (Colleoni *et al.*, 1999a and b). This correlated with an accumulation of unbranched soluble malto-oligosaccharides in the plastid stroma. An equivalent mutant of *Arabidopsis* also accumulated MOS and high amylose starch but did not display any consistent decrease in starch accumulation (Zeeman *et al.*, 1998a). On the contrary, the *Arabidopsis* leaf contained more starch at the end of the night than the wild-type reference, suggesting a function of D-enzyme in polysaccharide breakdown (Critchley *et al.*, 2001). In addition accumulation of MOS seemed confined to the dark phase. This is the first time that such conflicting behaviors between mutants of starch metabolism are reported. Indeed the results obtained in *Chlamydomonas* suggest an important function of D-enzyme in starch biosynthesis while those of *Arabidopsis* point to a role in starch breakdown only. The *Chlamydomonas* mutant was obtained during a classical screen for low starch phenotypes after UV mutagenesis (Colleoni *et al.*, 1999a) while the *Arabidopsis* mutants were obtained as gene disruptions after screening a T-DNA library of *Arabidopsis* for an insertion in a particular D-enzyme sequence (Zeeman *et al.*, 1998a). Several issues require clarification before any further speculation is made on the functions of D-enzyme in plants. It is indeed still unclear that the *Chlamydomonas STALL* locus defines the structural gene encoding the same type of D-enzyme activity as in *Arabidopsis*. If so it remains possible that the UV generated *stall-1* did not generate a true null mutant allele and that the phenotype would be different with a gene disruption at the *STALL* locus. Finally the low starch phenotype in *Chlamydomonas* was recorded under nitrogen starvation, which defines culture conditions that mimic the constant accumulation of starch occurring in storage organs. On the other hand the *Arabidopsis* phenotype was investigated in leaves cells undergoing recurrent cycles of synthesis and degradation. Therefore additional documentation of the defects occurring in the *stall* mutants of *Chlamydomonas* was needed before any further speculation is made on the function of α -1,4 glucanotransferases in starch metabolism. We now report the molecular characterization of the *STALL* locus and mutants. We prove that *STALL* defines the structural gene of a form D-enzyme analogous to that analyzed in *Arabidopsis*. We report the isolation of a gene disruption at the *STALL* locus and have investigated the behavior of the D-enzyme mutants following recurrent cycles of synthesis and degradation. We show that the MOS are produced mainly during the phases of active starch biosynthesis and degraded during

polysaccharide catabolism. These results confirm an important function of α -1,4 glucanotransferases during the normal process of starch biosynthesis in green algae. The possible reasons underlying the conflicting results obtained in *Chlamydomonas* and *Arabidopsis* are discussed.

RESULTS

*Isolation of *stall-2* allele* - During the first of our two large-scale campaigns of insertional mutagenesis (see materials and methods) we isolated one particular low starch mutant that accumulated unbranched malto-oligosaccharides (Fig. 1). Because of this phenotype, we immediately set out to assay D-enzyme activity and perform complementation tests with the previously defined *stall-1* UV-generated mutant (Colleoni *et al.*, 1999a and b). As expected the mutant contained no trace of D-enzyme activity and did not complement the previously characterized *stall-1* mutants in diploids.

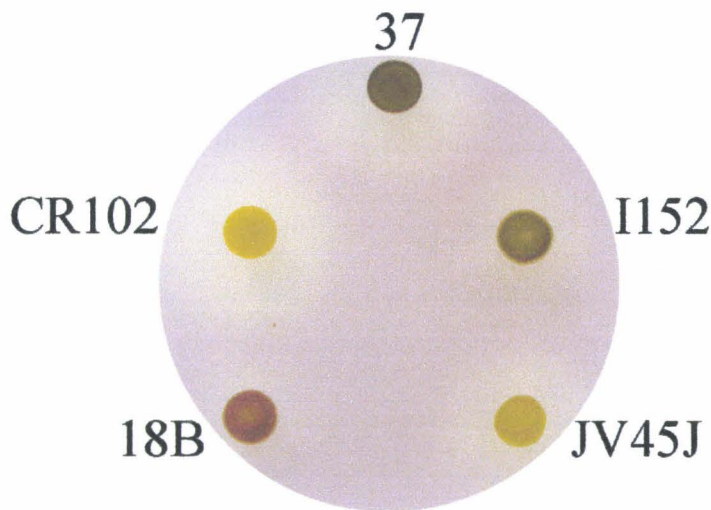


Figure 1: Wild type and mutant iodine-staining phenotypes. Strain 37 corresponds to the wild type reference use in this work. Strains 18B (*sta2-1*) and I152 (*sta3-1*) are defective for GBSSI and SSIII-like soluble starch synthase, respectively (Delrue *et al.*, 1992, Fontaine *et al.*, 1993). Both JV45J (*stall-1*) and CR102 (*stall-2*) are defective for D-enzyme activity. Mutations at *STAI1* locus in JV45J and CR102 have been generated after UV and insertional mutagenesis respectively. Cells patches were incubated 5 days on solid nitrogen-deprived medium and subsequently stained by iodine vapors.

A set of meiotic recombinants carrying the new *stall-2::ARG7* mutation were obtained upon crossing with a wild-type reference strain. A set of three *stall-1* and three *stall-2::ARG7* segregants were compared with respect to starch and soluble glucans accumulation. In addition a more detailed investigation of the structure of both starch and glucans was performed on strain CR102 and compared to the reference JV45J *stall-1* mutant strain.

Table 1 : Phenotypes of 137C (wild-type), JV45J (*stall-1*) and CR102 (*stall-2*) strains during storage starch synthesis.

	Starch ^a (µg per million cells)	MOS ^b (µg per million cells)	λ _{max} ^c of Amylopectin (nm)	Amylopectin ^d	Amylose ^d
137C (wt)	20.1	0.012	552	82	18
JV45J (<i>stall-1</i>)	2.3	0.46	562	78.7	21.3
CR102 (<i>stall-2</i>)	0.4	1.15	568	71.8	28.2

^a Amounts of insoluble polysaccharide purified through sedimentation and ^b amount of soluble malto-oligosaccharides as measured by the standard amyloglucosidase assay. ^c Wavelength at the maximal absorbance of the iodine-polysaccharide complex of amylopectin purified by gel filtration chromatography on Sepharose CL-2B column. ^d The percentage of each fraction of starch was calculated after gel filtration on Sepharose CL-2B column of the dispersed polysaccharides.

The results summarized in Table I suggest that the *stall-2::ARG7* mutation displays a phenotype very similar to that of the previously characterized *stall-1* carrying mutants with a somewhat increased expressivity. Indeed during crosses (n=8) the *stall-2* mutants always accumulated less than 5% of the wild-type starch amount while the *stall-1* mutants could accumulate up to 12 % of that amount. This correlated with a significant increase in MOS production in the *stall-2::ARG7* mutants. In addition the chain-length distribution of the amylopectin from both the *stall-1* and *stall-2::ARG7* were significantly modified. Using FACE (Fluorophore Assisted Capillary Electrophoresis) we had previously documented a small but significant difference in the chain-length distribution of the wild type and mutant (*stall-1*) amylopectin (Colleoni *et al.*, 1999a). Using HPAED-PAD (Fig. 2) we confirm these differences and demonstrate that the presence of *stall-2::ARG7* leads to an exacerbation of the phenotype. The strains carrying the gene disruption display a more dramatic relative increase of chains of DP 12 to 16 and similar modification of the very small glucans (DP3 to 6). Here again the expressivity of the *stall-2::ARG7* mutant phenotype is significantly increased.

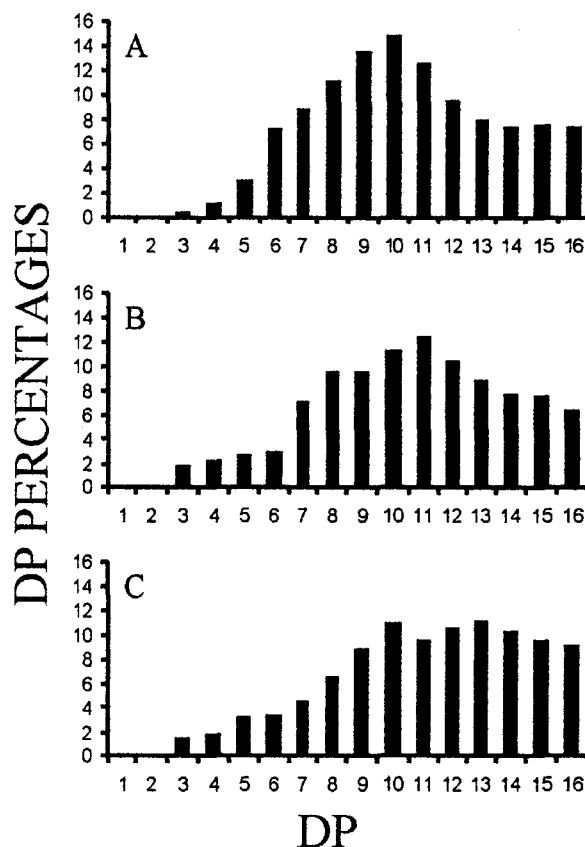


Figure 2: Chain-length distributions of the two *stall* allelic mutants and the wild-type reference strain. Isoamylase-debranched chains were analyzed by HPAED-PAD. Percentages of chains ranging between DP1 to 16 (chains containing 1 to 16 glucose residues) are scaled on the y axis. Panel A: debranched chains of purified amylopectin from our “waxy” reference strain BAFR1 (*sta2-29::ARG7*). Panel B: debranched chains of gel permeation chromatography-purified amylopectin from the mutant JV45J (*stall-1*). Panel C: debranched chains of gel permeation chromatography purified amylopectin from the mutant CR102 (*stall-2*).

Cloning and characterization of a Chlamydomonas cDNA homologous to vascular plants

D-enzymes - Alignment of known D-enzyme protein sequences revealed three blocks (regions I to III, Fig. 3) of highly conserved amino-acid sequences between enzymes as distantly related as those of *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium butyricum*, *Solanum tuberosum* and *Borrelia burgdorferi*. We used degenerated oligonucleotide primers to amplify by PCR from genomic DNA a 1564 bp sequence with homology to vascular plant sequences. We then used this as a probe to fish out a 2071 bp cDNA lacking the 133 bp of 5' sequence that were subsequently obtained by RACE PCR to yield the full cDNA sequence. The complete protein sequence is displayed in Fig. 3 and was compared to the *E. coli* *MalQ* amylomaltase, the *Synechocystis* α -1,4 glucanotransferase, the potato tuber D-enzyme and the leaf expressed D-enzyme sequence of *Arabidopsis*.


```

1 -----MKKR S. pneumoniae
1 -----C. butyricum
1 ---MAIHTCFLSPSSFPKLPYPKNTTFQSP--IPKLSRPTFMFDRKGSFQNGT--AAVPAVGEDFPIDYADWLPKRPDNDRR S. tuberosum
1 -----MKYKKTRINLNLR B. burgdorferi
1 MIPLRAPQGVRYTQQIDRSQQVLPLQLRSRAPQSVSHVAAGSRRASRRSVRAFAWGTPKTTGPAPGEVLGKDYDQKIP--SYNKG R. reinhardtii

I
5 QSGVLMHISSLPGAYGIGSFGQSAYDFVDFLVRTKQRYWQILPLGATSYG---DSPYQSFSFAFAGNTHFIDLDILVEQGLLEASD S. pneumoniae
1 ----MHISSLPGKYGIGTFGRSAYEFCDLFLEKAGQKYWQILPLGQTSYG---DSPYQSFSFAFAGNPYFIDLDILNEKNLLDKDD C. butyricum
79 RAGILLHPTSFPGPYGIGDLGPQAFKFLDWLHLAGCSLWQVLPLVPPGKRGNEGSPYSGQDANCNTLLISLEELVDDGLLKME S. tuberosum
15 KSGILLNISLPSKYGIGDLGKAYKFDLFLASSQSYWQMFAYSPIDFTR---SPYSIFSFAFAGNVYYIDLEALDKFIDSDL B. burgdorferi
85 RAGILLHPTSLPGPYGIGDIGDEAKRFVDWLADHGMQWQLLPLVPPDP---MYSPYSGTDANCGNPLVVSIEELIKDGLLEFSE C. reinhardtii

87 LEGVDFGSDASEVDYAKIYYARRPILLEKAVKRFEEVG-D--VKDFEKAQD--NQSWLELFAEYMAIKEY---FDNLAWTEWPDAD S. pneumoniae
78 YEEKNFGDNKEMINYGLIFNEKMKVLRKAYMNFNSK--D--DESAKFIED--EKKWLDDYSLFMALKYK---FNFIWSNSW-NKD C. butyricum
165 LPEP---LPTDRVNYSTISEIKDPLITKAARLLSSE-GELKDQLENFRDRPNISSWLEDAAYFAAIDNS---VNTISWYDW-PEP S. tuberosum
98 LKEN---ETRYSDLLKIS-FKDKFLKEAALNFNINRASADEVRSFEKFKK---SSYWLDFASFVAPKEYFFKESKNAFNVLFDRG B. burgdorferi
168 TPRP---VPIADVDPAVAACKPLLRKAAQRLK-E-DRFTRLREYLYKRKEHPWVEDSALFDVARNLPE-LSQLAWWQW-PEP C. reinhardtii

165 ARARKASALESYREQLADKLVIYHRVTQYFFQWQLKLKAYANDNHIEIVGDMPIYVAEDSSDMWANPHLKTVDNG-KATCIAGCP S. pneumoniae
154 IKLRNNEIEKYKDELKEDVNYWKLQYEFFSQWKNLKYANKNKIIGIDPIYIAQSSDVWSNPDI FLLNKETLEPLKVGSCP C. butyricum
243 LKNRHLAALAEVYQSEKDFIDIFIAQQFLFQRQWKKVRDYARSKGISIMGDMPIYVGYSADVWANKQFLLNRKG-FPLIVSGVP S. tuberosum
177 ILKRNEKDLFKLRNLSKEIKVQEVLYQYFFSQFQALKRYANDKGIELIMNVFFIAYDSADVWAYQYFKLRFDA-SKDKIAGIS B. burgdorferi
247 LRLRQKEALKEFRETNKDAIDEFVVIQYFFQWKAIRSANGKIGIKLIGDMPIYVGHSADVWANRHLFELNEAG-LPEQVSGVP C. reinhardtii

II
250 PDEFSVTGQLWGNPIYDWEAMDKGKWWIERLESFKIYDIVRIDHFRGFESYWEIPAGSDTAAPGEWVKGPYKLFAAVKEELG S. pneumoniae
240 PDAFSETGQLWGNPIYDWGYLEKTFEWWVDRIKSSLKLYDILRIDHFRGFESYWEIPAGSDTAAPGEWVKGPYKLFVNIKEKIG C. butyricum
240 PDAFSETGQLWGNPIYDWGYLEKTFEWWVDRIKSSLKLYDILRIDHFRGFESYWEIPAGSDTAAPGEWVKGPYKLFVNIKEKIG S. tuberosum
262 PDYFLEQEQAWDSAAYSWNVLKFKYEWAKRIGVLRKYADIIKIDHFRGFESYWEIPAGSDTAAPGEWVKGPYKLFVNIKEKIG B. burgdorferi
332 PDAFSATGQLWGSPLYKWPAAHKEGFKWWTARMARTLELYDECRIDHFRGFESYWEIPAGSDTAAPGEWVKGPYKLFVNIKEKIG C. reinhardtii

III
336 ELNIIAEDLGFMTEDEVIELRERTGFPGMKILQFAFNPEDESIDSPHLAPANSVMYTGTHDNTVLGWYRNEIDDATREYMARYTNR S. pneumoniae
326 DIEIIAEDLGYLETELEFKKRTGFPGMKIIQFAFGGSSNPYLPHNYEKNCVAYTGTHDNTVRGWFEVTGSKEEKEKAVEYFKL C. butyricum
414 KINI AEDLGVITEDVQLRKSIEAPGMAVLQFAFGSDAENPHLPHNEQNVVYTGTHDNTIRGWDTLPQEEKSNVLKYLNS- S. tuberosum
348 DLKIWVEDFQNDLEDVSRRLRDFNFPGMKIMNLAFDFDSSNQNLPHNYIKNCIVYTGSGDNDTIREFIN-SLDDLHKYIFDYLN- B. burgdorferi
418 AVPIAEDLGVITTDVVALREAGPMMVVLQFAGGGGPGNVHLPHNHYENCFVYPTGTHDNETAVGWFRGSANDTKSYIKSYLR- C. reinhardtii

422 KEYETVVHMLRTVFSSVSFMAIATMQDLELDEAARMNFPSTLGGNWSWRMTEDQLTPAVEEGLDLTTIYRRINENLVDLKK S. pneumoniae
412 TEEEGYNWGVIRGVWSSVANTSIGVMQDFLNLGNEARINKPSTLASNWSWRAKDNVFTNELANKIYRLTRIYGRCE C. butyricum
499 IEEEEISRGLIEGAVSSVARIAIIPMQDVLGLGSDSRMNI PATQFGNWSWRIPSTSFNDLDAEAKLRDILATYGR L S. tuberosum
432 TNENFVWDMIRSAMGSSVDNVI VSMQDYINLGDKFSANI PKSTLDNCIFRLLEDLDATLSQNISFITRLYGRA B. burgdorferi
503 TDGGDIADWDFIRACMAAVERPCVIMMQDVMRLDNTARMNTPGTAAGNWRWRMGDNVWNSLKKEGEDLRKVAHDTNRLPKPKA C. reinhardtii

```

Figure 3: Sequences comparison of α -1,4 glucanotransferases from different organisms. *Chlamydomonas reinhardtii* D-enzyme sequence (AAG29840) was compared to those from *Streptococcus pneumoniae* (NP_346528), *Clostridium butyricum* (Q59266), *Solanum tuberosum* (QO6801), *Borrelia burgdorferi* (NP_212300). Highlighted boxes display conserved regions used for oligonucleotide primers design. Alignment was constructed using the ClustalW method with the PAM250 residue weight table. The amino acid (G) indicated in bold within region I of *Chlamydomonas* D-enzyme sequence is modified to a cysteine residue in the *sta11-1* mutant allele.

A phylogenetic tree of selected α -1,4 glucanotransferases was built (Fig. 4) showing once again that the *Chlamydomonas* enzyme sequence could be placed as an intermediate between cyanobacteria and vascular plants. In addition to this, we selected a set of two distinct cosmids covering the entire gDNA corresponding to the *STA11* gene (see materials and methods). The organization of the *STA11* gene is displayed in Fig. 5.

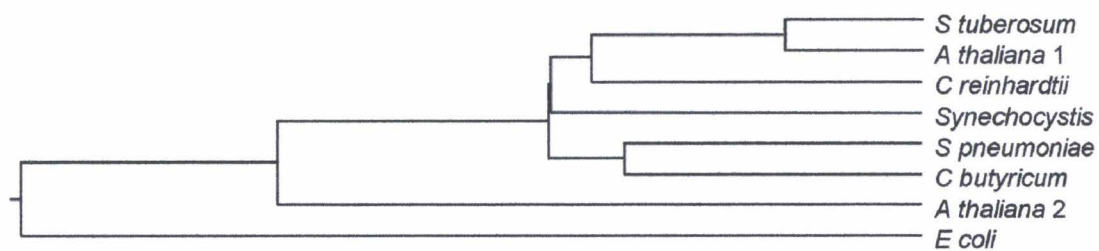


Figure 4: Phylogenetic tree of selected α -1,4 glucanotransferases. Accession numbers (from top to bottom) are as follow: NP_346526, Q59266, NP_440120, QO6801, NP_201291, AAG29839, NP_417875, AAL91204, NP_181616. This phylogenetic tree was built using the Clustal W method with the PAM250 residue weight table.

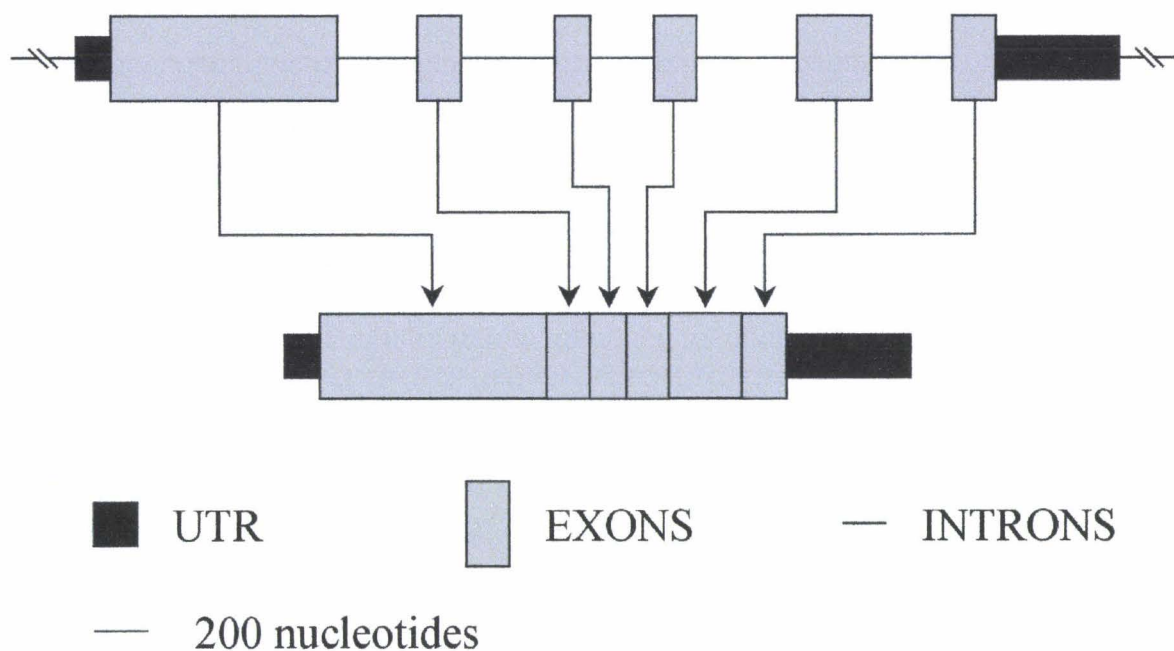


Figure 5: Intron / Exon organization of *Chlamydomonas* α -1,4 glucanotransferase gene. Genbank accession number: AF307843.

*Molecular characterization of *sta11-2::ARG7** - Because insertional mutagenesis in *Chlamydomonas* is known to lead to local rearrangements and deletions of genomic DNA that are easy to detect, we used the D-enzyme cDNA as a probe in Southern blots of wild-type and mutant recombinants of *sta11-2::ARG7*. The results exemplified in Fig. 6A show co-segregation of a RFLP evidenced with the D-enzyme probe and the *sta11-2::ARG7* mutation. The D-enzyme transcript levels while low in *sta11-1* carrying mutant could be detected both in Northern-blot analysis (data not shown) and in RT-PCR experiments (Fig. 6B). On the contrary, the *sta11-2::ARG7* mutants contained no detectable transcripts corresponding to D-enzyme while mRNAs encoding D-enzyme could be routinely found in *sta11-1* mutants with levels similar to those found in wild-type strains (Fig. 6B). These results confirmed *sta11-2::ARG7* as a *bona fide* null mutant.

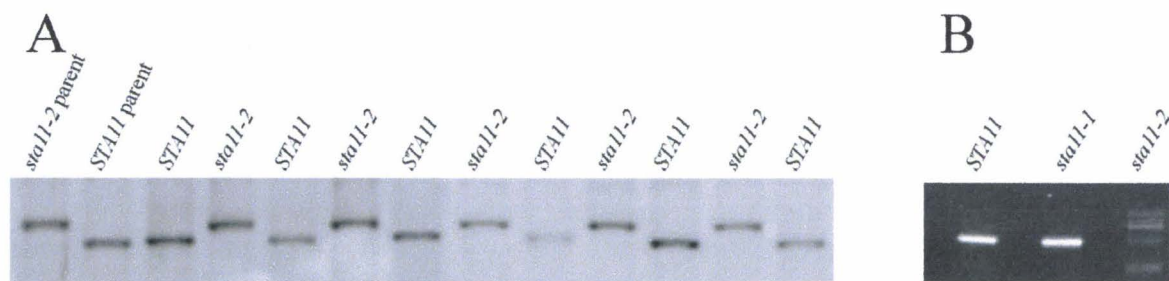


Figure 6: Panel A shows RFLP analysis from *sta11-2::ARG7* (indicated as *sta11-2*) mutant and wild type strains. Molecular hybridization has been carried out using as a probe a 1,5 kb corresponding to a internal region of the α -1,4 glucanotransferase gene. Panel B represents a 0,8% agarose gel loaded with RT-PCR products from a reaction performed with specific primers corresponding to the 3' end of the D-enzyme mature transcript (see materials and methods for more details).

*Molecular characterization of *sta11-1** - When we set out to amplify the *sta11-1* cDNA by using the same set of degenerated primers as those that enabled us to clone our wild-type probe we systematically met with failure. However the mRNA's presence was suggested by the use of other primers corresponding to the *Chlamydomonas* sequence. We then sequenced the whole mutant *sta11-1* cDNA and found only one consistent change in the middle of the conserved region I, thereby explaining our failure to amplify cDNAs by using oligonucleotide primers corresponding to this region of the gene. We then sequenced this region in a total of five wild type and five *sta11-1* mutants and found the modified sequence to co-segregate with the mutant allele. This co-segregation analysis was completed by an additional round of PCR performing directly on gDNA, using the

degenerated primers corresponding to region I and II on eight wild type and six mutant progeny. The sequence modification consisted of change of a GGC codon specifying glycine to a TGC codon specifying cysteine at the level of the last glycine of region I (highlighted in Fig. 3)

Analysis of enzyme activity and corresponding mRNA levels during recurrent starch synthesis and degradation - To approach the conditions used during the analysis of the Arabidopsis mutants we subjected Chlamydomonas to a 12h day 12h night cycle of growth in nitrogen supplied and CO₂ enriched or acetate supplied environment. These optimal conditions ensure that Chlamydomonas will not be restricted for growth. The enzyme activity levels were assayed while the relative mRNA abundance was estimated by semi-quantitative RT-PCR experiments (data not shown). No major oscillations of mRNA abundance were witnessed at the experiment's level of detection (twofold) that could be compared with those that we previously evidenced for the small subunit of the Chlamydomonas ADP-Glucose pyrophosphorylase (data not shown) (Zabawinski *et al.*, 2001). The enzyme assays afforded for more precise measurements that revealed a small but significant increase of D-enzyme activity in darkness (Fig. 7).

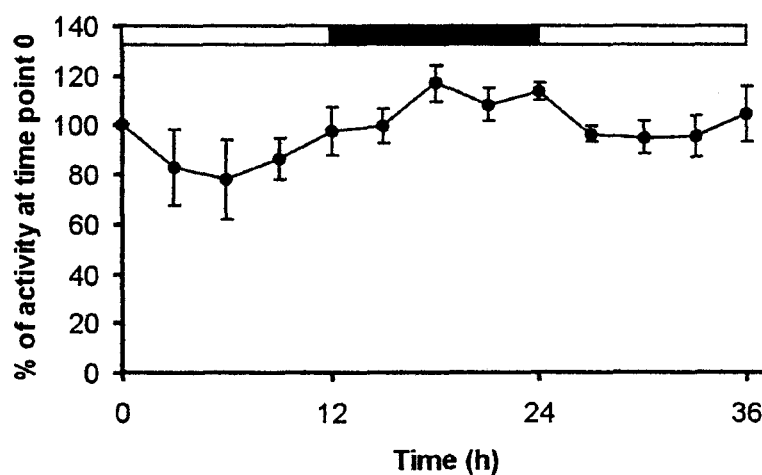


Figure 7: D-enzyme activity (●) measured on wild type cells grown under 12h day 12h night cycle with 4% CO₂ constant bubbling. The results displayed are the mean ± standard deviations of four distinct and independent experiments. The results were compared by taking T=0 measure as an arbitrary standard (assigned value of 100%).

Analysis of starch and malto-oligosaccharide contents - We followed starch and malto-oligosaccharide accumulation in two *stall-1* mutants and two wild-type recombinants for 36 hours as detailed in materials and methods. According to the pre-culture used and the particular strain under study, the time of minimal starch and MOS content varied somewhat (± 3 h). However the results were all essentially the same with the minimal starch content being obtained most often in the middle of the light phase as was previously reported (Mérida *et al.*, 1999) and the maximal starch content being always reached at the light to dark transition (Fig. 8A and 8B). Most importantly all *stall-1* mutants MOS behaved similarly and followed closely the starch accumulation curves being degraded at the time of starch breakdown and produced at the time of polysaccharide synthesis.

DISCUSSION

α -1,4 glucanotransferases were recently shown to define important components of starch metabolism in *Arabidopsis* and *Chlamydomonas* (Colleoni *et al.*, 1999a and b, Critchley *et al.*, 2001). Both mutants accumulated malto-oligosaccharides and high amylose starch when defective for D-enzyme activity. However the levels of starch in the *Arabidopsis* mutant were either equivalent or higher than those displayed by the wild-type reference while in the *Chlamydomonas* mutants, starch levels were as severely reduced as in strains defective for the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase (Van den Koornhuyse *et al.*, 1996). These vastly different phenotypes argued that in *Chlamydomonas*, D-enzyme is required in the normal process of starch biosynthesis while in *Arabidopsis*, it appears that the same enzyme activity is required for starch degradation only. In an attempt to resolve these contradictions we undertook a detailed molecular characterization of the *stall* mutants of *Chlamydomonas*. The multiplicity of enzyme forms in plants is such that it remained possible that the enzyme defective in both systems belonged to different families in a fashion reminiscent of the debranching enzymes of the isoamylase or pullulanase type. Indeed both forms of debranching enzyme catalyze the same biochemical reaction but isoamylase was shown to be selectively involved in amylopectin synthesis while pullulanase is suspected to be active in starch degradation. Because two different kinds of α -1,4 glucanotransferases are known to occur in *Arabidopsis*, it was of paramount importance to better define the nature of the missing enzyme activity in *Chlamydomonas*. It is now clear that the D-enzyme of *Chlamydomonas* is more related to the *Arabidopsis* chromosome V form of α -1,4 glucanotransferase and to the previously characterized potato D-enzyme than to that of the *Arabidopsis* chromosome II. Yet it is the chromosome V form of α -1,4 glucanotransferase which is missing in the *Arabidopsis* mutant. Because only one kind of α -1,4 glucanotransferase is presently documented in the extensive EST data gathered for *Chlamydomonas* (more than 110,000 EST are currently available for *Chlamydomonas*), it still remains possible that α -1,4 glucanotransferases sequences have been duplicated during evolution of vascular plants and that different forms of enzymes have acquired specialized anabolic or catabolic functions. Another possible explanation for the conflicting results obtained in *Arabidopsis* and *Chlamydomonas* could come from the different molecular nature of the mutations under investigation. Indeed the *Arabidopsis* mutant carries a T-DNA insertion essentially

inactivating the gene while the *Chlamydomonas* UV generated mutant is now shown to consist of a single amino-acid change in an otherwise intact protein. It is thus possible that the very nature of these different mutations could explain the observed phenotypic contradictions. However, the report we now make of a gene disruption of the *Chlamydomonas STAI1* gene disproves this. Indeed the absence of D-enzyme mRNA and protein in *Chlamydomonas* correlates with a further decrease in starch amount to less than 3% of the wild-type amount, an observation that is very hard to reconcile with an absence of direct or indirect function of D-enzyme in the normal process of starch biosynthesis. The increased phenotypic expressivity of the *stai1-2::ARG7* gene disruption was also evidenced on the chain-length distribution of amylopectin. This modification can be explained either through a direct function of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis as suggested in (Colleoni *et al.*, 1999b) or by an indirect effect through the lowering of the ADP-glucose concentration. Such a substrate concentration decrease is indeed expected if the function of D-enzyme is to harvest efficiently the energy contained in the glucans released by isoamylase by assisting the release of G1P through starch phosphorylase. Indeed, the modified chain-length distribution witnessed here is very similar to that evidenced on the amylopectin of the low starch mutants defective for either phosphoglucomutase or the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase (Van den Koornhuysen *et al.*, 1996). Future characterization of the phenotypes witnessed in both *Arabidopsis* and *Chlamydomonas* should therefore focus on metabolic profiling of the mutant and wild-type strains.

In a final attempt to resolve the contradictions observed between the *Arabidopsis* and *Chlamydomonas* mutants we have investigated the phenotype of the algal mutants in physiological conditions that are closer to those of the *Arabidopsis* leaf, which defines a typical plant “source” tissue. Our previous report concerned nitrogen starved culture where starch accumulates to very high levels and adopts a structure similar to that of storage starch which is synthesized in the plant “sink” reserve tissues (the kernel endosperm, the tuber, the seed embryo...). During nitrogen starvation the *Chlamydomonas* cell becomes progressively non photosynthetic. It was therefore possible that if starch turnover occurs in these conditions the energy losses occasioned by the presence of futile cycles would not be compensated by photophosphorylation. The fact that preamylopectin processing during biosynthesis is expected to release malto-oligosaccharides through the action of isoamylases, may explain why inefficient MOS metabolism may trigger a collapse of

polysaccharide synthesis under nitrogen starvation. We therefore have investigated the behavior of the *stall* mutants in nitrogen supplied medium and growing in log phase in the presence of a 12 hour light and 12 hour dark cycles. The experiments detailed in this work prove that the ATP supplied through photosynthesis does not bypass the requirement for D-enzyme activity during biosynthesis. Most importantly the malto-oligosaccharides accumulated at the time of starch biosynthesis and were degraded at the time of starch breakdown, a result that is in clear contradiction with the situation documented in *Arabidopsis*. It must be stressed that the *Chlamydomonas* system presents important differences with respect to the mature *Arabidopsis* leaf cell. Among these differences, the cell cycle remains active in the algae. Together with the ticking of the circadian clock, this may be responsible for the very different timing of starch biosynthesis and degradation observed in *Chlamydomonas*. This may however not be a unique property of algae since other vascular plant leaf tissues are also known to anticipate the arrival of darkness and trigger starch degradation in the light (Li *et al.*, 1992, Mérida *et al.*, 1999).

It is now apparent that different species of plants as well as different tissues of a same plant harbor very different levels of enzyme activities of starch and malto-oligosaccharide metabolism. This remains true when one compares those tissues actively engaged in starch synthesis. The *Arabidopsis* mature leaf, the *Chlamydomonas* nitrogen supplied cell growing in the light, the *Chlamydomonas* nitrogen starved cell, the potato tuber, the maize endosperm or the pea embryo, all contain vastly different types and amounts of enzyme activities concerned with starch metabolism. While the “core” synthetic pathway composed of ADP-glucose pyrophosphorylases, starch synthases, branching enzymes and isoamylases are present in all cases (for review see Kossmann and Lloyd, 2000 and Myers *et al.*, 2000), the systems contain very different amounts of those other enzymes whose functions in starch metabolism remain unclear. D-enzyme activity is easy to detect in *Chlamydomonas*, in the *Arabidopsis* leaf and in the potato tuber. However the activity could not be detected at comparable levels in the maize endosperm. When maize and *Chlamydomonas* pullulanase are assayed and compared, the algae proved to contain one to two orders of magnitude less of this enzyme activity while plastidial phosphorylase defines one of the most abundant enzymes of the maize endosperm amyloplast. The malto-oligosaccharides produced by isoamylase during starch biosynthesis could be metabolized through many distinct pathways with different consequences. They can be very efficiently recovered by providing primers to the soluble or granule bound starch synthases. They can

be equally efficiently recovered by being transferred on pre-amylpectin by D-enzyme. They can be degraded with moderate energy loss by a combination of D-enzyme and phosphorylase digestion or they can feed a futile cycle by degradation through endo or exo type of amylases or by glucosidases. The phenotypic consequences will depend on the limited or unlimited availability of substrate and ATP, which in turn will depend on the highly variable physiological conditions prevailing in the tissue under consideration. D-enzyme as a major enzyme of malto-oligosaccharide metabolism is likely to be of use in both polysaccharide synthesis and degradation. The consequences of mutations affecting D-enzyme activity on starch metabolism will largely depend on the enzymatic make-up and physiological status of the cell under consideration.

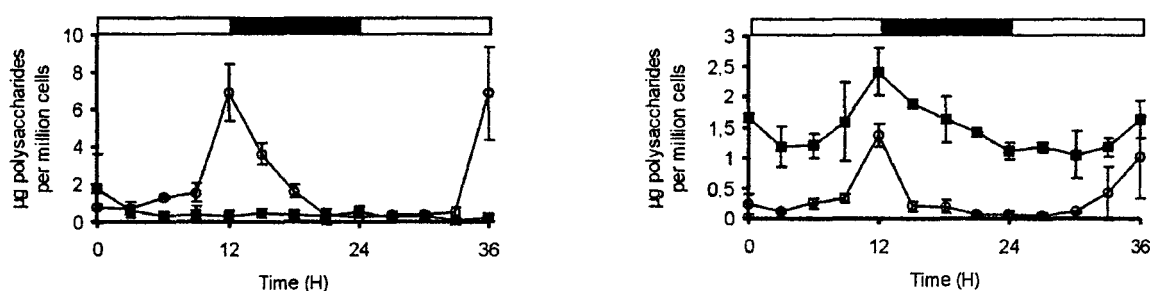


Figure 8: Starch (O) and WSP (■) accumulations in wild type and *stall-1* mutant strain. Cells were grown under 12h day (white horizontal bars) 12h night (black horizontal bars) cycle with 4% CO₂ constant bubbling. Results displayed in panel A are the mean $\pm$ standard deviation of two distinct and independent experiments performed on wild type strain. Results displayed in panel B are the mean $\pm$ standard deviation of two distinct and independent experiments carried out on *stall-1* mutant strain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials – α [^{32}P] dCTP was purchased from Amersham (U.K.). CL-2B sepharose column and Percoll were obtained from Amersham Pharmacia Biotech. Starch assay kit was obtained from Roche (Germany).

Chlamydomonas strains, growth conditions and media – The reference strains of *C. reinhardtii* used in this study are 137C (*mt- nit1 nit2*), 37 (*mt+ pab2 ac14*) and BAFR1 (*mt+ nit1 nit2 sta2-29::ARG7*). The strain used for nuclear transformation is TerBD20 (*mt- sta2-1 nit1 nit2 cw15 arg7-7*). JV45J (*mt- nit1 nit2 stal1-1*) and all “CO” strains were previously described (Colleoni *et al.*, 1999a). RC21 (*mt- stal1-2::ARG7 sta2-1 nit1 nit2 cw15 arg7-7*) was obtained by nuclear transformation of TerBD20 using plasmid pASL and strain CR102 (*stal1-2::ARG7*) represents a progeny from a cross involving both RC21 and 37 strains. Standard media are fully detailed in Harris (1989) while growth conditions and nitrogen-starved media are described in Ball *et al.* (1990), Ball *et al.* (1991), Delrue *et al.* (1992) and Libessart *et al.* (1995). For the studies concerning enzyme activity, mRNA level, starch and malto-oligosaccharide measurement in 12h day 12h night cycle, experiments were performed under high CO₂ level (4%) bubbling in Sueoka medium (Sueoka, 1960).

Insertional mutagenesis – Transformations of strain TerBD20 with plasmid pASL (Adam and Lopez, 1998) were performed following method described by Kindle (1990).

D-enzyme assays – Protocols used for crude extracts preparations and enzyme assays were previously described in (Colleoni *et al.*, 1999a and b)

Determination of starch levels, starch purification and spectral properties of the iodine-starch complex – A full account of amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradient and λ_{max} (maximal absorbance wavelength of the iodine polysaccharide complex) measures can be found in Delrue *et al.* (1992).

Separation of starch polysaccharides by gel permeation chromatography – 1.5 mg starch dissolved in 500 μl 10 mM NaOH was applied to a column (0.5 cm i.d. x 65 cm) of Sepharose CL-2B, which was equilibrated and eluted with 10 mM NaOH. Fractions of 300 - 320 μl were collected at a rate of one fraction per 1.5 min. Glucans in the fractions were detected by their reaction with iodine and the levels of amylopectin and amylose were determined by amyloglucosidase assays (Roche, Germany).

Chain length distribution analysis – Fractions from CL-2B column containing amylopectin

were pooled and dialyzed 12 hours against water. After lyophilization, the samples were digested by isoamylase (2 units from Megazyme International, Bray, County Wicklow, Ireland, in 55 mM sodium acetate buffer pH 3.5) before HPAED-PAD analysis. For a complete description of this technique, refer to Fontaine *et al.* (1993)

Cloning of the full-length D-enzyme gDNA – A complete description of algal DNA extraction can be found in Rochaix *et al.* (1991). Degenerated primers corresponding to the two first of the three highly conserved regions of D-enzyme protein sequence (see Fig. 2) were designed as following: Primer I: 5'-RTTRTCRTGNGTACCNGTRTA; Primer II: 5'-RAARCCVGCRAAATGRTCRATVCG. PCR amplification performed on wild-type genomic DNA with both Primer I and II, gave a specific fragment of 1,564 bp whose sequence was strongly similar to that of D-enzymes already cloned from higher plants. To isolate the full genomic copy of the structural gene of *Chlamydomonas* D-enzyme, 11,280 *E. coli* clones from a cosmid library (Zhang *et al.*, 1994) were screened using the previously obtained 1,564 bp fragment as a radiolabeled probe. This genomic library is indexed in 120 microtitration plates and the corresponding *E. coli* clones were transferred onto nylon filters and consequently treated as described in Sambrook *et al.* (1989) before hybridization with the specific nucleotide probe. Over a total of four positives clones, 2 were selected for further analysis because of their strong hybridizations with the probe. This prompted us to use these cosmids for complete sequencing of the D-enzyme gene subsequently submitted to GenBank (accession number AF307843).

Cloning of the full-length D-enzyme cDNA – A partial cDNA clone corresponding to algal D-enzyme was isolated as follows. Approximately 500,000 lysis plaques of a *Chlamydomonas* λ ZAP II cDNA library were screened with the 1,564pb genomic probe previously described. A cDNA clone with an insert of 2,071 bp was isolated and fully sequenced on both strand. 5' end of the D-enzyme cDNA was obtained by RACE-PCR (Life Technologies) following the supplier's instructions. Briefly, a total fraction of RNA from the wild-type strain was reverse transcribed using the following specific primer 5'-CTCCAGCAGTCCGTCCTTG. A first PCR amplification of the subsequently produced cDNA was done using the specific primer 5'-GCTCCTCAATGCTCACCACAA while the nested PCR amplification was carried out with the next specific primer 5'-CGGGGGCACCAGCGGCAGCAG. The complete cDNA obtained was submitted to GenBank (accession number AF307842). Total RNA was extracted from the wild type strain 330 with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany) following the supplier's

instructions.

RFLP analysis – Standard protocols for molecular biology as described in Sambrook *et al.* (1989) were used for RFLP analysis, including gDNA restriction and subsequent electrophoresis on agarose gel, transfer onto nylon membranes and hybridization with a specific probe. Approximately 10 µg of gDNA was digested with 50 units of SmaI. Restriction fragments were then separated on 0.8 % agarose gel and transferred onto a nylon membrane (Porablot, NY Amp, Macherey-Nagel, Germany). Hybridization was performed overnight at 65°C in the following hybridization buffer: 5 x SSC, 5 x Denhardt's, 0.1 % SDS, 0.1 g/ml denatured salmon sperm DNA where 1 x SSC is 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate and 1 x Denhardt's is 0.2 g/l Ficoll 400, 0.2 g/l PVP40 and 0.2 g/l BSA. Probes were radiolabeled by random priming method as described by supplier's instruction (Amersham Life Science). Membranes were typically washed twice in 2 x SSC, 0.1 % SDS at 65°C for 10 min and twice in 0.5 x SSC, 0.1 % SDS at 65°C for 10 min before exposure to x-ray film.

RT-PCR experiments – Total RNA was extracted using the “RNeasy plant mini kit” as described by the manufacturer (Qiagen, Germany). Total RNA was then quantified by agarose gel analysis and spectrophotometry. Reverse transcription was performed with SuperScript II kit (Life Technologies). The product of the reaction was then purified on mini-column (PCR purification kit, BIO 101, La Jolla) and the subsequent PCR amplification was performed using the “Jump start ready mix” (Sigma, St Louis). Primers corresponding to the D-enzyme cDNA were the following:

RTD3 : 5'-TGATGCGGCTGGACAACACG

RTD4 : 5'-TCCCCACAGAAACGCACCCCTACA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Université des Sciences et Technologies de Lille, the Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 8576 du CNRS, director Jean-Claude Michalski) and by the Région Nord-Pas de Calais (fellowship n° 99060060 to FW).

REFERENCES

- Adam, M. and Loppez, R. (1998) Use of the *ARG7* gene as an insertional mutagen to clone *PHON24*, a gene required for derepressible neutral phosphatase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet.* **258**, 123-32.
- Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A. Martiat, J.C. and Matagne, R. F. (1990) Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **66**, 1-9.
- Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. and Decq, A. (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17-26.
- Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J-M. and Ball, S. (1999-a) Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol.* **120**, 993-1003.
- Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomiany, M-C., Liénard, L., Wattebled, F., D'Hulst, C. and Ball, S. (1999-b) Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.* **120**, 1005-1014.
- Critchley, J.M., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M. and Smith, S.M. (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *Plant J.* **26**, 89-100.
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M.L., Fournet, B. and Ball, S. (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis

and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**, 3612-3620.

Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, ML., Routier, F., Marianne-Pépin, T., Decq, A., Wieruszeski, JM., Delrue, B., Van den Koornhuyse, N., Bossu, JP., Fournet, B. and Ball, S. (1993) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268**, 16223-16230.

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

James, M.G., Robertson, D.S. and Myers, A.M. (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**, 417-429.

Jones, G. and Whelan, W.J. (1969) The action pattern of D-enzyme, a transamylodextrinylase from potato. *Carbohydr. Res.* **9**, 483-490.

Kinderf, I., Li Z., Samuel, M. S., Koshar-Hashezmi, B., Ball, S., Rampling, L. and Morell, M. (2002) The role of the *E. coli glgX* gene in bacterial glycogen metabolism. *Submitted.*

Kindle, K. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **87**, 1228-1232.

Kossmann, J. and Lloyd, J. (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 141-196.

Li, B., Geiger, D.R. and Shieh, W.J. (1992) Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves. *Plant Physiol.* **99**, 1393-1399.

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

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

Mérida, A., Rodriguez-Galan, J.M., Vincent, C. and Romero, J.M. (1999) Expression of the granule-bound starch synthase I (*Waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated. *Plant Physiol.*, **120**, 401-410.

Mouille, G., Maddelein, M-L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B. and Ball,

- S. (1996) Phytoglycogen processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**, 1353-1366.
- Myers, AM., Morell, MK., James, MG. and Ball, SG. (2000) Recent progress in understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.*, **122**, 989-998.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E. and Satoh, H. (1996) 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. *Physiol. Plant.* **97**, 491-498.
- Peat, S., Whelan, W.J. and Rees, W.R. (1956) The enzymic synthesis and degradation of starch: the disproportionating enzyme of potato. *J. Chem. Soc.* **1956**, 44-53.
- Rochaix, J. D., Mayfield, S., Goldschmidt-Clermont, M. and Erickson, J. (1991) Molecular biology of *Chlamydomonas*. In *Plant molecular biology : a practical approach*. (C. Shaw, ed.), pp. 253-275, IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sueoka, N. (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **46**, 83-91.
- Teste MA, Enjalbert B, Parrou JL and Francois, JM. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* YPR184w gene encodes the glycogen debranching enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 105-110.
- Van den Koornhuysse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J. and Ball, S. (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16281-16287.
- Zabawinski, C., Van Den Koornhuysse, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix J-M., Preiss, J. and Ball, S. (2001) Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of an heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Bacteriol.* **183**, 1069-1077.
- Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith A.M. and Rees, T. (1998a) A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J.* **15**, 357-365.
- Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W.L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A.M. and Chen, J. (1998b) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates

both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* **10**, 1699-1712.

Zhang, H., Herman, P. and Weeks, D. (1994) Gene isolation through genomic complementation using an indexed library of *Chlamydomonas reinhardtii* DNA. *Plant Mol. Biol.* **24**, 663-672.

V. Article III

Le métabolisme de l'amidon de l'algue
verte unicellulaire *Chlamydomonas*
reinhardtii est-il régulé de manière
circadienne ?

B. Résumé

Certains processus métaboliques sont sous le contrôle de l'horloge circadienne. Il s'agit le plus souvent de processus fondamentaux pour l'organisme qui doit s'adapter rapidement à son environnement et en particulier aux cycles réguliers de l'alternance du jour et de la nuit. Néanmoins, peu d'études se sont attachées à déterminer si le métabolisme de l'amidon végétal était lui-même contrôlé par cette horloge. Nous nous intéressons ici à ce type de régulation chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Nous avons ainsi placé des cultures dans différentes conditions d'illumination (alternance de 12h de lumière pour 12 h d'obscurité; lumière continue; obscurité continue) afin d'observer si des cycles réguliers de synthèse et de dégradation du polysaccharide de réserve pouvaient être maintenus dans chaque cas. Les résultats positifs obtenus nous ont conduit à pousser plus loin nos expérimentations. Afin de découpler le rythme circadien du cycle de division cellulaire, lui-même contrôlé par l'horloge, les mêmes expérimentations ont été effectuées sur des cellules cultivées en milieu carencé en azote. Les différents résultats obtenus nous permettent de penser que la production d'amidon dépend de l'horloge circadienne et que ce contrôle ne s'exerce pas seulement par l'entremise du cycle de division cellulaire.

introduction

Depuis 1987 l'étude du métabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas* a été abordée comme celle de la synthèse de l'amidon des feuilles ou l'amidon des tissus de réserve, c'est à dire sans considérer a priori la possibilité de l'existence d'un contrôle direct de ce métabolisme par l'horloge circadienne. En effet si l'on examine la cinétique d'accumulation et de dégradation de l'amidon des feuilles d'*Arabidopsis* tout laisse supposer que cette dernière obéit simplement et directement à la présence et à l'absence de la photosynthèse de manière parfaitement logique et sans nécessiter *a priori* un quelconque contrôle par l'horloge circadienne (bien que ce point n'ait jamais été formellement prouvé). Les premières courbes d'accumulation de polysaccharides de réserve en carence minérale (en phosphate) chez *Chlamydomonas* publiées par R. Matagne *et al.* (1976) ne laissaient nullement entrevoir la présence d'oscillations circadiennes du contenu en amidon (voir figure 1). Notre laboratoire ne s'est donc pas attaché à suivre la cinétique de ces carences minérales 24 h sur 24.

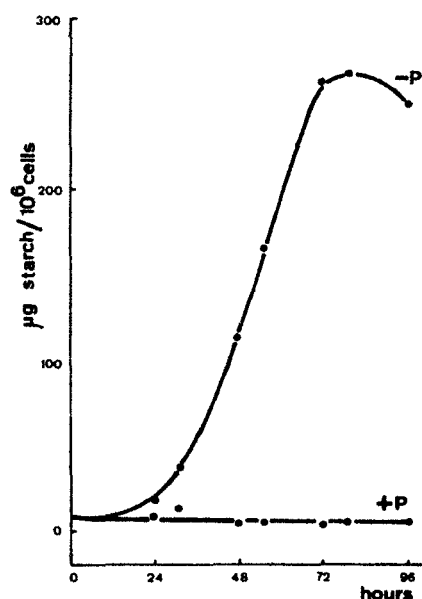


Figure 1: Quantité d'amidon accumulée par des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivées en milieu liquide contenant du phosphate (+P) ou dépourvu de cet élément (-P). Matagne *et al.*, 1976

De manière générale les oscillations circadiennes ne s'observe que rarement de manière fortuite par les laboratoires de recherche dans la mesure où les horaires de travail ne recourent généralement qu'un tiers de la période et que très souvent les observations routinières sont réalisées sur des extraits prélevés le plus souvent entre 8 heures et midi. Pourtant, en système non carencé et en présence de divisions cellulaires Uwe Klein avait publié dès 1987 des courbes très particulières d'accumulation d'amidon se caractérisant par

un minimum d'accumulation au beau milieu de la phase lumineuse. Des courbes similaires mais mieux précisées ont été récemment publiées par Thyssen *et al.* (2002; Figure 2). Il est clair que le déclenchement de la synthèse ne correspond nullement à la transition nuit-jour et que la lumière ne constitue pas la seule explication au rythme observé. L'initiation de la dégradation à la transition jour-nuit semble par contre résulter uniquement de l'absence de fixation du CO₂ dépendant de la mise à l'obscurité. Il convient de préciser toutefois que les cultures examinées sont non carencées et se divisent activement avec une période circadienne. De ce fait, l'explication simple et première des effets observés réside bien évidemment en un contrôle fin du cycle de division cellulaire sur le métabolisme des polysaccharides de réserve. De tels contrôles sont connus et documentés en ce qui concerne le métabolisme du glycogène chez *S. cerevisiae*. Klein avait immédiatement conclu à la présence de ce type de régulation chez *Chlamydomonas* du fait de l'abolition du rythme de synthèse et de dégradation observées chez des cellules dites « désynchronisées ». De telles cellules étaient dans son esprit constituées par des cellules de *Chlamydomonas* prises à 10⁷ cellules.mL⁻¹ ce qui constitue la phase stationnaire. Toutefois dans cette phase la lumière devient limitante et l'alimentation carbonée de la culture pose problème. Ces effets sont susceptibles d'aplanir les oscillations observables et ne constituent pas à nos yeux un contrôle expérimental satisfaisant.

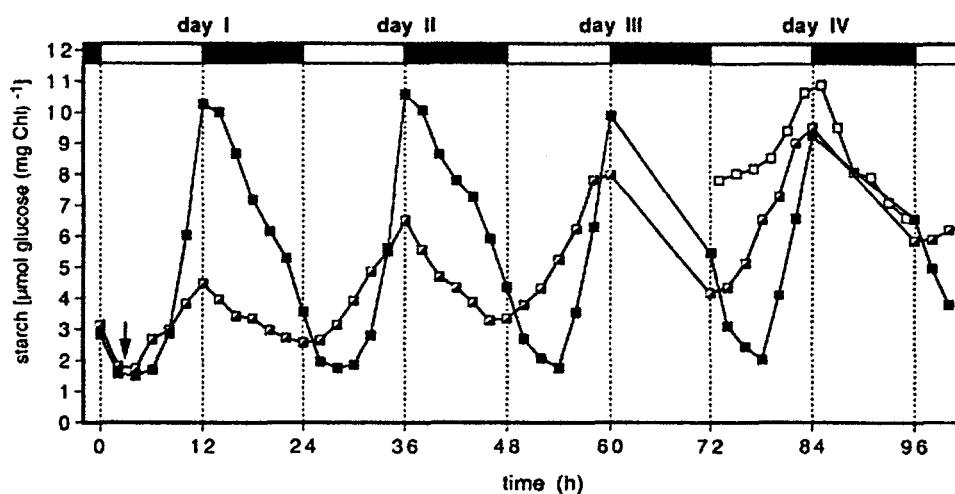


Figure 2: Quantité d'amidon accumulée par des cellules de *Chlamydomonas* cultivées sous une concentration de 4% en CO₂ durant toute l'expérience (■), ou cultivée sous 4% CO₂ pendant 2 heures avant que cette concentration ne soit ramenée à celle de l'air ambiant (□). La troisième courbe correspond à une culture obtenue uniquement sous 0,036% CO₂. Les valeurs exprimées ici correspondent aux moyennes de trois expérimentations distinctes. Thyssen *et al.*, 2001.

Au laboratoire des observations très préliminaires (non publiées) réalisées sur des cultures mises à l'obscurité (en présence d'acétate) semblaient indiquer la reprise inexplicable de la synthèse en obscurité prolongée après une phase de dégradation prononcée. De plus, de

récents rapports font état d'une régulation circadienne de l'abondance de messagers encodant de multiples fonctions impliquées dans la régulation du métabolisme carboné. Ces résultats ont conduit Zabawinski *et al.* (2001) à étudier la présence d'une régulation de même type concernant l'abondance des messagers encodant la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase. Les données obtenues, reportées en figure 3, indiquent que cette quantité varie effectivement selon une oscillation circadienne. Mieux, l'activité enzymatique correspondante semble, elle aussi, suivre l'oscillation quoique de manière moins convaincante. Il reste impossible dans ces expériences de distinguer le contrôle exercé par le cycle cellulaire de celui qui serait plus directement imposé par l'oscillateur circadien. Il est de plus très probable que l'oscillateur circadien détermine la période du cycle de division cellulaire. Dans cette hypothèse le métabolisme de l'amidon dépendrait directement ou indirectement de l'oscillateur. Les résultats obtenus par Zabawinski *et al.* (2001) suggèrent que le contenu en amidon pourrait aussi dépendre de l'oscillateur. Nous avons voulu tester ce point. Pour nous placer dans des conditions où nous pouvons nous affranchir de l'effet direct de la lumière sur le métabolisme carboné nous avons choisi d'adjoindre de l'acétate au milieu de culture. En effet, une oscillation circadienne se doit de perdurer en lumière ou en obscurité continue. Nous avons également tenté de découpler l'effet du cycle de division de celui de l'oscillateur circadien en imposant l'arrêt des divisions par la présence d'une carence minérale (carence en azote).

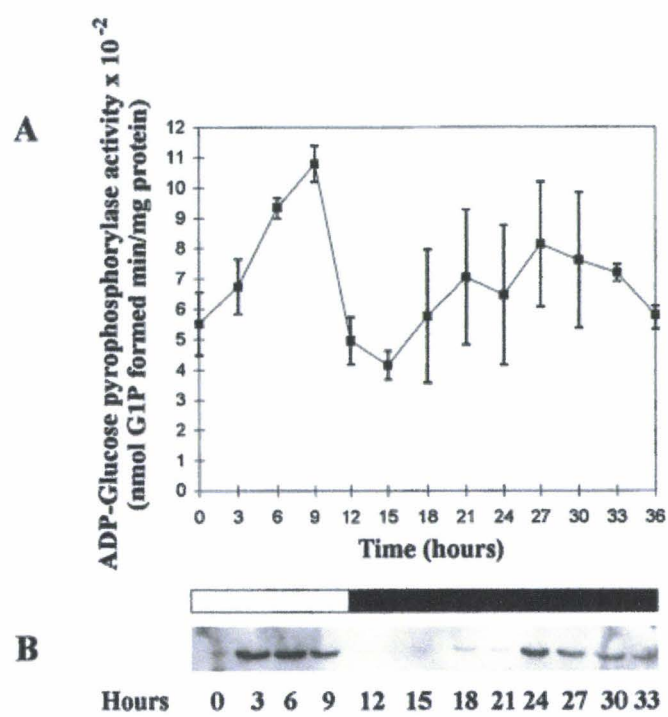


Figure 3: A, activité ADP-glucose pyrophosphorylase de cellules sauvages cultivées sous forte concentration en CO₂ en condition de 12 heures d'illumination suivies de 24 heures d'obscurité. B, Analyse par Northern Blot de l'expression du gène de la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase sur des cellules cultivées dans les mêmes conditions. Zabawinski *et al.*, 2001.

Matériels et Méthodes.

Matériels.

Les kits de dosage d'amidon proviennent de la société Roche (Allemagne)

Souche de *Chlamydomonas* utilisée, conditions de croissance et milieux de culture.

La souche utilisée pour ces travaux est la référence sauvage du laboratoire concernant la production d'amidon: 137c (*mt- nit1 nit2*). Le milieu liquide Tris Acetate Phosphate (TAP+N) utilisé dans ces expérimentations est décrit par Harris (1989), tandis que la composition du milieu carencé en azote est détaillée dans Ball *et al.*, 1990. Les précultures sont cultivées une semaine sous agitation constante en cycles de 12 heures de luminosité (4000 lux) pour 12 heures d'obscurité. Au temps $t=0$, des flacons de 250mL, contenant 100mL de milieu, sontensemencés à 3.10^6 cellules par mL pour le +N et 2.10^6 cellules par mL pour le -N. Les cultures sont placées dans différentes conditions: lumière continue, obscurité continue ou alternance lumière/obscurité (12h/12h).

Prélèvements des cellules pour dosage de la quantité d'amidon accumulée.

Toutes les trois heures 1 mL des cultures carencées en azote est prélevé puis remplacé par 1mL de milieu frais. Ceci permet d'éviter de baisser le volume du milieu de culture et de modifier ainsi les paramètres d'agitation. Les prélèvements se font sur une durée de 84 heures. Pour les cultures contenant une source d'azote, des prélèvements de 1 mL se font également toutes les 3 heures. Dans le but d'éviter que les cellules n'entrent en phase stationnaire, des dilutions sont effectuées aux temps $t=3$, $t=27$, $t=39$, $t=60$. Ces temps correspondent à différents moments de la journée ce qui permet d'éviter l'introduction d'un cycle due à l'apport régulier de milieu frais. Les données présentées dans les différents graphiques tiennent compte de ces dilutions.

Dosage de l'amidon.

Un mL de la culture est centrifugé 10 min à 20000g. Une fois le surnageant enlevé, 1mL d'acétone 80% est ajouté au culot qui, après remise en suspension, est laissé 12 heures au réfrigérateur. Une nouvelle étape de centrifugation permet d'isoler le culot d'amidon qui est alors repris dans 500 μ L de KOH 1N puis incubé 30 minutes à 95°C. L'ajout de 500 μ L d'acide acétique permet d'ajuster le pH avant dosage à l'amyloglucosidase. Le protocole de dosage est décrit dans Delrue *et al.*, 1992.

Résultats.

Le contenu en amidon, chez *Chlamydomonas*, oscille sur une période de 24 heures.

Nous avons réalisé une cinétique d'accumulation de l'amidon contenu dans notre souche de référence alors que celle-ci était soumise à des cycles répétés d'alternance entre luminosité (12 heures) et obscurité (12 heures). Les courbes obtenues (Figure 4), exprimées par mL de culture ou par millions de cellules, montrent clairement la présence de phases de synthèse et de dégradation du polysaccharide de réserve. La synthèse de l'amidon commence au milieu de la phase lumineuse et se poursuit jusque 3 heures après le passage à l'obscurité. C'est à ce stade que la dégradation du polysaccharide prend place. Elle se poursuit jusqu'en milieu de journée suivante.

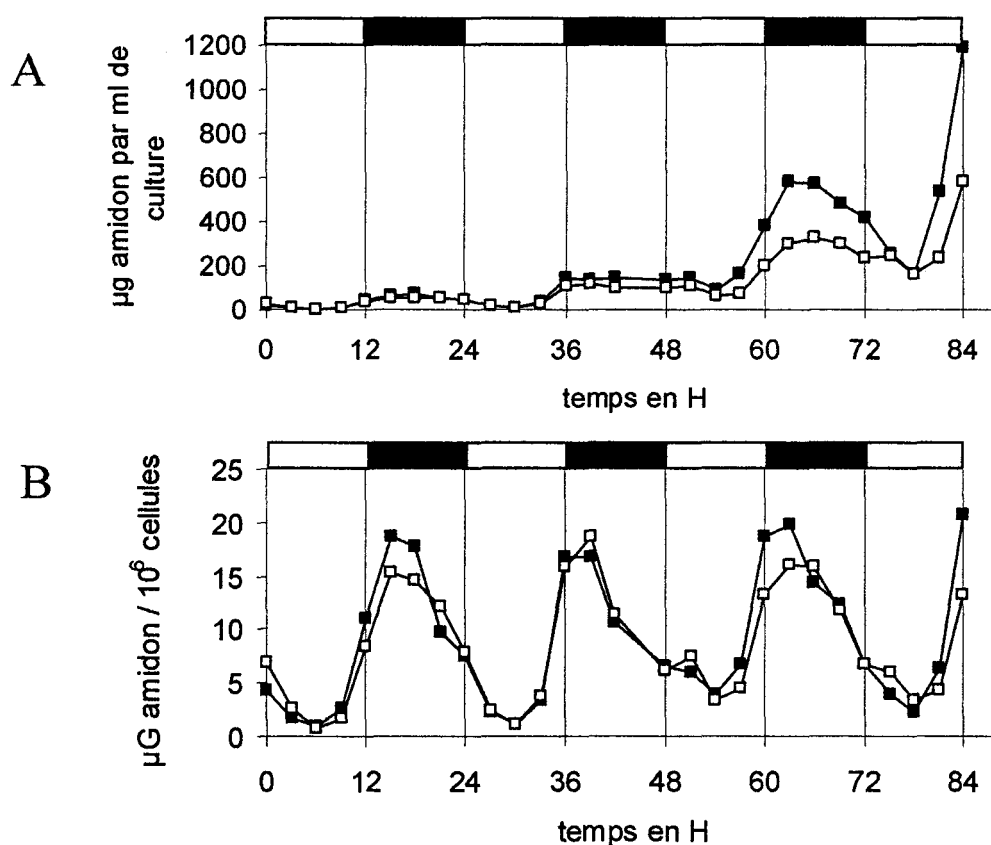


Figure 4: Cinétique d'accumulation d'amidon effectuée sur des cellules cultivées en condition d'alternance jour/nuit (cultures LD). Les barres blanches indiquent les périodes où les cultures sont soumises à une illumination; à l'inverse, les barres noires représentent leur mise à l'obscurité. Les 2 courbes (□/■) représentent 2 cultures indépendantes. A, la quantité d'amidon produite est exprimée en µg d'amidon par mL de culture. B, les mêmes résultats sont ici exprimés en µg d'amidon par millions de cellules

Le fait d'exprimer les courbes en μg d'amidon par mL de culture permet de s'affranchir du paramètre engendré par la division cellulaire. En effet, dans ce type de culture où l'obscurité succède à la lumière, les cellules se synchronisent et la division cellulaire intervient généralement en fin de phase obscure pouvant expliquer la baisse de la quantité d'amidon par cellule observée à ce stade. Les courbes présentées en figure 4A nous indiquent que la baisse de la quantité d'amidon relève bien d'un processus de dégradation et n'est pas uniquement le résultat de la dilution de l'amidon précédemment accumulé dans un nombre de cellule plus important.

L'oscillation circadienne est maintenue en lumière continue.

Afin de savoir si l'oscillation observée en figure 4 est dépendante de la présence d'une mise à l'obscurité pouvant transmettre un signal de dégradation, nous avons placé des cultures en condition de lumière continue (figure 5).

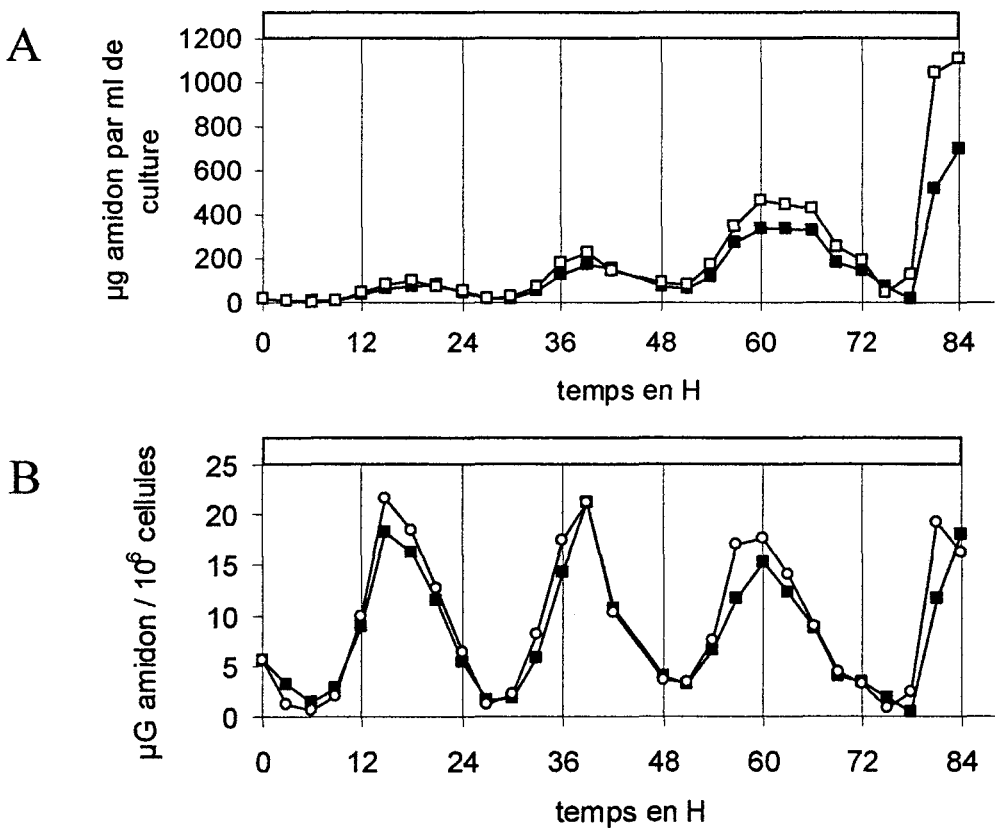


Figure 5: Cinétique d'accumulation d'amidon effectuée sur des cellules cultivées sous une illumination constante (cultures LL). Les 2 courbes (□/■) représentent 2 cultures indépendantes. A, la quantité d'amidon produite est exprimée en μg d'amidon par mL de culture. B, les mêmes résultats sont ici exprimés en μg d'amidon par millions de cellules

Rappelons que les précultures ont été produites en condition d'alternance jour/nuit (12h/12h) pendant plusieurs jours avant le début de l'expérience. Ici encore, les phases de

dégradation du polysaccharide de réserve succèdent aux phases de synthèse de manière très régulière. Les résultats obtenus sont aisément superposables à ceux présentés en figure 4. Il semble donc que les phases de dégradations ne soient pas conditionnées par le passage à l'obscurité.

L'oscillation circadienne est maintenue à l'obscurité.

Sachant que l'étape de dégradation intervient de manière indépendante de la mise à l'obscurité, nous avons voulu vérifier que l'oscillation circadienne pouvait se maintenir en absence de lumière. Pour ce faire, les cultures sont soumises, après inoculation, à l'obscurité totale. La présence d'acétate dans le milieu de culture permet un apport énergétique aux cellules qui ne peuvent, dans ces conditions, plus accomplir de photosynthèse. Encore une fois, les données présentées en figure 6 nous montrent que les cycles de synthèse et de dégradation sont maintenus de manière tout à fait comparable à ce qui est observé en figure 4 et 5. Tout semble donc indiquer que ces cycles sont sous le contrôle d'une horloge interne, permettant leur maintien quelles que soient les conditions de luminosité appliquées aux cultures.

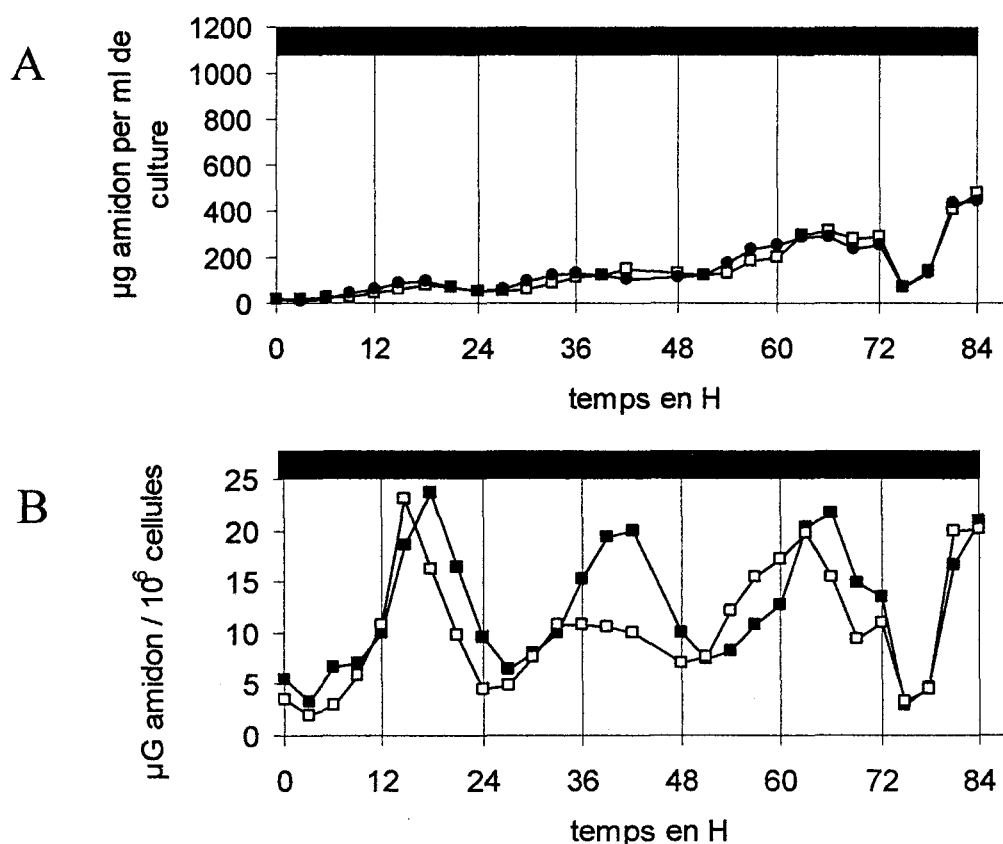


Figure 6: Cinétique d'accumulation d'amidon effectuée sur des cellules cultivées à l'obscurité durant 84 heures (cultures DD). Les 2 courbes (□/■) représentent 2 cultures indépendantes. A, la quantité d'amidon produite est exprimée en μg d'amidon par mL de culture. B, les mêmes résultats sont ici exprimés en μg d'amidon par millions de cellules

Une oscillation du métabolisme de l'amidon est maintenue en absence de division cellulaire (carence en azote) et en présence de lumière.

Afin de déterminer si l'horloge régulant les étapes de synthèse et de dégradation de l'amidon est dépendante ou indépendante du cycle cellulaire, nous avons effectué les mêmes types expériences décrites plus haut mais cette fois-ci dans un milieu carencé en azote. Dans ces conditions, les cellules effectuent au maximum un cycle de division cellulaire. Les résultats reportés en figure 7 nous indiquent qu'une rythmicité de la production d'amidon est maintenue tout au long des 84 heures que dure l'expérience pour les cellules cultivées en alternance jour/nuit et pendant au moins 60 heures pour celles cultivées en lumière continue. Ces résultats nous permet de penser que le cycle cellulaire n'est pas le seul élément responsable de l'oscillation circadienne du métabolisme de l'amidon.

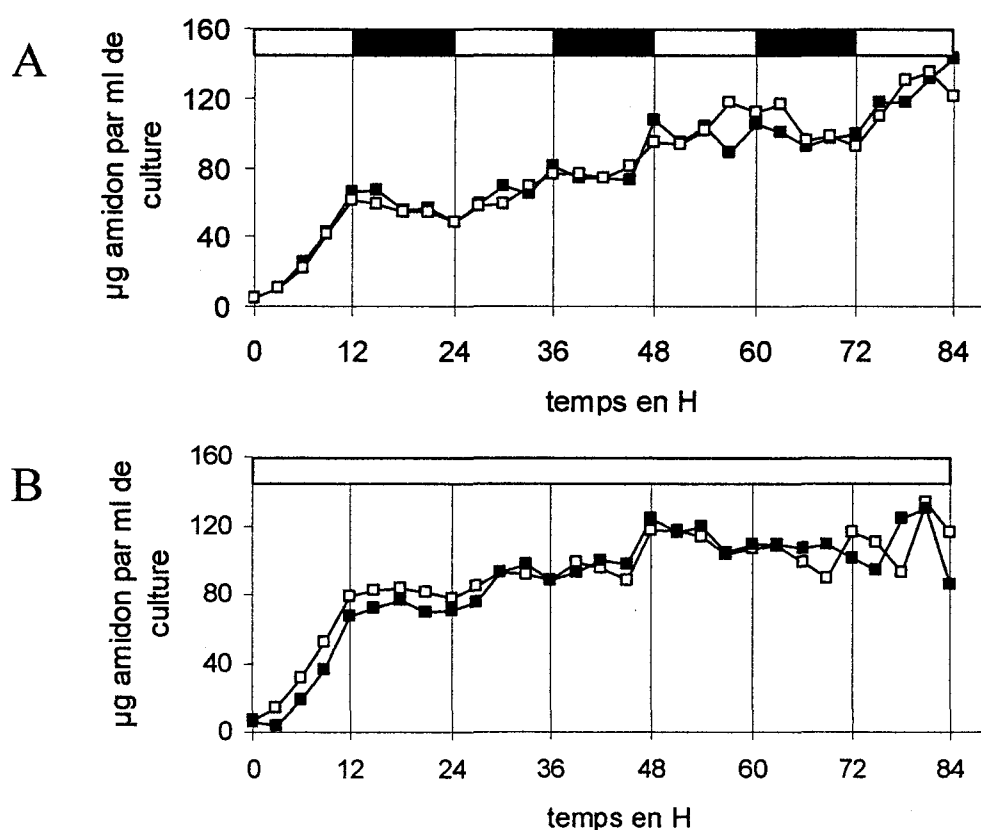


Figure 7: A, Cinétique d'accumulation d'amidon effectuée sur des cellules cultivées en carence azotée et en alternance jour/nuit (12h/12h; cultures -N LD). Les 2 courbes (□/■) représentent 2 cultures indépendantes. B, Cinétique d'accumulation d'amidon effectuée sur des cellules cultivées en carence azotée et en lumière continue durant 84 heures (-N LL). Les 2 courbes (□/■) représentent 2 cultures indépendantes. Les résultats obtenus lors des expérimentations en carence azotée ne peuvent pas être exprimés en quantité d'amidon par million de cellules puisque le rythme de division cellulaire se trouve entièrement perturbé par ce type de culture.

Nous pouvons noter que la carence azotée induit une synthèse massive d'amidon lors des 12 premières heures. De plus, le taux de dégradation du polysaccharide semble ici fortement réduit, voire remplacé par une phase stationnaire où anabolisme et catabolisme semble co-exister.

L'oscillation disparaît en absence de lumière et de division cellulaire.

La dernière expérimentation menée concerne les cultures carencées en azote et placées à l'obscurité continue (Figure 8). Dans ces conditions, la rythmicité semble disparaître. En effet, l'alternance entre la synthèse d'amidon et les phases stationnaires observée pour les cultures -N LD et -N LL de la figure 7 se trouve remplacée par une accumulation lente mais continue de polysaccharide (au moins pendant 48 heures). Nous avons confirmé cette absence d'oscillation sur d'autres souches dans les mêmes conditions.

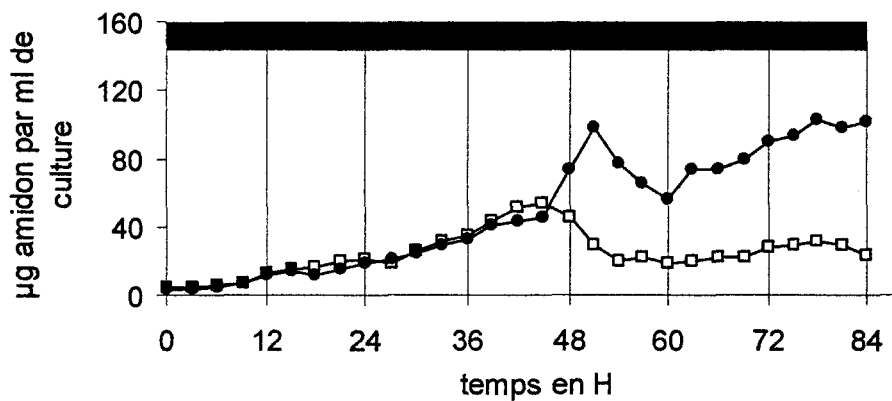


Figure 8: Cinétique d'accumulation d'amidon effectuée sur des cellules cultivées en carence azotée et placées à l'obscurité durant 84 heures (cultures -N DD). Les 2 courbes (□/■) représentent 2 cultures indépendantes.

Discussion

Les résultats présentés ici ont été obtenus en comparant trois cultures réalisées en présence d'acétate avec une photopériode 12 h de jour/12 h d'obscurité d'une part (LD), à l'obscurité totale (DD) ou à la lumière continue d'autre part (LL). La préculture était commune dans les 3 situations et subissait une photopériode de 12 h de jour/12 h d'obscurité. Les expériences reprises ci-dessus montrent que les oscillations demeurent vigoureuses après au moins 3 cycles dans les 3 situations. Nous confirmerons ultérieurement que ces oscillations perdurent pendant au moins 10 cycles mais nous avons peu de doutes à ce sujet. Qualitativement les oscillations sont remarquablement semblables à celles décrites par Thyssen *et al.* représentées dans la figure 2. Notons toutefois qu'en présence d'acétate l'initiation de la dégradation dans la culture LD ne correspond plus à la transition jour nuit mais commence 4 à 6 heures plus tard. Nous interprétons cette observation par la présence d'acétate dans nos expériences qui fournit en permanence une source de carbone réduit aux cultures. L'initiation tardive de la dégradation est masquée dans les expériences de Thyssen *et al.* par l'absence simultanée l'acétate et de la photosynthèse qui conduit à une chute brutale de la concentration des substrats à l'obscurité (ATP, 3-PGA, hexoses phosphates) et impose de ce fait la dégradation quelque soit l'état de régulation du métabolisme sous-jacent. Nos expériences démontrent qu'il existe un mécanisme de régulation de l'initiation de la synthèse et de la dégradation de l'amidon indépendant de la présence ou de l'absence de lumière sur une période de 24 heures. Ce contrôle peut-être exercé directement par l'horloge circadienne ou indirectement par le cycle de division cellulaire. Afin de découpler quelque peu le métabolisme de l'amidon du cycle de division cellulaire nous avons soumis les mêmes précultures à des conditions de carence en azote en présence de photopériode (-N LD), en lumière continue (-N LL) et à l'obscurité (-N DD) et ce en présence constante d'acétate. Les courbes -N LD et -N LL sont très semblables. Elles montrent une accélération de la synthèse d'amidon pendant les premières 12 heures de carence nutritive. Par la suite des plateaux ou des phases de dégradation succèdent à des phases de re-synthèse avec une périodicité avoisinant 24 heures. Le rythme est cependant beaucoup moins régulier et prononcé qu'en milieu supplémenté en azote. Bien que les effets de la carence azotée soit d'une complexité biologique très importante nous pensons que ces expériences prouvent que des éléments de rythmicité circadienne perdurent dans le métabolisme de l'amidon après arrêt du cycle de division cellulaire. En effet dans de telles cultures les cellules subissent au maximum un cycle de division.

Par contre la culture -N DD se caractérise par un taux de synthèse bas mais très régulier pendant un minimum de 48 heures. Cette culture est devenue totalement arythmique pour le métabolisme de l'amidon. Nous suggérons que l'arrêt du cycle de division à l'obscurité conduise à la perte des oscillations circadiennes chez *Chlamydomonas*. Il serait intéressant de tester toute une série de phénomènes rythmés différents chez l'algue pour voir s'ils répondent de la même manière et deviennent non rythmés.

Les observations que nous rapportons ici restent très préliminaires. Elles mettent cependant en lumière l'existence chez *Chlamydomonas* d'un contrôle du métabolisme de l'amidon par l'horloge circadienne. La détection d'oscillations du métabolisme en condition de carence nutritive à la lumière doit en toute logique nous conduire à appréhender de nouveau la caractérisation phénotypique de nos souches mutantes. En effet l'alternance de phases de synthèse et de dégradation dans un système limité du point de vue énergétique pourrait très bien conduire à des phénotypes exacerbés surprenants et contradictoires avec leurs « vraies fonctions ». La seule discordance notée entre les phénotypes de nos mutants et ceux des plantes supérieures consiste en celle affichée par les mutants défectueux en enzyme D. Nous devons faire l'étude complète des oscillations du métabolisme de ce mutant et vérifier en condition d'arythmie (-N obscurité) que le taux de synthèse de l'amidon a effectivement chuté et que les malto-oligosaccharides sont bien produits dans ces conditions.

Bibliographie

Klein, U. (1987). Intracellular carbon partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **61**, 953-956

Matagne, R. F., Loppes, R. and Deltour, R. (1976). Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii*: Biochemical and Cytochemical approach with specific mutants. *J. Bacteriol.* **126**, 937-950.

Thyssen, C., Schlichting, R. and Giersch, C. (2001). The CO₂-concentrating mechanism in the physiological context: lowering the CO₂ supply diminishes culture growth and economises starch utilisation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta.* **213**, 629-639.

Zabawinski, C., Van den Koornhuyse, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J.-M., Preiss, J. and Ball, S. (2001). Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Bacteriol.* **183**, 1069-1077.

VI. Discussion générale

A. La synthèse de l'amylose par la GBSSI.

La première partie de ce travail nous a amenés à démontrer que le locus *STA2* de *C. reinhardtii* correspond bien au gène de structure de la GBSSI, l'enzyme responsable de la biosynthèse de l'amylose. Les clonages des ADNc et ADNg complets de ce gène nous ont permis de mettre à jour une caractéristique particulière de la GBSSI de l'algue : la présence d'une extension C-terminale d'une masse d'environ 11 kDa. Cette dernière, unique au sein du groupe des GBSSI connues, confère à la protéine de *Chlamydomonas* une masse moléculaire d'environ 69000, alors qu'elle ne dépasse jamais 60000 chez les plantes supérieures. Des analyses de séquences effectuées avec cette seule extension ne nous ont pas permis de lui déceler de similitude avec des séquences déjà connues par ailleurs. Néanmoins, la présence de cette extension pourrait s'avérer essentielle à l'activité de la protéine. En effet, sa totale disparition dans la protéine tronquée produite par l'allèle mutant *sta2-1*, conduit à l'absence complète de synthèse d'amylose.

Au-delà de l'analyse de cette structuration particulière du gène *STA2* et de la GBSSI elle-même, nous avons poursuivi les études de synthèse d'amylose *in vitro* engagés par van de Wal *et al.* (1998). Ces derniers avaient démontré en incubant des grains d'amidon natifs de *Chlamydomonas* en présence d'ADP-glucose que la synthèse massive d'amylose s'effectuait par un mécanisme selon lequel l'amylopectine jouait le rôle d'amorce de la synthèse. Ils avançaient aussi que la synthèse d'amylose obtenue dans ces conditions modifiait le type cristallin des grains d'amidon de A (type « normal » chez *Chlamydomonas*) en B. Cependant, les faibles quantités de polysaccharides à leur disposition ne leur avaient pas permis de d'aller plus loin dans l'analyse de ces résultats. Nos propres résultats montrent que le changement de type cristallin découle d'une synthèse de cristaux de type B à l'intérieur des grains d'amidon alors que le pourcentage de cristaux de type A reste constant tout au long de l'expérience. Ceci suggère fortement que la GBSSI puisse induire la synthèse *de novo* de cristaux de type B sans conséquence sur les cristaux A pré existants. C'est la première fois que l'on rend compte d'une telle situation chez les plantes. En effet, jusqu'à présent on considérait l'amylose comme une molécule amorphe sans rôle précis dans l'élaboration de la cristallinité du grain d'amidon. Nos résultats semblent indiquer que ce n'est pas le cas et que l'amylose contribue d'une manière ou d'une autre à la synthèse des cristaux de type B dans le polysaccharide de

réserve. Nos résultats sont d'autant plus importants que nous montrons que seule la GBSSI est à l'œuvre dans ces conditions (aucune synthèse d'amylose n'est détectable lors de l'utilisation de grains d'amidon extraits d'une souche dont le gène *STA2* est inactivé par une interruption génique) et que même *in vivo*, la synthèse d'amylose ne s'opère que lorsque celle de l'amylopectine devient minimale. Les systèmes de synthèse *in vitro* d'amylose représentent donc de bons systèmes d'études et reflètent avec précision les situations rencontrées *in vivo*. Des développements ultérieurs sont encore nécessaires pour mieux saisir toute la problématique de la synthèse d'amylose. Certains points restent encore en suspens comme : la synthèse d'amylose se déroule-t-elle à la surface du grain d'amidon ? Y a-t-il modification du volume moyen des grains d'amidon même après doublement de la quantité de polysaccharide ? Quels seront les impacts de la présence de divers malto-oligosaccharides sur la synthèse d'amylose par la GBSSI ?

B. Le rôle de l' α -1,4 glucanotransférase.

Les résultats que nous avons obtenus sur l' α -1,4 glucanotransférase de *Chlamydomonas* confirme l'implication de cette enzyme dans la biosynthèse de l'amidon. Christophe Colleoni (1999) avait précédemment montré que des mutants de l'enzyme D voyaient s'effondrer la quantité d'amidon produite en condition de carence azotée à la lumière. Par ailleurs le phénotype s'exprimait également en système non carencé en lumière continue mais avec une expressivité moindre. L'enzyme purifiée se comportait comme une enzyme D classique respectant par exemple la règle des liaisons interdites. Colleoni *et al.* (1999b) avaient aussi clairement mis en évidence que l'enzyme était particulièrement active sur les chaînes externes de polysaccharides. Ils proposaient alors que son rôle physiologique était de récupérer l'énergie contenue dans les malto-oligosaccharides libérés par l'isoamylase. Depuis Critchley *et al.* (2001) ont caractérisé un mutant criblé à partir d'une collection de mutants d'insertion d'*Arabidopsis* produits à l'aide de l'ADN-T. Ce mutant affichait un phénotype opposé à celui de *Chlamydomonas*... à savoir une dégradation ralentie de l'amidon et l'accumulation de malto-oligosaccharides en phase obscure seulement. Il n'y avait pas dans ce système de modification de la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine bien que, comme chez *Chlamydomonas*, ce mutant soit enrichi en amylose. Avant de spéculer davantage sur ces différences il nous restait à prouver que le gène mutant décrit chez *Chlamydomonas* encode bien le même type d'enzyme que chez *Arabidopsis*. Les expériences

rapportées dans cette thèse ne permettent plus aucun doute à ce propos. Mieux, nous avons pu identifier le point précis de la mutation ponctuelle présente dans l'allèle *stall-1* et caractériser dans un même temps les effets dus à une interruption génique. L'expressivité phénotypique accrue montrée par l'interruption fait penser à la sévérité caractéristique d'une mutation impliquée dans la fourniture du substrat ADP-glucose. De plus, la structure altérée particulière de l'amylopectine produite dans cette situation n'est pas non plus sans rappeler celle qui est engendrée par les mutations de la sous-unité régulatrice de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (Van den Koornhuyse *et al.* 1996). Il subsiste cependant une différence importante avec les mutants *stal* déficients pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase. En effet, les mutants dont l'activité de l'enzyme D est altérée, montrent un accroissement significatif de la teneur en amylose. Cette caractéristique semble contradictoire avec une diminution de la teneur en ADP-glucose puisque van den Koornhuyse *et al.* (1996) ont bien montré une diminution très importante de la teneur en amylose dans les mutants appauvris en ADP-glucose. L'accroissement de la quantité d'amylose peut se comprendre de deux façons : soit cet accroissement prend sa source dans une déficience sélective dans la biosynthèse de l'amylopectine comme l'ont suggéré Colleoni *et al.* (1999a) soit cet accroissement relatif vient d'une stimulation de la synthèse de l'amylose due à la présence massive de malto-oligosaccharides dans le mutant. Cette dernière interprétation nous semble aujourd'hui d'autant plus plausible que ces auteurs ont rapporté que la masse de l'amylose produit était significativement plus basse dans les mutants *stall*. Or une stimulation de la synthèse d'un amylose de faible masse est attendue des effets conjugués mais contradictoires de la baisse de la concentration en ADP-glucose d'un côté et de l'accroissement de la concentration en malto-oligosaccharides de l'autre. Il nous reste désormais à vérifier que la concentration en ADP-glucose baisse bel et bien dans les mutants. Le mutant d'*Arabidopsis* n'affiche ni le déficit quantitatif d'accumulation ni la différence caractéristique de distribution de longueur de chaînes de l'amylopectine. Tout se passe donc chez *Arabidopsis* comme si l'ADP-glucose était synthétisé en quantité normale. Nous pensons que l'ATP accessible sans limite à cause de la photophosphorylation court-circuitée chez *Arabidopsis* tous les problèmes énergétiques qui pourraient résulter d'un mauvais recyclage des glucanes. La photosynthèse masquerait par conséquent le rôle de l'enzyme D à la lumière. Pourquoi n'en est-il pas autant chez *Chlamydomonas* ? En carence azotée la réponse est claire : ce système devient vite non-photosynthétique et il ne peut y avoir de compensation énergétique par photophosphorylation. En système non carencé et à la lumière on aurait pu s'attendre à la présence de la compensation. Il n'en est rien ! Nous pouvons spéculer à l'infini sur cette divergence de

comportement à la lumière entre la microalgue et la cellule de feuille d'*Arabidopsis*. Nous nous bornerons à observer que *Chlamydomonas* est probablement plus contraint sur le plan énergétique. En effet la microalgue doit sans cesse pomper un CO₂ bien moins accessible en milieu aqueux qu'il ne l'est dans l'air ambiant... Mais ce sont là que de pures spéculations !

C. La régulation circadienne du métabolisme de l'amidon chez Chlamydomonas. reinhardtii.

Nous avons également prouvé dans ce travail que l'accumulation d'amidon chez *Chlamydomonas* suit un rythme circadien. Les ébauches expérimentales rapportées ici font penser à une dépendance directe de l'horloge circadienne. Nous sommes cependant conscient du caractère très préliminaire de ces études. On pourrait arguer qu'il ne s'agit que d'une dépendance du cycle de division cellulaire qui lui-même dépendrait de l'horloge. Le maintien d'un rythme en carence azotée alors que les divisions sont arrêtées prouve qu'au moins certains éléments de ce rythme ne dépendent pas seulement du cycle. Le système devient arythmique en bloquant le cycle de division et en maintenant la culture à l'obscurité. Le rythme circadien d'accumulation et de dégradation semble donc requérir la présence d'au moins un de ces deux facteurs. Les conséquences de ces observations sur nos études sont nombreuses et importantes. En effet, il sera probablement nécessaire d'apprécier le phénotype de chacune de nos souches mutantes dans ces conditions d'arythmicité cellulaire. Il se pourrait que certains phénotypes soient renforcés et/ou que d'autres au contraire soient moins marqués. L'utilisation actuelle de cellules asynchrones même en condition de carence azotée mais en lumière continue ne nous affranchit pas totalement de l'influence de l'horloge circadienne sur le métabolisme du polysaccharide de réserve. Les cellules passent toutes par des cycles successifs de synthèse et de dégradation de l'amidon dont l'influence peut se révéler non négligeable alors que les cellules sont incapables de subvenir à leurs besoins énergétiques.

VII. Bibliographie générale

Abel, G., Springer, F., Willmitzer, L., and Kossmann, J. (1996). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **10** (6), 981-991.

Adam, M. and Lopez, R. (1998) Use of the *ARG7* gene as an insertional mutagen to clone *PHON24*, a gene required for derepressible neutral phosphatase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet.* **258**, 123-32.

Baba, T., Yoshii, M., and Kainuma K. (1987). Acceptor molecule of granular-bound starch synthase from sweet-potato roots. *Starch/Stärke* **39**, 52-56.

Ball, S. G., Dirick, L., Decq, A. Martiat, J.C. and Matagne, R. F. (1990) Physiology of starch storage in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* **66**, 1-9.

Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. and Decq, A. (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**, 17-26.

Ballicora, M. A., Frueauf, J. B., Fu, Y., Schürmann, P. and Preiss, J. (2000). Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **275**, 1315-1320.

Bin, L., Geiger, D. R. and Shieh, W-J. (1992). Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves. *Plant Physiol.* **99**, 1393-1399.

Blankenship J.E., and Kindle K.L., (1992). Expression of chimeric genes by the light-regulated *cabII-1* promotor in *Chlamydomonas reinhardtii*. A *cabII-1/nit1* gene functions as a dominant selectable marker in a *nit1-nit2*- strain. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5268-5279.

Blauth, S. L., Kim, K. N., Klucinec, J., Shannon, J. C., Thompson, D. and Gultinan, M. (2002). Identification of mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (*sbe1*) in *Zea mays* L. *Plant mol. Biol.* **48**, 287-297.

Boyton, J., Gillham, N., Harris, E., Hosler, J., Johnson, A., Jones, A., Randolph-Anderson, B., Robertson, D., Klein, T., Shark, K. and Sanford, J. (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, **240**: 1534-1538.

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

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 85-112.

Cao, H., James, M. J. and Myers, A. M. (2000). Purification and characterization of soluble starch synthases from maize endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 135-146

Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J-M. and Ball, S. (1999a) Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol.* **120**, 993-1003.

Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomiany, M-C., Liénard, L., Wattebled, F., D'Hulst, C. and Ball, S. (1999b) Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol.* **120**, 1005-1014.

Critchley, J.M., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M. and Smith, S.M. (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**, 89-100.

Dauvillée, D., Mestre, V., Colleoni, C., Slomianny, M-C., Mouille, G., Delrue, B., d'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J-M. and Ball, S. G. (2001). Two loci control phytylglycogen production in the mononuclear green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **125**, 1710-1722.

Davies J. P., Yildiz F., and Grossman A. R. (1994). Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. *Plant Cell*, **6**, 53-63.

de Fekete, M. A. R., Leloir, L. F., and Cardini, C. E. (1960). Mechanism of starch biosynthesis. *Nature* **187**, 918-919.

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

Denyer, K., Barber, L. M., Burton, R., Hedley, C., Hylton, C., Johnson, S., Jones, D., Marshall, J., Smith, A., Tatge, H., Tomlinson, K., and Wang, T. (1995). The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L. *Plant Cell Environ.* **18**, 1019-1026.

Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., and Smith, A. (1996). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.*, **10**, 1135-1143.

Doehlert, D. C. and Knutson, C. A. (1991). Two classes of starch debranching enzymes from developing maize kernels. *J. Plant Physiol.* **138**, 566-572.

Dry, I., Smith, A., Bhattacharyya, M., Dunn, P. and Martin, C. (1992). Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organ of pea and potato. *Plant J.* **2**, 193-202.

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

Edwards, A., Fulton, D. C., Hylton, C. M., Jobling S. A., Gidley, M., Rossner, U., Martin, C. and Smith, A. M. (1999). A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J.* **17**, 251-261.

Edwards, A., Vincken, J.-P., Suurs, L. C. J. M., Visser, R. G. F., Zeeman, S., Smith, A. and Martin, C. (2002). Discrete forms of amylase are synthesized by isoforms of GBSSI in pea. *Plant Cell* **14**, 1767-1785

Eriksson, G. (1969). The waxy character. *Hereditas* **63**, 180-204.

Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, ML., Routier, F., Marianne-Pépin, T., Decq, A., Wieruszeski, JM., Delrue, B., Van den Koornhuyse, N., Bossu, JP., Fournet, B. and Ball, S. (1993) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* **268**, 16223-16230.

Fu, Y., Ballicora, M. A., Leykam, J. F. and Preiss, J. (1998). Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Boil. Chem.* **273**, 25045-25052

Fujita, N., Kubo, A., Francisco, P. B. Jr, Nakakita, M., Harada, K., Minaka, N. and Nakamura, Y. *Planta* **208**, 283-293.

Furukawa, K., Tagaya, M., Inouye, M., Preiss, J. and Fuku, T. (1990). Identification of lysine 15 at the active site in *Escherichia coli* Glycogen synthase: conservation of a Lys-X-Gly-Gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes. *J. Biol. Chem.* **265**, 23837-23842

Gallant, D. J., Bouchet B., Buléon, A. and Pérez, S. (1992). Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46**, S3-S16

Gao, M., Wanat, J., Stinard, P. S., James, M. G. and Myers, A. M. (1998). Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase. *Plant Cell* **10**, 399-412.

Guan, H. P. and Preiss, J. (1993). Differentiation of the properties of the branching isoenzymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* **102**, 1269-1273.

Guan, H., Li, P., Imparl-radosevich, J., Preiss, J. and Kelling, P. (1997). Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme. *Arch. Bioch. Bioph.* **342**, 92-98.

Harn, C., Knight, M., Ramakrishnan, A., Guan, H. P., Keeling, P. L. and Wasserman B. P. (1998). Isolation and characterization of the ZSSIIa and ZSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Mol. Biol.* **37**, 639-649.

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

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

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

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

James, M.G., Robertson, D.S. and Myers, A.M. (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**, 417-429.

Jenkins, P., Cameron, R., and Donald, A. (1993). A universal feature in the starch granules from different botanical sources. *Starch/Stärke* **45**, 417-420.

Jones, G. and Whelan, W.J. (1969) The action pattern of D-enzyme, a transmaltodextrinylase from potato. *Carbohydr. Res.* **9**, 483-490.

Kakefuda, G. and Duke, S. H. (1989). Characterization of pea chloroplast D-enzyme (4- α -glucanotransferase). *Plant Physiol.* **91**, 136-143

Kinderf, I., Li Z., Samuel, M. S., Koshar-Hashezmi, B., Ball, S., Rampling, L. and Morell, M. (2002) The role of the *E. coli glgX* gene in bacterial glycogen metabolism. *Submitted*.

Kindle, K., Schnell, R., Fernandez, E., and Lefebvre, P. (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *J. Cell Biol.*, **109**, 2589-2601.

Kindle, K. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **87**, 1228-1232.

Klein, U. (1987). Intracellular carbon partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **61**, 953-956

Konishi, Y., Nojima, H., Okuno, K., Asaoka, M., and Fuwa, H. (1985). Characterization of starch granules from waxy, nonwaxy and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1965-1971.

Kossmann J, Visser RG, Muller-Rober B, Willmitzer L and Sonnewald U. (1991). Cloning and expression analysis of a potato cDNA that encodes branching enzyme: evidence for co-expression of starch biosynthetic genes. *Mol. Gen. Genet.* **230**, 39-44

Kossmann, J. and Lloyd, J. (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 141-196.

Kreiss, M. (1980). Primer dependent and independent forms of soluble starch synthase from developing barley endosperms. *Planta* **148**, 412-416.

Kuriki, T. and Imanaka, T. (1999). The concept of the α -amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *J. Bioscience and bioengineering* **87**, 557-565.

Lee, E. Y. C., Marshall, J. J. and Whelan W. J. (1971). The substrate specificity of amylopectine-debranching enzymes from sweet corn. *Arch. Bioch. Biophys.* **143**, 365-374.

Leloir, L. F, De Fekete, M.A.R., and Cardini, C. E. (1961). Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *J. Biol. Chem.* **236**, 636-641.

Li, B., Geiger, D.R. and Shieh, W.J. (1992) Evidence for circadian regulation of starch and sucrose synthesis in sugar beet leaves. *Plant Physiol.* **99**, 1393-1399.

Li, Z., Rahman, S., Kosar-Hashemi, B., Mouille, G., Appels R. and Morell M. K., (1999a) Cloning and characterization of a gene encoding wheat starch synthase I. *Theor. Appl. Genet.* **98**, 1208-1216.

Li, Z. Y., Chu, X. S., Mouille, G., Yan, L. L., Kosar-Hashemi, B., Hey, S., Napier, J., Shewry, P., Clarke, B., Appels, R., Morell, M. K. and Rahman, S. (1999b). The localisation and expression of the class II starch synthase of wheat. *Plant Physiol.* **120**, 1147-1155.

Li, Z. Y., Mouille, G., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S., Clarke, B., Gale, K. R., Appels, R., Morell, M. K. (2000). The structure and expression of the wheat starch synthase III gene. Motifs in the expressed gene define the lineage of the starch synthase III gene family. *Plant Physiol.* **123**, 613-624.

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

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

MacDonnald, F. D. and Preiss, J. (1985). Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize. *Plant Physiol.* **78**, 849-852

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

- Manners, D. J.** (1989). Recent development in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydr. Polym.* **16**, 37-82.
- Manners, D. J.** (1997). Observations of the possible involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis. *J. Appl. Glycosci.* **44**, 541-546.
- Marshall, J., Sidebottom, C., Debet, M., Martin C., Smith, A. M. and Edwards, A.** (1996). Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *Plant cell* **8**, 1121-1135.
- Martin, C. and Smith, A. M.** (1995). Starch Biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 971-985
- Matagne, R. F., Loppes, R. and Deltour, R.** (1976). Phosphatases of *Chlamydomonas reinhardtii*: Biochemical and Cytochemical approach with specific mutants. *J. Bacteriol.* **126**, 937-950.
- Mérida, A., Rodriguez-Galan, J.M., Vincent, C. and Romero, J.M.** (1999) Expression of the granule-bound starch synthase I (*Waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated. *Plant Physiol.*, **120**, 401-410.
- Mouille, G., Maddelein, M-L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B. and Ball, S.** (1996). Phytoglycogen processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**, 1353-1366.
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L.** (1992). Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* **11**, 1229-1238
- Müller-Röber, B. T. and Kossmann, J.** (1994). Approaches to influence starch quantity and quality in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* **17**, 601-613.
- Murata, T., Sugiyama, T. and Akazawa, T.** (1965). Enzymatic mechanism of starch synthesis in glutinous rice grains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 371-376.
- Myers, AM., Morell, MK., James, MG. and Ball, SG.** (2000) Recent progress in understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.*, **122**, 989-998.
- Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S., and Nagamine, T.** (1995). Production of waxy (amylose-free) wheats. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 253-259.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E. and Satoh, H.** (1996) 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. *Physiol. Plant.* **97**, 491-498.
- Nelson, O. E., and Rines, H. W.** (1962). The enzymatic deficiency in the *waxy* mutant in maize. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 297-300.
- Pan, D. and Nelson, E.** (1984). A debranching enzyme deficiency in endosperms of the Sugary-1 mutants of maize. *Plant Physiol.* **74**, 324-328.

- Peat, S., Whelan, W. J. and Rees, W. R. (1953).** D-enzyme: a disproportionating enzyme in potato juice. *Nature* **172**, 158.
- Peat, S., Whelan, W.J. and Rees, W.R. (1956)** The enzymic synthesis and degradation of starch: the disproportionating enzyme of potato. *J. Chem. Soc.* **1956**, 44-53.
- Ponstein, A. S., Oosterhaven, K., Feenstra, W. J., and Witholt, B. (1991).** Starch synthesis in potato tubers: identification of the *in vitro* and the *in vivo* acceptor molecules of soluble starch synthase activity. *Starch/Stärke*, **43** (6), 208-220.
- Preiss, J. and Boyer, C. D. (1980).** Mechanisms of saccharide polymerization and depolymerization. (Marshall, J.J., ed.) 161-174 *Academic Press, New York*.
- Preiss, J. (1991).** Biology and molecular biology of starch synthesis and its regulation. *Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol.* **7**, 59-114.
- Preiss, J., and Sivak, M. (1998).** Biochemistry, molecular biology and regulation of starch synthesis. *Genet. Eng. (N. Y.)* **20**, 177-223.
- Quinn J., Li H. H., Singer J., Morimoto B., Mets L., Kindle K., and Merchant S. (1993).** The plastocyanin-deficient phenotype of *Chlamydomonas* ac-208 results from a frame-shift mutation in the nuclear gene encoding preapoplastocyanin. *J. Biol. Chem.* **268**, 7832-7841.
- Rahman, A., Wong, K.-T., Jane, J.-L., Myers, A. M. and James, M. G. (1998).** Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize. *Plant Physiol.* **117**, 425-435.
- Recondo, E. and Leloir, L. (1961).** Adenosine diphosphate glucose and starch biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 85-88.
- Rochaix, J. D., Mayfield, S., Goldschmidt-Clermont, M. and Erickson, J. (1991)** Molecular biology of *Chlamydomonas*. In *Plant molecular biology : a practical approach*. (C. Shaw, ed.), pp. 253-275, IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- Robin, J., Mercier, C., Charbonnière, R., and Guilbot, A. (1974).** Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chem.* **51**, 389-406.
- Rohde, W., Becker, D. and Salamini, F. (1988).** Structural analysis of the *waxy* locus from *Hordeum vulgare*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7185-7186.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989)** *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 2nd ED., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R. and Kossmann, J. (2002)** Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.* **30**, 581-591.

- Shannon, J. C., and Garwood, D. L.** (1984). Genetics and physiology of starch development. In *Starch: chemistry and technology*, 2nd edition, (Whistler, R. L., Bemiller, J. N., and Paschall E. F., eds), pp 25-86, Academic Press, Orlando.
- Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N.** (1983). Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell*. **35**, 225-33.
- Smith, A. M.** (1990) Evidence that the "waxy" protein of pea (*Pisum sativum*) is not the major starch-granule-bound starch synthase. *Planta* **182**, 599-604.
- Starck, D. M., Timmermann, K. P., Barry, G. F., Preiss, J. and Kishore, G. M.** (1992) Regulation of amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* **258**, 287-292
- Steup, M.** (1990). Starch degrading enzymes. Methods in plant biochemistry. **Vol 3**, 103-128
- Sueoka, N.** (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **46**, 83-91.
- Takaha, T., Yanase, M., Okada, S and Smith, S. M.** (1993). Disproportionating enzyme (4- α -glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of potato. *J. Biol. Chem.* **268**, 1391-1396.
- Takeda, Y., Guan, H-P. and Preiss, J.** (1993). Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* **240**, 253-263
- Tam, L-W. and Lefebvre, P. A.** (1993). Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics* **135**, 375-384.
- Teste, M. A., Enjalbert, B., Parrou, J. L. and Francois, J. M.** (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* YPR184w gene encodes the glycogen debranching enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 105-110.
- Thyssen, C., Schlichting, R. and Giersch, C.** (2001). The CO₂-concentrating mechanism in the physiological context: lowering the CO₂ supply diminishes culture growth and economises starch utilisation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. **213**, 629-639.
- Tsai, C. Y. and Nelson, O. E.** (1966). Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science*. **151**, 341-343.
- Tsai, C. Y.** (1974) The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem. Genet.* **11**, 83-95.
- Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A. and Nakamura, Y.** (2002). Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectine structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 1-8.
- van den Koornhuyse, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J. and Ball, S.** (1996) Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16281-16287.

van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buléon, A., Visser, R., and Ball, S. (1998). Amylose is synthesized *in vitro* by extension of and cleavage from amylopectin. *J. Biol. Chem.* **273** (35), 22232-22240.

van de Wal, M. (2000). *Amylose Biosynthesis in Potato: Interaction between Substrate Availability and GBSSI Activity, Regulated at the Allelic Level*. Ph.D. thesis, University of Wageningen, Wageningen, NL.

Vos-Scheperkeuter, G. H., de Boer, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. And Withold, B. (1986). Identification of granule-bound starch synthase in potato tuber. *Plant Physiol.* **82**, 411-416

Vrinten, P. L. and Nakamura, T. (2000). Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiol.* **122**, 255-263

Wakelin, J. H., Virgin H. S., and Crystal E. (1959). Development and comparison of two X-ray methods for determining the crystallinity of cotton cellulose. *J. Appl. Phys.*, **30** (11), 1654-1662.

Wang, Z., Wu, Z., Xing, Y., Zheng, F., Guo, X., Zhang, W. and Hong, M. (1990). Nucleotide sequence of rice *waxy* gene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5898.

Weatherwax, P. (1922). A rare carbohydrate in waxy maize. *Genetics* **7**, 568-572.

Yamamori, M., Fujita, S., Hayakawa, K., Matsuki, J. and Yasui, T. (2000). Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylase. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 21-29

Yeh, J. Y., Garwood, D. L. and Shannon, J. C. (1981). Characterization of starch from maize endosperm mutants. *Starch/Starke* **33**, 222-230.

Zabawinski, C., Van den Koornhuyse, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J.-M., Preiss, J. and Ball, S. (2001). Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase. *J. Bacteriol.* **183**, 1069-1077.

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

Zeeman, S. C., Umemoto, T., Lue, W. L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A. M. and Chen, J. (1998b) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytylglycogen. *Plant Cell* **10**, 1699-1712.

Zeeman, S. C., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, K. L., Donald, A. M. and Smith, A. M. (2002a). Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition and structure. *Plant Physiol.* **129**, 516-529.

Zeeman, S. C., Smith, S. M. and Smith, A. M. (2002b) The priming of amylose synthesis in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **128**, 1069-1076.

Zhang, H., Herman, P. and Weeks, D. (1994) Gene isolation through genomic complementation using an indexed library of *Chlamydomonas reinhardtii* DNA. *Plant Mol. Biol.* **24**, 663-672.