

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Biologie Santé

Présentée par

Sylvain Dumez

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

Analyse fonctionnelle des enzymes de branchement de l'amidon de la feuille d'*Arabidopsis thaliana*

Présentée le 12 mai 2006 devant la commission d'examen composée de :

Président : J-C. Michalski

Rapporteurs : M. James
H. Hofte

Examineurs : V. Planchot
A. Blennow
S. G. Ball

Directeur de thèse : C. d'Hulst



Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle. Je remercie le Docteur Jean-Claude Michalski, Directeur de l'Unité et président de la commission d'examen de ce travail.

I would like to thank Professor Martha James who accepted the hard task to review this work. I would also apologize for the very short delay between the reception of the manuscript and the date of transmission of reports.

Je remercie le Professeur Herman Hofte pour sa présence en qualité de rapporteur et pour le travail que cela représente. Je tiens à m'excuser pour le peu de temps séparant la réception de ce manuscrit et la date de transmission du rapport.

Je remercie également le Docteur Véronique Planchot à la fois pour sa présence dans la commission d'examen de ce travail et pour l'excellente collaboration entre nos deux équipes. I also thank the Professor Andreas Blennow for his presence in the examination commission of this work.

Je souhaiterais remercier le Professeur Steven Ball pour ses nombreux conseils avisés durant ces années, je vous remercie également en tant qu'examinateur de ce travail.

Un grand merci au directeur de ce travail, le Docteur Christophe d'Hulst. Tu m'as accueilli et fait confiance en DEA et tu as renouvelé cette confiance pour la thèse pour ce qui n'était encore que le début du projet « Arabido ». Merci pour tes nombreux conseils, encouragements et discussions, parfois agrémentées d'un verre sympa.

Merci à tous ceux qui m'ont accompagné durant ces (presque) 5 années, mes compères « Arabido » David, Fabrice, Ying, Nico « la relève », Olivier, Margo et Tanguy, sans oublier Luc, Jean-Phi, Kim, Djé, Vincent, Clément, Seb ainsi que ceux qui continuent leur bonhomme de chemin au 002-005 : David, Coco, Philippe, Charlotte et Aline.

Remerciements à tous ceux, trop nombreux pour être tous cités qui ont contribué de près ou de loin à ce que ce travail et ces 5 années se déroulent dans d'excellentes conditions.

Un grand merci à Karine pour son soutien, son amour et sa patience.

Merci à ma mère sans qui je ne serai bien évidemment pas là et qui m'a permis de faire ces longues études.

Enfin, mes pensées vont vers mon père et ma grand-mère, qui là-haut j'espère, me regardent.

A Guillaume, simplement.



Abréviations

3-PGA	: 3-phosphoglycérate	G3PDH	: Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
ADH	: Alcool déshydrogénase	G6P	: Glucose-6-phosphate
ADN	: Acide désoxyribonucléique	GBSS	: Amidon-synthétase liée au grain
ADNc	: Acide désoxyribonucléique complémentaire	λ_{max}	: Longueur d'onde du maximum d'absorbance
ADN-T	: Acide désoxyribonucléique de transfert	LB	: Luria-Bertani
ADPG	: Adénosine diphosphoglucose	MOS	: Malto-oligosaccharides
AGPase	: Adénosine diphosphoglucose pyrophosphorylase	NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide
APTS	: Acide-8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique	NADP	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ARN	: Acide ribonucléique	pb	: Paire de bases
ARNm	: Acide ribonucléique messenger	PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
ATP	: Adénosine triphosphate	Pi	: Orthophosphate
BE	: Enzyme de branchement	SDS	: Sodium dodécyl sulfate
BET	: Bromure d'éthidium	SS	: Amidon-synthétase soluble
BSA	: Sérum albumine bovine	TBE	: Tris Borate EDTA
Col-0	: Ecotype Columbia d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	THF	: Tétra Hydro furane
Coll.	: Collaborateurs	TLC	: Chromatographie sur couche mince
Da	: Dalton	Tris	: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
DBE	: Enzyme de débranchement	WSP	: Water Soluble Polysaccharides
DMSO	: Diméthylsulfoxyde	WS	: Ecotype Wassileskija d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
DO	: Densité optique	WT	: Type sauvage
DP	: Degré de polymérisation		
EDTA	: Acide éthylène diamine tétracétique		
G1P	: Glucose-1-phosphate		

SOMMAIRE

Introduction	9
A- <u>La place économique de l'amidon</u>	10
B- <u>Le grain d'amidon : une structure complexe et organisée</u>	11
a. Du glucose et de deux liaisons	12
b. L'amylose	12
c. L'amylopectine	13
d. Le grain d'amidon forme une superstructure	15
e. l'interaction avec l'iode	18
f. Les autres constituants du grain	20
C- <u>La synthèse de l'amidon</u>	20
a. L'initiation : la grande inconnue	21
b. La synthèse du glycosyl-nucléotide précurseur	23
c. L'élongation des glucanes	26
a. <i>L'amidon synthétase liée au grain (GBSSI)</i>	27
b. <i>Les amidon-synthétases solubles</i>	30
d. L'introduction des points de branchements	33
a. <i>Les enzymes de branchement appartiennent à la super famille des α-amylases</i>	33
b. <i>Les méthodes d'étude</i>	36
c. <i>La nomenclature</i>	37
d. <i>Les SBEs de la famille A</i>	38
e. <i>Les SBEs de la famille B</i>	40
f. <i>Les enzymes de branchement d'Arabidopsis thaliana</i>	40
g. <i>Les SBEs au centre d'interactions fonctionnelles et/ou physiques ?</i>	41
e. A la frontière entre cristallisation et dégradation : la participation des enzymes de débranchement	44
a. <i>Les isoamylases</i>	44
b. <i>La pullulanase</i>	46

D- <u>La dégradation de l'amidon et la mobilisation des réserves</u>	48
a. La phosphorylation de l'amidon est un requis obligatoire	48
b. La voie hydrolytique	49
c. La voie phosphorolytique	53
d. La nature du produit formé	54
e. Le transport du maltose	54
f. Le devenir du maltose	55
E- <u>Le choix d'<i>Arabidopsis thaliana</i></u>	57
F- <u>Objectifs du travail de thèse</u>	61
Matériel et méthodes	62
Produits	63
Les lignées d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et les conditions de culture utilisées	63
Croisements	63
A- <u>BIOLOGIE MOLÉCULAIRE</u>	64
a. Extraction d'ADN génomique	64
b. Sélection des lignées homozygotes mutantes	64
c. Extraction des ARN totaux	65
d. RT-PCR	65
e. Clonage des ADNc et expression chez <i>E. coli</i>	
des enzymes de branchement d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
<u>Souches d'<i>Escherichia coli</i></u>	65
<u>Plasmides utilisés</u>	65
<u>Milieu de croissance bactérien</u>	66
<u>Clonage des ADNc</u>	66
<u>Expression des protéines</u>	67
f. Analyse transcriptomique	67
B- <u>TECHNIQUES BIOCHIMIQUES</u>	68
a. Extraction et purification de l'amidon	68
b. Extraction des sucres solubles	69
c. Dosage des teneurs en amidon et en glucanes solubles	69
d. Dosages des contenus en glucose, fructose, saccharose, G1P et G6P	69

e. Détermination des propriétés spectrales du complexe iode/ polysaccharide (λ_{\max})	70
f. Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique	70
g. Fractionnement des polysaccharides solubles par chromatographie d'exclusion stérique	71
h. Distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine et des polysaccharides solubles	71
i. Mesure du taux de branchement de l'amylopectine	72
j. Chromatographie sur couche mince (TLC)	72
k. Détermination de l'anomérisation du maltose	73
l. Microscopie électronique à transmission	73
m. Mesures de diffraction aux rayons X	73
C- <u>TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES</u>	74
a. Extraction des protéines des feuilles	74
b. Dosage des protéines	74
c. Les gels d'activités ou zymogrammes	74
<i>Zymogramme des activités amidon-synthétases solubles</i>	74
<i>Zymogramme des activités modifiant l'amidon</i>	75
<i>Zymogramme des activités amidon-phosphorylases</i>	75
<i>Zymogramme des activités phosphoglucomutases</i>	75
<i>Zymogramme des activités de branchement</i>	75
<i>Zymogramme de la transglucosidase DPE2</i>	76
d. Dosages <i>in vitro</i> des activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon	76
<i>Dosage des enzymes de branchement</i>	76
<i>Dosage des amidon-synthétases solubles</i>	76
<i>Dosage de l'ADP-glucose pyrophosphorylase</i>	77
<i>Dosage des activités β-amylases</i>	77
<i>Dosage de l'activité α-1,4 glucanotransférase</i>	77
<i>Dosage de l'activité pullulanase</i>	78
<i>Dosage des activités α-amylases</i>	78
<i>Dosage des activités amidon-phosphorylases</i>	78

e. Western Blot	78
f. Méthode de fractionnement non aqueux	79
g. Préparation des échantillons pour les dosages des activités et la détermination des quantités de polysaccharides solubles	80
h. Dosages des marqueurs enzymatiques	80
Résultats	81
<u>Mutants of Arabidopsis lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation.</u>	82
Abstract	83
Introduction	84
Results	87
<i>The nuclear genome of Arabidopsis contains three candidate genes putatively encoding starch branching enzymes.</i>	87
<i>Selection of insertion mutations in genes AtBE1, AtBE2, AtBE3.</i>	89
<i>Mutations in AtBE2 and AtBE3 abolish two distinct starch branching enzyme activities.</i>	90
<i>Impact of the mutations on starch accumulation levels and growth phenotype</i>	92
<i>Structural analysis of starch and WSG</i>	94
<i>The MOS in the Atbe2-1/Atbe3-2 mutants essentially accumulate in the cytosol</i>	97
<i>The production of maltose is strongly reduced in adg1 mutant background</i>	99
<i>Transglucosidase DPE2 requires β-maltose to be active.</i>	100
Discussion	101
Acknowledgments	105
Résumé en français	106

<u>Résultats complémentaires</u>	107
<i>Autres études structurales des amidons des lignées mutantes</i>	108
<i>Impact des mutations sur d'autres activités du métabolisme de l'amidon (2)</i>	109
<i>L'abolition de l'expression d'adg1 n'est pas complète dans la lignée mutante utilisée</i>	110
<i>La lignée Atbe2-1/Atbe3-2 voit l'expression de plusieurs centaines de ses gènes modifiée</i>	111
Discussion	113
Bibliographie	119
Annexes	145
Annexe I	146
Annexe II	147
Annexe III	148
Annexe IV	149
Annexe V	151
Annexe VI	158
Annexe VII	161

INTRODUCTION

A- La place économique de l'amidon

Au 1^{er} siècle avant JC, un médecin grec nommé Dioscoride désigna l'amidon à partir d'un terme signifiant « sans meule » car sa préparation s'effectuait par macération contrairement à la fabrication de la farine qui nécessitait une action physique de broyage. Il en parle comme d'une substance utilisée notamment en médecine. Si l'art d'extraire ce polymère et ses premières applications remontent à l'Antiquité, l'apparition d'une industrie amylicée et le développement des potentialités offertes par l'amidon date de l'après seconde guerre mondiale. Cet essor industriel s'accompagna des travaux des chercheurs qui permirent l'amélioration constante des connaissances de la structure et des propriétés de l'amidon.

Principalement réalisée à partir du blé et de la pomme de terre, la production française d'amidon a atteint plus de 2,7 millions de tonnes en 2004, soit 30% du volume total produit dans l'union européenne mais se situe loin derrière les Etats-Unis, incontestables leaders mondiaux de ce marché, qui ont produit plus de 25 millions de tonnes dans le même temps essentiellement à partir de la culture du maïs. Ces chiffres traduisent le

succès de l'amidon et de ses nombreux dérivés auprès d'industries variées, demandeuses de produits renouvelables et biodégradables. La multiplicité de ces produits, tant dans le domaine alimentaire qui absorbe 50% des utilisations des produits amylicés, que non-alimentaire illustre la diversité et l'originalité des propriétés offertes par ce polysaccharide et ses dérivés qui épaississent, collent, gélifient, agglomèrent, lient, sucent, fixent, fluidifient, humidifient, colorent, acidifient, lubrifient... sans oublier leurs qualités nutritives et énergétiques. Le large panel des utilisations de l'amidon passe des confitures jusqu'à la confiserie, la boulangerie, la brasserie, mais encore la pharmacie, la papeterie, les adhésifs, les matériaux de construction...

L'exemple d'utilisation le plus surprenant vient de certaines industries qui proposent par pulvérisation de grains d'amidon de blé le décapage à sec de coques d'avions et même de carrosseries utilisées par les écuries de Formule 1. Cette technique se place comme une excellente alternative par l'utilisation d'un produit totalement naturel et biodégradable associant hauts rendements et protection de l'environnement aux méthodes classiques de ponçages fastidieuses et polluantes.

Mais le polysaccharide natif tel qu'il est synthétisé dans le végétal ne

trouve une application directe que dans seulement 23% des cas. Le plus fréquemment, les amidonniers doivent le transformer et l'ajuster aux besoins de leurs clients par voie chimique ou physique (amidons modifiés) ou par l'action d'enzymes hydrolytiques conduisant aux dextrines et sirops de glucose.

Dans le domaine alimentaire, les principales modifications visent à adapter l'amidon aux contraintes technologiques qui résultent de la cuisson, des congélations/décongélations ou de la stérilisation et de le rendre compatible avec des utilisations alimentaires modernes (micro-ondes, préparations instantanées). Un des objectifs de ces transformations est de limiter au cours de la cuisson la tendance naturelle du polymère à s'hydrater au contact de l'eau (la rétrogradation) : les granules gonflent et la viscosité de la solution augmente. Lors du refroidissement, les grains se réassocient, forment un gel (la gélatinisation) et libèrent une partie de l'eau fixée (la synérèse). L'emploi d'amidons modifiés permet au final une meilleure conservation des aliments, une amélioration de leur stabilité et de leur aspect.

Source inépuisable d'utilisations des plus variées, l'amidon n'a pas encore livré tous ses secrets. Les professionnels

cherchent continuellement à améliorer les procédés de transformations de cette merveilleuse molécule afin d'augmenter les rendements tout en diminuant les coûts de production. Toutefois les modifications apportées réclament une parfaite maîtrise de ses propriétés physico-chimiques et des voies enzymatiques qui conduisent à sa synthèse. Nombre d'enzymes impliquées dans sa structuration *in vivo* sont maintenant bien connues, mais nous sommes encore loin d'une compréhension totale du rôle porté par chacune des nombreuses activités dans la synthèse ou dans la dégradation.

B- Le grain d'amidon : une structure complexe et organisée

L'amidon représente la principale forme glucidique de réserve des végétaux. Produit ultime de l'assimilation du carbone par la photosynthèse, il est synthétisé au niveau des plastes sous la forme de grains insolubles dans l'eau. Ces plastes sont les chloroplastes, au niveau des tissus photosynthétiques comme la feuille, et les amyloplastes au sein des organes de réserve (tubercules de pomme de terre par exemple ou albumens des céréales). Dans le premier cas, on parlera d'amidon transitoire, synthétisé le jour et consommé durant la nuit, et dans le second, d'amidon

de réserve, stocké à plus long terme et ne subissant pas d'un rythme quotidien de synthèse et de dégradation. Un type d'amidon méconnu est l'amidon floridéen synthétisé dans le cytoplasme des rhodophytes (algues rouges). Ce terme est également utilisé pour nommer le polysaccharide trouvé chez les glaucophytes, les cryptophytes, les dinoflagellés ainsi que chez certains parasites apicomplexa comme *Toxoplasma gondii* (Coppin et coll., 2005) et *Eimeria* (Ryley et coll., 1969).

a. Du glucose et deux liaisons

Tout comme le glycogène, un autre polysaccharide de réserve présent chez les animaux, les champignons et les bactéries, l'amidon ne contient que des résidus de glucose reliés entre eux par seulement deux types de liaisons O-glycosidiques : α -1,4 et α -1,6. Les premières forment le squelette linéaire de la molécule tandis que les secondes assurent sa ramification. Bien que partageants le même agencement élémentaire, les ressemblances structurales entre les deux polymères s'arrêtent ici. Le glycogène s'organise sous la forme d'une particule amorphe et hydrosoluble (figure 1) tandis que l'amidon possède une structure très complexe avec plusieurs niveaux d'organisations structurales. Cette organisation est bien plus complexe que ne le laisse concevoir sa composition fort

simple. Contrairement au glycogène, deux molécules très différentes par leur structure et leurs propriétés physico-chimiques coexistent au sein du grain : l'amylopectine et l'amylose. Mais la particularité singulière de l'amidon est d'être partiellement cristallin, caractéristique qu'il partage avec peu de macromolécules.

b. L'amylose

La part de l'amylose dans le poids sec du polysaccharide varie entre 18 et 33% selon l'origine végétale et les conditions de culture. 100 à 10000 résidus de glucose composent ses chaînes qui forment une molécule d'une masse de 10^4 à 10^6 Da. Le faible taux de ramification, très inférieur à 1%, conduit à qualifier à tort l'amylose de molécule linéaire. Bien que cette caractéristique soit démontrée par

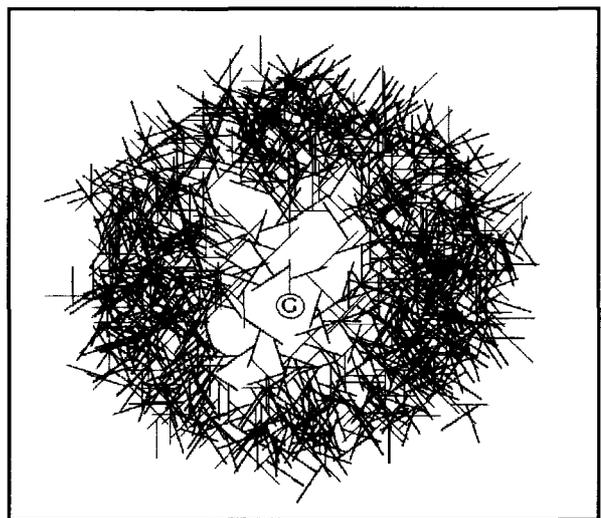


Figure 1 : représentation théorique d'un grain de glycogène selon Meléndez et coll. (1998) élaborée à l'aide d'un modèle mathématique autorisant la croissance des chaînes en 3D. Les paramètres utilisés sont ceux du glycogène cellulaire : longueur moyenne des chaînes : 13 glucoses avec deux liaisons α -1,6 par chaîne et une molécule limitée à 12 étages.

sa haute sensibilité à la digestion par la β -amylase, une exo-amylase qui libère du maltose à partir d'une extrémité non-réductrice sans hydrolyser les liaisons α -1,6 (Takeda et coll., 1987), certaines parties de la molécule résistent à cette attaque enzymatique. L'analyse des β -limites dextrans résiduelles montre que les points de branchement sont inégalement répartis au sein du polymère pour se concentrer dans certaines régions et générer des petites grappes plutôt que d'aboutir à une production équilibrée des sites de ramifications qui conférerait à la structure une allure en peigne (Hizukuri et coll., 1997 ; pour revue Buléon et coll., 1998).

La nature biochimique de l'amylose lui confère des propriétés bien différentes de celles de l'amylopectine détaillée ci-après. Elle lui permet notamment de s'associer avec certaines petites molécules hydrophobes comme des lipides, en particulier chez les céréales (Morrison, 1995).

Néanmoins, des mutants devenus incapables de synthétiser l'amylose, accumulent un amidon normalement structuré en quantité semblable à celle du sauvage de référence. L'amylose est ainsi totalement dispensable à la cristallinité du

grain. Sa localisation précise et son interaction avec les autres déterminants du grain d'amidon restent inconnus. Il se trouverait principalement dans les zones amorphes du grain, sensibles à l'hydrolyse acide (Blanshard, 1987).

c. L'amylopectine

La fraction amylopectine constitue 70 à 80% du poids sec de l'amidon, et à ce titre représente la fraction majeure du grain. C'est une molécule de haute masse (10^7 à 10^8 Da) qui présente un degré de polymérisation compris entre 50000 et 500000 résidus de glucose. Contrairement à l'amylose, l'amylopectine affiche un taux de branchement modérément élevé de 5 à 6%. C'est une caractéristique qu'elle partage avec le glycogène, qui est encore plus branché avec en moyenne 8 à 10% de liaisons α -1,6. Mais la structure amorphe du glycogène ne ressemble en rien à l'organisation parfaitement orchestrée du polymère de réserve végétal. Là où les points de branchement sont disposés aléatoirement dans le glycogène, ils sont, pour l'amylopectine, concentrés dans certaines régions de la molécule nommées lamelles amorphes. Une telle répartition des ramifications confère à l'amylopectine une structure dite en « grappes ». La charpente linéaire des α -1,4 glucanes s'ordonne en doubles hélices parallèles que l'on retrouve au sein de la lamelle

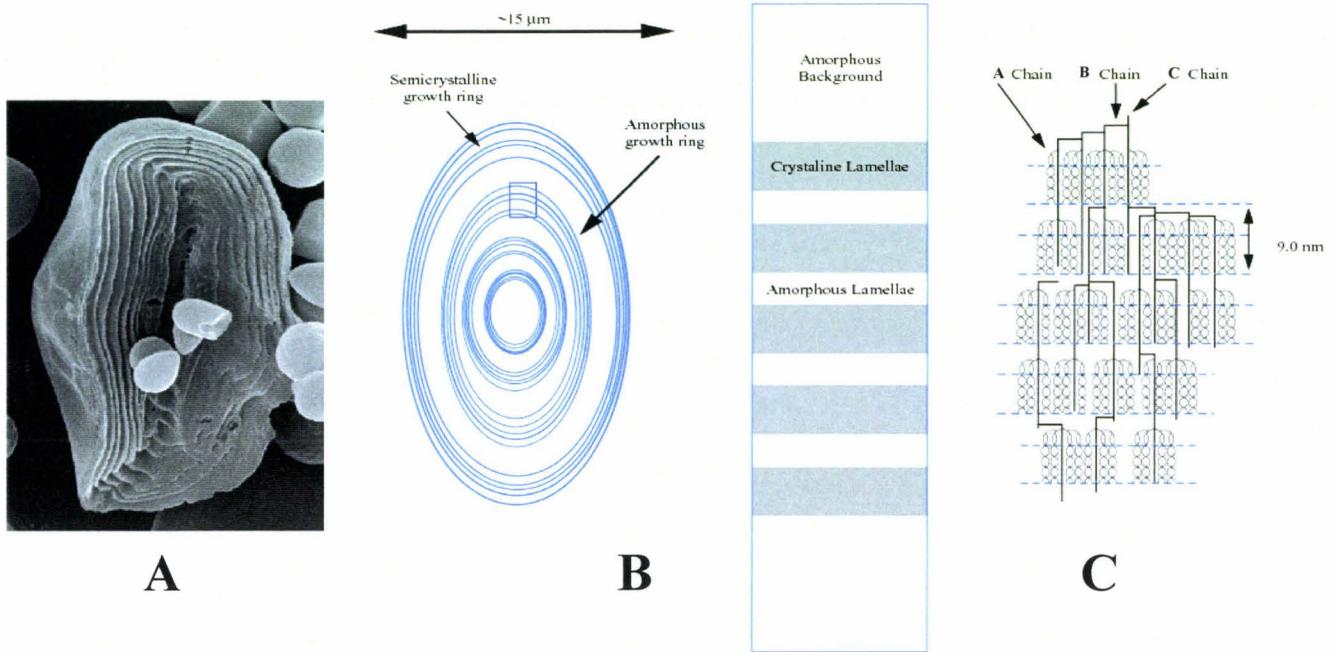


Figure 2 : représentation des différents niveaux d'organisation d'un grain d'amidon. **A :** photo en microscopie électronique à balayage d'un grain d'amidon de blé ayant subi une attaque ménagée par des α -amylases. Les structures concentriques encore visibles (0,1 à 0,5 μm d'épaisseur) correspondent aux zones cristallines résistantes à la dégradation enzymatique ménagée. **B :** représentation schématique de l'alternance des régions amorphes et semi-cristallines et agrandissement d'une zone semi-cristalline où alternent lamelles amorphes et cristallines. **C :** schématisation d'une molécule d'amylopectine en relation avec la figure B. Les points de ramification se concentrent dans les lamelles amorphes alors que les glucanes organisés en doubles hélices parallèles coïncident avec les lamelles cristallines. La taille cumulée d'une lamelle amorphe et d'une lamelle cristalline fait 9 nm quelle que soit l'origine botanique de l'échantillon d'amidon considéré. On désigne par « C » l'unique chaîne de la molécule d'amylopectine porteuse de l'extrémité réductrice. Les glucanes désignés par la lettre « A » sont les plus externes de la molécule et sont supportés par des glucanes plus « internes » désignés par « B ».

cristalline rendant la structure insoluble et partiellement cristalline(fig. 2B).

Le couple lamelle cristalline / lamelle amorphe est retrouvé avec une périodicité de 9 nm, quelle que soit l'origine botanique de l'amidon étudié (Jenkins et coll., 1993). Cette invariabilité augure un mode de synthèse très contrôlé et parfaitement conservé à travers le règne végétal.

Le modèle de la grappe ou « cluster » en anglais (Robin et coll., 1974 et French 1974) suggère que la molécule

d'amylopectine soit constituée par différentes classes de chaînes nommées A, B et C. Ce modèle est cohérent vis-à-vis des résultats de distribution polymodale des longueurs des chaînes constitutives de l'amylopectine (Hizukuri, 1986). L'unique chaîne C est la seule à posséder une extrémité réductrice, pointée vers le centre du grain (le hile). Elle est ramifiée par les chaînes B ($16 \leq DP \leq 80$) qui sont elles-mêmes ramifiées par d'autres chaînes B ou par des chaînes A. Ces dernières sont les plus externes et les plus courtes ($DP \leq 16$) mais également les plus nombreuses. Elles

ne portent aucune ramification et sont retrouvées au sein d'une seule grappe.

En 1986, Hizukuri débrancha par une approche enzymatique plusieurs amidons et en sépara les chaînes libérées par HPLC. Il démontra que certaines chaînes B participent à l'élaboration de plusieurs grappes et révisa à la fois le modèle préétabli de la structure de l'amylopectine et la classification de ces chaînes B en fonction du nombre de grappes dans lesquelles elles sont impliquées. Ainsi, les chaînes B1 sont restreintes à une seule grappe tandis que les chaînes B2 et B3 s'étendent sur respectivement deux et trois grappes, les chaînes B4 reliant au moins quatre grappes. Les résultats de ces mêmes travaux suggèrent que les chaînes A et B1, situées en positions les plus externes, doivent jouer un rôle dans le type cristallin de l'amidon (voir ci-après). Cette hypothèse est appuyée plus tard par Manners (1989) qui estime la proportion des chaînes externes entre 80 et 90% pour seulement 10 à 20% de chaînes engagées dans les liaisons inter grappes.

d. Le grain d'amidon forme une superstructure

Les grains d'amidon arborent des formes généralement sphériques ou ovoïdes et leur diamètre varie de 0,1 jusqu'à 100 μm selon la source végétale. La répartition de la taille de ces grains est le plus souvent homogène, centrée sur une valeur moyenne, excepté chez certaines céréales comme le blé, l'orge ou l'avoine chez lesquelles coexistent deux populations différentes de grain nommées « A » et « B », pour respectivement les grandes (15 à 30 μm) et les petites tailles (2 à 3 μm) (Buléon et coll., 1998). Aucune explication plausible n'éclaire à ce jour cette disparité, particulière à ces espèces.

La figure 2A représente un grain d'amidon de blé après une α -amylolyse ménagée. Certaines parties, encore visibles, ont résistées à la dégradation. Ces zones de 100 à 500 nm d'épaisseur sont les régions semi-cristallines organisées par appositions successives de lamelles cristallines et amorphes. Cette organisation coïncide avec la structure de l'amylopectine évoquée précédemment. Les zones dégradées par les α -amylases, sont des régions avec une organisation beaucoup plus lâche et par conséquent une accessibilité aisée à l'hydrolyse enzymatique. La répétition régulière des

zones semi-cristallines et amorphes constitue les anneaux de croissance, observables en microscopie, centrés sur le hile. L'absence des anneaux de croissance dans des amidons d'albumen de blé ou d'orge cultivés en lumière continue (Buttrose 1960 et 1962) fit penser que cette alternance reflétait le rythme jour/nuit. Mais les anneaux sont toujours présents dans des amidons issus de tubercules de pomme de terre cultivés dans les mêmes conditions (Pilling et Smith 2003). Plusieurs facteurs tant physiques (température, encombrement stérique) que biologiques (disponibilité du substrat) doivent contrôler la formation des anneaux de croissance et doivent varier d'un organisme à l'autre.

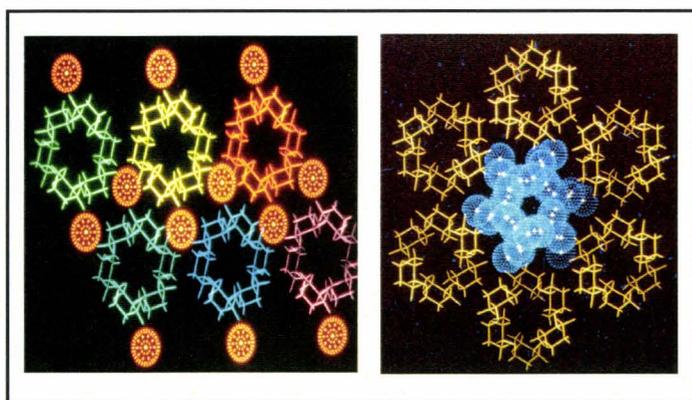


Figure 3 : représentations en coupe transversale des mailles cristallines de type A (à gauche) et B (à droite) usuellement retrouvées au sein des grappes de l'amylopectine. Les sphères oranges (à gauche) et bleues (à droite) schématisent les molécules d'eau au sein des structures.

Dans des grains d'amidon natifs, les taux de cristallinité varient entre 15 et 45% (Zobel, 1988). Ainsi, bien qu'il s'agisse d'une caractéristique importante,

la cristallinité n'est pas le principal mode d'organisation adopté par l'amidon.

Selon l'origine de l'amidon étudié, plusieurs types de cristallinité (allomorphes) existent (figure 3) et fournissent des profils de diffraction aux rayons-X différents. Dans le type A, les doubles hélices sont empacotées de manière plus dense que dans le type B (Imberty et coll., 1987) où, plus hydratées, elles s'arrangent de manière à former au centre un espace creux dans lequel s'enchâssent les molécules d'eau (Imberty et Pérez, 1988). Le type A est retrouvé principalement chez les céréales et le type B dans les amidons issus des tubercules. En 1986, Hizukuri propose que le type cristallin (A ou B) dépend des proportions de chaînes A et B1 dans l'amylopectine. Un troisième type de cristallinité nommé C, rencontré chez certaines légumineuses comme le pois résulterait de la présence simultanée des types A et B (Galland et coll., 1997). Enfin, le profil V, engendré par la formation d'un complexe entre l'amylose et des lipides comme des acides gras ou des monoglycérides peut apparaître lors de la gélatinisation de l'amidon.

Comment s'organisent les cristaux dans le grain ? Galland et coll. en 1997 à partir d'observations en microscopie

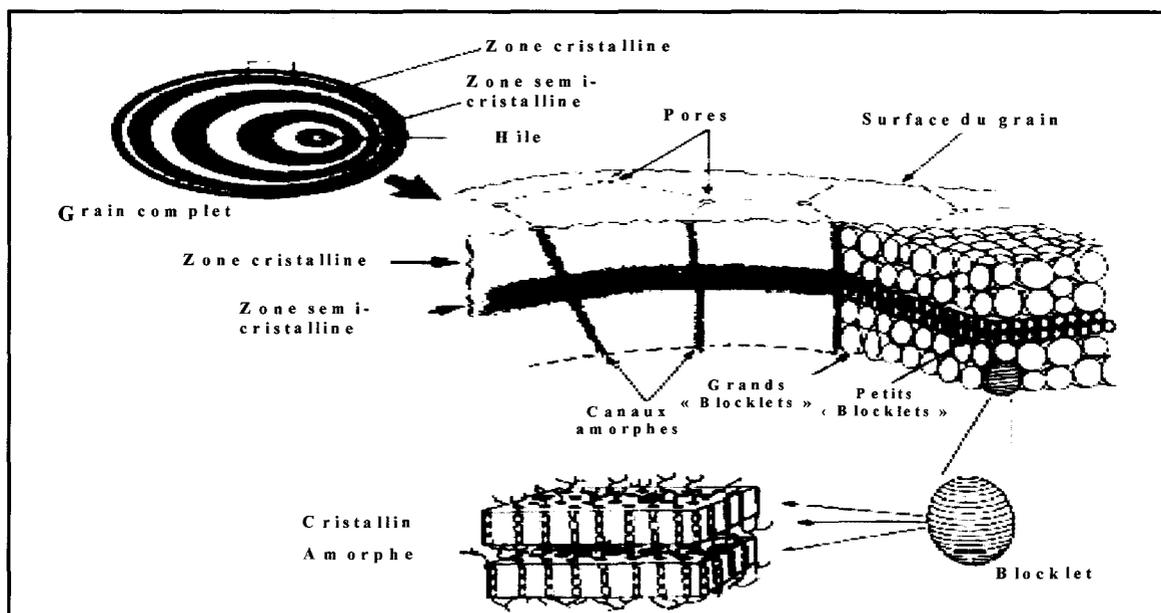


Figure 4 : représentation schématique du modèle d'organisation des structures cristallines de l'amylopectine présentée par Galland et coll. (1997). Les « blocklets » d'une taille variant de 20 à 500 nm sont plus grands dans les zones cristallines du grain (celles résistantes à une hydrolyse ménagée) alors que leur taille est réduite dans les zones semi-cristallines.

électronique et en microscopie de force atomique, présentent un modèle basé sur l'existence de « blocklets » (figure 4). Dans cet ancien concept les grains sont composés d'unités cristallines encastées dans du matériel amorphe. Il s'agit d'un niveau supérieur d'organisation de l'amylopectine, sous la forme d'ovoïdes de 20 à 500 nm de diamètre selon l'amidon étudié et la localisation du blocklet à l'intérieur du granule. Les plus gros blocklets (50 à 500 nm) forment des zones plus résistantes aux dégradations enzymatiques par comparaison avec des blocklets moins gros (20 à 50 nm). Ces conclusions cadrent avec les observations des zones amorphes, qui contiennent de petits blocklets.

En observant un grain d'amidon sous la lumière polarisée, on voit apparaître une croix de biréfringence ou croix de Malte centrée sur le hile (figure 5). Cela indique une orientation perpendiculaire des molécules d'amylopectine et d'amylose par rapport aux anneaux de croissance et à la surface du grain. Comment est agencé l'amylose au sein du grain ? Jenkins et Donald ont suivi en 1995 l'influence de la quantité d'amylose sur les régions cristallines. Ils ont observé l'augmentation de la taille de la lamelle amorphe et ce au détriment de la lamelle cristalline car la périodicité de 9 nm précédemment évoquée est conservée. Dans le même temps, la densité aux électrons de la lamelle cristalline diminue

avec l'augmentation du taux d'amylose. Ces résultats suggèrent que l'amylose perturbe la conformation cristalline de l'amylopectine. Ils proposent alors deux mécanismes pour expliquer ces phénomènes. Dans le premier, l'amylose pénètre la lamelle amorphe au détriment de la taille de la lamelle cristalline et dans le second, l'amylose co-cristallise avec l'amylopectine.

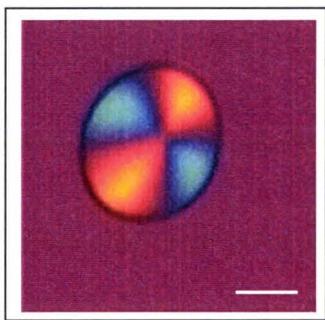


Figure 5 : grain d'amidon de tubercule de pomme de terre observé en lumière polarisée. La barre représente 5 µm. D'après Zeeman et coll. 2002.

Afin de mieux situer ces deux molécules à l'intérieur du grain, Atkin et coll. ont en 1999 marqué de l'amidon non dégradé avec des enzymes affines pour les liaisons α -1,4 et α -1,6 de l'amidon couplées à des particules d'or. L'architecture du granule est ainsi conçue par des régions cristallines d'amylopectine séparées par des régions amorphes constituées presque exclusivement d'amylose. Ce modèle nous ramène à l'image des anneaux de croissance du grain. Malheureusement les limites de cette technique ne permettent pas d'examiner les molécules à l'échelle de la lamelle.

e. L'interaction avec l'iode

L'interaction des glucanes avec l'iode moléculaire est une propriété couramment utilisée dans les recherches sur l'amidon. L'extrême simplicité de la méthode de coloration en a fait, et en fait toujours, un outil de choix dans l'histoire de l'étude de ce polymère.

Les premières hypothèses sur la formation d'un complexe iode/polysaccharide se développèrent à partir des observations de Hanes en 1937. Au cours de la dégradation enzymatique de l'amidon, la couleur formée avec l'iode diminuait d'intensité. Hanes postula que l'amylose s'enroulait en spirale en solution et que chaque tour de cette spirale mesurait 6 unités de glucose, minimum requis pour observer une coloration. Dans cette configuration, les molécules d'iode se situaient à l'intérieur de l'hélice. Cette hypothèse fut adoptée et par la suite corroborée par les études de Freudenberg et coll. en 1939 et de Bates et coll. en 1943 qui vérifièrent qu'une telle conformation permettait aux atomes d'hydrogènes pointés vers l'intérieur de la cavité d'interagir avec l'iode.

En 1948, Gilbert et Marriot examinèrent la nature du complexe entre l'amylose et l'iode. Ils s'aperçurent que la forte coloration bleue était obtenue en

présence d'ions $3I_2 \cdot 2I^-$. Ils considèrent que la couleur rouge obtenue en colorant des chaînes plus courtes résultait de la faible capacité de ces chaînes à fixer des ions de cette taille.

Bailey et Whelan en 1961 puis Banks et coll. (1971) ont poursuivi la description de cette propriété et de son utilité pour caractériser les longueurs des glucanes (tableau 1). La longueur du glucane influe sur sa capacité à fixer les

molécules d'iode, avec un minimum requis de 12 résidus de glucose. En résumé, plus le glucane est long, plus il peut fixer l'iode, ce qui augmente la longueur d'onde du maximum d'absorbance du complexe formé (appelée plus succinctement λ_{max}). Les points de branchement en α -1,6 empêchent l'agencement en doubles hélices et sont donc des freins à la fixation de l'iode.

Tableau 1 : variation de la longueur d'onde du maximum d'absorbance du complexe formé entre l'iode et des glucanes de différents degrés de polymérisation (DP) selon Banks et coll. 1971.

DP	22,2	29,5	31,3	36,4	50,7	71	93	105	134	1500
λ_{max} (en nm)	496	524	530	546	574	588	595	606	610	642

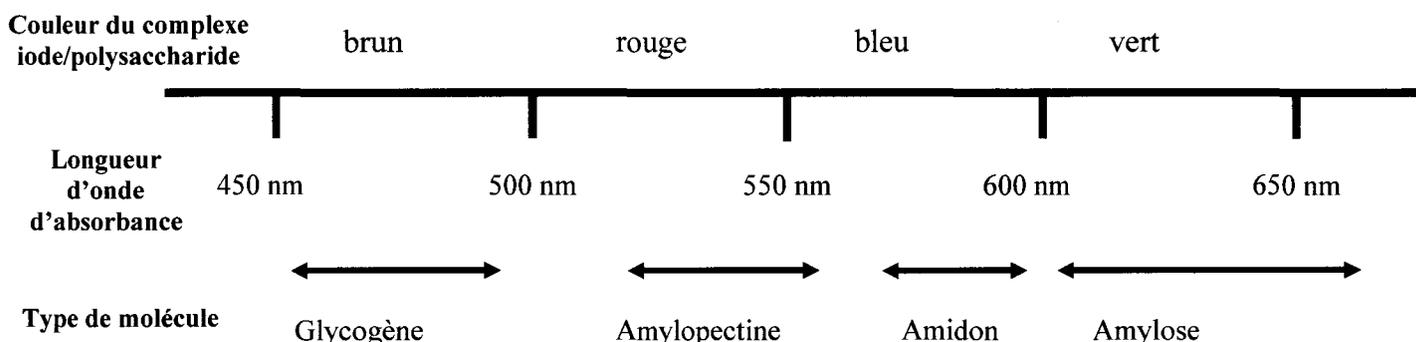


Figure 6: domaines d'absorbances des complexes formés entre l'iode et les polysaccharides

Ainsi, la coloration à l'iode moléculaire permet de faire le distinguo entre les différents polymères glucaniques que l'on peut rencontrer (figure 6). L'amylose fixe fortement l'iode moléculaire et la couleur obtenue est bleue-verte avec une λ_{\max} supérieure à 600 nm. La prépondérance de chaînes courtes et la présence de nombreux points de branchement expliquent la faible capacité de l'amylopectine à fixer cet halogène. En effet, seul 1 mg d'iode est retenu pour 100 g d'amylopectine. On obtient une coloration rouge avec une λ_{\max} typiquement à 540 nm.

f. Les autres constituants du grain

Outre l'amylose et l'amylopectine, l'amidon contient d'autres types de molécules adsorbées à la surface du grain, piégées par sa croissance ou encore spécifiquement liés à lui. On y retrouve des lipides, des protéines et des sels minéraux. Chez les céréales, les quantités de lipides peuvent représenter jusqu'à 1,2% du poids du grain d'amidon. On distingue les lipides internes qui s'associent de manière très forte avec l'amylose et les triglycérides retrouvés à la surface du grain.

La majorité des protéines retrouvées dans le grain sont des enzymes impliquées dans le métabolisme de

l'amidon, piégées lors de sa croissance. La seule connue à ce jour pour être active dans la matrice polysaccharidique est la GBSSI (granule bound starch synthase I) qui peut couvrir 95% de l'ensemble des protéines du grain et représenter jusqu'à 0,5% du poids total du granule (Wattebled et coll., 2002).

Enfin, on retrouve du phosphore à la fois dans les phospholipides mais également sous forme d'esters de phosphate, qui substituent les hydroxyles en position C3 et C6 de certains résidus de glucose à respectivement 30 et 70%. Les niveaux de phosphorylation les plus élevés sont rencontrés dans les racines ou les tubercules, particulièrement dans la pomme de terre où le taux de phosphorylation est proche de 0,1%. Cette modification est effectuée par deux protéines kinases que nous retrouverons plus loin dans ce manuscrit : GWD (Glucan Water Dikinase) et PWD (Phosphoglucan Water Dikinase).

C- La synthèse de l'amidon

En théorie, seules trois enzymes sont nécessaires à la synthèse d'amidon. La première synthétise le glycosyl-nucléotide précurseur, la seconde allonge les α -1,4 glucanes à partir de ce précurseur et la troisième va introduire les points de

branchement en α -1,6. Cependant, ce modèle simple ne rend absolument pas compte de la complexité finale de la structure évoquée précédemment. La construction du grain d'amidon nécessite en réalité plusieurs étapes catalytiques, dont la plupart sont assurées par plusieurs isoformes enzymatiques qui possèdent la même fonction catalytique. Cette multitude d'activités ne semble pas dépendre de la complexité du génome de l'organisme étudié puisque cette situation peut être observée de la micro-algue *Ostreococcus tauri* jusqu'aux plantes supérieures (Ral et coll., 2004).

Sans être totalement exhaustif, ce chapitre dévoile le tableau des connaissances actuelles sur le mode de synthèse de l'amidon. Si la plupart des étapes sont désormais bien comprises, certaines restent encore sujettes à spéculation. Pour faciliter le suivi de cette voie complexe, un schéma général du métabolisme de ce polysaccharide sera séquentiellement établi au fur et à mesure de l'avancée dans le manuscrit et lorsque cela sera possible.

a. L'initiation : la grande inconnue

En examinant la structure d'un grain d'amidon, il est raisonnable de situer le ou les mécanismes de son initiation en

son centre, le hile. La zone qui entoure celui-ci possède une organisation beaucoup plus lâche que les couches concentriques plus cristallines (Buléon et coll., 1998) et peu de travaux se sont focalisés sur celle-ci. L'initiation ne se limite pas seulement à un processus physique, puisque le nombre de grains par plaste est contrôlé génétiquement. Chez la pomme de terre, par exemple, il n'y a généralement qu'un seul granule par plaste tandis que s'opèrent plusieurs événements d'initiation indépendants dans le riz (Smith, 2001). Si l'initiation du grain d'amidon reste encore un domaine peu exploré, plusieurs résultats très clairs sont rapportés sur le glycogène. Chez les animaux et les champignons, une protéine particulière, la glycogénine est capable de s'autoglycosyler à partir d'UDP-glucose (le glycosyl-nucléotide donneur dans le système glycogène) et de former un oligosaccharide de 6 à 10 résidus de glucose (pour revue Roach, 2002). Cet oligosaccharide sert ensuite d'amorce à la glycogène-synthétase. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, deux glycogénines GLG1 et GLG2 sont requises pour l'initiation de la synthèse du glycogène. Les fonctions de ces deux protéines sont redondantes, puisque la disparition totale de la synthèse du glycogène est conditionnée par l'extinction simultanée des deux gènes, les simples mutations n'y suffisant pas (Cheng et coll.,

1995). Le même résultat fut obtenu par interruption du gène *gnn* chez *Neurospora crassa* (De Paula et coll., 2005). Ensemble, ces informations semblaient constituer la preuve de l'implication des glycogénines dans l'initiation de la synthèse d'un grain de glycogène chez les cellules eucaryotes. Toutefois les travaux de Torija et coll. (2005) ont relancés le débat. De manière surprenante, les auteurs ont observé qu'une petite proportion de souches de levure déficientes pour les deux formes de glycogénine (mutant *glg1-/glg2-*) était tout de même capable d'accumuler du glycogène lors de la surexpression d'une forme endogène hyperactive de la glycogène-synthétase ou dans un contexte mutant pour le locus *TPSI*, le gène de structure de la tréhalose-6-phosphate synthétase. Dans cette dernière situation, les contenus intracellulaires d'UDP-glucose et de glucose-6-phosphate, respectivement le substrat donneur et l'effecteur positif de la glycogène-synthétase, sont accrus. Ces résultats soutiennent l'existence d'une voie d'initiation indépendante des glycogénines à l'image du mécanisme observé chez les bactéries dans lesquelles aucune protéine se rapprochant des glycogénines n'a encore été trouvée. En effet, Ugalde et coll. (2003) ont montré que si la glycogène-synthétase native d'*Agrobacterium tumefaciens* pouvait initier la synthèse *de novo* du

glycogène, la glycogène-synthétase de *Saccharomyces cerevisiae* en était parfaitement incapable. Bien que l'existence d'une voie d'initiation engageant exclusivement la glycogène-synthétase semble être en mesure de contourner le mécanisme dépendant des glycogénines chez la levure (de même que chez les bactéries où les protéines de type glycogénine n'ont jamais été décrites), les facteurs influant sur ce phénomène semblent être dirigés par un ensemble de facteurs, peut-être propres à chaque espèce.

Le génome d'*Arabidopsis thaliana* recèle plusieurs gènes codant des protéines analogues aux glycogénines fongiques. Chatterjee et coll. (2005) ont fortement réduit l'expression de l'une d'entre elles, prédite pour être dirigée vers le plaste, par la technique de l'ARN interférent. Parce la coloration à l'iode des feuilles donnait une couleur jaune, ils ont rapidement conclu à l'importance de cette glycogénine sur la synthèse d'amidon. Malheureusement, aucun dosage précis d'amidon n'a été effectué et la technique employée, qui peut inhiber l'expression d'autres protéines de type glycogénine, ne permet pas de conclure aussi rapidement quant à l'implication de cette protéine dans le phénomène d'initiation du grain d'amidon. L'étude d'une lignée spécifiquement mutante pour le gène de structure de cette

glycogénine serait un complément bienvenu à ces travaux.

Ral et coll. (2004) ont rapporté une étude sur l'amidon accumulé chez *Ostreococcus tauri*, une micro-algue qui représente aujourd'hui la plus petite cellule eucaryote connue. Malgré la petite taille de son génome (Courties et coll., 1998) et la réduction de la complexité d'un certain nombre de processus biologiques comme le contrôle de la division cellulaire (Khadaroo et coll., 2004), le niveau de complexité apparent du métabolisme de l'amidon est comparable à celui rencontré chez les plantes supérieures. Toutefois, les auteurs n'ont détecté dans son génome nucléaire aucune séquence analogue aux glycogénines connues. Le résultat le plus inattendu de leurs travaux vient sans conteste de l'observation de la division de l'unique grain d'amidon qui s'effectue de concert avec celle du chloroplaste. Ce phénomène conduit à une répartition égale de la matrice polysaccharidique dans chacun des deux plastes. Le polymère subit ensuite un nouveau cycle de croissance puis de division. L'existence d'un quelconque mécanisme d'initiation semble de fait inutile dans ce système où le matériel nécessaire à l'initiation d'un nouveau grain est déjà disponible. Néanmoins, le cas d'*Ostreococcus* peut rester particulier et ne rend peut-être pas

compte de la situation chez les plantes supérieures.

b. La synthèse du glycosyl-nucléotide précurseur

En 1961, Leloir et son groupe découvrent le rôle des glycosyl-nucléotides dans la synthèse de l'amidon (Leloir et coll., 1961, Recondo et Leloir, 1961). Si l'UDP-glucose est la voie d'entrée du carbone dans la synthèse du glycogène animal et fongique, l'ADP-glucose représente le substrat donneur préféré des enzymes d'élongation végétales et bactériennes. L'ADP-glucose pyrophosphorylase (ou AGPase, EC 2.7.7.27) catalyse la formation du glycosyl-nucléotide à partir de glucose-1-phosphate et d'ATP. Le G1P provient de l'isomérisation du G6P par la phosphoglucomutase (PGM, EC 2.1.5.1). La fourniture en G6P résulte de l'assimilation du CO₂ atmosphérique lors du cycle de Calvin dans les tissus photosynthétiques ou de la dégradation du saccharose dans les organes de réserve. Les caractérisations de mutants dépourvus de l'activité de la phosphoglucomutase plastidiale ont prouvées son importance sur la synthèse d'amidon. Que ce soit chez *Arabidopsis thaliana* (Caspar et coll., 1985), le tabac (Hanson et McHale, 1988), l'algue unicellulaire verte *Chlamydomonas reinhardtii* (mutant *sta5*, van den

Koornhuyse et coll., 1996) ou le pois (mutant *rug3*, Harrison et coll., 1998), l'absence de la PGM plastidiale s'accompagne toujours d'une baisse spectaculaire des quantités d'amidon accumulées. Le mutant PGM d'*Arabidopsis* présente également un phénotype marqué sur la croissance. Après 37 jours de culture en photopériode courte de 7 heures d'illumination, la masse fraîche des plantes mutantes atteint seulement que 10% de celle du sauvage. Une croissance normale est toutefois rétablie en cultivant les plantes sous une illumination constante.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase végétale se présente sous la forme d'un hétérotétramère composé de deux grandes sous-unités et deux petites sous-unités codées par des gènes différents (Morell et coll., 1987). La petite sous-unité porte la fonction catalytique tandis que la grande sous-unité occupe le rôle de régulateur (Sivak et Preiss, 1998). A l'enzyme plastidiale présente dans tous les tissus synthétisant de l'amidon s'ajoute une autre AGPase cytosolique dans l'albumen de maïs (Denyer et coll., 1996a), du riz (Sikka et coll., 2001), de l'orge (Thorbjørnsen et coll., 1996) et du blé (Tetlow et coll., 2003). Dans ces mêmes albumens, la forme cytosolique fournit de 65 à 95% de l'activité AGPase totale, ce

qui implique que dans ces tissus la plus grande part de la synthèse d'amidon nécessite l'importation du précurseur ADP-glucose vers le plaste. Le transporteur fut identifié chez le maïs suite aux travaux de Sullivan et Kaneko (1995) ainsi que de Cao et coll. (1995) et son rôle dans la synthèse d'amidon fut démontré par Shannon et coll. (1998). BT1 (Brittle-1) est un polypeptide de 39 à 44 kDa ancré dans la membrane de l'amyloplaste. Sa séquence peptidique contient un motif KTGGL, retrouvé dans les séquences d'amidon-synthétases et de glycogène-synthétases, couramment admis pour être impliqué dans la fixation de l'ADP-glucose. La diminution de 80% du contenu en amidon dans les grains du mutant *bt1* parachève la démonstration du rôle tenu par ce transporteur.

L'isolement et l'étude de mutants dépourvus soit de la petite soit de la grande sous-unité de l'AGPase chez le maïs (Tsai et Nelson, 1966), *Arabidopsis thaliana* (Lin et coll., 1988a et 1988b ; Wang et coll., 1998) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Ball et coll., 1991 ; van den Koornhuyse et coll., 1996 ; Zabawinski et coll., 2001) aboutit à une baisse spectaculaire des quantités d'amidon synthétisé voire à l'absence totale du polysaccharide de réserve. Les effets drastiques des déficiences pour l'AGPase illustrent la part

importante jouée par cette enzyme dans la synthèse du polymère. Véritable porte d'entrée vers la mise en réserve du carbone, cette enzyme se doit de répondre aux variations physiologiques de la cellule végétale et son activité est contrôlée de façon très précise.

Le principal mode de régulation de l'ADP-glucose pyrophosphorylase chloroplastique est connu depuis 1966 et les travaux de Ghosh et Preiss qui montrèrent que, *in vitro*, cette enzyme subissait une activation par le 3-PGA et une inhibition par le Pi. La validation *in vivo* de ce contrôle allostérique attendra 25 ans et l'étude d'une souche mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* insensible à l'activation par le 3-PGA et à l'inhibition par le Pi (Ball et coll., 1991 ; van den Koornhuyse et coll., 1996). On retrouve un type de régulation homologue pour l'AGPase bactérienne : l'enzyme est dans ce cas activé par le fructose-6-phosphate et le fructose-1,6-diphosphate tandis que les inhibiteurs sont l'ADP et l'AMP.

Si le ratio 3-PGA/Pi joue un rôle clé dans la régulation de l'AGPase dans les tissus photosynthétiques et la plupart des tissus non photosynthétiques, cela est moins clair dans le cas des activités AGPases du blé (Tetlow et coll., 2003), de l'orge (Kleczkowski et coll., 1993) et du

pois (Hylton et Smith, 1992) qui semblent beaucoup moins sensibles à ce type de régulation. Ces observations suggèrent l'existence, d'un type tissulaire à l'autre, de différentes formes d'AGPases dont les activités sont dépendantes de la présence d'une grande sous-unité régulatrice spécifique du tissu botanique. En effet, plusieurs isoformes différentes ont été décrites chez les végétaux. La situation la plus fréquente consiste en l'existence d'un seul gène codant une petite sous-unité et de plusieurs pour les grandes sous-unités qui sont exprimés différemment. Chez *Arabidopsis thaliana*, deux gènes codent des petites sous-unités (*APS1* et *APS2*) et quatre gènes codent des grandes sous-unités (*APL1* à *APL4*). Crevillen et coll. (2003) ont étudié les propriétés de chaque combinaison hétérotétramérique d'*Arabidopsis* en les co-exprimant chez *E. coli*. Ces travaux ont montré l'importance de l'identité de la grande sous-unité qui confère à l'activité de l'AGPase des réponses différentes aux effecteurs allostériques. Les auteurs proposent que leurs observations augurent d'une forte plasticité de l'activité de l'AGPase en fonction de sa localisation dans un tissu « source » ou un tissu « puits » dans lesquels les concentrations en effecteurs sont différentes. On peut dès lors imaginer des expressions différentes de chaque sous-unité selon le type tissulaire, comme cela

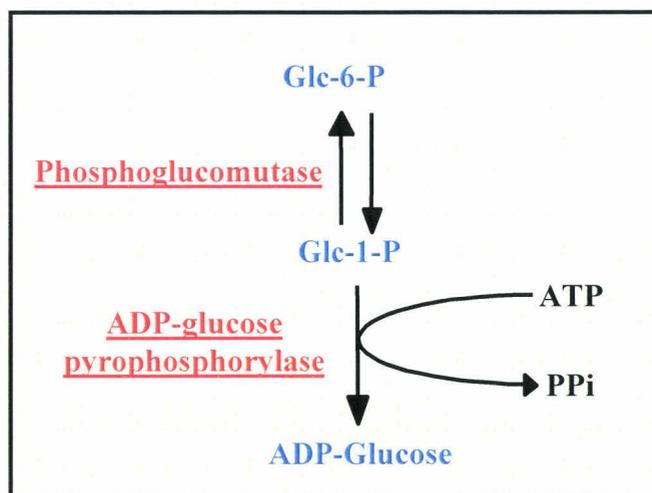
semble être le cas dans le riz (Ohdan et coll., 2005).

Fu et coll. ont suggéré en 1998 l'existence de modifications post-traductionnelles de l'AGPase en observant une inactivation partielle de l'enzyme recombinante de pomme de terre après la formation de ponts disulfures entre les extrémités N-terminales des sous-unités. Le contrôle de l'état redox de l'enzyme impliquerait les thiorédoxines. A l'état oxydé, l'AGPase serait pleinement active et, à l'opposé, complètement inactive à l'état réduite. Tiessen et coll. (2002) ont proposé que l'état redox de l'AGPase soit directement influencé par la fourniture en saccharose au tubercule. Toutefois si l'ADP-glucose pyrophosphorylase de pomme de terre est soumise à un puissant contrôle redox, cela n'est pas le cas des AGPases de céréales (Ballicora et coll., 2000) pour lesquelles aucun élément de régulation n'est encore connu.

D'autres résultats montrent une régulation transcriptionnelle des gènes codant les sous-unités de l'AGPase induits ou réprimés par la présence de glucose ou de saccharose. De plus, l'expression de certains de ces gènes fluctue en fonction de la luminosité (Sokolov et coll., 1998). Enfin, les résultats de Zabawinski et coll. en 2001 suggèrent une rythmicité de la

transcription de l'AGPase et de son activité sous contrôle de l'horloge circadienne.

La régulation de la synthèse de l'amidon s'effectue donc principalement au niveau de l'ADP-glucose pyrophosphorylase. Son activité répond très sensiblement à différents signaux qui indiquent l'état physiologique de la cellule et vont directement influencer l'approvisionnement en ADP-glucose, l'unique glycosyl-nucléotide précurseur de la synthèse de l'amidon.



Première partie du schéma général de synthèse de l'amidon

c. L'élongation des glucanes

Les amidon-synthétases (ou ADP-glucose α -1,4-glucane α -4-glucosyltransférases EC 2.4.1.21) transfèrent le résidu de glucose de l'ADP-glucose sur l'extrémité non-réductrice d'un α -1,4 glucane par la création d'une nouvelle liaison O-glycosidique α -1,4 selon le mode d'action présenté sur la figure 7.

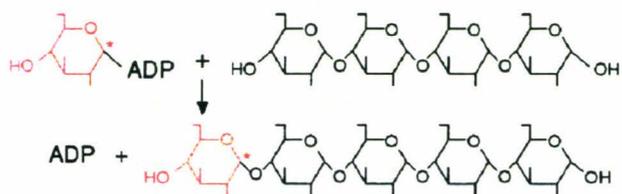


Figure 7: schématisation du mode d'action des amidon-synthétases selon Myers et coll. (2000). Les extrémités non réductrices des glucanes sont indiquées à gauche des molécules. En rouge figure le résidu de glucose transféré.

Dans le métabolisme du glycogène, une seule glycogène-synthétase allonge les glucanes, mais la synthèse du polysaccharide végétal nécessite l'action de plusieurs isoformes. On trouve d'une part l'amidon-synthétase liée au grain d'amidon (ou GBSS pour granule bound starch synthase) et les amidon-synthétases solubles (ou SSS pour soluble starch-synthases).

a. L'amidon synthétase liée au grain (GBSSI)

Cette enzyme est seule responsable de la synthèse de l'amylose. En atteste l'étude de nombreuses plantes déficientes pour la GBSSI et dont l'amidon est exempt d'amylose. Citons entre autres les mutants du maïs (Sprague et coll., 1943 ; Nelson et Rines, 1962 ; Tsai, 1974 ; Echt et Schwartz, 1981 ; Schure et coll., 1983), du riz (Sano, 1984 ; Villareal et Juliano, 1986), du blé (Nakamura et coll., 1995), de la pomme de terre (Hovenkamp-Hermelink

et coll., 1987), du pois (Denyer et coll., 1995) et le mutant au locus *STA2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et coll., 1992). De plus des complémentations menées avec le gène sauvage codant la GBSSI restaurent la production d'amylose chez la pomme de terre (Flipse et coll., 1994) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Wattebled et coll., 2002). Chez les céréales, le phénotype mutant porte le nom *waxy* en référence à l'aspect lisse et cireux des grains. Chez d'autres plantes des mutants analogues furent nommés différemment : *amf* (amylose-free) pour la pomme de terre ou *lam* (low in amylose) pour le pois.

Des effets sur le contenu en amylose sont également observés lorsque l'apport en ADP-glucose est limité. A la réduction attendu des quantités d'amidon synthétisés dans les mutants *rb* et *rug3* du pois déficients respectivement pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase et la phosphoglucomutase plastidiale, on assiste à une diminution simultanée du contenu en amylose. A l'extrême, les amidons accumulés dans les souches mutantes pour la PGM ou l'AGPase de *Chlamydomonas reinhardtii* ne contiennent plus du tout d'amylose (van den Koornhuysse et coll., 1996). De toutes les amidon-synthétases, les GBSSI végétales sont celles qui possèdent l'affinité la plus faible pour

l'ADP-glucose avec un Km apparent de 5 mM vis-à-vis de ce substrat. Toute baisse d'approvisionnement du précurseur conduit de ce fait à la réduction des quantités d'amylose.

La GBSSI est une protéine d'un poids moléculaire conservé qui se situe généralement vers 60 kDa. L'exception vient de l'enzyme de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* d'une masse de 69 kDa, qui présente une extension carboxy-terminale de 11 kDa absente des autres GBSSI. Si cette extension est requise pour une activité normale de l'enzyme (Delrue et coll., 1992), aucune fonction précise n'a pu lui être attribuée. La GBSSI de *Chlamydomonas* est également remarquable par son niveau d'activité au moins 10 fois plus élevé que ceux des GBSSI des plantes supérieures. La GBSSI est étroitement liée à la matrice polysaccharidique (Denyer et coll., 1993), propriété qui constitue un gros avantage à son étude, puisqu'il suffit d'incuber des grains purifiés d'amidon natifs en présence d'ADP-glucose. Ce type d'expérience combiné à l'utilisation judicieuse de mutants (en particulier chez *Chlamydomonas*) a apporté des éléments de réponse quant à la nature du substrat glucanique « accepteur » de l'enzyme et son mode d'action. En 1992, Delrue et coll. avaient observé dans le mutant *sta2* de *Chlamydomonas* la disparition d'une

fraction de l'amylopectine nommée amylopectine de type II ou encore matériel intermédiaire du fait de son poids moléculaire compris entre celui de l'amylose et celui de l'amylopectine. La GBSSI est ainsi capable de transférer des résidus de glucose à partir d'ADP-glucose radiomarqué sur l'amylopectine de la pomme de terre (Baba et coll., 1987) et du pois (Denyer et coll., 1996b). De plus, Denyer et coll. (1996b) rapportent que l'ajout de malto-oligosaccharides (MOS) comme le maltotriose stimule la synthèse d'amylose *in vitro*. van de Wal et coll. (1998) par des expériences de marquage radioactif court suivi d'une chasse montrent *in vitro* que la GBSSI de *Chlamydomonas reinhardtii* incorpore le glucose sur les chaînes externes de l'amylopectine et observent lors d'incubations plus longues un transfert de la radioactivité vers l'amylose. Dans ce système, l'addition de MOS au milieu réactionnel stimule, comme chez le pois, la synthèse de l'amylose mais au préjudice de celle de l'amylopectine. Sur la base de ces résultats, Ball et coll. (1998) proposent un nouveau modèle de synthèse de l'amylose tel qu'ils l'imaginent *in vivo* (figure 8). Par la suite, les travaux de Denyer et coll. (1999a) suggèrent que ce modèle est inexistant chez le pois et que l'amylose est synthétisé directement à partir des malto-oligosaccharides de manière processive.

Zeeman et coll. (2002) rapportent des résultats similaires chez *Arabidopsis thaliana*.

L'activité de la GBSSI semble influencée par la liaison de l'enzyme à l'amylopectine (Denyer et coll., 1999b). Dauvillée et coll. (1999) valident cette hypothèse en rapportant l'étude d'un mutant de *Chlamydomonas reinhardtii* incapable de synthétiser de l'amylopectine et dans lequel la GBSSI ne synthétise que de très faibles quantités de matériel insoluble dont la structure rappelle celle de l'amylose.

Enfin, chez certains végétaux il n'existe pas une mais plusieurs GBSSI. Les feuilles et les tiges du mutant *waxy* du riz, le péricarpe du mutant *waxy* du blé ou encore les nodules du mutant *lam* du pois contiennent encore de l'amylose. La production de ce matériel dans les organes de ces plantes est donc contrôlée par au moins un autre gène. Une protéine à la séquence N-terminale et au poids moléculaire comparables à ceux de la GBSSI fut détectée dans les feuilles du mutant *lam* du pois (Denyer et coll., 1997). Deux GBSSs coexistent chez le blé (Vrinten et Nakamura, 2000) et l'orge (Patron et coll., 2002). Dans les deux organismes, une GBSS est principalement exprimée dans l'albumen tandis que la

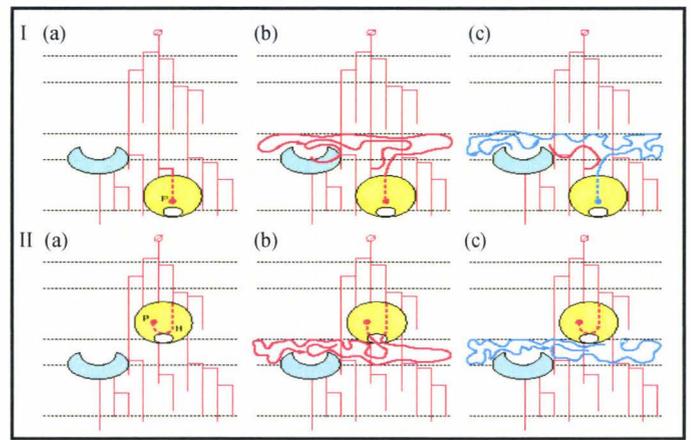


Figure 8 : modèles de biosynthèse de l'amylose par amorçage à l'amylopectine proposés par Ball et coll. (1998). La matrice d'amylopectine d'origine est représentée par des traits fins rouges, alors que les chaînes externes allongées par la GBSSI sont indiquées par des traits épais rouges. Les molécules d'amylose néo-synthétisées correspondent aux traits de couleur bleue. Les cercles barrés indiquent les extrémités réductrices de l'amylopectine alors que ceux pleins correspondent aux extrémités non-réductrices. Les cercles jaunes symbolisent la GBSSI et les formes en demi-lune de couleur bleu-claire évoquent une enzyme de branchement présente à l'intérieur du grain d'amidon. La lettre P indique la position du site catalytique de la GBSSI et la lettre H, celle d'un hypothétique site d'hydrolyse. Les parties I et II montrent deux mécanismes possibles de synthèse de l'amylose. Dans la partie I, la libération de la molécule d'amylose par clivage est assurée par l'enzyme de branchement ou par un autre type d'enzyme hydrolytique (non montré). La partie II modélise les différentes étapes de synthèse de l'amylose au cours desquelles, c'est la GBSSI elle-même qui libère le glucane néo-synthétisé par hydrolyse. Dans ce dernier cas, la présence de l'enzyme de branchement dans le grain d'amidon explique la présence des points de ramification dans l'amylose.

seconde est plutôt retrouvée dans les tissus synthétisant un amidon transitoire comme les feuilles ou le péricarpe. Chez le pois, la situation est identique avec la GBSSIIa exprimée préférentiellement dans l'embryon et la GBSSIIb exprimée majoritairement dans les feuilles. Edwards et coll. (2002) ont observé que ces deux isoformes affichaient des propriétés distinctes, la GBSSIIa synthétise un amylose d'un poids moléculaire plus faible que celui produit par la GBSSIIb.

b. Les amidon-synthétases solubles

En abordant désormais la synthèse de l'amylopectine, la situation va se compliquer sensiblement puisqu'on a repéré chez certaines espèces jusqu'à 5 séquences d'enzymes d'élongation solubles. Les protéines correspondantes sont classées de la SSI à la SSV selon leurs séquences peptidiques et leur poids moléculaire, compris entre 70 et 180 kDa. La multiplication des isoformes et les redondances fonctionnelles, au moins partielles, qui en découlent rendent la compréhension du niveau de participation de chacune d'entre elles pour l'édification de la molécule d'amylopectine singulièrement difficile. Néanmoins, l'utilisation d'individus spécifiquement déficients pour certaines activités d'élongation a permis dans quelques cas d'esquisser quelques éléments de réponse.

En nous appuyant sur ce type d'étude, nous détaillerons les connaissances actuelles sur le rôle porté par chaque isoforme en suivant l'ordre de la classification abordée ci-dessus.

La phase ouverte de lecture de la SSI du riz fut clonée par Baba et coll. (1993). La protéine correspondante possède un poids moléculaire de 68,5 kDa. Par la suite, des ADNc analogues furent produits à partir du blé (Block et coll.,

1993) d'Arabidopsis (Newman et coll., 1994), du maïs (Knight et coll., 1998) et de la pomme de terre (Kossmann et coll., 1999). Kossmann et coll. décrivent en 1999 l'inhibition dans la pomme de terre de la SSI par l'expression d'un ARN antisens correspondant. Mais la diminution notable de l'activité portée par la SSI ne conduit pas à la modification structurale de l'amylopectine dans les tubercules des lignées transgéniques. Par ailleurs, dans une revue publiée en 2002, Nakamura présente très succinctement un mutant pour la SSI du riz dans lequel il remarque une modification de la structure de l'amylopectine de l'albumen. Ces deux résultats tendaient à lui concéder un rôle mineur dans l'élaboration du polysaccharide, à tout le moins dans les organes de réserve puisque la SSI semble plus exprimée dans les feuilles. Les travaux de Delvallé et coll. (2005) menés sur des lignées d'Arabidopsis mutantes pour la SSI ont démontré son importance pour la synthèse de l'amylopectine. Les mutants rendent compte d'une structure très perturbée du polymère où la distribution des longueurs des chaînes, habituellement polymodale, laisse place à une distribution quasi unimodale accompagné d'une modification du degré de polymérisation majoritaire passant de 12 pour le sauvage à 14-15 pour le mutant. L'absence de la SSI conduit à une

diminution marquée du nombre des chaînes A et B1, les plus externes et les plus courtes de l'amylopectine. Les auteurs s'appuient également sur l'observation de sa faible efficacité à allonger les chaînes longues (comme cela avait déjà été décrit en ce qui concerne la SSI du maïs par Commuri et Keeling en 2001) pour proposer une fonction de la SSI liée à la synthèse des courtes chaînes les plus externes de la grappe d'amylopectine.

La SSII est rencontrée à la fois en phase soluble et associée à la matrice polysaccharidique (Denyer et coll., 1993). Dans ce dernier cas, elle fut improprement nommée GBSSII. La protéine est en fait piégée lors de la croissance du grain et ne participe en aucune façon à la synthèse de l'amylose (Denyer et coll., 1995). Il semble même qu'elle n'y soit pas particulièrement active contrairement à la GBSSI. Chez le pois, le mutant au locus *RUG5* élimine l'activité de la SSII et cause une altération marquée de la morphologie des grains, de la quantité d'amidon accumulée (de l'ordre de 50% de celle du sauvage) ainsi que la structure de l'amylopectine. Celle-ci présente une réduction du contenu en chaînes intermédiaires ($15 \leq DP \leq 45$) couplée à l'augmentation des chaînes courtes et longues. La SSII du pois semble donc essentiellement responsable de la synthèse

des chaînes intermédiaires. L'augmentation du nombre des chaînes longues pourrait provenir d'une contribution accrue de la GBSSI à la synthèse de l'amylopectine dans ce contexte mutant. D'autres analyses du mutant *rug5* indiquent que la mutation affecte également le taux et le type de cristallinité (Hedley et coll. 2002). Chez les monocotylédones, il existe deux formes de SSII à des stades différents du développement, la SSIIa et la SSIIb (Harn et coll., 1998). Si l'implication de la SSIIb reste pour le moment inconnue, faute de mutant disponible, des déficiences pour la SSIIa ont été décrites chez le blé (Yamamori et coll., 2000), le riz (Umemoto et coll., 2002), l'orge (Morell et coll., 2003), et le maïs (Zhang et coll., 2004). Tous ces mutants présentent des phénotypes comparables au mutant *rug5* du pois, indiquant des rôles similaires pour la SSII des dicotylédones et la SSIIa des monocotylédones.

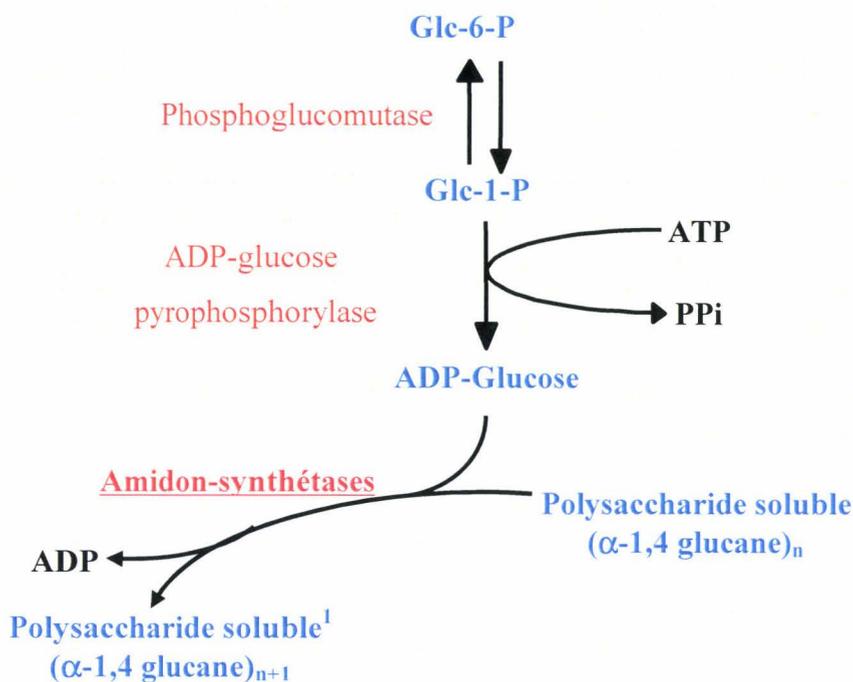
Mis à part la GBSSI, l'enzyme d'élongation la plus étudiée est sans conteste la SSIII. D'un poids moléculaire plus élevé que la SSI et la SSII, situé à environ 120 kDa, la part de cette isoforme dans la structuration du grain semble varier d'un végétal à l'autre. Les mutants *sta3* de *Chlamydomonas reinhardtii* (Fontaine et coll., 1993) et *dull1* du maïs (Gao et coll.,

1998) ainsi qu'une lignée transgénique de pomme de terre exprimant un ARN antisens de la SSIII (Marshall et coll., 1996 et Edwards et coll., 1999) présentent tous une amylopectine enrichie en courtes ($DP \leq 15$) et longues chaînes ($DP \geq 80$) au détriment des glucanes de taille intermédiaire. Dans tous les cas, cette modification structurale s'accompagne d'un effet marqué sur la morphologie des granules. L'effet de la mutation au locus *STA3* de *Chlamydomonas* est plus marqué. On assiste également à une baisse de la capacité globale de synthèse avec une diminution de son contenu en amidon qui chute à 20% des quantités habituelles. On remarque également une baisse significative de la cristallinité de l'amidon résiduel.

Un mutant pour la SSIII récemment décrit chez *Arabidopsis thaliana* présente un phénotype pour le moins inattendu (Zhang et coll., 2005). Si les modifications de la structure de l'amylopectine, bien que subtiles, vont dans le même sens que celles décrites dans les autres mutants pour la SSIII, la mutation ne semble pas affecter la morphologie des grains d'amidon. De plus, la mutation induit un accroissement de la synthèse du polysaccharide. Les auteurs

proposent deux hypothèses pour expliquer ce résultat. Dans la première la SSIII inhiberait l'activité d'autres enzymes de synthèse en particulier les autres amidon-synthétases. La seconde hypothèse stipule que la structure de l'amylopectine du mutant constituerait un meilleur substrat pour les autres amidon-synthétases. On peut penser par exemple à la GBSSI qui pourrait être responsable de l'augmentation des longues chaînes de l'amylopectine observée dans tous les mutants pour la SSIII. L'augmentation de la taille moyenne des glucanes dans les mutants pour la SSIII est en corrélation avec l'accroissement de la teneur en phosphate de l'amidon. La raison de cette relation reste encore inconnue.

Enfin, des séquences classées dans le groupe des SSIV/SSV apparaissent dans les génomes ou les banques d'EST de certaines espèces végétales comme le blé, le riz, *Arabidopsis thaliana* ou encore *Chlamydomonas reinhardtii* (pour revue Ball et Morell, 2003). Mais à ce jour, faute d'études biochimiques et de description d'individus mutants, la fonction de ces protéines dans la synthèse du polymère reste à définir.



d. L'introduction des points de branchements

L'étape de ramification est assurée par les α -1,4-glucane : α -1,4-glucane-6-glycosyl-transférases (EC 2.4.1.18) plus simplement nommées les enzymes de branchements (ou SBE pour Starch Branching Enzymes). Si la synthèse du glycogène ne fait appel qu'à une seule enzyme de branchement, la synthèse de l'amidon nécessite au minimum 2 isoformes qui semblent fonctionnellement distinctes. Mais avant d'aborder le rôle qu'occupent ces enzymes dans l'élaboration du polymère, nous allons visiter la nomenclature particulière des SBE après avoir exposé leur appartenance à une classe d'enzymes hydrolytiques omniprésente dans le métabolisme de l'amidon.

a. Les enzymes de branchement appartiennent à la super famille des α -amylases

La super famille des α -amylases ou famille GH13 (GH pour Glycoside Hydrolases) selon la classification CAZy définit par Henrissat et coll. (2001) englobe plusieurs dizaines d'enzymes qui catalysent environ 20 types de réactions distinctes et possèdent des spécificités de substrat différentes. Cela inclue par exemple des spécificités endo ou exoamylasiques ou encore des préférences de transglucosylation ou de simple clivage. Ces enzymes peuvent agir sur des liaisons α -1,4 ou α -1,6, et, à titre informatif uniquement ici puisqu'elles n'existent pas dans l'amidon, sur des liaisons α -1,1. En 1999, Kuriki et Imanaka ont défini les enzymes appartenant à la super famille des α -amylases selon quatre critères :

1- Elles agissent sur des liaisons α -glycosidiques.

2- Elles hydrolysent ou transfèrent des liaisons α -glycosidiques en conservant leur anomérie. Cette définition est essentielle pour la compréhension d'une partie des résultats qui vont suivre dans ce mémoire. En effet, les glycoside hydrolases peuvent agir sur les liaisons O-glycosidiques de deux

manière (figure 9). Elles peuvent soit retenir la configuration anomérique au niveau de la liaison traitée (« retaining mechanism ») de telle façon à ce qu'une liaison de type α clivée par ce mécanisme libérera une extrémité réductrice en anomérie α . Ou le mécanisme inversera l'anomérie (« inverting mechanism ») en donnant dans le

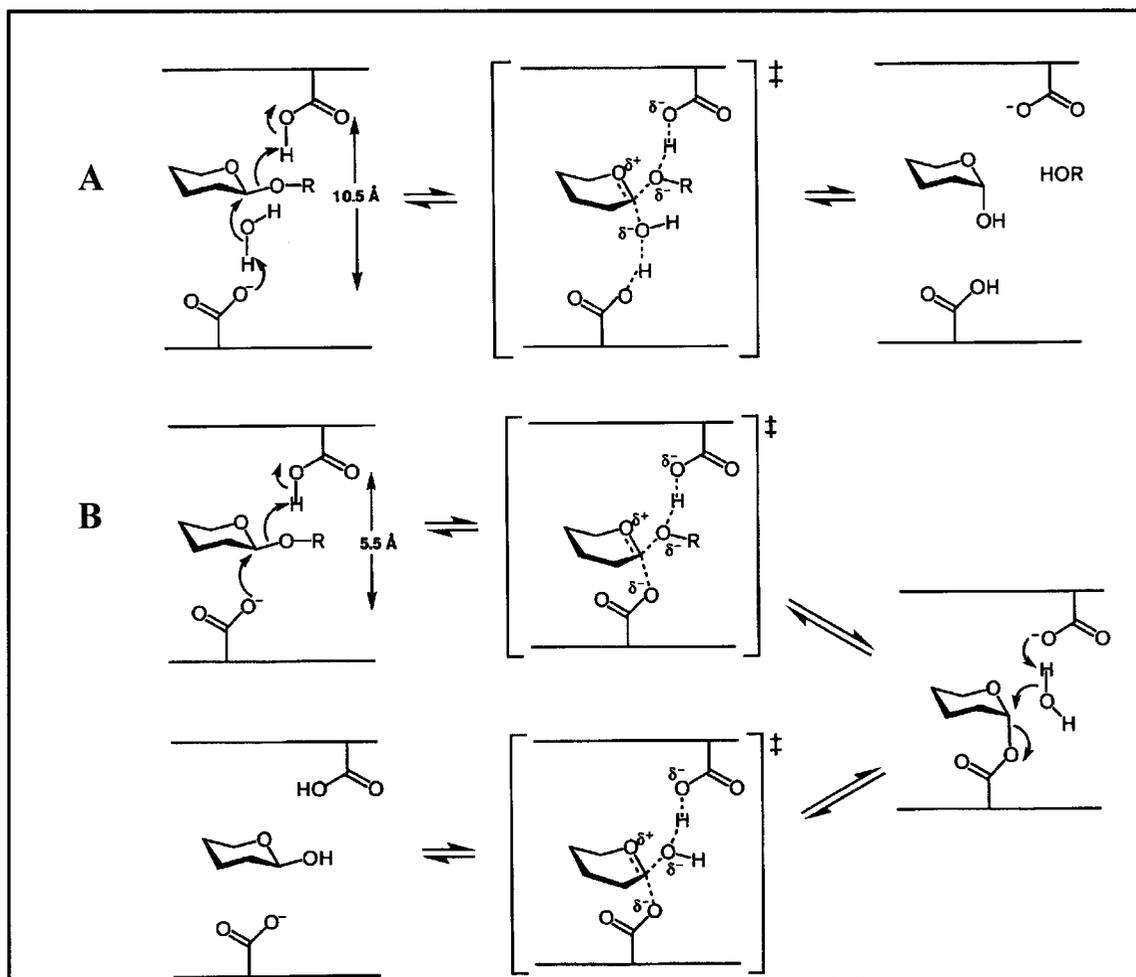


Figure 9 : La coupure d'une liaison β selon un mécanisme retenant ou inversant l'anomérie

A : Lors de l'action d'une enzyme inversant l'anomérie (inverting enzyme) un résidu d'acide carboxylique agit en tant que base pour activer une molécule d'eau et un second agit en tant qu'acide pour faciliter le départ du groupe partant. Dans ce mécanisme, le clivage de la liaison s'effectue en une seule étape.

B : La catalyse de la coupure par une enzyme retenant l'anomérie nécessite deux étapes. Un résidu d'acide carboxylique va agir en tant que nucléophile dans la première partie de la réaction puis comme groupe partant dans la deuxième partie de la réaction. La maintenance de l'anomérie résulte de la succession de deux réactions inversant l'anomérie.

Durant le processus de clivage, il y a formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent.

D'après Leemhuis (2003).

même exemple une extrémité réductrice avec une configuration β .

- 3- Elles contiennent quatre motifs peptidiques conservés dans lesquels sont situés les résidus d'acides aminés impliqués dans la catalyse ou dans la fixation du substrat.
- 4- Elles possèdent deux résidus d'acide aspartique et un résidu d'acide glutamique comme acides aminés impliqués dans la réaction catalytique.

Les structures tri-dimensionnelles de plusieurs enzymes de la famille des α -amylases ont été résolues. Ces protéines partagent des structures similaires en tonneau ou TIM-barrel (α/β)₈. Cet agencement fut identifié la première fois dans la triose-phosphate isomérase (TIM) qui a laissé son nom à ce type de repliement. C'est aux extrémités carboxy-terminales des feuillets β que l'on retrouve les résidus d'acides aminés engagés dans la catalyse.

La plupart des enzymes des voies de synthèse ou de dégradation de l'amidon appartiennent à la famille des α -amylases : on recense ainsi les isoamylases et la pullulanase mais également les α -amylases et les α -1,4 glucanotransférases. Les β -

amylases sont exclues de cette famille car leur mode de fonctionnement suit un mécanisme inversant l'anomérisation et ne répond donc pas à la deuxième partie de la définition évoquée ci-dessus.

En revanche, le mode d'action des enzymes de branchement concorde parfaitement avec cette définition. Elles clivent une liaison α -1,4 d'un glucane et transfèrent la partie clivée de ce glucane sur un autre glucane (ou sur lui-même) en créant une liaison α -1,6 (Borovsky et coll., 1976, voir figure 10). De plus, les séquences peptidiques des enzymes de branchement contiennent les quatre régions spécifiques des enzymes amylolytiques (Baba et coll., 1991 et Burton et coll., 1995).

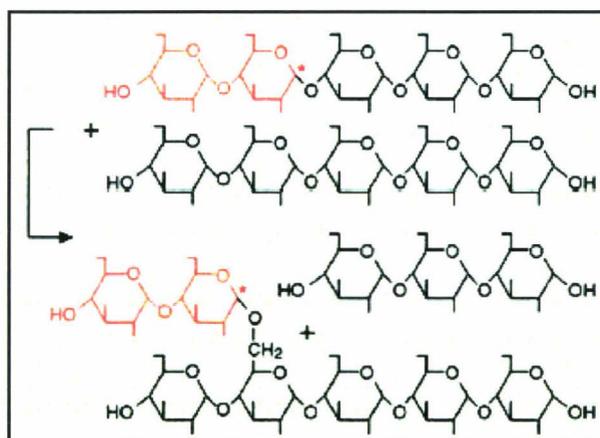


Figure 10 : schématisation du mode d'action des enzymes de branchement selon Myers et coll. (2000). Les extrémités réductrices des glucanes sont indiquées à la droite des molécules, les extrémités non-réductrices à gauche. Les résidus de glucose qui subissent la réaction de transfert en position α -1,6 sont indiqués en rouge.

b. Les méthodes d'étude

Le mode d'action des enzymes de branchement est la source de nombreux problèmes rencontrés lors de leur étude. Il n'y a pas de synthèse *stricto sensu* lors de la réaction. Il semble donc difficile d'obtenir des informations quantitatives des activités respectives de chaque isoforme. Vient s'ajouter la question du substrat à utiliser lors du dosage : les substrats disponibles ne refléteront jamais la structure rencontrée *in planta* par les enzymes et leur utilisation ne rendra jamais précisément compte de la réalité de leur action. Si les techniques de dosages décrites restent imparfaites, elles contribuent néanmoins à appréhender le rôle incarné par les enzymes de branchement dans la synthèse de la molécule d'amylopectine (pour revue Sivak et Preiss, 1998). La première méthode historiquement décrite (Hawker et coll., 1974) est la stimulation de l'activité de la phosphorylase « a ». La phosphorylase « a » de muscle de lapin synthétise des glucanes linéaires à partir de glucose-1-phosphate. L'enzyme de branchement va introduire les liaisons α -1,6 et va donc accroître le nombre d'extrémités non-réductrices disponibles pour l'élongation par la phosphorylase. Utilisée lors de l'incubation d'un gel de polyacrylamide dans lequel auront migré

les protéines d'un extrait cellulaire brut, la méthode permet de révéler subséquemment par coloration à l'iode les zones où se situeront après migration les enzymes de branchement. L'utilisation de GIP radiomarqué augmente la sensibilité de cette technique qui est la seule à pouvoir être utilisée à partir d'un extrait non purifié.

La deuxième technique appelée test à l'iode (Hawker et coll., 1974) nécessite de travailler sur des enzymes exemptes de toutes traces d'enzymes de dégradation des glucanes et, bien sûr, d'autres formes d'enzyme de branchement. La préparation d'enzyme de branchement est incubée en présence d'amylose, d'amylopectine ou de n'importe quel type de dextrines. La ramification va conduire à la formation de chaînes de plus en plus courtes ce qui aura pour conséquences d'abaisser au cours de la réaction l'absorbance du complexe formé par l'iode et les polysaccharides. Cette méthode n'est pas très sensible mais permet de tester la spécificité de l'enzyme vis-à-vis d'un grand nombre de structures.

La dernière technique fut décrite par Takeda et coll. (1993). Ce test permet de mesurer le nombre d'événements de ramification catalysés par l'enzyme de branchement. L'enzyme est incubée avec de l'amylose réduite et les produits formés sont débranchés par l'isoamylase. Le pouvoir réducteur des glucanes transférés

au cours de la réaction est ensuite mesuré. On peut également imaginer de déterminer la distribution des longueurs des chaînes du produit formé et ainsi obtenir des informations sur la taille des glucanes transférés. Ce test représente à l'heure actuelle la méthode d'étude des enzymes de branchement la plus quantitative et la plus qualitative.

c. La nomenclature

Il n'est pas inutile d'inclure ici quelques éléments de classification des enzymes de branchements de l'amidon. Pendant des années, les SBEs de diverses origines végétales furent traitées par des équipes qui établirent chacune leur propre classification. Il en a découlé des dénominations parfois inadéquates qui rendaient parfois bien difficile

l'établissement de liens entre les résultats obtenus chez différentes espèces végétales. Le cas du riz en est un exemple frappant. Mizuno et coll (1992) ont décrit originellement 5 isoformes d'enzymes de branchement : RBE1, RBE2a et b, RBE3 et RBE4 (RBE pour Rice Branching Enzyme) avant de s'apercevoir que RBE2a et RBE2b n'étaient qu'une seule et même protéine. Ils ont ensuite remarqué que RBE2 représentait en fait la forme immature de RBE1. Malheureusement les auteurs n'ont pas simplifié leur dénomination et les termes RBE1, 3 et 4 ont subsisté par la suite. La situation s'est cependant sensiblement améliorée ces dernières années depuis les travaux de Burton et coll. (1995) qui ont jeté les bases d'une classification maintenant retenue par l'ensemble de la communauté scientifique

Tableau 2 : Classification des enzymes de branchement et de leurs dénominations les plus couramment utilisées ces dernières années. Entre parenthèses figurent les différents noms attribués historiquement dans les travaux antérieurs.

Organisme	Famille B		Famille A	
	<i>Mono et dicotylédones</i>		<i>Monocotylédones</i>	
Maïs	SBEI		SBEIIa	SBEIIb
Blé	SBEI		SBEIIa	SBEIIb
Orge	SBEI		SBEIIa	SBEIIb
Riz	SBEI (RBEI)		SBEIIa (RBE4 ou QEIIa)	SBEIIb (RBE3 ou QEIIb)
Pois	SBEA (SBEII)			SBEIII (SBEI)
Pomme de terre	SBEI (SBEA)			SBEII (SBEIII)
Haricot	PvSBEI			PvSBEII

de l'amidon en ordonnant les SBEs dans deux familles (A et B). Par ailleurs, la dénomination de la plupart des enzymes de branchement est désormais calquée sur celle retenue chez le maïs, considéré comme le modèle dans ce domaine au regard des nombreuses études menées sur les SBEs de cette plante. Les SBEs sont désormais classées en deux groupes selon leur séquence peptidique et leur faculté à transférer de plus ou moins longues chaînes. On distingue ainsi les enzymes de branchement de type I (SBEI) des enzymes de branchement de type II (SBEII) appartenant respectivement aux familles B et A (Burton et coll., 1995). Le tableau 2 présente les différentes enzymes de branchement les plus fréquemment décrites, notons que la nomenclature adoptée chez le pois (Smith, 1988, Bhattacharyya et coll., 1990 et Burton et coll., 1995) est inversée par rapport à celle du maïs.

Chez tous les végétaux, dont le métabolisme de l'amidon est décortiqué, il existe une et une seule SBEI tandis que une ou deux SBEII peuvent être rencontrées selon l'organisme étudié. Chez les plantes dicotylédones comme le pois, la pomme de terre ou le haricot, il n'existe qu'une seule SBEII. Chez les plantes monocotylédones comme le maïs, le blé, l'orge ou encore le riz, deux SBEII

distinctes, codés par deux gènes distincts coexistent. On parlera dans ce cas de SBEIIa et de SBEIIb.

Le cas particulier rencontré chez *Arabidopsis thaliana* sera abordé plus loin dans ce manuscrit.

d. Les SBEs de la famille A

L'étude d'individus mutants associée aux analyses biochimiques a permis de lever une partie du voile posé sur les SBE de la famille A. C'est incontestablement les fonctions des SBEA (ou SBEII) du maïs qui sont les mieux comprises aujourd'hui. C'est pourquoi nous nous appuyerons en grande partie sur les résultats obtenus chez cette plante pour définir la fonction des SBEA dans la synthèse de l'amylopectine.

Comme nous venons de l'indiquer, deux formes de SBEA existent chez les plantes monocotylédones comme le maïs. Mais ces deux isoformes ne sont pas retrouvées de manière uniforme dans les différents organes de la plante. SBEIIa est ainsi active dans tous les organes, incluant les feuilles et l'albumen, tandis que l'activité de SBEIIb est restreinte à l'albumen (Dang et Boyer, 1988 et 1989 ; Gao et coll., 1996). Les SBEA du riz (Yamanouchi et Nakamura, 1992), de

l'orge (Sun et coll., 1998) et du blé (Morell et coll., 1997) présentent un comportement similaire. La synthèse de l'amidon de réserve des tissus « puits » des céréales requiert donc l'utilisation de deux formes de SBEA.

Le premier mutant pour l'isoforme SBEIIa est décrit par Blauth et coll. (2001). La mutation n'entraîne aucune altération significative de la structure de l'amylopectine dans l'albumen mais conduit à des modifications importantes de l'amidon transitoire des feuilles. Les auteurs observent une augmentation de la teneur en amylose du grain d'amidon associée à une augmentation du contenu en longues chaînes de l'amylopectine. Les résultats rapportés sur un mutant similaire du riz concordent avec ceux obtenus chez le maïs (Nakamura, 2002). Les phénotypes des mutants SBEIIa observés dans les feuilles correspondent à ceux rencontrés dans l'albumen des mutants pour l'isoforme SBEIIb incluant les mutants *ae* (*amylose extender*) du maïs (Boyer et Preiss, 1978 ; Stinard et coll., 1993) et du riz (Mizuno et coll., 1993 ; Nishi et coll., 2001). Dans tous les cas, la mutation du gène codant la SBEIIb conduit à une baisse du contenu en amidon et à une augmentation nette de la teneur en amylose. La mutation provoque également des modifications de la distribution de la

taille des chaînes de l'amylopectine de l'albumen du maïs (Kasemsuwan et coll., 1995 ; Shi et Seib, 1995) et du riz (Nishi et coll., 2001) qui indiquent une augmentation significative de la taille moyenne des chaînes de la molécule. Le nombre de chaînes courtes ($DP \leq 16$) est réduit et cette diminution est beaucoup plus marquée sur les chaînes de DP compris entre 6 et 11 résidus de glucose. En contrepartie, on assiste à une augmentation du nombre de chaînes de $DP \geq 17$. Les profondes altérations de la structure de la molécule d'amylopectine se projettent sur la structure même du grain. En effet, les grains d'amidon accumulés dans le mutant *ae* du maïs adoptent un profil de cristallinité B (au lieu du profil A rencontré habituellement chez cette céréale), et sont moins cristallins (Kasemsuwan et coll., 1995 ; Shi et Seib, 1995).

Le seul véritable mutant décrit à ce jour chez une dicotylédone est le mutant *r* (pour *rugosus*) du pois (Smith, 1988 ; Bhattacharyya et coll., 1990 ; Tomlinson et coll., 1997). Déjà au XIXe siècle, Mendel (1865) utilisa ce mutant, sans le savoir, pour définir les lois de la génétique classique. L'abolition de l'unique SBEA chez le pois conduit à un phénotype analogue à celui des mutants *ae* du riz et du maïs, mais ne présente aucun effet sur

la structure de l'amidon contenu dans les feuilles. Jobling et coll. (1999) rapportent l'étude d'une lignée de la pomme de terre exprimant un antisens dirigé contre la SBEA. Bien que cette isoforme ne représente seulement que 2% de l'activité totale de branchement mesurée dans le tubercule, la réduction de son activité augmente sensiblement à la fois la quantité d'amylose du grain et la longueur moyenne des chaînes de l'amylopectine. Par ces aspects, le phénotype observé renvoie à celui des mutants *ae*. Ainsi, les SBE de la famille A sont essentielles à la construction d'une molécule d'amylopectine. De plus, chez les monocotylédones la perte de la fonction portée par SBEIIb dans l'albumen ne peut être compensée ni par SBEIIa ni par SBEI.

Guan et Preiss (1993) utilisèrent les trois techniques de dosages citées précédemment pour définir les propriétés de chacune des isoformes. Ils ont montré *in vitro* que SBEIIa et IIb possédaient des propriétés d'action quasi identiques. SBEIIa semble toutefois mieux transférer *in vivo* les glucanes les plus courts, de DP 5 et 6 (Seo et coll., 2002). Toutes deux sont plus affines pour l'amylopectine que pour l'amylose et démontrent la même capacité de mieux brancher l'amylopectine que l'amylose (Guan et Preiss, 1993). Les SBEII sont capables de transférer

principalement de courts glucanes de DP compris entre 6 et 9 (Guan et coll., 1995) à partir d'un glucane de taille minimale de 12 résidus de glucose (Guan et coll., 1997). De cette manière les SBEII semblent participer plus ou moins directement à la formation des chaînes A, les plus externes, de l'amylopectine.

e. Les SBEs de la famille B

C'est une nouvelle fois chez le maïs que le premier mutant pour une enzyme de branchement de la famille B fut décrit (Blauth et coll., 2002). Mais aucune altération de la structure de l'amidon, que ce soit au niveau des feuilles ou dans l'albumen, ne fut observée. Ce résultat confirme le travail de Flipse et coll. (1996) sur une « lignée antisens » de pomme de terre inactivant l'expression de la SBEB. Le mutant SBEI du riz (Sato et coll., 2003) affiche des modifications subtiles de la structure de l'amylopectine caractérisée par la diminution du nombre des courtes ($12 \leq DP \leq 21$) et des longues chaînes ($DP \geq 37$) ainsi que par l'augmentation du nombre de très courtes chaînes ($DP \leq 10$). Les auteurs proposèrent une fonction de SBEI liée à la synthèse des chaînes B1, B2 et B3. Cette hypothèse rejoint celle fournie par Guan et coll. (1995) à la suite de leurs travaux sur la spécificité d'action *in vivo*

des SBEs. SBEI transfère ainsi des glucanes de DP supérieur à 14 résidus de glucose à partir d'un glucane donneur d'une taille minimale requise de 15 résidus de glucose (Guan et coll., 1997).

Les caractérisations enzymologiques de SBEI vont dans le même sens que les observations des phénotypes mutants. La SBEI du maïs montre une plus grande affinité pour l'amylose que pour l'amylopectine et une plus grande capacité à brancher cet amylose que les SBE de la famille A (Guan et Preiss, 1993 ; Guan et coll., 1994 ; Guan et coll., 1995 ; Guan et coll., 1997). De fait, SBEI agit préférentiellement sur de plus longues chaînes que les SBEII et transfère également des glucanes plus longs. Cela semble indiquer des rôles différents pour les enzymes de branchement des familles A et B dans l'élaboration de la molécule d'amylopectine

f. Les enzymes de branchement d'Arabidopsis thaliana

Deux phases ouvertes de lecture codant des enzymes de branchement furent repérés chez *Arabidopsis* (Fisher et coll., 1996b). Elles proviennent de deux gènes indépendants (Khoshnoodi et coll., 1998). Si les séquences de ces deux ADNc présentent des divergences à leurs extrémités 5' et 3', les protéines codées

partagent plus de 80% d'identité et se rapportent toutes deux aux enzymes de branchement de la famille A. Les séquences peptidiques rapprochent davantage les deux protéines aux SBEA des dicotylédones que des monocotylédones (Fisher et coll., 1996). De plus, malgré les efforts entrepris, ces mêmes travaux se sont révélés incapables de détecter une séquence relative aux SBE de type I (ou de la famille B). *Arabidopsis thaliana* représente ainsi la première dicotylédone décrite à disposer de deux enzymes de branchement de type II et la première plante dépourvue *a priori* d'enzyme de branchement de type I. Les enzymes de branchement d'*Arabidopsis* faisant l'objet de ce travail, nous re discuterons de cet aspect dans les parties « résultats » et « discussion » dans la suite de ce manuscrit.

g. Les SBEs au centre d'interactions fonctionnelles et/ou physiques ?

Selon la vision actuelle de la synthèse de l'amylopectine, les différentes formes d'amidon-synthétases allongeraient les glucanes avant l'introduction des ramifications par les enzymes de branchement. Ce processus se répèterait ainsi de manière cyclique afin de produire la structure en grappe de l'amylopectine telle que nous l'avons décrite

précédemment. Ces deux types d'activités enzymatiques sont représentées par plusieurs isoformes qui apparemment possèdent chacune leurs spécificités propres d'action et de substrat. On peut entrevoir les liaisons fonctionnelles qui existent entre les différentes enzymes, chacune étant potentiellement dépendante de l'action d'une autre. Par conséquent, en addition aux spécificités d'action des SSS et des SBEs dans la synthèse des glucanes, les relations qu'elles entretiennent les unes envers les autres doivent jouer un rôle prépondérant dans la détermination de la structure finale de l'amylopectine. Pour tester cette hypothèse Guan et Keeling (1998) ont exprimé différentes combinaisons d'amidon-synthétases et d'enzymes de branchement du maïs chez *Escherichia coli* et isolé les produits formés. Selon la combinaison envisagée, la distribution des longueurs des chaînes variait, renforçant l'hypothèse déjà soulevée par Guan et coll. (1995) selon laquelle les enzymes de branchement végétales ne déterminent pas à elles seules la structure en grappe de l'amylopectine. Dans une très élégante approche Seo et coll. (2002) confirmèrent ce postulat en exprimant les différentes combinaisons des SBEs du maïs chez un mutant pour l'enzyme de branchement du glycogène de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae*. Ainsi, si l'expression de SBEI

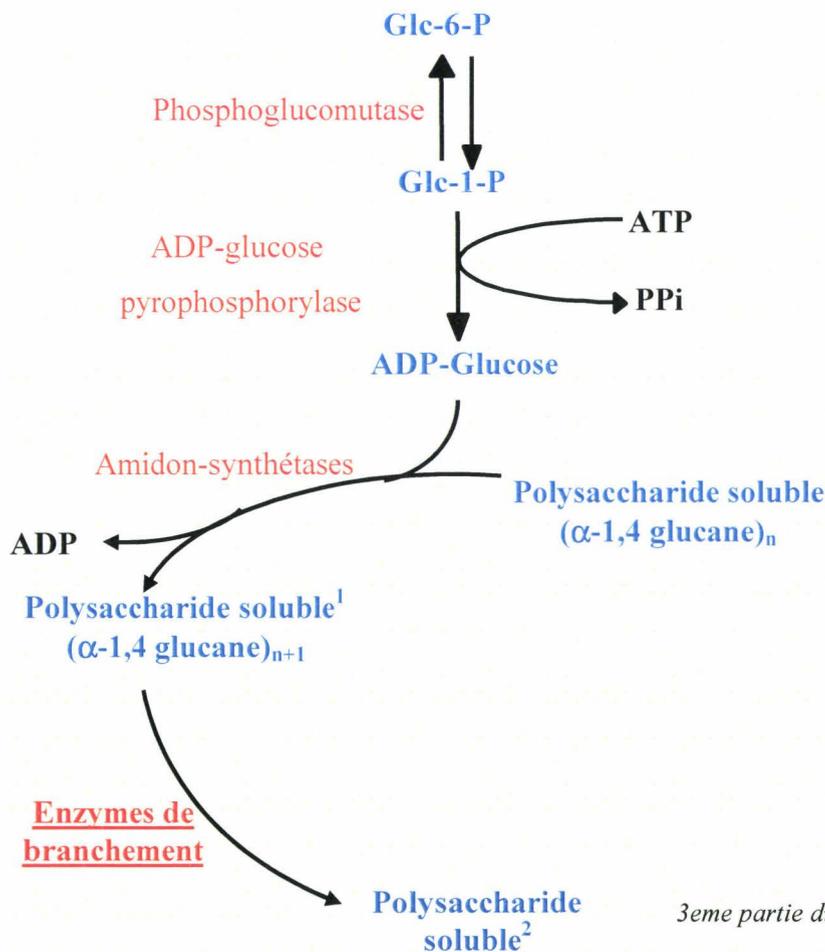
ne permet pas de compléter l'absence de la BE fongique endogène. L'effet de SBEI est observé lorsque les auteurs la co-expriment avec SBEIIa ou SBEIIb. Les auteurs proposent que la glycogène-synthase se révèle incapable de synthétiser le précurseur nécessaire à l'action de SBEI, ce qui interrompt prématurément le cycle élongation-branchement-élongation. De plus, dans le système hétérologue utilisé, l'addition de SBEI à la combinaison SBEIIa et SBEIIb augmente la fréquence de ramification. Les auteurs présentent deux hypothèses pour expliquer ce résultat. Soit les SBEII agissent avant SBEI dans la synthèse du polymère en mettant à disposition un substrat compatible à l'action de SBEI ou bien l'activité de SBEI dépend directement de la présence des isoformes SBEIIa et Iib.

Par la suite, Yao et coll. (2004) confirmèrent les hypothèses soulevées par Seo et coll (2002). Ils constatèrent que l'abolition simultanée des activités de SBEI et SBEIIb conduit à des modifications de la structure fine de l'amylopectine différentes et plus marquées de celles observées dans le simple mutant *ae*. En s'appuyant sur ces nouveaux résultats les auteurs postulent que le rôle de SBEIIb prédomine celui de SBEI dans l'albumen. SBEI inhiberait

ainsi *in vivo* l'action des autres enzymes de branchement.

Par ailleurs, les enzymes de branchement semblent être impliquées dans l'établissement de complexes multi-enzymatiques. Si l'effet pléiotropique de la mutation *dull1* chez le maïs (pour rappel, cette mutation affecte la SSIII) notamment sur l'enzyme de branchement SBEIIa en constituait une preuve indirecte, les travaux de Tetlow et coll. (2004) menés chez le blé apportent une base solide quant à l'existence d'interactions physiques entre différents acteurs du métabolisme du

polymère de réserve. SBEI, SBEIIb et la phosphorylase se réunissent au sein d'un complexe dont l'association dépend de l'état phosphorylé des différents partenaires. La SSI et la SSII semblent également interagir directement avec SBEIIa ou SBEIIb (Mike Emes, communication personnelle). S'il ne fait désormais aucun doute que certaines enzymes du métabolisme de l'amidon travaillent ensemble au sein de complexes protéiques, du moins chez certaines céréales, l'importance et l'impact biologique de ce phénomène reste encore à évaluer de manière formelle.



3eme partie du schéma général de synthèse de l'amidon

e. A la frontière entre cristallisation et dégradation : la participation des enzymes de débranchement

A la lumière de résultats obtenus une nouvelle fois grâce à l'étude de lignées mutantes, on recense d'autres activités nécessaires à l'édification du polymère cristallin. Les enzymes de débranchement (ou DBE pour Debranching Enzymes) sont rencontrées sous plusieurs formes enzymatiques subdivisées en deux classes : les isoamylases (EC 3.2.1.68) qui catalysent le clivage des liaisons α -1,6 de l'amylopectine et les pullulanases (EC 3.2.1.41), capables d'agir également sur le pullulane, un polymère de résidus de maltotriose unis par des liaisons α -1,6 (Manners, 1997).

a. Les isoamylases

En 1996, Ball et coll. proposent un nouveau modèle de synthèse de l'amylopectine intégrant un membre de la famille des enzymes de débranchement (DBE). Suite aux résultats obtenus sur une souche déficiente pour l'isoamylase de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (mutant *sta7*, Mouille et coll., 1996) mais également sur des mutants analogues chez le maïs (mutant *sugary1*, Pan et Nelson. 1984 ; James et coll., 1995) et le riz (Nakamura et coll., 1996) les

auteurs proposent un schéma de synthèse discontinue impliquant une phase d'épissage d'une structure immature afin de lui permettre sa cristallisation ultérieure (figure 11A). Chez tous ces végétaux, l'absence de l'activité isoamylasique provoque un effondrement des quantités d'amidon accumulé, voire sa disparition dans le mutant *sta7* de *Chlamydomonas*. Cette chute s'accompagne d'une accumulation massive d'un polysaccharide soluble nommé phytoglycogène dont la structure ressemble fortement à celle du glycogène qui est synthétisé chez les animaux, les champignons et les bactéries. Dans le modèle de Ball et coll. (1996), les enzymes de branchement forment une nouvelle lamelle amorphe en introduisant les liaisons α -1,6. Cependant, la structure ainsi formée (qualifiée de pré-amylopectine par les auteurs), serait incompatible en l'état à l'élongation par les amidon-synthétases (le niveau de branchement de la lamelle amorphe par les SBEs serait incompatible avec la cristallisation ultérieure de la molécule). La nouvelle lamelle amorphe est ensuite épissée par l'isoamylase qui clive certaines ramifications pour permettre à la molécule de cristalliser. Dans ce modèle, l'isoamylase participe ainsi clairement à la synthèse de l'amylopectine. Mais les travaux de Zeeman et coll. (1998a) sur un mutant (*dbel*) pour une isoamylase

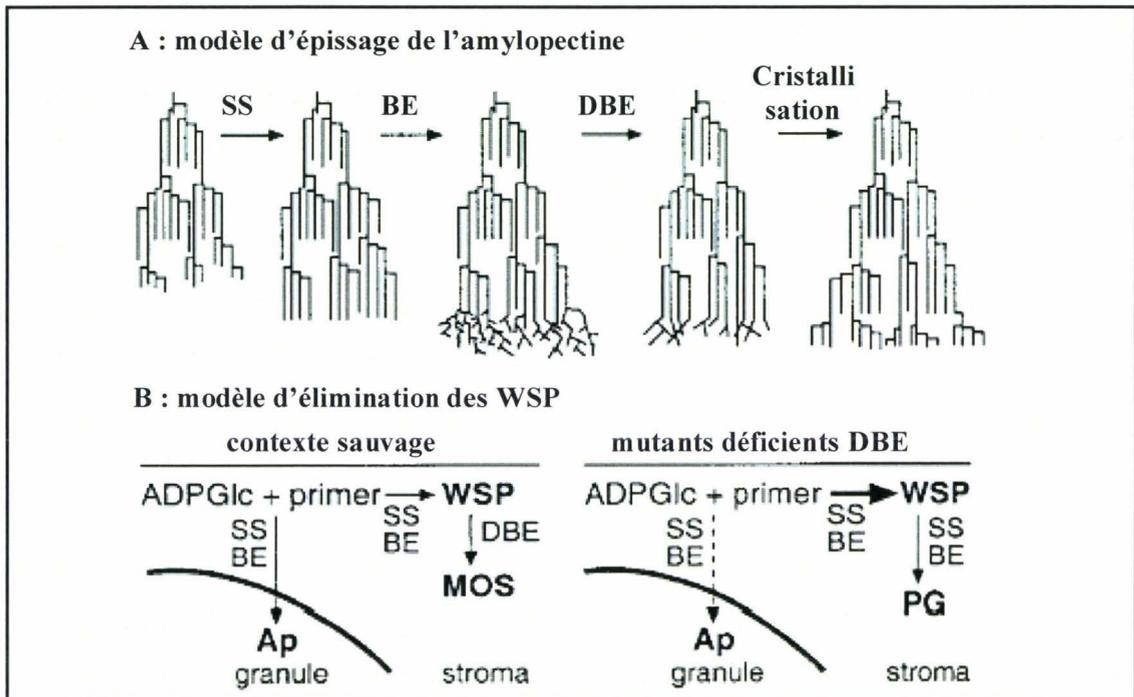


Figure 11 : représentation des modèles d'épissage de la pré-amylopectine (partie A) et d'élimination des polysaccharides solubles (WSP) (partie B). Dans la partie A, les amidon-synthétases (SS) allongent une lamelle amorphe. Lorsque la taille des glucanes devient suffisante ceux-ci peuvent être l'objet de l'action des enzymes de branchement (BE) qui incorporent les liaisons α -1,6 en formant une structure intermédiaire hyper-ramifiée. Les enzymes de débranchement (DBE) clivent les points de branchement qui seraient incompatibles avec la formation d'une lamelle amorphe dont l'élongation ultérieure interdirait la cristallisation de la molécule. Dans la partie B « contexte sauvage », les DBE préviennent l'accumulation de WSP dont la transformation en MOS (malto-oligosaccharides) évite la compétition avec la synthèse de l'amylopectine (Ap). En absence de DBE (partie B à droite), la non-dégradation des WSP détourne l'utilisation du précurseur (ADPGlc) au détriment de la synthèse de l'amylopectine avec pour conséquence la production anormalement élevée de phytoglycogène (PG) dans le stroma. D'après Myers et coll., 2000

d'*Arabidopsis thaliana* vont mettre à mal le tableau peint par Ball et coll. en 1996. Selon les auteurs, le phénotype du mutant *dbel* rejoint celui du maïs dans le sens où l'abolition de la synthèse de l'amylopectine n'est pas totale, de plus la structure de cette amylopectine est identique à celle du sauvage de référence. Ces résultats incompatibles avec le modèle proposé en 1996, amène Zeeman et ses collègues à proposer un autre rôle à l'isoamylase (figure 11B). Cette enzyme préviendrait la synthèse du phytoglycogène

en faveur de la mise en réserve du carbone sous forme d'amidon. Cette interprétation est difficile à concilier avec la nouvelle étude menée chez *Arabidopsis* sur les mutants pour l'isoamylase (Wattebled et coll., 2005 ; Delatte et coll., 2005) qui accumulent une amylopectine dont la distribution de la taille des chaînes est modifiée par rapport au sauvage. Cette observation rejoint les données de nouvelles analyses plus détaillées des mutants du maïs (Dinges et coll., 2001) et du riz (Kubo et coll., 1999) dont les

amylopectines respectives présentent également des modifications de structure. Ces résultats vont donc à l'encontre du modèle proposé par Zeeman et coll. (1998a) et rejoignent l'interprétation de Ball et coll. (1996).

Il est intéressant de noter que l'activité isoamylasique semble portée par un complexe multimérique. En effet, les analyses biochimiques de Beatty et coll. (1999) chez le maïs et de Fujita et coll. (1999) chez le riz ont montré que le poids moléculaire de ce complexe pouvait atteindre 400 kDa. Aux études biochimiques s'ajoutent les observations menées sur des lignées mutantes. Ainsi chez *Chlamydomonas reinhardtii* le mutant au locus *STA8* (Dauvillée et coll., 2001) présente un phénotype comparable au mutant *dbe1* décrit par Zeeman et coll. (1998a) mais moins marqué que le mutant *sta7* précédemment décrit par la même équipe (Mouille et coll., 1996). Les résultats de ces travaux suggèrent que le produit du gène *STA8* est nécessaire à l'activité normale d'un complexe multimérique. Les résultats de Wattebled et coll. (2005) et de Delatte et coll. (2005) sur *Arabidopsis* vont dans le même sens. Les mutants aux loci *AtISA1* et *AtISA2* et le double mutant correspondant perdent la même activité Iso1 habituellement visible

en gel d'activité et affichent exactement le même phénotype.

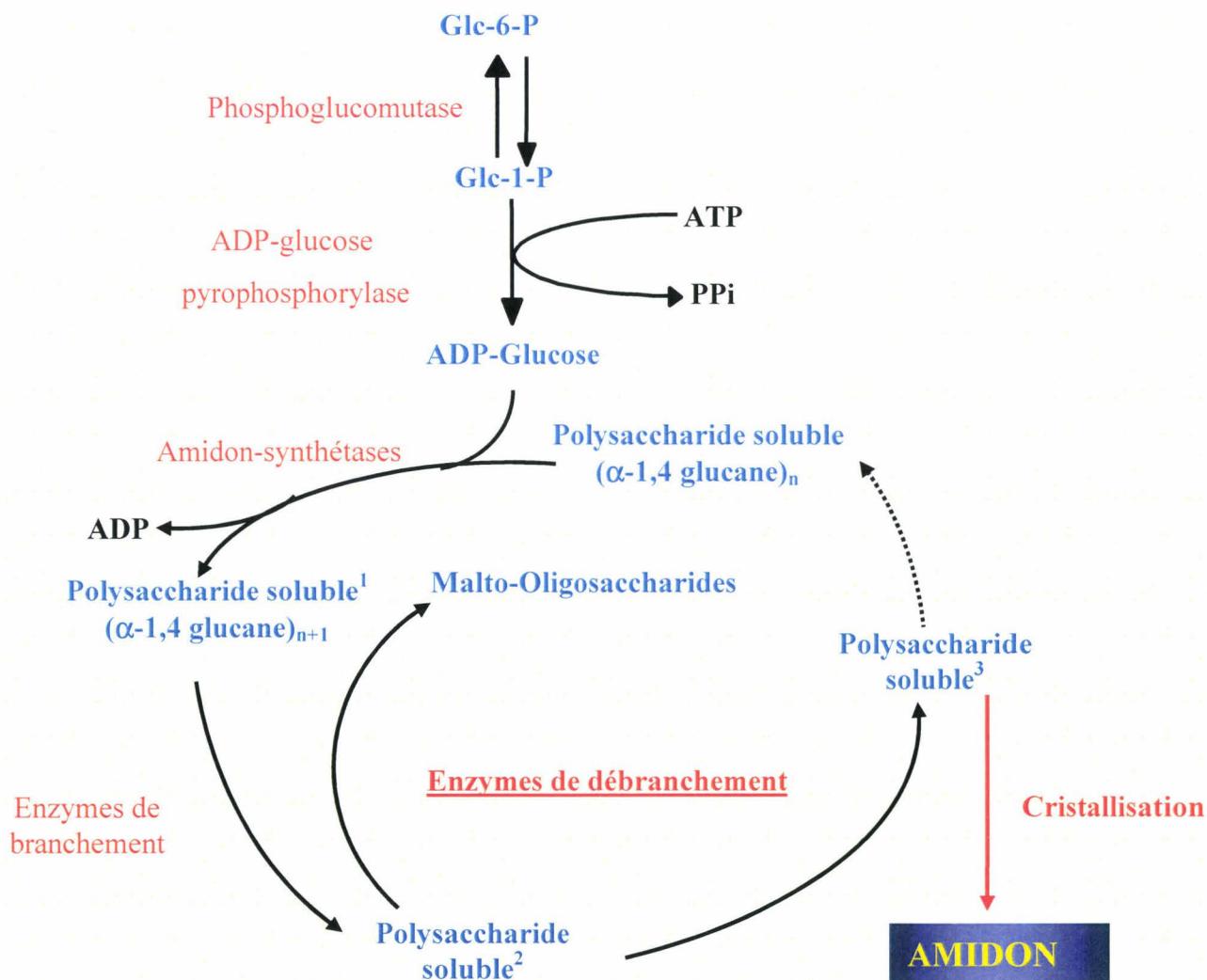
Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient une troisième séquence codant une isoamylase, *AtISA3*. Comme le suggère la surproduction d'amidon dans le mutant correspondant, l'action du produit du gène *AtISA3* doit principalement porter sur la dégradation du polysaccharide de réserve (Wattebled et coll., 2005 ; Delatte et coll., 2006). Cette observation rejoint les résultats obtenus par Hussain et coll. (2003) qui montrèrent *in vitro* que la protéine de la pomme de terre correspondant à *AtISA3* était plus active sur des β -limites dextrines.

b. La pullulanase

La participation de la pullulanase ou limite dextrinase dans le métabolisme de l'amidon commence juste à être perçue. Si Kubo et coll. (1999) lui suggèrent un rôle pour la synthèse de l'amidon en lien avec l'isoamylase, les résultats des mutants *zpu1* du maïs (Dinges et coll., 2003) et *Atpul* d'*Arabidopsis thaliana* (Wattebled et coll., 2005) vont apporter de plus amples indications. Ces deux travaux permettent d'imputer à la pullulanase un rôle dans la synthèse du polymère dans lequel son activité recouvrirait partiellement celle de l'isoamylase dans le modèle d'épissage de Ball et coll. (1996). Néanmoins, les

travaux de Delatte et coll. (2006) qui concernent l'analyse d'une lignée d'*Arabidopsis thaliana* mutante à la fois pour AtISA3 et AtPU1 (la pullulanase) suggèrent un recouvrement partiel des fonctions de ces deux enzymes dans la feuille puisqu'ils observent dans le double mutant une augmentation encore plus marquée du contenu en amidon par comparaison avec le simple mutant *Atisa3*. Ces résultats laissent donc entrevoir la possibilité d'une fonction double de la pullulanase (synthèse et dégradation) en

lien avec les isoamylases de synthèse et de dégradation. Indiquons que le simple mutant pour la pullulanase (*Atpu1*) décrit par Wattedled et coll. (2005) n'affiche visiblement aucune altération du contenu et de la structure de l'amidon des feuilles. A elle seule, la pullulanase semble donc n'avoir qu'un rôle mineur dans le métabolisme de l'amidon transitoire (situation différente de l'amidon de stockage accumulé dans les organes de réserve où l'impact de l'absence de pullulanase semble plus marqué).



4eme partie du schéma général de synthèse de l'amidon

D- La dégradation de l'amidon et la mobilisation des réserves

Nous avons décrit l'amidon comme une possibilité de mise en réserve d'énergie et de carbone par le végétal sous la forme d'une structure polysaccharidique complexe et semi-cristalline. Mais la plante doit pouvoir mobiliser ces réserves lorsque le besoin s'en fait sentir, lors de la germination (graine ou tubercule) ou au cours de la nuit pour poursuivre son développement. Définir la ou les voies menant à la dégradation de l'amidon demande de répondre aux questions suivantes : quelles sont les activités capables « d'attaquer » le grain d'amidon ? Quel est (sont) le(s) produit(s) formé(s) ? Quel est son (leur) devenir ? Il y a encore peu de temps, la dégradation restait un domaine confus au sein duquel il était difficile d'établir un schéma clair. La multiplicité des formes enzymatiques capables de dégrader des α -glucanes et le peu de mutants disponibles pour celles-ci sont responsables en grande partie du flou dans lequel la communauté scientifique baignait. Mais l'acquisition des connaissances sur la dégradation du polymère s'est accéléré ces dernières années, notamment dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana* et la pomme de terre. Les informations retirées d'études

récentes répondent désormais en partie aux questions posées ci-dessus et permettent enfin d'entrevoir l'organisation de la dégradation de l'amidon. Il semble toutefois que des voies dégradatives différentes soient mises en place selon le végétal étudié ou l'organe spécifié. Nous tracerons le schéma de la mobilisation des réserves glucidiques tel qu'il est imaginé aujourd'hui chez *Arabidopsis thaliana*.

a. La phosphorylation de l'amidon est un requis obligatoire

Si le processus enzymatique à l'origine de la dissociation du granule n'est pas clairement défini, il semble néanmoins requérir la phosphorylation de certaines unités de glucose. Cette modification de l'amidon, qui prend part aussi bien durant la phase lumineuse que durant la nuit et se réalise à la surface du granule (Ritte et coll., 2004), semble représenter un pré-requis essentiel pour la mise en place des événements qui conduisent à la mobilisation du polymère. Une protéine découverte en 1998 par Lorberth et coll., nommée « R1 » puis renommée plus tard GWD (pour Glucan Water Dikinase) catalyse la phosphorylation en position C6 d'une petite proportion de résidus de glucose à partir d'ATP (Ritte et coll., 2002). La réduction de l'activité de GWD conduit à la suraccumulation d'amidon comme dans une lignée de pomme de terre

dans laquelle l'expression de GWD est inhibée par un antisens (Lorberth et coll., 1998) ou dans le mutant *sex1* (pour starch excess) d'*Arabidopsis thaliana* (Yu et coll., 2001). Plus récemment, une deuxième enzyme ressemblant à GWD et capable de phosphoryler les résidus de glucose en C3 fut identifiée chez *Arabidopsis*. Son activité est strictement dépendante d'une pré-phosphorylation des glucanes par GWD, et de ce fait fut nommée PWD (pour Phosphoglucan Water Dikinase) (Kötting et coll., 2005 ; Baunsgaard et coll., 2005). L'inactivation de PWD chez *Arabidopsis thaliana* conduit à un phénotype similaire à celui des lignées déficientes pour GWD. Le lien entre phosphorylation et dégradation n'est pas clairement établi, toutefois certaines hypothèses peuvent être émises. La présence de groupements phosphate pourrait désorganiser l'empaquetage de la molécule d'amylopectine et faciliter ainsi l'initiation de sa dégradation (Blennow et coll., 2002) ou bien la présence de résidus de glucose estérifiés est nécessaire à l'action des enzymes amylolytiques.

b. La voie hydrolytique

Les premières enzymes amylolytiques potentiellement impliquées dans les premiers événements de la dégradation sont les α -amylases (EC 3.2.1.1). Ce sont des endoamylases qui

hydrolysent une liaison α -1,4 d'un glucane et produisent de petits malto-oligosaccharides de longueur minimale de 2 résidus de glucose (α -maltose). Elles sont connues pour être massivement exprimées lors de la germination de la graine et sont capables d'agir sur le polymère insoluble (Sargeant, 1979). Cependant leur rôle dans le catabolisme de l'amidon transitoire des feuilles n'est toujours pas établi. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient trois gènes codant des protéines de type α -amylases. La localisation intracellulaire de l'une d'elles, AMY3, est prédite pour être chloroplastique. Zeeman et coll. (1998b) rapporte l'étude d'un mutant suraccumulateur d'amidon nommé *sex4* dans lequel l'activité de l' α -amylase plastidiale chute. Ce travail semblait constituer la preuve de l'importance de cette enzyme dans la dégradation du polysaccharide. Mais le locus *SEX4* n'est pas le gène de structure codant AMY3, il code en réalité une phosphatase (Smith et coll., 2005). La cible de cette enzyme n'est pas connue, mais on peut imaginer que l'activité d'une protéine importante dans la dégradation soit inhibée par phosphorylation, notamment AMY3. Un nouveau travail a donc été entrepris sur des mutants pour chaque isoforme d' α -amylases d'*Arabidopsis*. De manière

surprenante, la vitesse de dégradation de l'amidon du mutant *amy3* est tout à fait normale, tout comme la lignée triple mutante pour les trois α -amylases repérées la forme plastidiale et les 2 formes cytosoliques (Yu et coll., 2005). Les α -amylases ne semblent donc pas essentielles à une digestion normale du polymère durant la nuit dans les feuilles et le phénotype observé dans le mutant *sex4* ne provient vraisemblablement pas de l'effet de la mutation sur l'activité de AMY3.

Une autre classe d'enzymes amylolytique décrite est composée des β -amylases (EC 3.2.1.2). Contrairement aux α -amylases, les β -amylases sont des exo-amylases qui libèrent presque exclusivement du β -maltose en hydrolysant les α -1,4 glucanes à partir de leur extrémité non-réductrice jusqu'à une liaison α -1,6 que les β -amylases ne peuvent dégrader. La dégradation de l'amylopectine par les β -amylases aboutit à la formation d'une β -limite dextrine (Baba et Kainuma, 1987). La démonstration de l'importance des β -amylases fut apportée par l'analyse d'une lignée antisens de pomme de terre réprimant l'expression d'une β -amylase plastidiale (Scheidig et coll., 2002). La répression de la β -amylase plastidiale conduit à une nette diminution de la capacité de dégradation de l'amidon

dans les feuilles. De plus, la protéine recombinante est capable de libérer du maltose à partir de grains d'amidon natifs. Sur les 9 séquences d'*Arabidopsis* homologues aux β -amylases, seules 4 semblent posséder un peptide de ciblage au chloroplaste. Une seule d'entre elles a été formellement localisée dans le plaste (Lao et coll., 1999). La seule lignée d'*Arabidopsis* déficiente pour une β -amylase est le mutant *ram1*. Mais l'absence de la protéine, normalement localisée dans le cytosol, ne conduit pas à l'observation d'un phénotype modifié concernant l'amidon dans ce mutant par comparaison avec le sauvage.

La présence de liaisons α -1,6 que les enzymes amylolytiques ne peuvent dégrader, nécessite l'action des enzymes de débranchement. Cette classe enzymatique a déjà été évoquée précédemment, rappelons juste qu'une lignée mutante pour une forme d'isoamylase (*isa3*) accumule plus d'amidon que le sauvage quel que soit le moment du cycle et le dégrade moins vite lors de la phase nocturne (Wattebled et coll., 2005 ; Delatte et coll., 2006). ISA3 semble agir à la surface du grain d'amidon en libérant de courts glucanes de l'amylopectine (Delatte et coll., 2006). Les mêmes auteurs proposent que son absence

peut être en partie palliée par la pullulanase (ou limite dextrinase) sur la base du phénotype du double mutant *isa3-lda-* (*lda* pour limite dextrinase), plus marqué que celui du simple mutant *isa3-*. Cependant la fonction de la pullulanase ne semble pas si nette puisque son activité apparaît aussi partiellement redondante de celle d'Iso1 (le complexe de débranchement formé des sous-unités ISA1 et ISA2) qui est impliquée dans la synthèse de l'amylopectine (Wattebled et coll., 2005).

Chez *E. coli*, le locus *malQ* code une amyloamylase encore appelée α -1,4-glucanotransférase (EC 2.4.1.25) qui catalyse la réaction de transfert d'un glucane à partir d'un glucane donneur vers un autre (figure 12).

L'amyloamylase est essentielle à la dégradation du maltose chez *E. coli*. Les mutants *malQ-* deviennent incapables de croître sur un milieu contenant du maltose comme unique source carbonée et accumulent des quantités anormalement élevées de ce disaccharide. Une enzyme similaire nommée enzyme disproportionnante (ou enzyme-D) existe chez les plantes mais sa fonction exacte au sein du métabolisme de l'amidon demeure un sujet de discussion. La disparition de l'activité de l'enzyme-D chez *Chlamydomonas reinhardtii*, codée par le locus *ST11* (Wattebled et coll., 2003) entraîne une chute du contenu en amidon

(le mutant ne contient plus que 10% d'amidon en comparaison avec la souche sauvage de référence), notons que cette baisse n'est observable que lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu carencé en azote. Le mutant accumule

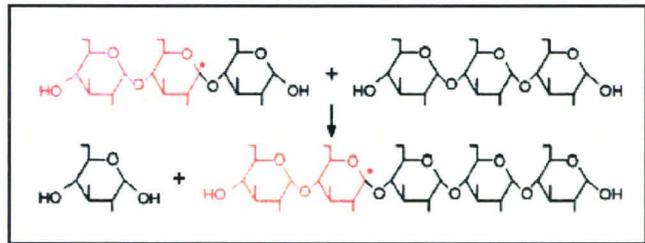


Figure 12 : représentation schématique du mode d'action de l' α -1,4 glucanotransférase ou enzyme-D d'après Myers et coll. (2000). Les extrémités réductrices des glucanes sont positionnées à droite de ce schéma, les extrémités non-réductrices à gauche. Les résidus de glucose distingués en rouge sont ceux qui subissent la réaction de transfert catalysée par l'enzyme D.

simultanément de courts malto-oligosaccharides solubles (Colleoni et coll., 1999a). La structure de l'amylopectine résiduelle est modifiée, particulièrement au niveau des chaînes courtes de DP inférieur à 16 résidus de glucose. Colleoni et coll. (1999b) montrèrent que l'enzyme-D était capable d'agir sur les chaînes externes de l'amylopectine en y incorporant des glucanes linéaires tout en libérant un résidu de glucose par glucane transféré. De plus, ils prouvèrent que l'ajout de l'enzyme-D purifiée stimulait la dégradation phosphorolytique à partir de maltotriose et de maltotétraose. Les auteurs se sont basés sur l'ensemble des informations retirées de leurs travaux pour attribuer à l'enzyme-D

une fonction essentielle à la synthèse de l'amidon. Les glucanes largués par l'action de l'isoamylase dans le modèle de Ball et coll. (1996) au cours de l'épissage de la pré-amylopectine (voir page 45) seraient pris en charge par l'enzyme-D et transférés sur l'amylopectine. Cette réaction

limiterait la perte à un seul résidu de glucose au lieu d'un glucane linéaire entier. Cette hypothèse nous permet de compléter le schéma de biosynthèse de l'amidon construit jusqu'à présent (figure 13).

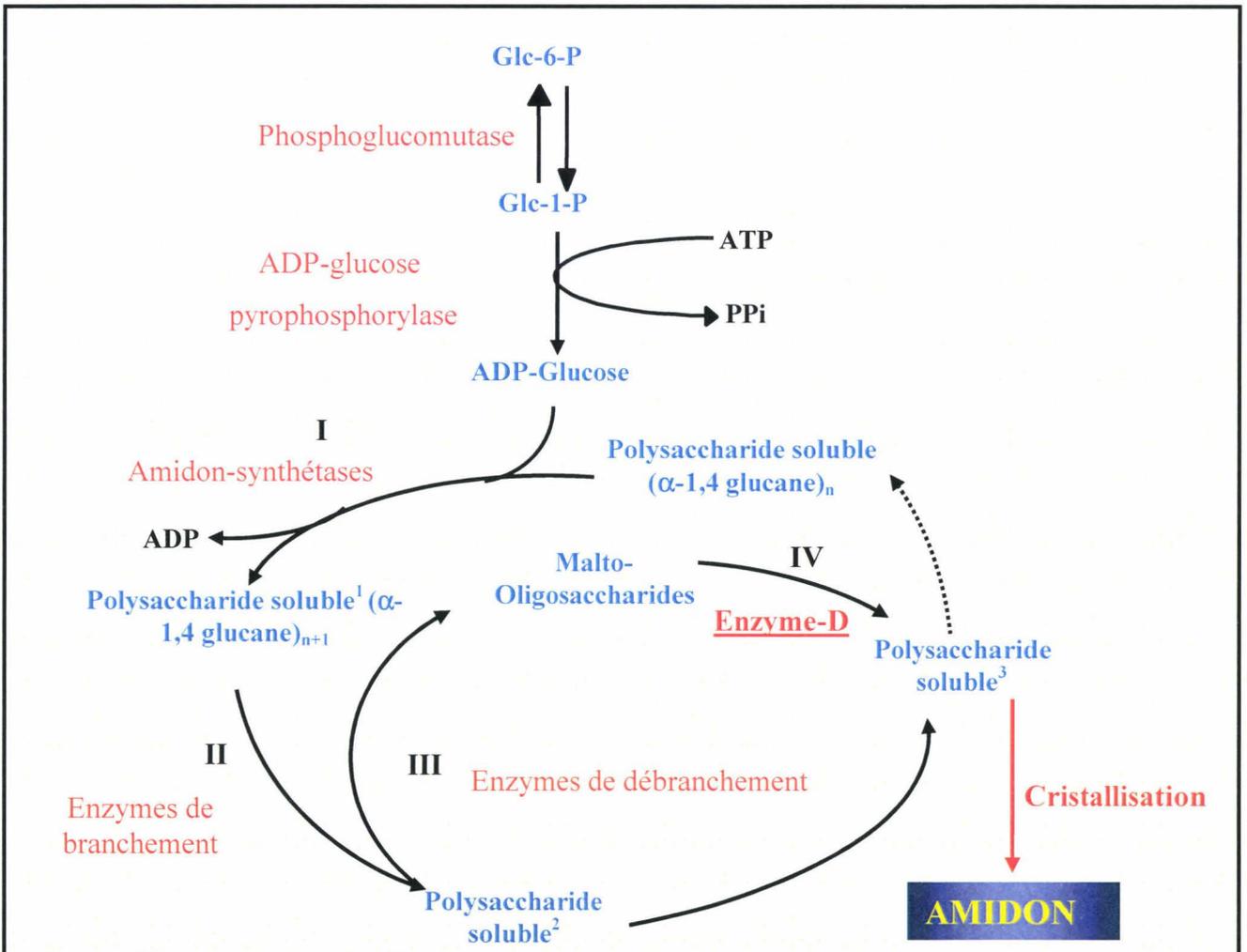


Figure 13 : un nouveau modèle de biosynthèse de l'amidon (modifié d'après Wattedled, 2002).

I : Les amidon-synthétases utilisent l'ADP-glucose pour allonger les chaînes en formation et former le « Polysaccharide soluble¹ ». **II** : Les enzymes de branchement introduisent les liaisons α-1-6 de façon aléatoire sur la structure existante (« Polysaccharide soluble² »). **III** : Les enzymes de débranchements permettent l'épissage du « Polysaccharide soluble² » prévenant ainsi la formation de phytyglycogène. Cette étape génère d'un côté, un polysaccharide mature très organisé (Polysaccharide soluble³) qui va éventuellement pouvoir cristalliser, de l'autre des malto-oligosaccharides linéaires solubles. **IV** : L'enzyme disproportionnante utilise ces malto-oligosaccharides comme substrat afin de les réincorporer sur l'amylopectine en formation. Cette étape limite la perte énergétique qui peut compromettre une production normale d'amidon en condition d'apport énergétique extérieure faible voire nul (comme lors de la carence azotée chez *C. reinhardtii*). La seule perte enregistrée provient alors de la libération du glucose facilement métabolisable par la cellule. Le polysaccharide mature produit lors de l'étape d'épissage (Polysaccharide soluble³) va pouvoir cristalliser ou entrer dans un nouveau cycle de synthèse jusqu'à sa cristallisation.

Mais en 2001, Critchley et coll. rapportent l'étude d'un mutant similaire chez *Arabidopsis thaliana*. Le mutant *dpe1* ne présente aucune baisse des quantités d'amidon ni altération significative de la structure de l'amylopectine emmagasinée. Mais, *a contrario* du phénotype du mutant *stall* de *Chlamydomonas*, la perte de l'enzyme-D chez *Arabidopsis* empêche la lignée mutante de dégrader correctement son amidon. En fin de nuit, les feuilles du mutant *dpe1* contiennent environ trois fois plus d'amidon que la lignée sauvage et 8 fois plus de malto-oligosaccharides principalement sous forme de maltotriose. Ces résultats ont encouragé les auteurs à allouer à l'enzyme-D un rôle différent de celui-ci proposé par Colleoni et coll (1999b). L'enzyme-D participerait au recyclage des malto-oligosaccharides formés lors de la dégradation de l'amidon à l'obscurité. L'action de cette enzyme conduirait à former des glucanes plus longs qui seraient alors catabolisés plus aisément par les enzymes de dégradation. Dans l'hypothèse qui émane de cette équipe, l'enzyme-D sera retrouvée dans le schéma présentant la dégradation de l'amidon imaginée aujourd'hui chez *Arabidopsis*.

c. La voie phosphorolytique

Les α -glucanes phosphorylases catalysent de manière réversible la réaction suivante :



Le nombre d'isoformes peut varier selon l'espèce végétale étudiée. On observe par exemple chez *Arabidopsis* une isoforme plastidiale et une isoforme cytosolique (Zeeman et coll., 2004) tandis que chez la pomme de terre deux isoformes plastidiales s'ajoutent à l'enzyme cytosolique (Duwenig et coll., 1997 ; Sonnewald et coll., 1995 ; Albrecht et coll., 2001). Cette situation est aussi retrouvée chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Luc Liénard, Thèse de Doctorat, 2003). Tsai et Nelson (1969) décrivent un mutant du maïs affecté pour l'activité des trois phosphorylases. Nommé *shrunken-4* en raison de la taille réduite de ses graines, ce mutant accumule des quantités d'amidon réduites des deux tiers. La baisse simultanée du contenu en phosphate de pyridoxal, le cofacteur obligatoire des α -glucanes phosphorylases, fut dans un premier temps accusée de l'origine de la baisse d'activité des phosphorylases (Burr et Nelson, 1973). Mais les travaux de Yu et coll. (2001) montrèrent que la baisse d'activité phosphorylasique dans le mutant *shrunken-4* était indépendante du problème de la synthèse de son cofacteur. Reste

néanmoins que la pléiotropie de cette mutation chez le maïs occulte très certainement la part de la baisse d'activité des α -glucanes phosphorylases dans l'effondrement du contenu en amidon. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, la perte de l'activité de PhoB, l'une des deux isoformes plastidiales, conduit dans ce cas à une suraccumulation d'amidon. Ce phénotype laisse envisager de l'importance du rôle joué par la phosphorylase dans la dégradation du grain. Mais en 2004, Zeeman et coll. décrivent un nouveau mutant pour la forme plastidiale d'amidon-phosphorylase chez *Arabidopsis thaliana*. Les auteurs n'observent aucun effet sur la dégradation du polymère rejetant de fait toute intervention de l'amidon-phosphorylase dans le catabolisme de l'amidon dans les feuilles. Toutefois l'examen de ce même mutant par notre équipe a abouti à l'observation de grains légèrement plus volumineux dans le mutant sans pour autant affecter le contenu en polysaccharide (D'Hulst et coll., 2004) Ce résultat suggère d'une participation subtile de l' α -glucane phosphorylase dans le métabolisme de l'amidon.

La part de la voie phosphorolytique dans le catabolisme du grain d'amidon ne semble en tout cas pas être la route principale choisie par les végétaux pour mobiliser les réserves polysaccharidiques.

d. La nature du produit formé

Si les preuves expérimentales concluantes manquent encore pour attribuer précisément un rôle à chaque forme enzymatique que l'on suppose impliquée dans la dégradation de l'amidon, certaines preuves indirectes proposent actuellement des pistes pour contourner ce problème. Weise et coll. (2004) ont étudié l'export de métabolites à partir de chloroplastes intacts de feuilles d'épinard. Ils ont observé que durant la nuit, le maltose était le produit principal exporté du chloroplaste. Plus tard, les mêmes auteurs ont montré que c'est essentiellement le maltose en configuration anomérique β qui est exporté (Weise et coll., 2005). Les β -amylases semblent par conséquent bien impliquées dans le processus de dégradation de l'amidon des feuilles. Sur la base de leur observation de l'existence d'un gradient de β -maltose entre le chloroplaste et le cytosol, les mêmes auteurs proposent que ce maltose traverse l'enveloppe du chloroplaste de manière passive.

e. Le transport du maltose

Les résultats des travaux de Niittylä et coll. (2004) ne sont pas conciliables avec l'hypothèse de Weise et coll. (2005). En effet, ils décrivent les résultats d'une lignée mutante d'*Arabidopsis* présentant

un caractère de suraccumulation d'amidon, dont la croissance est ralentie et présentant des niveaux très élevés de maltose. Cette lignée mutante fut baptisée *mex1* (pour maltose excess). Le produit du gène *MEX1* est ancré dans l'enveloppe du chloroplaste et la protéine correspondante (MEX1) complémente la mutation *malF*- chez *E. coli* (les mutants *malF* sont dépourvus de leur transporteur de maltose et ne peuvent croître sur un milieu dont le maltose est la seule source de carbone disponible). MEX1, selon toute vraisemblance, est un transporteur de maltose de l'enveloppe du chloroplaste chez *Arabidopsis* et au regard du phénotype affiché par le mutant, doit représenter la voie d'exportation majeure du maltose vers le cytosol.

f. Le devenir du maltose

L'exploration du génome d'*Arabidopsis thaliana*, rendu disponible en 2000, a permis de trouver une deuxième séquence d'enzyme disproportionnante. La séquence peptidique de l'enzyme correspondante (nommée DPE2) ne dispose apparemment pas de peptide de transit vers le chloroplaste (selon les programmes informatiques habituels ChloroP et TargetP, Emanuelsson et coll., 1999). La protéine fut localisée uniquement dans le cytosol des cellules d'*Arabidopsis* (Chia et coll., 2004). Des lignées mutantes pour ce gène furent

analysées (Lu et Sharkey, 2004 ; Chia et coll., 2004). Les plantes mutantes ont une croissance ralentie et les plantes adultes, plus petites que le sauvage, possèdent des feuilles plus pâles, rappelant le phénotype des plantes mutantes *mex1*. L'abolition de la fonction de DPE2 aboutit, tout comme dans le cas du mutant *mex1*-, à la suraccumulation d'amidon et à un contenu anormalement élevée de sucres solubles dont le principal constituant est le maltose. Les plantes mutantes contiennent également des quantités moindres de saccharose. De plus, Chia et coll. (2004) montrèrent que DPE2 est capable de transférer des résidus de glucose sur une molécule accepteuse comme le glycogène à partir de maltose. Un travail similaire mené sur une lignée de pomme de terre dont l'activité stDPE2 est réprimée montre des résultats identiques sauf en ce qui concerne la localisation de l'enzyme qui en l'occurrence semble être située dans le stroma (Lloyd et coll., 2004). Cette position intracellulaire différente induit un mode de dégradation du maltose différent notamment au niveau du substrat accepteur et du transport du produit libéré. Malgré cette différence, les résultats de ces travaux s'accordent sur l'importance de l'activité de DPE2 dans la dégradation du maltose. DPE2 représente donc un composant primordial de la voie de métabolisation de l'amidon dans les feuilles.

Le phénotype des lignées mutantes *dpe2*-chez *Arabidopsis* suggère que le processus de dégradation de l'amidon dans le plaste est lié au métabolisme d'un glucane cytosolique de nature inconnue mais qui serait le substrat accepteur du résidu de glucose transféré par DPE2. Actuellement le meilleur candidat en lice est un hétéroglycane soluble constitué d'arabinose, de galactose, de glucose, de fucose, de rhamnose, de xylose et de

mannose qui semble fournir un bon substrat à la forme cytosolique de la phosphorylase (Yang et Steup, 1990 ; Fettke et coll., 2004 ; Fettke et coll., 2005a et 2005b). Le glucose libéré par DPE2 pourrait être ensuite phosphorylé avant sa conversion en saccharose.

Les voies conduisant à la dégradation de l'amidon chez *Arabidopsis* telles qu'elles sont perçues aujourd'hui sont schématisées sur la figure 14.

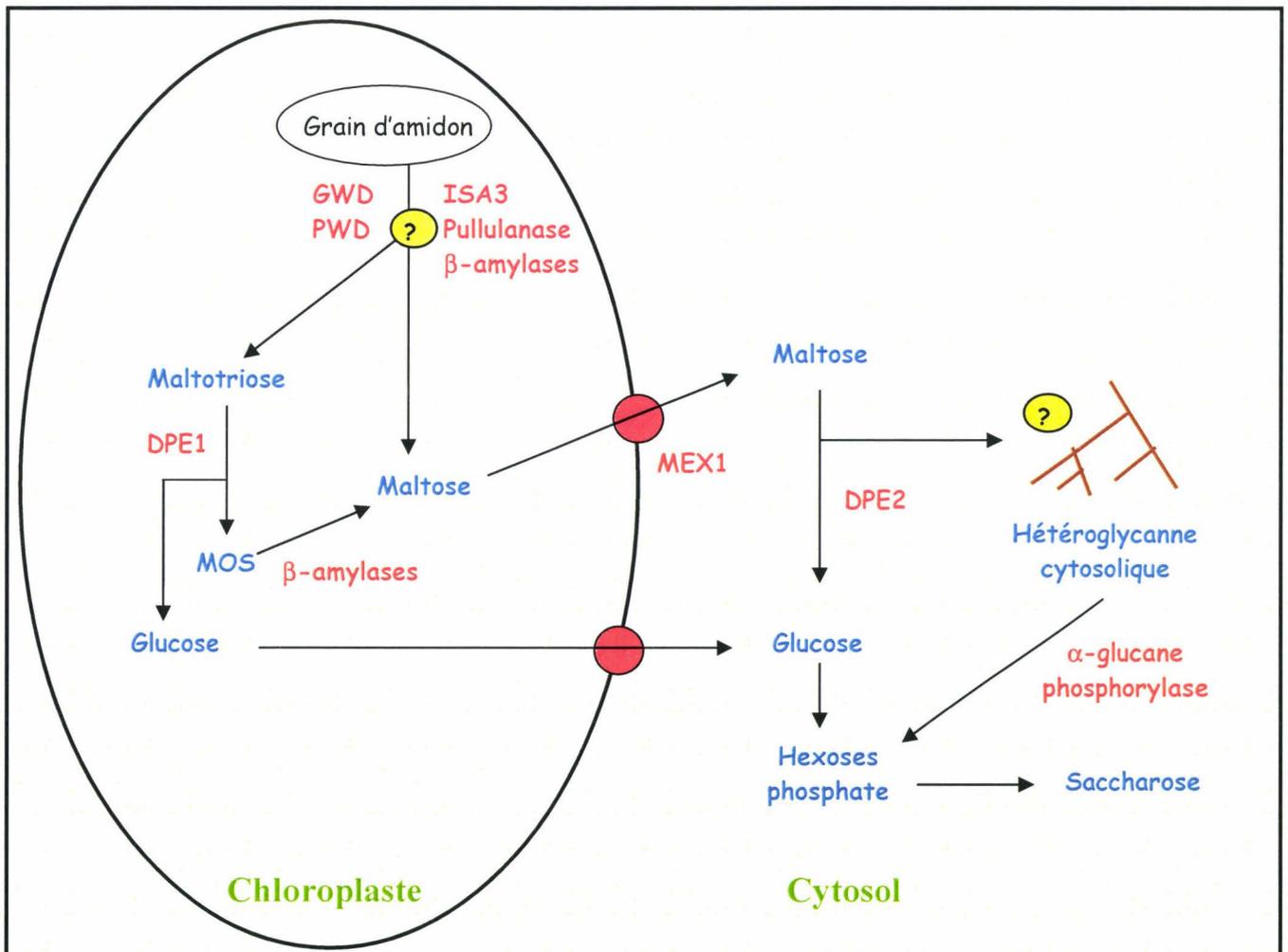


Figure 14: Mécanisme supposé de dégradation de l'amidon dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Les points d'interrogation indiquent des étapes putatives. La séquence précise des événements conduisant à la libération de glucanes branchés ou linéaires à partir de l'amidon granulaire n'est pas connue, de même que les accepteurs glucaniques de la transglucosidase DPE2. Abréviations : GWD : Glucan Water Dikinase ; PWD : Phosphoglucan Warer Dikinase ; MEX1 : Maltose Exporter ; MOS : Malto-OligoSaccharides.

E- Le choix d'*Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (arabette des dames ou arabette rameuse) fut découverte au XVI^e siècle par le botaniste Johannes Thal qui lui laissa son nom. Elle appartient à la famille des brassicacées (ou crucifères) à laquelle appartiennent de nombreuses espèces cultivées comme le chou, le navet, la moutarde, le colza ou le radis. Plus de 750 accessions naturelles d'*Arabidopsis thaliana* ont été collectées dans le monde, dont les écotypes couramment utilisés Columbia, Landsberg et Wassilewskija, et sont disponibles dans les deux centres de semences ABRC et NASC.

Arabidopsis thaliana est une petite plante herbacée dicotylédone retrouvée principalement en Europe et en Asie dans des milieux divers tels que les zones cultivées, les dunes ou les talus. A l'âge adulte, les plantes atteignent 30 à 50 cm. Elles sont formées d'une rosette de feuilles de 2 à 5 cm de diamètre située au ras du sol dont se détache une courte racine et un pédoncule floral portant des feuilles alternes et une inflorescence en grappe (figure 15). Des rameaux secondaires se détachent et portent également des inflorescences. Les fleurs blanches de quelques millimètres sont typiques des crucifères avec quatre sépales et quatre pétales disposés en croix, quatre étamines

et un pistil. Le mode de reproduction est principalement autogame. Après fécondation, chaque fleur se transforme en une capsule allongée, la silique, contenant entre 30 et 50 graines. Chaque plante peut ainsi produire plusieurs milliers de graines à chaque génération. Le cycle de développement se déroule en six à huit semaines si les facteurs influant sur la croissance ne sont pas limitants.



Figure 15 : Vue d'un plant d'*Arabidopsis thaliana* âgé d'environ 6 semaines.

Plusieurs caractéristiques d'*Arabidopsis* ont conduit la communauté scientifique internationale à faire de cette plante le représentant des végétaux chlorophylliens vasculaires parmi les organismes modèles utilisés en génétique. La vitesse de son cycle de vie et la faible taille de cette plante autorise à la cultiver sans besoin de grandes infrastructures. Son

petit génome de 125 Mbases (ceux du riz et du maïs sont respectivement 4 fois et 20 fois plus grands) organisé en 5 chromosomes fut séquencé et publié en 2000 par The Arabidopsis Genome Initiative.

L'efficacité des méthodes de mutagenèse et leur facilité à être mises en œuvre chez *Arabidopsis* constituent des atouts majeurs de ce modèle végétal. Ces dernières années, la mutagenèse insertionnelle a été largement utilisée et les banques de mutants contiennent désormais plusieurs centaines de milliers de mutants disponibles aux chercheurs et couvrant la quasi totalité des 26000 gènes d'*Arabidopsis*.

La technique de transformation décrite par Bouchez et coll. (1993) détourne la voie d'infection naturelle d'un phytopathogène des plantes, *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie possède le plasmide Ti (Tumor inducer) possédant une partie mobile (l'ADN-T pour ADN de transfert) capable de migrer vers la cellule végétale infectée et de transformer le génome nucléaire de la cellule infectée. La mobilisation de l'ADN-T n'est rendue possible que sous certaines conditions de stress et en particulier lors de l'apparition de blessures au niveau de la plante. L'ADN-T est le support de gènes

codant pour des voies de biosynthèse de composés organiques assimilables par la bactérie (les opines), mais aussi de facteurs de croissance (cytokinines et auxines), ce qui entraîne le développement des bactéries et l'apparition de tumeurs. Le vecteur utilisé lors des mutagenèses insertionnelles est modifié de façon à ce que l'ensemble des gènes induisant la pathogénicité est remplacé par des marqueurs génétiques de sélection (figure 16). Lors de l'infection, l'ADN-T s'intègre aléatoirement dans le génome de la cellule végétale par recombinaison illégitime (Mayerhofer et coll., 1991) à raison de 1,5 insertion en moyenne par plante (Bechtold et coll., 1993). La cible principale de cette intégration est le matériel chromosomique du gamétophyte femelle (Desfeux et coll., 2000 et Bechtold et coll., 2000) permettant la transmission de la mutation à la descendance jusqu'à obtention d'individus homozygotes mutants. Les sites d'insertion de l'ADN-T sont ensuite systématiquement séquencés (Balzergue et coll., 2001). Les petites séquences ainsi générées sont nommées FSTs (pour Flanking Sequence Tag). La disponibilité de la séquence génomique d'*Arabidopsis* permet ensuite de situer avec exactitude les sites d'insertion de l'ADN-T dans chaque lignée mutante. La recherche d'une lignée mutante d'intérêt est réalisé facilement *in silico* en consultant par exemple la base de

données française FlagDB (<http://flagdb-genoplante-info.infobiogen.fr/projects/fst/>, Samson et coll., 2002). Il s'agit là d'un formidable outil dont disposent les végétalistes pour aborder des études de génomique fonctionnelle de divers métabolismes par cette voie de génétique inverse. Depuis des années, notre laboratoire a choisi de disséquer la voie métabolique de l'amidon.

L'analyse du génome d'Arabidopsis a permis de mettre en évidence l'existence d'au moins 33 loci potentiellement impliqués dans le métabolisme de l'amidon chez cette plante (Tableau 3).

Cette liste n'est pas exhaustive, puisque nous avons volontairement écarté les loci dont les activités ont déjà été explorées de manière approfondie, telles que les ADP-glucose pyrophosphorylases ou encore les phosphoglucomutases. Par ailleurs, cette liste est établie sur la base de notre connaissance actuelle du métabolisme de l'amidon dont on peut se faire une idée très précise à travers la littérature. Cependant, il n'est pas possible de sélectionner *a priori* des gènes dont l'implication dans le métabolisme n'est pas soupçonnée.

Dans le cadre de ce projet, notre laboratoire s'est proposé de cribler de manière systématique la banque de mutants

d'insertion d'Arabidopsis établie par l'INRA de Versailles (URGV), afin de sélectionner et d'analyser des lignées déficientes pour le maximum des 33 activités enzymatiques citées dans le tableau 3.

L'analyse de chaque lignée sélectionnée sera réalisée en considérant les points suivants :

1) Dosage des activités enzymatiques et analyses par gels d'activités (zymogrammes). Localisation temporelle, cellulaire et tissulaire de l'activité enzymatique à travers la plante.

2) Etude structurale des polysaccharides de réserve :

a. Dosages de la quantité des sucres solubles et insolubles synthétisés

b. Etude morphologique des grains d'amidon (microscopie électronique à balayage et par transmission)

c. Détermination de l'organisation de la structure granulaire (diffraction des rayons X grands angles)

d. Analyses de la structure des cristallites du polysaccharide (diffraction des rayons X petits angles)

Tableau 3 : liste des 33 gènes qui ont retenu notre intérêt dans le projet Génoplante Af2001030.

^a Les noms donnés sont assignés de telle manière à constituer une terminologie simple et significative pour chaque gène impliqué dans l'étude. Les noms formels indiqués dans la 2^{ème} colonne sont ceux obtenus dans la littérature et correspondent à des loci qui ont déjà été analysés.

Nom du gène dans ce projet ^a	Autre nom du gène ^a	Numéro de gène nomenclature ACI	Fonction probable	Numéro d'accension dans GenBank	Localisation de l'ORF (5' vers 3')	Chromo- some	Nombre d'introns
<i>AtGBS1</i>		At1g32900	GBSSI	AC006424	43039-40115	I	12
<i>AtSS1</i>		At5g24300	SSI	AB006701	54498-58424	V	15
<i>AtSS2</i>		At3g01180	SSII	AC008261	31487-34709	III	8
<i>AtSS3</i>		At1g11720	SSIII	AC007296	38926-34597	I	14
<i>AtSS4</i>		At4g18240	SSIV	AL161548	49502-54325	IV	16
<i>AtSS5</i>		At5g65687.1	SSV	AL021684	92472-97386	V	17
<i>AtBE1</i>		At3g20440	Branching enz.	AB024036	67329-60568	III	21
<i>AtBE2</i>	<i>sbe2.2</i>	At5g03650	Branching enz.	AL162506	27183-32729	V	22
<i>AtBE3</i>	<i>sbe2.1</i>	At2g36390	Branching enz.	AC006919	16819-22476	II	18
<i>AtISA2</i>	<i>dbel</i>	At1g03310	Isoamylase DBE	AC005278	22421-19773	I	0
<i>AtISA3</i>		At4g09020	Isoamylase DBE	AL161513	171712-175978	IV	21
<i>AtISA1</i>		At2g39930	Isoamylase DBE	AF002109	36222-42327	II	18
<i>AtPU1</i>	<i>LDA</i>	At5g04350	Pullulanase DBE	NC003076	1221565-1228398	V	24
<i>AtDPE1</i>		At5g64860	D enzyme	AB019236	26123-22708	V	16
<i>AtDPE2</i>		At2g40840	D enzyme	AC002409	16447-20575	II	16
<i>AtAAM1</i>		At1g76130	α -amylase	AC009978	17825-20092	I	11
<i>AtAAM2</i>		At4g25000	α -amylase	AL161562	128132-126416	IV	5
<i>AtAAM3</i>		At1g69830	α -amylase	AC010675	60344-64829	I	11
<i>AtBAM1</i>	<i>AT-β-AMY</i>	At4g15210	β -amylase	AL161540	179882-177259	IV	7
<i>AtBAM2</i>		At2g32290	β -amylase	AC005700	33282-31320	II	6
<i>AtBAM3</i>		At3g23920	β -amylase	AP001297	44566-47043	III	4
<i>AtBAM4</i>		At2g45880	β -amylase	AC004665	59299-56240	II	9
<i>AtBAM5</i>		At5g45300	β -amylase	AB020744	35094-38154	V	10
<i>AtBAM6</i>		At5g55700	β -amylase	AB009050	43455-46284	V	10
<i>AtBAM7</i>		At4g00490	β -amylase	AL161472	29109-31549	IV	8
<i>AtBAM8</i>	<i>Ct-BMY</i>	At4g17090	β -amylase	AL161545	155788-153954	IV	4
<i>AtBAM9^b</i>	<i>BMY3</i>	At5g18670	β -amylase	AC051627	6225958-6228134	V	2
<i>AtPHS1</i>		At3g29320	Phosphorylase	AP001309	2512-7228	III	15
<i>AtPHS2</i>		At3g46970	Phosphorylase	AL133292	23539-19053	III	14
<i>AtGLY1</i>		At2g35710	Glycogenin	AC006068	31886-33212	II	3
<i>AtGLY2</i>		At4g33330	Glycogenin	AL161583	89318-88232	IV	1
<i>AtGLY3</i>		At4g16600	Glycogenin	AL161544	92468-95136	IV	2
<i>AtGWD1</i>	<i>SEX1</i>	At1g10760	GWD	AC007354	24944-33777	I	29

e. Composition des macromolécules (chromatographie d'exclusion stérique) et calcul du rapport amylose/amylopectine dans le polysaccharide de réserve

f. Détermination du taux de branchement de chacun des

polysaccharides accumulés dans les feuilles de la plante (amylose, amylopectine, phytoglycogène, MOS)

g. Analyse de la distribution de la taille des glucanes constitutifs de l'amylopectine (FACE, HPAEC-PAD)

3) Etudes des interactions protéine-protéine au moyen de la technique double hybride de levure en utilisant les ADNc clonés des gènes d'intérêts.

4) Expression chez *E. coli* des différentes activités enzymatiques au moyen de ces même ADNc, en vue de caractériser biochimiquement les spécificités d'action de ces enzymes.

F- Objectifs du travail de thèse

Nous nous sommes attachés au cours de ce travail de thèse à élucider le rôle tenu par les différentes formes d'enzyme de branchement chez *Arabidopsis thaliana*. Comme l'indique le tableau 3, trois séquences montrant des analogies avec cette classe d'enzyme sont trouvées dans le génome d'*Arabidopsis*. Nous avons nommées arbitrairement ces trois séquences *AtBE1*, *AtBE2* et *AtBE3*. *AtBE2* et *AtBE3* sont les deux séquences identifiées auparavant par Fisher et coll. (1996b) et appartiennent toutes deux à la famille A, ce qui rend inédite chez les dicotylédones la situation rencontrée chez *Arabidopsis*. *AtBE1* est quant à elle en terme de séquence peptidique plus éloignée des enzymes de branchement végétales.

Le but de ce travail de thèse est de définir la part fonctionnelle de chacune des formes catalytiques codées par les gènes

AtBE1, *AtBE2* et *AtBE3*. A ce titre nous avons sélectionné et analysé des lignées mutantes pour chacun de ces trois gènes. De plus, les trois combinaisons doubles mutants furent générées dans le but d'atténuer les effets de masquages phénotypiques qui résulteraient de redondances fonctionnelles, partielles ou totales, issues de l'action des différentes isoformes.

Les principaux résultats seront présentés en anglais sous forme de l'article soumis pour publication. Suivront d'autres résultats obtenus durant la thèse mais absents de la future publication.

A la suite de leur présentation, les résultats seront discutés.

MATERIEL ET METHODES

Produits

L'ADP [$U-^{14}C$] glucose, le glucose-1-phosphate [$U-^{14}C$], la résine de sépharose CL-2B et le Percoll proviennent de Amersham Biosciences (Orsay, France). L'ADP-glucose, le glucose-1-phosphate et la plupart des enzymes (sauf indication contraire) proviennent de chez Sigma (Lyon, France). Les kits de dosage de l'amidon sont obtenus chez Enzytec (Toulouse, France). Les kits de dosages du fructose et du glucose proviennent de chez Megazyme (Wicklow, Irlande).

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* et les conditions de culture utilisées

Les lignées analysées appartiennent aux écotypes Wassilewskija (WS) ou Columbia (Col-0). Les lignées sauvages et mutantes proviennent des banques de mutants d'insertion générées par transformation avec un ADN-T modifié à l'URGV (INRA de Versailles ; Bechtold et coll., 1993; Bouchez et coll., 1993), au NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre; Alonso et coll., 2003) ou par Syngenta (Sessions et coll., 2002). Les graines sont vernalisées pendant 48h à 4°C dans une solution stérilisée (121°C, 1 bar, 20 min) de phytagar 0,1% (p/v) puis semées sur un compost à base de tourbe. Les plantes sont cultivées avec une photopériode de 16h et 8h de nuit, avec des températures s'étalant de 16-17°C (la nuit) à 21-22°C (le jour).

Croisements

Au cours du travail présenté dans ce manuscrit, nous avons engendré des lignées doubles mutantes par croisement entre deux lignées simples mutantes et une lignée triple mutante par croisement entre une lignée double mutante et une simple mutante. Dans chaque cas, nous avons choisi une plante dite « receveuse » et une plante « donneuse ». Pour éviter tout risque d'autopollinisation et de pollinisation croisée la receveuse est débarrassée de toutes les siliques en cours de développement et des fleurs déjà ouvertes. Un bouton floral est disséqué sous la loupe binoculaire pour dégager le pistil et retirer les six anthères avec leur pollen encore infertile. Le pollen de la plante « donneuse » est enfin déposé sur le pistil nu de la plante « receveuse ». Un mois plus tard, les graines issues du croisement peuvent être récupérées, elles donneront toutes des individus doubles hétérozygotes (dont on vérifie le génotype par PCR ; voir ci dessous) qu'on laisse s'autoféconder. En théorie, 1/16^e des graines qui résultent de cette autofécondation seront des plantes homozygotes mutantes pour chacun des deux gènes. Les individus correspondants seront sélectionnés selon les méthodes décrites ci-après.

A- BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

a. Extraction d'ADN génomique

Une feuille d'*Arabidopsis thaliana*, prélevée 3 semaines après la germination, est fixée dans l'azote liquide. La feuille est broyée dans un tube « eppendorf » de 1,5 mL à l'aide d'un petit pilon stérile jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. La fine poudre ainsi obtenue est homogénéisée dans 400 µL de tampon d'extraction : 100 mM Tris pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2% (p/v) CTAB, 0,064% (v/v) β-mercaptoéthanol puis incubée 30 min. à 60°C. 1 volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1 ; v/v) est ajouté à la suspension avant une centrifugation de 15 min. à 10000 g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée puis précipitée par l'ajout de 300 µL d'isopropanol suivi d'une centrifugation durant 30 min. à 10000 g et à 4°C. Le culot est rincé par 300 µL d'éthanol à 70% (v/v) suivi d'une nouvelle centrifugation à 10000 g à 4°C pendant 5 min. puis séché avant d'être repris dans 50 µL d'eau milliQ stérile. 6 µL sont utilisés dans les réactions de PCR.

b. Sélection des lignées homozygotes mutantes

Nous recevons les graines des lignées mutantes des banques sous la forme d'un mélange de sauvages, de mutants et d'hétérozygotes. Une étape préalable de

sélection d'un individu mutant est donc nécessaire avant d'entreprendre les analyses. Pour cela nous utilisons la technique de la PCR à l'aide de deux couples d'amorces oligonucléotidiques pour génotyper les lignées. Les bases des données de l'URGV ou du NASC (<http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb+/HTML/index.shtml>; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) indiquent le site d'insertion de l'ADN-T dans chaque lignée mutante, permettant de choisir une amorce en amont de l'insertion et une seconde en aval. Une amplification PCR obtenue avec ce couple indique la présence de l'allèle sauvage. Le deuxième couple est composé à nouveau de l'amorce s'hybridant en amont du site d'insertion de l'ADN-T et d'une amorce s'hybridant spécifiquement à l'ADN-T. Cette fois, une amplification indique la présence de l'allèle mutant. La liste des couples d'amorces oligonucléotidiques utilisés se trouve dans l'annexe I.

La réaction de PCR est réalisée avec 10 ng d'ADN, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, 0,2 µM de chaque amorce et 1 U de Taq DNApolymérase dans un volume final de 50 µL de tampon Tris/HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X-100 0,1 % (Promega).

Le programme de PCR comprend les cycles suivants :

2 min. à 95°C

10 cycles de :

45 s à 95°C

30 s à 65°C avec un degré en moins à chaque cycle

1 minute d'élongation à 72°C

puis 35 cycles de :

45 s à 95°C

30 s à 55°C

1 minute à 72°C

2 min. d'élongation finale à 72°C.

A 9 µl de produit de PCR est ajouté 1 µl du tampon de chargement suivant :

glycérol 50%

EDTA 10 mM

bleu de bromophénol 0,25%

Les 10 µL sont chargés sur un gel d'agarose 2% (p/v) préparé dans du tampon TBE x 1 (Tris 8,9 mM, acide borique 8,9 mM, EDTA 2 mM pH 8.0) contenant 0,5 µg/mL de BET.

c. Extraction des ARN totaux

Environ 100 mg de tissu frais sont récoltés en milieu de photopériode et utilisés pour l'extraction des ARN totaux à l'aide du kit Plant RNeasy (Qiagen), selon les instructions du fournisseur. Les ARN ainsi produits sont utilisés pour vérifier la présence d'ARN modifiés dans chacune des lignées simples mutantes et pour le clonage des ADNc.

d. RT-PCR

Environ 20 ng d'ARN sont utilisés pour les expériences de RT-PCR, réalisées à l'aide du kit One Step RT-PCR (Qiagen). Trois régions différentes entourant le site d'insertion de l'ADN-T ont été amplifiées : en amont, en aval et enjambant le site d'insertion.

Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans l'annexe II.

e. Clonage des ADNc et expression chez *E. coli* des enzymes de branchement d'*Arabidopsis thaliana*

Souches d'*Escherichia coli* -

DH5α: F⁻ *deoR recA1 endA1*

hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) supE44 λ⁻ thi-1

gyrA96 relA1

BL21-AITM: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻)*

gal dcm araB::T7RNAP-tetA

Des cellules DH5α furent utilisées pour la maintenance et la conservation des différents plasmides. La souche BL21-AITM fut choisie pour l'expression des protéines recombinantes.

Plasmides utilisés

pDONRTM201 est le vecteur dit

« donneur » du système gatewayTM.

pDESTTM17 permet l'expression chez *E. coli* d'une protéine possédant une extension de 6 histidines à son extrémité amino-terminale.

pENTR-BE2 et pENTR-BE3 sont les vecteurs d'entrée du système gatewayTM résultant des clonages respectifs des phases ouvertes de lecture des gènes *AtBE2* et *AtBE3* dans le vecteur pDONRTM201 par le biais d'une réaction de recombinaison de type BP (recombinase).

pDESTTM17-BE2 et pDESTTM17-BE3 sont respectivement les vecteurs qui ont servi à l'expression des gènes *AtBE2* et *AtBE3* étiquetés par le tag 6xHis. Ces plasmides résultent d'une réaction de recombinaison de type LR (recombinase) entre un vecteur pENTR et un vecteur pDESTTM17.

Milieu de croissance bactérien

Milieu LB (Luria-Bertani) liquide

Bacto-tryptone 10 g/L

Bacto-yeast extract 5 g/L

NaCl 10 g/L

pH 7.0

Le LB (Luria-Bertani) gélosé possède la même composition que le milieu liquide mais est solidifié avec 1,2% d'agar.

Le milieu peut être sélectif, si besoin, en y ajoutant 50 µg/mL d'ampicilline ou de kanamycine, selon le cas.

Clonage des ADNc

Dans un tube « eppendorf » stérile, 1 µg d'ARN préparé comme décrit précédemment est mélangé à 0,5 µg d'oligoDT 12-18 (Invitrogen) dans de l'eau stérile traitée au DEPC dans un volume

total de 5 µL. Le tube est placé 5 min. à 70°C puis plongé dans la glace. On ajoute 15 µL du mélange réactionnel suivant : 4 µL d'ImProm-II 5X reaction buffer, MgCl₂ 5 mM, mélange de dNTPs 0,5 mM (Promega), 1 µL d'ImProm-II reverse transcriptase (Promega), qsp 15 µL avec de l'eau stérile traitée au DEPC. Les conditions de rétro-transcription sont :

5 min. à 25°C

1 heure à 42°C

15 min. à 70°C pour inactiver la transcriptase inverse.

Les produits de rétrotranscription sont ensuite traités par un mélange de RNase A et de RNase H 2U/2U (Invitrogen), et on incube 20 min. à 30°C. Les ADNc sont purifiés sur une colonne (Geneclean Turbo Wash, Qiagen), élués dans 30 µL d'eau stérile et stockés à -80°C avant leur utilisation.

Pour amplifier les cadres ouverts de lecture des gènes *AtBE2* et *AtBE3*, 3 µL de produit de rétro-transcription sont mis en jeu dans une réaction de PCR comme suit : 5 µL de tampon 10 X *Pfu*, 1 µL de dNTPs mix, 100 ng de chaque amorce (voir séquences en annexe III), 5U *pfu turbo* (Stratagene), qsp 50 µL H₂O.

Les conditions de PCR sont les suivantes :

2 min. à 95°C

puis 35 cycles de :

30 s à 95°C

30 s à 55°C

5 min. à 72°C

élongation finale à 72°C durant 10 min.

Les produits de PCR sont préparés et chargés sur un gel d'agarose à 0,8% de la même manière que décrit précédemment. A l'issue de la migration, les zones du gel contenant les amplicons sont découpées et les produits de PCR sont purifiés à l'aide du kit GeneClean Turbo Wash (Qiagen). Une estimation de la quantité de produit est réalisée par comparaison entre l'intensité obtenue aux UV à partir de 1 µL de produit déposé et un standard.

Expression des protéines

Le produit de PCR est ensuite inséré par recombinaison dans le vecteur Gateway pDONR201 selon les recommandations du fournisseur. Les ADNc des gènes *AtBE2* et *AtBE3* ont ensuite été insérés par une seconde étape de recombinaison dans le vecteur Gateway pDEST17. Après 4 heures d'induction dans 100 mL de milieu LB contenant 0,2% de L-arabinose, les bactéries sont culottées par centrifugation (2000 g, 10 min.) et les protéines sont extraites dans 10 mL de NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM par 3 cycles de sonications de 10 s espacées de 30 s dans

la glace. L'homogénat est centrifugé et quelques microlitres d'extrait soluble sont analysés par SDS-PAGE et par gel d'activité (respectivement pages 78 et 75).

f. Analyse transcriptomique

Les méthodes utilisées sont décrites de manière simplifiée.

Une quantification précise des ARN se fait par Ribogreen (Molecular Probes), un fluochrome de cyanine asymétrique se fixant assez spécifiquement sur l'ARN. L'excitation se fait à 485 nm et l'émission de rayonnement, proportionnelle à la quantité d'ARN est mesurée à 520 nm. A partir des ARN totaux quantifiés, les ARN antisens (ARNa) des ARN messagers sont amplifiés de façon linéaire et spécifique à l'aide du kit «MessageAmpTM aRNA» (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. Les ARNa obtenus sont marqués directement au Cy3/Cy5 par rétro-transcription avec la SuperscriptII RT. Les cibles sont ensuite purifiées avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen Inc., USA) puis quantifiés au spectrophotomètre à 260 nm pour la quantité totale d'ADN, à 550 nm pour l'ADN marqué au dCTPCy3 et à 650 nm pour l'ADN marqué au dCTPCy5. 30 pmoles de chaque échantillon Cy3 et Cy5 sont mélangées dans un volume total de 180 µL puis précipitées 1 heure à -20°C ou 30 minutes à -80°C en présence de 20 µL d'acétate de

sodium 3M pH 5.0, 4 μL d'acrylamide à 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ et 500 μL d'éthanol 96,2%. Après centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes à 4°C, le culot est rincé par 500 μL d'éthanol 70% et l'ensemble est centrifugé à 10000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est séché à l'air 15 minutes à l'obscurité et remis en suspension dans 35 μL d'eau. Les lames sont chauffées 10 minutes à 65°C puis préhybridées à 42°C pendant au moins 1 heure en présence de 50 mL de solution de préhybridation :

SSC 20X	12,5 mL
BSA 10% (p/v)	5 mL
SDS 10% (p/v)	0,5 mL
H2O	qsp 50 μL

Les lames sont rincées rapidement dans un bain d'eau MQ puis dans un bain d'isopropanol avant d'être séchées sous azote comprimé. Les cibles sont dénaturées à 95°C durant 1 minute puis centrifugées à température ambiante à 10000 g pendant 1 minute. 1 volume de mix d'hybridation 2X (50 μL SSC 20X, 2 μL SDS 10% (p/v) et 50 μL de formamide) est ajouté aux cibles qui sont ensuite appliquées entre la lame et la lamelle. Les lames sont hybridées une nuit à 42°C. La lame hybridée est sortie de la chambre d'hybridation et lavée à l'obscurité successivement dans 4 bains de stringence croissante durant 4 minutes chacun.

1^{er} lavage : SSC 2X, 0,1% SDS (à 42°C)

2^e lavage : 1X SSC (température ambiante)

3^e lavage : 0,2X SSC (température ambiante)

4^e lavage : 0,05X SSC (température ambiante)

Très rapidement, les lames sont séchées avec un spray d'azote comprimé. La lecture est réalisée dans le scanner Genepix 4000A (Axon instruments, USA) muni de deux lasers (excitation à 532 et 635 nm) qui permettent l'acquisition simultanée des signaux émis par les fluorochromes Cy3 et Cy5. Les données obtenues sont normalisées et un programme génère un fichier de sortie contenant la liste complète des profils d'expression des gènes.

B- TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

a. Extraction et purification de l'amidon

Environ 10 g de feuilles d'*Arabidopsis* récoltées en fin de photopériode sont broyées à l'aide d'un polytron blender « Tissue Tearor » (Biospec products, Inc.) dans 30 mL de tampon d'extraction: 100 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.2, 5 mM EDTA, 10 % (v/v) éthanol. L'homogénat est filtré sur deux couches de Miracloth et centrifugé pendant 10 min. à 4000 g, à 4°C. Le culot est resuspendu dans 5 mL de Percoll à 90% (v/v) et centrifugé pendant 40 min à 10000 g, à 4°C. Le culot d'amidon peut être lavé

une ou deux fois dans 1 mL de tampon d'extraction supplémenté avec 0,5% SDS (p/v). L'amidon est ensuite rincé 6 fois par de l'eau stérilisée avant toute utilisation ultérieure. Il peut être conservé à 4°C dans de l'éthanol 20%.

b. Extraction des sucres solubles

Les feuilles récoltées au même moment (sauf cas particuliers) que pour l'extraction d'amidon sont immédiatement plongées dans l'azote liquide, broyées jusqu'à obtention d'une fine poudre à l'aide d'un mortier et sont ensuite placées pendant 10 min dans un bain-marie à 100°C afin d'inactiver toutes les enzymes. Tous les échantillons sont extraits à 4°C dans le tampon suivant : 100 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), pH 7.2, 5 mM EDTA, 10 % (v/v) éthanediol. Les extraits sont homogénéisés avec le même polytron blender que pour l'extraction d'amidon décrite ci-dessus. Tout au long de la procédure, les tubes restent sur la glace. Après centrifugation (10 min. à 10000 g à 4°C), le surnageant est utilisé directement pour doser les quantités de polysaccharides solubles, de glucose, de fructose, de saccharose, de glucose-1-phosphate, de glucose-6-phosphate et pour la détermination de l'anomérisation du maltose mais a été lyophilisé avant l'analyse en chromatographie

d'exclusion stérique sur matrice TSK HW50 (méthode décrite ci-après).

c. Dosage des teneurs en amidon et en glucanes solubles

Les polysaccharides sont dosés avec le kit de dosage amidon commercialisé par Enzytec. L'amidon est dispersé dans l'eau 10 min. à 100°C puis hydrolysé par l'amyloglucosidase pendant au moins 20 min. à 55-60°C. Les résidus de glucose libérés sont phosphorylés par l'hexokinase et oxydés par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ce qui dans le même temps réduit le NADP en NADPH H⁺. La production du NADPH H⁺ est suivie au spectrophotomètre à 365 nm à température ambiante jusqu'à stabilisation de l'absorbance.

Le dosage des polysaccharides solubles est réalisé de manière équivalente à ceci près qu'il nécessite également un test sans amyloglucosidase pour estimer la proportion d'hexose libre dans l'extrait.

d. Dosages des contenus en glucose, fructose, saccharose, G1P et G6P

Les quantités de glucose et de fructose sont déterminées à partir des extraits de feuilles en suivant les recommandations du fournisseur (Megazyme). La quantité de saccharose est testée comme suit : à 30 µL d'extrait de feuilles sont ajoutées 60 µL de

NaH₂PO₄ 20 mM pH 4,5 et 10 U d'invertase (Sigma). Après 20 min. d'incubation à 55°C, sont ajoutés 300 µL d'eau, 300 µL de tampon Triéthanolamine pH 7.6, 1,5 mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM MgSO₄, 2 U d'hexokinase et 1 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase (Enzytec). La réaction se déroule à température ambiante jusqu'à ce que l'absorbance lue à 365 nm se stabilise (le niveau de saccharose est déterminé après avoir ôté le contenu en glucose préalablement dosé). Le contenu en G6P est déterminé comme suit : 30 µL d'extrait de feuilles sont ajoutés à 360 µL d'eau et 300 µL de tampon Triéthanolamine pH 7,6, 1,5 mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM MgSO₄, 2 U d'hexokinase et 1 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase (Enzytec) sont ajoutés à l'échantillon. La réaction est suivie à température ambiante jusqu'à ce que l'absorbance lue à 365 nm reste stable. Pour la mesure de la quantité de G1P, 2 U de phosphoglucomutase (Sigma) sont ajoutées à la réaction précédente concernant le dosage du G6P et on suit l'augmentation de l'absorbance à 365 nm à température ambiante jusqu'à ce qu'elle se stabilise (le niveau de G6P préalablement mesuré est retiré de la valeur obtenue pour le G1P).

e. Détermination des propriétés spectrales du complexe iode/polysaccharide (λ_{\max})

La λ_{\max} représente la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe formé par l'iode et les polysaccharides. 50 µg d'amidon sont dispersés dans 40 µL de DMSO pur à 100°C pendant 10 min. puis ramenés à 10% en DMSO (v/v). Les 400 µL d'échantillons sont ajoutés à 100 µL d'une solution d'iode (KI 0,2% (p/v) et I₂ 0,02% (p/v)) et un spectre d'absorption est effectué entre 400 et 700 nm pour déterminer la longueur d'onde du maximum d'absorption.

f. Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique

Cette technique permet la séparation de l'amylopectine et de l'amylose. 1,5 à 2 mg d'amidon sont dispersés dans 400 µL de DMSO à 100°C durant 20 min. L'amidon est précipité par 4 volumes d'éthanol pur à -20°C pendant au moins 2 h. Le précipité obtenu est centrifugé 5 min. à 10000 g et dissous dans 500 µL de soude 10 mM. L'échantillon est déposé sur une colonne de sépharose CL-2B de 60 cm de hauteur et 0,5 cm de diamètre interne équilibrée et éluée dans de la soude 10 mM à un débit de 12 mL/h. Les fractions de 300 µL sont

analysées pour leur contenu en glucanes par une solution d'iode. Les fractions contenant l'amylopectine sont regroupées, comme pour celles renfermant l'amylose et les quantités relatives de chaque polymère sont mesurées à l'amyloglucosidase.

g. Fractionnement des polysaccharides solubles par chromatographie d'exclusion stérique

2 mg de polysaccharides solubles purifiés et lyophilisés sont dissous dans 500 µL de DMSO 10% (v/v) et déposés sur une colonne de séphadex TSK HW50 (1 cm de diamètre interne sur une hauteur de 50 cm) équilibrée et éluée dans du DMSO 10% (v/v). Les fractions de 500 µL sont collectées à un débit de 10 mL/h. Les sucres contenus dans les différentes fractions sont détectés par la méthode au phénol sulfurique. A 20 µL de phénol 5% sont ajoutés 20 µL d'échantillon dans une plaque de microtitration posée sur la glace. Après une très légère agitation, 100 µL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés et après une nouvelle légère agitation, la plaque est placée à 80°C au maximum 30 min. L'absorbance est lue à 490 nm et est comparée à celle d'une solution de glucose standard.

h. Distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine et des polysaccharides solubles

La distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine est réalisée par électrophorèse capillaire après dérivation des polysaccharides à l'APTS.

Le débranchement est effectué après purification de l'amylopectine sur une colonne de sépharose CL-2B. Les fractions contenant l'amylopectine sont rassemblées. L'échantillon, contenant environ 500 µg d'amylopectine, est dialysé une nuit à 4°C contre de l'eau distillée puis lyophilisé. Les polysaccharides sont repris dans 1 mL d'acétate de sodium 55 mM pH 3,5 puis mis en présence de 1 U d'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* (Megazyme) pendant une nuit à 42°C. Après dessalage sur une colonne Carbograph « Extract-clean » (Alltech, US) puis une lyophilisation, les produits de débranchement sont analysés par FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis). Les glucanes sont mis en suspension dans 2 µL d'APTS (acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique) 0,2 M, solubilisés dans l'acide acétique 15% et 2 µL d'une solution de cyanoborohydrure de sodium 1 M dans du THF (TétraHydroFurane) fraîchement préparé. L'échantillon est placé à 42°C à l'abri de la lumière pendant une nuit puis est analysé par électrophorèse capillaire.

Le protocole pour la dérivation et l'analyse des glucanes solubles est exactement le même. Seuls les glucanes ou les sucres qui possèdent une extrémité réductrice sont marqués par l'APTS.

i. Mesure du taux de branchement de l'amylopectine

Le taux de branchement de l'amylopectine est mesuré par méthylation. L'amylopectine (500 µg) est dispersée dans 300 µL de DMSO anhydre, à 80°C pendant 1h. La méthylation est réalisée par ajout de 500 µL d'iodométhane en présence de 50 mg de soude en poudre. L'échantillon est plongé dans un bain à ultrasons pendant 4h puis laissé à l'obscurité pendant une nuit. La réaction est arrêtée par addition de 2 mL de chloroforme, 2 cristaux de thiosulfate de sodium et 2 mL d'eau distillée. La phase chloroformique est lavée 6 fois par 2 mL d'eau distillée, séchée et lyophilisée. Un second cycle de méthylation est réalisé pour éviter toute sous méthylation. L'échantillon est ensuite mis en suspension dans 25 µL d'acétone puis hydrolysé en présence de 1 mL d'acide trifluoroacétique (ATFA) 4 M pendant 4h à 100°C. Après la réaction, l'ATFA est co-distillé 4 fois avec de l'éthanol puis l'échantillon est séché. La réduction de l'échantillon est effectuée par l'addition de 500 µL de BD₄NA 20 mg/mL dans l'ammoniaque et incubation pendant

2h à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition d'acide acétique à 5%. L'acide borique est ensuite co-distillé 6 fois avec du méthanol, puis l'échantillon est séché et lyophilisé. La peracétylation de l'échantillon est obtenue par l'addition de 500 µL d'anhydride acétique et incubation à 100°C pendant 4 heures. L'échantillon est ensuite séché puis remis en suspension dans 1,5 mL de chloroforme. La phase chloroformique est lavée 6 fois par 2 mL d'eau puis filtrée sur des cristaux de Na₂SO₄ anhydres.

L'analyse quantitative est réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur une colonne capillaire de 30m (methyl silicon, EC.tm -1, Alltech). Le chromatographe utilisé est un Varian 3400 à détection d'ionisation de flamme. La température du four est programmée de 120 à 240°C, selon un pas de 2°C par minute. La température de détection est fixée à 250°C. Les pics sont identifiés par un standard comportant des dérivés méthylés et acétylés du glucitol (D2454 dextrans) et leur identité est confirmée par spectrométrie de masse. Les aires des pics de 2,3,6-Methyl et 2,3-Methyl sont utilisés pour la quantification.

j. Chromatographie sur couche mince (TLC)

4 µL des différentes fractions issues du fractionnement des polysaccharides

solubles sur séphadex TSK HW50 sont déposés sur une feuille de silice (Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Allemagne). 2 µg de saccharose, de glucose, de maltose et de maltotriose sont utilisés sur la couche mince en guise de contrôles. La séparation s'effectue pendant 4 heures dans le tampon de migration suivant : butanol / éthanol / eau dans un rapport 1/1/1 (v/v/v). A l'issue de la migration, la feuille est séchée sous une sorbonne avant d'y pulvériser une solution d'orcinol sulfurique. La révélation se déroule à 120°C jusqu'à apparition des signaux bruns.

k. Détermination de l'anométrie du maltose

La procédure est celle décrite par Shirokane et al. (2000). 12 nmoles de polysaccharides solubles purifiés sont incubées dans le tampon suivant : Triéthanolamine pH 7,6, 155 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM MgSO₄, à 30°C en présence de 2 U d'hexokinase et 1 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase. La réaction démarre en ajoutant 5 U de maltose phosphorylase seule (pour estimer la proportion d'α-maltose dans l'échantillon) ou par addition simultanée de 5 U de maltose phosphorylase et de 5 U de maltose épimérase (pour mesurer à la fois l'α- et le β-maltose). L'augmentation de l'absorbance est suivie à 365 nm.

l. Microscopie électronique à transmission

Afin d'éviter les pertes de matériel et les distributions hétérogènes, les échantillons ont tout d'abord été enrobés d'une solution d'agar à 3% (avec une température inférieure à 40°C). Une fois la solution d'Agar solidifiée, des cubes de 1 mm³ ont été découpés puis traités pendant 20 min dans une solution d'acide périodique à 1%, lavés dans de l'eau distillée, puis incubés dans une solution saturée de thiosemicarbazide pendant 24h. Les échantillons ont finalement été traités par une solution d'AgNO₃ à 1% (PATAg) selon Gallant et coll., 1973. Les échantillons ont ensuite été lavés puis enrobés dans du Nanoplast (Helbert et coll., 1996). Après polymérisation du nanoplast (10 jours), l'échantillon est à nouveau enveloppé dans du LR White Hard Grade. Des sections de 0,1 mm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un ciseau en diamant (Micro MT-7000) et examinées avec un microscope à transmission électronique (JEOL 100S) à 80 keV.

m. Mesures de diffraction aux rayons X

Les taux de cristallinité et le type allomorphe ont été déterminés par diffraction aux rayons X selon la méthode décrite dans Pohu et coll., 2004.

C- TECHNIQUES ENZYMOLOGIQUES

a. Extraction des protéines des feuilles

La méthode d'extraction des protéines décrite ici fut celle utilisée le plus fréquemment, néanmoins certains dosages enzymatiques ont pu nécessiter l'emploi d'autres tampons qui seront alors décrits dans la section appropriée.

Les feuilles sont prélevées en milieu de photopériode et broyées à 4°C à l'aide du Polytron Blender dans le tampon suivant : 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,5 M NaCl. Le broyat est centrifugé 5 min. à 10000 g à 4°C afin de récupérer le surnageant contenant les protéines solubles. L'extrait est continuellement conservé sur la glace.

b. Dosage des protéines

A 400 µL d'échantillon à doser sont rajoutés 100 µL de réactif du kit de dosage BioRAD (Richmond, CA, USA). L'absorbance est lue à 595 nm après une incubation de 15 min. à l'obscurité et la quantité de protéines est déduite d'une courbe d'étalonnage établie avec l'albumine sérique bovine (0 à 20 µg/mL).

c. Les gels d'activités ou zymogrammes

Les gels sont réalisés avec les chambres d'électrophorèse MiniProtean II commercialisées par BioRAD (Richmond,

CA, USA). Les gels ont une épaisseur de 1,5 mm. La concentration finale en monomère est de 7,5% (p/v) pour le gel de séparation et de 4% (p/v) pour le gel de concentration. Ils sont respectivement tamponnés par le Tris/HCl 125 mM pH 6,8 et par le Tris/HCl 375 mM pH 8,8. Tous les gels d'activité décrits ci-après furent réalisés en conditions natives à 4°C. Le tampon de migration pour tous les gels d'activités excepté le gel d'activité phosphorylase (détaillé ci-après) est : Tris 25 mM, glycine 192 mM, DTT 1 mM. Le tampon de chargement utilisé pour tous les gels sauf une nouvelle fois pour le gel phosphorylase est quant à lui : Tris 62,5 mM, glycine 480 mM, glycérol 25%, bleu de bromophénol 0,001%.

Zymogramme des activités amidon-synthétases solubles

100 µg de protéines provenant d'un extrait cellulaire de feuilles sont déposés sur le gel contenant 0,3% (p/v) de glycogène de foie de lapin. Après la migration (15 V.cm⁻¹ pendant 2h30 à 4°C), le gel est incubé toute la nuit en présence de Glygly/NaOH 50 mM pH 9,0, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, β-mercaptoethanol 5 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,25 g/L, ADP-Glc 1 mM. Les activités amidon-synthétases sont révélées par coloration à l'iode.

Zymogramme des activités modifiant l'amidon

Le gel est préparé comme précédemment et les mêmes quantités de protéines sont déposées. Toutefois, le gel contient 0,3% d'amidon soluble de pomme de terre (Sigma). Les conditions de migration sont quasi identiques à celles décrites ci-dessus, la migration des protéines étant réalisée durant 3 heures. Le gel est ensuite incubé une nuit en présence de Tris/HCl 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM. Les activités modifiant l'amidon sont révélées par coloration à l'iode.

Zymogramme des activités amidon-phosphorylases

Le gel contient 0,45% de glycogène de foie de lapin ou 0,2% d'amidon de pomme de terre. Il est tamponné par le Tris/HCl 110 mM pH 7,2. Le gel de concentration à 2,5% final en monomère est tamponné par le Tris/H₃PO₄ 60mM pH 7,3. Le tampon de migration utilisé pour l'électrophorèse est le Glycine/Tris 40 mM pH 8,5.

A 100 µg d'extrait protéique sont ajoutés 10 µL de Tris/H₃PO₄ 60 mM pH 7.3 et 20 µL de tampon de chargement : saccharose 25% (p/v), bleu de bromophénol 0,001%.

La migration se déroule à 4°C durant 2h30 à 15 mA et 250V. A l'issue de celle-ci le gel est équilibré dans le Citrate/NaOH 100 mM pH 7.0 pendant 10 min. avant d'être incubé une nuit à température ambiante

dans le citrate/NaOH 100 mM pH 7.0, G1P 20 mM. Le gel est coloré par la solution d'iode précédemment citée.

Zymogramme des activités phosphoglucomutases

100 µg de protéines sont déposés sur le gel de polyacrylamide qui ne contient pas de substrat. Après une migration en conditions non-dénaturantes, le gel est incubé à température ambiante et à l'obscurité en présence de Tris/HCl 200 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, MgCl₂ 50 mM, G1P 15 mM, NAD 0,5 mM, NADP 0,25 mM, glucose-1,6-diphosphate 0,05 mM, 17 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 1 mM, 5-methyl-phena-zinium méthyl-sulfate (PMS) 0,5 mM. La réaction est arrêtée par de l'eau après 1h au plus d'incubation (l'évolution de la coloration est observée pendant tout le temps d'incubation).

Zymogramme des activités de branchement

Ce gel d'activité est basé sur la stimulation par la phosphorylase « a ». La phosphorylase « a » synthétise de longs glucanes linéaires à partir de G1P en forte concentration et en absence de Pi. Ces glucanes sont alors pris en charge par l'enzyme de branchement qui introduit des

liaisons O-glycosidiques de type α -1,6. Cela augmente le nombre d'extrémités non-réductrices disponibles pour l'allongement par la phosphorylase « a ». A la fin de l'incubation, la structure est piégée dans les mailles du gel et peut être révélée par coloration à l'iode.

100 μ g de protéines sont déposés sur le gel qui, cette fois, ne contient aucun substrat. Après la migration, le gel est incubé une nuit à température ambiante dans 30 mL du tampon suivant: Hepes/NaOH 50 mM pH 7,0, 10% glycérol (v/v), G1P 50 mM, AMP 2,5 mM, 28 U de phosphorylase "a" de muscle de lapin. Les zones correspondant aux activités de branchement sont colorées par une solution d'iode.

Zymogramme de la transglucosidase DPE2

100 μ g de protéines sont chargés sur le gel qui contient 0,3% (p/v) de glycogène de foie de lapin. A l'issue de la migration, le gel est placé une nuit à température ambiante dans le tampon suivant: Tris/HCl pH 7,0 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, DTT 1 mM, maltose 10 mM (Sigma). Le gel est coloré par une solution d'iode.

d. Dosages *in vitro* des activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon

Dosage des enzymes de branchement

100 μ g de protéines sont incubés à 30°C pendant 2 heures dans 250 μ L de 50 mM Hepes/NaOH pH 7,0, 1 mM AMP, 10% glycérol (v/v), $[U^{14}C]$ G1P (150 mCi/mmol) 8 μ M, 50 mM G1P et 2U de phosphorylase « a » de muscle de lapin. La réaction est arrêtée par ébullition pendant 10 min. 100 μ L d'une solution de glycogène à 100 mg/mL et 1 mL de méthanol 75% (v/v) / KCl 1% (p/v) sont utilisés pour la précipitation des glucanes produits. Le précipité est filtré (Whatmann GF/A[®]), rincé deux fois avec 15 mL d'eau distillée, puis deux fois par de l'éthanol 70% et séché. Le produit est finalement placé dans un compteur à scintillation après addition de 3 mL de solution de comptage (UltimaGold, Perkin Elmer, Boston, MA).

Dosage des amidon-synthétases solubles

50 μ g de protéines sont incubés pendant 30 min à 30°C dans 100 μ L de Glygly/NaOH pH 9, 50 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 100 mM, β -mercaptoéthanol 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 0,25 g/L, $[U^{14}C]$ ADP-glucose (333 mCi/mM) 0,75 nM, ADP-glucose 1 mM,

glycogène 10 mg/mL. La réaction est arrêtée par ébullition pendant 10 min. Après addition de 1 mL de méthanol 75% (v/v) KCl 1% (p/v), l'échantillon est centrifugé à 10000 g pendant 10 min. à 4°C. Le culot est ensuite lavé 3 fois par 1 mL de méthanol 75% / KCl 1% puis séché à température ambiante pendant 30 min. Le culot est remis en suspension dans 300 µL d'eau distillée puis placé dans une fiole de comptage en présence de 2 mL de liquide à scintillation (UltimaGold, Perkin Elmer, Boston, MA).

Dosage de l'ADP-glucose pyrophosphorylase

L'activité ADP-glucose pyrophosphorylase est mesurée dans le sens de la dégradation de l'ADP-glucose en présence de PPi pour produire de l'ATP et du glucose-1-phosphate. Le G1P est transformé en G6P par l'action de la phosphoglucomutase. Le G6P est oxydé en glucono-6-phospho lactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de NADP. La production de NADPH H⁺ est suivie par spectrophotométrie à 365 nm.

L'échantillon (100 µg de protéines) est ajouté au mélange réactionnel pour obtenir un volume final de 1 mL du tampon suivant : GlyGly/NaOH 80 mM pH 7,5, PPi 1 mM, MgCl₂ 60 mM, glucose-1,6-diphosphate 0,05 mM, NADP 0,25 mM, NaF 10 mM, ADP-glucose 1 mM et acide

3-phosphoglycérique (3-PGA) 3 mM (si nécessaire). Après 30 min d'incubation à 30°C, la réaction est arrêtée par ébullition. L'échantillon est ensuite centrifugé et le surnageant est prélevé. Après addition de 1 unité de phosphoglucomutase et de 1 unité de glucose-6-phosphate déshydrogénase, l'absorbance à 365 nm est mesurée.

Dosage des activités β-amylases

Les feuilles prélevées en milieu de photopériode sont broyées dans 100 µL du tampon d'extraction : acétate de sodium 50 mM pH 6,0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM. 100 µg de protéines sont incubés 1 heure à 30°C avec 50 mM d'acétate de sodium pH 6,0, 5 mM EDTA, 5 mM DTT et 10 mg/mL d'amidon soluble de pomme de terre. La réaction est arrêtée en mettant l'échantillon 10 min. à 100°C. On y ajoute ensuite 360 µL d'eau et 300 µL de tampon Triéthanolamine pH 7,6, 1,5 mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM MgSO₄, 5 U de maltose phosphorylase, 5 U de maltose phosphorylase, 2 U d'hexokinase et 1 U de glucose-6-phosphate déhydrogenase (Enzytec). La réaction est par ce fait complètement spécifique du maltose libérée lors de la réaction.

Dosage de l'activité α-1,4 glucanotransférase

Les feuilles sont broyées dans 20 mM MES pH 6.2. A 50 µL d'échantillon sont

ajoutés 450 μL du tampon suivant : 50 mM MOPS pH 6.8, 60 mM DP3 (maltotriose). L'incubation est menée 1 heure à 30°C puis arrêtée en bouillant l'échantillon 10 minutes. On dose ensuite le glucose libéré.

Dosage de l'activité pullulanase

Le tampon d'extraction utilisé est : 100 mM MOPS pH 7.2, 2 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, éthanediol 10% (v/v) et PVP 50 mg/mL. 50 μg de protéines sont placés dans 50 mM MOPS pH 7.2, 10 mM DTT et 20 mg/mL de pullulane dans un volume total de 250 μL . Après 1 heure à 30°C, 250 μL d'une solution de DNS sont ajoutés à l'échantillon et l'ensemble est porté à ébullition durant 10 minutes. Après ajout de 800 μl d'eau, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm. La quantité de produit libéré est déduite d'une courbe d'étalonnage réalisée avec différentes concentrations de maltotriose.

Dosage des activités α -amylases

L'extrait protéique est obtenu en broyant les feuilles dans 50 mM acide malique pH 5.4, 87,5 mM NaOH, 50 mM NaCl et 2 mM CaCl_2 . A 100 μL d'extrait sont ajoutés 100 μL d'Amylase HR reagent (Ceralpha method ; Megazyme, Wicklow, Irlande) et l'ensemble est incubé 20 minutes à 40°C. La réaction est arrêtée par addition de 1,5 mL de Na_2HPO_4 1% (p/v) pH 11.5.

L'absorbance est mesurée à 400 nm au spectrophotomètre.

Dosage des activités amidon-phosphorylases

50 μL d'extrait préparé comme décrit page 74 sont ajoutés à 950 μL du tampon d'incubation suivant : 20 mM MOPS pH 7.0, 20 mM tampon phosphate, 10 mM MgCl_2 , 2,7 mM NADP, 4 mM glucose 1,6-diphosphate et 2,5 mg/mL d'amylopectine. L'incubation menée pendant 1 heure à 30°C est arrêtée en plongeant l'échantillon à 100°C pendant 10 minutes. L'échantillon est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 5 minutes et 1 U de phosphoglucomutase est ajoutée au surnageant obtenu. La réaction se déroule à température ambiante durant 10 minutes puis on mesure à 365 nm la DO initiale. L'augmentation de l'absorbance est suivie jusqu'à sa stabilisation après ajout de 3U de glucose-6-phosphate déshydrogénase.

e. Western Blot

Les protéines solubles de feuilles d'Arabidopsis (50 μg) sont dénaturées dans 50% (v/v) β -mercaptoéthanol et 10% (p/v) de SDS pendant 5 min. à 100°C. On y ajoute 10 μL de tampon de chargement (voir page 74). Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE préparé comme décrit page 74 mais contenant en plus 0,1% (p/v) de SDS. Le

gel ne contient aucun substrat. Après la migration, le gel est incubé pendant 10 min dans le tampon de transfert (48 mM Tris, 39 mM Glycine, 0,0375 % [w/v] SDS, et 20 % méthanol). Le transfert sur membrane de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences) est réalisé en présence du même tampon dans une cuve « Mini Trans-Blot Cell » (Biorad, Hercules, CA, USA), pendant 1h30 et 100 mA. La membrane est rincée deux fois pendant 10 min. dans du TBS (20 mM Tris pH 7,6, 137 mM NaCl) puis bloquée 1 h dans le tampon TBS-T (TBS supplémenté avec 0,05% Tween20) contenant du lait à une concentration finale de 5%. La membrane est rincée par deux fois dans le TBS-T puis deux nouvelles fois par du TBS avant d'être incubée toute la nuit à 4°C dans le tampon TBS-T à 5% de lait contenant l'anticorps polyclonal dirigé contre la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (*bt2*) de l'albumen de maïs (Giroux et Hannah, 1994) dilué au 1/5000^e dans le tampon de blocage. Après l'incubation, la membrane est lavée 3 fois dans le tampon TBS-T avant d'être incubée 1 h en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué avec la phosphatase alcaline diluée au 1/10000^e dans le tampon TBS-T + 1% lait à température ambiante. Avant immuno-détection par un kit de biotine/streptavidine/phosphatase alcaline (Sigma),

selon les recommandations du fabricant, la membrane est rincée par trois fois dans du TBS-T + 1% lait et enfin 20 s dans un bain de TBS-T.

f. Méthode de fractionnement non aqueux

Préalablement décrite (Gerhardt and Heldt, 1984) puis récemment modifiée (Weise et coll., 2005), la procédure complète utilisée dans ce travail est exposée ici. 7 à 8 g de feuilles sont récoltés 10 heures après le début de la phase lumineuse et immédiatement fixés dans de l'azote liquide. Les feuilles sont broyées à l'aide d'un mortier et restent congelées tout au long du broyage par addition d'azote liquide. La poudre obtenue est transvasée dans un tube « Falcon » de 50 mL puis complètement séchée par lyophilisation. La poudre déshydratée est mise en suspension dans 20 mL d'un mélange anhydre de C₂Cl₄ / n-heptane d'une densité finale de 1,32 g.mL⁻¹ (les solutions stocks sont conservées en présence de billes de dessiccation et tous les prélèvements sont effectués en présence d'argon afin de préserver leur caractère anhydre), et homogénéisée par ultrasonication à une puissance de 5,5 en discontinu (40%) pendant 3 min. selon des périodes de 10 s de sonication suivies de pause de 10 s sur la glace. L'homogénat est filtré à travers deux couches de Miracloth (Calbiochem,

EMD Biosciences, Inc. La Jolla CA, USA) dans un nouveau tube « Falcon » de 50 mL. Le broyat retenu sur le filtre est rincé par 10 mL de C₂Cl₄ / n-heptane (densité = 1,32 g.mL⁻¹) puis par 10 mL de n-heptane seul. Le filtrat est quant à lui centrifugé 7 min. à 1800 g. Le surnageant est éliminé et le culot est précautionneusement remis en suspension dans 4 mL de C₂Cl₄ / n-heptane anhydre de densité = 1,32 g.mL⁻¹ puis délicatement déposé en surface d'un gradient discontinu de 6 couches de 4 mL de C₂Cl₄ / n-heptane anhydre, de 1,60 g.mL⁻¹ (fond du tube) à 1,35 g.mL⁻¹ (haut du tube) avec un incrément de densité égal à 0,05. On procède alors à une centrifugation à 3200 g pendant 1h30 à 4°C. Des fractions de 4 mL sont collectées et on y ajoute 2 volumes de n-heptane avant une nouvelle centrifugation de 10 min. à 2200 g à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont séchés dans un dessiccateur à température ambiante pendant 18 heures en présence d'anhydride phosphorique.

g. Préparation des échantillons pour les dosages des activités et la détermination des quantités de polysaccharides solubles

200 µL de NaH₂PO₄ 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM sont ajoutés à l'échantillon séché. La suspension est soniquée 10 s, placée sur la glace 10 s et soniquée de nouveau

pendant 10 s à une puissance de 7 en discontinu (70%). L'échantillon est centrifugé 5 min. à 10000 g et le surnageant obtenu est utilisé dans tous les dosages qui suivent.

h. Dosages des marqueurs enzymatiques

Les marqueurs enzymatiques suivants ont été dosés à 25°C comme décrit ici : pour le marqueur chloroplastique, NADP-glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase, 20 µL d'échantillon sont ajoutés à 180 µL du tampon: 50 mM GlyGly/NaOH pH 8,2, 80 mM acide 3-phosphoglycérique, 20 mM MgSO₄, 10 mM cystéine, 5 mM glutathion, 0,4 mM NADPH, 2 U phosphoglycérate kinase. L'oxydation du NADPH est suivie au spectrophotomètre à 340 nm pendant 10 min. Le résultat pour chaque échantillon est donné par la pente de la droite qui est relative de l'activité de la NADP-glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase.

Pour le marqueur cytosolique, l'alcool déshydrogénase, 50 µL d'échantillon sont ajoutés à 950 µL de: 50 mM GlyGly/NaOH pH 8,7, 2 mM NAD, et 30% (v/v) éthanol. La réduction du NAD est suivie à 340 nm pendant 5 min. au spectrophotomètre.

RESULTATS

Mutants of Arabidopsis lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation*

Sylvain DUMEZ §, Fabrice WATTEBLED §, David DELVALLE §, Véronique PLANCHOT ¶, Steven G. BALL § and Christophe D'HULST §

§ Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 CNRS/USTL, IFR 118, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

¶ Unité de Recherche Biopolymères, Interactions, Assemblages, Centre INRA de Nantes, rue de la Géraudière, B.P. 71627, 44316 Nantes Cedex 3, France

Author for correspondence: Christophe D'HULST

Tel: +33 3 20 43 48 81

Fax: +33 3 20 43 65 55

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

Running title: SBE mutants of Arabidopsis

The author(s) responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Christophe D'HULST (christophe.dhulst@univ-lille1.fr).

Abbreviations: CL: Chain Length; WSG: Water Soluble Glucan; MOS: Malto-OligoSaccharides; SBE: Starch Branching Enzyme; TLC: Thin Layer Chromatography; FACE: Fluorophore Assisted Capillary Electrophoresis; DP: Degree of Polymerization; SE: Standard Error; FW: Fresh Weight. λ_{\max} : wavelength at the maximal absorbance of the iodine-polysaccharide complex

* *In revision in The Plant Cell*

ABSTRACT

Three genes that potentially encode isoforms of starch branching enzymes have been found in the genome of *Arabidopsis thaliana*: *AtBE1*, *AtBE2* and *AtBE3*. Although no impact on starch structure was observed in mutants lacking *Atbe1*, modifications in amylopectin structure analogous to those of other branching enzyme II mutants were detected in *Atbe2* and *Atbe3* mutants. No impact on starch content was monitored in any of the single mutant lines. Moreover, three double mutant combinations were produced (*Atbe1/Atbe2*, *Atbe1/Atbe3*, *Atbe2/Atbe3*) and the impact of the mutations on starch content and structure were analyzed. Our results suggest that *AtBE1* has no apparent function for the synthesis of starch in the leaves as both *Atbe1/Atbe2* and *Atbe1/Atbe3* double mutants display the same phenotype as the *Atbe2* and *Atbe3* mutants. However, starch synthesis was abolished in *Atbe2/Atbe3* while high levels of α -maltose were assayed in the cytosol. This result indicates that the functions of both *AtBE2* and *AtBE3* that belong to class II of SBEs are largely redundant in *Arabidopsis*. Moreover, it

is demonstrated that maltose accumulation depends on the presence of an active ADP-Glucose Pyrophosphorylase and that the cytosolic transglucosidase (DPE2), required for maltose metabolization, is specific for β -maltose.

INTRODUCTION

Starch is a polymer of D-glucose that accumulates in the plastid of plants as huge water insoluble granules. Glucose residues are linked together by α -1,4 and α -1,6 O-glycosidic bonds. The α -1,6 linkages are commonly referred to as the branch points while the α -1,4 O-glycosidic bonds compose the linear backbone of the polymer. The starch granule is composed of two structurally distinct homopolymers: amylose which is essentially linear and amylopectin which is a moderately branched macromolecule (usually 6% of α -1,6 bonds within the polymer). The asymmetrical distribution of the branch points within amylopectin is responsible for the cluster organization of the molecule that further adopts a semi-crystalline structure (Hizukuri, 1986; for review: Buléon et al., 1998).

The synthesis pathway of amylopectin is rather complex and involves different enzymatic activities usually supported by multiple genetically distinct forms of enzymes. This pathway includes starch-synthases (elongation step), starch branching enzymes (introduction of branches), starch debranching enzymes and α -1,4-glucanotransferases (maturation of the structure required for further growth and crystallization of the granule) (for

review Myers et al., 2000; Ball and Morell, 2003).

Starch branching enzymes (SBEs; EC 2.4.1.18; CAZy family GH13) catalyze the formation of the α -1,6 linkages within the polymer. SBEs first cleave a preexisting α -1,4 linkage and transfers the fragment initially positioned at the non reducing end of the cleaved glucan to an α -1,6 position through an intra or an inter-molecular mechanism (for review Sivak and Preiss, 1998). The consequence of this reaction is to increase the number of non-reducing ends within the molecule thus facilitating the elongation by the starch-synthases. Two to three genetically independent isoforms of SBEs were observed in most plants (Fisher et al., 1996a; Larsson et al., 1996, 1998; Morell et al., 1997; Mizuno et al., 1992; Nakamura et al., 1992). Depending on their peptide sequence, these SBEs were categorized into two classes named SBEI (or B family) and SBEII (or A family). Some of these forms, essentially maize and potato SBEs were kinetically characterized after their purification from the plant tissues or their heterologous expression in *E. coli* (Takeda et al., 1993, Guan and Preiss, 1993 and 1994; Rydberg et al., 2001). From these studies, it appears that SBEI is essentially active on long linear chains (of amylose-type) while SBEII is

more active on the shorter chains of amylopectin. Moreover, SBEI preferentially transfers longer chains than SBEII.

Mutant lines defective for SBEI, IIa and IIb in maize (Blauth et al., 2001 and 2002; Yao et al., 2004; Stinard et al., 1993) and in rice (Sato et al., 2003; Nakamura, 2002; Nishi et al., 2001) were isolated and analyzed for their ability to synthesize starch. The absence of SBEI in both plants has little or no impact on starch that accumulates in the endosperm while the absence of SBEIIb leads to the synthesis of a modified amylopectin with a strong decrease in the number of short chains and an increase in the number of long chains. On the other hand, the absence of SBEIIa in maize leads only to the modification of the structure of starch that accumulates in the leaf (transitory starch) without impact on the endosperm starch (storage starch). In *Arabidopsis thaliana*, two SBEs belonging to class II were cloned (Fisher et al., 1996b) and their expression levels were characterized (Khoshnoodi et al., 1998). The precise function of these two forms of SBEII remains unknown. A third gene putatively encoding a SBE was observed in the nuclear genome of this plant. However, the corresponding protein does not belong to type I class of SBE as described in other plants.

The objective of this work was to investigate the function of the three SBEs (AtBE1, AtBE2 and AtBE3) in the leaves of *Arabidopsis* through the selection and the phenotypic characterization of mutants specifically defective for each of the three isoforms. Moreover, we have constructed double mutant combinations defective for two out of the three SBEs. Our results indicate that 1) AtBE1 has no apparent function in the metabolism of starch in the *Arabidopsis* leaves; 2) AtBE2 and AtBE3 that belong to class II of SBEs are required for the synthesis of normal starch and their activities are largely redundant; 3) the double mutant line simultaneously defective for both AtBE2 and AtBE3 substitute starch by the accumulation of α -maltose; 4) that the latter is generated through degradation of abnormal products of the starch synthesis pathway; 5) DPE2 is specific for β maltose thereby explaining the rationale of beta-amylolysis as the major route of starch degradation in plant leaves.

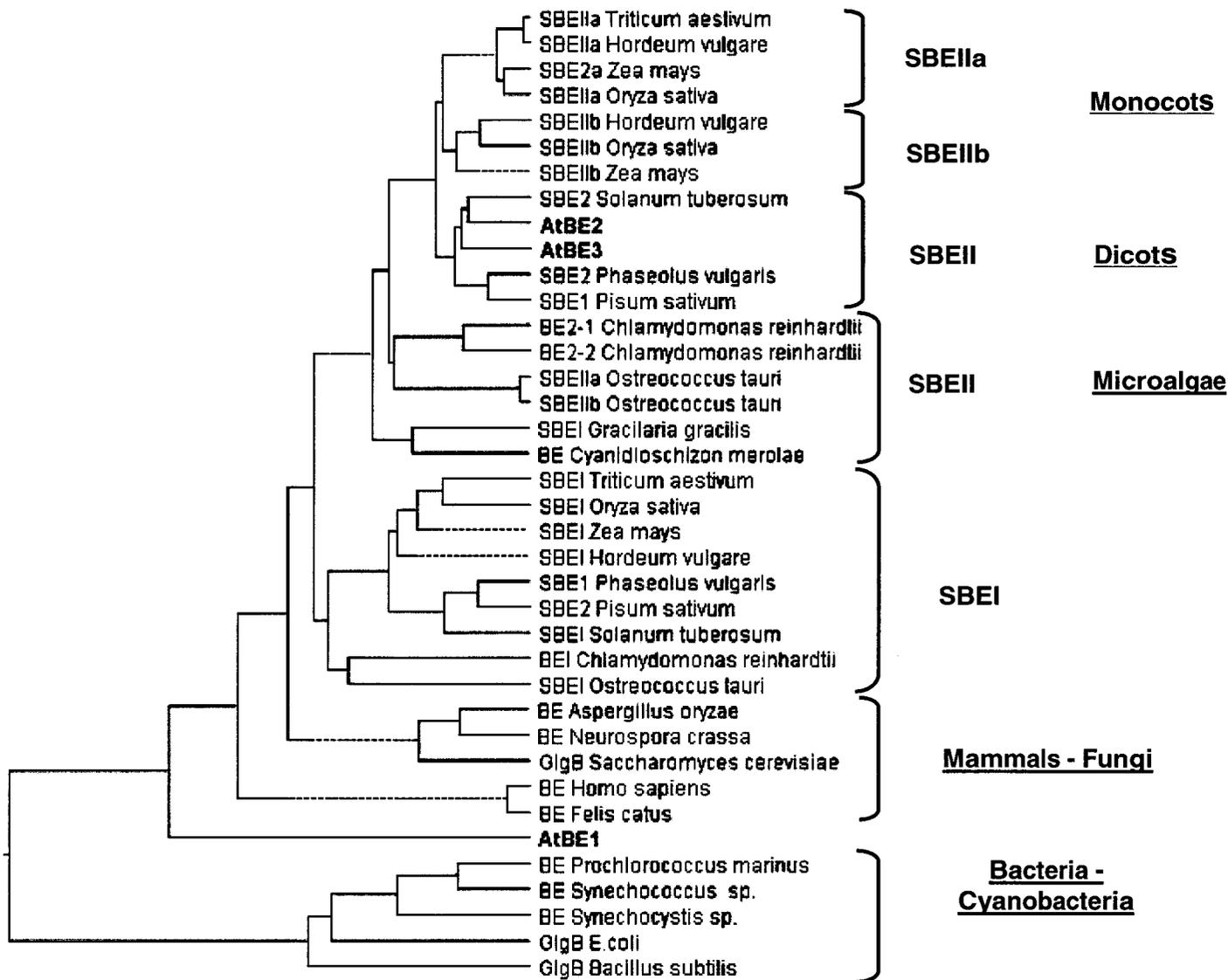


Figure 1: Dendrogram of branching enzymes amino-acid sequences from various sources (multiple alignment parameters: Gap penalty: 10; Gap length penalty: 10). Accession numbers are as follow: SBE1 *Triticum aestivum*: AF002820; SBE2a *Triticum aestivum*: AF338432; SBE2a *Zea mays*: AAB67316; SBE2b *Zea mays*: AAC33764; SBE1 *Zea mays*: AAC36471; SBE1 *Hordeum vulgare*: AAP72268; SBE2a *Hordeum vulgare*: AAC69753; SBE2b *Hordeum vulgare*: AAC69754; SBEI *Pisum sativum*: CAA56319; SBEII *Pisum sativum*: CAA56320; GlgB *E. coli*: BAB37700; GlgB *Bacillus subtilis*: CAB15076; BE *Aspergillus oryzae*: BAB69770; *Cyanidioschizon merolae*: <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/> locus CMH144C; BE *Neurospora crassa*: CAB91480; *Prochlorococcus marinus*: NP_875470; *Synechococcus* sp.: CAE08009; *Synechocystis* sp.: NP_442003; *Gracilaria gracilis*: AAB97471; SBE2 *Phaseolus vulgaris*: BAA82348; SBE1 *Phaseolus vulgaris*: BAA82349; *Felis catus*: AAR13899; *Homo sapiens*: AAA58642; SBEI *Ostreococcus tauri*: AAS88882; SBEIIa *Ostreococcus tauri*: AAS88883; SBEIIb *Ostreococcus tauri*: AAS88895; SBEI *Oryza sativa*: AAD28284; SBEIIa *Oryza sativa*: BAA82828; SBEIIb *Oryza sativa*: A48537; SBE1 *Solanum tuberosum*: CAA49463; SBE2 *Solanum tuberosum*: CAB40743; AtBE1: BAB02827; AtBE2: NP_195985; AtBE3: NP_181180; GlgB *Saccharomyces cerevisiae*: AAB64488. AtBE1, AtBE2 and AtBE3 correspond to the 3 forms of SBEs found in the genome of *Arabidopsis thaliana* (loci At3g20440, At5g03650 and At2g36390 respectively). *Chlamydomonas reinhardtii* sequences were produced from the last release version of the nuclear genome sequence available at <http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.download.ftp.html>.

RESULTS

The nuclear genome of Arabidopsis contains three candidate genes putatively encoding starch branching enzymes.

The three genes putatively encoding starch branching enzymes (SBEs; EC 2.4.1.18; CAZy family GH13) in the Arabidopsis genome are *AtBE1* (At3g20440), *AtBE2* (At5g03650) and *AtBE3* (At2g36390). These genes are expressed in the leaves of Arabidopsis during either short (8h) or normal (12h) day lengths (<http://www.starchmetnet.org/Datapages/AtBE2/AtBE2Frameset.htm> and Smith et al., 2004) although the expression of *AtBE1* is very low and rather constant throughout the cycle when compared to those of *AtBE2* and *AtBE3*. The transcript level of *AtBE3* increases during the illuminated period to reach a maximum at the transition between day and night. It then regularly falls to a minimum at the end of the dark period. *AtBE2* transcript level is maximal 4 hours after light onset and slowly decrease to a minimum near the end of the dark phase.

The proteins corresponding to the *AtBE1*, *AtBE2* and *AtBE3* genes contain a predicted chloroplast-targeting peptide of 49, 61 and 37 amino-acids respectively (ChloroP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>; Emanuelsson et al., 1999), thereby

suggesting that these proteins are likely to be localized within the chloroplast. *AtBE2* and *AtBE3* are two highly conserved proteins with more than 75% amino-acid identity. The relatively well conserved intron-exon organization in 5' parts of both *AtBE2* and *AtBE3* genes (Figure 2) suggests that these two genes probably arose from a duplication event. By comparison, the sequence homology between *AtBE1* and both *AtBE2* and *AtBE3* can be considered as low (only 28% and 27% amino-acids identity respectively) suggesting a different ancestral origin of the corresponding gene. Protein sequence comparisons with SBEs from other plant sources indicate that *AtBE2* and *AtBE3* belong to the class A of SBEs while *AtBE1* cannot be easily classified within plant SBEs. *AtBE1* is not related to the standard plant A- or B-type SBE families but shows more relatedness to the glycogen-branching enzymes from fungi and animals although the protein sequence similarity is quite low in that case too (less than 30%). The situation in Arabidopsis is thus different from that observed in other dicots such as potato, pea and bean where only one type A of SBE can be found along with one type B of SBE (see dendrogram of branching enzyme families in figure 1; for a review Ball and Morell, 2003).

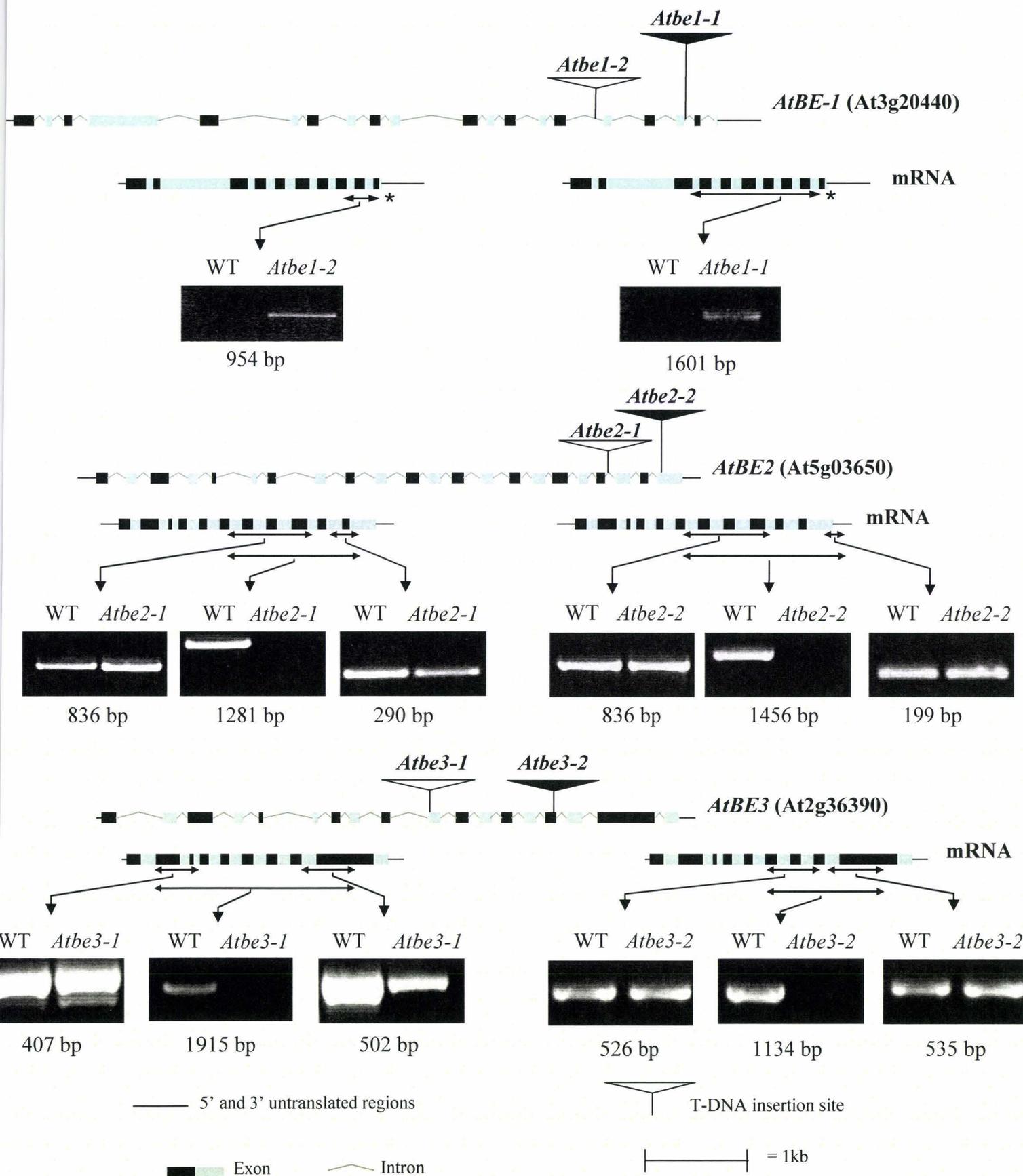


Figure 2: Molecular organization of SBEs mutant alleles and impact of insertional mutations on transcript expression. Both gDNA and mRNA organizations are presented for each SBE gene of Arabidopsis with the T-DNA insertion sites. Double-sided arrows indicate mRNA regions amplified by RT-PCR for the different primer-pairs designed for each T-DNA insertion (see supplemental data for primer-pair sequences). Pictures below mRNA structure are agarose gels performed after RT-PCR amplifications. WT: wild-type. * Double sided arrows are not at scale.
Table 1: Description of the different mutant alleles of SBE used in this work.

¹ Position of T-DNA is given from the start codon

² Nottingham Arabidopsis Stock Centre: <http://nasc.nott.ac.uk/>

³ Génoplante: <http://genoplante-info.infobiogen.fr/FLAGdb/>

Gene	AGI gene identification	Allele and line identification	Position of T-DNA ¹	Mutant collection	Genetic background
<i>AtBE1</i>	At3g20440	<i>Atbe1-1</i> (DYK140)	+ 6461 (intron 20)	Génoplante ³	WS
		<i>Atbe1-2</i> (N637880)	+ 5592 (intron 15)	NASC ²	Col-0
<i>AtBE2</i>	At1g03310	<i>Atbe2-1</i> (EFH20)	+ 5022 (intron 19)	Génoplante	WS
		<i>Atbe2-2</i> (DSA16)	+ 5487 (exon 22)	Génoplante	WS
<i>AtBE3</i>	At4g09020	<i>Atbe3-1</i> (N548089)	+ 3262 (exon 10)	NASC	Col-0
		<i>Atbe3-2</i> (EQJ13)	+ 4485 (exon 15)	Génoplante	WS

Selection of insertion mutations in genes AtBE1, AtBE2, AtBE3.

Several T-DNA insertion mutant lines for each of the three SBEs were selected from different collections (Génoplante and SALK; Figure 2; Table 1) and the corresponding homozygous mutants were identified for further analysis.

We have investigated the ability of the mutant lines to further express the mRNA corresponding to the SBE genes by RT-PCR. Amplifications were performed on RT products upstream, downstream and spanning the insertion site of the T-DNA (Figure 2) for both *Atbe2* and *Atbe3* mutant alleles. The correct amplicons were obtained with the wild type allele in all cases. However, RT-PCR carried out on mutant alleles have shown that no amplification was obtained for the region

spanning the insertion site of the T-DNA although RT-PCR amplicons with the expected size were generated with regions upstream and downstream the T-DNA insertion site. It is therefore unlikely that these modified transcripts could be functional and lead to the production of active proteins. In the case of *Atbe1* mutant alleles, RT-PCRs were performed between primers corresponding to the T-DNA and the gene specific sequences (Figure 2). While an amplicon with the correct expected size was produced in both *Atbe1-1* and *Atbe1-2* mutants, this amplicon was missing in the WT line. The presence of the T-DNA within the transcript is likely to abolish its function *in vivo*.

We have constructed all three combinations of double mutant lines defective for two out of the three SBEs.

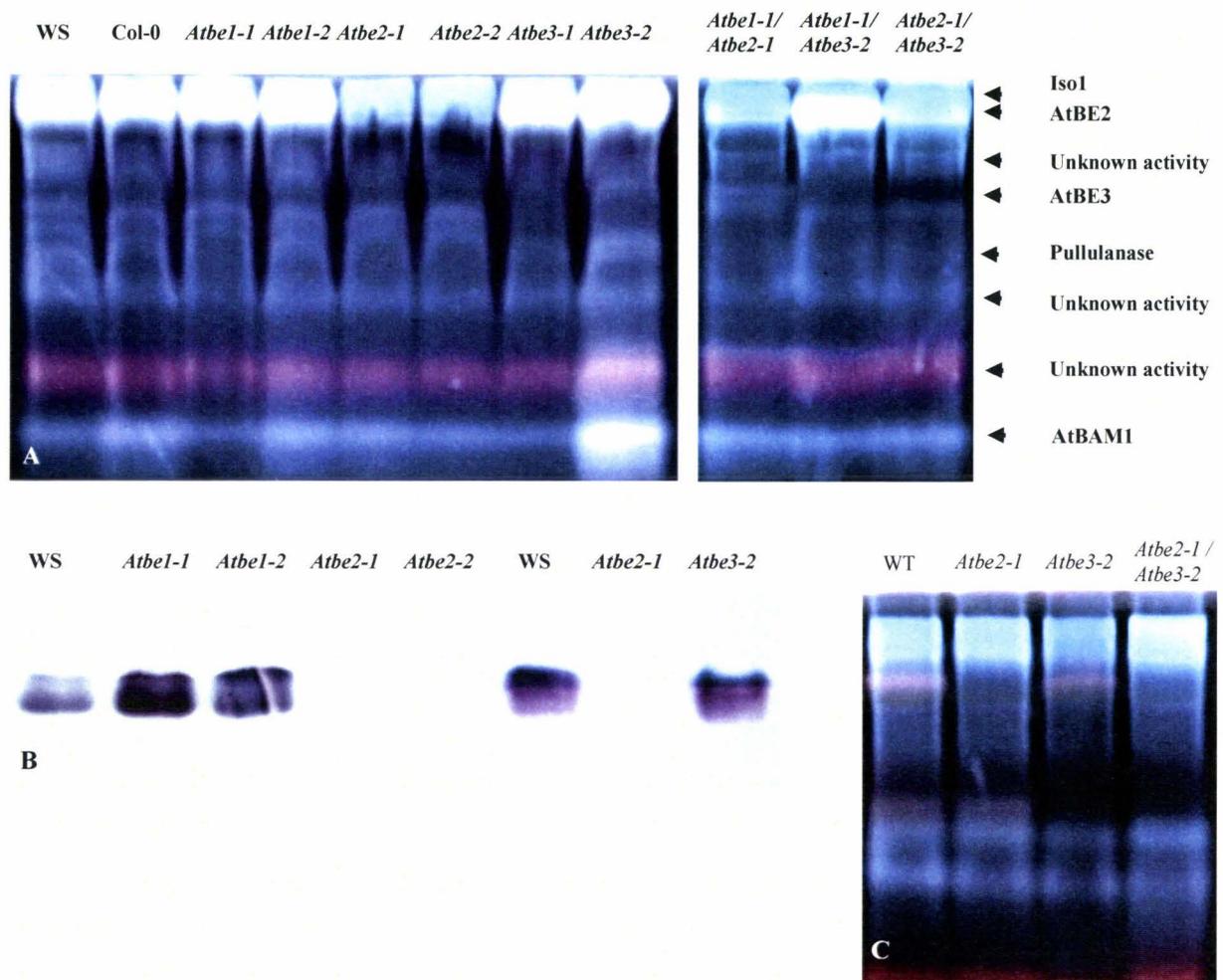


Figure 3: Zymograms of SBE activities. A: starch containing gels. After migration of 100 μ g of proteins under native conditions, gels were incubated overnight at room temperature in Tris/HCl pH 7.0 50 mM, 1 mM DTT, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 . Starch modifying enzymes were observed by staining the gel with lugol solution. B: stimulation of phosphorylase “a” activity. After the migration of 100 μ g of proteins under native conditions, gel was incubated overnight at room temperature in 30 mL of incubation buffer containing G1P at 50 mM and 28 U of rabbit muscle phosphorylase “a”. SBE activities were revealed after sowing the gel in lugol solution. C: Starch containing gel as in A but the different activities are much better separated. WS and Col-0: wild type references. Iso1: isoamylase activity (*AtISA1* and *AtISA2* gene products as described in Wattedled et al., 2005); *AtBAM1* corresponds to gene At4g15210 encoding a β -amylase. Pullulanase corresponds to gene At5g04360 as already reported by Wattedled et al. (2005).

The different double mutant combinations were produced with the WS genetic background and were as follows: *Atbe1-1/Atbe2-1*; *Atbe1-1/Atbe3-2* and *Atbe2-1/Atbe3-2*. These double mutants were analyzed together with the single mutants for their growth phenotype and for starch accumulation and structure.

Mutations in AtBE2 and AtBE3 abolish two distinct starch branching enzyme activities.

SBEs activities in the different mutant backgrounds were assayed by two different approaches: zymograms and *in vitro* assays. Zymogram analyses were performed in two different ways: either by using the ability of branching enzymes to stimulate phosphorylase “a” activity or

through the iodine staining of the modified starch structure produced by branching enzymes (see methods section for more details about the different methods used for the characterization of the SBEs activities). Only one activity was observed when the phosphorylase “a” stimulation technique was used (Figure 3B). The corresponding band was missing in both *Atbe2-1* and *Atbe2-2* mutants but was unaffected by the mutations at *AtBE1* and *AtBE3* loci. This result was confirmed by *in vitro* assay of SBEs activities using the phosphorylase “a” stimulation method. In that case, no SBE activity was measured in the *Atbe2* mutant background whereas the SBE activity level was equivalent to that of the wild type in *Atbe1* and *Atbe3* mutant backgrounds (Table 2). SBE activity was also assayed by iodine stained starch containing zymogram (Figure 3A). A clear band in the upper part of the gel was systematically missing in all *Atbe2* mutant backgrounds while a band in the middle part of the gel was missing in all *Atbe3* mutant backgrounds. The clear band that disappear in line *Atbe2* might be a consequence of the combined action of both Iso1 (Wattebled et al., 2005) and AtBE2 on starch contained in the gel. Since both activities were not fully resolved on this zymogram, this likely leads to the progressive release in the

incubation buffer of small MOS as products of both enzymes activities (branching enzyme produces small glucans that are debranched by the debranching enzyme) leading to a clear band when the gel was stained with iodine. However, when both Iso1 and AtBE2 were better separated on the gel, the AtBE2 activity looks “pink” as expected for a branching enzyme (Figure 3C). A “pink” colored band was also observed for the AtBE3 activity on the starch containing gel (Figure 3C). However, despite several attempts, no activity corresponding to AtBE1 protein was observed in the conditions used in this work.

Other starch metabolizing activities including ADP-glucose pyrophosphorylase, starch-synthases, starch-phosphorylases, α -1,4 glucanotransferases, α and β -amylases, pullulanase were assayed from leaf extracts. None of these activities were significantly affected by the different mutations except for starch-phosphorylases (STPases). Indeed in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant where STPases activity was 3-4 times higher than in the corresponding wild type line (WS) (Table 2). This behavior was confirmed by zymogram analysis for STPases activities where both the cytosolic and the plastidial forms of STPase were increased (Figure 4).

Table 2: *In vitro* assays of several starch-metabolizing enzymes performed with leaf crude extracts of wild type (WS and Col-0), single and double mutant lines defective for SBE activities. Activities are expressed in nmol.min⁻¹.mg⁻¹ of proteins (means ± SE; n= 3; independent samples). AGPase = ADP-glucose pyrophosphorylase. * 3 mM of 3-PGA was added to the incubation buffer. ND = not determined.

	Starch Branching Enzyme	AGPase	AGPase (+ 3-PGA)*	Soluble starch- synthase	α- amylase
WS	107 ± 19	3.3 ± 0.2	22.9 ± 0.2	33.2 ± 0.2	55 ± 1
Col-0	107 ± 24	3.9 ± 0.2	28.7 ± 0.9	20.1 ± 0.2	37 ± 1
<i>Atbe1-1</i> (WS)	96 ± 8	3.0 ± 0.2	25.6 ± 0.7	22.0 ± 0.3	41 ± 1
<i>Atbe1-2</i> (Col-0)	130 ± 11	7.3 ± 0.1	34.2 ± 0.3	30.9 ± 0.8	36 ± 1
<i>Atbe2-1</i> (WS)	2 ± 1	3.9 ± 1.1	16.8 ± 1.5	50.8 ± 0.5	36 ± 1
<i>Atbe2-2</i> (WS)	1 ± 0	4.8 ± 0.1	29.9 ± 0.1	20.7 ± 0.3	52 ± 1
<i>Atbe3-1</i> (Col-0)	82 ± 16	3.9 ± 0.3	25.6 ± 0.6	29.7 ± 0.6	74 ± 1
<i>Atbe3-2</i> (WS)	102 ± 5	3.1 ± 0.4	21.2 ± 0.6	20.8 ± 1.0	39 ± 1
<i>Atbe1-1/Atbe2-1</i>	1 ± 0	2.9 ± 0.1	24.7 ± 0.6	26.0 ± 0.8	ND
<i>Atbe1-1/Atbe3-2</i>	51 ± 17	3.1 ± 0.3	28.1 ± 0.4	54.3 ± 1.4	55 ± 1
<i>Atbe2-1/Atbe3-2</i>	2 ± 1	4.4 ± 0.2	27.7 ± 0.4	31.0 ± 0.6	69 ± 2
	β- amylase	D- enzyme	Pullulanase	Starch- phosphorylase	
WS	147 ± 9	63 ± 3	13 ± 1	5.9 ± 0.1	
Col-0	ND	ND	8 ± 1	2.8 ± 0.1	
<i>Atbe1-1</i> (WS)	ND	ND	12 ± 1	9.7 ± 0.1	
<i>Atbe1-2</i> (Col-0)	ND	ND	13 ± 3	4.5 ± 0.1	
<i>Atbe2-1</i> (WS)	ND	ND	8 ± 2	7.8 ± 0.1	
<i>Atbe2-2</i> (WS)	ND	ND	8 ± 2	6.0 ± 0.1	
<i>Atbe3-1</i> (Col-0)	ND	ND	13 ± 2	5.1 ± 0.1	
<i>Atbe3-2</i> (WS)	ND	ND	7 ± 2	7.7 ± 0.3	
<i>Atbe1-1/Atbe2-1</i>	ND	ND	9 ± 1	14.0 ± 0.3	
<i>Atbe1-1/Atbe3-2</i>	ND	ND	10 ± 1	5.4 ± 0.1	
<i>Atbe2-1/Atbe3-2</i>	146 ± 7	39 ± 1	19 ± 1	20.2 ± 0.1	

Impact of the mutations on starch accumulation levels and growth phenotype

We measured the leaf starch and water soluble glucans (WSGs) contents at the end of the light period (16h day / 8h night) in the different single and double mutants and compared them to that of the corresponding wild-type ecotypes (Table 3). We have not detected any significant

alteration of the starch content in the single mutants as well as in both *Atbe1-1/Atbe2-1* and *Atbe1-1/Atbe3-2* double mutants. However, the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant was free of starch. The absence of starch was coupled with the accumulation of very high levels of WSGs that were not observed in other lines. Moreover, this double mutant displayed a lower growth rate, a reduced size of the mature plant, a

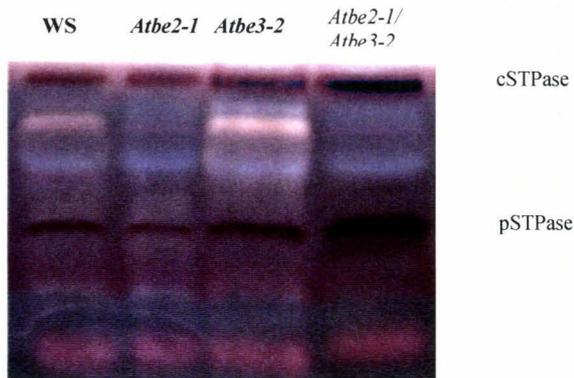


Figure 4: zymogram of starch phosphorylases (STPases) performed with soluble starch containing polyacrylamide gel. 100 μg of leaf extract proteins were loaded onto a native PAGE (7.5% acrylamide) containing potato soluble starch (Sigma) at 0.3% final concentration. Proteins were separated for 3h at 4°C and 15 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$. The gel was incubated overnight at room temperature in the following buffer: Sodium citrate pH 7.0 100 mM, 20 mM Glucose-1-P. The enzymatic activities were revealed by soaking the gel into iodine solution (I_2 0.2% w/v and KI 2% w/v).

pale color and a general wilting of the inflorescence (Figure 5A).

Thirty days after seed germination the fresh weight of the above ground organs of

the double mutant was only one fifth of the wild type (Figure 5B) under the 16h day / 8h night growth conditions used during this work. The same lower growth rate was observed under 12h day / 12h night regime although it was less pronounced. Both *dpe2* and *mex1* mutants of Arabidopsis that have lost their ability to metabolize maltose display such a dwarf-like phenotype. However, both mutants exhibit a starch excess phenotype and are not affected for polysaccharide biosynthesis. Despite the growth phenotype, the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant was still able to produce siliques and viable seeds after self-pollination, although the flowering rate was low when compared to that of other lines.



Figure 5: comparison of growth rates of wild type (WS) and *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant. A: Pictures of wild type and mutant lines were regularly taken after seed germination. Pictures are shown at the same scale thus allowing direct comparison of wild type and mutant plants. B: above ground organs were harvested at 7, 10, 14, 18, 21, 28 and 32 days after germination and immediately weighted. Continuous line = Wild type (WS). Dashed line = *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant. Vertical bars represent SE of 3 independent measures. DAG = days after germination.

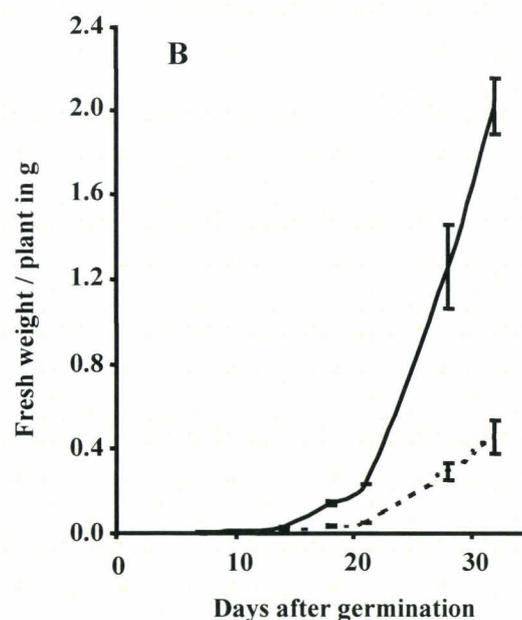


Table 3: Leaf starch accumulation in wild type (WS and Col-0) and SBE mutant lines. The results are the average of several independent experiments performed on independent samples (means \pm SE or Standard Deviation when n= 2). Starch and WSGs were extracted at the end of the illuminated period (16h day / 8h night growth rhythm). The amounts of starch, amylose and WSG were determined by the amyloglucosidase assays. The λ_{\max} and the branching level of amylopectin and the ratio of amylose were measured after purification through size exclusion chromatography on sepharose CL-2B columns. WT: Wild type. NA: not applicable; ND: not determined; * Average starch contents for WS (n=12) and Col-0 (n=4) are $9.9 \pm 3.7 \text{ mg.g}^{-1}$ of FW and $15.0 \pm 4.6 \text{ mg.g}^{-1}$ of FW respectively.

	Starch amount in % / WT*	λ_{\max} of amylopectin in nm	Amylose ratio in %	Branching level of amylopectin in %	WSG content in mg.g^{-1} of FW
<i>WS</i>	100	555 ± 1 (n= 8)	24 ± 4 (n= 6)	4.9 ± 0.1 (n=2)	0.28 ± 0.14 (n=8)
<i>Col-0</i>	100	547 ± 4 (n= 3)	21 ± 3 (n= 3)	ND	0.34 ± 0.29 (n=3)
<i>Atbe1-1 (WS)</i>	107 ± 13 (n=9)	556 ± 2 (n= 6)	23 ± 7 (n= 4)	ND	0.27 ± 0.06 (n=4)
<i>Atbe1-2 (Col-0)</i>	109 ± 21 (n=3)	545 ± 5 (n= 3)	27 ± 2 (n= 3)	ND	0.32 (n=1)
<i>Atbe2-1 (WS)</i>	86 ± 10 (n=7)	564 ± 5 (n= 4)	28 ± 5 (n= 3)	4.8 ± 0.3 (n=2)	0.21 ± 0.09 (n=3)
<i>Atbe2-2 (WS)</i>	99 ± 16 (n=10)	561 ± 2 (n= 6)	26 ± 4 (n= 5)	5.6 ± 0.1 (n=2)	0.20 ± 0.14 (n=5)
<i>Atbe3-1 (Col-0)</i>	78 ± 14 (n=3)	556 ± 0 (n= 3)	24 ± 4 (n= 3)	ND	0.03 ± 0.02 (n=3)
<i>Atbe3-2 (WS)</i>	92 ± 12 (n=10)	559 ± 2 (n= 7)	27 ± 6 (n= 5)	4.9 (n=1)	0.17 ± 0.07 (n=6)
<i>Atbe1-1/Atbe2-1</i>	122 ± 10 (n=3)	557 ± 2 (n= 3)	29 ± 8 (n= 3)	ND	0.15 ± 0.06 (n=3)
<i>Atbe1-1/Atbe3-2</i>	120 ± 17 (n=5)	555 ± 2 (n= 3)	27 ± 4 (n= 3)	ND	0.20 ± 0.12 (n=5)
<i>Atbe2-1/Atbe3-2</i>	Not detected (n=3)	NA	NA	NA	11.47 ± 5.48 (n=4)

Structural analysis of starch and WSG

Whenever possible, we have compared the structures of the starches from the single and double mutants with those of the corresponding wild type ecotypes. After extraction and purification, the size and morphology of the starch granules were analyzed on ultra thin slices by transmission electron microscopy. The starch granules in *Atbe2* and *Atbe3* mutants were on average slightly larger than the wild-type while no differences were seen for the *Atbe1* mutant (see also page 108). Wide angle X-ray diffraction analysis was

performed on purified starches from *Atbe1-1*, *Atbe2-1* and *Atbe3-2* mutants. No difference was observed when compared to the wild type. All starch samples were of the B crystalline-type and displayed about 37% level of crystallinity.

Starches purified from the different mutant backgrounds were submitted to size exclusion chromatography on sepharose CL-2B column to 1) purify amylopectin; 2) measure the amount of amylose. Although the amount of amylose was higher in the mutant than in the WT populations we failed to demonstrate statistical significance of the difference by using the

Student's test (Table 3). In addition, we have determined the branching level by using the methylation method (Table 3). Our results showed that the branching level of amylopectin was not significantly modified in the single mutants when compared to the wild type.

We have established the Chain Length (CL) distribution profiles of the amylopectin from each single and double mutant. Average profiles produced from several independent analyses are presented in Figure 6. For better clarity, we have combined profiles from mutant lines in both WS and Col-0 genetic backgrounds since individual profiles were the same

whatever the genetic background (CL profiles were the same for WS and Col-0 samples). Both *Atbe2* and *Atbe3* mutants displayed more or less the same profiles that were slightly different from those of the wild type (Figure 6C, 6D and 6A respectively). DP 6-7 and DP 5-9 chains were slightly decreased in *Atbe2* and *Atbe3* respectively, while DP 10-16 chains were slightly increased. No difference was evidenced for *Atbe1* in comparison to the wild type (Figure 6B). *Atbe1-1/Atbe2-1* (Figure 6E) and *Atbe1-1/Atbe3-2* (Figure 6F) double mutants showed the same profiles as the corresponding *Atbe2* and *Atbe3* single mutants respectively.

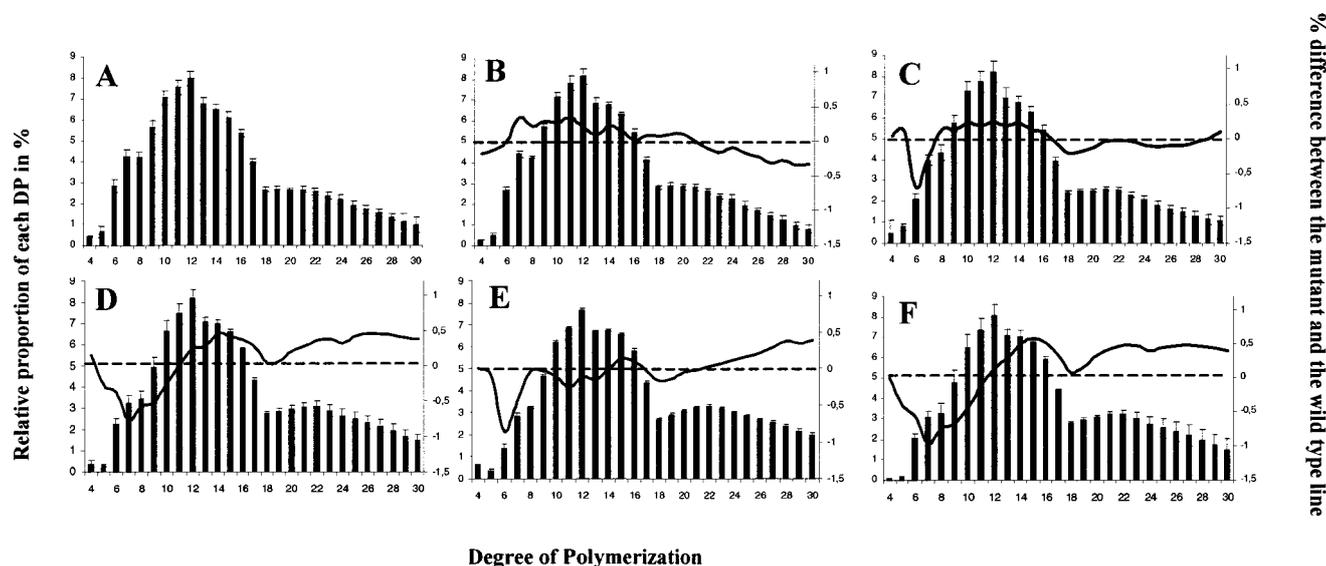


Figure 6: Compared Chain Length distribution profiles of wild type and SBE mutants. After purification and enzymatic debranching of amylopectin, the linear glucans were condensed to APTS and submitted to capillary electrophoresis that allow the separation of glucans which size differ by only one glucose unit. The level of APTS fluorescence is quantitative and indicates the proportion of each glucan in the mix. The diagrams represent the percentage (Y-axis on the left) of each glucans (X-axis) in the total population of glucans that can be detected for each sample. Thin vertical bars correspond to SE calculated on several independent analyses for each line (n=10 for WT in A; n=6 for *Atbe1* in B; n=7 for *Atbe2* in C; n=6 for *Atbe3* in D; n=3 for *Atbe1/Atbe2* in E; n=3 for *Atbe1/Atbe3* in F). The continuous line corresponds (Y-axis on the right) to the difference plot determined for each glucan between the wild type and the mutant line (i.e. mutant profile – wild type profile). Dotted lines correspond to 0-level for the Y-axis on the right (difference plots).

We have characterized the structure of the accumulating WSGs in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant. After extraction, the WSGs were submitted to size exclusion chromatography on a TSK HW50 column. The elution profile was compared to that of a mix of glycogen and glucose after the detection of the corresponding sugars by the phenol-sulfuric method (Figure 7A). Only one peak of material that co-migrates with glucose was observed for the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant. The fractions corresponding to this peak were analyzed by TLC (Figure 7B) and FACE before and after enzymatic debranching (Figure 8).

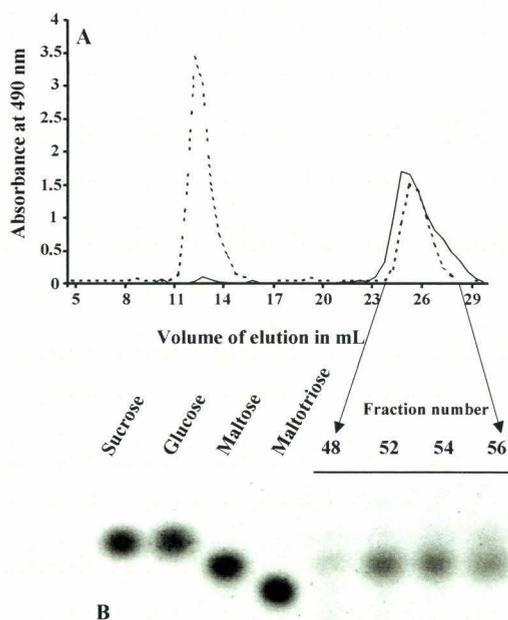


Figure 7: analysis of the WSGs in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant. A: the profile of the WSGs (2 mg) from the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant (continuous line) was compared to that of a mixture of glycogen (3 mg) and glucose (2 mg) (dashed line) by size exclusion chromatography on TSK HW50 column. Fractions of 500 μ L were collected at a flow rate of 10 mL/h in DMSO 10%. Carbohydrates were detected by the phenol-sulfuric acid method. Y-axis: absorbance at 490 nm. X-axis: elution volume in mL. C: TLC of fractions 48, 52, 54 and 56.

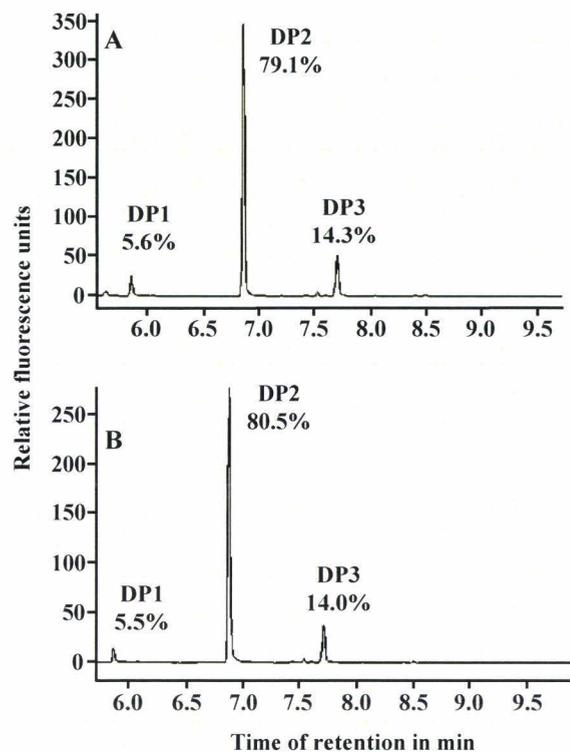


Figure 8: FACE analysis of WSGs that accumulate in the double mutant line. After purification, WSGs extracted from the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant were submitted to FACE analysis before (A) and after (B) enzymatic debranching. X-axis: time of retention in minutes. Y-axis: relative fluorescence level expressed in arbitrary units. DP1 = glucose; DP2 = maltose; DP3 = maltotriose. The numbers under DP1, DP2 and DP3 indicate the relative proportion of each type of glucan in the total content.

Our results indicate that WSGs accumulating in the double mutant are composed of very short malto-oligosaccharides (MOS) made of maltose (80%), maltotriose (14%), and glucose (6%).

The fructose and hexose-P levels were not changed in the double mutant when compared to that of the wild type (Table 4). However, an increase in sucrose contents was observed in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant as expected for a starchless line (Table 4).

Table 4: Comparison of starch, WSG and sugars contents in the wild type (WS) and the mutant lines. Starch, WSG, sugars and Hexose-P contents are expressed in mg.g⁻¹ of FW (means ± SE; n=3) and were measured at the end of the light phase on plants cultured under 16h light / 8h dark conditions.

Line	Starch	WSG	Glucose	Fructose	Sucrose	G-1-P	G-6-P
Wild type (WS)	6.7 ± 0.2	0.1 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00
<i>adg1</i> (WS)	1.4 ± 0.1	Not detected	0.67 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
<i>Atbe2-1/Atbe3-2</i>	Not detected	12.5 ± 0.03	1.4 ± 0.07	0.23 ± 0.01	0.40 ± 0.11	0.20 ± 0.05	0.03 ± 0.01
<i>adg1/Atbe2-1/Atbe3-2</i>	Not detected	0.46 ± 0.03	1.1 ± 0.02	0.31 ± 0.01	1.25 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.08 ± 0.01

The MOS in the Atbe2-1/Atbe3-2 mutants essentially accumulate in the cytosol

We have performed cell fractionation experiments (non-aqueous method) to determine the intracellular location of MOS contained in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant. Our results suggest that it essentially accumulates in the cytosol (about 76% of MOS are localized in the cytosol) 10h after the beginning of the 16h light phase (Figure 9). Day/night evolution of MOS content in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant was performed under 12h day / 12h night growth conditions. The plants were left in the dark for 3 full days to remove all residual glucans (including starch and MOS) and then transferred to 12h day / 12h night growth rhythms. Leaf samples were harvested 3 days after re-illuminating the plants. This experiment shows that MOS accumulate during the day to reach a maximum at the day / night transition and is degraded at night to reach a minimum at

the night / day transition (Figure 10A). However, when plants were kept for several days under a 16h day / 8h night rhythm, the MOS concentration was always very high in the double mutant compared to the wild-type whatever the time of the cycle (Figure 10B).

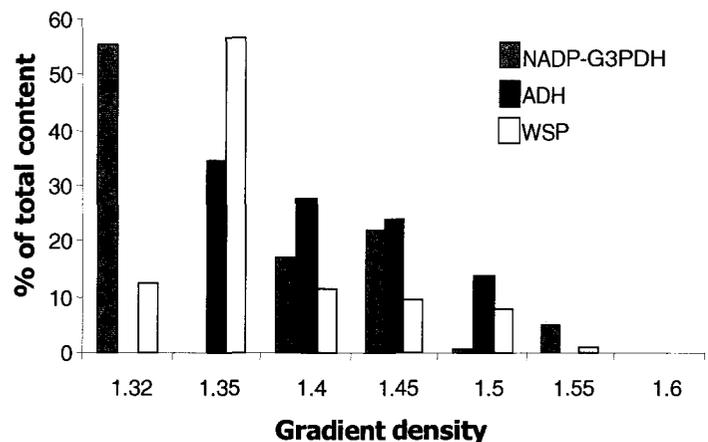


Figure 9: fractionation of plant leaf extract to determine the intracellular localization of the MOS that accumulates in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant. The cytosol and the chloroplasts were fractionated through a non aqueous method after centrifugation on a discontinuous density gradient (see methods section for details). WSGs content, NADP-G3PDH activity (NADP-Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, chloroplastic marker) and ADH activity (Alcohol dehydrogenase, cytosolic marker) were assayed on the different density fractions and were expressed as a % of the total content or activity (Y-axis) measured in all fractions (X-axis).

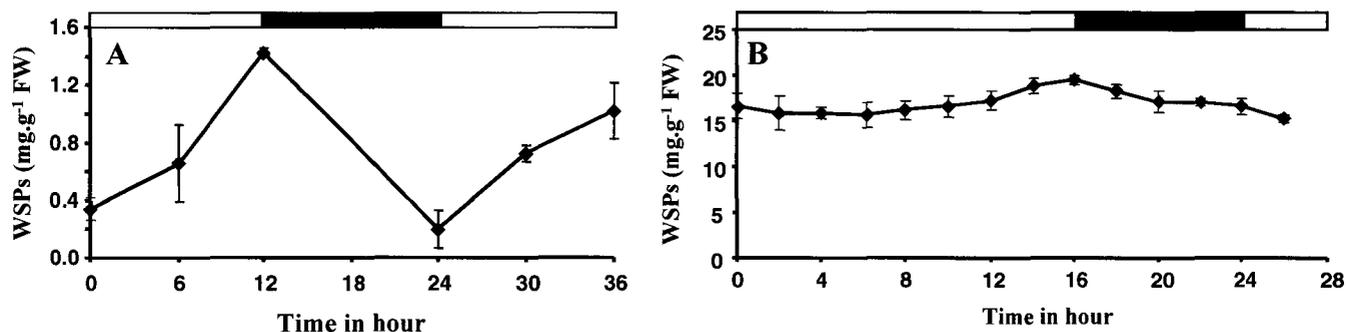


Figure 10: Diel variation of MOS content in *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant. Total WSGs in crude extract of the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant were assayed by amyloglucosidase assay at different time points of 12h day / 12h night (A) and 16h day / 8h night (B) growth cycles. In (A) the plants were left for 3 days under complete dark before transferred back to 12h light / 12h night rhythm. WSGs content was measured after 3 days under such growth conditions. Values are the means of three independent measures. X-axis: time in hours; Y-axis: total WSGs content in mg.g⁻¹ of Fresh Weight (FW). Thin vertical bars represent the standard error value. Open bar: illuminated period; closed bar: dark period.

Nonetheless, an increase was observed during the day while a decrease was observed during the night. This result suggest that MOS removal is not complete under short nights leading to an over accumulation of these molecules after several days of culture in such conditions.

Finally, we have determined that α -maltose represents above 90% of the total pool of maltose present in the double mutant (the level of α -maltose was determined by the enzymatic method described in Shirokane et al., 2000) at the end of the light period when plants were cultured under 16h light / 8h dark regime. This test was performed on fresh material immediately after extraction of the MOS to limit the impact of mutarotation in the samples and after immediate boiling to inactivate enzymes. Mutarotation occurs spontaneously when molecules are conserved in solution, although its rate is quite low according to Weise et al. (2005) and to our own observation. Indeed, after

leaving freshly extracted MOS on melting ice for one week, we have determined that β -maltose content has reached 40% of the total maltose indicating that, in the conditions we have used during the purification procedure of the MOS, the mutarotation process is very slow (spontaneous anomerization of maltose may occur at higher rate at room temperature and is strongly dependent upon the parameters of the solution).

We have also determined the maltose anomery at the end of the light period on *Atbe2-1/Atbe3-2* plants cultivated under 12h light / 12h night regime. α -maltose represents 65% of the total pool of maltose at the end of the light phase in these conditions.

The production of maltose is strongly reduced in *adg1* mutant background

To ensure that the production of maltose in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant actually occurs through a modified starch pathway, we have produced a triple mutant line that is defective for *Atbe2*, *Atbe3* and *adg1* (or *APSI*, locus At5g48300). The *ADGI* locus encodes one of the two small subunits of the ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase). AGPase is responsible for the synthesis of the unique precursor molecule of starch synthesis: ADP-glucose. A mutation at the *ADGI* locus leads to a strong reduction of starch accumulation in *Arabidopsis* leaves as described by Lin et al. (1988). We have selected in the Génoplante collection a mutant line of *Arabidopsis* that has an insertion of a modified T-DNA in the promoter region of the *ADGI* gene (line

EGZ73 corresponding to FST #511G12). Starch accumulation is not fully abolished in this line but strongly reduced to about 20% of the wild-type level at the end of the day under 16h light / 8h dark growth conditions (Table 4). In addition, the growth of this mutant line was comparable to that of the wild-type in the condition used in this work (figure 11). The presence of the triple *adg1/Atbe2-1/Atbe3-2* combination showed a fully restored “wild type” growth phenotype when compared to the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant (figure 11). Moreover, a strong reduction of maltose accumulation was observed in the presence of *adg1* when compared to the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant (Table 4) suggesting that maltose arises directly from the starch pathway and not from any other route that would be enhanced because of the absence of starch granule formation.

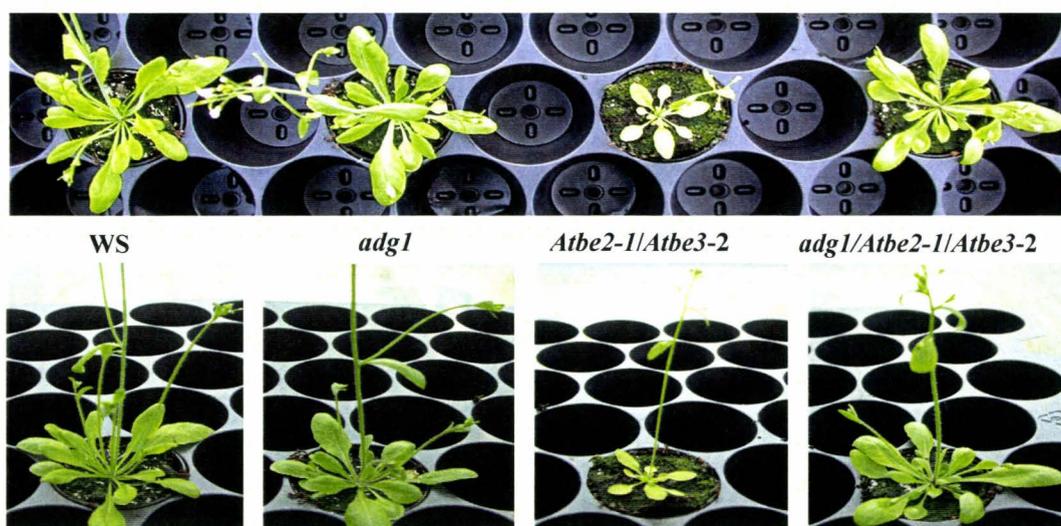


Figure 11: comparison of growth phenotype between wild type (WS) and mutant lines of *Arabidopsis thaliana* cultured under 16h light / 8h dark conditions. Pictures were taken 20 days after the germination of the plants.

This result suggests that the reduced growth of the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant is essentially due to the high level of maltose accumulation in the cells and not because of the absence of starch synthesis under 16h day / 8h dark cycle. High concentration of maltose might disturb the osmotic balance within the cell and/or might lead to pleiotropic feedback regulation effects on photosynthesis, carbon metabolism and plant growth.

Transglucosidase DPE2 requires β -maltose to be active.

Weise et al. (2005) have previously suggested that DPE2, a cytosolic transglucosidase required for the metabolization of maltose during leaf starch degradation at night (Lu and Sharkey, 2004; Chia et al., 2004), could be specific for β -maltose. The accumulation of α -maltose in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutants provided us with a reliable source that enables us to prove or rule out this hypothesis. We have thus performed zymogram analysis of the transglucosidase activity (Figure 12) of Arabidopsis using either commercially available maltose (50% α and 50% β forms) or that purified from the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant (90% α and 10% β forms). DPE2 activity localized at the very top of the glycogen containing polyacrylamide gel (Figure 12A) was

clearly visible when commercially produced maltose was used as substrate (Figure 12B), even in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant. However, no band was observed when maltose from the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant was used (Figure 12C). This result indicates both that DPE2 is preferentially active on β -maltose and that this enzyme is expressed in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant (Figure 12A) during the day.

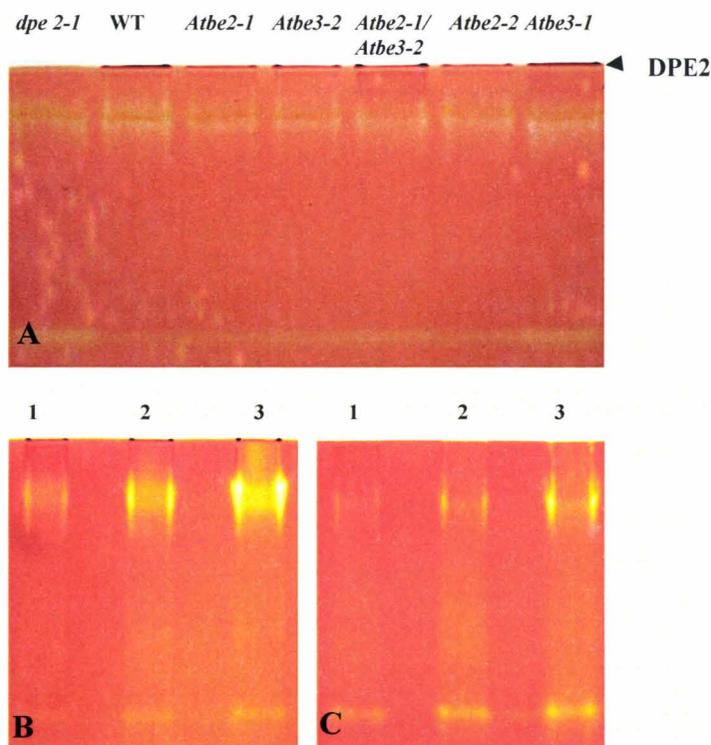


Figure 12: Zymograms of transglucosidase (DPE2) activity. Proteins from crude leaf extracts (harvested at the middle of the light phase) were loaded onto glycogen containing polyacrylamide gels and migrated under native conditions for 3h at 4°C and 15 V.cm⁻¹. After migration the gels were incubated overnight at room temperature in buffer containing maltose and subsequently stained with iodine solution. A and B: gels incubated with 10 mM and 6 mM of commercially available maltose (50% α and 50% β forms) respectively. C: gel incubated with 6 mM of maltose purified from *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant (90% α and 10% β forms). A: 100 μ g of proteins for each sample were loaded onto the gel; *dpe2-1*: leaf crude extract from a mutant line with T-DNA insertion in gene *AtDPE2* (At2g40840). In B and C, lanes 1, 2 and 3 correspond to 100 μ g, 200 μ g and 400 μ g of proteins loaded onto the gel.

DISCUSSION

In this work we describe mutant lines of *Arabidopsis thaliana* specifically defective for one out of the three putative SBE genes found in the nuclear genome of the plant (*Atbe1*, *Atbe2* and *Atbe3* mutant lines). Moreover, all double mutant combinations (*Atbe1-1/Atbe2-1*, *Atbe1-1/Atbe3-2* and *Atbe2-1/Atbe3-2*) were produced and their ability to synthesize starch was examined. First, our results suggest that AtBE1 has no obvious function in the Arabidopsis leaf starch pathway since no modification of the starch phenotype could be recorded when the corresponding gene was disrupted. Moreover, in *Atbe2* and *Atbe3* mutant backgrounds, the additional mutation at the *AtBE1* locus does not lead to any further changes in the starch phenotype other than those observed in the single *Atbe2* and *Atbe3* mutants. Finally, despite several attempts, no branching activity corresponding to AtBE1 was observed although it is expressed in the leaf of *Arabidopsis thaliana*. The AtBE1 sequence is undoubtedly related to the SBEs family, but its level of similarity to other SBEs (either from Arabidopsis or other plant sources) is low (below 40%). Therefore, and at variance with all other vascular plants, *Arabidopsis thaliana* appears to be devoid of B-type SBE. It remains possible however that the function of AtBE1 might

be more specialized and/or restricted to some other parts of the plant. It is also possible that it substitutes for some of SBE “B” elusive functions.

Conversely, the absence of either AtBE2 or AtBE3 proteins leads to a slight alteration of the starch phenotype essentially characterized by a small but significant modification in the chain length (CL) distribution profile of amylopectin. DP 5-8 chains are reduced while DP 9-15 chains are increased in both mutant lines. These results are reminiscent of those previously reported for rice and maize endosperm storage starch although differences were much more pronounced in the latter cases. Indeed rice mutants (*amylose extender*) defective for SBEIIb display a striking decrease of DP 5-13 chains and an increase in DP 15-30 chains (Nishi et al., 2001; Tanaka et al., 2004).

Therefore, in Arabidopsis leaves, DP 5-8 glucans may correspond to the main products of the catalytic activities of AtBE2 and AtBE3. This range of size matches to that already reported for maize SBEIIa and IIb when incubated *in vitro* in the presence of amylose (Takeda et al., 1993). Afterward, these DP 5-8 glucans are further elongated by starch synthases to produce longer chains required for the formation of the amylopectin clusters and the linkage between these clusters. SSI (At5g24300) might represent a good

candidate for such elongation as this enzyme is responsible for the synthesis of the short outer chains of amylopectin (DP 8–12; Delvallé et al., 2005) and is essentially active on short glucans (DP < 10-12; Commuri and Keeling, 2001). SSII (At3g01180) and SSIII (At1g11720) might also be good candidates for the direct elongation of the glucans produced by SBEs. In maize, SSIII and SBEIIa are suspected to interact physically, as a mutation at the *Dul* locus (the structural gene for SSIII; Gao et al., 1998) leads to the modification of SBEIIa activity (Boyer and Preiss, 1981). Such an interaction might occur between SSIII and AtBE2 or AtBE3 (or both) in the Arabidopsis leaf, leading to the preferential elongation of the end products of SBEs by SSIII. This idea is supported by our own observation of SSIII mutants in *Chlamydomonas* (Fontaine et al., 1993) or Arabidopsis that accumulate a structurally modified amylopectin in which the number of DP 6-7 chains is significantly increased (unpublished results). The recent description of a mutant line of Arabidopsis specifically defective for SSIII did not mention such a modification in the amylopectin structure (Zhang et al., 2005) although a slight but significant increase in DP 6-7 chains can be observed in the *Atss3-2* mutant allele.

The apparent different behavior between AtBE2 and AtBE3 with respect to

their ability to stimulate phosphorylase “a” might reveal a threshold effect that is specific to this SBE assay. Indeed, the recombinant AtBE3 expressed in *E. coli* was clearly observed on zymogram performed with the phosphorylase “a” stimulation method (figure 13). Moreover, their *in vivo* functions seem largely (but not fully) redundant as suggested by the complete absence of starch in the mutant line simultaneously defective for both enzymes. The loss of their activity in the double mutant cannot be overcome by AtBE1 therefore strengthening our assumption that the latter is not actively involved in starch metabolism in Arabidopsis leaves.

This situation may be related to that described in potato (Safford et al., 1998) where the reduction of SBE activity by 98% in some transgenic lines expressing an antisense sequence of SBE B (class I) does not lead to a dramatic modification of starch structure. The remaining SBE A activity (measured through the phosphorylase stimulation assay) accounts only for a minor part of the total SBE activity in potato tuber but is sufficient to sustain normal starch synthesis. However, reduction of SBE A expression by antisense technology leads to a much bigger modification in starch structure (Jobling et al., 1999) which is somewhat different to the situation observed in

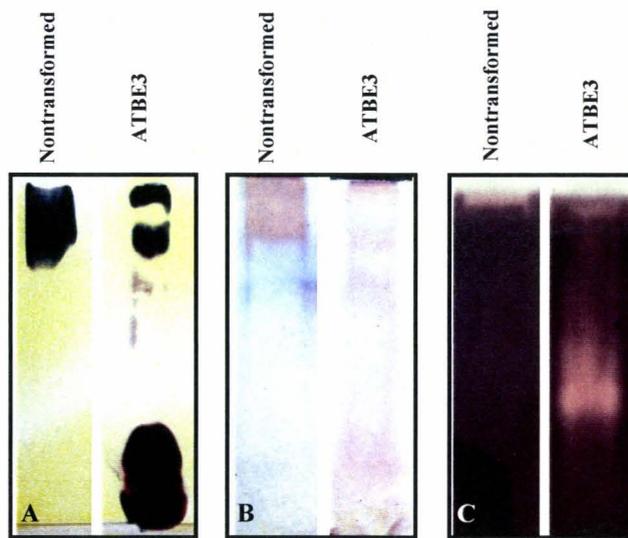


Figure 13: zymogram analysis of recombinant AtBE3 expressed in *E. coli*. The ORF of gene *AtBE3* was amplified by PCR using primers containing the recombination sequences of the Gateway Cloning System (Invitrogen). The PCR product was cloned by recombination in the Gateway pDONR201 vector following manufacturer's instructions. The *AtBE3* cDNA was then inserted by a second recombination step in the Gateway pDEST17 vector, allowing the expression of the N-terminus 6xHis-tagged fusion protein in *E. coli* BL21 strain. After 4 hours induction in LB medium containing 0.2% L-arabinose, bacterial crude extracts were prepared and loaded onto different polyacrylamide gels (migration is always performed under native conditions at 4°C at constant voltage 15 V.cm⁻¹) to test for SBE activity. A: 100 µg of proteins from a leaf crude extract were loaded on a native PAGE (6.5% acrylamide). After electrophoresis for 2h30 the gel was incubated overnight at room temperature in 30 mL of the following buffer: Hepes/NaOH 50 mM pH 7.0; 10% glycerol (v/v); GIP 50 mM; AMP 2.5 mM; 28U of phosphorylase "a" from rabbit muscle. Branching activities were revealed by iodine staining. B: same as in A except that 27 mg of maltodextrins (from Sigma-Aldrich) was added to the incubation buffer. C: 100 µg of proteins were loaded onto a native PAGE (7.5% acrylamide) containing soluble potato starch (Sigma) at 0.3% final concentration and separated for 3h. The gels were incubated overnight at room temperature in the following buffer: Tris/HCl pH 7.0 50 mM, 1 mM DTT, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂. The enzymatic activities were revealed by soaking the gel into iodine solution (I₂ 0.2% w/v and KI 2% w/v). Untransformed lanes correspond to crude extracts of untransformed *E. coli* BL21 strain.

Arabidopsis where the contribution of each SBE II (family A) by itself is low as shown by the marginal phenotype described in each single mutant. This in turn might reveal some basic differences between transitory and storage starches. Only the antisense inhibition of both SBE A and B leads to a strongly altered structure of tuber starch although starch synthesis was not abolished in these lines and was only reduced by 50% (Schwall et al., 2000). This could be due to the presence of low albeit significant amounts of residual BE activity.

The origin of maltose accumulation in the double mutant line cannot yet be completely addressed although we have definitely shown with the analysis of the *adg1/Atbe2-1/Atbe3-2* triple mutant that the maltose derives from the starch pathway. The absence of maltose in the starch-free *pgm1* mutant (Caspar et al., 1985) and in the very low-starch *Atss2/Atss3* double mutant (Martha James and Alan Myers, personal communication) confirm this conclusion. The amount of maltose in the *Atbe2-1/Atbe3-2* mutant is 300 to 600 fold higher than that assayed at mid-course of the light phase in the wild

type but is more or less equivalent to that measured in *dpe2* mutants defective for cytosolic transglucosidase (Chia et al., 2004; Lu and Sharkey, 2004; Weise et al., 2005). The stunted growth phenotype of the double mutant is equally reminiscent of that observed in the *dpe2* mutants. The lack of maltose metabolization in the *dpe2* mutant can explain why such high level of maltose accumulates in the cell. Spontaneous mutarotation of maltose could explain why equivalent amount of both anomers are assayed in the mutant (Weise et al., 2005). In our study, above 90% of maltose assayed in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant was in the α form. Although no definitive explanation can yet address this difference between our results and those of Weise et al. (2005) several hypothesis may be raised to explain the origin of maltose accumulation in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant. In this line, despite the absence of SBE activity, the starch synthases (SSs) could still able to produce linear α -glucans from ADP-glucose (ADP-glucose pyrophosphorylase and other starch metabolizing enzymes remain unaffected; Table 2). We propose that these linear glucans are rapidly degraded (even during the light phase) by amylases to produce maltose in great majority and some other short MOS (Glucose and DP 3 are side products of degradation). After its translocation to the

cytosol by the MEX1 maltose exporter (Niittyta et al., 2004; Weise et al., 2004) maltose is degraded by a cytosolic transglucosidase (DPE2; Chia et al., 2004, Lu and Sharkey, 2004) with the help of an acceptor molecule whose nature is not yet known although the existence of a cytosolic complex soluble heteroglycan was recently reported in Arabidopsis leaves (Fettke et al., 2005a, b). Plastidial β -amylases were shown to interact directly with semi-crystalline starch granules and suggested to be important factors for leaf starch degradation in the potato leaf (Scheidig et al., 2002). However, the situation is obviously different in the *Atbe2-1/Atbe3-2* double mutant since no granular starch was observed in this line. The abnormal products of the starch pathway may thus be comparatively more accessible to other enzymes of the starch pathway. In such a modified situation a plastidial α -amylase might become the most effective enzyme of degradation of those glucans produced by SSs in the *Atbe2-1/Atbe3-2* line. The main end product of α -amylases on linear α -1,4 linked glucans is α -maltose with some other side products like maltotriose and other short MOS (Robyt and French, 1970) since α -amylases exhibit a retaining mechanism (for more details: <http://afmb.cnrs->

mrs.fr/CAZY/GH_13.html). α -maltose is then exported to the cytosol by MEX1 where it will be metabolized by DPE2 after mutarotation. Abnormal accumulation of α -maltose in the *Atbe2-1/Atbe3-2* may be understood because of the substrate specificity that we now demonstrate for DPE2 (Figure 12B and 12C). Indeed the latter seems to be significantly active on β -maltose only. β -maltose is slowly generated by spontaneous mutarotation of α -maltose and is subsequently metabolized by DPE2 while accumulating in the cytosol. The rate of spontaneous mutarotation being quite low (this work and Weise et al., 2005) this could explain why accumulation of α maltose is observed during the illuminated period (Figure 10). At night (in 12h day / 12h night growth conditions), because *de novo* synthesis of maltose is turned off, maltose content progressively decreases because of the degradation of the β -form by DPE2. However, under long day (16h) growth conditions, maltose cannot be completely degraded since mutarotation is too slow to convert all the α -maltose to β -maltose during the short night. This might explain why maltose progressively accumulates in the leaf cells even at the end of the dark phase when the plants are subjected to a 16h day / 8h night growth regime.

An alternative to this hypothesis is that maltose is indifferently produced by both α - and β - amylases leading to the production of both α - and β - maltose. After its transfer to cytosol, β -maltose is rapidly metabolized by DPE2 while α -maltose is only slowly degraded after its spontaneous anomerization to the β -form. Therefore, under long day / short night growth conditions, α -maltose concentration gradually increases in the leaf of the plant because it is not a suitable substrate for DPE2.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Génoplante (program n°Af2001030), the CNRS, the INRA, the Région Nord-Pas de Calais and the European Union-FEDER (program ARCir), the Ministère Délégué à la Recherche (Grant n°JC5145 ACI Jeunes-Chercheurs). We thank Pr Alan Myers and Pr Martha James (Iowa State University) for sharing unpublished results and for helpful discussions. We are grateful to Frédéric Chirat for his assistance with FACE and Yves Leroy for his assistance with HPAEC-PAD and Gas Chromatography.

RESUME

Trois gènes qui codent potentiellement des enzymes de branchement sont retrouvés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*: *AtBE1*, *AtBE2* et *AtBE3*. Bien qu'aucun d'impact sur la structure de l'amidon ne fut observé dans les mutants *Atbe1*, des modifications sur la structure de l'amylopectine analogues à celles rencontrés chez d'autres mutants d'enzyme de branchement de type II furent détectées dans les mutants *Atbe2* et *Atbe3*. Aucune modification du contenu en amidon ne fut repérée dans les lignées simples mutantes. Par ailleurs, nous avons produit les trois combinaisons doubles mutants (*Atbe1/Atbe2*, *Atbe1/Atbe3*, *Atbe2/Atbe3*) et avons analysé l'impact des mutations sur le contenu et la structure de l'amidon.

Nos résultats montrent que *AtBE1* ne possède apparemment aucune fonction dans la synthèse d'amidon dans les feuilles puisque les deux doubles mutants *Atbe1/Atbe2* et *Atbe1/Atbe3* affichent les mêmes phénotypes que les simples mutants *Atbe2* et *Atbe3*. Toutefois, la synthèse d'amidon est abolie dans le double mutant *Atbe2/Atbe3* alors que de fortes quantités de α -maltose s'accumulent dans le cytosol. Ce résultat indique que les fonctions des deux enzymes de branchement de type II

AtBE2 et *AtBE3* sont redondantes chez *Arabidopsis*.

De plus, nous avons démontré d'une part que l'accumulation de ce maltose dépend de la présence d'une forme active d'ADP-Glucose Pyrophosphorylase et d'autre part que la transglucosidase cytosolique (DPE2), impliquée dans la métabolisation du maltose, était spécifique du β -maltose.

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Autres études structurales des amidons des lignées mutantes

Les grains d'amidon extraits des lignées simples et doubles mutantes furent analysés en microscopie électronique à transmission à partir de coupes ultra-fines. La morphologie et la taille des granules du mutant *Atbe1-1* et du sauvage WS sont

indiscernables entre eux (figure 14A). Par contre les grains accumulés dans les mutants *Atbe2-1*, *Atbe2-2* et *Atbe3-2* semblent légèrement plus volumineux et plus allongés (figure 14B et C). Cette observation n'est le résultat que d'une seule analyse qui devra être confirmée ou infirmée

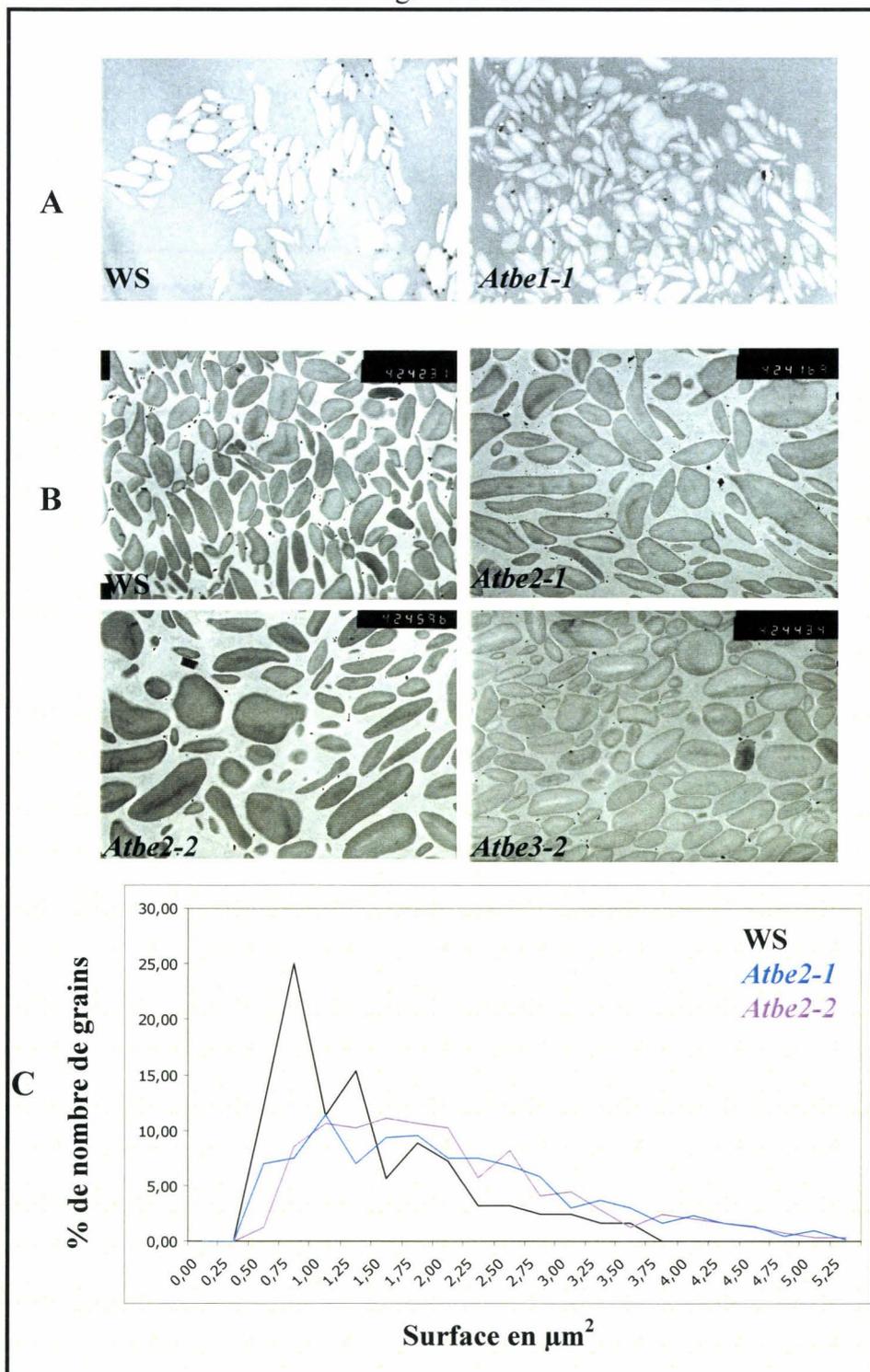


Figure 14 : Coupes ultra-fines de grains d'amidon observés en microscopie électronique à transmission.

A : grains d'amidon des lignées sauvage WS et *Atbe1-1* extraits de plantes cultivées dans les conditions standard (voir matériel et méthodes page 63).

B : grains d'amidon des lignées sauvage WS, et mutantes *Atbe2-1*, *Atbe2-2* et *Atbe3-2* extraits de plantes cultivées dans les mêmes conditions.

C : surfaces relatives mesurées à partir de l'observation en microscopie électronique à transmission de populations de grains extraits des lignées sauvage WS et mutantes *Atbe2-1* et *Atbe2-2*. Cette mesure n'a pas été réalisée pour la lignée *Atbe3-2*.

Impact des mutations sur d'autres activités du métabolisme de l'amidon (2)

Dans la partie A des résultats, nous avons présenté les résultats de dosages *in vitro* de différentes activités du métabolisme de l'amidon, dont les amidon-synthétases solubles (tableau 2). Aucune des activités testées, sauf l'activité de branchement et probablement les phosphorylases, ne semble être perturbée dans les lignées simples mutantes. Néanmoins, nous pouvons envisager que la participation des différentes isoformes d'amidon-synthétases solubles peut varier selon le fond génétique considéré sans pour autant observer de différences sensibles dans l'activité totale testée. Le gel d'activité présenté sur la figure 15A permet la révélation deux isoformes d'amidon-synthétases solubles, la SSI et la SSIII. Les activités respectives de ces deux enzymes sont identiques à celles rencontrées dans les sauvages de référence quels que soient les fonds génétiques simples ou doubles mutants envisagés.

Par ailleurs, l'absence simultanée des deux formes d'enzyme de branchement de type II rend la plante incapable de synthétiser un polysaccharide insoluble. Dans la première partie des résultats, nous présentons le résultat du dosage de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (tableau 2) en présence ou en l'absence de son activateur allostérique, le 3-PGA. Nous devons

considérer également ici l'activité des phosphoglucomutases. En effet, une conséquence de la mutation sur l'enzyme plastidiale ne permettrait pas une accumulation normale d'amidon (Caspar et coll., 1985). Le zymogramme révélant spécifiquement les activités des différentes phosphoglucomutases est présenté sur la figure 15B. Nous ne notons aucune altération des activités détectées dans la lignée *Atbe2-1/Atbe3-2*.

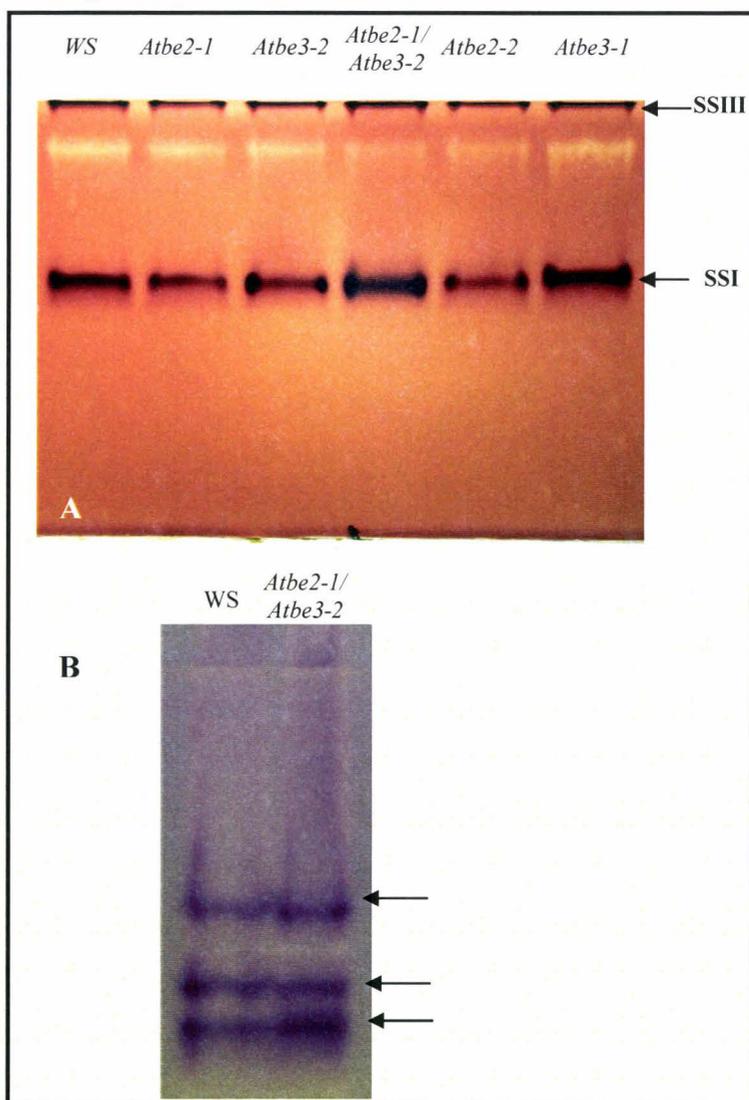


Figure 15: Zymogrammes des activités amidon-synthétases solubles et des activités phosphoglucomutases

A: gel révélant les activités amidon-synthétases solubles (matériels et méthodes page 74)

B: gel révélant les activités phosphoglucomutases situées au niveau des flèches (matériels et méthodes page 75)

L'abolition de l'expression d'adg1 n'est pas complète pour l'allèle mutant utilisé

Le gène *adg1* nommé également *aps1* se situe au locus At5g48300 et s'organise en 8 exons et 7 introns (figure 16). Il code la petite sous-unité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, une protéine de 520 amino-acides pour un poids moléculaire de 56 kDa. Elle possède un peptide d'adressage au chloroplaste de 7 kDa et le poids moléculaire de la protéine mature est donc de 49 kDa.

Nous avons repéré dans la banque de FST correspondant à la collection de mutants d'insertion de l'URGV une FST correspondant au locus *adg1* (FST 511G12, lignée EGZ73, voir figure 16). L'insertion de l'ADN-T se situe dans le promoteur, en position -79 par rapport au codon ATG. Pour information, une deuxième lignée mutante, pour laquelle l'insertion se situe dans le dernier exon, est disponible mais n'a pas été étudiée. Nous avons analysé la lignée EGZ73 pour son contenu en amidon. Cette mutation n'entraîne pas la disparition totale du polymère à laquelle on s'attend (Lin et coll., 1988a). Il reste en effet environ 20% des quantités normales en comparaison avec le sauvage de référence (tableau 4). Ce résultat suggère que l'insertion de l'ADN-T dans le promoteur du gène affecte vraisemblablement son expression

sans l'interrompre totalement conduisant ainsi probablement à une faible synthèse de la protéine codée par *adg1*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons détecté ADG1 sur des quantités égales d'extraits de protéines solubles de feuilles des différents lignées par immuno-détection (figure 17). L'anticorps utilisé reconnaît spécifiquement un polypeptide d'un poids moléculaire légèrement inférieur à 50 kDa. Ce polypeptide est présent en plus faibles quantités dans les feuilles des lignées *adg1* et *adg1/Atbe2-1/Atbe3-2*.



FST 511G12

Figure 16 : Organisation du locus At5g48300.

La séquence codante du gène est figurée par les flèches pleines orange dans le sens 5' vers 3'. Les drapeaux représentent les FSTs disponibles selon leur banque d'origine (rouge pour l'URGV, bleu pour le NASC et jaune pour les lignées GABI)

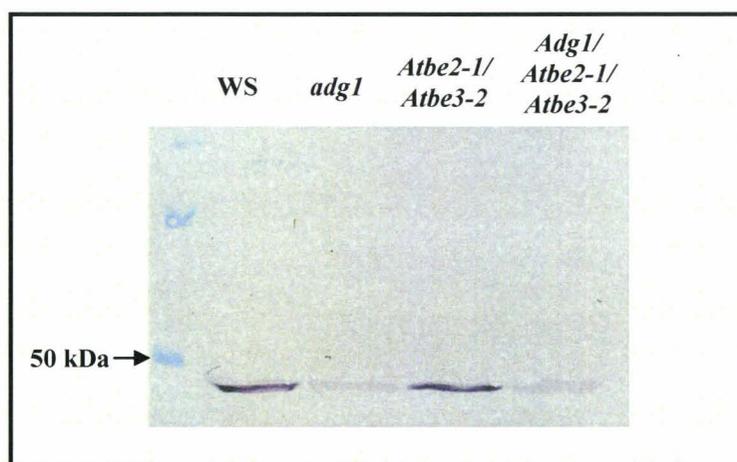


Figure 17 : Immuno-détection de la petite sous-unité de l'AGPase d'*Arabidopsis thaliana*.

La première piste correspond au marqueur de poids moléculaire. La préparation des échantillons, la migration et la méthode de détection sont consignées page 78.

La lignée Atbe2-1/Atbe3-2 voit l'expression de plusieurs centaines de ses gènes modifiée

Le phénotype particulier de la lignée double mutante *Atbe2-1/Atbe3-2* nous a encouragés à étudier l'expression de chacun de ses gènes dans le but premier de développer de nouvelles pistes vers la compréhension de l'accumulation massive de maltose corrélée à la croissance retardée et la petite taille des plantes. Nous avons entrepris de comparer l'expression des gènes du double mutant avec l'expression des gènes du sauvage WS à deux moments précis du cycle jour/nuit. Les ARN totaux furent extraits de feuilles prélevées à la transition jour/nuit et à la transition nuit/jour. Les plantes furent cultivées durant 3 semaines dans les conditions consignées page 63. Les ARN totaux congelés furent ensuite envoyés à l'équipe dirigée par le Dr Jean-Pierre Renou (INRA, Versailles) qui préparèrent les échantillons et réalisèrent l'hybridation des puces CATMA. Plusieurs centaines de gènes du double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* voient leur expression modifiée dans le sens de la sous-expression ou de la sur-expression. La quantité de données rend impossible de détailler plus en avant les résultats obtenus. L'expression de certains gènes est modifiée de la même manière aux deux moments testés du cycle

jour/nuit. L'expression de certains est uniquement modifiée le matin ou le soir. La machinerie de synthèse protéique semble profondément perturbée, une multitude de gènes engagés dans l'assemblage des ribosomes sont sur-exprimés en fin de journée. D'autres gènes sont sur-exprimés en fin de nuit comme par exemple certains gènes de réponse aux stress ou impliqués dans la sénescence de la plante. Il y a sous-expression de différents gènes impliqués dans la croissance de la plante. La transcription de plusieurs gènes de divers métabolismes de la plante est modifiée : transport des acides aminés, métabolisme lipidique, synthèse de la paroi cellulaire, etc...

Très peu de gènes connus du métabolisme de l'amidon connaissent une variation de leur expression dans la lignée *Atbe2-1/Atbe3-2*. Un gène (At3g23920) codant une β -amylase prédite par ChloroP (Emanuelsson et coll., 1999) pour être dirigée vers le plaste voit son expression diminuée en fin de journée dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2*. L'expression du gène At1g32900, dont le produit est la GBSSI, est également réduite dans le double mutant mais en fin de nuit, moment du cycle jour/nuit où normalement l'expression de ce gène augmente (Smith et coll., 2004). Le gène At3g46970 est lui plus exprimé dans le double mutant et ce spécifiquement à la fin de la phase

nocturne. Ce gène code l' α -glucane phosphorylase cytosolique PHS2. La présentation et l'interprétation de ces résultats est problématique dans le cadre de cette thèse car nous ne possédons pas les outils informatiques nécessaires à l'analyse des résultats bruts obtenus après l'hybridation des puces CATMA. Il conviendrait donc de réaliser cette analyse car il nous semble important de comprendre le phénotype de croissance du double mutant. En effet, même s'il n'accumule plus d'amidon, ce dernier est remplacé par des niveaux très élevés de maltose qui peut compenser la perte de l'amidon en ce qui concerne les apports carboné et énergétique. En d'autres termes, une partie non négligeable du maltose qui s'accumule pendant la journée pourrait être dégradée la nuit pour fournir à la plante ce dont elle a besoin pour se développer. La restauration partielle du phénotype de croissance chez le triple mutant *adg1/Atbe2-1/Atbe3-2* suggère l'existence de complications dans le double mutant qui ne sont pas seulement liées à l'approvisionnement en carbone (le triple mutant est dépourvu d'amidon mais aussi de maltose). On peut penser qu'il s'agisse d'un problème lié au contrôle de la pression osmotique dans les cellules (les fortes concentrations de maltose pourraient en être responsables) ou encore d'un phénomène de rétrocontrôle, par le maltose

lui même, de l'expression et/ou de l'activité d'un certain nombre d'autres gènes/protéines du métabolisme carboné, du contrôle du développement (synthèse des hormones, synthèse de la paroi) ou de la régulation du cycle cellulaire.

DISCUSSION

Au cours de cette étude nous avons décrit des lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* spécifiquement déficientes pour chacun des trois gènes d'enzymes de branchement trouvés dans le génome nucléaire, *AtBE1*, *AtBE2* et *AtBE3*. Nous avons également produit et analysé les trois combinaisons de doubles mutants (*Atbe1-1/Atbe2-1*, *Atbe1-1/Atbe3-2* et *Atbe2-1/Atbe3-2*). La première conclusion de ces travaux est que *AtBE1* ne semble jouer aucun rôle dans la synthèse de l'amidon de la feuille d'*Arabidopsis*. Aucune modification de la quantité ou de la structure de l'amidon emmagasiné dans les lignées mutantes *Atbe1-1* et *Atbe1-2* ne fut observée. De plus, les phénotypes des lignées doubles mutantes *Atbe1-1/Atbe2-1* et *Atbe1-1/Atbe3-2* sont strictement identiques à ceux déjà déterminés dans les lignées *Atbe2* et *Atbe3*. La disparition totale du polymère dans la lignée *Atbe2-1/Atbe3-2* démontre qu'aucune autre forme active d'enzyme de branchement ne peut couvrir l'absence des isoformes *AtBE2* et *AtBE3*. Malgré nos efforts, nous n'avons jamais réussi à percevoir l'activité de branchement correspondant à *AtBE1* bien que la phase ouverte de lecture soit bien exprimée au niveau des feuilles. La séquence peptique de *AtBE1*, bien qu'affichant des analogies avec les enzymes de branchement, est éloignée des séquences de SBE végétales connues.

Ensemble, ces informations semblent montrer qu'*Arabidopsis thaliana* soit la première espèce végétale décrite dépourvue d'enzyme de branchement de type I (ou de la famille B).

L'absence de *AtBE2* ou de *AtBE3* conduit à une très légère modification de la distribution des longueurs des chaînes de l'amylopectine, avec dans les deux cas une augmentation de la longueur moyenne de ces chaînes. L'interruption des fonctions des gènes *Atbe2* et *Atbe3* provoquent des phénotypes fortement semblables. Toutefois, l'absence de *AtBE3* conduit à une modification plus large de la structure de l'amylopectine. Dans le mutant correspondant, on assiste à une diminution des chaînes de DP allant de 5 à 10 résidus de glucose et dans le même temps à une augmentation des chaînes de DP compris entre 9 et 15 résidus de glucose alors que l'absence de *AtBE2* a un impact plus limité, provoquant la baisse des chaînes de DP 6 et 7 uniquement. Les modifications observées dans ce travail rappellent celles précédemment décrites dans les mutants *amylose extender* du maïs (Boyer et Preiss, 1978 ; Stinard et coll., 1993 ; Kasemsuwan et coll., 1995 ; Shi et Seib, 1995) et du riz (Nishi et coll., 2001 ; Tanaka et coll., 2004). Les faibles niveaux de modifications perçus dans les mutants *Atbe2* et *Atbe3* comparées à celles des mutants analogues du maïs et du riz

peuvent s'expliquer par le recouvrement fonctionnel visiblement étendu des deux isoformes AtBE2 et AtBE3 dont les séquences peptidiques sont identiques à plus de 75%. Néanmoins, de subtiles différences entre les phénotypes des lignées *Atbe2* et *Atbe3* laissent supposer que celles-ci possèdent également leurs propres spécificités catalytiques ou encore leurs propres spécificités d'interaction avec les autres protéines du métabolisme de l'amidon. Les phénotypes des lignées mutantes suggèrent que les chaînes de DP 5 à 10 soient les produits principaux de l'action catalytique de AtBE2 et de AtBE3 dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Ce résultat cadre avec les tailles des chaînes transférées lors des incubations de SBEIIa et SBEIIb du maïs en présence d'amylose (Takeda et coll., 1993).

Quel que soit le mécanisme adopté par *Arabidopsis* pour initier la synthèse de nouveaux grains d'amidon dans ses feuilles, AtBE2 et AtBE3 doivent être impliquées dans les premières étapes de la ramification du polymère. Nous pouvons envisager que la perte de l'une des deux isoformes provoque une baisse du nombre de grains synthétisés dans chaque plaste sans que le contenu final en polysaccharide n'en soit affecté. Cet effet peut constituer la source du faible accroissement de la taille moyenne des grains accumulés dans les lignées mutantes *Atbe2* et *Atbe3* (voir

figure 14, page 108). Néanmoins ce résultat devra être confirmé par une deuxième série d'observations.

L'absence totale de toute forme de polysaccharide insoluble dans la lignée double mutante *Atbe2-1/Atbe3-2* confirme d'une part qu'aucune autre forme active d'enzyme de branchement ne peut compenser l'absence des deux isoformes AtBE2 et AtBE3 et d'autre part le recouvrement presque total de ces deux activités. *Arabidopsis thaliana* représente actuellement le seul exemple de dicotylédone possédant deux représentants de la famille A des SBE. La ressemblance entre les deux enzymes provient fort probablement d'un des nombreux événements de duplication génique comme en a connu le génome d'*Arabidopsis thaliana* au cours de son évolution (Simillion et coll., 2002). Les séquences nucléiques des deux gènes sont sensiblement identiques à ceci près des divergences observées entre leurs extrémités 5' et 3'. Malgré cette différence, les organisations exon / intron des deux gènes présentent des ressemblances frappantes (voir figure 2, page 88).

La synthèse de l'amidon est totalement abolie dans la lignée *Atbe2-1/Atbe3-2*. Il est remplacé par des malto-oligosaccharides solubles (MOS) dont le constituant principal est le maltose. Nous avons montré que cette accumulation

massive de maltose provenait de la voie de synthèse de l'amidon puisque les quantités de maltose sont quasiment réduites à néant dans le triple mutant *adg1/Atbe2-1/Atbe3-2*. La forte réduction de l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase dans ce triple mutant et la baisse de synthèse de l'ADP-glucose qui en découle prévient ainsi la synthèse des glucanes linéaires par les amidon-synthétases et par conséquent des MOS. Nous montrons ainsi que le maltose qui s'accumule dans le double mutant ne provient pas de l'activation d'une voie métabolique parallèle en absence de synthèse d'amidon (et alors que le précurseur est normalement synthétisé). Les fortes quantités de maltose accumulées sont sensiblement équivalentes à celles rencontrées dans les mutants *dpe2* déficients pour la transglucosidase cytosolique (Chia et coll., 2004; Lu and Sharkey, 2004; Weise et coll., 2005) mais sont au moins deux fois supérieures à celles du mutant *mex1*, dans lequel le transporteur de maltose est absent (Niittyla et coll., 2004). Dans le mutant *dpe2*, la métabolisation du maltose cytosolique est impossible, ce qui explique l'accumulation de maltose dans ce mutant. La mutarotation, qui est un phénomène spontané, peut expliquer les niveaux plus ou moins équivalents d' α et de β -maltose retrouvés dans le mutant *dpe2* par Weise et coll. (2005). Dans notre étude, 90% du

maltose accumulé se trouve en configuration anomérique α . Bien qu'aucune explication satisfaisante ne puisse apporter un éclairage complet sur ce résultat, nous pouvons toutefois émettre quelques hypothèses en nous focalisant sur l'origine du maltose accumulé dans le double mutant. Si l'absence des enzymes de branchement empêche la synthèse d'amidon, les amidon-synthétases restent tout à fait capables d'allonger des glucanes à partir d'ADP-glucose (les dosages d'activité des amidon-synthétases et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase ainsi que les zymogrammes amidon-synthétases et phosphoglucomutases montrent que ces activités ne sont pas affectées par les mutations ; tableau 2 et figure 15). Nous proposons que ces glucanes linéaires soient systématiquement dégradés par les amylases, même pendant la journée. Cette dégradation aboutit principalement à la formation de maltose ainsi que de glucose et de maltotriose comme composants mineurs. Le maltose est ensuite exporté du chloroplaste au cytosol *via* MEX1 (Niittyla et coll., 2004) pour être dégradé par la transglucosidase cytosolique DPE2 (Lu et Sharkey, 2005 ; Chia et coll., 2005) à l'aide d'une molécule accepteuse dont la nature exacte est encore inconnue. Cette molécule pourrait être l'hétéroglycane soluble cytosolique décrit par Fettke et coll. (2005a et b). Les β -amylases sont

connues pour interagir directement avec le grain d'amidon et pour l'importance de leur fonction dans la dégradation de l'amidon dans les feuilles (Scheidig et coll., 2002). Le mode d'action des β -amylases inverse l'anométrie du carbone réducteur après hydrolyse de la liaison α -1,4 (voir page 34) et débouche sur la production de β -maltose. Néanmoins, la situation observée dans le double mutant est différente puisque aucune forme de matériel cristallin n'est présente. Les glucanes linéaires produits par les amidon-synthétases peuvent ainsi fournir à d'autres enzymes de dégradation un meilleur substrat, plus accessible. Nous pensons particulièrement aux α -amylases dont l'action catalytique aboutit majoritairement à la formation d' α -maltose (le mode d'action de ces enzymes retient l'anométrie originelle du carbone engagé dans la liaison O-glycosidique) et d'autres composés minoritaires comme le maltotriose et d'autres MOS (Robyt et French, 1970). L' α -maltose pourrait ensuite être transporté vers cytosol par MEX1 (Niittyala et coll., 2004) avant d'être dégradé par la transglucosidase cytosolique DPE2 (Lu et Sharkey, 2005 ; Chia et coll., 2005) après mutarotation. L'accumulation anormale d' α -maltose doit être la conséquence de la spécificité catalytique de DPE2 envers le β -maltose uniquement

(montré dans ce travail). La mutarotation est un phénomène lent (Weise et coll., 2005 et ce travail). Cela explique pourquoi on assiste à l'accumulation d' α -maltose durant la phase lumineuse, dans des conditions de culture de 12h de jour et 12h de nuit. Dans ces conditions, la synthèse de maltose s'arrête la nuit et l' α -maltose est progressivement transformé en β -maltose qui est aussitôt pris en charge par DPE2 pour être métabolisé. La période de nuit est dans ce cas suffisamment longue pour conduire à la dégradation complète du maltose. Dans des conditions de culture où la phase lumineuse est plus longue, les quantités résiduelles d' α -maltose sont trop importantes pour être transformées par la mutarotation en β -maltose durant la nuit qui est trop courte et par conséquent ne peuvent être totalement dégradées par DPE2. Il en résulte une augmentation sensible jour après jour de la concentration intracellulaire d' α -maltose.

Le maltose peut également être produit par l'action simultanée des α et des β -amylases. Pour les mêmes raisons que nous venons de donner, l' α -maltose s'accumulera progressivement dans le cytoplasme de la cellule puisque c'est prioritairement la forme β qui sera métabolisée.

Le phénotype morphologique des doubles mutants *Atbe2-1/Atbe3-2* rappelle

ceux des plantes mutantes *dpe2* et *mex1*. Les plantes sont plus pâles que le sauvage et présentent un retard de croissance. Elles restent également toujours plus petites que le sauvage de référence même à l'état adulte. Les niveaux de maltose mesurés dans la lignée mutante *dpe2* sont similaires (Lu et Sharkey, 2005 ; Chia et coll., 2005 ; nos propres observations) à ceux observés dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2*, alors que le phénotype de croissance est beaucoup plus marqué dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2*. La plante se révèle incapable de procéder à la mise en réserve sous forme d'amidon. Hormis l'étape de ramification, le reste du système de synthèse d'amidon fonctionne correctement, mais le produit des amidon-synthétases est automatiquement dégradé, même pendant la journée. Cette perte d'énergie ainsi que les niveaux élevés de maltose présents dans la cellule sont sources de stress et conduisent probablement la plante à modifier plusieurs voies métaboliques. Les variations observées de l'expression de centaines de gènes dans la lignée *Atbe2-1/Atbe3-2* reflètent, peut être partiellement, ces nombreux changements métaboliques (annexes IV à VII et partie « Résultats supplémentaires »). Elles devraient nous aider à mieux comprendre la régulation des flux carbonés dans les feuilles en lien avec le métabolisme de l'amidon.

BIBLIOGRAPHIE

- Albrecht, T., Koch, A., Lode, A., Greve, B., Schneider-Mergener, J. and Steup, M.** (2001) Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analysis and immunochemical characterization. *Planta*. **213**, 602-613.
- Alonso, J. M., Stepanova, A.N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al.,** (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Atkin, NJ., Cheng, SL., Abeysekera, RM. and Robards, AW.** (1999). Localisation of amylose and amylopectin in starch granules using enzyme-gold labeling Starch. *Starch/Stärke*. **51**, 163-172.
- Baba, T., Yoshii, M., Kainuma, K.** (1987) Acceptor molecule for granule bound starch synthase from sweet potato roots. *Starch-Stärke*. **39**, 52-56.
- Baba, T. and Kainuma, K.** (1987) Partial hydrolysis of sweet-potato starch with β -amylase. *Agricultural and Biological Chemistry*. **51**, 1365-1371.
- Baba, T., Kimura, K., Mizuno, K., Etoh, H., Ishida, Y., Shida, O. and Arai, Y.** (1991) Sequence conservation of the catalytic regions of amylolytic enzymes in maize branching enzyme-I. *Biochemical and Biophysical research Communications*. **181**, 87-94.
- Baba, T., Nishihara, M., Mizuno, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Kobayashi, E., Ohnishi, S., Tanaka, K-I., and Arai, Y.,** (1993). Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiology*. **103**, 565-573.
- Bailey, JM. and Whelan, WJ.** (1961) Physical properties of starch. I. Relationship between iodine stain and chain length. *The Journal of Biological Chemistry*. **236**, 969-973.
- 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

- Ball, S., Guan, HP., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P. and Preiss, J.** (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell*. **86**, 349-352.
- Ball, SG., van de Wal, MHB. and Visser, RGF.** (1998) Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Science*. **3**, 462-467.
- Ball, S. G., & Morell, M. K.,** (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annual Review of Plant Biology*. **54**, 207-233.
- Ballicora, MA., Frueauf, JB., Fu, YB., Schurmann, P. and Preiss, J.** (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*. **275**, 1315-1320.
- Balzergue, S., Dubreucq, B., Chauvin, S., Le-Clainche, I., Le Boulaire, F., de Rose, R., Samson, F., Biaudet, V., Lecharny, A., Cruaud, C., Weissenbach, J., Caboche, M., and Lepiniec L.,** (2001). Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *Biotechnology*. **30**, 496-504.
- Banks, W., Greenwood, CT. and Khan, KM.** (1971) Interaction of linear, amylose oligomers with iodine. *Carbohydrate Research*. **17**, 25-33.
- Bates, FL., French, D. and Rundle, RE.** (1943) Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation. *Journal of American Chemical Society*. **65**, 142-148.
- Baunsgaard, L., Lutken, H., Mikkelsen, R., Glaring, MA., Pham, TT., Blenow, A.** (2005) A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in Arabidopsis. *The Plant Journal*. **41**, 595-605
- Beatty, MK., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, AM. and James, MG.** (1999) Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. *Plant Physiology*. **119**, 255-266.
- Bechtold N., Ellis J. and Pelletier G.** (1993). *In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Life Sciences*. **316**, 1194-1199.

- Bechtold, N., Jaudeau, B., Jolivet, S., Maba, B., Vezon, D., Voisin, R. and Pelletier, G.** (2000) The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. **155**, 1875-1887.
- Bhattacharyya, MK., Smith, AM., Ellis, THN., Hedley, C. and Martin, C.** (1990) The wrinkled-seed character of Pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell*. **60**, 115-122.
- Blanshard, J. M. V.** (1987). Starch granule structure and function: a physicochemical approach. In: *Starch: Properties and Potential*, ed. Gaillard T., Wiley J., Michester S.: 16-54.
- Blauth, SL., Yao, Y., Klucinec, JD., Shannon, JC., Thompson, DB. and Gultinan, MJ.** (2001) Identification of *mutator* insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn. *Plant Physiology*. **125**, 1396-1405.
- Blauth, SL., Kim, KN., Klucinec, J., Shannon, JC., Thompson, D. and Gultinan, M.** (2002) Identification of *Mutator* insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (*sbe1*) in *Zea mays* L. *Plant Molecular Biology*. **48**, 287-297.
- Blennow, A., Engelsen, SB., Nielsen, TH., Baunsgaard, L. and Mikkelsen, R.** (2002) Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends in Plant Science*. **7**, 445-450.
- Block, M., Loerz, H. and Luetticke, S.** (1996) *Triticum aestivum* soluble starch synthase mRNA. Genbank Accession U48227.
- Borovsky, D., Smith, EE. and Whelan, WJ.** (1976) On the mechanism of amylose branching by potato Q-enzyme. *European Journal of Biochemistry*. **62**, 307-312.
- Bouchez, D., Camilleri C. and Caboche M.** (1993). A binary vector based on Basta resistance for *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Life Sciences*. **316**, 1188-1193.
- Boyer, CD. and Preiss, J.** (1978) Multiple forms of starch branching enzyme of maize: evidence for independent genetic control. *Biochem Biophys Res Commun*. **80**, 169-175

- Boyer, C.D., and Preiss, J.,** (1981). Evidence for independent genetic control of the multiple forms of maize endosperm branching enzymes and starch synthases. *Plant Physiology*. **67**, 1141-1145.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S.** (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. **23**, 85-112.
- Burr, B. and Nelson, OE.** (1973) The phosphorylase of developing maize seeds. *Annals of the NY Academy of Sciences*. **21**, 129-138.
- Burton, R. A., Bewley, J. D., Smith, A. M., Bhattacharyya, M. K., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilton, W. D. O., and Martin, C.** (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *The Plant Journal*. **7**, 3-15.
- Buttrose, MS.** (1960) Submicroscopic development and structure of starch granules in cereal endosperms. *Journal of Ultrastructural Research*. **4**, 231-257.
- Buttrose, MS.** (1962) The influence of environment on the shell structure of starch granules. *The Journal of Cell Biology*. **14**, 159-164.
- Cao, H., Sullivan, TD., Boyer, CD. and Shannon, JC.** (1995) Bt1, a structural gene for the major 39-44 kDa amyloplast membrane polypeptides. *Physiologia Plantarum*. **95**, 176-186.
- Caspar, T., Huber, S. C., and Somerville, C.,** (1985). Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant Physiology*. **79**, 11-17.
- Chatterjee, M., Berbezy, P., Vyas, D., Coates, S., Barsby, T.** (2005). Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in *Arabidopsis* leaves. *Plant Science*. **168**, 501-509
- Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, MG. and Roach, PJ.** (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator protein Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. **15**, 6632-6640.

- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., & Smith, A.M.** (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *The Plant Journal*. **37**, 853-863.
- Colléoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D-J., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J-M, and Ball, S.,** (1999a). Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiology*. **120**, 993-1003
- Colléoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomiany, M-C, Liénard, L., D'Hulst, C., and Ball, S.,** (1999b). Biochemical characterization of the *Chlamydomonas* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiology*. **120**, 1005-1014
- Commuri, P. D., & Keeling, P. L.,** (2001). Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant Journal*. **25**, 475-486.
- Coppin, A., Varré, JS., Liénard, L., Dauvillée, D., Guérardel, Y., Soyer-Gobillard, MO., Buléon, A., Ball, S. and Tomavo, S.** (2005) Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *Journal of Molecular Evolution*. **60**, 257-267.
- Courties, C., Perasso, R., Chrétiennot-Dinet, MJ., Gouy, M., Guillou, L. and Troussellier, M.** (1998) Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Journal of Phycology*. **34**, 844-849.
- Crevillen, P., Ballicora, MA., Merida, A., Preiss, J., Romero, JM.** (2003). The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**, 28508-28515.
- Critchley, J. H., 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*. *The Plant Journal*. **26**, 89-100.

- Dang, PL. and Boyer, CL.** (1988) Maize leaf and kernel starch synthases and starch branching enzymes. *Phytochemistry*. **27**, 1255-1259.
- Dang, PL. and Boyer, CL.** (1989) Comparison of soluble starch synthases and branching enzymes from leaves and kernels of normal and amylose-extender maize. *Biochemical Genetics*. **27**, 521-532.
- Dauvillée, D., Colléoni, C., Shaw, E., Mouille, G., D'Hulst, C., Morell, M., Samuel, MS., Bouchet, B., Gallant, DJ., Sinskey, A. and Ball, S.** (1999) Novel starch-like polysaccharides are synthesized by a soluble form of granule-bound starch synthase in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. **119**, 321-330.
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, MK., d'Hulst, C., Wattebled, F., Liénard, L., Delvallé, D., Ral, JP., Myers, AM. and Ball, SG.** (2001) Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiology*. **125**, 1723-1731.
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, ML. and Zeeman, SC.** (2005) Arabidopsis mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *The Plant Journal*. **41**, 815-830.
- Delatte, T., Umhang, M., Trevisan, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, SM and Zeeman, SC.** (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *Journal of Biological Chemistry*. Sous presse.
- 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. *Journal of Bacteriology*. **174**, 3612-3620.
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, A. and D'Hulst C.** (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Journal*. **43**, 398-412.

- Denyer, K., Sidebottom, C., Hylton, C. and Smith, AM.** (1993). Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. *The Plant Journal*. **4**, 191-198.
- Denyer, K., Barber, L., 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 and Environment*. **18**, 1019-1026.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjørnsen, T., Keeling, P., Smith, AM.** (1996a). The major form of ADPglucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extraplasmidial. *Plant Physiology*. **112**, 779-783.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., and Smith, A.** (1996b). The elongation of amylose and amylopectine chains in isolated starch granules. *The Plant Journal*. **10**, 1135-1143.
- Denyer, K., Barber, LM., Edwards, EA., Smith, AM. and Wang TL.** (1997) Two isoforms of the GBSSI class of granule-bound starch synthase are differentially expressed in the pea plant (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell and Environment*. **20**, 1566-1572.
- Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Moller, BL. and Smith, AM.** (1999a) Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochemical Journal*. **340**, 183-191.
- Denyer, K., Waite, D., Edwards, A., Martin, C., and Smith, AM.** (1999b) Interaction with amylopectin influences the ability of granule-bound starch synthase I to elongate malto-oligosaccharides. *Biochemical Journal*. **342**, 647-653.
- De Paula, RM., Wayne, WA., Terenzi, HF., Roach, PJ. and Bertolini, MC.** (2005) GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **435**, 112-124.
- Desfeux, C., Clough, SJ. and Bent, AF.** (2000) Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the Arabidopsis floral-dip method. *Plant Physiology*. **123**, 895-904.

D'Hulst, C. Chatterjee, M. Planchot V.

Demande de brevet français déposé par
Génoplante-Valor

Titre : Procédé d'amélioration des plantes

Déposée le 29 mars 2004 sous le n° 04
03242.

**Dinges, J. R., Colleoni, C., Myers, A. M.,
and James, M. G.,** (2001) Molecular
structure of three mutations at the maize
sugary1 locus and their allele-specific
phenotypic effects. *Plant Physiology*. **125**,
1406-1418.

**Dinges, JR., Colleoni, C., James, MG.
and Myers, AM.** (2003) Mutational
analysis of the pullulanase-type
debranching enzyme of maize indicates
multiple functions in starch metabolism.
The Plant Cell. **15**, 666-680

**Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L.
and Kossmann, J.** (1997) Antisense
inhibition of cytosolic phosphorylase in
potato plants (*Solanum tuberosum* L.)
affects tuber sprouting and flower
formation with only little impact on
carbohydrate metabolism. *The Plant
Journal*. **12**, 323-333.

Echt, CS and Schwartz, D. (1981)
Evidence for the inclusion of controlling
elements within the structural gene at the

waxy locus in maize. *Genetics*. **99**, 275-
284.

**Edwards, A., Fulton, DC., Hylton, CM.,
Jobling, SA., Gidley, M., Martin, C. and
Smith, AM.** (1999) A combined reduction
in activity of starch synthase II and III of
potato has novel effects on the starch of
tubers. *The Plant Journal*. **17**, 251-261.

**Edwards, A., Vincken, JP., Suurs,
LCJM., Visser, RGF., Zeeman, S., Smith
,A. and Martin, C.** (2002) Discrete forms
of amylose are synthesized by isoforms of
GBSSI in pea. *The Plant Cell*. **14**, 1767-
1785.

**Emanuelsson, O., Nielsen, H., & von
Heijne G.,** (1999). ChloroP, a neural
network-based method for predicting
chloroplast transit peptides and their
cleavage sites. *Protein Science*. **8**, 978-984.

**Fettke, J., Eckermann, N., Poeste, S.,
Pauly, M. and Steup, M.** (2004) The
glycan substrate of the cytosolic (Pho 2)
phosphorylase isozyme from *Pisum
sativum* L.: identification, linkage analysis
and subcellular localization. *The Plant
Journal*. **39**, 933-946.

- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberger, P., and Steup, M. (2005a)** Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *The Plant Journal*. **43**, 568-585.
- Fettke, J., Poeste, S., Eckermann, N., Tiessen, A., Pauly, M., Geigenberger, P., and Steup, M., (2005b).** Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho2 phosphorylase isozyme. *Plant and Cell Physiology*. **46**, 1987-2004.
- Fisher, D. K., Gao, M., Kim, K-N., Boyer, C. D., and Guiltinan, M. J. (1996a)** Allelic analysis of the maize *amylase-extender* locus suggests that independent genes encode starch-branching enzymes IIa and IIb. *Plant Physiology*. **110**, 611-619.
- Fisher, DK., Gao, M., Kim, KN., Boyer, CD. and Guiltinan, MJ. (1996b)** Two closely related cDNAs encoding starch branching enzyme from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. **30**, 97-108.
- Flipse, E., Huisman, JG., de Vries, BJ., Bergervoet, JEM., Jacobsen, E. and Visser, RGF. (1994)** Expression of a wild-type GBSS gene introduced into an amylose-free potato mutant by *Agrobacterium tumefaciens* and the inheritance of the inserts at the microscopic level. *Theoretical and Applied Genetics*. **88**, 369-375.
- Flipse, E., Suurs, L., Keetels, CJAM., Kossman, J., Jacobsen, E. and Visser, RGF. (1996)** Introduction of sense and antisense cDNA for branching enzyme in the amylose-free potato mutant leads to physico-chemical changes in the starch. *Planta*. **198**, 340-347.
- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M-L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Delrue, B., van den Koornhuysse, N., Bossu, J. P., Fournet, B., and Ball, S. G. (1993)** Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *Journal of Biological Chemistry*. **268**, 16223-16230.
- French, D. (1984)** Organisation of starch granules. In: Whistler RL., BeMiller JN., Paschall EF., editors. *Starch, Chemistry*

and Technology 2nd ed., Academic Press, Orlando, FL,: 183-247.

Freudenberg, K., Schaaf, E., Dumpert, G. and Ploetz, T. (1939) Neue ansichten fiber die starke. *Naturwissenschaften*. **27**, 850-853.

Fu, Y., Ballicora, MA., Leykam, JF. and Preiss, J. (1998). Mechanism reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. *Journal of Biological Chemistry*. **273**, 25045–25052.

Fujita, N., Jubo, A., Francisco, PB., Nakakita, M., Harada, K., Minaka, N. and Nakamura, Y. (1999) Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta*. **208**, 283-293.

Gallant, D. J., Bouchet, B., and Baldwin, P. M. (1997) Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*. **32**, 177-191.

Gallant, D., Derrien, A., Aumaitre, A., and Guilbot A., (1973) Dégradation in vitro de l'amidon par le suc pancréatique. Etude par microscopie électronique à transmission et à balayage. *Starch*, **25**: 56-64

Gao, M., Fisher, DK., Kim, KN., Shannon, JC. and Guiltinan, MJ. (1996) Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization. *Plant Molecular Biology*. **30**, 1223-1232.

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. *The Plant Cell*. **10**, 399-412.

Gerhardt, R. and Heldt, H., (1984). Measurement of subcellular metabolite levels in leaves by fractionation of freeze-stopped material in nonaqueous media. *Plant Physiology*., **75**: 542-547.

Gilbert, GA. and Marriot, JVR. (1948) Starch-iodine complexes. Part I *Transactions of the Faraday Society*. **65**, 142.

Giroux, MJ. and Hannah, LC. (1994) ADP-glucose pyrophosphorylase in shrunken-2 and brittle-2 mutants of maize. *Molecular and General Genetics*. **243**, 400-408.

- Guan, H., Li, P., Imparl-Radosevitch, J., Preiss, J. and Keeling, P.** (1997) Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **342**, 92-98.
- Guan, HP. and Keeling, PL.** (1998) Starch biosynthesis: understanding the functions and interactions of multiple isozymes of starch synthase and branching enzyme. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. **10**, 307-319.
- Guan, HP. and Preiss, J.** (1993) Differentiation of the properties of the branching isozymes from maize (*Zea mays*). *Plant Physiology*. **102**, 1269-1273.
- Guan, H-P., Baba, T. and Preiss, J.** (1994) Expression of branching enzyme I of maize endosperm in *Escherichia coli*. *Plant Physiology*. **104**, 1449-1453.
- Guan, HP., Kuriki, T., Sivak, M. and Preiss, J.** (1995) Maize branching enzyme catalyses synthesis of glycogen-like polysaccharide in *glgB*-deficient *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**, 964-967.
- Guan, H-P., Li, P., Imparl-Radosevich, J., Preiss, J., and Keeling, P.** (1997) Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **342**, 92-98.
- Ghosh, HP. and Preiss, J.** (1966) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*. **241**, 4491-4504.
- Hanes, CS.** (1937) The action of amylases in relation to the structure of starch and its metabolism in the plant. Parts I-III and IV-VII. *New Phytologist*. **36**, 101.
- Hanson, K. R., and McHale, N. A.** (1988) A starchless mutant of *Nicotiana glauca* containing a modified plastid phosphoglucomutase. *Plant Physiology*. **88**, 838-844.
- Harn, C., Knight, M., Ramakrishnan, A., Guan, H., Keeling, P. L., and Wasserman, B. P.** (1998) Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm. *Plant Molecular Biology*. **37**, 639-649.

- Harrison, C. J., Hedley, C. L. and Wang, T. L.** (1998) Evidence that the *rug3* locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *The Plant Journal*. **13**, 753-762.
- Hawker, JS., Ozbun, JL., Ozaki, H., Greenberg, E. and Preiss, J.** (1974) Interaction of spinach leaf adenosine diphosphate glucose α -1,4-glucan α -4-glucosyl transferase and α -1,4-glucan, α -1,4-glucan-6-glycosyl transferase in synthesis of branched α -glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **160**, 530-551.
- Hedley, CL., Bogradeva, TY. and Wang, TL.** (2002) A genetic approach to studying the morphology, structure and function of starch granules using pea as a model. *Starch/Starke*. **54**, 235-242.
- Helbert, W., Schulein, M. and Henrissat, B.** (1996) Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* α -amylase into corn starch granules. *International Journal of Biological Macromolecules*. **19**, 165-169.
- Henrissat, B., Coutinho, PM. and Davies, GJ.** (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. **47**, 55-72.
- Hizukuri, S.** (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research*. **147**, 342-347.
- Hizukuri, S., Takeda, Y., Abe, J., Hanashiro, I., Matsunobu, G. and Kiyota, H.** (1997) In: Frazier PJ, Richmond P, Donald AM, editors. Starch: Structure and functionality. London: Royal Society of Chemistry. **121**.
- Hovenkamp-Hermelink, J., Jacobsen, E., Ponstein, A., Visser, R., Vos-Scheperkeuter, G., Bijmolt, E., de Vries, J., Witholt, B. and Feenstra, W.** (1987) Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. **75**, 217-221.

- Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, AM., Martin, C. and Bustos, R.** (2003). Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *The Plant Cell*. **15**, 133-149.
- Hylton, C. and Smith, AM.** (1992) The *rb* mutation of peas causes structural and regulatory changes in ADP glucose pyrophosphorylase from developing embryos. *Plant Physiology*. **99**, 1626-1634.
- Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buléon, A. and Tran, V.** (1987) New three-dimensional structure for A-type starch. *Macromolecules*. **20**, 2634-2636.
- Imberty, A. and Pérez, S.** (1988) A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers*. **27**, 1205-1221.
- James, M. G., Robertson, D. S., and Myers, A. M.,** (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *The Plant Cell*. **7**, 417-429.
- Jenkins, P. J., Cameron, R. E., and Donald, A. M.,** (1993). A universal feature in the starch granules from different botanical sources. *Starch / Stärke*, **45**, 417-420.
- Jenkins PJ. And Donald AM.** (1995) The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules*. **17**, 315-321.
- Jobling SA., Schwall GP., Westcott RJ., Sidebottom CM., Debet M., Gidley MJ., Jeffcoat R. and Safford R.** (1999) A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of *SBE A*. *The Plant Journal*. **18**, 163-171.
- Kasemsuwan, T., Jane, J., Schnable, P., Stinard, P. and Robertson, D.** (1995) Characterization of the dominant mutant *Amylose-extender (Ae1-5180)* maize starch. *Cereal Chemistry*. **72**, 457-464
- Khadaroo, B., Robbins, S., Ferraz, C., Derelle, E., Eychenie, S., Cooke, R., Peaucellier, G., Delseny, M., Demaille, J., Van De Peer, Y., Picard A. and Moreau H.** (2004) The first green lineage *cdc25* dual-specificity phosphatase. *Cell Cycle*. **3**, 513-518

- Khoshnoodi, J., Larsson, C-T., Larsson, H. and Rask, L.** (1998) Differential accumulation of *Arabidopsis thaliana* *Sbe2.1* et *Sbe2.2* transcripts in response to light. *Plant Science*. **135**, 183-193.
- Klezkowski, LA., Villand, P., Luthi, E., Olsen, OA. and Preiss, J.** (1993) Insensitivity of barley endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase to 3-phosphoglycerate and orthophosphate regulation. *Plant Physiology*. **101**, 179-186.
- Knight, M. E., Harn, C., Lilley, C. E. R., Guan, H., Singletary, G. W., Mu-Forster, C., Wasserman, B. P., and Keeling, P. L.** (1998) Molecular cloning of starch synthase I from maize (W64) endosperm and expression in *Escherichia coli*. *The Plant Journal*. **14**, 613-622.
- Kossmann, J., Abel, G. J. W., Springer, F., Lloyd, J. R. and Willmitzer, L.** (1999) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta*. **208**, 503-511.
- Kotting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M. and Ritte, G.** (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiology*. **137**, 242-252.
- Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H. and Nakamura, Y.** (1999) The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiology*. **121**, 399-409.
- Kuriki, T. and Imanaka, T.** (1999) The Concept of the α -Amylase Family : Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**, 557-565.
- Lao, NT., Schoneveld, O., Mould, RM., Hibberd, JM., Gray, JC. and Kavanagh, TA.** (1999) An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase. *The Plant journal*. **20**, 519-527.
- Larsson, C-T., Hofvander, P., Khoshnoodi, J., Ek, B., Rask, L. and Larsson H.** (1996) Three isoforms of starch synthase and two isoforms of branching enzyme are present in potato tuber starch. *Plant Science*. **117**, 9-16.

- Larsson, C-T., Khoshnoodi, J., Ek, B., Rask, L. and Larsson, H.** (1998) Molecular cloning and characterization of starch-branching enzyme II from potato. *Plant Molecular Biology*. **37**, 505-511.
- Leemhuis, H.** (2003) What makes cyclodextrin glycosyltransferase a transglycosylase
Chapter 1: the α -amylase family: Transglycosylation and hydrolysis reaction specificity. *Thèse de Doctorat*. University library Groningen.
- Leloir, LF., de Fekete, MAR and Cardini, CE.** (1961) Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose. *Journal of Biological Chemistry*. **236**, 636-641.
- Lienard, L.** (2003) La dualité fonctionnelle des α -glucanes phosphorylases dans le métabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Lin, T-P., Caspar, T., Somerville, C. and Preiss, J.** (1988a) Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADPglucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiology*. **86**, 1131-1135.
- Lin TP., Caspar T., Somerville CR. and Preiss J.** (1988b) A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADPglucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiology*. **88**, 1175-1181
- Lloyd, JR., Blennow, A., Burhenne, K. and Kossmann, J.** (2004) Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiology*. **134**, 1347-1354.
- Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L. and Kossmann, J.** (1998) Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nature Biotechnology*. **16**, 473-477.
- Lu, Y. and Sharkey, T.D.** (2004) The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*. **218**, 466- 473.
- Manners, DJ.** (1997) Observations of the possible involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis. *Journal of Applied Glycoscience*. **44**, 541-546.

- Marshall, J., Sidebottom, C., Debet, M., Martin, C., Smith, A., and Edwards, A.** (1996) Identification of the major starch synthase in the soluble fraction of potato tubers. *The Plant Cell*, **8**, 1121-1135.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, GP., Schell, J., Hohn, B. and Koncz, C.** (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO Journal*. **10**, 697-704.
- Melendez, R., Melendez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J. and Cascante, M.** (1998) Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. *Biophysical Journal*. **75**, 106-114.
- Mendel, G.** (1865) Versuche über Pflanzen-Hybriden. *Verh. Naturforsch. Ver. Brünn*. **4**, 3-47.
- Mizuno, K., Kimura, K., Arai, Y., Kawasaki, T., Shimada, H., & Baba, T.,** (1992) Starch branching enzymes from immature rice seeds. *Journal of Biochemistry*. **112**, 643-651.
- Mizuno, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Satoh, H., Kobayashi, E., Okumura, S., Arai, Y., Baba, T.** (1993) Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *Journal of Biological Chemistry*. **268**, 19084-19091.
- Morell, MK., Bloom, M., Knowles, V. Preiss, J.** (1987) Subunit structure of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology*. **85**, 182-187.
- Morell, MK., Blennow, A., Kosar-Hashemi, B. and Samuel, MS.** (1997) Differential expression and properties of starch branching enzyme isoforms in developing wheat endosperm. *Plant Physiology*. **113**, 201-208.
- Morell, M. K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, M., Samuel, M. S., Chandler, P., Rahman, S., Buléon, A., Batey, I. L. and Li, Z.** (2003) Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *The Plant Journal*. **34**, 173-185.
- Morrison, WR.** (1995) Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. *Cereals Food World*. **40**, 437-446.

Mouille, G, Maddelein, ML, Libessart, N, Talaga, P, Decq, A, Delrue, B, Ball, S. (1996) Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *The Plant Cell*. **8**, 1353-1366.

Myers, A. M., Morell, M. K. James, M. G., & Ball, S. G., (2000). Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology*. **122**, 989-997.

Nakamura, T., Yamamori, M., Hirano, H., Hidaka, S. and Nagamine, T. (1995) Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular and General Genetics*. **248**, 253-259.

Nakamura, Y., Takeichi, T., Kawaguchi, K. and Yamamouchi, H. (1992) Purification of two forms of starch branching enzyme (Q-enzyme) from developing rice endosperm. *Physiologia Plantarum*. **84**, 329-335.

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. *Physiologia Plantarum*. **97**, 491-498.

Nakamura, Y. (2002) Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiology*. **43**, 718-725.

Nelson, OE. and Rines, HW. (1962) The enzymatic deficiency in the *waxy* mutant in maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **9**, 297-300.

Newman, T., deBruijn, FJ., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., Retzel, E. and Somerville, C. (1994) Genes galor: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones. *Plant physiology*. **106**, 1241-1255.

Nishi, A., Nakamura, Y., Tanaka, N. and Satoh, H. (2001) Biochemical and genetic analysis of the effects of *amylose-extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiology*. **127**, 459-472.

Niittyla, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., & Zeeman, S.C., (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, **303**: 87-89.

- Ohdan T., Francisco Jr PB., Sawada T., Hirose T., Terao T., Satoh H. and Nakamura Y.** (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *Journal of Experimental Botany*. **56**, 3229–3244.
- Pan D. and Nelson OE.** (1984) A debranching enzyme deficiency in endosperms of the *sugary-7* mutants of maize. *Plant Physiology*. **74**, 324-328.
- Patron, NJ., Smith, AM., Fahy, BF., Hylton, CM., Naldrett, M., Rossnagel, BG. and Denyer, K.** (2002) The altered pattern of amylose accumulation in the endosperm of low-amylose barley cultivars is attributable to a single mutant allele of granule-bound starch synthase I with a deletion in the 5' non-coding region. *Plant Physiology* **130**, 190-198.
- Peat, S., Whelan, W. J., and Rees, W. R.,** (1956). The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XX, The disproportionating enzyme of potato. *Journal of Chemical Society*, 44-53.
- Pilling, E. and Smith, AM.** (2003) Growth ring formation in the starch granules of potato tuber. *Plant Physiology*. **132**, 365-371.
- Pohu, A., Planchot, V., Putaux, J.L., Colonna, P. Buléon, A.** (2004) Split crystallisation during debranching of maltodextrins at high concentration by isoamylase. *Biomacromolecules* **5**, 1792-1798
- Ral, JP., Derelle, E., Ferraz, C., Wattebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buléon, A., Slomianny, MC., Delvalle, D., d'Hulst, C., Rombauts, S., Moreau, H. and Ball, S.** (2004) Starch division and partitioning a mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus taurii*. *Plant Physiology*. **136**, 3333-3340
- Recondo, E. and Leloir, LF.** (1961) Adenosine diphosphate glucose and starch synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **6**, 85-88.
- Ritte, G., Lloyd, JR., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J. and Steup, M.** (2002) The starch-related R1 protein is an alpha -glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 7166-7171
- Ritte, G., Scharf, A., Eckermann, N., Haebel, S. and Steup, M.** (2004) Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiology*. **135**, 2068-2077.

- Roach, P.J.** (2002) Glycogen and its metabolism. *Current Molecular Medicine*. **2**, 101-120.
- Robin, J.P., Mercier, C., Charbonnière, R. and Guilbot, A.** (1974). Lintnerized starches. Gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry*. **51**, 389-406.
- Robyt, J. F. and French, D.** (1970) The action pattern of porcine pancreatic α -amylase in relationship to the substrate binding site of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. **245**, 3917-3927.
- Rydberg, U., Andersson, L., Andersson, R., Aman, P. and Larsson, H.** (2001) Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. *European Journal of Biochemistry*. **268**, 6140-6145.
- Ryley, JF., Bentley, M., Manners, DJ. and Stark, JR.** (1969) Amylopectin, the storage polysaccharide of the coccidian *Eimeria brunetti* and *E. tenella*. *Journal of Parasitology*. **55**, 839-845.
- Safford, R., Jobling, S. A., Sidebottom, C. M., Westcott, R. J., Cooke, D., Tober, K. J., Strongitharm, B. H., Russell A. L. and Gidley, M. J.** (1998) Consequences of antisense RNA inhibition of starch branching enzyme activity on properties of potato starch. *Carbohydrate Polymers*. **35**, 155-168.
- Sano, Y.** (1984) Differential regulation of *waxy* gene expression in rice endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*. **68**, 467-473.
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G., Caboche, M. and Lecharny, A.** (2002) FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Research*. **30**, 94-97.
- Sargeant, JG.** (1979) The α -amylase isoenzymes of developing and germinating wheat grain. In: *The biochemistry of cereals*, pp. 339-343, New-York: Academic Press.
- Satoh, H., Nishi, A., Yamashita, K., Takemoto, Y., Tanaka, Y., Hosaka, Y., Sakurai, A., Fujita, N. and Nakamura, Y.** (2003) Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm. *Plant Physiology*. **133**, 1-11.

- Scheidig, A., Fröhlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R., & Kossmann, J.,** (2002). Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *The Plant Journal*. **30**, 581-591.
- Schwall, GP., Safford, R., Westcott, RJ., Jeffcoat, R., Tayal, A., Shi, YC., Gidley, MJ. and Jobling, SA.** (2000) Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology*. **18**, 551-554.
- Seo, B., Kim, S., Scott, MP., Singletary, GW., Wong, K., James, MG. and Myers, A.** (2002) Functional interactions between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthases of brewer's yeast. *Plant Physiology*. **128**, 42164-42170.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, JD., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M. and Goff, SA.** (2002). A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. *The Plant Cell*. **14**, 2985-2994.
- Shannon, JC, Pien, FM, Cao, H, Liu, KC** (1998). Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplasmidial synthesized ADP--glucose into amyloplasts of maize endosperms. *Plant Physiology*. **117**, 1235-1252.
- Shi, Y-C, Seib, PA** (1992) The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydrate Research*. **227**, 131-145
- Shirokane, Y., Ichikawa, K., & Suzuki, M.,** (2000). A novel enzymic determination of maltose. *Carbohydrate Research*. **329**, 699-702.
- Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N.** (1983) Molecular identification and isolation of the *waxy* locus in maize. *Cell*. **35**, 225-233.
- Sikka, VK., Choi, S., Kavakli, IH., Sakulsingharoj, C., Gupta, S., Ito, H., Okita, TW.** (2001) Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Science*. **161**, 461-468.

- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C.E., Zabeau, M. and Van de Peer, Y.** (2002) The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 13627-13632.
- Sivak, M. N. & Preiss, J.** (1998). Starch: basic science to biotechnology. In *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 41. Academic Press, San Diego, N.Y.
- Smith, AM.** (1988) Major differences in isoforms of starch-branching enzyme between developing embryos of round- and wrinkled-seeded peas (*Pisum sativum* L.). *Planta*. **175**, 270-279.
- Smith, AM.** (2001) The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*. **2**, 335-341.
- Smith, AM., Zeeman, SC. and Smith, S.** (2005) Starch degradation. *Annual Review of plant Biology*. **56**, 73-98.
- Smith, SM., Fulton, DC., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, SC. And Smith, A.** (2004) Diurnal changes in the transcriptome encoding enzyme of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*. **136**, 1-13.
- Sokolov, LN., Déjardin, A. and Kleczkowski, LA.** (1998) Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochemical Journal*. **336**, 681-687.
- Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B. and Steup, M.** (1995) A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Molecular Biology*. **27**, 567-576.
- Sprague, GF., Brimhall, B. and Hixon, RM.** (1943) Some effects of the *waxy* gene in corn on properties of the endosperm starch. *Journal of American Society of Agronomy*. **35**, 817-822.
- Stinard, PS., Robertson, DS. and Schnable, PS.** (1993) Genetic isolation, cloning, and analysis of a *Mutator*-induced, dominant antimorph of the Maize *amylose extender1* locus. *The Plant Cell*. **5**, 1555-1566.

- Sullivan, T. D., and Kaneko, Y.,** (1995). The maize *brittle1* gene encodes amyloplasts membrane polypeptides. *Planta*. **196**, 477-484.
- Sun, C., Sathish, P., Ahlandsberg, S. and Jansson, C.** (1998) The two genes encoding starch-branching enzymes IIa and IIb are differentially expressed in barley. *Plant Physiology*. **118**, 37-49.
- Takeda, Y., Hizukuri, S., Takeda, C. and Suzuki, A.** (1987) Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molecular fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydrate Research*. **165**, 139–145.
- Takeda, Y., Guan, H-P., & Preiss, J.** (1993) Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydrate Research*. **240**, 253-263.
- Tanaka, N., Fujita, N., Nishi, A., Satoh, H., Hosaka, Y., Ugaki, M., Kawasaki, S., & Nakamura, Y.** (2004). The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnology Journal*. **2**, 507-516.
- Tetlow IJ, Davies EJ, Vardy KA, Bowsher CG, Burrell MM, Emes MJ.** (2003) Subcellular localization of ADPglucose pyro-phosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of a plastidial isoform. *Journal of Experimental Botany*. **54**, 715–725.
- Tetlow, IJ., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, CG., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, MK., Emes, MJ.** (2004) Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *The Plant Cell*. **16**, 694-708.
- The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**, 796-815.
- Thorbjørnsen T, Villand P, Denyer K, Olsen OA, Smith AM.** (1996) Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *The Plant Journal*. **10**, 243–250.

- Tiessen, A., Hendricks, JH., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, EM., Geigenberger, P.** (2002) Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell*. **14**, 2191-2213.
- Tomlinson, KL., Lloyd, JR. and Smith, AM.** (1997) Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves. *The Plant Journal*. **11**, 31-43.
- Torija, MJ., Novo, M., Lemassu, A., Wilson, W., Roach, PJ., François, J. and Parrou, JL.** (2005) Glycogen synthesis in the absence of glycogenin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. **579**, 3999-4004.
- Tsai, CY.** (1974). The function of the *Waxy* locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical Genetics*. **11**, 83-95.
- Tsai, C-Y. and Nelson, O.** (1966) Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science*. **151**, 341-343.
- Tsai, C-Y., and Nelson, O.** (1969). Mutations at the shrunken-4 locus in maize that produce three altered phosphorylases. *Genetics*. **61**, 813-821.
- Ugalde, JE., Parodi, AJ. and Ugalde, RA.** (2003) De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 10659-10663.
- Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A., and Nakamura, Y.** (2002) Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. **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*. *The Journal of Biological Chemistry*. **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. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**, 22232-22240.

Villareal, CP. and Juliano, BO. (1986) Waxy gene factor and residual protein of rice starch granules. *Starch/Staerke*. **38**, 118-119.

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

Walker, G. J., and Whelan, W. J., (1957). The mechanism of carbohydrase action. 4. The mechanism of D-enzyme action. *Biochemical Journal*. **67**, 548-551.

Wang, S. M., W. L. Lue, T. S. Yu, J. H. Long, C. N. Wang, K. Eimert, and J. Chen. (1998) Characterization of ADG1, an Arabidopsis locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstrates that the presence of the small subunit is required for large subunit stability. *Plant Journal*. **13**, 63-70

Wattebled F., Buléon A., Bouchet B., Ral JP., Liénard L., Delvallé D., Binderup K., Dauvillée D., Ball S., and D'Hulst C. (2002). Granule bound starch synthase I: a major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules. *European Journal of Biochemistry*. **269**, 3810-3820.

Wattebled, F., Ral, JP., Dauvillee, D., Myers, AM., James, MG., Schlichting, R., Giersch,, C., Ball SG. and D'Hulst, C .(2003) STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* locus required for normal starch granule biogenesis, encodes disproportionating enzyme. Further evidence for a function of alpha-1,4 glucanotransferases during starch granule biosynthesis in green algae. *Plant Physiology*. **132**, 137-45.

Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., & D'Hulst, C., (2005) Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiology*. **138**, 184-195.

Weise, S.E., Weber, A.P. and Sharkey, T.D. (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*. **218**, 474-482.

- Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P. and Sharkey, T.D.** (2005) beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiology*. **137**, 756-761.
- Yamamori, M., Fujita, S., Hayakawa, K. and Matsuki, J.** (2000) Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theoretical and Applied Genetics*. **101**, 21–29
- Yamanouchi, H. and Nakamura, Y.** (1992) Organ specificity of isoforms of starch branching enzyme (Q-enzyme) in rice. *Plant and Cell Physiology*. **33**, 985–991.
- Yang, Y. and Steup, M.** (1990) Polysaccharide fraction from higher plants which strongly interacts with the cytosolic phosphorylase isoform. I. Isolation and characterization. *Plant Physiology*. **94**, 960–969.
- Yao, Y., Thompson, D. B., & Gultinan, M. J.** (2004). Maize starch-branching enzyme isoforms and amylopectin structure. In the absence of starch-branching enzyme IIb, the further absence of starch-branching enzyme Ia leads to increased branching. *Plant Physiology*. **136**, 3515-3523.
- Yu, T-S., Kofler, H., Häusler, R. E., Hille, D., Flügge, U-I., Zeeman, S. C., Smith, A.M., Kossmann, K., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W-L., Chen, J., and Weber, A.** (2001). The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *The Plant Cell*. **13**, 1907-1918.
- Yu, TS., Zeeman, SC., Thorneycroft, D., Fulton, DC., Dunstan, H., Lue, WL., Hegemann, B., Tung, SY., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, DL., Wang, SM., Smith, AM., Chen, J., Smith, SM.** (2005) Alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *Journal of biological Chemistry*. **280**, 9773-9779.
- Yu, Y., He Mu, H., Wasserman, B. P., and Carman, G. M.,** (2001). Identification of the maize amyloplasts stromal 112-kD protein as a plastidic starch phosphorylase. *Plant Physiology*, **125**, 351-359.

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. *Journal of Bacteriology*. **183**, 1069-1077.

Zeeman, SC., Umemoto, T., Lue, WL., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, AM. and Chen, J. (1998a) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *The Plant Cell*. **10**, 1699-1712.

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

Zeeman, SC., Smith, SM. and Smith, AM. (2002) The priming of amylose synthesis in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*. **128**, 1069-1076.

Zeeman, S. C., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., Haldimann, P., Bechtold, N., Smith, A. M. and Smith, S. M. (2004) Plastidial α -glucan phosphorylase is not required for starch degradation in

Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiology*. **135**, 849-858.

Zhang, X., Colleoni, C., Ratushna, V., Sirghie-Colleoni, M., James, M. G., and Myers, A. M., (2004). Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Molecular Biology*. **54**, 865-879.

Zhang, X., Myers, A. M., & James, M. G. (2005). Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiology*. **138**, 663-674.

Zobel, HF. (1988) Molecules to granules: a comprehensive review. *Starch/Stärke*. **40**, 1-7.

ANNEXES

Annexe I

Couples d'amorces utilisés pour la sélection des lignées mutantes

Lignées	Allèle sauvage		Allèle mutant	
	Couple utilisé	Taille de l'amplicon (en pb)	Couple utilisé	Taille de l'amplicon (en pb)
<i>Atbe1-1</i>	be1For2 – be1Rev1	715	be1For2 – TAG5	817
<i>Atbe1-2</i>	be1For10 – be1Rev10	929	be1For10 – LBb1	761
<i>Atbe2-1</i>	be2For3 – be2Rev2	802	be2For3 – TAG5	542
<i>Atbe2-2</i>	be2For2 – be2Rev1	715	be2For2 – TAG5	489
<i>Atbe3-1</i>	be3for3 – be3rev3	637	be3for3 – LBb1	504
<i>Atbe3-2</i>	be3Rev1 – be3For2	459	be3Rev1 – TAG6	640
<i>adg1</i>	adg1For3 – adg1Rev3	608	adg1Rev3 – TAG5	699
<i>mex1</i>	mex1For1 – mex1Rev1	1705	mex1For1 – LB1	1687

be1For2 : TAATGCGGAAAATAAATAAACCAA

be1Rev1 : GTCCGGCTAGGCAAAAACACC

be1For10 : GCTTCCTCTACACCGACATCATAAC

be1Rev10 : TTTCCAACGCAGAGCAATAACTT

be2For2 : CTGGAGACTTTGGTATTGGTTGTG

be2For3 : ATTTTCCCAGAGGCGAGCAG

be2Rev1 : ATCGGTTTATTTTCGGTTGTTTATC

be2Rev2 : CCACGGCGGTTCTACACG

be3For2 : TTGGATATTCTACTGATGTTGACG

be3Rev1 : ATTTTCTCCCCACCTCCTGTT

be3For3 : CTGACTTGTTTGCTTGTTGAGGATAG

be3Rev3 : GTGCACAATATCCATCAGAACAACC

adg1For3 : TTCCGAAAACACCCCCATTAC

adg1Rev3 : GATTATCCCCAAAACACTCTGC

mex1For1 : GACTCTCCGTTCTTCCTCAA

mex1Rev1 : GACCGTTCAATATCAAAAAGTTA

TAG5 : CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC

TAG6 : CACTCAGTCTTTCATCTACGGCA

LBb1 : TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG

LB1 : GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCT

Annexe II

Couples d'amorces utilisés pour les réactions de RT-PCR

Gène	Allèle mutant	Position du couple d'amorces*	Séquences des amorces (de 5' à 3')	Taille de l'amplicon (en pb)
<i>AtBE1</i> (At3g20440)	<i>Atbe1-1</i>		BE1up1: CCAAGCCAAAAGTTCCAGAGTCCT TAG5: CTACAAATTGCCTTTTCTT	1601
<i>AtBE1</i> (At3g20440)	<i>Atbe1-2</i>		BE1lo2: CCTCTGTGAAGGCGTGATTG Lba1: GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	954
<i>AtBE2</i> (At5g03650)	<i>Atbe2-1</i>	En amont	347upper1: CACGAGTTAGGCCTGGTAGTTCTGA 347lower1: TGCTCGCCTCTGGGAAAATCAAT	836
		Chevauchement	347upper1: CACGAGTTAGGCCTGGTAGTTCTGA 347lower3: CACGGCGTTTCTACACGGTGCATAG	1281
		En aval	347upper3: TGACTTCGGAGCACCAATTCATATCAC 347lower3: CACGGCGTTTCTACACGGTGCATAG	290
<i>AtBE2</i> (At5g03650)	<i>Atbe2-2</i>	En amont	97upper1: CACGAGTTAGGCCTGGTAGTTCTGA 97lower1: TGCTCGCCTCTGGGAAAATCAAT	836
		Chevauchement	97upper1: CACGAGTTAGGCCTGGTAGTTCTGA 97lower2: CCATTACCAGATTCTTTACATTTTCG	1456
		En aval	97upper2: TATGCACCGTGTAGAACCGCCG 97lower2: CCATTACCAGATTCTTTACATTTTCG	199
<i>AtBE3</i> (At2g36390)	<i>Atbe3-1</i>	En amont	BE3upSA1: TGAAGAAGCCAGGAAACAGAGACACT BE3loSA1: GAGCCATAACATCAGATTTTCGATTCC	407
		Chevauchement	BE3upSA1: TGAAGAAGCCAGGAAACAGAGACACT BE3loSA2: CTTGCGGGATATGTACTGGTGCTCTGA	1915
		En aval	BE3upSA2: AGACGAGGACTGGCAGGTTGGTGAT BE3loSA2: CTTGCGGGATATGTACTGGTGCTCTGA	502
<i>AtBE3</i> (At2g36390)	<i>Atbe3-2</i>	En amont	456upper1: CAAATTTTTTCGCACCTAGCAGC 456lower1: ACACCACCGTCTTCGACAGGAAC	526
		Chevauchement	456upper1: CAAATTTTTTCGCACCTAGCAGC 456lower3: GCAAGTTACCTCTCTCGAATACAATG	1134
		En aval	456upper3: TGGCAGGTTGGTGATATAACTTTC 456lower3: CAAGTTACCTCTCTCGAATACAATG	535

* La position du couple d'amorces est indiquée selon le site d'insertion de l'ADN-T dans le gène excepté pour *Atbe1-1* et *Atbe1-2* pour lesquels les amplifications RT-PCR ont été réalisées à l'aide d'une amorce s'hybridant spécifiquement avec l'ADN-T et d'une amorce spécifique de la séquence de l'ARNm.

Annexe III

Couples d'amorces utilisés pour les amplifications RT-PCR des cadres ouverts de lecture des gènes AtBE2 et AtBE3

BE2upper :

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGTGGTGATTACGGAGTGT

BE2lower :

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAATCGTGGTTTGCTAAAGCATA

BE3upper :

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGTTTACACGATTTACAGGCGTAC

BE3lower :

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAACATCTTCGGGTAACAGGCCT

Les séquences en gras sur fond gris indiquées sur les amorces correspondent aux sites de recombinaison qui permettent le clonage dans le vecteur pDONR201. On trouve respectivement les sites nommés AttB1 et AttB2 sur les amorces appelées upper et lower. Le reste de la séquence de chaque amorce est spécifique du gène d'intérêt.

Annexe IV

Gènes sous-exprimés dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* en fin de journée

Identifiant AGI (locus)	Fonction présumée du produit du gène	Description de la fonction	Description du procédé biologique	I _{Atbe2-1/Atbe3-2}	I _{WS}	Ratio moyen
AT4G32940	vacuolar processing enzyme gamma / gamma-VPE	cysteine-type endopeptidase activity	proteolysis and peptidolysis	11,36	14,38	-3,02
AT5G09220	amino acid permease 2 (AAP2)	amino acid permease activity	neutral amino acid transport	10,78	13,74	-2,96
AT4G39800	inositol-3-phosphate synthase isozyme 1 / myo-inositol-1-phosphate synthase 1 / MI-1-P synthase 1 / IPS 1	inositol-3-phosphate synthase activity	phospholipid biosynthesis	10,67	13,27	-2,60
AT4G15530	pyruvate phosphate dikinase family protein	kinase activity	phosphorylation	8,61	11,18	-2,57
AT1G34060	alliinase family protein	carbon-sulfur lyase activity	histidine biosynthesis	7,60	10,10	-2,50
AT5G45380	sodium:solute symporter family protein	solute:sodium symporter activity	transport	9,07	11,41	-2,35
AT4G15530	pyruvate phosphate dikinase family protein	kinase activity	phosphorylation	8,97	11,31	-2,34
AT4G11910	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	7,28	9,60	-2,32
AT2G41240	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	transcription factor activity	regulation of transcription	7,63	9,86	-2,23
AT5G45350	proline-rich family protein	rhodopsin-like receptor activity	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	11,30	13,51	-2,21
AT1G54575	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	7,32	9,45	-2,13
AT1G73040	jacalin lectin family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	6,71	8,81	-2,10
AT1G17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 3-PGDH	phosphoglycerate dehydrogenase activity	L-serine biosynthesis	9,99	12,08	-2,10
AT4G33040	glutaredoxin family protein	thiol-disulfide exchange intermediate activity	electron transport	7,62	9,68	-2,06
AT1G32900	starch synthase, putative	transferase activity, transferring glycosyl groups	biosynthesis	8,43	10,46	-2,03
AT2G17710	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	7,52	9,52	-2,00
AT2G18230	inorganic pyrophosphatase (soluble) (PPA) / pyrophosphate phospho-hydrolase / PPase	pyrophosphatase activity	metabolism	10,70	12,67	-1,97
AT2G15830	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,85	10,80	-1,95
AT1G14880	expressed protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	12,03	13,98	-1,94
AT1G69490	no apical meristem (NAM) family protein	transcription factor activity	flower development	7,88	9,79	-1,91
AT1G23130	Bet v I allergen family protein	molecular_function unknown	No classification	11,98	13,88	-1,90
AT4G22490	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid binding	lipid transport	7,01	8,89	-1,87
AT3G21080	ABC transporter-related	molecular_function unknown	No classification	8,97	10,83	-1,85
AT3G57680	peptidase S41 family protein	protein binding	intracellular signaling cascade	7,22	9,07	-1,85
AT1G62420	expressed protein	endopeptidase inhibitor activity	biological_process unknown	7,58	9,42	-1,84
AT1G75380	wound-responsive protein-related	DNA binding	nucleotide-excision repair	10,92	12,75	-1,83
AT2G33380	calcium-binding RD20 protein (RD20)	calcium ion binding	response to dessication	7,96	9,75	-1,79
AT4G01450	nodulin MtN21 family protein	molecular_function unknown	electron transport	7,50	9,28	-1,78
AT3G22840	chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)	chlorophyll binding	photosynthesis light harvesting	8,40	10,18	-1,78
AT4G08300	nodulin MtN21 family protein	molecular_function unknown	cell growth and/or maintenance	6,65	8,39	-1,74
AT3G15353	metallothionein protein, putative	copper ion binding	copper ion homeostasis	13,09	14,82	-1,74

AT1G52720	expressed protein peroxidase 42 (PER42) (P42)	molecular_function unknown	No classification	10,08	11,82	-1,74
AT4G21960	(PRXR1)	peroxidase activity	No classification	12,00	13,72	-1,73
AT4G15210	beta-amylase (BMY1) / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase	beta-amylase activity	starch catabolism	8,03	9,75	-1,72
AT5G49630	amino acid permease 6 (AAP6)	acidic amino acid transporter activity	L-tryptophan transport	7,97	9,69	-1,72
AT5G42980	thioredoxin H-type 3 (TRX-H-3) (GIF1)	oxidoreductase activity, acting on sulfur group of donors, disulfide as acceptor	response to hydrogen peroxide	12,44	14,15	-1,70
AT1G56010	transcription activator NAC1 (NAC1)	transcription factor activity	auxin mediated signaling	8,28	9,98	-1,70
AT5G02560	histone H2A, putative	DNA binding	chromosome organization and biogenesis (sensu Eukarya)	8,48	10,18	-1,70
AT3G45860	—	—	—	9,15	10,83	-1,68
AT1G67360	rubber elongation factor (REF) family protein	molecular_function unknown	No classification	11,09	12,77	-1,68
AT5G47650	MutT/nudix family protein	hydrolase activity	DNA repair	10,49	12,15	-1,67
AT2G32870	mepirin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	8,43	10,09	-1,67
AT4G14020	rapid alkalinization factor (RALF) family protein	molecular_function unknown	No classification	7,13	8,79	-1,67
AT1G32450	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transporter activity	oligopeptide transport	7,78	9,43	-1,65
AT2G14247	Expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,14	9,79	-1,65
AT5G64090	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,27	9,90	-1,63
AT4G11130	RNA-dependent RNA polymerase, putative	RNA-directed RNA polymerase activity	posttranscriptional gene silencing	8,64	10,27	-1,63
AT2G22430	homeobox-leucine zipper protein 6 (HB-6) / HD-ZIP transcription factor 6	DNA binding	negative regulation of abscisic acid mediated signaling	10,02	11,63	-1,61
AT5G43850	acireductone dioxygenase (ARD/ARDprim) family protein	metal ion binding	No classification	10,67	12,26	-1,59
AT2G25625	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,54	12,12	-1,58
AT5G43060	cysteine proteinase, putative / thiol protease, putative	cysteine-type peptidase activity	proteolysis and peptidolysis	12,13	13,70	-1,58
AT1G55760	BTB/POZ domain-containing protein	protein binding	No classification	7,04	8,61	-1,57
AT5G47370	homeobox-leucine zipper protein 2 (HAT2) / HD-ZIP protein 2	transcriptional repressor activity	cell elongation	8,81	10,39	-1,57
AT2G41220	glutamate synthase, chloroplast (GLU2) / ferredoxin-dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT 2)	glutamate synthase (ferredoxin) activity	glutamate biosynthesis	9,79	11,35	-1,57
AT2G42750	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	chaperone activity	protein folding	8,87	10,43	-1,56
AT2G47880	glutaredoxin family protein	thiol-disulfide exchange intermediate activity	electron transport	9,04	10,58	-1,54
AT3G17810	dihydroorotate dehydrogenase family protein / dihydroorotate oxidase family protein	oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	de novo pyrimidine base biosynthesis	8,94	10,47	-1,53
AT5G48370	thioesterase family protein	hydrolase activity, acting on ester bonds	No classification	7,94	9,47	-1,53
AT1G67870	glycine-rich protein	alcohol dehydrogenase activity, zinc-dependent	No classification	10,28	11,81	-1,53
AT3G23920	beta-amylase, putative / 1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase, putative	beta-amylase activity	Starch catabolism	11,03	12,56	-1,53
AT4G27290	S-locus protein kinase, putative	protein kinase activity	protein amino acid phosphorylation	8,65	10,17	-1,52
AT1G69510	expressed protein	DNA binding	chromosome organization and biogenesis (sensu Eukarya)	10,93	12,44	-1,50

Annexe V

Gènes sur-exprimés dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* en fin de journée

Identifiant AGI (locus)	Fonction présumée du produit du gène	Description de la fonction	Description du procédé biologique	I _{Atbe2-1/Atbe3-2}	I _{WS}	Ratio moyen
AT4G25630	fibrillarin 2 (FIB2)	snoRNA binding	rRNA processing	10,65	7,56	3,09
AT3G57520	alkaline alpha galactosidase, putative	hydrolase activity), hydrolyzing O-glycosyl compounds	No classification	10,40	7,35	3,06
AT5G18840	sugar transporter, putative guanine nucleotide-binding family protein / activated protein kinase C receptor	carbohydrate transporter activity	transport	10,24	7,24	2,99
AT3G18130	(RACK1)	nucleotide binding	No classification	11,94	9,05	2,89
AT4G12600	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	RNA binding	protein biosynthesis	11,97	9,14	2,83
AT5G65010	asparagine synthetase 2 (ASN2)	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) activity	asparagine biosynthesis	11,85	9,11	2,73
AT1G52930	brix domain-containing protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	10,78	8,15	2,64
AT1G61580	60S ribosomal protein L3 (RPL3B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,47	7,94	2,52
AT3G62460	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,01	6,55	2,46
AT2G44120	60S ribosomal protein L7 (RPL7C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,63	10,17	2,46
AT3G44750	histone deacetylase, putative (HD2A)	zinc ion binding	No classification	9,78	7,34	2,44
AT3G48360	speckle-type POZ protein-related	protein binding	No classification	10,66	8,28	2,38
AT3G16080	60S ribosomal protein L37 (RPL37C)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,34	9,97	2,37
AT2G20450	60S ribosomal protein L14 (RPL14A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis regulation of transcription, DNA-dependent	11,87	9,50	2,36
AT3G12720	myb family transcription factor dyskerin, putative / nucleolar protein NAP57, putative	transcription factor activity	RNA processing	10,62	8,26	2,36
AT3G57150	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative / cyclophilin, putative /	pseudouridine synthase activity	RNA processing	10,60	8,24	2,36
AT3G56070	rotamase, putative	cyclosporin A binding	signal transduction	10,46	8,12	2,33
AT2G41840	40S ribosomal protein S2 (RPS2C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,37	11,07	2,30
AT2G36620	60S ribosomal protein L24 (RPL24A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,91	10,62	2,29
AT2G04030	heat shock protein, putative	ATP binding	protein folding	11,68	9,43	2,25
AT5G22440	60S ribosomal protein L10A (RPL10aC)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,74	9,50	2,24
AT3G55280	60S ribosomal protein L23A (RPL23aB)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	11,77	9,54	2,24
AT1G77760	nitrate reductase 1 (NR1)	nitrate reductase activity	nitrate assimilation	10,28	8,05	2,23
AT3G19030	expressed protein	molecular_function unknown	homoserine biosynthesis	12,44	10,22	2,23
AT3G23940	dehydratase family	catalytic activity	branched chain biosynthesis	10,57	8,37	2,20
AT3G48930	40S ribosomal protein S11 (RPS11A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,07	9,88	2,19
AT5G08610	DEAD box RNA helicase (RH26)	ATP dependent helicase activity	DNA metabolism	10,39	8,20	2,19
AT5G13490	ADP, ATP carrier protein 2, mitochondrial / ADP/ATP translocase 2 / adenine nucleotide translocator 2 (ANT2)	ATP:ADP antiporter activity	ATP/ADP exchange	9,81	7,63	2,18

AT1G56110	nucleolar protein Nop56, putative	DNA binding	biological_process unknown	12,47	10,29	2,18
AT5G60670	60S ribosomal protein L12 (RPL12C)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,62	10,45	2,17
AT5G27850	60S ribosomal protein L18 (RPL18C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,09	10,94	2,15
AT3G14600	60S ribosomal protein L18A (RPL18aC)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	10,68	8,53	2,15
AT1G48570	zinc finger (Ran-binding) family protein	binding	regulation of transcription, DNA-dependent	9,70	7,56	2,14
AT5G59850	40S ribosomal protein S15A (RPS15aF)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis negative regulation of	13,41	11,29	2,13
AT4G05420	UV-damaged DNA-binding protein, putative	DNA binding	photomorphogenesis	11,61	9,49	2,12
AT5G16130	40S ribosomal protein S7 (RPS7C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,53	10,42	2,11
AT3G60245	60S ribosomal protein L37a (RPL37aC)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	14,05	11,94	2,11
AT3G05560	60S ribosomal protein L22-2 (RPL22B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,31	11,21	2,10
AT3G54090	pfkB-type carbohydrate kinase family protein	kinase activity	acetate fermentation	11,19	9,09	2,10
AT1G27400	60S ribosomal protein L17 (RPL17A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,70	9,60	2,09
AT3G04840	40S ribosomal protein S3A (RPS3aA)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,69	11,61	2,08
AT1G22780	40S ribosomal protein S18 (RPS18A)	structural constituent of ribosome	translational initiation	12,44	10,36	2,08
AT3G05590	60S ribosomal protein L18 (RPL18B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	14,67	12,59	2,07
AT5G23740	40S ribosomal protein S11 (RPS11C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,17	11,10	2,07
AT2G47610	60S ribosomal protein L7A (RPL7aA)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,33	10,26	2,07
AT4G34740	amidophosphoribosyltransferase / glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase / phosphoribosyldiphosphate 5-amidotransferase	amidophosphoribosyltransferase activity	purine base biosynthesis	10,94	8,88	2,06
AT5G61170	40S ribosomal protein S19 (RPS19C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,00	8,94	2,06
AT2G37600	60S ribosomal protein L36 (RPL36A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,72	9,66	2,06
AT3G13470	chaperonin, putative	chaperone activity	No classification	11,35	9,30	2,06
AT5G07090	40S ribosomal protein S4 (RPS4B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,95	10,89	2,05
AT4G25730	FtsJ-like methyltransferase family protein	methyltransferase activity	nucleosome assembly	10,92	8,86	2,05
AT1G49500	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,42	8,37	2,05
AT3G57490	40S ribosomal protein S2 (RPS2D)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,19	8,14	2,05
AT3G11510	40S ribosomal protein S14 (RPS14B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,09	10,04	2,05
AT1G43170	60S ribosomal protein L3 (RPL3A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	14,27	12,23	2,04
AT1G52300	60S ribosomal protein L37 (RPL37B)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	13,40	11,36	2,04
AT5G23900	60S ribosomal protein L13 (RPL13D)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,67	10,64	2,03
AT1G18080	WD-40 repeat family protein / auxin-dependent protein (ARCA) / guanine nucleotide-binding protein beta subunit, putative	nucleotide binding	No classification	13,09	11,06	2,02
AT5G06550	transcription factor jumonji (jmjC) domain-containing protein	No classification	cell surface receptor linked signal transduction	9,59	7,56	2,02
AT4G17390	60S ribosomal protein L15 (RPL15B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,69	8,67	2,02

AT3G23830	glycine-rich RNA-binding protein, putative	RNA binding	No classification	10,18	8,17	2,01
AT3G09630	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,85	10,84	2,01
AT3G17170	ribosomal protein S6 family protein (RFC3)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	10,76	8,77	1,99
AT2G42220	rhodanese-like domain-containing protein	ATP binding	No classification	11,58	9,60	1,98
AT1G58380	40S ribosomal protein S2 (RPS2A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,98	9,01	1,97
AT2G24730	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4C), pseudogene	No classification	No classification	10,64	8,67	1,97
AT1G24290	AAA-type ATPase family protein	ATP binding	defense response	10,53	8,57	1,96
AT5G08180	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	RNA binding	protein biosynthesis	11,09	9,13	1,96
AT2G01250	60S ribosomal protein L7 (RPL7B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,95	11,00	1,94
AT5G02870	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4D)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	14,69	12,77	1,92
AT5G20290	40S ribosomal protein S8 (RPS8A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	15,30	13,38	1,92
AT5G08620	DEAD box RNA helicase (RH25)	ATP dependent helicase activity	DNA metabolism	10,67	8,75	1,92
AT3G58610	ketol-acid reductoisomerase	ketol-acid reductoisomerase activity	branched chain family amino acid biosynthesis	11,56	9,65	1,91
AT3G62870	60S ribosomal protein L7A (RPL7aB)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,88	11,97	1,91
AT1G04270	40S ribosomal protein S15 (RPS15A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,18	11,27	1,90
AT1G26910	60S ribosomal protein L10 (RPL10B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,71	8,82	1,90
AT3G30775	proline oxidase, mitochondrial / osmotic stress-responsive proline dehydrogenase (POX) (PRO1) (ERD5)	proline dehydrogenase activity	proline catabolism	9,73	7,83	1,89
AT3G52170	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,06	7,17	1,89
AT1G66580	60S ribosomal protein L10 (RPL10C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,03	10,14	1,89
AT2G36160	40S ribosomal protein S14 (RPS14A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,26	10,37	1,89
AT2G27530	60S ribosomal protein L10A (RPL10aB)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,74	9,86	1,89
ATCG00830	ribosomal protein L2	No classification	No classification	14,49	12,62	1,87
AT1G01100	60S acidic ribosomal protein P1 (RPP1A)	structural constituent of ribosome	translational elongation	13,60	11,73	1,87
AT5G02450	60S ribosomal protein L36 (RPL36C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,04	11,18	1,86
AT4G05460	F-box family protein (FBL20)	ubiquitin-protein ligase activity	ubiquitin-dependent protein catabolism	12,03	10,17	1,86
AT3G44590	60S acidic ribosomal protein P2 (RPP2D)	structural constituent of ribosome	translational elongation	10,45	8,58	1,86
AT2G15620	ferredoxin--nitrite reductase, putative	nitrite reductase (NO-forming) activity	electron transport	13,38	11,52	1,86
AT3G49040	F-box family protein	molecular_function unknown	No classification	10,10	8,24	1,86
AT3G02080	40S ribosomal protein S19 (RPS19A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,91	11,06	1,85
AT4G36130	60S ribosomal protein L8 (RPL8C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,08	8,24	1,85
AT1G26880	60S ribosomal protein L34 (RPL34A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	13,14	11,30	1,85
AT4G30800	40S ribosomal protein S11 (RPS11B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	9,02	7,18	1,84
AT5G52650	40S ribosomal protein S10 (RPS10C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,34	9,50	1,83
AT5G10360	40S ribosomal protein S6 (RPS6B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,38	11,55	1,83
AT2G02750	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	10,48	8,65	1,83
AT1E59250	eugene prediction	molecular_function unknown	No classification	9,11	7,29	1,82

AT1G31660	bystin family	molecular_function unknown	No classification	9,75	7,94	1,81
AT3G09500	60S ribosomal protein L35 (RPL35A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,71	10,90	1,81
AT3G56340	40S ribosomal protein S26 (RPS26C)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	11,47	9,66	1,81
AT3G21300	RNA methyltransferase family protein	RNA methyltransferase activity	RNA processing	8,95	7,14	1,81
AT1G09690	60S ribosomal protein L21 (RPL21C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,56	11,76	1,80
AT1G29250	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	11,56	9,76	1,80
AT2G32060	40S ribosomal protein S12 (RPS12C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,89	10,09	1,79
AT5G40770	prohibitin	molecular_function unknown	biological_process unknown	11,44	9,66	1,79
ATCG00830	ribosomal protein L2	No classification	No classification	15,13	13,34	1,78
AT3G03920	Gar1 RNA-binding region family protein	RNA binding	immune response	11,73	9,95	1,78
AT1G02830	60S ribosomal protein L22 (RPL22A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,23	8,45	1,78
AT1G70600	60S ribosomal protein L27A (RPL27aC)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,70	9,92	1,78
AT1G15930	40S ribosomal protein S12 (RPS12A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,38	11,61	1,78
AT3G13230	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,88	8,11	1,77
AT5G20720	20 kDa chaperonin, chloroplast (CPN21) (CHCPN10) (CPN20)	calmodulin binding	biological_process unknown	12,68	10,91	1,77
AT4G37910	heat shock protein 70, mitochondrial, putative / HSP70, mitochondrial, putative	heat shock protein activity	protein folding	12,66	10,89	1,77
AT4G13170	60S ribosomal protein L13A (RPL13aC)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,89	9,12	1,77
AT3G14900	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,26	7,50	1,76
AT1G15380	lactoylglutathione lyase family protein / glyoxalase I family protein	lactoylglutathione lyase activity	carbohydrate metabolism	8,84	7,08	1,76
AT5G56710	60S ribosomal protein L31 (RPL31C)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,86	11,10	1,75
AT2G21580	40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,54	11,79	1,75
AT1G14320	60S ribosomal protein L10 (RPL10A) / Wilms tumor suppressor protein-related	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	14,12	12,37	1,75
AT2G31810	acetolactate synthase small subunit, putative	acetolactate synthase activity	branched chain family amino acid biosynthesis	9,63	7,89	1,74
AT3G23990	chaperonin (CPN60) (HSP60)	chaperone activity	No classification	11,00	9,26	1,74
AT5G58420	40S ribosomal protein S4 (RPS4D)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,39	8,65	1,74
AT2G32220	60S ribosomal protein L27 (RPL27A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	9,20	7,46	1,74
AT5G45775	60S ribosomal protein L11 (RPL11D)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,31	8,58	1,74
AT3G08740	elongation factor P (EF-P) family protein	translation elongation factor activity	translational elongation	13,09	11,35	1,74
AT3G60770	40S ribosomal protein S13 (RPS13A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,76	11,03	1,73
AT3G51190	60S ribosomal protein L8 (RPL8B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,71	8,98	1,73
AT2G44040	dihydrodipicolinate reductase family protein	dihydrodipicolinate reductase activity	lysine biosynthesis via diaminopimelate	9,90	8,18	1,73
AT2G17360	40S ribosomal protein S4 (RPS4A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,31	11,59	1,72
AT5G03850	40S ribosomal protein S28 (RPS28B)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,27	10,55	1,72
AT1G10522	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,84	9,12	1,72
AT2G39460	60S ribosomal protein L23A (RPL23aA)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,69	8,98	1,71
AT1G23280	MAK16 protein-related	molecular_function unknown	No classification	9,75	8,04	1,71

AT5G47930	40S ribosomal protein S27 (RPS27D)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	11,51	9,81	1,70
AT1G77940	60S ribosomal protein L30 (RPL30B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,50	9,80	1,70
AT1G72370	40S ribosomal protein SA (RPSaA)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,64	10,95	1,69
AT3G09200	60S acidic ribosomal protein P0 (RPP0B)	structural constituent of ribosome	translational elongation	13,98	12,30	1,69
AT3G53870	40S ribosomal protein S3 (RPS3B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,95	11,27	1,68
AT3G12145	polygalacturonase inhibitor, putative / leucine-rich repeat protein (FLR1)	enzyme inhibitor activity	No classification	9,74	8,06	1,68
AT2G34480	60S ribosomal protein L18A (RPL18aB)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	14,34	12,66	1,68
AT4G26370	antitermination NusB domain-containing protein	RNA binding	regulation of transcription, DNA-dependent	10,04	8,37	1,67
AT4G29905	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,73	9,06	1,67
AT1G23205	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	pectinesterase inhibitor activity	No classification	10,79	9,12	1,67
AT3G23390	60S ribosomal protein L36a/L44 (RPL36aA)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,66	11,00	1,66
AT5G20630	germin-like protein (GER3)	nutrient reservoir activity	biological_process unknown	13,27	11,61	1,65
AT4G00620	tetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase, putative	catalytic activity	folic acid and derivative biosynthesis	9,35	7,70	1,65
AT2G33430	plastid developmental protein DAG, putative	molecular_function unknown	No classification	11,04	9,39	1,65
AT3G07770	heat shock protein-related	ATP binding	protein folding	10,68	9,04	1,65
AT4G25740	40S ribosomal protein S10 (RPS10A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,41	9,76	1,65
AT5G22650	expressed protein	histone deacetylase activity	negative regulation of transcription	11,85	10,20	1,65
AT4G29410	60S ribosomal protein L28 (RPL28C)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	11,90	10,26	1,64
AT5G08180	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	RNA binding	protein biosynthesis	9,47	7,83	1,64
ATCG01040	cytochrome c biogenesis protein	No classification	No classification	11,90	10,26	1,64
AT1G07930	elongation factor 1-alpha / EF-1-alpha	calmodulin binding	selenocysteine incorporation	13,03	11,40	1,63
AT1G74560	nucleosome assembly protein (NAP) family protein	DNA binding	nucleosome assembly	10,91	9,29	1,62
AT5G63310	nucleotide diphosphate kinase II, chloroplast (NDPK2)	nucleoside-diphosphate kinase activity	response to hydrogen peroxide	10,44	8,82	1,62
AT3G13580	60S ribosomal protein L7 (RPL7D)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,07	9,45	1,62
AT2G18900	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	nucleotide binding	No classification	9,80	8,18	1,62
AT5G14580	polyribonucleotide nucleotidyltransferase, putative	RNA binding	nitrogen metabolism	9,15	7,53	1,62
AT3G58660	60S ribosomal protein-related	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,34	8,72	1,61
AT3G18600	DEAD/DEAH box helicase, putative	ATP dependent helicase activity	DNA metabolism	9,61	8,00	1,61
AT4G25340	immunophilin-related / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-related	FK56 binding	protein folding	9,96	8,34	1,61
AT1G55490	RuBisCO subunit binding-protein beta subunit, chloroplast / 60 kDa	chaperone activity	systemic acquired resistance	11,79	10,18	1,61
AT5G23310	chaperonin beta subunit / CPN-60 beta	iron superoxide dismutase activity	removal of superoxide radicals	11,25	9,65	1,60
AT1G07070	superoxide dismutase (Fe) / iron superoxide dismutase 3 (FSD3)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	9,91	8,32	1,60
AT3G53740	60S ribosomal protein L35a (RPL35aA)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,52	10,92	1,60
AT3G53740	60S ribosomal protein L36	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,52	10,92	1,60

	(RPL36B)					
AT1G67430	60S ribosomal protein L17 (RPL17B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,20	10,60	1,60
AT5G22660	F-box family protein	electron transporter activity	electron transport	10,55	8,95	1,59
AT2G43460	60S ribosomal protein L38 (RPL38A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	10,89	9,29	1,59
AT4G18730	60S ribosomal protein L11 (RPL11C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,55	8,95	1,59
AT5G20160	ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/Gadd45 family protein	RNA binding	protein biosynthesis biological_process unknown	12,24	10,64	1,59
AT3G07430	YGGT family protein	molecular_function unknown	unknown	9,88	8,29	1,59
AT4G39200	40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,58	11,99	1,59
AT5G02960	40S ribosomal protein S23 (RPS23B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,22	11,64	1,59
ATCG00830	ribosomal protein L2	No classification	No classification	15,28	13,70	1,58
AT1G25260	acidic ribosomal protein P0-related	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,38	8,80	1,58
AT3G33002	pseudogene, ribosomal protein S2p family	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,62	10,04	1,58
AT2G33370	60S ribosomal protein L23 (RPL23B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,56	9,98	1,58
AT1G60640	expressed protein	molecular_function unknown	cell adhesion	9,58	8,00	1,58
AT4G34670	40S ribosomal protein S3A (RPS3aB)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis inflammatory response	12,11	10,53	1,58
AT2G33210	chaperonin, putative	chaperone activity	lysine biosynthesis via diaminopimelate	9,94	8,37	1,58
AT3G59890	dihydrodipicolinate reductase family protein	dihydrodipicolinate reductase activity		8,86	7,28	1,57
AT1G79470	inosine-5prim-monophosphate dehydrogenase	IMP dehydrogenase activity	GMP biosynthesis	10,44	8,87	1,57
AT1G16350	inosine-5prim-monophosphate dehydrogenase, putative	IMP dehydrogenase activity	GMP biosynthesis	10,43	8,86	1,57
AT3G46040	40S ribosomal protein S15A (RPS15aD)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,94	9,37	1,57
AT4G25890	60S acidic ribosomal protein P3 (RPP3A)	structural constituent of ribosome	translational elongation	12,05	10,48	1,57
AT1G48830	40S ribosomal protein S7 (RPS7A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	12,21	10,65	1,56
AT5G02610	60S ribosomal protein L35 (RPL35D)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis biological_process unknown	10,70	9,14	1,56
AT2G20530	prohibitin, putative	molecular_function unknown	unknown	10,60	9,05	1,56
AT3G62530	PBS lyase HEAT-like repeat-containing protein	lyase activity	No classification	11,84	10,28	1,56
AT1G18800	nucleosome assembly protein (NAP) family protein	DNA binding	nucleosome assembly	10,06	8,50	1,56
AT3G54400	aspartyl protease family protein	pepsin A activity	proteolysis and peptidolysis	8,81	7,26	1,55
AT5G52470	fibrillarlin 1 (FBR1) (FIB1) (SKIP7)	snoRNA binding	rRNA processing	10,47	8,92	1,55
AT5G27770	60S ribosomal protein L22 (RPL22C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,06	11,52	1,55
AT4G26670	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein	protein translocase activity	protein transport	12,26	10,71	1,55
AT3G51800	metallopeptidase M24 family protein	metalloexopeptidase activity	proteolysis and peptidolysis	10,84	9,30	1,54
AT2G42740	60S ribosomal protein L11 (RPL11A)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,14	8,61	1,54
AT1G32920	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,99	9,45	1,54
AT2G43460	60S ribosomal protein L38 (RPL38A)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	11,63	10,10	1,54
AT5G28060	40S ribosomal protein S24 (RPS24B)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	12,52	10,99	1,53
AT4G08950	phosphate-responsive protein, putative (EXO)	molecular_function unknown	No classification	9,48	7,94	1,53

AT3G13520	arabinogalactan-protein (AGP12)	molecular_function unknown	No classification	11,56	10,03	1,53
AT3G18740	60S ribosomal protein L30 (RPL30C)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	13,19	11,66	1,53
AT3G61100	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,43	6,90	1,53
AT3G53020	60S ribosomal protein L24 (RPL24B)	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	13,37	11,85	1,53
AT3G04230	40S ribosomal protein S16 (RPS16B)	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	10,85	9,33	1,52
AT2G44860	60S ribosomal protein L24, putative	structural constituent of ribosome	ribosome biogenesis	10,31	8,80	1,52
AT1G08580	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,84	8,33	1,51
AT4G32480	expressed protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	9,03	7,52	1,51
AT3G10260	reticulon family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	12,47	10,96	1,50
AT1G72040	deoxynucleoside kinase family	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	10,21	8,71	1,50
AT4G01560	brix domain-containing protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	9,71	8,21	1,50
ATCG00160	ribosomal protein S2	No classification	No classification	13,29	11,79	1,50

Annexe VI

Gènes sous-exprimés dans le double mutant Atbe2-1/Atbe3-2 en fin de nuit

Identifiant AGI (locus)	Fonction présumée du produit du gène	Description de la fonction	Description du procédé biologique	I _{Atbe2-1/ Atbe3-2}	I _{WS}	Ratio moyen
AT1G73600	phosphoethanolamine N-methyltransferase 3, putative (NMT3)	phosphoethanolamine N-methyltransferase activity	chemotaxis	7,46	10,76	-3,30
AT4G39800	inositol-3-phosphate synthase isozyme 1 / myo-inositol-1-phosphate synthase 1 / MI-1-P synthase 1 / IPS 1	inositol-3-phosphate synthase activity	phospholipid biosynthesis	10,07	13,25	-3,18
AT5G48850	male sterility MS5 family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	8,21	10,82	-2,61
AT4G34140	D111/G-patch domain-containing protein	nucleic acid binding methionine	No classification	8,88	11,32	-2,45
AT3G17390	S-adenosylmethionine synthetase, putative	adenosyltransferase activity	lignin biosynthesis	11,32	13,72	-2,40
AT1G65060	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	4-coumarate-CoA ligase activity	phenylpropanoid metabolism	7,13	9,53	-2,40
AT4G01450	nodulin MtN21 family protein	molecular_function unknown	electron transport	6,98	9,36	-2,39
AT5G03760	glycosyl transferase family 2 protein	cellulose synthase activity	No classification	7,18	9,48	-2,29
AT1G29660	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	carboxylic ester hydrolase activity	No classification	8,37	10,64	-2,27
AT3G23810	adenosylhomocysteinase, putative / S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, putative / AdoHcyase, putative	adenosylhomocysteinase activity	one-carbon compound metabolism	10,42	12,68	-2,26
AT2G37460	nodulin MtN21 family protein	molecular_function unknown	No classification	7,25	9,41	-2,16
AT4G13770	cytochrome P450 family protein	cytochrome P45 activity	glucosinolate biosynthesis	9,59	11,73	-2,14
AT2G32240	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,44	12,53	-2,09
AT1G73870	zinc finger (B-box type) family protein	zinc ion binding	regulation of transcription	7,59	9,67	-2,07
AT3G19710	branched-chain amino acid aminotransferase, putative / branched-chain amino acid transaminase, putative (BCAT4)	catalytic activity	branched chain family amino acid metabolism	8,45	10,52	-2,07
AT4G22490	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid binding	lipid transport	7,01	9,08	-2,06
AT3G52370	beta-Ig-H3 domain-containing protein / fasciclin domain-containing protein	glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase activity	cell adhesion	6,67	8,72	-2,05
AT1G32900	starch synthase, putative	transferase activity, transferring glycosyl groups	starch biosynthesis	10,37	12,41	-2,04
AT5G09220	amino acid permease 2 (AAP2)	amino acid permease activity	neutral amino acid transport	11,60	13,61	-2,01
AT4G08300	nodulin MtN21 family protein	molecular_function unknown	cell growth and/or maintenance	6,79	8,80	-2,01
AT5G20700	senescence-associated protein-related	molecular_function unknown	No classification	8,57	10,56	-1,98
AT1G04680	pectate lyase family protein	pectate lyase activity	No classification	7,20	9,18	-1,98
AT5G49215	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	polygalacturonase activity	carbohydrate metabolism	7,66	9,63	-1,97
AT4G37800	xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative / xyloglucan endotransglycosylase, putative / endo-xyloglucan transferase, putative	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	carbohydrate metabolism	8,41	10,38	-1,97

AT4G12030	bile acid:sodium symporter family protein	bile acid:sodium symporter activity	sodium ion transport	7,49	9,43	-1,94
AT4G00370	sugar transporter family protein	organic anion transporter activity	inorganic anion transport	8,94	10,88	-1,94
AT3G49220	pectinesterase family protein	pectinesterase activity	cell wall modification	9,64	11,54	-1,90
AT4G21960	peroxidase 42 (PER42) (P42) (PRXR1)	peroxidase activity	No classification	11,38	13,28	-1,90
AT4G27400	late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related	molecular_function unknown	No classification	6,42	8,32	-1,90
AT4G25630	fibrillarin 2 (FIB2)	snoRNA binding	rRNA processing	6,90	8,79	-1,89
AT5G53420	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,38	10,26	-1,89
AT2G17230	phosphate-responsive 1 family protein	molecular_function unknown	No classification	8,79	10,66	-1,87
AT1G20070	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	7,36	9,23	-1,87
AT4G07410	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	nucleotide binding	No classification	7,74	9,61	-1,87
AT5G09870	cellulose synthase, catalytic subunit, putative	cellulose synthase activity	cell wall biosynthesis (sensu Magnoliophyta)	9,63	11,47	-1,84
AT4G34950	nodulin family protein	molecular_function unknown	No classification	8,21	10,04	-1,83
AT4G03060	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative (AOP2)	oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one	glucosinolate biosynthesis	6,73	8,55	-1,82
AT1G11850	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,51	10,31	-1,80
AT5G05270	chalcone-flavanone isomerase family protein	molecular_function unknown	flavonoid biosynthesis	8,70	10,50	-1,80
AT4G14440	enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein	unknown				
AT2G41170	F-box family protein	carnitine racemase activity	metabolism	8,18	9,97	-1,79
AT2G28950	expansin, putative (EXP6)	molecular_function unknown	No classification	7,53	9,28	-1,75
AT2G35760	integral membrane family protein	molecular_function unknown	cell wall modification during cell expansion (sensu Magnoliophyta)	8,47	10,23	-1,75
AT3G14210	myosinase-associated protein, putative	carboxylic ester hydrolase activity	No classification	9,02	10,77	-1,75
AT1G23130	Bet v I allergen family protein	molecular_function unknown	No classification	7,65	9,40	-1,74
AT5G23010	2-isopropylmalate synthase 3 (IMS3)	transferase activity, transferring acyl groups, acyl groups converted into alkyl on transfer	No classification	11,88	13,62	-1,74
AT5G49630	amino acid permease 6 (AAP6)	acidic amino acid transporter activity	glucosinolate biosynthesis	7,34	9,08	-1,74
AT5G45380	sodium:solute symporter family protein	solute:sodium symporter activity	L-tryptophan transport	7,33	9,06	-1,73
AT3G07010	pectate lyase family protein	pectate lyase activity	transport	9,25	10,97	-1,72
AT2G37710	lectin protein kinase, putative	kinase activity	No classification	8,82	10,53	-1,71
AT5G13400	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transporter activity	protein amino acid phosphorylation	9,94	11,64	-1,71
AT5G49330	myb family transcription factor	transcription factor activity	oligopeptide transport regulation of transcription, DNA-dependent	9,94	11,62	-1,68
AT5G42980	thioredoxin H-type 3 (TRX-H-3) (GIF1)	oxidoreductase activity, acting on sulfur group of donors, disulfide as acceptor	response to hydrogen peroxide	7,28	8,94	-1,67
AT4G38740	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase / cyclophilin / rotamase / cyclosporin A-binding protein (ROC1)	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	signal transduction	11,78	13,45	-1,67
AT2G41090	calmodulin-like calcium-binding protein, 22 kDa (CaBP-22)	calcium ion binding	No classification	12,03	13,69	-1,66
				13,20	14,84	-1,65

AT1G30530	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	transferase activity, transferring glycosyl groups	metabolism	9,31	10,95	-1,65
AT2G27420	cysteine proteinase, putative	cysteine-type peptidase activity	proteolysis and peptidolysis	9,68	11,32	-1,64
AT1G17745	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 3-PGDH	phosphoglycerate dehydrogenase activity	L-serine biosynthesis	8,39	10,01	-1,62
AT1G56110	nucleolar protein Nop56, putative	DNA binding	biological_process unknown	10,18	11,78	-1,60
AT1G01120	fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1 (KCS1)	fatty acid elongase activity	fatty acid elongation	7,30	8,90	-1,60
AT3G58990	aconitase C-terminal domain-containing protein	hydro-lyase activity	metabolism	7,10	8,70	-1,60
AT5G25610	dehydration-responsive protein (RD22)	nutrient reservoir activity	response to abscisic acid stimulus	10,08	11,68	-1,60
AT4G28780	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	carboxylic ester hydrolase activity	No classification	7,44	9,04	-1,59
AT1G65060	4-coumarate--CoA ligase 3 / 4-coumaroyl-CoA synthase 3 (4CL3)	4-coumarate-CoA ligase activity	phenylpropanoid metabolism	7,22	8,79	-1,57
AT2G20570	golden2-like transcription factor (GLK1)	transcription regulator activity	positive regulation of transcription	7,83	9,40	-1,57
AT5G17220	glutathione S-transferase, putative	glutathione transferase activity	aromatic amino acid family metabolism	8,21	9,77	-1,56
AT5G44580	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,22	11,77	-1,55
AT1G67360	rubber elongation factor (REF) family protein	molecular_function unknown	No classification	8,53	10,08	-1,55
AT3G07390	auxin-responsive protein / auxin-induced protein (AIR12)	extracellular matrix structural constituent	extracellular matrix organization and biogenesis	9,17	10,72	-1,55
AT5G11740	arabinogalactan-protein (AGP15)	molecular_function unknown	No classification	9,06	10,60	-1,55
AT3G54600	DJ-1 family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	9,84	11,38	-1,54
AT3G13230	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	7,58	9,11	-1,54
AT5G37770	touch-responsive protein / calmodulin-related protein 2, touch-induced (TCH2)	calcium ion binding	response to mechanical stimulus	8,43	9,96	-1,53
AT2G32240	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,16	9,69	-1,53
AT1G64670	hydrolase, alpha/beta fold family protein	hydrolase activity	aromatic compound metabolism	6,99	8,52	-1,53
AT2G39330	jacalin lectin family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	7,01	8,53	-1,52
AT1G18590	sulfotransferase family protein	sulfotransferase activity	No classification	8,53	10,05	-1,52
AT4G01080	expressed protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	7,63	9,14	-1,52
AT3G01550	triose phosphate/phosphate translocator, putative	antiporter activity	triose phosphate transport	7,52	9,03	-1,51
AT1G24020	Bet v I allergen family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	6,80	8,31	-1,51
AT1G14880	expressed protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	11,27	12,78	-1,50
AT4G25730	FtsJ-like methyltransferase family protein	methyltransferase activity	nucleosome assembly	9,07	10,57	-1,50
AT2G18230	inorganic pyrophosphatase (soluble) (PPA) / pyrophosphate phospho-hydrolase / PPase	pyrophosphatase activity	metabolism	10,07	11,57	-1,50
AT3G55605	mitochondrial glycoprotein family protein / MAM33 family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	7,15	8,65	-1,50

Annexe VII

Gènes sur-exprimés dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* en fin de nuit

Identifiant AGI (locus)	Fonction présumée du produit du gène	Description de la fonction	Description du procédé biologique	I		Ratio moyen
				Atbe2-1/ Atbe3-2	I _{WS}	
AT4G35770	senescence-associated protein (SEN1)	molecular_function unknown	aging biological_process unknown	13,19	6,30	6,89
AT3G15460	brix domain-containing protein	molecular_function unknown	unknown	13,39	7,79	5,60
AT3G47340	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) activity	aging	11,64	6,04	5,60
AT5G41080	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	glycerophosphodiester phosphodiesterase activity	glycerol metabolism	11,82	6,94	4,88
AT1G15380	lactoylglutathione lyase family protein / glyoxalase I family protein	lactoylglutathione lyase activity	carbohydrate metabolism	10,93	6,77	4,15
AT3G30775	proline oxidase, mitochondrial / osmotic stress-responsive proline dehydrogenase (POX) (PRO1) (ERD5)	proline dehydrogenase activity	proline catabolism biological_process unknown	12,64	8,60	4,04
AT4G36850	PQ-loop repeat family protein / transmembrane family protein	molecular_function unknown	unknown	10,70	6,66	4,03
AT4G28050	senescence-associated protein, putative	molecular_function unknown	aging	10,16	6,30	3,85
AT3G48360	speckle-type POZ protein-related raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative	protein binding	No classification	11,02	7,26	3,76
AT5G20250	(din10)	hydrolase activity\, hydrolyzing O-glycosyl compounds	aging N-terminal protein myristoylation	11,95	8,25	3,70
AT3G61060	F-box family protein / lectin-related alkaline alpha galactosidase, putative	molecular_function unknown hydrolase activity\, hydrolyzing O-glycosyl compounds	No classification	11,34	7,66	3,67
AT3G57520	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	beta-galactosidase activity hydrolase activity\, hydrolyzing O-glycosyl compounds	carbohydrate metabolism	11,58	7,94	3,64
AT5G56870	lactase, putative	beta-galactosidase activity hydrolase activity\, hydrolyzing O-glycosyl compounds	carbohydrate metabolism	13,10	9,54	3,56
AT5G49360	glycosyl hydrolase family 3 protein	hydrolase activity\, hydrolyzing O-glycosyl compounds	carbohydrate metabolism	12,20	8,86	3,34
AT3G10300	calcium-binding EF hand family protein	calcium ion binding	No classification	10,29	7,02	3,28
AT1G10090	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,28	7,04	3,24
AT1G54740	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	11,13	7,91	3,22
AT5G56100	glycine-rich protein / oleosin	No classification	lipid storage	11,66	8,59	3,07
AT3G15630	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,01	6,97	3,04
AT2G20670	expressed protein	sugar porter activity	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system biological_process unknown	10,46	7,47	2,99
AT4G32480	expressed protein	molecular_function unknown	regulation of transcription, DNA-dependent	11,09	8,17	2,93
AT5G63160	speckle-type POZ protein-related dormancy/auxin associated family protein	protein binding	regulation of transcription, DNA-dependent	12,12	9,20	2,92
AT2G33830	protein	ATP binding	physiological process phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	10,58	7,67	2,91
AT2G20670	expressed protein	sugar porter activity	physiological process phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system	10,43	7,55	2,87
AT1G28330	dormancy-associated protein, putative (DRM1)	molecular_function unknown	physiological process	10,92	8,08	2,84
AT3G13450	2-oxoisovalerate dehydrogenase / 3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase / branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit (DIN4)	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase (2-methylpropanoyl-transferring) activity	response to light	11,16	8,53	2,63
AT5G18840	sugar transporter, putative	carbohydrate transporter activity	carbohydrate transport biological_process unknown	7,24	9,83	2,59
AT5G19120	expressed protein	molecular_function unknown	unknown	10,96	8,42	2,54
AT1G64660	Cys/Met metabolism pyridoxal-phosphate-dependent enzyme family	catalytic activity	amino acid metabolism	10,72	8,22	2,50

	protein					
AT2G40000	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,43	7,94	2,49
AT1G30820	CTP synthase, putative / UTP--ammonia ligase, putative	CTP synthase activity	nitrogen fixation indoleacetic acid biosynthesis	9,44	6,95	2,49
AT3G44300	nitrilase 2 (NIT2)	nitrilase activity		8,96	6,47	2,49
AT5G57655	xylose isomerase family protein	xylose isomerase activity	carbohydrate metabolism	11,63	9,16	2,47
AT1G73260	trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	endopeptidase inhibitor activity	No classification	11,59	9,13	2,46
AT1G03850	glutaredoxin family protein	thiol-disulfide exchange intermediate activity	electron transport	9,42	6,96	2,46
AT1G03090	methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial / 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1 (MCCA)	methylcrotonoyl-CoA carboxylase activity	leucine catabolism	11,26	8,81	2,45
AT2G18700	glycosyl transferase family 20 protein / trehalose-phosphatase family protein	transferase activity, transferring glycosyl groups	DNA recombination branched chain family	10,95	8,52	2,43
AT2G31810	acetolactate synthase small subunit, putative	acetolactate synthase activity	amino acid biosynthesis	9,27	6,86	2,41
AT1G80440	kelch repeat-containing F-box family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	12,08	9,67	2,41
AT2G43820	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	transferase activity, transferring hexosyl groups	metabolism	10,55	8,18	2,36
AT2G39570	ACT domain-containing protein	amino acid binding	metabolism biological_process unknown	13,84	11,49	2,36
AT3G54880	expressed protein	molecular_function unknown	unknown	9,59	7,25	2,33
AT1G53580	hydroxyacylglutathione hydrolase, putative / glyoxalase II, putative	hydroxyacylglutathione hydrolase activity	methylglyoxal catabolism	9,87	7,54	2,33
AT5G62530	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH)	aldehyde dehydrogenase activity	metabolism	11,99	9,67	2,32
AT1G23390	kelch repeat-containing F-box family protein	molecular_function unknown	biological_process unknown	12,40	10,17	2,23
AT2G32150	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	hydrolase activity	metabolism	11,74	9,51	2,23
AT4G37220	stress-responsive protein, putative	molecular_function unknown	response to stress	9,26	7,05	2,21
AT4G20820	FAD-binding domain-containing protein	electron carrier activity	electron transport	10,11	7,99	2,13
AT3G29575	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,48	7,42	2,06
AT2G32550	rcd1-like cell differentiation family protein	molecular_function unknown	development	8,56	6,53	2,03
AT2G30395	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,77	6,76	2,02
AT2G29670	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,96	8,95	2,01
AT1G03520	glycosyltransferase family 14 protein / core-2/I-branching enzyme family protein	transferase activity, transferring glycosyl groups	carbohydrate biosynthesis	9,36	7,37	2,00
AT4G38470	protein kinase family protein	protein kinase activity	metabolism photosynthesis light harvesting in photosystem II	11,50	9,50	2,00
AT2G34430	chlorophyll A-B binding protein / LHCII type I (LHB1B1)	chlorophyll binding		10,49	8,51	1,99
AT3G22060	receptor protein kinase-related	molecular_function unknown	No classification	9,47	7,49	1,98
AT5G24500	expressed protein	molecular_function unknown	No classification biological_process unknown	11,89	9,92	1,97
AT3G48390	MA3 domain-containing protein	molecular_function unknown		9,12	7,17	1,95
AT2G17880	DNAJ heat shock protein, putative	chaperone activity	protein folding	9,04	7,12	1,92
AT4G27640	importin beta-2 subunit family protein	protein transporter activity	protein-nucleus import, docking regulation of transcription,	8,91	6,99	1,91
AT1G71030	myb family transcription factor	transcription factor activity	DNA-dependent	9,57	7,67	1,90
ATCG00170	_	No classification	No classification	13,03	11,14	1,89
ATCG00830	ribosomal protein L2	No classification	No classification	14,90	13,02	1,88
AT4G24040	glycosyl hydrolase family protein 37 / trehalase, putative	trehalase activity	transport	8,61	6,73	1,88
AT3G02040	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein	glycerophosphodiester phosphodiesterase activity	glycerol metabolism	9,08	7,23	1,84
AT3G13750	beta-galactosidase, putative / lactase, putative	beta-galactosidase activity	carbohydrate metabolism	8,93	7,08	1,84
AT3G06850	branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit (din3)	alpha-ketoacid dehydrogenase activity	response to light	10,10	8,28	1,82

AT5G49450	bZIP family transcription factor	transcription factor activity	regulation of transcription, DNA-dependent	9,64	7,82	1,82
AT5G10160	beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase, putative	3-hydroxyacyl-ACP dehydratase activity	fatty acid biosynthesis	10,07	8,29	1,78
AT1G02660	lipase class 3 family protein	triacylglycerol lipase activity	lipid metabolism	8,69	6,92	1,77
AT4G19160	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,23	8,47	1,75
AT1G80920	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	chaperone activity	protein folding	10,08	8,33	1,75
AT2G05540	glycine-rich protein	molecular_function unknown	No classification	12,42	10,67	1,75
AT5G59960	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,76	9,02	1,74
AT5G21170	5prim-AMP-activated protein kinase beta-2 subunit, putative	SNF1A/AMP-activated protein kinase activity	N-terminal protein myristoylation	9,25	7,51	1,74
AT3G26520	tonoplast intrinsic protein, putative	water channel activity	osmoregulation	14,28	12,57	1,72
AT5G55970	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	zinc ion binding	No classification	9,58	7,86	1,71
AT3G33004	pseudogene, DNA-directed RNA polymerase beta-chain	No classification	No classification	10,00	8,29	1,70
ATCG00170	—	No classification	No classification	9,84	8,19	1,66
AT5G07440	glutamate dehydrogenase 2 (GDH2)	oxidoreductase activity	amino acid metabolism	9,47	7,83	1,65
AT5G20230	plastocyanin-like domain-containing protein	copper ion binding	electron transport	8,34	6,72	1,63
AT1G66760	MATE efflux family protein	antiporter activity	multidrug transport	8,13	6,51	1,62
ATCG01130	—	No classification	No classification	9,70	8,09	1,62
AT4G36040	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein (J11)	chaperone activity	protein folding	8,64	7,02	1,62
ATCG00160	ribosomal protein S2	No classification	No classification	13,43	11,82	1,61
AT2G26080	glycine dehydrogenase (decarboxylating), putative / glycine decarboxylase, putative / glycine cleavage system P-protein, putative	glycine dehydrogenase (decarboxylating) activity	glycine decarboxylation via glycine cleavage system	8,87	7,26	1,61
AT3G51840	short-chain acyl-CoA oxidase	acyl-CoA oxidase activity	fatty acid beta-oxidation	13,80	12,20	1,60
AT4G29905	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	11,63	10,04	1,59
AT5G54960	pyruvate decarboxylase, putative	pyruvate decarboxylase activity	response to hypoxia	10,40	8,82	1,58
AT5G24810	ABC1 family protein	ATP binding	No classification	9,41	7,82	1,58
AT1G03100	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	pseudouridylylate synthase activity	tRNA processing	8,73	7,16	1,58
AT1G20840	transporter-related	carbohydrate transporter activity	carbohydrate transport	11,11	9,55	1,57
AT5G39785	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	9,59	8,03	1,57
AT3G62550	universal stress protein (USP) family protein	molecular_function unknown	response to stress	9,39	7,83	1,56
AT3G33002	pseudogene, ribosomal protein S2p family	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis	11,06	9,51	1,55
AT3G29240	expressed protein	ATP binding	No classification	13,05	11,51	1,55
AT5G57550	xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase / endo-xyloglucan transferase (XTR3)	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	cell wall biosynthesis (sensu Magnoliophyta)	8,27	6,72	1,55
AT1G49500	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	10,55	9,02	1,53
AT3G43850	hypothetical protein	molecular_function unknown	No classification	7,92	6,40	1,53
AT1G70290	trehalose-6-phosphate synthase, putative	transferase activity, transferring glycosyl groups	trehalose biosynthesis	9,41	7,88	1,53
AT5G06860	polygalacturonase inhibiting protein 1 (PGIP1)	defense/immunity protein activity	defense response	9,36	7,83	1,53
AT5G45310	expressed protein	molecular_function unknown	No classification	8,77	7,27	1,50
ATCG00780	ribosomal protein L14	No classification	No classification	10,66	9,16	1,50
AT3G46970	starch phosphorylase, putative	transferase activity, transferring glycosyl groups	carbohydrate metabolism	8,94	7,43	1,50
AT1G23870	glycosyl transferase family 20 protein / trehalose-phosphatase family protein	transferase activity, transferring glycosyl groups	trehalose biosynthesis	8,49	6,99	1,50

Légende des annexes IV, V, VI et VII.

Il est impossible de représenter l'ensemble des modifications observées à l'issue de l'expérience de comparaison de l'expression des gènes du double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* et du sauvage WS (analyse transcriptomique sur les puces « génome complet » CATMA). Nous avons choisi de présenter les résultats des gènes présentant le plus de différences d'expression entre le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* et le sauvage de référence WS en listant ceux les plus « sur-exprimés » (ratio moyen sur fond rouge) ou « sous-exprimés » (ratio moyen sur fond vert) dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* dans l'ordre du ratio moyen mesuré. Sont indiqués en rouge, les gènes dont le produit est impliqué dans le métabolisme de l'amidon.

$I_{Atbe2-1/Atbe3-2}$: Log(2) de l'intensité moyenne des gènes du double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2*. On considère que les signaux <7 correspondent aux gènes très faiblement exprimés (de l'ordre du bruit de fond), 7 à 10 faiblement à moyennement, >10 fortement, >13 les transcrits majoritaires. Valeur moyenne de trois expériences indépendantes

I_{WS} : Log(2) de l'intensité moyenne des gènes du sauvage de référence WS. Valeur moyenne de trois expériences indépendantes.

Ratio moyen : Log(2) du ratio moyen mesuré. Indiqué sur fond vert pour les gènes sous-exprimés dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2* et sur fond rouge pour les gènes sur-exprimés dans le double mutant *Atbe2-1/Atbe3-2*.

