

Université des Sciences et Technologies de Lille  
**THESE DE DOCTORAT**

Ecole doctorale Biologie Santé

Présentée par

**Ying DONG**

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

**Etude fonctionnelle des enzymes de  
débranchement de l'amidon de la feuille  
d'*Arabidopsis thaliana* : entre synthèse et  
dégradation, établissement des fonctions des  
différentes isoformes d'isoamylases et de la  
pullulanase**

Présentée le 22 juin 2007 devant la commission d'examen composée de :

- Président :** Dr. Jean-Claude Michalski (Lille)
- Rapporteurs :** Dr. Grégory Mouille (Versailles)  
Dr. Denis Falconet (Grenoble)
- Examineurs:** Prof. Alan Myers (Iowa State University)  
Prof. Steven Ball (Lille)  
Prof. Simon Hawkins (Lille)
- Directeur de thèse :** Prof. Christophe d'Hulst (Lille)

SCD LILLE 1



D 030 306518 1



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR8576 CNRS) à l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Je remercie le directeur du laboratoire, le Docteur Jean-Claude Michalski, de présider la commission d'examen de ce travail.

Je remercie le docteur Grégory Mouille pour sa présence en qualité de rapporteur au sein de la commission d'examen de ce travail. Je tiens ici à m'excuser pour le retard dans l'achèvement du manuscrit et le peu de temps séparant sa réception et la date de transmission des rapports.

Je remercie également le professeur Simon Hawkins pour sa présence dans la commission d'examen de ce travail. I would also like to thank the professor Allan Myers for his presence in the examination commission of this work.

Je remercie le docteur Denis Falconet qui accepte le lourd travail de rapporteur de ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Steven Ball, aussi bien pour ses conseils et encouragements bienveillants durant ces années que pour sa présence en tant qu'examineur.

J'exprime toute ma gratitude au directeur de ma thèse, le Professeur

Christophe d'Hulst, pour m'avoir accordé sa confiance et accueilli en DEA et ensuite pour la thèse. Je le remercie vivement pour ses nombreux conseils, encouragements et discussions tout au long de ce travail et aussi pour son aide très concrète et précieuse pour une étudiante étrangère.

J'ai également une pensée pour tous les membres du groupe d'« Arabido » David, Fabrice, Sylvain, Nico, Aline, Elise, Oliver Tanguy et Margo, ainsi que ceux du groupe d'« chlamy » David, Coco, Philippe, Charlotte et Jennyfer, sans oublier Luc, Jean-Phi, Kim, Seb, Clément et Vincent car j'ai appris beaucoup de choses avec eux durant ces quatre années.

Je remercie aussi les membres du personnel du bâtiment C9 pour leur disponibilité, leur sympathie ainsi que pour avoir apporté leur contribution à la réalisation de ce projet.

Je voudrais aussi remercier les nombreux véritables amis qui m'ont accompagné à passer beaucoup de bons moments et qui m'ont soutenu pendant les périodes difficiles.

Un grand merci à mes parents surtout à ma mère pour leur soutien et compréhension pendant toutes ces années.

## Abréviations

<b>3-PGA</b> : 3-phosphoglycérate	<b><math>\lambda_{\max}</math></b> : longueur d'onde du maximum d'absorbance
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>MOS</b> : malto-oligosaccharides
<b>ADP</b> : adénosine diphosphate	<b>NADP</b> : nicotinamide adénosine diphosphate
<b>ADP-Glc</b> : adénosine diphospho-glucose	<b>PCR</b> : réaction de polymérisation en chaîne
<b>AGPase</b> : adénosine diphospho-glucose pyrophosphorylase	<b>Pi</b> : orthophosphate
<b>APTS</b> : acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique	<b>PPi</b> : pyrophosphate inorganique
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>SDS</b> : sodium dodécyl sulfate
<b>ARNm</b> : acide ribonucléique messenger	<b>SS</b> : amidon-synthétase soluble
<b>ATP</b> : adénosine triphosphate	<b>Tris</b> : tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
<b>BE</b> : enzyme de branchement	<b>UDP-Glc</b> : uridine diphospho-glucose
<b>Col</b> : écotype Columbia d' <i>Arabidopsis</i>	<b>WSP</b> : polysaccharide soluble dans l'eau
<b>Coll.</b> : collaborateurs	<b>WS</b> : écotype Wassilewskija d' <i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>DBE</b> : enzyme de débranchement	<b>WT</b> : type sauvage
<b>DMSO</b> : diméthylsulfoxyde	
<b>DP</b> : degré de polymérisation	
<b>DTT</b> : dithiolthréitol	
<b>EDTA</b> : éthylène diamine tétra acétique	
<b>GBSS</b> : amidon-synthétase liée au grain	
<b>Glc-1-P</b> ou <b>G1P</b> : glucose-1-phosphate	
<b>Glc-6-P</b> ou <b>G6P</b> : glucose-6-phosphate	
<b>kb</b> : kilo paires de bases	
<b>kDa</b> : kiloDalton	

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	<b>8</b>
<b>A. Importance économique de l'amidon</b>	<b>9</b>
a. L'importance de l'amidon dans les secteurs alimentaires et nutritionnels	9
b. Les applications industrielles de l'amidon	10
<b>B. La structure de l'amidon</b>	<b>11</b>
a. La différence avec le glycogène	12
b. La structure de grain d'amidon	13
c. L'amylose	16
d. L'amylopectine	17
e. Les autres composants du grain d'amidon	19
<b>C. La synthèse de l'amidon</b>	<b>20</b>
a. L'initiation de la synthèse des glucanes	20
b. La synthèse du glucosylnucléotide précurseur	23
c. L'élongation des glucanes	26
a) La synthèse de l'amylose	
Les amidon-synthétase liée au grain (GBSS)	26
GBSSI	27
GBSSIIb	28
b) La synthèse de l'amylopectine : les amidon-synthétases solubles	29
d. Les enzymes de branchement	32
a) Les SBEIs (famille B)	33
b) Les SBEIIs (famille A)	34
e. Les enzymes de débranchement	35
a) Histoire et nomenclature de la pullulanase	36
b) Histoire et nomenclature de l'isoamylase	37
c) La réaction de débranchement	37
d) La famille des $\alpha$ -amylases	38
e) Les rôles des enzymes de débranchement végétales dans le métabolisme de l'amidon	43
1) La fonction de la pullulanase	43
2) La fonction des isoamylases	45

3) L'activité isoamylasique : le résultat d'une interaction synergique	48
4) Une nouvelle famille isoamylase	49
f. L'enzyme disproportionnante	50
<b>D. La dégradation de l'amidon</b>	<b>51</b>
a. La phosphorylation de l'amidon : une modification obligatoire	53
b. Première attaque sur le grain d'amidon	54
c. Le débranchement	54
d. La mobilisation des glucanes linéaires	55
e. Les produits finaux exportés	57
f. La dérivation des produits de dégradation hors chloroplaste	57
<b>E. Un modèle puissant : <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>59</b>
<b>F. Objectifs du travail de thèse</b>	<b>62</b>
<b>Matériels et méthodes</b>	<b>63</b>
<b>Produits</b>	<b>64</b>
<b>Lignées d'<i>Arabidopsis thaliana</i>, conditions de culture et milieux</b>	<b>64</b>
<b>Croisements</b>	<b>64</b>
<b>Biologie moléculaire</b>	<b>65</b>
A. Extraction de l'ADN génomique de feuille	65
B. Sélection des lignées homozygotes mutantes	
C. Extraction des ARN totaux	66
D. RT-PCR	66
<b>Biochimie structurale</b>	<b>67</b>
A. Extraction et purification d'amidon et des polysaccharides solubles	67
B. Dosage des teneurs en amidon et en polysaccharides solubles	67
C. Dosage des contenus en glucose, fructose et saccharose	67
D. Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique	68
E. Fractionnement des polysaccharides solubles par chromatographie d'exclusion stérique	68
F. Détermination des absorbances spectrales du complexe iode/polysaccharide ( $\lambda_{max}$ )	69
G. Distribution de longueurs des chaînes de l'amylopectine et de polysaccharides solubles	69

H. Production des $\beta$ -limite dextrines de l'amylopectine	
I. Microscopie électronique à transmission (TEM) et Microscopie électronique à balayage (SEM)	70
J. Détermination du taux de branchement de l'amylopectine	70
<b>Enzymologie</b>	<b>70</b>
A. Extraction des protéines des feuilles	70
B. Dosage des protéines	71
C. Zymogramme	71
Zymogramme des activités hydrolytique	71
Zymogrammes des activités pullulanases	71
Zymogramme des activités amidon-synthétases solubles	71
Zymogramme des activités amidon-phosphorylases	72
D. Dosage <i>in vitro</i> des activités du métabolisme de l'amidon	72
Dosage de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase	72
Dosage des activités $\beta$ -amylases	72
Dosage des activités $\alpha$ -amylases	73
Dosage de l'activité $\alpha$ -1,4 glucanotransférase	73
Dosage de l'activité pullulanase	73
Dosage des activités amidon-phosphorylases	73
<b>Résultats</b>	<b>75</b>
<b>Mutants of Arabidopsis Lacking a chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogène and an Abnormal Form of Amylopectin.</b>	<b>76</b>
Résumé en français	76
Abstract	77
Introduction	77
Results	78
<i>DBE Genes in Arabidopsis and Selection of the Corresponding Mutant Lines</i>	78
<i>Enzymatic Characterization of the Mutant Lines</i>	78
<i>Starch and WSP Accumulation Phenotypes</i>	80
<i>Structural Analysis of Mutant Amylopectin and WSP</i>	81
Discussion	82
Materials and Methods	86

Acknowledgments

Literature Cited

<b>Résultats supplémentaires</b>	<b>90</b>
<b>L'analyse des doubles mutants <i>isa1-isa3-</i> et <i>isa3-pul-</i></b>	<b>91</b>
La construction des lignées doubles mutantes	91
Caractérisation enzymatique	92
Caractérisation de l'accumulation des polysaccharides dans les doubles mutants	95
Des polysaccharides structuralement modifiés s'accumulent dans les deux doubles mutants	98
L'analyse structurale de l'amylopectine et des WSP	98
L'impact des mutations sur la morphologie des grains d'amidon	104
<b>L'Analyse préliminaire du triple mutant <i>isa1-isa3-pul</i></b>	<b>106</b>
La construction du triple mutant	106
L'analyse des activités enzymatiques	106
L'accumulation des polysaccharides	107
<b>Discussion</b>	<b>108</b>
A. La fonction du complexe Iso	109
B. La fonction d'ISA3	112
C. La fonction de la pullulanase	113
<b>Bibliographie</b>	<b>116</b>
<b>Annexes</b>	<b>139</b>

# **INTRODUCTION**

## **A. Importance économique de l'amidon**

Nous situant au début du 21<sup>ème</sup> siècle, si nous jetons un regard rétrospectif sur le dernier siècle, nous nous rendons immédiatement compte que c'est une époque marquée par la rapidité de l'évolution technologique, la compréhension plus profonde de notre environnement, la variété de l'activité scientifique, en un mot, une véritable explosion de la connaissance.

Dans cette vague d'innovations, bien que de nouvelles matières soient sans cesse découvertes ou créées, certains produits naturels et même ordinaires, tel que l'amidon, attirent toujours fortement notre attention.

A notre époque, la fonction de l'amidon a depuis longtemps dépassé sa définition traditionnelle. En effet, il était auparavant considéré comme une simple matière nutritionnelle. En revanche, aujourd'hui, ce polymère naturel contenu en abondance dans le règne végétal, occupe une place de plus en plus importante dans tous les domaines de notre vie quotidienne.

### **a. L'importance de l'amidon dans les secteurs alimentaires et nutritionnels**

L'amidon est la principale

substance glucidique de réserve des végétaux supérieurs. Il peut être trouvé dans les différents organes de la plante, y compris les graines, les fruits, les tubercules, les racines et les feuilles, dans lesquels il est utilisé comme une source d'énergie. Certains organes de réserve de l'amidon, par exemple, les graines du maïs et du riz, ou les tubercules de la pomme de terre et du manioc, sont des aliments essentiels à l'homme. De fait, il est le principal fournisseur de calories dans les nourritures humaine et animale. Selon les chiffres de l'AAC (Association européenne des Amidonniers et Céréaliers) chaque année environ 90 millions de tonnes d'amidon sont produits dans le monde entier. 50% de l'amidon produit industriellement sont destinés à l'alimentation humaine. En plus de sa valeur nutritive, grâce à ses propriétés physico-chimiques spéciales, comme sa gélatinisation, sa viscosité, sa fluidité, sa solubilité, et sa blancheur, l'amidon accomplit de multiples fonctions dans de nombreux aliments comme épaississant, gélifiant, liant, sucrant, colorant, blanchissant, fixant ou encore fluidifiant.

A part ses fonctions nutritives traditionnelles, récemment, une forme d'amidon a particulièrement attiré l'attention en raison de son bénéfice potentiel pour la santé. Ce genre d'amidon est nommé amidon résistant, car il n'est

que faiblement digéré par l'amylase dans l'intestin grêle. Cet amidon résistant libère presque deux fois moins d'énergie que l'amidon digestible. Il est donc apprécié pour ceux qui surveillent leur ligne ou dont les pathologies liées au surpoids l'exigent. De plus, grâce à ses caractéristiques hypoglycémiantes et hypoinsulinémiantes, l'amidon résistant peut devenir potentiellement une substitution d'aliment pour la prévention du diabète de type II, de l'obésité, ou des maladies cardiovasculaires.

La propriété de résistance aux enzymes digestives de ce type d'amidon est strictement liée à sa structure spatiale et donc à sa composition macromoléculaire et aux caractéristiques physico-chimiques, qui en découlent. Il en résulte un phénomène d'inaccessibilité physique pour les enzymes de digestion, ou pour la modification chimique.

#### **b. Les applications industrielles de l'amidon**

En tant que polymère, grâce à la particularité de sa structure moléculaire, l'amidon possède des propriétés physico-chimiques spécifiques telles que la gélatinisation, la viscoélasticité, la fluidité ou encore la blancheur. Ces caractéristiques vouent l'amidon à de nombreuses utilisations dans divers domaines industriels, par exemple la

papeterie, le textile, la pharmacie, la fermentation, la chimie, la cosmétologie ou même la construction.

Il existe, malgré tout, certains inconvénients liés à l'emploi de l'amidon natif. Dans l'industrie agroalimentaire, son instabilité sous l'action des hautes températures constitue un problème de taille lors de nombreux processus. Citons par exemple la stérilisation des conserves au cours de laquelle la viscosité de l'amidon doit être stable. Citons encore l'élaboration des produits surgelés dont la qualité dépend de la propension à la rétrogradation de l'amidon. Pour palier à ces désagréments et mieux s'adapter aux besoins industriels, on peut faire subir divers traitements chimiques ou physiques à l'amidon natif. Les modifications apportées par ces traitements confèrent à l'amidon de nouvelles caractéristiques. Ainsi la réaction d'estérification ou d'éthérification qui greffe des groupements acétate ou hydroxypropyle sur les molécules d'amidon permet d'accentuer les phénomènes de répulsions inter-chaînes. Par conséquent, l'utilisation de ce type d'amidon permet de minimiser voire de supprimer le phénomène de rétrogradation. Il existe également un type d'amidon modifié dans lequel des pontages sont créés entre molécules ou au sein de la molécule par l'intermédiaire de l'oxychlorure de phosphate. Cette

réticulation permet d'augmenter la résistance de l'amidon (haute température, hydrolyse acide ou force extérieure).

Outre son utilisation dans l'industrie agroalimentaire, l'amidon modifié trouve des applications dans de nombreux autres domaines. L'amidon oxydé ou hydrolysé par l'acide est, par exemple, utilisé pour le traitement de surface dans la papeterie ou le textile en raison de sa faible viscosité. L'amidon natif peut même être polymérisé avec des composés chimiques. Par exemple, il peut être utilisé comme absorbant lorsque l'amidon est polymérisé avec le nitrile éthylénique.

Par ailleurs, les possibilités de modifier la texture de l'amidon continuent d'ouvrir de nouvelles perspectives, sans cesse exploitées. L'amidon auquel on introduit des groupements hydroxyéthyle peut se substituer au plasma dans les opérations chirurgicales. Du fait de la bonne solubilité et viscosité dans l'eau froide, l'amidon pré-gélatinisé trouve même une place dans la fonderie et l'industrie pétrolière. A notre époque sensibilisée à la protection de l'environnement, l'amidon modifié, matière biodégradable et peu coûteuse, constitue un matériau de choix. Par exemple, l'amidon xanthate et l'amidon cationique ont été utilisés comme agents de traitement des eaux usées. Dans l'industrie de la plasturgie, l'amidon

associé avec d'autres polymères revêt parfaitement les fonctions d'un plastique complètement biodégradable.

Certains produits de dégradation complète ou partielle de l'amidon, comme les dextrines ou le fructose, sont également utilisés dans l'industrie. On peut ainsi mentionner les cyclodextrines, des oligosaccharides cycliques issus de la dégradation de l'amidon par une enzyme bactérienne appelée cyclodextrine glycosyltransférase. Ceux-ci sont largement utilisés dans la pharmacie, la protection de l'environnement et l'alimentation pour leur propriété de capture des molécules hydrophobiques ou des métaux lourds.

## **B. La structure de l'amidon**

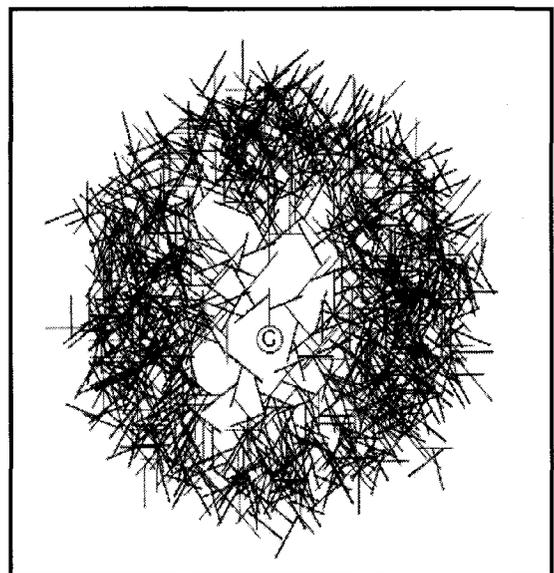
Comme nous l'avons présenté dans la partie précédente, l'amidon existe en tant que réserve d'énergie et de carbone dans les plantes supérieures ainsi que dans les algues vertes. A long terme, l'amidon qui est synthétisé dans l'amyloplaste, et nommé amidon de réserve, peut fournir l'énergie et le carbone nécessaires pour assurer la germination et la croissance des plantes à leurs premiers stades de développement. L'amyloplaste est une sorte de plaste demeurant dans les organes de réserve comme les graines du riz, du

maïs, ou les tubercules de pomme de terre. Dans les organes photosynthétiques de la plante, c'est-à-dire les feuilles, un autre rythme de consommation d'amidon est établi en vue de fournir l'énergie pendant la période d'obscurité et maintenir le métabolisme normal. Ainsi l'amidon transitoire des feuilles est synthétisé au sein des chloroplastes tout au long de la photopériode et dégradé presque totalement la nuit. Le terme d'amidon est aussi employé pour nommer un type de polysaccharide de réserve chez les algues rouge, les glaucophytes, les cryptophytes, les dinoflagellées et certains parasites apicomplexa comme *Toxoplasma gondii* (Coppin et coll., 2005). Surnommé amidon floridéen, ce polysaccharide s'apparente structurellement à celui que l'on retrouve chez les plantes et les algues vertes (Deschamps et coll., 2006).

#### a. La différence avec le glycogène

Avant de parler de la composition et de la structure de l'amidon, il faut d'abord indiquer la présence d'une autre sorte de polysaccharide de réserve appelé glycogène. On trouve celui-ci chez les animaux, les champignons ainsi que chez les bactéries. L'amidon et le glycogène sont tous les deux composés simplement et exclusivement de résidus d' $\alpha$ -D-glucose liés par des liaisons O-glycosidiques :  $\alpha$ -1,4 et  $\alpha$ -1,6. Malgré cette ressemblance au

niveau de la composition moléculaire, les points communs entre l'amidon et le glycogène s'arrêtent ici. Le glycogène est une matière soluble dans l'eau avec une structure amorphe (figure 1), tandis que l'amidon reste insoluble et partiellement cristallin. En réalité, la structure de l'amidon n'est pas uniforme comme celle du glycogène. Elle est au contraire constituée de plusieurs niveaux d'organisation tridimensionnelle. Si le glycogène est composé d'une macromolécule unique, l'amidon est un polymère plus hétérogène au sein duquel coexistent deux types de molécules très différentes marquées par leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques: l'amylose et l'amylopectine.

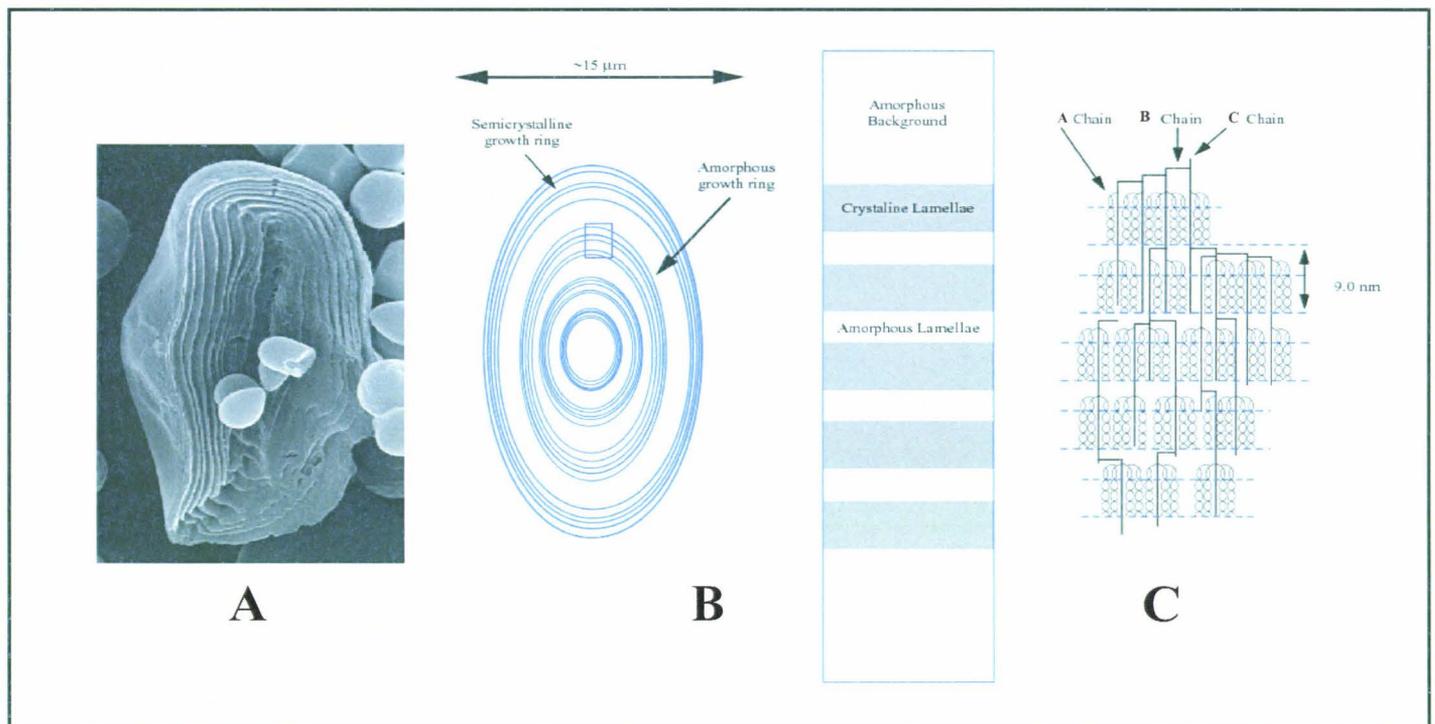


**Figure 1 :** représentation théorique d'un grain de glycogène selon Meléndez et coll. (1998) élaborée à l'aide d'un modèle mathématique autorisant la croissance des chaînes en 3D. Les paramètres utilisés sont ceux du glycogène cellulaire : longueur moyenne des chaînes : 13 glucoses avec deux liaisons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

## b. La structure du grain d'amidon

En conditions naturelles, l'amidon s'accumule sous forme de grains insolubles dans l'eau dans les plastes de différents tissus photosynthétiques et non photosynthétiques. En fonction de leur origine botanique, les grains d'amidon montrent une grande variation de la taille. Leurs diamètres varient en effet, de quelques micromètres chez *Arabidopsis thaliana* jusqu'à 100 micromètres pour la pomme de terre. Bien que la répartition de la taille des grains d'amidon soit le plus souvent homogène et centrée sur une

valeur moyenne au sein d'un même organisme, certaines céréales comme le blé, l'orge ou l'avoine présentent simultanément deux populations de grains de « grande » et de « petite » taille. La diversité est aussi présente dans la morphologie des grains d'amidon que l'on trouve sous forme de disque, de sphère, d'ovale, de fuseau, ou de polyèdre. Cela démontre que le grain d'amidon est façonné non seulement selon une voie biosynthétique particulière mais aussi en fonction des contraintes physiques particulières liées à la présence d'autres



**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 l'attaque ménagée par des  $\alpha$ -amylases. Les structures concentriques encore visibles (0,1 à 1  $\mu\text{m}$  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 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 ».

composés subcellulaires pendant l'accumulation de l'amidon dans la cellule.

La technique de microscopie associée à l'hydrolyse acide ménagée ou la digestion ménagée par l' $\alpha$ -amylase nous permet de révéler des structures principales des grains d'amidon, appelées « anneaux de croissance » (figure 2). Si certaines zones nommées lamelles amorphes sont sensibles à la digestion enzymatique ou acide, les zones semi-cristallines affichent clairement une résistance à la digestion. Les anneaux de croissance sont le résultat de l'alternance des lamelles amorphes et semi-cristallines dont l'épaisseur varie entre 120 nm et 400 nm (Yamaguchi et coll., 1979). Les lamelles semi-cristallines coïncident avec les régions dans lesquelles on trouve la structure en grappe de l'amylopectine. Ces lamelles semi-cristallines sont elles-mêmes constituées d'une succession de lamelles amorphes et cristallines (voir plus loin lors de la description de la molécule d'amylopectine). La formation de ces anneaux, centrés sur le hile, est supposée sous le contrôle du rythme diurne. De fait, des facteurs qui varient entre le jour et la nuit tels que le régime de l'intensité lumineuse ou le cycle de température, jouent des rôles importants dans le contrôle de la formation de ces anneaux (Buttrose, 1962 ; Gallant, 1974). Cette théorie est soutenue par le fait de l'absence des anneaux de croissance dans

l'amidon de blé (Buttrose, 1962) ou de *Chlamydomonas* (Buléon et coll., 1997) dans des conditions de culture homogène (sans variation de l'intensité lumineuse, ni de la température). Mais le travail de Pilling et Smith (2003) démontre au contraire la présence de ces anneaux dans l'amidon de pomme de terre même lorsque les conditions de culture ne sont pas soumises à fluctuations. Ainsi, ils suggèrent que la formation des anneaux est dépendante d'un contrôle endogène ou d'un rythme circadien. Même si l'origine des anneaux de croissance reste sujette à débat, des mécanismes physiques et biologiques pourraient interagir et contribuer ensemble à la régularisation de leur formation.

La cristallinité de l'amidon natif est due à la formation des doubles hélices des chaînes latérales de l'amylopectine (l'amylopectine est avec l'amylose, l'une des deux macromolécules constitutives du grain d'amidon). Malgré l'importance de cette structure, la cristallisation n'est pas le principal mode d'organisation adopté par l'amidon, puisque les taux de cristallinité oscillent entre 15 et 45% seulement (Zobel, 1988).

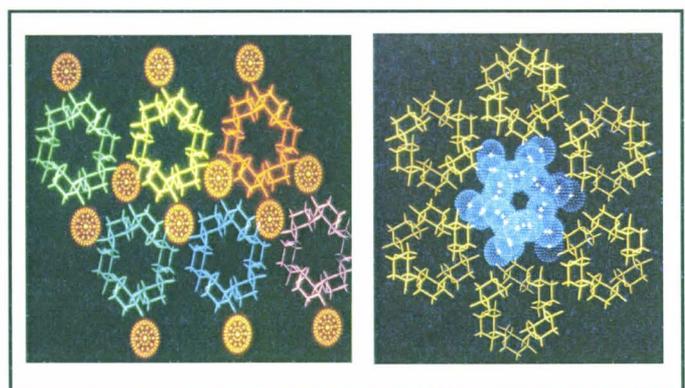
Plusieurs modèles tentant d'élucider la conformation de l'amylose au sein du grain d'amidon ont été présentés. Par la diffraction des rayons X aux petits angles, Jenkins et Donald (1995) ont

observé un rapport inverse entre la teneur en amylose et l'épaisseur des lamelles amorphes tout en conservant la périodicité de 9nm (voir plus loin le détail concernant les lamelles amorphes et cristallines de l'amylopectine). Dans le même temps, la densité aux électrons de la lamelle cristalline diminue avec l'augmentation de la teneur en amylose. Ces résultats suggèrent que la présence de l'amylose perturbe la conformation de la lamelle cristalline de l'amylopectine. Ils ont proposé deux hypothèses pour expliquer ces phénomènes. Dans la première, l'amylose pourrait s'engager partiellement dans la formation de doubles hélices avec des courtes chaînes de l'amylopectine et dans le second, l'amylose pourrait pénétrer la lamelle amorphe et y apporter du désordre. Une autre hypothèse est suggérée selon l'observation par RMN (Kasensuwan et Jane, 1994), les molécules d'amylose se disperseraient aléatoirement parmi celles d'amylopectine en formant des réticulations. Cette théorie est plausible du fait que l'amylose ne peut être extraite complètement qu'avec des températures supérieures à 90 °C.

Selon l'origine de l'amidon étudié, plusieurs types de cristallinité sont observés par l'analyse de la diffraction des rayons X aux grands angles (Buléon et coll., 1997). Des amidons de céréales donnent un profil de type A caractérisé par

la compacité plus importante des cristaux (système monoclinique) en comparaison du type B (Imberty et coll., 1987) (figure 3). Le type cristallin B (système hexagone), contenant plus de molécules d'eau, se retrouve fréquemment au sein des amidons de pomme de terre et de tubercules de certaines plantes tropicales ou encore des amidons enrichis en amylose comme le cas de l'amylomais ou du blé (Imberty et Pérez, 1988). Le troisième type cristallin nommé C, rencontré chez certaines légumineuses tel que le pois, résulterait de la coexistence des cristaux de type A et B dans un même grain d'amidon (Buléon et coll., 1997 ; Gallant et coll., 1997). Enfin, le type V est défini par la formation d'un complexe, qui apparaît lors de la gélatinisation de l'amidon, entre l'amylose et des lipides tels que les acides gras ou les monoglycérides.

Enfin, les grains d'amidon révèlent la présence d'une croix de Malte ou d'une



**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) représentent les molécules d'eau au sein de la structure.

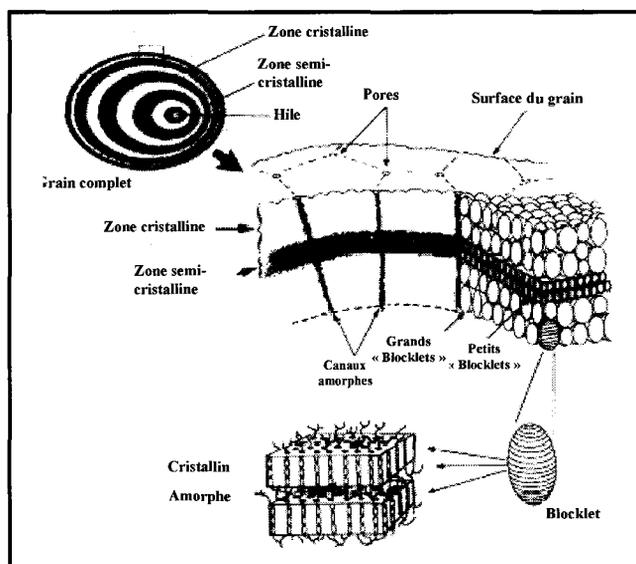
croix de biréfringence sous la lumière polarisée au microscope optique. Cette croix indique théoriquement que les chaînes du polymère sont perpendiculaires aux anneaux de croissance et à la surface du grain (French, 1984).

Profitant de la progression de la technique de microscopie électronique et de microscopie de force atomique, Gallant et Coll. (1997) évoquent l'existence de protubérances à la surface des grains d'amidon. Cette observation pousse ces auteurs à proposer un tout nouveau modèle de superstructure du grain d'amidon. En effet, ils supposent que les protubérances reflètent la présence d'organisations intermédiaires appelées «blocklets», dont la taille varie de 20 à 500 nm. Ces

« blocklets » composés de la structure 9 nm de l'amylopectine se sont associés de façon régulière en formant des lamelles semi-cristallines ou amorphes selon leurs tailles (figure 4). D'un autre côté, Oostergetel et van Bruggen (1993) ont proposé, d'après leurs analyses de diffraction des électrons après coloration à l'argent du polysaccharide, que les grappes d'amylopectine s'organisent en superhélices gauches pour former les régions semi-cristallines de l'amidon.

### c. L'amylose

L'amylose est un composant minoritaire de l'amidon. Il atteint environ 15% à 25% du poids sec du grain d'amidon. Ce chiffre varie selon l'origine botanique et les conditions de culture. L'amylose est constitué de quelques centaines jusqu'à plusieurs milliers de résidus  $\alpha$ -D-glucose enchaînés presque uniquement par des liaisons  $\alpha$ -1,4. Pendant une longue période, l'amylose a été définie comme une molécule linéaire. Le critère d'une molécule linéaire est déterminé par la digestibilité totale par la  $\beta$ -amylase, une exoamylase, qui est capable de couper la liaison  $\alpha$ -1,4 depuis l'extrémité non réductrice d'un glucane en libérant du  $\beta$ -maltose. L'activité de cette enzyme est stoppée par la présence d'une liaison  $\alpha$ -1,6 ce qui empêche ainsi la dégradation ultérieure des liaisons  $\alpha$ -1,4 situées au delà



**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.

de la liaison  $\alpha$ -1,6. Une molécule linéaire sera ainsi convertie totalement en maltose par une digestion à la  $\beta$ -amylase. Expérimentalement, bien que l'amylose manifeste une haute susceptibilité à la  $\beta$ -amylase, il reste une quantité non négligeable de  $\beta$ -limite dextrine qui résiste à cette attaque enzymatique (Taketa et coll., 1987). Ce phénomène démontre bien une très légère ramification (inférieure à 1%) de l'amylose. Hizukuri et coll (1997) supposent que chaque molécule possède en moyenne deux à huit points de branchement et chaque chaîne latérale porte quatre à une centaine de résidus de glucose. Loin d'être un arrangement régulier qui forme une construction en forme de peigne sur la chaîne principale, les courtes chaînes latérales se concentrent plutôt dans la région proche de l'extrémité réductrice en une structure de grappe. Mais ceci reste encore à démontrer de manière définitive.

Toutefois, cette faible ramification ne nuance pas la différence entre l'amylose et l'amylopectine, un autre composant, de structure beaucoup plus complexe. Buléon et coll. (1998) ont confirmé que la présence de points de branchement ne change pas significativement le comportement de l'amylose en solution. En outre, des études réalisées à partir des mutants *waxy* pour lesquels la synthèse de l'amylose a été totalement supprimée et

qui ne contiennent donc plus que de l'amylopectine, font apparaître que l'absence de la fraction amylose n'apporte aucune modification remarquable sur la formation, la structure ou la quantité des grains d'amidon (Weatherwax, 1922 ; Muruta et coll., 1965 ; Eriksson, 1969 ; Nakamura et coll., 1995 ; Denyer et coll., 1995 ; Delrue et coll., 1992). La localisation précise de l'amylose dans le grain d'amidon reste encore inconnue. On suppose qu'elle se trouve principalement dans les zones amorphes du grain, mais ce point est loin d'être démontré.

Dans certaines conditions *in vitro* comme lors de la déacétylation (Wu et coll., 1978) ou en précipitation (Buléon, 1984), des chaînes de l'amylose amorphe s'enroulent en simple hélice ou double hélices parallèles. Ces structures permettent à l'amylose de former des complexes avec des molécules de lipides, d'alcools ou d'iode qui en réalité s'intègrent dans la cavité de l'hélice. Le plus connu c'est le complexe iode-amylose qui donne une forte coloration bleu-vert et une longueur d'onde d'environ 620 nm au maximum d'absorption.

#### **d. L'amylopectine**

L'amylopectine est le composant le plus important et le plus abondant au sein du grain de l'amidon, avec 75% à 80% du poids sec du grain. En moyenne,

l'amylopectine possède une masse moléculaire de  $10^7$  à  $10^9$  Da avec un degré de polymérisation d'environ  $10^6$  résidus de glucose. Tandis que son organisation primaire est la même que celle de l'amylose, l'amylopectine montre un arrangement spatial très complexe et très différent de cette dernière. Premièrement, l'amylopectine est une macromolécule plus ramifiée que l'amylose, puisqu'elle contient de 5 à 6% de liaison  $\alpha$ -1,6. Ceci concorde avec la susceptibilité modérée de la molécule à la digestion par la  $\beta$ -amylase (environ 55% ; Banks, 1975).

Peat et coll. (1952) ont réparti les chaînes glucosidiques de l'amylopectine en trois groupes : A, B et C. La chaîne C est la chaîne qui porte l'unique extrémité réductrice libre, autrement dit, il n'y a qu'une seule chaîne C dans une molécule d'amylopectine. Les chaînes A sont des courtes chaînes externes linéaires rattachées par leurs extrémités réductrices sur le carbone C6 des résidus de glucose de chaînes plus internes (les chaînes B). De fait, les chaînes A ne portent pas d'autres chaînes. Enfin, les chaînes de type B, sont définies comme étant des chaînes supportant des points de ramification en C6, et elles mêmes liées à une autre chaîne B ou C par leurs extrémités réductrices. Le ratio A:B est considéré comme un paramètre important pour caractériser le degré de branchement multiple. Manners

(1989) rapporte un ratio de A:B d'entre 1,1 et 1,5. Les chaînes A représentent sans doute la plus grande population dans une molécule d'amylopectine.

Basé sur la connaissance de la structure primaire de l'amylopectine, un modèle de l'organisation secondaire de l'amylopectine est proposé par French (1972) et Robin et coll. (1974). Ce modèle propose que les points de branchement ne soient pas arrangés régulièrement le long des chaînes contrairement à la situation du glycogène, mais plutôt concentrés sur certaines zones. Cette localisation permet aux chaînes voisines d'interagir entre elles par des liaisons « hydrogène » pour former une structure en doubles hélices parallèles ou dite en grappes. Les zones dans lesquelles s'assemblent ces hélices constituent les lamelles cristallines, alors que les zones où s'agencent les points de branchement constituent les lamelles amorphes (à la base de la grappe d'amylopectine). Ce modèle est également conforté par le profil obtenu après une digestion partielle de l'amylopectine par l' $\alpha$ -amylase. Les lamelles amorphes sont, en effet, plus susceptibles que des lamelles cristallines (Zhu et Bertoft, 1996). Il est intéressant de noter que la taille du couple lamelle cristalline/lamelle amorphe témoigne une périodicité de 9 nm, quelle que soit l'origine de l'amidon (Jenkins et coll., 1993). Cette persistance nous suggère

un contrôle du métabolisme du polymère très régulé et parfaitement conservé à travers le règne végétal.

Le débranchement enzymatique de l'amylopectine par l'isoamylase et la pullulanase, deux enzymes qui hydrolysent spécifiquement la liaison  $\alpha$ -1,6, engendre des courtes chaînes linéaires. Cette méthode, associée à la chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC), donne une information plus complète de la distribution de la longueur de chaîne de cette macromolécule. D'après une analyse sur l'amylopectine en provenance de 11 espèces différentes, Hanashiro et coll., (1996) supposent que la distribution de la longueur des chaînes exhibe un profil d'onde avec un intervalle de DP=12. Ainsi, les chaînes d'amylopectine sont fractionnées en quatre populations : les fractions A (DP 6-12), B<sub>1</sub> (DP 13-24), B<sub>2</sub> (DP 25-36) et B<sub>3</sub> (DP>37). La fraction A constitue des chaînes A mentionnées plus haut dans cette partie, qui participent entièrement à l'édification d'une seule grappe. Les chaînes B sont distinguées en 3 groupes selon le nombre de grappes dans lesquelles elles sont engagées. Ainsi, les chaînes B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> et B<sub>3</sub> s'étendent respectivement sur une, deux et trois grappes. Les chaînes A sont considérées comme un facteur limite qui définit l'épaisseur de lamelles cristallines. D'ailleurs, Hizukuri présume que les

chaînes A et B<sub>1</sub> doivent jouer un rôle important dans la détermination du type cristallin de l'amidon (Hizukuri, 1986). En outre, une donnée intéressante et importante est l'estimation de la distance entre deux grappes se situant sur une même chaîne B. En général, ce chiffre oscille entre 22 et 25 résidus de glucose.

#### **e. Les autres composants du grain d'amidon**

Outre l'amylose et l'amylopectine, l'amidon contient d'autres constituants minoritaires. On trouve des lipides, des protéines et des sels minéraux au sein du grain d'amidon. Chez les céréales, la présence des lipides intérieurs est une caractéristique de l'amidon. Ils représentent 0,8-1,2% et 0,6-0,8% du poids d'amidon pour le blé et le maïs respectivement. Ces lipides, existants sous la forme d'acides gras libres ou de lysophospholipides, sont associés avec la fraction d'amylose. Ce résultat est corroboré par la corrélation positive de quantité entre des amylose et des lipides (Morrison, 1993).

Les protéines majoritairement enchâssées dans le grain lors de sa croissance, sont des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon. La mieux connue à ce jour est la GBSSI (granule bound starch synthase I), qui peut représenter jusqu'à 95% de l'ensemble des

protéines du grain et jusqu'à 0,5% du poids total du granule (Wattebled et coll., 2002).

Si la fraction minérale est négligeable dans les amidons de céréales, elle atteint un niveau exceptionnellement haut dans les amidons de tubercules. Le phosphate représente environ 0,1% du poids des amidons de pomme de terre. Sous la forme d'esters de phosphate, il substitue les hydroxyles en position C6 et C3 de certains résidus de glucose avec une proportion de 70% et 30% respectivement. Une série de recherches ont montré que cette phosphorylation est réalisée par deux protéines kinases probablement liées à la surface du grain d'amidon : la GWD (Glucan Water Dikinase) et la PWD (Phosphoglucan Water Dikinase). Nous reviendrons plus loin dans cette partie introductive, sur l'importance des groupements « phosphate » dans le métabolisme de l'amidon.

### **C. La synthèse de l'amidon**

Une fois la complexité de la structure du grain d'amidon connue, il est naturel de se poser des questions sur la manière dont cette macromolécule est synthétisée et métabolisée au sein d'un organisme. Bien que les facteurs physico-chimiques ne soient pas négligeables, la réponse réside plutôt dans le génome des

organismes. A ce jour, de nombreuses enzymes ont été découvertes en lien direct avec le métabolisme de l'amidon. Dans la partie suivante, nous allons présenter ces enzymes en fonction de leur rôle dans la voie métabolique. Nous présenterons dans un premier temps les enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon, puis celles impliquées dans la dégradation

#### **a. L'initiation de la synthèse des glucanes**

Le glycogène, en tant que glucane de réserve chez les mammifères, les champignons et les bactéries, est souvent comparé avec l'amidon en raison des similarités entre les 2 macromolécules. L'initiation de la synthèse du glycogène animal était élucidée en 1986 après la découverte de la glycogénine dans le muscle de lapin. C'est une protéine liée de façon covalente au glycogène par le résidu de Tyrosine en position 194 (Whelan, 1986). En fait, cette protéine dimérique est capable de s'autoglycosyler à partir d'UDP-glucose en formant un oligosaccharide de 6 à 10 résidus de glucose sur chaque sous-unité (Gibbons et coll., 2002). Ensuite, ce court glucane sert d'amorce à la glycogène-synthétase. Une preuve plus directe de la fonction de la glycogénine au cours de la synthèse du glycogène vient d'une expérience chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Deux

glycogénines, Glg1 et Glg2, y coexistent et leurs fonctions sont redondantes (Cheng et coll., 1995). La disruption du gène de structure d'une de deux protéines ne change pas l'accumulation du glycogène. Par contre, l'extinction simultanée des deux gènes aboutit la disparition totale de la synthèse du glycogène.

Quand à l'initiation de la synthèse du glycogène chez les procaryotes, aucun analogue aux glycogénines n'a été identifié, bien que certaines protéines liées au glycogène de façon covalente ont déjà été décrites chez *E. coli* (Goldraj et coll., 1993). En outre, lorsque la protéine Glg2 de *Saccharomyces cerevisiae* est exprimée chez *E. coli*, au lieu de stimuler la synthèse du glycogène, elle contrecarre fonctionnellement cette synthèse en dépit de sa possibilité de s'autoglycosyler (Albrecht et coll., 2004). Apparemment, le système d'initiation eucaryote serait incompatible avec l'organisme procaryote. Ces résultats sous-entendent l'existence d'une voie d'initiation indépendante des glycogénines. Ugalde et coll. (2003) ont proposé un nouveau modèle d'initiation de la synthèse du glycogène chez *Agrobacterium tumefaciens* dans lequel la glycogène-synthétase serait responsable de l'initiation de la synthèse du glycogène *de novo*. En réalité, cette protéine comporte trois activités dont l'autoglycosylation, l'initiation et l'élongation des glucanes.

Récemment, une découverte surprenante chez la levure a remis en question la nécessité de la glycogénine et suggère la présence d'un contournement de cette protéine dans la voie de la synthèse du glycogène. En effet, Torija et coll. (2005) ont observé qu'une petite proportion d'individus doubles mutants de la levure (*glg1-/glg2-*) déficients pour les deux formes de glycogénine étaient tout de même capables d'accumuler du glycogène. Les auteurs rapportent que cette initiation de la synthèse du glycogène en absence des glycogénines doit être due à l'hyperactivité de la glycogène-synthétase ou à l'existence d'une amorce alternative inconnue qui est sous le contrôle du locus *TPS1*, le gène de la tréhalose-6-phosphate synthétase. En effet, la délétion de *TPS1* accroît les concentrations intracellulaires d'UDP-glucose et de glucose-6-phosphate qui sont respectivement le substrat et l'activateur de la glycogène-synthétase. Mais il est improbable que la glycogène-synthétase initie la synthèse toute seule, car cette enzyme de levure, au contraire de celle d'*Agrobacterium tumefaciens*, est incapable d'initier la synthèse du glycogène après son expression hétérologue chez *Agrobacterium tumefaciens* (Ugalde et coll., 2003).

Chez les plantes, l'initiation de la synthèse de l'amidon n'est pas encore établie. Quel modèle s'applique dans ce

cas? Celui des mammifères et des champignons? Celui des bactéries? Ou un troisième modèle non encore décrit? L'amidon-synthétase soluble I du maïs semble capable de synthétiser des  $\alpha$ -glucanes à partir d'ADP-Glc sans avoir besoin d'une amorce (Imparl-Radosevich et coll., 1998). Mais la technique employée dans cette expérience ne peut pas assurer l'élimination totale d'amorces endogènes associées à cette enzyme. Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle la synthèse de l'amidon pourrait être initiée par une amidon-synthétase reste très attractive et mérite une recherche des plus attentives. D'ailleurs très récemment Roldan et coll. (2007) ont rapporté l'implication très probable chez *A. thaliana* d'une des formes d'amidon-synthétases solubles (la SS4) dans le mécanisme d'initiation de la synthèse de l'amidon. Cependant, le mécanisme précis par lequel la SS4 initie la synthèse de l'amidon chez *A. thaliana* n'est pas encore décrit. La présence d'amidon résiduel dans le mutant nul pour la SS4 indique cependant que cette enzyme n'est pas la seule à être impliquée dans ce processus.

La découverte des glycogénines animales et fongiques a encouragé les chercheurs à s'investir dans la recherche d'homologues qui interviendraient dans la biosynthèse de l'amidon. Ainsi, certaines protéines aux propriétés

d'autoglycosylation ont été trouvées, mais finalement, il est prouvé que ces protéines forment des liaisons de type  $\beta$  O-glycosidiques et s'engagent plutôt dans la biosynthèse des constituants polysaccharidiques de la paroi végétale comme la cellulose ou les xyloglucanes (Singh et coll., 1995; Dhugga et coll., 1997). Grâce à la publication de la séquence complète du génome d'*Arabidopsis thaliana*, huit gènes qui présentent des homologies avec les glycogénines de mammifères et de levures ont été mis en évidence. Chatterjee et coll. (2005) ont fortement réduit l'expression d'une de ces glycogénines dans une souche transgénique par la technique d'ARN interférence. Ils ont rapporté que cette souche présentait une réduction dramatique du contenu de l'amidon. Mais les auteurs n'ont décrit le phénotype d'accumulation d'amidon que par une simple coloration à l'iode des feuilles. Cela nous paraît être insuffisant pour conclure à une fonction de cette protéine dans l'initiation de l'amidon. Certaines analyses supplémentaires, par exemple le dosage précis de l'amidon, l'analyse de l'autoglycosylation ou la synthèse des oligosaccharides *in vitro* nous donneraient une compréhension plus globale vis-à-vis de ce type de protéine.

Une autre façon de fournir les amorces pour la synthèse de l'amidon a été découverte d'une observation surprenante

chez *Ostreococcus tauri*, une algue unicellulaire qui représente aujourd'hui la plus petite cellule eucaryote connue (Ral et coll., 2004). Son unique et volumineux grain d'amidon au sein du chloroplaste se divise en deux lors de la segmentation de ce chloroplaste. Cette division engendre une répartition égale du grain d'amidon dans chacun des deux plastes. Le polymère subit ensuite un nouveau cycle de croissance puis de division. Dans le petit génome nucléaire de cette algue picophytoplanctonique, on peut avec surprise retrouver toutes les séquences requises du métabolisme de l'amidon comme chez le maïs, ou le blé (alors que la plupart des autres voies métaboliques ou de régulation ont été fortement simplifiées). Néanmoins, aucune séquence homologue à celle des glycogénines n'a été découverte dans ce génome (le même constat peut-être effectué pour une autre algue unicellulaire dont le génome nucléaire a été séquencé : *Chlamydomonas reinhardtii*). De plus, les auteurs ont indiqué que l'amidon n'avait jamais pu être éliminé totalement d'*O. tauri* même par une incubation prolongée à l'obscurité. Ainsi, ce système d'initiation de l'amidon resterait très particulier chez *O. tauri* en comparaison des autres végétaux, parce qu'un mécanisme d'initiation *de novo* deviendrait dispensable chez cette algue.

#### **b. La synthèse du glucosyl-nucléotide précurseur**

La voie métabolique pour l'accumulation de polyglucane fut élucidée par Leloir et ses collègues dans les années 1950 après la découverte des nucléotides-sucres (Leloir et coll., 1971). C'est la première fois qu'une étude montrait que la synthèse du polyglucane utilise une forme de glucose activée, spécialement l'UDP-Glucose pour la synthèse du glycogène chez les mammifères et les champignons, alors que l'ADP-Glc est privilégié par des enzymes végétales et bactériennes. L'ADP-Glc est utilisé presque exclusivement comme précurseur glucidique pour la synthèse de l'amidon, bien que la recherche récente sur une algue rouge *Guillardia theta* (Deschamps et coll., 2006) ait démontré que chez cet organisme une enzyme de type de GBSS consomme l'UDP-glucose ainsi que l'ADP-Glc pour engendrer un polysaccharide de type amidon. L'ADP-Glc est synthétisé à partir de l'ATP et du glucose-1-phosphate (G-1-P) par une enzyme appelée l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, E.C.2.7.7.27) en présence d'ions divalents  $Mg^{2+}$ . Le G-1-P provient de l'isomérisation du G-6-P par la phosphoglucomutase (PGM, EC 2.1.5.1). Le G-6-P est le produit de la phosphorylation du glucose par l'hexokinase (EC 2.7.1.1). Finalement, le glucose découle directement du cycle

Calvin qui assimile le CO<sub>2</sub> atmosphérique dans les tissus photosynthétiques (sources). Pour les organes non photosynthétiques (puits), la dégradation du saccharose contribue également en grande partie à fournir du glucose.

La formation de l'ADP-Glc est considérée comme la porte d'entrée de la synthèse de l'amidon en raison de la fonction unique de cette molécule. L'AGPase, l'enzyme qui synthétise l'ADP-Glc est ainsi déterminée comme une enzyme clé dans la régulation du métabolisme de l'amidon. Dans les organes photosynthétiques dont les feuilles de plantes supérieures et les algues vertes, les AGPases sont localisés au sein des chloroplastes (Preiss, 1982). Ce fait est prouvé par la possibilité de synthétiser l'amidon à partir de chloroplastes isolés tout en conservant leur intégrité à la condition de fournir une source de CO<sub>2</sub> et de lumière (Heldt et coll., 1977). En revanche, la localisation de l'AGPase dans les cellules non photosynthétiques est plutôt controversée. Par immuno-localisation et analyse des chloroplastes intacts, la coexistence de deux formes de l'AGPase dont une forme plastidiale et une forme cytosolique a pu être observée dans les organes non photosynthétiques de la pomme de terre et de la plupart des céréales telles que le maïs, le blé et l'orge (Denyer et coll., 1996 ; Thorbjornsen et

coll., 1996b ; Burton et coll., 2002). En réalité, l'activité de l'AGPase chez les céréales est principalement retrouvée dans la fraction cytosolique. Denyer et coll. (1996) ont mesuré que la proportion de l'activité AGPase de la forme plastidiale du maïs ne comptait que pour 5% de l'activité globale. Plus tard un autre groupe a déclaré que l'activité AGPase plastidiale de l'orge atteignait à peine 15% (Johnson et coll., 2003). La fonction de l'AGPase cytosolique est encore sujette à débat, mais un transporteur de l'ADP-Glc situé à la membrane de l'amyloplaste a été découvert par Pozueta-Romero et coll. (1991) chez *Acer pseudoplatanus* L., puis analysé précisément par Shannon et coll. (1998) dans les amyloplastes d'endosperme du maïs. Cette protéine baptisée Bt1 (Brittle-1) conserve dans sa séquence un motif commun KTGGL nécessaire à la fixation de l'ADP-Glc et retrouvé dans les séquences d'amidon- et de glycogène-synthétases. Cette protéine est supposée tenir le rôle important de transporter l'ADP-Glc du cytosol, où il est synthétisé, à l'amyloplaste, où se déroule la synthèse du polysaccharide. La fonction de cette protéine est confirmée par les phénotypes des mutants *btl* qui montrent une sévère diminution du contenu en amidon et une suraccumulation d'ADP-Glc.

Si l'AGPase bactérienne se présente sous une forme homotétramérique,

l'AGPase végétale est toujours un hétérotétramère qui est composé de deux petites sous-unités  $\alpha$  (50-54 kDa) et deux grandes sous-unités  $\beta$  (51-60 kDa). La fonction des unités respectives est clarifiée par l'analyse de nombreux mutants. Si la mutation au locus *ADG1*, le gène qui code la petite unité de l'AGPase d'*Arabidopsis*, entraîne une perte totale de l'activité de l'AGPase et de la synthèse de l'amidon (Lin et coll., 1988a ; Wang et coll., 1998), le mutant *adg2* déficient pour l'expression de la grande unité contient encore environ 5% de l'activité AGPase sauvage et environ 40% d'amidon (Lin et coll., 1988b ; Wang et coll., 1997). Un résultat similaire a été obtenu à partir des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* : *stal* et *sta6* (Zabawinski et coll., 2001 ; van den Koornhuyse et coll., 1996). Toutes ces preuves suggèrent que l'expression de la petite sous-unité de l'AGPase, qui est désignée comme unité catalytique, détermine définitivement la présence de l'activité enzymatique, mais la fonction totale de l'enzyme nécessite l'existence de la grande sous-unité comme régulatrice. Chez *Arabidopsis*, il existe 4 grandes sous-unités génétiquement indépendantes (APL1, APL2, APL3 et APL4) et 2 petites sous-unités (APS1 et APS2), APS2 n'ayant apparemment pas d'activité significative. Crevillen et coll. (2005) ont exprimé et recombiné l'APS1 avec 4 grandes unités

respectivement chez *E. coli*. Les quatre recombinants présentent des sensibilités distinctes face aux effecteurs allostériques ainsi qu'une affinité différente face aux substrats. Ce résultat nous suggère que l'activité de l'AGPase d'*Arabidopsis* pourrait être régulée avec une certaine plasticité puisque les quatre grandes sous-unités s'expriment très probablement dans des tissus ou des conditions différents.

La plupart des AGPases déjà caractérisées jusqu'à présent sont régulées allostériquement par les petites molécules qui agissent comme des effecteurs. Généralement, les activateurs sont les métabolites importants qui signalent une profusion de carbone et d'énergie à l'intérieur de cellule, tandis que les inhibiteurs indiquent une pénurie d'énergie. Par exemple, les AGPases bactériennes sont activées par les intermédiaires issus de la glycolyse ou la voie d'Entner Doudoroff (par exemple le Fru-1,6-biP le Fru-6-P ou le pyruvate), et inhibées par l'AMP, l'ADP et le Pi (Preiss, 1984). Dans les tissus photosynthétiques, la régulation de ces enzymes se conforme à la même règle, et se joue essentiellement entre l'activation par le 3-phosphoglycérate (3-PGA) et l'inhibition par le Pi.

Ballicora et coll. (1999) ont pu démontrer *in vitro* que l'état redox de cette enzyme pouvait être régulé par la thiorédoxine f ou m dans les dicotylédones.

Le déclenchement de cette modification redox n'est pas encore totalement élucidé, mais la lumière et la fourniture en saccharose sont déjà reportées comme stimulatrices de cette modification (Hendriks et coll., 2003). Enfin, les résultats de Zabawinski et coll. (2001) suggèrent une rythmicité de la transcription de l'AGPase et de son activité sous contrôle de l'horloge circadienne.

Donc, la modulation de la synthèse de l'amidon est étroitement influencée par l'activité de l'AGPase. Cette enzyme répond très sensiblement à plusieurs signaux physiologiques ou environnementaux qui indiquent l'état d'énergie ou l'abondance de carbone dans l'organisme.

### **c. L'élongation des glucanes**

Après la synthèse de précurseurs, ce sont les amidon-synthétases (ou ADP-Glc  $\alpha$ -1,4-glucane  $\alpha$ -4-glucosyltransférases EC 2.4.1.21) qui prennent en charge de transférer le résidu de glucose de l'ADP-Glc vers l'extrémité non réductrice d'un  $\alpha$ -1,4-glucane par la création d'une nouvelle liaison O-glycosidique de type  $\alpha$ -1,4. Si la synthèse du glycogène n'exige qu'une seule glycogène-synthétase, la synthèse du polysaccharide végétal nécessite l'action de plusieurs isoformes. Celles-ci peuvent être divisées en deux groupes : les amidon-synthétases liées à la matrice du grain

d'amidon (ou GBSS pour granule-bound starch synthase) et les amidon-synthétases solubles retrouvées dans le stroma du plaste.

#### **a) La synthèse de l'amylose**

##### **Les amidon-synthétases liées au grain (GBSS)**

Ce groupe de protéines se caractérise par la liaison au grain d'amidon. Cette particularité est révélée par son inaccessibilité face aux protéases (Rahman et coll., 1995) et sa résistance au traitement par des détergents (Tanaka, 1967). On connaît actuellement deux amidon-synthétases appartenant à ce groupe, les GBSSI et GBSSIIb. Depuis le travail fondamental de Nelson et Rines dans les années 1960, nous savons déjà que la GBSSI est l'unique enzyme responsable de la synthèse de l'amylose. Les analyses de nombreux mutants pour la GBSSI ont permis de conforter cette hypothèse. Parmi ces mutants, nous pouvons citer ceux du maïs *waxy* (Sprague, 1933 ; Nelson et Hines, 1962 ; Tsai, 1974 ; Echt et Schwartz, 1981 ; Schure et coll., 1983), du riz (Murata et coll., 1965 ; Sano, 1990 ; Villareal et Juliano, 1986), de l'orge (Eriksson, 1969 ; Ishikawa et coll., 1995 ; Bhatti et Rossnagel, 1997), du blé (Nakamura et coll., 1995), de la pomme de terre *amf* (Hovenkamp-Hermelink et coll., 1987), du pois *lam* (Denyer et coll., 1995)

et *sta2* de *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et coll., 1992). Selon des analyses structurales effectuées sur ces mutants, l'absence de l'activité GBSSI abolit la synthèse de l'amylose sans perturber la formation de grains d'amidon semi-cristallins et insolubles dans l'eau (Buléon et coll., 1997). Il est intéressant de noter que pour le mutant du maïs *waxy*, du blé *wx* ou du riz *wx*, l'activité GBSS est toujours présente dans les tissus tels que les embryons, les feuilles, les péricarpes ou les racines, alors qu'elle est totalement absente dans les endospermes (Nelson et Tsai, 1964 ; Blackeney et Matheson, 1984 ; Fujita et Taira, 1998). Ces observations indiquent l'existence d'une deuxième forme de GBSS dans les tissus sources.

### GBSSI

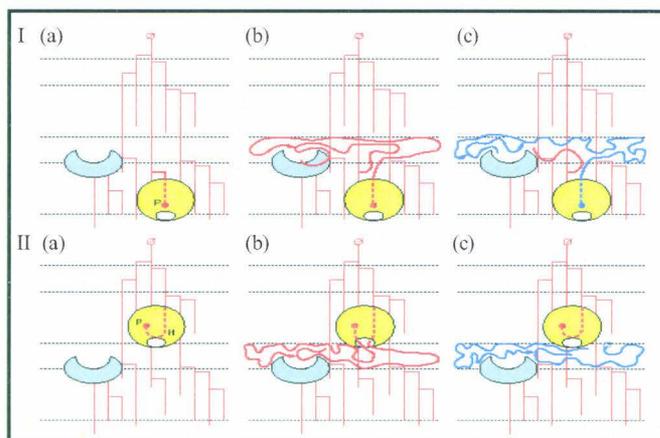
La GBSSI est une protéine d'un poids moléculaire de 58 à 60 kDa chez la plupart des végétaux. L'exception est l'enzyme de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Celle-ci présente une extension carboxy-terminale de 11 kDa absente des autres GBSSI, ce qui lui confère une masse de 76 kDa. La séquence peptidique de la GBSSI présente une forte similarité avec celles des autres isoformes d'amidon-synthétases ou encore de glycogène-synthétases. Plusieurs modèles tentant d'expliquer le mécanisme de synthèse de l'amylose par la GBSSI ont

été présentés. Denyer et coll. (1996) ont réalisé une série d'expériences de synthèse *in vitro* d'amylose à partir de grains d'amidon purifiés de l'embryon du pois et d'ADP-Glc radiomarqué par  $^{14}\text{C}$ . Les auteurs ont observé que le  $^{14}\text{C}$  était intégré dans l'amylopectine comme dans l'amylose. De plus, les auteurs ont indiqué que ces glucanes synthétisés *in vitro* dans l'amylopectine par la GBSSI, étaient considérablement plus longs que la moyenne de la longueur de chaînes de l'amylopectine « normale ». Par contre, après l'ajout de 100mM de malto-oligosaccharides dans la solution d'incubation, ce résultat est radicalement modifié. L'incorporation de  $^{14}\text{C}$  dans la fraction amylose devient alors prédominante. Selon ces faits, Denyer et coll. (1996) suggèrent que les malto-oligosaccharides, en comparaison de l'amylopectine, sont des substrats préférentiels de la GBSSI et jouent le rôle d'amorce de la synthèse de l'amylose *in vivo*.

La stimulation de la synthèse de l'amylose en présence de malto-oligosaccharide est également confirmée par les expériences effectuées sur l'amidon isolé de *Chlamydomonas reinhardtii* (van de Wal et coll., 1998). Les auteurs ont utilisé une source d'amidon avec une teneur initiale très réduite en amylose (l'amidon est purifié d'une souche mutante

pour la grande sous-unité de l'AGPase cultivée en condition de croissance exponentielle). Après une courte incubation avec l'ADP-Glc radiomarqué, la majeure partie de la radioactivité est incorporée dans l'amylopectine. Mais par des expériences de Pulse-Chase sur des temps plus longs, ces auteurs ont observé un net transfert de matériel radiomarqué depuis l'amylopectine vers l'amylose. Ainsi, une autre hypothèse concernant le mécanisme de synthèse de l'amylose est proposée par Ball et coll. (1998) (figure 5). Ils suggèrent que la GBSSI utilise plutôt les longues chaînes de l'amylopectine comme substrats pour synthétiser un précurseur de l'amylose covalentement lié à l'amylopectine. Ensuite par un mécanisme d'hydrolyse inconnu (soit par l'intermédiaire d'enzymes de branchement ou d'amylases qui se trouvent dans le grain d'amidon, soit par la GBSSI elle-même), les molécules de pré-amylose sont relarguées depuis l'amylopectine pour former l'amylose mature. Selon ces auteurs, l'activation de la synthèse de l'amylose par les malto-oligosaccharides est une conséquence de l'immobilisation de la GBSSI dans la matrice polysaccharidique de l'amylopectine, ainsi que de l'inaccessibilité des substrats (extrémités non-réductrices libres). Denyer et coll. (1999) ont réalisé des expériences similaires sur l'amidon de pois. Mais ils

ont déclaré qu'aucun transfert de glucanes de l'amylopectine vers l'amylose n'est observé après une incubation de 6h. Jusqu'à présent, le mécanisme précis de la



**Figure 5 :** modèle 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-clair 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.

synthèse de l'amylose reste sujet à controverse et mérite des expériences supplémentaires afin d'être totalement élucidé.

## GBSSIb

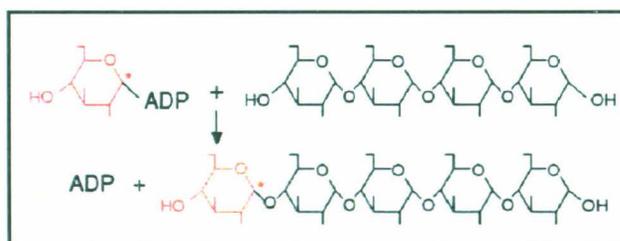
La fonction de cette protéine a été découverte grâce à la présence d'amylose dans certains tissus de la plante chez le mutant *waxy*. Plus tard, il a été montré que c'est une autre enzyme qui synthétise l'amylose dans certains organes tels que le péricarpe du blé (Nakamura et coll., 1998) ou l'embryon du pois (Denyer et coll., 1997). Comme la GBSSI, cette enzyme, appelée GBSSIb, est localisée au sein du grain d'amidon. L'analyse de la séquence de l'extrémité Nter de la GBSSIb du blé démontre que cette protéine présente une forte homologie de séquence avec la GBSSI du blé, du maïs ou de la pomme de terre.

### b) La synthèse de l'amylopectine : les amidon-synthétases solubles

Dans la partie précédente de ce manuscrit, nous avons présenté la complexité de la structure de l'amidon. Cette complexité provient majoritairement de celle de l'amylopectine. La complexité de la structure de l'amylopectine suggère qu'il doit exister une machinerie enzymatique complexe pour en accomplir la synthèse. En réalité, plusieurs types d'enzymes, qui remplissent des fonctions données, interviennent dans l'édification de l'amylopectine. Nous pouvons citer les amidon-synthétases solubles, qui allongent

les  $\alpha$ -(1,4) glucanes en utilisant l'ADP-Glc (figure 6) ; les enzymes de branchement, qui introduisent les liaisons  $\alpha$ -(1,6) ; les enzymes de débranchement, qui « élaguent » les chaînes inappropriées pour une édification correcte de la structure finale de l'amylopectine ; et enfin, les enzymes disproportionnantes, qui hydrolysent et reforment des liaisons  $\alpha$ -1,4 entre glucanes. Afin de faciliter la compréhension du mode de fonctionnement de ces enzymes, elles vont être présentées séparément dans la suite de ce propos.

Contrairement à la situation qui vient d'être décrite pour l'amylose, qui est synthétisée par une seule enzyme, les chaînes de l'amylopectine sont allongées par plusieurs amidon-synthétases solubles (EC 2.4.1.21). Li et coll. (2003) ont classifié les amidon-synthétases végétales en cinq groupes selon leurs homologies en termes de séquences peptidiques. Les amidon-synthétases solubles sont réparties



**Figure 6:** 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.

en quatre groupes : SSI, SSII, SSIII et SSIV. Cette multiplicité est retrouvée au sein des organismes les plus « primitifs » tels qu'*Ostreococcus tauri*, chez qui on peut déjà identifier 3 groupes d'amidon-synthétases solubles (Ral et coll., 2004). De plus, chez les céréales il peut exister des isoformes pour chaque forme de protéine. Par exemple, chez le riz, on compte trois isoformes pour la SSII et deux isoformes pour la SSIII ou la SSIV (Fujita et coll., 2006). Cette redondance d'isoformes augmente la difficulté de discerner la fonction assurée par chacune d'entre elles. La présentation de ces amidon-synthétases solubles suivra l'ordre de classification abordée ci-dessus.

L'enzyme nommée SSI est une protéine d'environ 67 kDa. Une série de travaux pionniers ont été réalisés en exprimant cette protéine chez *E. coli* (Guan et Keeling, 1998 ; Commuri et Keeling, 2001). Guan et Keeling ont observé que la SSI préfère synthétiser les courtes chaînes de DP 6 à DP 15. Un résultat similaire était obtenu sur la SSI recombinante du maïs exprimée chez *E. coli*. Ces expériences *in vitro* ont démontré que la SSI est incapable d'allonger les glucanes supérieur à DP 10. Mais, en absence de lignée mutante, la fonction de cette enzyme *in vivo* restait encore ambiguë. Kossmann et coll. (1999) ont produit une souche de pomme de terre dans laquelle l'activité de la SSI était

inhibée par l'expression d'un ARN antisens. Mais aucun changement significatif n'a été observé dans cette souche. Les auteurs estimèrent que la SSI ne contribuait que très peu à la synthèse des glucanes dans le tubercule de pomme de terre. Le premier mutant pour la SSI chez *A. thaliana* fut produit et analysé par Delvallé et coll. (2005). Les auteurs ont observé une diminution d'un quart de la quantité d'amidon et une légère augmentation de la teneur en l'amylose. Mais le caractère le plus remarquable de ce mutant est qu'il affiche une distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine totalement différente de celle du sauvage. En réalité, dans ce mutant la proportion des chaînes courtes (DP8 - DP 12) est considérablement réduite. En revanche, la quantité des chaînes moyennes (DP17 - DP 20) devient plus importante par rapport au sauvage. Les auteurs indiquent que les chaînes qui manquent dans ce mutant sont effectivement synthétisées *in vitro* par la SSI recombinante. Ainsi, ils suggèrent qu'*in vivo* comme *in vitro*, la fonction de la SSI serait de synthétiser les chaînes les plus courtes et les plus externes de l'amylopectine. Récemment, Fujita et coll. (2006) ont publié l'analyse d'un mutant de la SSI du riz qui présente le même type de modification structurale de l'amylopectine.

La SSII fut nommée incorrectement GBSSII dans le passé puisque cette

protéine est piégée lors de la croissance du grain mais ne participe en aucune façon à la synthèse de l'amylose (Denyer et coll., 1995). Contrairement à la SSI, les chercheurs prirent rapidement conscience de l'implication de la SSII dans la synthèse de l'amylopectine. Ils purent, en effet, analyser de nombreux mutants, tels que le mutant du pois (*rugosus5*, Craig et coll., 1998), de l'orge (*sex6*, Morell et coll., 2003), du maïs (*su2*, Zhang et coll., 2004), du blé (*GSP-1 null*, Yamamori et coll., 2000 ) et du riz (Umemoto et coll., 2002). La structure de l'amylopectine chez ces mutants est partout inévitablement altérée : la proportion des chaînes courtes (DP 8-DP 12) augmente, tandis que celle des chaînes intermédiaires (DP 13-DP 25) baisse. Nakamura et coll. (2005) ont confirmé le rôle de cette protéine *in vitro*. Les chaînes de l'amylopectine du riz (variété *japonica* qui possède plus de chaînes courtes DP $\leq$ 10) sont remarquablement prolongées par la SSIIa recombinante (clonée de la variété *indica*). Cette protéine recombinante est capable d'allonger les chaînes inférieures à DP11 pour former une population de chaînes depuis DP13 jusqu'à DP25, tandis qu'elle reste inactive pour les chaînes qui dépassent DP29. Ainsi, la SSII est considérée comme responsable de la formation des chaînes intermédiaires (chaînes B1).

Parmi toutes les amidon-

synthétases solubles, la SSIII est sans doute la mieux étudiée, pourtant son rôle précis reste encore à élucider. D'après les travaux effectués sur 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 (Edwards et coll., 1999), la déficience de cette protéine provoque des phénotypes variés selon les modèles étudiés. Le changement le plus flagrant était observé chez le mutant *sta3* de *C. reinhardtii*. Ce mutant n'accumule qu'environ 40% d'amidon par rapport au sauvage. Au niveau de la structure de l'amylopectine, la proportion des chaînes très courtes (DP2 - DP7) augmente, en s'accompagnant d'une baisse relative du taux des chaînes intermédiaires (DP8 - DP50) et une transition du type cristallin de A à B (Buléon et coll., 1997). Cependant, ces mutants ou lignées transgéniques provenant de différents organismes montrent tous des modifications structurales du grain d'amidon. Récemment, une série d'analyses a été effectuée sur un mutant de la SSIII d'*Arabidopsis thaliana* par Zhang et coll. (2005). De manière surprenante, les auteurs ont observé une suraccumulation de l'amidon à la fin de la journée par rapport au sauvage. De plus, le nombre de très longues chaînes (DP>40) diminue

dans l'amylopectine du mutant en comparaison du sauvage. Néanmoins, on y observe comme dans le mutant *sta3* plus de courtes chaînes de DP<10 et moins de chaînes entre DP 11 et DP 22. Ainsi, ils proposent une nouvelle hypothèse : la SSIII aurait un rôle de régulation négative au cours de la synthèse de l'amidon. Cependant, le mécanisme précis n'est pas connu. On peut toutefois imaginer l'implication de la SSIII dans des complexes multienzymatiques hétérogènes comme c'est vraisemblablement le cas chez le maïs (cf le mutant *dull1* chez lequel l'absence de la SSIII déstabilise l'activité d'une enzyme de branchement) (Gao et coll., 1998). De fait, en son absence, les complexes seraient dérégulés, conduisant ainsi à une augmentation du contenu en amidon dans les feuilles de la plante.

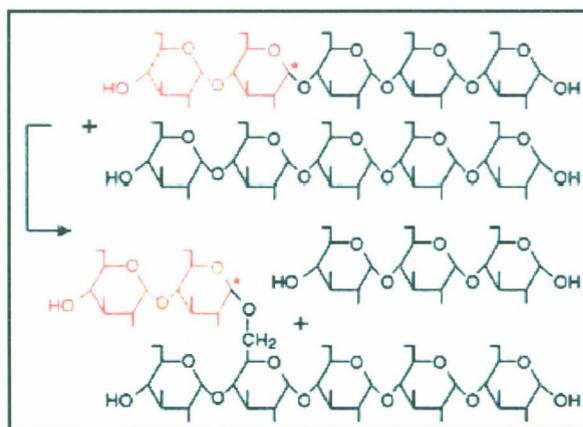
Récemment, le premier mutant pour la SSIV était produit et analysé chez *A. thaliana* par Roldan et coll. (2007). Les auteurs rapportent que la déficience pour cette protéine conduit au ralentissement du métabolisme de l'amidon. Cependant le phénotype le plus remarquable observé chez ce mutant, c'est qu'il produit moins de grains d'amidon par chloroplaste et en conséquence, la taille des grains d'amidon est considérablement plus grande que la normale. Ainsi, les auteurs suggèrent que cette protéine est impliquée dans le métabolisme d'initiation de la synthèse de

l'amidon. Néanmoins, le mécanisme précis par lequel la SSIV initie la synthèse de l'amidon n'est pas encore connu.

#### d. Les enzymes de branchement

Comme nous l'avons vu, la différence principale entre l'amylose et l'amylopectine est le niveau de ramification. En fait, la ramification modérée de l'amylopectine lui assure une conformation tridimensionnelle compatible avec son insolubilisation et sa cristallisation. L'introduction des points de branchement dans la molécule d'amylopectine est réalisée par une famille d'enzymes : les enzymes de branchement ou SBE (pour Starch Branching Enzyme, EC 2.4.1.18).

Cette famille d'enzymes catalyse la formation de la liaison glucosidique  $\alpha$ -1,6 en hydrolysant une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un glucane et en greffant l'extrémité



**Figure 8 :** 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  $\alpha$ -1,6 sont indiqués en rouge.

réductrice du malto-oligosaccharide libéré, en position C6 d'un autre glucane ou sur lui-même (Myers et coll., 2000 ; Rydberg et coll., 2001). Cette réaction accroît le nombre d'extrémités non réductrices disponibles pour les amidon-synthétases. Ainsi, ce type d'enzymes favorise l'incorporation des résidus de glucose dans le polysaccharide de réserve.

Selon leurs séquences en acides aminés, les enzymes de branchement sont classées en 2 familles différentes : les SBEIs ou la famille B et les SBEIIs ou la famille A (Burton et coll., 1995 ; Smith et coll., 1995). Dans les génomes de toutes les plantes déjà étudiées, il existe seulement une SBEI. Chez les plantes dicotylédones, il n'existe qu'une seule SBEII, tandis que deux SBEIIs codées par deux gènes différents sont observées chez les monocotylédones. Néanmoins la situation est différente chez *Arabidopsis thaliana* (une dicotylédone), où coexistent deux SBEII dont les activités sont largement redondantes (Dumez et coll., 2006). Un troisième gène de SBE est repéré dans le génome d'*A. thaliana*, néanmoins l'analyse *in silico* révèle que la séquence peptidique de cette protéine n'appartient pas à la famille SBEI (Dumez et coll., 2006).

#### a) Les SBEIs (famille B)

Selon les observations réalisées

jusqu'à présent, la SBEI s'exprime majoritairement dans les organes de réserve. Les SBEIs se distinguent de leurs homologues, les SBEIIs, par une affinité *in vitro* plus importante vis à vis des polymères peu ramifiés, tel que l'amylose. En effet, l'étude cinétique de l'activité de la SBEI recombinante montre que cette enzyme peut brancher l'amylose jusqu'à 10 fois plus vite que l'amylopectine (Takeda et coll., 1993 ; Guan et Preiss, 1993 ; Guan et coll., 1994 ; Guan et coll., 1995 ; Guan et coll., 1997).

Les expériences menées par Rydberg et coll. (2001) nous permettent de mieux comprendre le mécanisme de ramification des isoformes de SBEs. Un mélange de dextrans linéaires de DP 8 à 200 a été incubé avec deux enzymes de branchement recombinantes de la pomme de terre : SBEI et SBEII (les enzymes sont incubées séparément). Les auteurs suggèrent que les deux SBEs réalisent la réaction de branchement d'une façon intra-chaîne, en ce basant sur le fait qu'aucun accroissement du poids moléculaire n'est observé après une incubation de 16 heures. Le débranchement du produit après l'incubation offre un profil plus précis de l'activité des deux isoformes : la SBEI et la SBEII sont toutes les deux capables de produire les chaînes de DP 6 à DP 9. Mais la SBEI de pomme de terre affiche une activité plus importante sur les substrats

linéaires longs en donnant une augmentation de la population de chaînes de DP 29 à DP 30, alors que la SBEII forme une plus large population de chaînes intermédiaires avec un pic à DP13-14.

Le premier mutant déficient pour la SBEI a été décrit par Blauth et coll. (2001) chez le maïs. Les études *in vivo* sur ce mutant révèle que le défaut de cette enzyme n'a que peu d'influence sur la biosynthèse de l'amidon et la structure de l'amylopectine. Cependant Satoh et coll. (2003) rapportent que l'absence de la protéine SBEI chez le riz produit un subtil changement de la structure de l'amylopectine. La répartition de chaînes de DP 12 à DP 21 et de chaînes supérieures à DP 37 est à la baisse, et à l'inverse celle de chaînes de DP 24 à DP 34 et de chaînes courtes inférieures à DP 10 est augmentée. Ainsi, les auteurs suggèrent que la SBEI intervient spécifiquement dans la synthèse des chaînes de type B<sub>1</sub> et B<sub>2-3</sub>.

#### b) Les SBEIIs (famille A)

Contrairement aux isoformes de type I, les enzymes de branchement de type II semblent être plus efficaces sur l'amylopectine. Elles sont capables de transférer des glucanes courts (DP 3 à 9, avec un maximum à DP 6-7) à partir d'une chaîne comportant au minimum 12 résidus de glucose (Takeda et coll., 1993 ; Guan et preiss, 1993 ; Guan et coll., 1994 ; Guan et

coll., 1995 ; Guan et coll., 1997).

Nous avons cité dans la partie précédente deux isoformes de SBEII, nommées SBEIIa et SBEIIb, qui coexistent chez les céréales. Ces deux isoformes, très proches en termes de séquence peptidique, sont toutefois très différentes quant à leur profil d'expression. La SBEIIa semble être exprimée plus universellement dans tous les organes, incluant les feuilles et l'albumen, tandis que l'activité de SBEIIb est observée uniquement dans l'albumen (Yamanouchi et Nakamura, 1992 ; Sun et coll., 1997, Gao et coll., 1997).

Le premier mutant pour la SBEIIa est décrit par Blauth et coll. (2001). L'annulation de l'expression de cette enzyme n'entraîne aucune modification significative de la structure de l'amylopectine dans l'albumen. Pourtant, une augmentation de la teneur en amylose du grain d'amidon et une augmentation de la population de longues chaînes sont observées dans l'amidon des feuilles. Les auteurs interprètent ce phénotype contradictoire par la présence de l'activité SBEIIb redondante dans l'albumen. Cette hypothèse est corroborée par l'analyse de l'amidon issu de l'albumen des mutants SBEIIb, qui sont également nommés mutant *ae* (*amylose extender*) pour le maïs et le riz, ou mutant *r* (*rugosus*) pour le pois. Dans tous les cas, la mutation du gène *SbeIIb* conduit à un accroissement de la

teneur en amylose et à une augmentation remarquable du contenu des longues chaînes (Shannon et Garwood, 1984, Kasemsuwan et coll., 1995 ; Nishi et coll., 2001 ; Tomlisson et coll., 1997).

Récemment, l'activité des enzymes de branchement a été étudiée plus en détail chez *Arabidopsis thaliana* (Dumez et coll., 2006). Les simples mutants *be1-*, *be2-* et *be3-*, (les deux derniers appartiennent à la famille SBEII), ainsi que les doubles mutants *be1- be2-*, *be1- be3-* et *be2- be3-* ont été analysés. La fonction des SBEII relativement à la ramification des courtes chaînes est confirmée dans les simples mutants *be2* et *be3*, malgré des phénotypes plus faibles en comparaison des mutants *ae* du maïs ou du riz. De plus, la protéine BEI ne semble pas nécessaire à la biosynthèse de l'amidon dans les feuilles puisqu'aucune modification structurale de l'amidon n'est décrite dans ce cas. Mais la découverte la plus surprenante vient de l'analyse du double mutant *be2- be3-* dans lequel la synthèse de l'amidon est totalement abolie et s'accompagne d'une accumulation anormalement importante de maltose cytosolique. D'ailleurs, ce mutant éprouve des difficultés de croissance. Ainsi, les auteurs concluent que les activités de BE2 et BE3 sont largement redondantes, et que leurs activités sont absolument requises pour la formation de la structure de l'amylopectine.

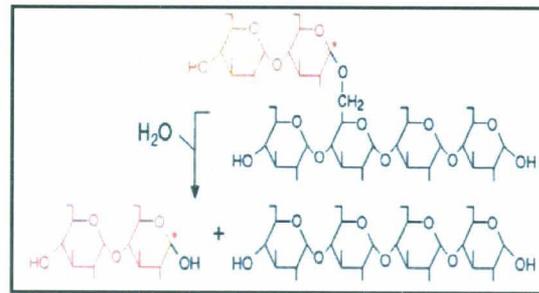
Chez les plantes monocotylédones, l'interaction entre les isoformes se déroule d'une autre façon. Seo et coll. (2002) ont analysé les fonctions de trois isoformes de SBE du maïs exprimées chez la levure en tant que système hétérologue *in vivo*. Ils ont montré que l'activité de la SBEI n'était détectable qu'en présence des deux autres isoformes. De plus, ils ont démontré la dominance de l'activité de la SBEIIa sur la SBEIIb en terme de structure des glucanes produits. Selon ces résultats, les auteurs suggèrent que les différentes isoformes de SBE interviennent de manière séquentielle dans la construction du polysaccharide de réserve. Cette conception est également soutenue par les expériences de Yao et coll. (2004). Ils ont démontré que l'absence de la SBEIa du maïs n'entraînait des modifications structurales de l'amylopectine que dans un fond génétique déficient pour la SBEIIb.

#### e. Les enzymes de débranchement

Selon les expériences de Seo et coll. (2002) qui ont été exposées dans le chapitre précédent, l'expression hétérologue de trois isoformes de SBE du maïs et de la glycogène-synthétase de la levure n'aboutissent pas à l'édification d'un polymère de structure aussi complexe, insoluble et partiellement cristalline que l'amylopectine. De plus, la comparaison du

profil de distribution de la longueur des chaînes de ce polymère avec celui de l'amylopectine du maïs montre un enrichissement plus important en chaînes courtes. Tous ces phénotypes suggèrent fortement l'existence d'un troisième groupe d'enzymes qui intervient dans la construction de l'amylopectine et s'assure d'enlever les chaînes très courtes que l'on observe après l'action des enzymes de branchement et de la glycogène-synthétase. En réalité, cette activité est effectuée par une famille d'enzymes, nommées enzymes de débranchement (DBE pour debranching enzyme) qui hydrolysent spécifiquement la liaison O-glycosidique de type  $\alpha$ -1,6 (figure 9). Ce type de fonction a été observé aussi bien chez les animaux, les bactéries ou les champignons pour le catabolisme du glycogène. Chez les plantes, les enzymes de débranchement sont regroupées en deux sous-familles : pullulanase et isoamylase. Ces deux sous-familles se distinguent par leurs capacités d'action sur le pullulane, un polymère glucanique qui est constitué de résidus de maltotriose reliés entre eux par des liaisons glucosidiques d' $\alpha$ -1,6.

#### a) Histoire et nomenclature de la pullulanase



**Figure 9 :** représentation schématique du mode d'action des enzymes de débranchement 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 d'hydrolyse catalysée par l'enzyme de débranchement.

La pullulanase tient son nom de sa possibilité d'hydrolyser le pullulane. Mais elle peut également agir sur la  $\beta$ -limite dextrine. Par contre, elle s'est avérée presque inactive sur le glycogène (Wu et coll., 2002). Au cours de l'avancée des connaissances, mise à part la pullulanase de type I qui est spécifique de l'hydrolyse des liaisons d' $\alpha$ -1,6, on a découvert également chez les bactéries la pullulanase de type II (amylopullulanase) qui agit aussi bien sur les liaisons  $\alpha$ -1,4 que sur les liaisons  $\alpha$ -1,6 du pullulane (Bertoldo et Antranikian, 2002). La pullulanase végétale, appartenant au type I classique, était appelée antérieurement limit dextrinase ou R-enzyme.

La pullulanase fut décrite pour la première fois en 1950. A l'époque, Hobson et ses collègues tentèrent de purifier l'enzyme Q (l'enzyme de branchement) à

partir de la fève. Ils ne réussirent pas la purification de cette enzyme, mais observèrent une nouvelle activité enzymatique. Cette nouvelle enzyme ne présentait aucune activité sur l'amylose pure, bien qu'elle entraînait un accroissement significatif de la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe iode-amylopectine. De plus, cette activité enzymatique était requise pour une  $\beta$ -amylolyse totale de l'amylose et de l'amylopectine. A partir de ces observations, les auteurs suggérèrent que le rôle de cette enzyme était d'hydrolyser les liaisons de type  $\alpha$ -1,6.

#### **b) Histoire et nomenclature de l'isoamylase**

A l'origine, le nom d'isoamylase a été utilisé la première fois par Maruo et Kobayashi en 1951 pour nommer une enzyme inconnue extraite de la levure de boulangerie. Cette enzyme est capable de convertir la couleur du complexe iode-« amidon waxy » du rouge au bleu violet. Maintenant, on sait qu'il s'agit bien d'une enzyme de débranchement du glycogène. Peu après, l'isoamylase fut définie comme un type d'enzyme qui hydrolyse uniquement les liaisons O-glycosidiques  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine ou du glycogène. Chez les végétaux, l'activité isoamylase a été mentionnée pour la première fois par

Manners et Rowe en 1969 au cours d'études sur le maïs doux. La présence de l'isoamylase chez les plantes était confirmée par James et coll. (1995) par une approche génétique. En effet, une cartographie de mutation par le transposon *Mu1* démontra que la mutation *sugary-1* du maïs touchait un gène de structure d'une enzyme de type isoamylase. Ces dernières années, grâce à l'avancée de la recherche en génomique, trois gènes différents codant des isoamylases ont été repérés chez toutes les espèces étudiées de la lignée verte. Dans le passé, le gène de structure de l'isoamylase 1 a été nommé *SUGARY-1* ou *SUI* chez le maïs et le riz et *ISO1* chez l'orge et le blé. Le gène codant l'isoamylase 2 était nommé *DBE1* chez *Arabidopsis*. Maintenant, l'utilisation d'*ISA1*, *ISA2* et *ISA3* comme abréviations de ces trois isoamylases est largement acceptée. Chez *Arabidopsis*, on peut trouver la présence génétique de tous les types de DBEs dont une pullulanase et trois isoamylases.

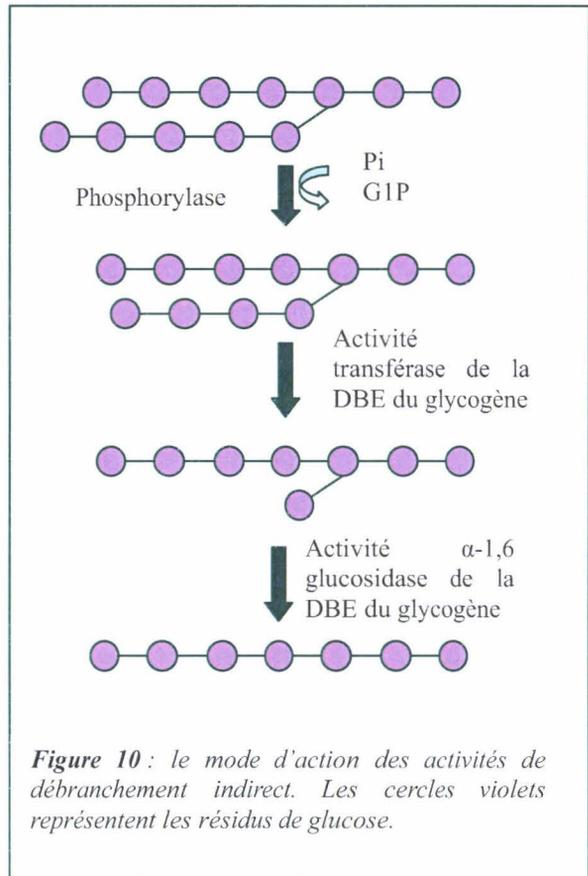
#### **c) La réaction de débranchement**

Chez les mammifères, les champignons ou les bactéries, la dégradation totale du glycogène nécessite l'action d'une enzyme de débranchement qui hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,6. Néanmoins, bien que leur fonction soit

similaire, les enzymes de débranchement du glycogène et de l'amidon agissent selon un mode très différent l'un de l'autre. Les DBEs du glycogène sont caractérisées par un débranchement en deux étapes (débranchement indirect, voir la figure 10) et les DBEs de l'amidon par un débranchement en une étape (débranchement direct, voir la figure 9).

La DBE du glycogène est une enzyme bifonctionnelle qui possède en même temps une activité de transférase ( $\alpha$ -1,4-glucanotransférase, EC 2.4.1.25) et une activité de glucosidase (amylo-1,6-glucosidase, EC 3.2.1.33) (Lee et Whelan, 1971). Ces deux activités enzymatiques coexistent dans la même chaîne polypeptidique. La coopération de la DBE du glycogène avec la phosphorylase assure une digestion complète du glycogène. La phosphorylase agit de façon récurrente à partir d'une extrémité non-réductrice pour ne laisser que quatre résidus de glucose sur une branche car elle devient alors incapable d'agir plus loin. Ensuite, la DBE du glycogène transfère un résidu de maltotriose depuis cette branche sur un glucane adjacent et le point de branchement est hydrolysé par la fonction de glucosidase de cette enzyme (figure 10).

Les enzymes de débranchement de l'amidon ne possèdent pas l'activité  $\alpha$ -1,4-glucanotransférase comme leurs homologues des animaux ou des



**Figure 10 :** le mode d'action des activités de débranchement indirect. Les cercles violets représentent les résidus de glucose.

champignons. En revanche, les DBEs de l'amidon libèrent directement les glucanes branchés par les liaisons  $\alpha$ -1,6 auxquelles elles peuvent accéder. Mais elles ne peuvent pas débrancher les chaînes latérales composées d'un seul résidu de glucose (Kainuma et coll., 1978 ; Rahman et coll., 1998 ; Wu et coll., 2002).

#### d) La famille des $\alpha$ -amylases

Comme beaucoup d'autres enzymes du métabolisme de l'amidon, les enzymes de débranchement appartiennent à la super famille des  $\alpha$ -amylases selon la classification définie par Henrissat (1991).

Tous les éléments de cette famille enzymatique expriment non seulement une similarité de la structure tridimensionnelle, mais également du mécanisme catalytique. En 1999, Kuriki et Imanaka ont défini les enzymes appartenant à la famille des  $\alpha$ -amylases selon quatre critères : (1) Elles s'activent sur des liaisons  $\alpha$ -glycosidiques. (2) Elles hydrolysent ou transfèrent des liaisons  $\alpha$ -glycosidiques en conservant leur anomérie. (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. Selon ces critères, on peut trouver dans cette famille enzymatique par exemple l' $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1), la pullulanase, l'isoamylase, l'enzyme disproportionnante et l'enzyme de branchement. En revanche, certaines exoamylases par exemple la  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2) et la glucoamylase (EC 3.2.1.3) sont exclues de cette famille,

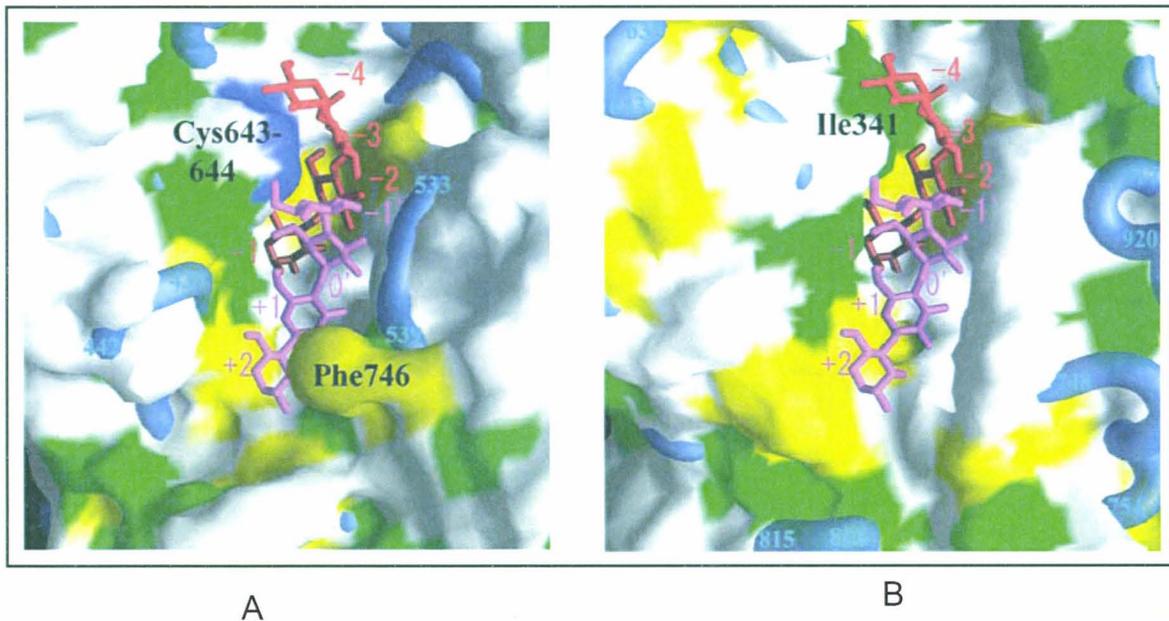


Figure 11: A représente le modèle de la fixation entre le substrat G4 et la pullulanase de *Klebsiella pneumoniae*. Les résidus aromatiques sont marqués en jaune et les résidus hydrophobiques sont représentés en vert. Les bâtonnets rouge et violet symbolisent les substrats. Le résidu Phe746 forme une configuration comme un nœud pointu au site de fixation de substrat. B représente le modèle de la fixation entre le substrat et l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*. Les résidus aromatiques sont marqués en jaune et les résidus hydrophobiques sont représentés en vert. Les bâtonnets rouges et violets symbolisent les substrats.

puisque'elles changent la configuration anomérique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) des produits libérés.

D'après des comparaisons de séquences, Nakajima et coll. (1986) ont révélé quatre régions conservées dans lesquelles trois résidus catalytiques sont strictement conservés à travers la famille des  $\alpha$ -amylases, y compris l'isoamylase et la pullulanase bactérienne. L'expérience de mutagenèse dirigée corrobore que les résidus Asp-347, Glu-422 et Asp-497 sont essentiels pour maintenir la catalyse de l'isoamylase de *Flavobacterium odoratum* (Abe et coll., 1999). De plus, un cinquième motif (YNWGYDP) est conservé spécifiquement dans les séquences de pullulanase de type I et l'isoamylase (Yanashita et coll., 1997). Ces dernières années, deux laboratoires ont effectué une analyse cristallographique respectivement sur l'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* et la pullulanase de *Klebsiella pneumoniae* (Katsuya et coll., 1998 ; Mikami et coll., 2006). Leurs études nous révèlent des informations plus détaillées concernant la structure tridimensionnelle et la fonction potentielle des DBEs de l'amidon. L'analyse structurale établit que ces deux enzymes possèdent toutes deux une structure en tonneau composée de la répétition de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  similaire à la structure classique «  $(\beta/\alpha)_8$  barrel » trouvée dans le domaine catalytique (ou domaine A), des autres

membres de cette famille (Matsuura et coll., 1984). Les cinq motifs précités sont retrouvés dans ce domaine. Néanmoins, cette structure en tonneau chez les deux DBEs en question est incomplète avec la délétion d'une hélice  $\alpha$  située entre le cinquième et le sixième feuillet  $\beta$ . Suivant ce domaine, l'extrémité C-ter est considérée comme intervenant dans la fixation du substrat. Elle est constituée de feuillets  $\beta$  qui pourraient protéger les résidus hydrophobes du domaine A du solvant (Dauter et coll., 1999 ; Lawson et coll., 1994). De plus, un autre domaine de fixation du substrat pourrait exister particulièrement au début de l'extrémité N-ter de la pullulanase comme l'indique l'analyse de la séquence peptidique (van Bueren et coll., 2004 ; Rodriguez-Sanoja et coll., 2005).

A présent, si des images assez détaillées sont déjà obtenues pour les structures tridimensionnelles des protéines de cette famille, on connaît encore très peu de choses quant à la spécificité du substrat entre les différentes enzymes. Les deuxième et troisième motifs conservés sont supposés être importants pour la spécificité du substrat. De plus, les longues boucles s'insérant entre les feuillets  $\beta$  et les hélices  $\alpha$  pourraient jouer un rôle important dans la distinction du substrat. Ces boucles, en donnant un effet de mur, s'étendent et traversent le site de fixation du substrat, influençant éventuellement son accessibilité.

Par exemple, la préférence du substrat pour l'isoamylase végétale et son équivalent GlgX d'*E. coli* est vraisemblablement liée à la longueur de la quatrième boucle située dans la structure en tonneau (Abe et coll., 1999). Quant à la préférence du substrat entre la pullulanase et l'isoamylase, Mikami et coll. (2006) suggèrent que le résidu Phe746 de la pullulanase forme une configuration comme un nœud pointu qui empêche probablement la fixation d'un substrat fortement branché tel que le glycogène (Figure 11).

Hussain et coll. (2003) ont comparé les séquences de trois isoamylases de pomme de terre (dénommées Stisa1, 2 et 3) avec celle de *Pseudomonas amyloclavata*. Ils ont trouvé que Stisa2 a perdu six résidus conservés dans le domaine A, y compris les trois résidus catalytiques, alors que les huit résidus conservés sont tous maintenus dans les séquences de Stisa1 et Stisa3. Mais il est intéressant de noter que les régions dans lesquelles les résidus conservés de Stisa2 sont substitués présentent toujours une forte similarité avec les deux autres isoamylases. Les auteurs suggèrent que très probablement Stisa2 ne possède plus d'activité hydrolytique tout en conservant l'activité de fixation du substrat. La comparaison de la séquence protéique d'Isa2 (l'orthologue chez *A. thaliana*) avec Stisa2 révèle qu'Isa2 présente la même caractéristique. Ainsi, les auteurs proposent que les conclusions

portées sur Stisa2 puissent s'appliquer de manière générale. Nous avons effectué une comparaison similaire en ajoutant les séquences disponibles des pullulanases végétales et certaines autres isoamylases. L'observation de Hussain et coll. est confirmée : les huit résidus conservés sont tous retrouvés dans les séquences d'Isa1, Isa3 et de la pullulanase concernée, alors que six résidus d'entre eux sont supprimés chez toutes les Isa2 comparées ici. De plus, on trouve que le cinquième motif spécifique de la pullulanase et de l'isoamylase est conservé également dans toutes les séquences de pullulanase, Isa1 et Isa3 comparées ici. Ce motif est presque totalement absent dans toutes les séquences d'Isa2, toutefois elles conservent le résidu de tyrosine qui est Tyr290 chez Isa1, Tyr423 chez Isa2 et Tyr309 chez Isa3. Ce résidu est important, à supposer qu'il intervienne dans la fixation du substrat (Katsuya et coll., 1998).

Vallee et coll. (1959) ont observé la présence d'un ion  $Ca^{2+}$  fortement lié à l'enzyme. Ce phénomène est déjà confirmé chez plusieurs enzymes, par exemple la Taka-amylase d'*Aspergillus oryzae* (Matsuura et coll., 1984), ou l'alpha-amylase de l'orge (Robert et coll., 2003). Dans l'isoamylase de *P. amyloclavata*, les données cristallographiques montrent la présence d'un seul site de fixation du  $Ca^{2+}$

		Région 1	Région 2	Région 3	Région 4	Région 5
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ISA1	DVVLNH	GFRFDLASI	EAWD	FICAHD	VNFWGYS
	ISA2	EVVFTH	GFCFINASS	DCWD	YISRNS	----PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EAWD	FVIAHD	VNTWGYS
	PU1	DVVYNH	GFRFDLMGH	EGWN	YVSAHD	YNWGYNP
<i>Zea mays</i>	ISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	FVCAHD	MNFWGYS
	ISA2	EVVFTH	GFCFINAPF	DPWS	YVSRNS	----PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EPWD	FVIAHD	VNTWGYS
	PU	DVVYNH	GFRFDLMGH	EGWN	YASAHD	YNWGYNP
<i>Hordeum vulgare</i>	ISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	FVCAHD	MNFWGYS
	ISA2	EVVFTH	GFCFINAPF	DPWS	YVSRNS	----PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EPWD	FVIAHD	VNTWGYS
	PU	DVVYNH	GFRFDLMGH	EGWD	YVSAHD	YNWGYNP
<i>Pisum sativum</i>	ISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	LVCAHD	VNFWGYS
	ISA2	EVVFSN	GFSFVNASH	DCWD	YISGNF	----PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASI	EPWD	FVIAHD	VNTWGYS
<i>Solanum tuberosum</i>	StISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	FVCAHD	FNFWGYS
	StISA2	EVVFTH	GFVFNASS	DNWN	YIARNS	----PYF
	StISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EPWD	FVIAHD	VNTWGYS
<i>Oryza sativa</i>	ISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	FVCAHD	MNFWGCS
	ISA2	EVVFTH	GFCFINAPF	DPWS	YVSRNS	----PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EPWD	FVIAHD	VNTWGYS
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	ISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	FVAAHD	FNFWGYS
	ISA2	QVEFCV		AVSN	AVAPLG	----GRS
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASC	EPWD	FITAHD	TNV----
<i>Spinacia oleracea</i>	PU	DVVYNH	GFRFDLMGH	EGWD	YVSAHD	YNWGYNP
<i>Escherichia coli</i>	GlgX	DIVLNH	GFRFDLAAV	EPWD	LVTAMD	
<i>Homo sapiens</i>	GDE	DVVYNH	GVRLENCHS	ELFT	MDITHD	
<i>Aspergillus oryzae</i>	$\alpha$ -AMY	DVVANH	GLRIDTVKH	EVLID	FVENHD	

Tableau 1 : les cinq régions conservées des enzymes de débranchement. Les quatre premières régions sont conservées dans tous les membres de la superfamille des  $\alpha$ -amylases. Les résidus d'acides aminés marqués en rouge représentent les résidus catalytiques.

(Katsuya et coll., 1998). Cet ion  $\text{Ca}^{2+}$  interagit avec sept résidus d'acides aminés et est apparemment impliqué dans la stabilisation de l'interface entre le domaine N et le domaine A. Par contre, cinq sites de fixation du calcium sont observés pour la pullulanase de *K. pneumoniae* (Mikami et coll., 2006). Parmi eux, deux sites sont situés dans l'interface du domaine N et le domaine A, un site est situé dans le creux catalytique. Ainsi, les ions calcium pourraient jouer un rôle considérable dans le repliement de la protéine et la catalyse de la réaction.

#### e) Les rôles des enzymes de débranchement végétales dans le métabolisme de l'amidon

Bien que le mutant *sugary-1* du maïs puisse être classé parmi les plus anciens mutants, la lésion génétique liée à cette lignée n'a pu être élucidée pendant plus d'une centaine d'années. En 1944, Sumner et Somers ont découvert qu'une partie de l'amidon était remplacée par une sorte de polysaccharide soluble structuralement similaire au glycogène dans l'albumen du mutant. Ce matériel soluble fût alors nommé phytoglycogène par les auteurs. Ce phénomène a été finalement mis en rapport avec une déficience d'activité des enzymes de débranchement (Erlander et coll., 1958 ;

Pan et coll., 1984). Néanmoins, dans la toute première période, avant la mise en place des méthodes génétiques, les fonctions respectives de la pullulanase et l'isoamylase *in vivo* étaient souvent confondues entre elles. Le phénomène d'accumulation du phyto-glycogène a été expliqué dans un premier temps par un défaut d'activité pullulanase, jusqu'en 1995, où pour la première fois James et coll. clarifièrent le phénotype du mutant *sugary-1*. Celui-ci est causé par l'insertion du transposon *Mul* dans un gène de structure qui ressemble plutôt à l'isoamylase bactérienne qu'à la pullulanase bactérienne. Désormais, la fonction de chacune de ces enzymes commence à être précisée.

#### 1) La fonction de la pullulanase

La pullulanase végétale est un type de protéine localisée dans les plastes. La protéine mature possède une masse moléculaire d'environ 100 kDa (Nakamura et coll., 1996 ; Renz et coll., 1998 ; Burton et coll., 1999 ; Zhu et coll., 1998 ; Dauvillée et coll., 2000). Plusieurs études effectuées sur la pullulanase purifiée suggèrent que cette enzyme est activée *in vitro* par des agents réducteurs tels que le dithiothréitol (DTT) ou la thiorédoxine h (Li et coll., 1992 ; Wu et coll., 2002). L'effet d'activation par des réducteurs était

également confirmé par des expériences *in vivo*. Par exemple, la surproduction de thiorédoxine h dans les grains de l'orge germés entraîne un accroissement de l'activité de la pullulanase (Cho et coll., 1999). Une autre étude sur l'enzyme d'épinard révèle que la série d'isomères observés *in vitro* avec des activités enzymatiques différentes résulte en réalité d'une variation d'état redox des enzymes (Schindler et coll., 2001). Selon les auteurs, l'état réducteur maintenu par le glutathion *in vivo* élargit la limite supérieure de pH tolérée par pullulanase (de pH7 à pH8). Ce changement permet de contrôler l'activité enzymatique par la photopériode puisque le pH du chloroplaste varie selon le jour (pH8) et la nuit (pH7). A part ce genre de régulation directe, l'enzyme pourrait bien subir un contrôle en cascade. MacGregor et coll. (2003) rapportent que la pullulanase de l'orge peut former un complexe en ratio 1:1 avec une protéine de 12,5 kDa qui inhibe l'activité de l'enzyme.

Bien qu'on ait déterminé que la pullulanase ne serait pas l'enzyme prépondérante responsable du phénotype d'accumulation du phytoglycogène dans le maïs *sugary1*, la pullulanase donne toujours à penser qu'elle est liée à l'hydrolyse de l'amidon en raison de sa spécialité enzymatique (hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6 rappelons-le). A l'aide de différentes observations expérimentales,

plusieurs groupes ont contribué à identifier l'importance de l'activité pullulanase dans les différentes étapes du métabolisme de l'amidon. Zhu et coll. (1998) suggèrent une bifonction pour la pullulanase des embryons de pois intervenant, à la fois dans la biosynthèse de l'amidon chez les embryons en développement, et dans sa dégradation au cours de la germination. Burtons et coll. (1999) en revanche, indiquent que la pullulanase de l'orge fonctionne plutôt au cours de la dégradation de l'amidon. En même temps, une conclusion opposée est donnée par la caractérisation de l'enzyme du maïs qui s'exprime abondamment dans l'albumen en formation (Beatty et coll., 1999). Néanmoins, à défaut de véritables mutants, toutes ces preuves sont encore insuffisantes pour interpréter la fonction *in vivo* de la pullulanase, puisque ces définitions ne se basent que sur une détection de l'expression de la protéine pendant le développement des graines.

L'étude d'un premier mutant du maïs pour ce gène (*Zpu1*) était rapportée par Dinges et coll. (2003). Les expériences révèlent que la pullulanase était plutôt une enzyme pléiotropique. La mutation de *Zpu1* entraîne une diminution voire une disparition de l'activité de SBEIIa et l'apparition d'une nouvelle activité de type  $\beta$ -amylase. Cette enzyme participe évidemment à l'hydrolyse de l'amidon car

ce mutant manifeste un retard de germination. La dégradation de l'amidon transitoire dans les feuilles est aussi perturbée pendant la nuit. La distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine dans les feuilles est significativement modifiée, cependant cette modification ressemble beaucoup à celle retrouvée dans le mutant de *Sbe2a* (dont l'activité est modifiée dans le mutant *zpu1-*). Ainsi, cette modification est censée être provoquée plutôt par le défaut de *SBEIIa* que par le défaut de *Zpu1*. Dans l'endosperme, la déficience de *Zpu1* n'apporte aucune modification sur la quantité, la composition de l'amidon et la structure de l'amylopectine, sauf l'apparition d'une faible quantité de malto-oligosaccharides branché chez le mutant. Cela sous-entend que la pullulanase est impliquée dans l'hydrolyse de glucanes branchés qui sont probablement produits au cours de l'élagage de la préamylopectine (Ball et coll., 1996 ; Myers et coll., 2000 ; voir plus loin pour une explication plus détaillée).

L'effet de la pullulanase devient plus flagrant lorsqu'elle est absente dans un fond génétique mutant pour l'isoamylase (Kubo et coll., 1999 ; Dinges et coll., 2003). L'accumulation de WSP (phytoglycogène) est plus importante et la quantité de l'amidon baisse plus sévèrement chez le double mutant que chez

le simple mutant de *sugary1*. L'ensemble de ces preuves suggère que la pullulanase est tout de même capable de participer à la biosynthèse de l'amidon dans l'endosperme et de combler au moins une partie de l'activité de l'isoamylase *SU1*.

Chez *Arabidopsis*, une lignée mutante *pul* et deux lignées doubles mutants *isa2-/pul-* et *isa3-/pul-* ont été sélectionnées et analysées dans le cadre de ce travail. Nous en discuterons plus loin dans les parties « résultats » et « discussion » de ce manuscrit.

## 2) La fonction des isoamylases

Après la mise en évidence du phénotype d'accumulation du phytoglycogène suite à une lésion du locus *Su1*, le gène de structure qui code *ISA1* chez le maïs (James et coll., 1995), l'activité d'une enzyme de débranchement apparaît pour la première fois comme non négligeable dans le processus de biosynthèse de l'amidon. Plus tard, il fût confirmé que la mutation du gène *ISA1* était la cause du phénotype d'accumulation du « phytoglycogène » observé dans l'albumen du mutant du riz *sugary* et du mutant de l'orge *notch2* (Kubo et coll., 1999 ; Burton et coll., 2002). L'inhibition de l'expression d'*ISA1* par l'ARN antisens provoque la même accumulation de phytoglycogène chez la pomme de terre

(Bustos et coll., 2004). L'apparition du phytoglycogène est également rapportée chez les mutants *sta7* et *sta8* de *Chlamydomonas*. Dans ces mutants, une activité isoamylase est déficiente (Mouille et coll., 1996 ; Dauvillée et coll., 2000, 2001a). Zeeman et coll. (1998) rapportèrent l'existence d'un mutant d'*Arabidopsis* *dbel* qui manifestait une accumulation importante de la quantité de phytoglycogène et une diminution drastique de la quantité d'amidon. Néanmoins, la cartographie montre que, dans cette lignée, le gène touché par la mutation est *ISA2*, un autre gène de structure d'une isoamylase.

Les phytoglycogènes issus de tous ces mutants sont structurellement parlant similaires. Ils affichent une proportion plus élevée de chaînes courtes ( $DP < 10$ ). Alors que le mutant *sta7* chez *C. reinhardtii* n'accumule plus du tout d'amidon, l'amidon résiduel présent chez les autres mutants subit également plus ou moins des altérations structurales. Le changement de la distribution de LC (longueur des chaînes) de l'amylopectine est observé dans le mutant du maïs et du riz (Dinges et coll., 2001 ; Fujita et coll., 2003), mais très peu de variations de la distribution de LC sont observées chez les mutants *sta8*, *notch2*, *dbel* et la lignée antisens de pomme de terre (Dauvillée et coll., 2001a ; Burton et coll., 2002 ; Zeeman et coll., 1998 ; Bustos

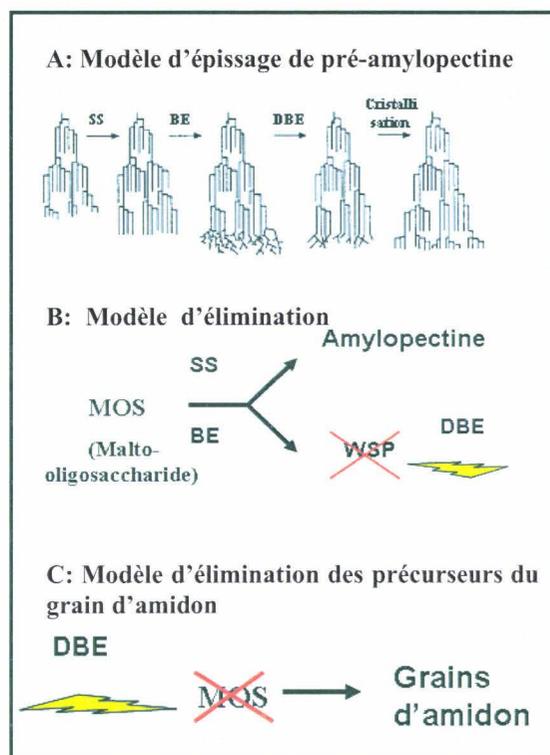
et coll., 2004).

En outre, les mutants cités ici présentent souvent des modifications morphologiques des grains d'amidon, telles que la déformation de la surface, la diminution de la taille et l'augmentation du nombre de grains.

Plusieurs modèles ont été proposés afin d'expliquer les phénotypes observés et d'élucider la fonction précise de l'isoamylase au cours de la synthèse de l'amylopectine (Figure 12). En 1996, Ball et coll. proposèrent que l'activité isoamylase participerait à la maturation d'une structure intermédiaire de l'amylopectine baptisée pré-amylopectine (figure 12A). Cette structure hyperbranchée résulterait de l'action synergique des amidon-synthétases et des enzymes de branchement. L'arrangement irrégulier des points de branchement sur la préamylopectine empêcherait la formation correcte des lamelles amorphes (où se situent les points de branchement) perturbant ainsi la formation des doubles hélices de glucanes dans la lamelle cristalline. Le rôle de l'isoamylase serait de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,6 surnuméraires introduites par les enzymes de branchement. Cette réaction amène un arrangement plus régulier des points de branchement qui sont concentrés dans les lamelles amorphes et permet ainsi la mise en place de la structure en grappe de

l'amylopectine. En l'absence de cette activité, la synthèse désordonnée de la préamylopectine bloque finalement la cristallisation de l'amylopectine et aboutit à la formation du phytoglycogène. De plus, la présence d'amylopectine résiduelle de structure modifiée corrobore l'idée que l'isoamylase est effectivement impliquée dans la synthèse de l'amylopectine. Ce modèle est fortement soutenu par les phénotypes représentés chez le mutant *sta7* et les mutants *sugary* du maïs et du riz.

Zeeman et coll. (1998) proposaient un modèle différent suite à l'étude sur le mutant *dbe1* d'*Arabidopsis thaliana* (Figure 12B). Les auteurs découvrirent que dans cette lignée, contrairement aux mutants du maïs et du riz, la structure de l'amylopectine de l'amidon résiduel n'était pas modifiée malgré la réduction de 90% de l'accumulation de l'amidon. Ceci suggérerait l'absence d'implication directe de l'isoamylase dans l'édification de la structure de l'amylopectine. Pour expliquer la chute de la quantité d'amidon et la production de phytoglycogène, les auteurs proposèrent que la synthèse du phytoglycogène dans le plaste était en compétition avec celle de l'amidon car le phytoglycogène serait un consommateur alternatif de l'ADP-Glc. Comme le



**Figure 12 :** représentation des modèles d'épissage de la préamylopectine D'après Myers et coll., 2000 (partie A), d'élimination des polysaccharides solubles (WSP) (partie B) et d'élimination des précurseurs du grain d'amidon (partie C). 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  $\alpha$ -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 DBEs préviennent l'accumulation de WSP dont la transformation en MOS (malto-oligosaccharides) évite la compétition avec la synthèse de l'amylopectine. En absence de DBE, 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. Dans la partie C, les MOS seraient les précurseurs des grains d'amidon. Le DBE contrôlerait l'initiation de la synthèse du grain par élimination la nucléation des MOS.

phytyloglycogène est le substrat principal de l'isoamylase, en l'absence de cette enzyme, la synthèse de l'amylopectine est, de fait, ralentie. Cependant, cette interprétation est difficile à concilier avec notre nouvelle étude menée chez *Arabidopsis* pour l'isoamylase, y compris le phénotype d'un mutant au locus *ISA2*, un allèle de la mutation *dbel*. Nous discuterons en détail de cette étude dans les parties « résultats » et « discussion » dans la suite de ce manuscrit.

S'appuyant sur des faits tels que l'accroissement du nombre des grains d'amidon, la diminution de la taille des grains et la constance de la structure de l'amylopectine observés chez le mutant de l'orge, Burton et coll. (2002) proposèrent un troisième modèle concernant le rôle de l'isoamylase (Figure 12C). Les auteurs pensaient que celle-ci pouvait être impliquée dans les mécanismes d'initiation de la synthèse des grains d'amidon par le contrôle de la fréquence d'initiation de la synthèse. En effet, selon les auteurs, l'activité isoamylase éliminerait ou limiterait la nucléation des  $\alpha$ -glucanes qui existeraient comme précurseurs des grains d'amidon. En l'absence d'isoamylase, l'accumulation de polysaccharides solubles dans le stroma du plaste entraînerait une nucléation anarchique des nouveaux grains d'amidon et ainsi l'augmentation du nombre des grains d'amidon. Ce modèle

est également soutenu par Bustos et coll. (2004) suite à une observation similaire obtenue sur une lignée antisens de pomme de terre. Néanmoins, comme nous l'avons indiqué plus haut, des résultats plus récents concernant l'initiation de la synthèse de l'amidon ont été obtenus (Roldan et coll., 2007) et indiquent que le mécanisme d'amorçage de la synthèse de l'amidon est plutôt contrôlé par les amidon-synthétases solubles et en particulier la SS4. L'impact des enzymes de débranchement sur la taille et le nombre des grains semble donc indirect.

### **3) L'activité isoamylase : le résultat d'une interaction synergique**

Les caractéristiques des isoamylases issues de différentes espèces végétales suggèrent que l'activité isoamylase est en réalité portée par un complexe multimérique. Ishizaki et coll. (1983) ont identifié l'isoamylase de pomme de terre, une macromolécule de 520 kDa, comme étant composée de deux types de polypeptides, l'un de 94 kDa et l'autre de 83 kDa. L'expérience de western blot révèle qu'à ces deux polypeptides correspondent respectivement les protéines Stisa1 et Stisa2 (Hussain et coll., 2003). De même, suite aux comportements allèle-spécifiques figurés par différentes lignées de mutants de *sugary-1*, Dinges et coll.

(2001) proposèrent que l'activité isoamylase du maïs résulterait plutôt de l'interaction entre Su1 (Isa1) et les autres composants tels que la pullulanase, les enzymes de branchement et les enzymes amylolytiques. La construction du complexe de l'isoamylase semble être un modèle très répandu chez différentes espèces végétales. Les travaux chez *Chlamydomonas* indiquent que l'isoamylase est également contrôlée par deux loci, *STA7* et *STA8*. Le gène *STA7* code la sous-unité catalytique et on rappelle que l'absence de cette protéine conduit à la disparition totale de l'amylopectine. Néanmoins, en l'absence du produit du gène *STA8*, défini comme sous-unité régulatrice, le mutant produit encore une quantité faible d'amidon résiduel (Dauvillée et coll., 2001a, b). En outre, la présence de l'isoamylase multimérique est aussi rapportée chez le riz, cependant il semble que ce complexe se présente sous la forme homomérique mais pas hétéromérique comme c'est le cas dans les autres études (Fujita et coll., 1999).

De même, une relation interactive existerait entre les différentes enzymes. Cette hypothèse est venue de l'effet pléiotropique de mutation. Par exemple, la baisse de l'activité pullulanase est très courante chez les mutants *sugary-1* du maïs et du riz (Beatty et coll., 1999 ; Kubo et coll., 1999). D'ailleurs, chez le mutant

*zpu1* du maïs, une nouvelle activité  $\beta$ -amylase est apparue dans l'albumen, lorsque l'enzyme SBEIIa devient inactive malgré la présence intacte de la protéine. La cause des changements enzymatiques reste encore à établir à ce jour. Outre la modification des interactions protéine-protéine, les enzymes concernées ont dû très probablement subir une modification post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle.

#### 4) Une nouvelle famille d'isoamylase

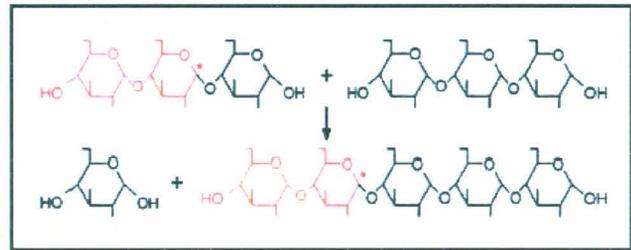
D'après l'analyse enzymatique *in vitro*, Hussain et coll. (2003) ont prévu que la troisième isoamylase, Isa3, serait plutôt impliquée dans le catabolisme de l'amidon. Cette hypothèse est confirmée chez *Arabidopsis* suite aux études menées pendant ce travail de thèse sur une lignée mutante *isa3*. Ce mutant présente une suraccumulation de l'amidon causée par la perturbation de la dégradation lors de la phase nocturne par rapport au sauvage. Nous discuterons de ce mutant et de la fonction d'Isa3 plus loin dans le manuscrit.

#### f. L'enzyme disproportionnante

Les enzymes disproportionnantes (ou enzymes D, des  $\alpha$ -1,4 glucanotransférases, EC 2.4.1.25) se caractérisent par leur capacité à transférer

les  $\alpha$ -1,4 glucanes depuis les malto-oligosaccharides donneurs vers autres oligosaccharides récepteurs en reformant une liaison de type  $\alpha$ -1,4. Chaque réaction de transfert s'effectue finalement au détriment d'un résidu de glucose qui est relargué par l'enzyme au cours de la réaction (Peat et coll., 1956 ; Takaha et coll., 1993) (Figure 13). Récemment, en fonction de la similitude entre les séquences peptidiques et la possibilité d'utiliser le maltose comme molécule donneuse, les enzymes disproportionnante ont été groupées en deux classes (Bresolin et coll., 2006) : la DPE1 qui est incapable de consommer le maltose (Colléoni et coll., 1999a,b ; Wattedled et coll., 2003 ; Takaha et coll., 1998b), et la DPE2 qui est responsable du catabolisme du maltose (Chia et coll., 2004 ; Lu et coll., 2006b ; Dumez et coll., 2006). Puisque la DPE2 participe plutôt à la dégradation de l'amidon qu'à la synthèse, nous en discuterons dans le chapitre concernant la voie de dégradation de l'amidon.

Bien que la protéine DPE1 soit classée dans les premières découvertes des protéines qui interviennent dans le métabolisme de l'amidon, sa fonction précise n'est toujours pas définitivement déterminée. Afin d'expliquer le rôle de cette enzyme, plusieurs mutants correspondants ont été produits. Mais face aux phénotypes variables obtenus chez les



**Figure 13 :** représentation schématique du mode d'action de l' $\alpha$ -1,4 glucanotransférase 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.

différents organismes, les interprétations du rôle de cette enzyme s'avèrent différentes. Dans le mutant *stall* de *Chlamydomonas reinhardtii*, la déficience pour la DPE1 entraîne une diminution drastique de la quantité d'amidon accumulée (moins de 10% par rapport à la souche sauvage) et une augmentation de la teneur en amylose (Colleoni et coll., 1999a). De plus, les auteurs observèrent que cette mutation apporte des changements plus profonds au niveau de la structure du polysaccharide de réserve et de la morphologie du grain d'amidon. Par ailleurs, cette lignée mutante accumule une quantité importante de malto-oligosaccharide (MOS). La structure de l'amylopectine est également fortement modifiée, avec un accroissement de la population de chaînes courtes (Colleoni et coll., 1999a). Plus tard, les auteurs ont démontré que cette enzyme était capable de transférer les malto-oligosaccharides

linéaires sur les chaînes externes de l'amylopectine (Colleoni et coll., 1999b). Ainsi, il semble que la DPE1 s'intègre directement dans la biosynthèse de l'amylopectine, car elle pourrait en effet transférer des MOS libérés lors de l'épissage de la préamylopectine par les enzymes de débranchement. De cette manière, les glucanes sont réincorporés dans l'amylopectine et l'énergie est épargnée, ne « consommant » qu'un seul résidu de glucose par réaction de transfert.

Un résultat différent a été obtenu chez le mutant *dpe1* d'*Arabidopsis* par Critchley et coll. (2001). En effet, contrairement à la situation chez *Chlamydomonas*, chez ce mutant, une suraccumulation d'amidon est observée au cours de la période photosynthétique, et la structure de l'amylopectine n'est pas modifiée. Mais ce mutant accumule aussi une grande quantité de MOS à la fin de la période obscure. De plus, l'amidon est enrichi en amylose. Selon ces résultats, les auteurs proposèrent que le rôle de DPE1 concernait plutôt le catabolisme de l'amidon : elle adresserait les courts MOS vers les glucanes plus grands libérés par les enzymes de débranchement afin de faciliter et d'accélérer la réaction hydrolytique (par  $\beta$ -amylase) ou phosphorolytique (par phosphorylase) qui se déroulerait

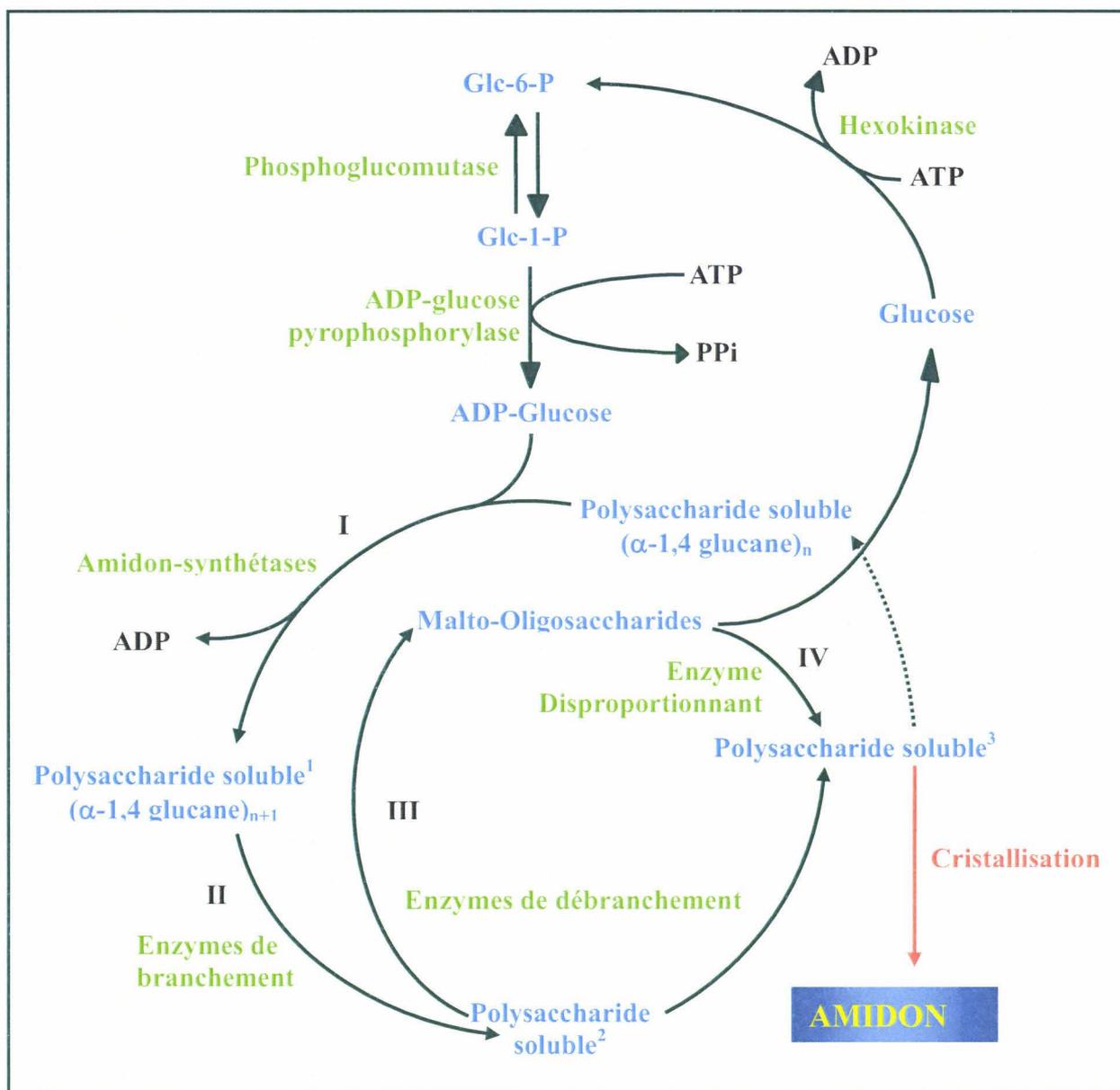
ultérieurement.

La figure 14 résume les mécanismes de biosynthèse de l'amidon tels qu'ils sont perçus à ce jour chez *Arabidopsis thaliana*.

## D. La dégradation de l'amidon

Dans la présentation précédente, nous avons décrit que l'amidon était synthétisé de concert par plusieurs activités enzymatiques comme une réserve d'énergie et de carbone sous la forme d'un polysaccharide insoluble et semi-cristallin. Evidemment, ce matériel de réserve doit être facilement mobilisable lorsque les besoins physiologiques l'exigent, tels que la germination (graines ou tubercules) ou au cours de la nuit afin de fournir l'énergie et les substances pour poursuivre son développement à long terme.

Un ancien modèle de dégradation de l'amidon avait été établi principalement sur les expériences biochimiques et les caractérisations enzymatiques *in vitro* à la fin du siècle dernier (Bech et Ziegler, 1989 ; Steup, 1988). Dans ce modèle de dégradation, l' $\alpha$ -amylase est une enzyme clé qui s'attaque au grain d'amidon. Ensuite, la dégradation est accomplie principalement par les enzymes de débranchement et les



**Figure 14 :** un nouveau modèle de biosynthèse de l'amidon (modifié d'après Wattedled, 2002c).

**I :** Les amidon-synthétases utilisent l'ADP-Glc pour allonger les chaînes en formation et former le « Polysaccharide soluble<sup>1</sup> ». **II :** Les enzymes de branchement introduisent les liaisons α-1-6 de façon aléatoire sur la structure existante (« Polysaccharide soluble<sup>2</sup> »). **III :** Les enzymes de débranchements permettent l'épissage du « Polysaccharide soluble<sup>2</sup> » prévenant ainsi la formation de phytyglycogène. Cette étape génère d'un côté, un polysaccharide mature très organisé (Polysaccharide soluble<sup>3</sup>) 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 une perte énergétique qui peut s'avérer fatale pour une production normale d'amidon en condition d'apport énergétique extérieure faible voire nul (comme lors de la carence azotée chez *C. reinhardtii*). La seule perte enregistrée provient alors de la production de résidus de glucose facilement métabolisables par la cellule. Le polysaccharide mature produit lors de l'étape d'épissage (Polysaccharide soluble<sup>3</sup>) va pouvoir cristalliser ou entrer dans un nouveau cycle de synthèse jusqu'à sa cristallisation.

$\alpha$ -glucane-phosphorylases. Un rôle important a été attribué aux  $\alpha$ -glucanes phosphorylases dans ce modèle, puisque le G-1-P produit par cette enzyme serait énergiquement favorable et il se transformerait plus tard en triose phosphate, qui était autrefois considéré comme le principal produit exporté du plaste. Le maltose et le glucose existeraient aussi possiblement, mais ils seraient la partie mineure.

Pourtant, l'établissement de la voie de dégradation de l'amidon était beaucoup plus compliqué du fait de la multiplicité des formes enzymatiques capables de dégrader des  $\alpha$ -glucanes. Par exemple on peut compter jusqu'à trois gènes prédictifs pour les  $\alpha$ -amylases et neuf gènes pour des  $\beta$ -amylases chez *A. thaliana*. De plus, la variation de la localisation subcellulaire des protéines et le peu de mutants disponibles pour celles-ci ajoutent à la difficulté de distinguer les rôles individuels de chaque une d'elle. Mais l'acquisition des connaissances sur la dégradation de l'amidon s'est accélérée ces dernières années, notamment dans la feuille d'Arabidopsis et de la pomme de terre, grâce à l'isolement d'une série de mutants sur-accumulateurs d'amidon (mutants *sex*, pour *starch-excess*). Ces études concourent à la proposition d'un nouveau modèle de la dégradation de l'amidon, y compris la première étape de la dégradation, les

enzymes importantes impliquées dans ce processus et les produits finaux de la dégradation.

**a. La phosphorylation de l'amidon :  
une modification obligatoire**

Jusqu'à présent, plusieurs études ont confirmé que l'initiation de la dégradation de l'amidon requiert la phosphorylation de certains résidus de glucose du polysaccharide. Cette modification est réalisée par une enzyme d'abord nommée « R1 » puis renommée GWD (pour Glucan Water Dikinase). La GWD est capable de transférer le  $\beta$ -phosphate depuis l'ATP sur l'hydroxyle en position C6 d'un résidu de glucose (Ritte et coll., 2002 ; Mikkelsen et coll., 2004 ; Ritte et coll., 2006). Cette phosphorylation pourrait apparaître aussi bien pendant la synthèse de l'amidon que pendant sa dégradation (Nielsen et coll., 1994 ; Ritte et coll., 2004). La réduction de l'activité de GWD conduit à la suraccumulation d'amidon comme dans une lignée antisens de pomme de terre (Lorberth et coll., 1998) ou dans le mutant *sex1* d'Arabidopsis (Yu et coll., 2001). Plus récemment, une deuxième enzyme de phosphorylation a été identifiée chez Arabidopsis. Elle est capable de phosphoryler l'hydroxyle en C3 des résidus de glucose à la condition que celui-ci soit déjà phosphorylé en C6 par GWD. Ainsi cette enzyme est nommée

PWD pour Phosphoglucan Water Dikinase (Kotting et coll., 2005 ; Baunsgaard et coll., 2005). L'inactivation de PWD chez *Arabidopsis* conduit à un phénotype similaire à celui des lignées déficientes pour la GWD.

Le lien entre la phosphorylation et la dégradation n'est pas encore clairement établi, néanmoins il est suggéré que la présence de groupements phosphates peut modifier la solubilité du grain d'amidon et l'empaquetage de la molécule d'amylopectine (Blennow et coll., 2002). D'ailleurs, ces groupements phosphates seraient vraisemblablement nécessaires pour un contact direct avec les activités amylolytiques responsables de la dégradation de l'amidon.

#### **b. Première attaque sur le grain d'amidon**

Bien que l'enzyme qui initie l'attaque à la surface du grain d'amidon ne soit toujours pas identifiée en ce qui concerne la dégradation de l'amidon transitoire (celui des tissus photosynthétiques), on a présumé que les  $\alpha$ -amylases (EC 3.2.1.1), une famille d'endoamylases qui hydrolysent les liaisons  $\alpha$ -1,4 de glucanes et libèrent de petits malto-oligosaccharides, étaient importantes pour les premières étapes de dégradation. Cette théorie est confirmée pour la dégradation de l'amidon de céréale

puisque cette protéine s'exprime abondamment lors de la germination de la graine et est capable d'agir sur le polymère insoluble (Fincher, 1989 ; Ritchie et coll., 2000). Cependant leur rôle dans le catabolisme de l'amidon transitoire reste sujet à débat. Le génome d'*Arabidopsis* contient trois gènes putatifs des  $\alpha$ -amylases, dont un seul (*Amy3*) possède un peptide d'adressage vers le chloroplaste. Yu et coll. (2005) ont étudié trois mutants simples, trois combinaisons doubles mutantes et un triple mutant pour ces trois gènes. Aucune modification de phénotype n'a été observée chez tous ces mutants. Leurs travaux semblent indiquer que les trois formes d' $\alpha$ -amylases décrites chez *Arabidopsis* ne possèdent aucune fonction lors de la dégradation du polymère de réserve dans la feuille. Soit l'attaque initiale du grain d'amidon ne nécessite pas l'activité d'une endoamylase, soit il existe une nouvelle endoamylase qui n'est pas encore identifiée chez *Arabidopsis*.

#### **c. Le débranchement**

L'ordonnement des liaisons O-glycosidiques de type  $\alpha$ -1,6 dans la structure de l'amidon exige absolument l'action des enzymes de débranchement. Comme nous l'avons présenté dans le chapitre consacré aux enzymes de débranchement, le rôle d'une isoforme d'isoamylase (*Isa3*) chez *Arabidopsis* lors

de la dégradation a été clairement établi (Wattebled et coll., 2005 ; Delatte et coll., 2006). Dans l'expérience *in vitro*, le meilleur substrat pour ISA3 est la  $\beta$ -limite dextrine, un catabolite qui existe certainement pendant la dégradation de l'amidon *in vivo*. D'ailleurs, il est intéressant de noter que la Stisa3 recombinante de pomme de terre présente une activité 10 fois plus haute que la Stisa1 et la Stisa2 sur le grain d'amidon (Hussain et coll., 2003). Cela nous laisse supposer que la Stisa3 est capable d'initier l'attaque sur le grain d'amidon. De même, la pullulanase pourrait prendre partiellement en charge la dégradation de l'amidon. Le phénotype observé récemment chez le double mutant *isa3/pu1* pourrait servir de preuve préliminaire pour cette hypothèse (Ces résultats sont non publiés mais décrits dans la partie « résultats »).

#### **d. La mobilisation des glucanes linéaires**

Pendant une longue période, la voie phosphorolytique était considérée comme le principal processus de dégradation dans les feuilles (Bech et Ziegler, 1989 ; Steup, 1988). Cette réaction est réalisée par les  $\alpha$ -glucane-phosphorylases, un groupe d'enzymes qui catalysent le clivage d'une liaison O-glycosidique de type  $\alpha$ -1,4 en présence de phosphate inorganique avec pour conséquence la formation de G-1-P. Il

a été observé *in vitro* que les  $\alpha$ -glucane-phosphorylases plastidiales sont capables de cataboliser l'amidon dans les chloroplastes isolés, ce qui laisse deviner leur importance (Levi et Gibbs, 1976 ; Stitt et Heldt, 1981). A l'opposé de cette hypothèse, aucun changement concernant la dégradation du polymère n'a été observé dans une lignée antisens de pomme de terre dans laquelle l'expression d'une isoforme de phosphorylase plastidiale était drastiquement réduite (Sonnewald et coll., 1995). Un phénotype similaire a été retrouvé dans un mutant d'*Arabidopsis* pour la phosphorylase plastidiale (Zeeman et coll., 2004). Toutefois, les auteurs suggèrent que cette enzyme se chargeait d'un rôle spécifique pour la réponse aux stress abiotiques. Selon ces résultats, il semblerait que la voie phosphorolytique n'était pas la route principale choisie par les végétaux pour le catabolisme du polymère. Le débat a été relancé très récemment avec les travaux de Dauvillée et coll. (2006) sur une isoforme plastidiale de phosphorylase de *Chlamydomonas*. Les auteurs montrèrent en effet qu'une mutation au locus *STA4*, le gène de structure de PhoB (une forme plastidiale), entraînait une diminution de la quantité d'amidon et un enrichissement de la teneur en amylose lors de la culture des cellules en carence azotée (mimant les conditions d'accumulation de l'amidon de stockage

des tissus non photosynthétiques). La structure de l'amylopectine était également légèrement modifiée s'accompagnant d'une augmentation de la proportion des longues chaînes. Ainsi, les auteurs supposèrent que PhoB, comme l'enzyme D, posséderait une double fonction de synthèse et de dégradation de l'amidon de réserve.

Une autre famille d'enzymes intervenant dans le processus de dégradation est celle des  $\beta$ -amylases (EC 3.2.1.2). Ce sont des exoamylases qui libèrent presque exclusivement du  $\beta$ -maltose en hydrolysant les  $\alpha$ -1,4 glucanes à partir de leur extrémité non-réductrice. L'importance des  $\beta$ -amylases est prouvée par l'analyse d'une lignée antisens de pomme de terre dans laquelle l'expression d'une  $\beta$ -amylase plastidiale a été fortement réduite (Scheidig et coll., 2002). Un phénotype de suraccumulation d'amidon révélé dans les feuilles de cette lignée suggérait une perturbation de la dégradation de l'amidon. Dans le génome d'*Arabidopsis*, il existe neuf séquences putatives de  $\beta$ -amylases dont trois semblent posséder un peptide de transit d'entrée dans le chloroplaste. Deux d'entre elles (BMY8 et BMY7) ont été localisées expérimentalement dans le plaste (Lao et coll., 1999 ; Sparla et coll., 2006). Cependant, l'expression de ces enzymes est plutôt induite en condition de stress

thermique (Kaplan et Guy, 2004, 2005). Enfin, le seul mutant d'*Arabidopsis* pour une  $\beta$ -amylase cytosolique est le mutant *ram1* (Laby et coll., 2001). L'absence de la protéine ne conduit à aucune modification notable concernant l'amidon dans ce mutant par comparaison avec le sauvage. Toutefois, la forte augmentation de la teneur en maltose dans les feuilles au cours de la nuit chez *Arabidopsis*, le haricot ou encore l'épinard suggérait plus ou moins une intervention d'une ou plusieurs  $\beta$ -amylase au cours du processus de dégradation (Weise et coll., 2004 ; Critchley et coll., 2001 ; Niittylä et coll., 2004).

Enfin, rappelons-nous qu'un mutant *dpe1* d'*Arabidopsis* (Critchley et coll., 2001) entraîne un ralentissement de la dégradation de l'amidon et une suraccumulation de malto-oligosaccharides. Ce phénotype indique un rôle de DPE1 au cours du catabolisme de l'amidon. DPE1 faciliterait l'action d'autres enzymes de dégradation en formant des glucanes linéaires plus longs. Si les expériences de Critchley et coll. relancent le débat sur la fonction de DPE1 au sein du processus du métabolisme de l'amidon, leur observation d'une suraccumulation de maltotriose mais pas de maltotétraose confirme plutôt la prépondérance d'une fonction de dégradation par les  $\beta$ -amylases puisque le maltotétraose est digestible par la  $\beta$ -

amylase mais pas par l' $\alpha$ -glucane phosphorylase.

#### **e. Les produits finaux exportés vers le cytosol**

L'étude des produits exportés vers le cytosol pendant la nuit apporte une autre preuve de l'importance des  $\beta$ -amylases dans la voie de dégradation. L'étude par RMN du proton de la conversion de l'amidon vers le saccharose chez le haricot et la tomate a permis de mettre en évidence l'export de glucose, de maltose et de glucanes de taille supérieure du plaste vers le cytosol au cours de la nuit (Schleucher et coll., 1998). Weise et coll. (2004) ont observé que le maltose était le métabolite principal exporté à partir de chloroplastes intacts de feuilles d'épinard. Ces résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés par l'analyse d'un mutant nommé *mex1* d'*Arabidopsis* (Niittylä et coll., 2004). Ce mutant, tout en accumulant une forte quantité de maltose, présente un phénotype de suraccumulation d'amidon et un sévère retard de développement. Le produit du gène *MEX1* a été localisé dans l'enveloppe du chloroplaste et la protéine assume effectivement le transport du maltose vers le cytosol. Le glucose produit par DPE1 est un autre produit exporté du chloroplaste. On a également mis en évidence un transporteur de glucose qui transfère le glucose depuis le chloroplaste vers le

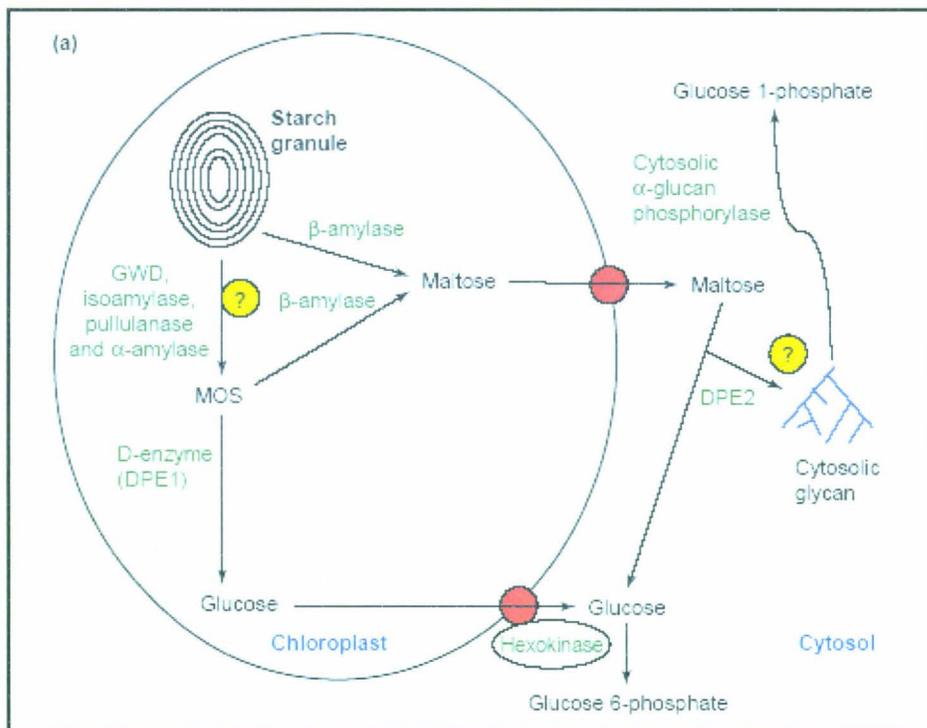
cytosol (Weber et coll., 2000). Mais l'absence de mutant pour cette protéine ne permet pas encore de lui attribuer un rôle clé dans le catabolisme de l'amidon. Néanmoins, on peut supposer que l'exportation du glucose est aussi importante chez *Arabidopsis* du fait qu'un double mutant pour DPE1 et MEX1 affiche un retard de croissance encore plus sévère que le simple mutant pour MEX1 (Niittylä et coll., 2004).

#### **f. La dérivation des produits de dégradation hors chloroplaste**

Comme nous l'avons présenté, DPE1 ne peut pas utiliser le maltose comme substrat alors qu'une grande quantité de maltose est produit au cours la dégradation de l'amidon. Il y a peu, les seules activités enzymatiques connues pour métaboliser le maltose étaient les  $\alpha$ -glucosidases (maltases), qui clivent de façon hydrolytique le maltose en donnant deux molécules de glucose. Jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré le rôle de cette enzyme dans le catabolisme de l'amidon. Récemment, DPE2, une deuxième enzyme disproportionnante (une transglucosidase plus précisément), a été décrite simultanément par trois groupes, dont deux travaillaient sur un mutant d'*Arabidopsis* et le troisième examinait une lignée transgénique de pomme de terre (Chia et coll., 2004 ; Lu et Sharkey, 2004 ;

Lloyd et coll., 2004). Chez *Arabidopsis*, la protéine se situe dans le cytosol (Lu et coll., 2006a), alors qu'elle semble plastidiale chez pomme de terre (Lloyd et coll. 2004). Mais récemment, de nouvelles études indiquent que l'enzyme de pomme de terre pourrait aussi être localisée dans le cytosol (Fettke et coll., 2005b). La localisation de cette protéine est importante puisque cela conduit à des modèles différents pour la fonction de DPE2 et le métabolisme du maltose. Contrairement à DPE1, DPE2 est une transglucosidase capable d'agir sur le maltose, en transférant un résidu de

glucose sur un glucane accepteur. Dans tous les cas rapportés, 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 de sucres solubles (dont le principal est le maltose) anormalement élevé. Depuis peu, il est apparu qu'un hétéroglycane cytosolique soluble de structure complexe, composé principalement d'arabinose, de galactose et de glucose pourrait jouer la fonction d'accepteur glycanique *in vivo* pour le résidu de glucose transféré par



**Figure 15 :** Mécanismes supposés 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 glycaniques de la transglucosidase DPE2. Abréviations : GWD : Glucan Water Dikinase ; MOS : Malto-OligoSaccharides. D'après Lloyd et coll., 2005.

DPE2 (Fettke et coll., 2005a et 2005b). Cet hétéroglycane cytosolique serait aussi un excellent substrat pour une  $\alpha$ -glucane-phosphorylase cytosolique (PHS2) (Fettke et coll., 2006). Le rôle de cette phosphorylase cytosolique *in vivo* permettrait de « recycler » l'hétéroglycane en libérant les résidus de glucose (sous forme de G-1-P) additionnés préalablement par DPE2. Cette hypothèse permettrait de comprendre le phénotype du mutant *phs2*-d'*Arabidopsis* qui accumule quatre fois plus de maltose dans les feuilles pendant la nuit (Lu et coll., 2006b). PHS2 est la forme cytosolique des  $\alpha$ -glucane-phosphorylases de la feuille d'*A. thaliana*. Le G-1-P ainsi produit par PHS2 serait alors converti en saccharose pour les autres besoins de la plante.

La figure 15 résume les mécanismes de dégradation de l'amidon tels qu'ils sont perçus à ce jour chez *Arabidopsis thaliana*.

### E. Un modèle d'étude puissant : *Arabidopsis thaliana*

L'espèce *Arabidopsis thaliana* appartient à la famille des Brassicaceae comme de nombreuses autres espèces cultivées (chou, navet, radis, moutarde etc.). Elle a été découverte au 16<sup>ème</sup> siècle par Johannes Thal, un physicien allemand.

Cette plante est nommée aussi « Arabette des dames » ou « Arabette rameuse ». L'origine géographique d'*Arabidopsis* est difficile à identifier, mais cette plante peut pousser naturellement dans les vastes régions d'Europe, d'Asie, ou encore d'Afrique du Nord.

*Arabidopsis thaliana* est une plante dicotylédone d'une hauteur maximale de 30 à 40cm à l'âge adulte. Au début de la croissance, ses feuilles se développent sous la forme d'une rosette au ras du sol avec un diamètre d'environ de 2 à 5 cm (Figure 16). Deux ou trois semaines (tout dépend de l'ensoleillement et des autres conditions de culture) après la germination, la tige florale se détache de la rosette, en portant des feuilles alternes et une inflorescence



**Figure 16 :** Vue d'un plant d'*Arabidopsis thaliana* âgé d'environ 3 semaines.

primaire en grappe. Des inflorescences se présentent également sur des rameaux secondaires. Ses fleurs blanches de quelques millimètres à symétrie bilatérale comprennent 4 sépales, 4 pétales, 6 étamines et 2 carpelles. *Arabidopsis* fructifie sous la forme de siliques (sorte de haricots verts très petits, longs et fins) dans lesquelles une cinquantaine de graines se forment. A la suite de la maturation et de la sécheresse de la silique, la couleur du carpelle change du vert au jaune ou au marron.

Depuis 50 ans, *Arabidopsis* a été étudié en profondeur dans les laboratoires du monde entier et choisi comme une espèce modèle de prédilection pour les études de génétique et de génomique fonctionnelle. Pourtant son succès est loin d'être un hasard mais s'appuie sur plusieurs avantages physiologiques et génomiques de cette plante par rapport à d'autres végétaux supérieurs. La plante exige peu d'infrastructures pour la culture du fait de sa petite taille. Son cycle de reproduction court (6 semaines de la germination à la graine mature) favorise les analyses génétiques rapides. De plus, l'abondance de la production de graines (des milliers de graines par plante) et la propriété de l'autofécondation font d'*Arabidopsis* un modèle idéal pour les expériences de mutagenèse. D'ailleurs, les individus ont la capacité de se croiser entre

eux, cela nous permet de réaliser des croisements artificiels, une méthode principale des analyses génétiques. Avec une taille de 125 Mbases se répartissant sur 5 chromosomes, le génome d'*Arabidopsis* fait partie des plus petits génomes parmi les plantes supérieures. C'est cet avantage qui a permis d'en obtenir la séquence complète pour la première fois pour un végétal en 2000 (l'écotype Columbia a été séquencé par un consortium international). Par comparaison, le riz et le maïs ont des génomes respectivement 4 et 20 fois plus complexes. De plus, la diploïdie de son génome a aussi rendu plus facile l'identification de traits récessifs. Les mutations géniques chez *Arabidopsis* peuvent être obtenues par de nombreuses méthodes, y compris les méthodes classiques comme l'éthylméthane sulfonate (EMS), le nitrosométhane biuret (NMB), l'irradiation par rayon X, les neutrons rapides, les particules lourdes chargées, mais également par des processus biologiques comme des insertions de transposons ou d'ADN-T. Les techniques d'insertion de l'ADN-T ont pris un essor très rapide ces dernières années en raison de la facilité avec laquelle on peut isoler le site d'insertion marqué par la présence cette séquence d'ADN exogène. L'ADN-T est un fragment nucléotidique mobilisable qui se situe dans le plasmide Ti (pour Tumor

inducer) de plusieurs espèces bactériennes du genre *Agrobacterium* dont *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie est un phytopathogène du sol capable de transférer une partie de son matériel génétique ou plus précisément le fragment d'ADN-T dans le génome de la plante hôte via le plasmide Ti, dans certaines conditions. Naturellement, dans ce plasmide, l'ADN-T flanqué de deux bordures (RB à droite et LB à gauche) comporte des gènes importants pour son transfert vers le génome nucléaire de la cellule végétale infectée, mais également une région permettant le développement d'une tumeur (galle du collet), ainsi que les gènes permettant la synthèse et la libération des opines par les cellules végétales (les opines sont des composés qui peuvent être métabolisés par la bactéries pour sa croissance). En condition expérimentale, le vecteur binaire utilisé contient une région de l'ADN-T modifiée et désarmée, c'est-à-dire dans laquelle les gènes virulents sont retirés et remplacés par des gènes de résistance à certains antibiotiques (ex. Kan<sup>R</sup>) ou d'herbicides (Basta<sup>R</sup>) en tant que marqueurs de sélection de transformation (Bouchez et coll., 1993). 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). Les régions flanquant l'ADN-T dans chaque transformant sont séquencées systématiquement à partir d'une bordure de l'ADN-T afin de détecter des sites d'insertions (il s'agit des FST pour Flanking Sequence Tag). Les informations sont disponibles dans plusieurs banques de données quelle que soit l'origine de la production des mutants. En France, il existe le site FlagDB++ (<http://genoplante-info.infobiogen.fr>, Samson et coll., 2004). On peut également consulter la banque de données américaine SALK ou encore GABI. Actuellement, environ 350 000 FST sont disponibles. Les banques de données sont un puissant outil nous permettant de rechercher rapidement *in silico* des lignées mutantes dans des gènes d'intérêt.

Des recherches antérieures ont permis d'observer la présence d'au moins 33 gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme de l'amidon chez *Arabidopsis* (Annexe III). Mais il faut souligner que cette méthode de recherche n'est favorable que pour l'analyse fonctionnelle de gènes putatifs *a priori*.

## F. Objectifs du travail de thèse

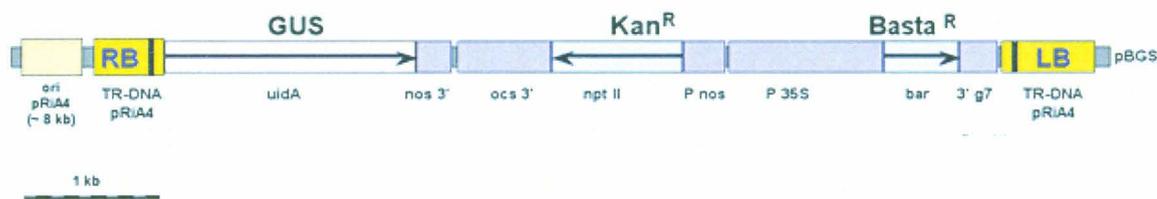
Le travail de la thèse a été particulièrement orienté vers le rôle tenu par différentes formes d'enzymes de débranchement chez *Arabidopsis thaliana*.

Comme nous l'avons vu précédemment, cette famille d'enzyme concerne quatre gènes chez *Arabidopsis* dont trois séquences codent des protéines possédant la spécificité « isoamylase » et une quatrième « pullulanase ». Ces quatre gènes ont ainsi été nommés arbitrairement *ISA1*, *ISA2*, *ISA3* et *PUI1*.

Afin d'élucider la fonction de chacune des isoformes, des lignées de mutants correspondant aux quatre gènes ont été sélectionnées et analysées. De plus,

des combinaisons doubles mutantes voire triples mutantes ont été produites dans le but de modérer l'effet de redondances fonctionnelles, partielles ou totales, issues de l'action des différentes isoformes. Les résultats obtenus de ces différents travaux sont présentés dans la partie « résultats » de ce mémoire, sous la forme d'un article paru en 2005 dans la revue *Plant Physiology* et d'une partie « résultats supplémentaires »

## pGKB5 T-DNA



**Figure 17 :** Carte schématique de l'ADN-T modifié utilisé pour transformer *Arabidopsis thaliana* à l'URGV de l'INRA de Versailles. **RB** et **LB** : Séquences conservées de l'ADN-T, nécessaires à l'intégration dans le génome de la cellule hôte. **GUS** : gène rapporteur de la  $\beta$ -glucuronidase. **KanR** : gène de résistance à la kanamycine. **BastaR** : gène de résistance à l'herbicide Basta.

## **MATERIELS ET METHODES**

## Produits

La résine de Sepharose CL2-2B et le Percoll proviennent de Amersham Biosciences (Orsay, France). La résine de HW-TSK 50F provient de Tosoh Bioscience (Stuttgart, Allemand). Les kits de dosage de l'amidon (EnzyPlus) sont obtenus chez Enzytec (Toulouse, France). Les kits de dosage du fructose et du glucose proviennent de Megazyme (Wicklow, Irlande). Les kits de dosage de protéine sont achetés chez Biorad (USA).

## Lignées d'*Arabidopsis thaliana*, conditions de culture et milieu

Les lignées mutantes *Atisa2* (CTI15) et *Atpu1* (CQU5) ont été construites dans un fond génétique WS (Wassilewskija). Toutes les autres lignées analysées dans ce travail ont été produites dans un fond génétique Col (Columbia). Les graines des mutants d'écotype WS et la lignée de référence ont été obtenues dans les banques de mutants d'ADN-T générées à l'URGV de L'INRA de Versailles (Bechtold et coll., 1993; Bouchez et coll., 1993), alors que les graines des mutants d'écotype Col et la lignée de référence ont été obtenues auprès de NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre; Alonso et coll., 2003).

Les graines sont vernalisées à 4°C pendant 48h dans une solution stérilisée de

phytagar 0,1% (p/v) avant d'être semées sur terreau. Pour l'analyse du métabolisme de l'amidon pendant un cycle jour / nuit, les plantes sont cultivées en phytotron avec une photopériode de 12h de jour et 12h de nuit, avec des températures de 16°C (la nuit) et de 22°C (le jour). Pour toutes les autres expériences, les plantes sont cultivées dans une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit, avec des températures de 16°C (la nuit) et 21°C (le jour).

## Croisements

Les lignées doubles mutantes sont engendrées par les croisements entre deux lignées simples mutantes tandis que les triples mutants sont produits par les croisements entre deux doubles homozygotes mutants qui portent un gène muté commun afin que la sélection de mutant soit simplifiée. Pour chaque croisement, une plante est choisie comme « receveuse » et une autre comme « donneuse ». La première étape du croisement est d'éliminer de la plante receveuse toutes les siliques venues de l'autopollinisation et les fleurs déjà ouvertes. Les pétales des boutons floraux sont soigneusement détachés à l'aide d'un microscope. Les fleurs de la plante « receveuse » sont totalement débarrassées de leurs étamines en ne laissant que les pistils non fertilisés. Ces pistils sont

ensuite fécondés artificiellement par le pollen d'une plante « donneuse ». Environ un mois après, les siliques dont les graines sont toutes hétérozygotes pour les deux mutations, peuvent être récupérées. Après autopollinisation, les plantes issues de ces graines donneront un mélange de tous les génotypes possibles dont 1/16<sup>e</sup> d'homozygotes mutants pour les deux gènes concernés. C'est à partir de ce pool de graines que les homozygotes mutants seront sélectionnés selon la méthode génétique décrite ci-dessous.

## **BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **A. Extraction de l'ADN génomique de feuille**

Une feuille d'*Arabidopsis thaliana*, prélevée 3 semaines après la germination, est congelée à -80°C immédiatement après la cueillette. La feuille est broyée au froid dans un tube « eppendorf » de 1,5ml à l'aide d'un petit pilon. La fine poudre obtenue est homogénéisée dans 400µl 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 ). Après 30min d'incubation à 60°C, l'ADN génomique libéré des cellules est purifié par l'ajout d'un mélange de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, v/v) à la suspension, suivi d'une centrifugation

de 15min à la vitesse de 10 000 tpm (tour par min.) à 4°C. La phase aqueuse est récupérée puis l'ADN est précipité par l'ajout de 300 µl d'isopropanol, et culoté par une centrifugation de 30 min à 10 000 tpm et 4°C. Le culot est rincé deux fois par l'éthanol à 70%(v/v) et séché à température ambiante avant d'être repris dans 50µl d'eau milliQ stérile.

### **B. Sélection des lignées homozygotes mutantes**

Les stocks de graines de mutants provenant des banques de mutants indiquées ci-avant sont tous issus de l'autopollinisation d'hétérozygotes mutants. Ils se présentent donc sous forme d'un mélange de graines au génotype sauvage, mutant ou hétérozygote. Il est donc nécessaire de d'abord sélectionner des lignées homozygotes mutantes pour les gènes étudiés. La technique de PCR est utilisée pour identifier la présence de l'ADN-T au sein du gène étudié, et pour s'assurer de l'absence de la copie sauvage de ce gène. Pour cela, nous désignons deux couples d'amorces oligonucléotidiques. Le premier couple est composé d'une amorce qui s'hybride sur le gène en amont de l'insertion de l'ADN-T, et d'une autre amorce qui s'hybride en aval de l'insertion. Ce couple nous permet de discerner l'existence de l'allèle intact par

l'amplification PCR. Quant au deuxième couple, une amorce est désignée pour s'hybrider spécifiquement sur l'ADN-T, et l'autre pour s'hybrider sur le gène en amont ou en aval du site d'insertion. Ce couple permet de déterminer si l'ADN-T est présent au sein du gène en amplifiant un fragment composé d'une part de la séquence du gène, et de la séquence de l'ADN-T, d'autre part. Les informations concernant les sites d'insertion et les séquences qui flanquant l'insertion se trouvent dans 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>). La liste des couples d'amorces oligo-nucléotidiques utilisés se trouve dans l'annexe I.

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 de mélange 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 ARNs totaux

Environ 0,1g de tissus frais sont récoltés en milieu de photopériode et les ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit RNAeasy miniplante (Qiagen), selon les instructions du fabricant.

### 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). Afin de vérifier la transcription des gènes d'intérêt, trois régions différentes entourant le site d'insertion de l'ADN-T (pour chaque gène) ont été amplifiées : en amont, en aval et enjambant le site d'insertion.

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

## BIOCHIMIE STRUCTURALE

### A. Extraction et purification d'amidon et des polysaccharides solubles

Environ 10g de feuilles d'Arabidopsis sont récoltés en fin de photopériode et congelés immédiatement dans l'azote liquide. Les feuilles sont broyées à l'aide d'un polytron blender « Tissue Tearor » (Biospec products, Inc.) dans 30mL de tampon d'extraction : 100 mM 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), pH 7,2, 5 mM EDTA. L'homogénat est filtré sur deux couches de Miracloth et centrifugé pendant 15 minutes à 4000g, à 4°C. Le culot et le surnageant sont soigneusement séparés. Le surnageant contenant les polysaccharides solubles est récupéré et placé pendant 10 min. dans un bain-marie à 100°C afin d'inactiver toutes les enzymes. Après centrifugation (10 min. à 10000g à 4°C), le surnageant est utilisé directement pour le dosage de polysaccharides solubles, de glucose, de fructose, de saccharose, de maltose. Il est lyophilisé avant l'analyse en chromatographie d'exclusion stérique sur matrice TSK HW50 (méthode décrite ci-après).

Le culot d'amidon est resuspendu dans 5 mL de Percoll (Amersham Biosciences, France) à 90% (v/v) et centrifugé pendant 30 min. à 10000g, à 4°C. Le culot d'amidon est lavé une fois par 1 mL de Percoll 90% et deux fois par 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. Il peut

être conservé à 4°C dans de l'éthanol 20%.

## **B. Dosage des teneurs en amidon et en polysaccharides solubles**

Les polysaccharides sont dosés par la méthode à l'amyloglucosidase (Delrue et coll., 1992) avec le kit commercial de dosage d'amidon (Enzytec). 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 de glucose libre dans l'extrait.

## **C. Dosage des contenus en glucose, fructose et saccharose**

Le contenu en glucose est déterminé en même temps que le dosage de polysaccharides solubles avec le kit commercial de dosage amidon (Enzytec) comme décrit ci-dessus. Le contenu en fructose est dosé à l'aide du kit de dosage Megazyme. Le principe est de transformer le fructose en glucose sous l'action de la phosphoglucose isomérase. Le niveau de fructose est déterminé après avoir ôté le contenu en glucose préalablement dosé.

Le saccharose est d'abord hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase (Megazyme) en suivant le protocole conseillé par le fournisseur. Par dosage du glucose total, la quantité de saccharose est déterminée après avoir

soustrait la quantité de glucose libre.

#### **D. Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique**

L'amidon (1 à 2 mg) est dispersé dans 200  $\mu$ L de DMSO 100% à 100°C pendant 10 min. L'amidon est ensuite précipité par 800  $\mu$ L d'éthanol absolu, à -20°C pendant 30 min. Après centrifugation à 100000g pendant 5 min puis séchage, le culot est resuspendu dans 500  $\mu$ L de soude 10 mM. L'échantillon est déposé sur une colonne de Sepharose CL-2B (Amersham Biosciences, France) de 65 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 par heure. La  $\lambda_{\max}$  ainsi que l'absorbance maximum du complexe iode-polysaccharide sont mesurées dans chaque fraction de 300  $\mu$ L. Les fractions contenant l'amylopectine ou l'amylose ainsi identifiées sont regroupées et les quantités de chaque polymère sont dosées par la méthode à l'amyloglucosidase.

#### **E. Fractionnement des polysaccharides solubles par chromatographie d'exclusion stérique**

Environ 2 mg de polysaccharides solubles purifiés et lyophilisés sont dissous dans 500  $\mu$ L de DMSO 10% (v/v) et déposés sur une colonne de séphadex TSK

HW50 (Tosoh Bioscience, Stuttgart Allemand) de 90 cm de hauteur et 2,2 cm de diamètre interne, équilibrée et éluée dans du DMSO 10% (v/v). Les fractions de 2 mL sont collectées à un débit de 12 mL par heure. Les sucres contenus dans chaque fraction sont détectés par la méthode au phénol sulfurique. A 20  $\mu$ L de phénol 5% sont ajoutés 20  $\mu$ L d'échantillon dans une plaque de microtitration placée sur glace. Après une très légère agitation, 100  $\mu$ L d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. La réaction se déroule à 80 °C pendant 30 min. L'absorbance est lue à 490 nm. Les fractions de polysaccharides solubles et les fractions de sucres sont regroupées, puis les quantités précises sont mesurées par la méthode à l'amyloglucosidase.

#### **F. Détermination des absorbances spectrales du complexe iode/polysaccharide ( $\lambda_{\max}$ )**

La  $\lambda_{\max}$  représente la longueur d'onde du maximum d'absorbance du complexe formé par l'iode et les polysaccharides. 50  $\mu$ g d'amidon sont dissous dans 40  $\mu$ L de DMSO pur, puis 360  $\mu$ L d'eau y sont ajoutés afin d'amener la concentration de DMSO à 10% (v/v). Les 400  $\mu$ L d'échantillons sont ajoutés à 100  $\mu$ L d'une solution d'iode (KI 1% (p/v) et I<sub>2</sub> 0,1% (p/v)). L'absorbance est mesurée entre 400 et 700 nm pour déterminer la longueur d'onde du maximum

d'absorption.

### **G. Distribution de longueurs des chaînes de l'amylopectine et de polysaccharides solubles**

La distribution de longueurs des chaînes est réalisée par chromatographie d'échange d'anions à haute performance avec détections ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD) ou par électrophorèse capillaire après dérivation des polysaccharides à l'APTS.

Le débranchement est effectué après purification de l'amylopectine sur une colonne de Sepharose CL-2B. L'échantillon, contenant environ 500 µg d'amylopectine, est dialysé une nuit à 4°C contre de l'eau distillé puis lyophilisé. Les polysaccharides sont repris dans 1 mL d'acétate de sodium 55 mM pH 3,5 puis incubés pendant une nuit à 42°C en présence de 1U d'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* (Megazyme) et de 1 U de pullulanase de *Klebsiella planticola* (Megazyme). L'échantillon est déssalé sur une colonne Carbohydrate « Extract-clean » (Alltech, US) puis lyophilisé.

Afin de s'adapter à la méthode de l'électrophorèse capillaire, les glucanes sont suspendues 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 1M dans du THF (Tétrahydrofurane) fraîchement préparé. L'échantillon est incubé 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.

### **H. Production des β-limite dextrines de l'amylopectine**

Après purification sur une colonne de Sepharose CL-2B, 500 µg d'amylopectine sont dialysés contre de l'eau distillée puis lyophilisés. Le culot d'amylopectine est dissous dans 500 µL d'acétate de sodium 55 mM, pH 3.5 et incubé 4h à 30°C en présence de 17 unités de β-amylase (Sigma). Pour s'assurer que la digestion soit complète, 17 unités d'enzyme sont ajoutées, et l'échantillon est incubé toute la nuit. La production d'extrémités réductrices au cours de la réaction est suivie par dosage à l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) à 540 nm. L'échantillon est ensuite bouilli pendant 5 min, puis débranché comme décrit précédemment par 1 unité d'isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata* (Megazyme) et de 1 U de pullulanase de *Klebsiella*

*planticola* (Megazyme), avant d'être dérivé par l'ATPS, puis analysé par électrophorèse capillaire.

### **I. Microscopie électronique à transmission (TEM) et Microscopie électronique à balayage (SEM)**

Afin d'éviter les pertes de matériel et les distributions hétérogènes, les échantillons ont tout d'abord été entourés d'une solution d'agar à 3% (avec une température inférieure à 40°C). Une fois la solution d'agar solidifiée, des cubes de 1mm<sup>3</sup> 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'AgNO<sub>3</sub> à 1% (PATAg) selon Gallant et coll., 1973. Les échantillons ont ensuite été lavés puis enveloppés 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) sous 80 keV.

### **J. Détermination du taux de branchement de l'amylopectine**

Environ 1 mg d'amylopectine purifiée est dispersé dans du diméthylsulfoxyde-D<sub>6</sub>/D<sub>2</sub>O 80 :20. L'analyse est réalisée à la suite d'un échange suffisant d'hydrogène entre échantillons et tampon. Le résultat est obtenu en intégrant les signaux des protons anomères correspondants (La RMN est quantitative) et en faisant les rapports relatifs de ceux-ci.

## **ENZYMOLOGIE**

### **A. Extraction des protéines des feuilles**

A part les dosages pour lesquels ceci est précisé, les extraits protéiques sont préparés selon la méthode présentée ci-après. Les feuilles sont prélevées en milieu de photopériode et broyées à 4°C dans le tampon suivant : 100mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, glycérol 10%(v/v). Le broyat est centrifugé 5 min. à 10000g à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré et maintenu à 4°C.

### **B. Dosage des protéines**

Les extraits protéiques sont dosés par le 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'étalon établie avec l'albumine sérique bovine (0 à 20 µg/mL).

### **C. Zymogramme**

Les gels d'activité sont réalisés avec les chambres d'électrophorèse MiniProtean II BioRAD (Richmond, CA, USA) en conditions natives. Les gels ont une épaisseur de 1,5 mm. La concentration finale de polyacrylamide est de 7,5% (p/v) pour le gel de séparation et de 4% (p/v) pour le gel de concentration. Les migrations se réalisent à 4°C à 15V/cm<sup>-1</sup> pendant 3h. A part les zymogrammes pour lesquels ceci est précisé, le tampon de migration est : Tris 25 mM, glycine 192 mM, DTT 1 mM.

#### **Zymogramme des activités hydrolytiques**

100 µg d'extrait protéique sont déposés sur le gel de polyacrylamide contenant 0,3% d'amidon soluble de pomme de terre avec 6% de polyacrylamide pour le gel de séparation. Après la migration, le gel est incubé une nuit à température ambiante dans du citrate de sodium 50 mM, pH 6,0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, DTT 5 mM. Afin de révéler les différentes activités hydrolytiques, l'amidon soluble peut être remplacé dans le gel par 0,3% de glycogène, 0,3%

d'amylopectine ou 0,2% de β-dextrine limite.

#### **Zymogrammes des activités pullulanases**

100 µg de protéines sont déposés sur le gel contenant 0,3% de pullulane rouge. Après la migration, le gel est incubé toute la nuit en présence de Tris/HCl 100 mM pH 7,0, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 1 mM. Les activités pullulanases apparaissent sous la forme de bandes blanches sur le gel.

#### **Zymogramme des activités amidon-synthétases solubles**

100 µg de protéines provenant d'un extrait cellulaire de feuilles sont déposés sur le gel de polyacrylamide (7,5%) non dénaturant contenant 0,3% de glycogène de foie de lapin. Après la migration, le gel est incubé toute la nuit en présence de Glygly/NaOH 50 mM pH 9, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,25 g/L, ADP-Glc 1mM. Les activités amidon-synthétases sont révélées par coloration à l'iode.

#### **Zymogramme des activités amidon-phosphorylases**

Les protéines de feuilles sont extraits dans le tampon suivant : 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0, 0,5 M NaCl. 100  $\mu\text{g}$  de protéines sont déposés sur le gel contenant 0,3% d'amidon soluble. La concentration finale de gel de concentration est de 2,5%. Le tampon de migration est le Glycine/Tris 40 mM pH 8,5. Après la migration, 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 révélé par coloration à l'iode.

#### **D. Dosage *in vitro* des activités du métabolisme de l'amidon**

##### **Dosage de l'activité ADP-glucose pyrophosphorylase**

L'activité ADP-glucose pyrophosphorylase est mesurée dans le sens de la dégradation de l'ADP-Glc en présence de PPI pour produire de l'ATP et du glucose-1-phosphate. Le G-1-P est transformé en G-6-P par l'action de la phosphoglucomutase. Le G-6-P est oxydé en glucono-6-phospholactone par la glucose-6-phosphate déshydrogénase en présence de NADP. La production de NADPH,  $\text{H}^+$  est suivie par spectrométrie à 365 nm.

L'échantillon (100  $\mu\text{g}$  de protéines) est ajouté au mélange réactionnel pour obtenir un volume final de 500  $\mu\text{L}$  du tampon suivant : GlyGly/NaOH 80 mM pH 7.5, PPI 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  60 mM, Glucose-1,6-diphosphate 0.05 mM, NADP 0,25 mM, NAF 10 mM, ADP-Glc 1 mM et acide 3-phosphoglycerique (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 $\beta$ -amylases**

Les feuilles prélevées en milieu de photopériode sont broyées dans 100  $\mu\text{L}$  du tampon d'extraction suivant : acétate de sodium 100 mM pH 6,0, EDTA 10 mM, DTT 10 mM. 100  $\mu\text{L}$  d'extrait brut sont incubés 1 heure à 30°C avec 100  $\mu\text{L}$  d'amidon soluble de pomme de terre (20mg/ml). La réaction est arrêtée en mettant l'échantillon 10 min. à 100°C. Dans cette solution, on ajoute ensuite 360  $\mu\text{L}$  d'eau, 5 unités de maltose phosphorylase (Sigma), 2 unités d'hexokinase (Enzytec), 1 unité de G-6-P déshydrogénase (Enzytec) et 300  $\mu\text{L}$  de tampon (Triéthanolamine pH7,6, 1,5 mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM  $\text{MgSO}_4$ )

(Enzytec). L'absorbance à 365 nm est mesurée. De ce fait, le maltose libéré lors de la réaction est déterminé spécifiquement.

#### **Dosage des activités $\alpha$ -amylases**

Les feuilles sont broyées dans 50 mM acide malique pH 5.4, 87,5 mM NaOH, 50 mM NaCl et 2 mM CaCl<sub>2</sub>. A 100  $\mu$ L d'extrait sont ajoutés 100  $\mu$ L d'Amylase HR reagent, un substrat commercial (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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1% (p/v) pH 11.5. L'absorbance est mesurée à 400 nm au spectrophotomètre et la concentration de produit libéré est déterminée à l'aide d'un étalon mesuré à l'avance.

#### **Dosage de l'activité $\alpha$ -1,4 glucanotransférase**

Les feuilles sont broyées dans 20 mM MES pH 6.2. A 50  $\mu$ L d'échantillon sont ajoutés 450  $\mu$ L 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**

Les protéines sont extraites dans le tampon suivant : 100 mM MOPS pH 7.2, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, éthanediol 10% (v/v) et PVP 50 mg/mL. 50  $\mu$ g 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 200  $\mu$ L. Après 1 heure à 30°C, 200  $\mu$ L d'une solution de DNS sont ajoutés à l'échantillon et l'ensemble est porté à ébullition durant 10 minutes. Après ajout de 800  $\mu$ L 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 amidon-phosphorylases**

50  $\mu$ L d'extrait préparé dans le tampon 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 0,5 M NaCl sont ajoutés à 950  $\mu$ L du tampon d'incubation suivant : 20 mM MOPS pH 7.0, 20 mM tampon phosphate, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 unité de phosphoglucomutase est ajoutée au surnageant obtenu. La réaction se déroule à température ambiante durant 10 minutes. Le G-1-P libéré par les

phosphorylases est ainsi transformé en G-6-P, puis 3 unités de glucose-6-phosphate déshydrogénase sont ajoutées à la solution. L'absorbance est mesuré après sa stabilisation.

## **RESULTATS**

## Résumé

Quatre gènes de la structure des enzymes de débranchement (DBE) de l'amidon (*ISA1*, *ISA2*, *ISA3* et *PUI*) sont détectés dans le génome de l'*Arabidopsis thaliana*. Les deux lignées simples mutantes correspondant respectivement à ces gènes ont été sélectionnées et analysées. Nos résultats indiquent que les activités *ISA1* et *ISA2* sont toutes les deux indispensables pour la production d'un complexe isoamylasique fonctionnel, dénommé Iso1. Ce complexe est l'activité isoamylasique majeure trouvée dans les feuilles d'*Arabidopsis*. L'absence d'Iso1 dans ces deux lignées conduit à la diminution de 80% de contenu de l'amidon synthétisé en fin de photopériode et une accumulation massive de polysaccharides solubles dans l'eau (WSP). La structure de ces WSP est similaire à celle de glycogène. De plus, la structure de l'amylopectine résiduel dans ces deux lignées mutantes s'avère fortement modifiée en comparaison de celle du sauvage. Ces résultats suggèrent qu'Iso1 est directement impliquée dans le processus de synthèse de l'amylopectine et non pas de manière indirecte comme cela avait été suggéré par

certains auteurs.

La lignée portant une déficience pour le gène *ISA3* montre quant à elle un phénotype de suraccumulation de l'amidon à la fin du jour et de la nuit qui s'accompagne d'une légère, mais significative modification de la structure de l'amylopectine. Ce résultat sous-entend que cette enzyme joue un rôle majeur dans la mobilisation de l'amidon pendant la nuit.

Par contre aucun phénotype n'a été observé après l'analyse du simple mutant *pul1-*, alors que le double mutant *isa2-/pul1-* présente une décroissance de 92% de contenu de l'amidon par rapport au sauvage (plus forte que celle observée dans le simple mutant *isa2-* ou *isa1-*). Cela suggère que la fonction de pullulanase est partiellement redondante de celle de Iso1, même si l'implication de la pullulanase reste très négligeable en présence de Iso1 dans les cellules.

# Mutants of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogen and an Abnormal Form of Amylopectin<sup>1[w]</sup>

Fabrice Wattebled<sup>2</sup>, Ying Dong<sup>2</sup>, Sylvain Dumez, David Delvallé, Véronique Planchot, Pierre Berbezy, Darshna Vyas, Paul Colonna, Manash Chatterjee<sup>3</sup>, Steven Ball, and Christophe D'Hulst\*

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 8576 Centre National de la Recherche Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France (F.W., Y.D., S.D., D.D., S.B., C.D.); Unité de Recherche sur les Biopolymères, Interactions et Assemblages, Institut National de la Recherche Agronomique Centre de Nantes, 44316 Nantes cedex 3, France (V.P., P.C.); and Biogemma UK Ltd, Cambridge CB4 0GZ, United Kingdom (P.B., D.V., M.C.)

Mutant lines defective for each of the four starch debranching enzyme (DBE) genes (*AtISA1*, *AtISA2*, *AtISA3*, and *AtPLU1*) detected in the nuclear genome of *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) were produced and analyzed. Our results indicate that both *AtISA1* and *AtISA2* are required for the production of a functional isoamylase-type of DBE named Iso1, the major isoamylase activity found in leaves. The absence of Iso1 leads to an 80% decrease in the starch content in both lines and to the accumulation of water-soluble polysaccharides whose structure is similar to glycogen. In addition, the residual amylopectin structure in the corresponding mutant lines displays a strong modification when compared to the wild type, suggesting a direct, rather than an indirect, function of Iso1 during the synthesis of amylopectin. Mutant lines carrying a defect in *AtISA3* display a strong starch-excess phenotype at the end of both the light and the dark phases accompanied by a small modification of the amylopectin structure. This result suggests that this isoamylase-type of DBE plays a major role during starch mobilization. The analysis of the *Atpu1* single-mutant lines did not lead to a distinctive phenotype. However, *Atisa2/Atpu1* double-mutant lines display a 92% decrease in starch content. This suggests that the function of pullulanase partly overlaps that of Iso1, although its implication remains negligible when Iso1 is present within the cell.

Amylopectin, the major polysaccharide fraction of starch granules, can be distinguished from glycogen by the presence of an asymmetric distribution of  $\alpha$ -1,6 branches within the molecule (for review, see Buléon et al., 1998; Myers et al., 2000). It is thought that this concentration of branches in certain regions of the macromolecule is responsible for the clustering of chains, which in turn allows the formation of double helical structures that align and crystallize (Hizukuri, 1986; Manners, 1989; for review, see Ball and Morell, 2003). In 1996, Ball et al. suggested that this distribution and, consequently, the crystallization of polysaccharides in macrogranular structures result from the action of the isoamylase family of debranching enzymes (DBEs). This suggestion has been termed the

amylopectin-trimming model, which hypothesized that misplaced, loosely branched chains are trimmed from a maturing structure to allow polysaccharide crystallization. This result was suggested by the description of mutants of maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), and the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* that, in the absence of isoamylase, substituted amylopectin synthesis by that of glycogen (Pan and Nelson, 1984; James et al., 1995; Mouille et al., 1996; Nakamura et al., 1996; Kubo et al., 2005). In *C. reinhardtii*, the substitution of starch by glycogen synthesis was essentially complete and therefore thought to be mandatory to obtain macrogranular structures. Subsequently, mutants or antisense plants with reduced amounts of isoamylase activity were produced in barley (*Hordeum vulgare*), potato (*Solanum tuberosum*), and *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; Zeeman et al., 1998; Burton et al., 2002; Bustos et al., 2004). Alternative interpretations to the trimming model were proposed, including a specific function in the clearing of water-soluble polysaccharides (WSPs) or in the priming of starch granule formation (Zeeman et al., 1998). A specific claim was made that the block on starch synthesis of defects in isoamylase activity was essentially incomplete. In *Arabidopsis*, mutants that lacked isoamylase activity were said to display a normal amylopectin structure, an observation thought to be incompatible with the trimming model (Zeeman et al., 1998).

<sup>1</sup> This work was supported by Génoplante (project no. AF2001030), by the Région Nord Pas de Calais, by the Ministère Délégué à la Recherche (Action Concertée Incitative Jeunes-Chercheurs no. JC5145), by the European Community (Feder, CPER2000-2006), and by the Centre National de la Recherche Scientifique.

<sup>2</sup> These authors contributed equally to the paper.

<sup>3</sup> Present address: National Institute of Agricultural Biology, Hintingdon Road, Cambridge CB3 0LE, UK.

\* Corresponding author; e-mail christophe.dhulst@univ-lille1.fr; fax 33-3-20-43-65-55.

[w] The online version of this article contains Web-only data.

Article, publication date, and citation information can be found at [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.059295](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.105.059295).

In this study, we report the starch accumulation phenotypes of different insertion mutant lines of Arabidopsis defective for each of the four DBE isoforms detected in the Arabidopsis genome: *AtISA1* (At2g39930), *AtISA2* (At1g03310), *AtISA3* (At4g09020), and *AtPUI1* (At5g04360). Moreover, we have generated and analyzed a double-mutant line that is defective for both pullulanase and the major form of an isoamylase-type DBE (*AtISA2/AtPUI1*). Our results contradict the observation of Zeeman et al. (1998) and provide information about the specific function of each DBE in starch metabolism.

## RESULTS

### DBE Genes in Arabidopsis and Selection of the Corresponding Mutant Lines

Four genetically independent loci corresponding to DBEs were detected in the nuclear genome of Arabidopsis: At2g39930 (*AtISA1*), At1g03310 (*AtISA2*), At4g09020 (*AtISA3*), and At5g04360 (*AtPUI1*); for a complete description of these loci, see <http://www.starchmetnet.org/GeneList/GeneListFrameset.htm>. The latter corresponds to a pullulanase-type DBE, whereas the former three correspond to an isoamylase-type DBE. Insertion mutant lines for each of these genes were selected from different insertion mutant collections (Nottingham Arabidopsis Stock Centre [NASC] and Génoplante). A rapid description of these lines is presented in Table I. Except for *Atisa2-1*, T-DNA is always inserted within coding sequences (Fig. 1). Homozygous mutant lines were selected from a pooled sample of T3 seeds for each gene of interest. Expression of mRNA was tested for each line by reverse transcription (RT)-PCR amplification of the corresponding transcript (18S RNA amplification was used as a positive control for each sample). The mRNA synthesis is completely abolished in *Atisa2-1* (Fig. 1B) and *Atpu1-1* (Fig. 1D). Conversely, a transcript is still synthesized and was amplified in *Atisa1-1* (Fig. 1A), *Atisa2-2* (Fig. 1B), and *Atisa3-1* (Fig. 1C). Nevertheless, when the RT-PCR amplification was performed by a primer pair overlapping the insertion site of the T-DNA, no amplicon was observed in the mutant lines. It is likely that these mutations do not lead to the production of a protein and might therefore be considered as null mutations for the genes of interest.

Double-mutant lines defective for both *AtISA2* and *AtPUI1* were generated after crosses between lines CTI15 (*Atisa2-1*) and CQU5 (*Atpu1-1*). Two segregating lines, named 5FWB6 and 3FWF5, were selected from two independent crosses and further analyzed for starch accumulation phenotype. In the following paragraphs, only the results concerning line 5FWB6 will be presented, since the same results were obtained with line 3FWF5.

No significant modification in seed germination level, plant growth, flowering rate, or silique formation was noticed for the different mutant lines grown under the standard conditions used for this work (16-h light/8-h dark).

### Enzymatic Characterization of the Mutant Lines

DBE activities were checked in all mutant lines through zymogram analysis (Fig. 2). This technique has proven to represent one of the best ways to correlate the alteration of a specific starch-metabolizing activity with one particular mutated gene. Soluble proteins of a leaf crude extract are loaded onto a starch-containing polyacrylamide gel and separated under native conditions. Their activity is revealed by iodine staining after incubation overnight at room temperature. Under these conditions, several starch-modifying activities were observed in Arabidopsis leaves ranging from starch-branching enzymes to  $\beta$ -amylase (Fig. 2, A and B). Nevertheless, some bands of unidentified activity were detected on these gels. These activities were not yet associated to a particular starch-metabolizing enzyme after mutant analysis.

Mutation at the *AtPUI1* locus in line CQU5 leads to the specific disappearance of a blue band (Fig. 2B). To confirm that this blue band actually corresponds to pullulanase, we have submitted the same leaf extract to a specific pullulanase zymogram performed with a red pullulan-containing gel (Fig. 2C). After migration, the gel was incubated overnight at room temperature. Only one clear band (corresponding to degradation of red pullulan) was detected in the wild-type extract, indicating that only one pullulanase activity is present in Arabidopsis leaves (as already suggested by genome sequence analysis). This band is lacking in *Atpu1-1*, but remains apparent in *Atisa2-1*, suggesting that a mutation at this locus does not affect pullulanase activity.

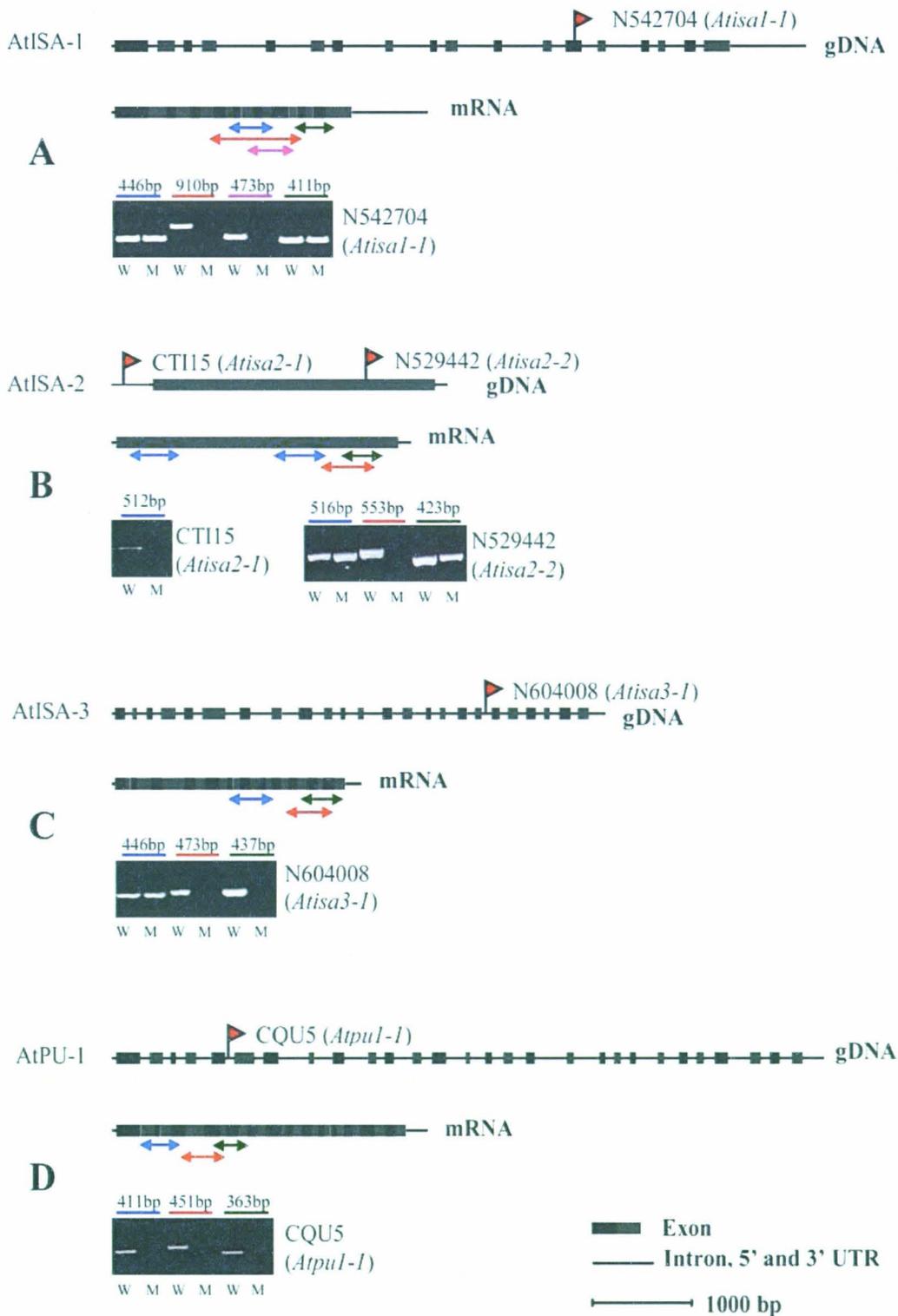
Table I. Description of mutant lines used in this work

Gene	AGI Identification	Enzymatic Function	Line and Allele Identification	Position of T-DNA <sup>a</sup>	Mutant Collection
<i>AtISA1</i>	At2g39930	Isoamylase	N542704 ( <i>Atisa1-1</i> )	+4591 (exon 13)	NASC <sup>b</sup>
<i>AtISA2</i>	At1g03310	Isoamylase	CTI15 ( <i>Atisa2-1</i> )	-290	Génoplante <sup>c</sup>
			N529442 ( <i>Atisa2-2</i> )	+2091	NASC
<i>AtISA3</i>	At4g09020	Isoamylase	N604008 ( <i>Atisa3-1</i> )	+3638 (intron 18)	NASC
<i>AtPUI1</i>	At5g04360	Pullulanase	CQU5 ( <i>Atpu1-1</i> )	+1108 (intron 5)	Génoplante

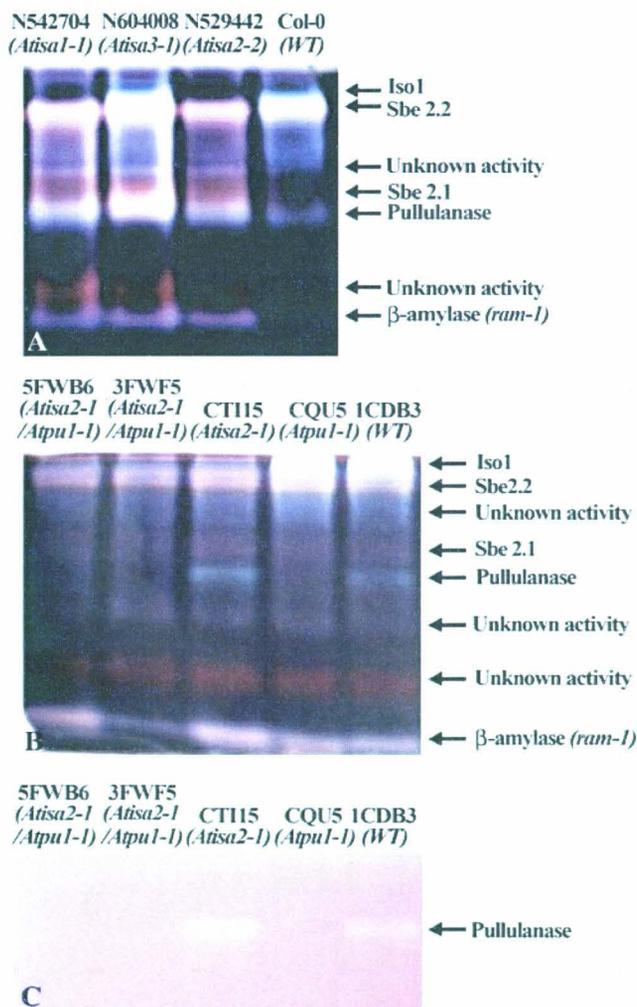
<sup>a</sup>Position of T-DNA is given from the start codon. FLAGdb:

<sup>b</sup>NASC: <http://nasc.nott.ac.uk>.

<sup>c</sup>Génoplante, <http://genoplante-info.infobiogen.fr/>



**Figure 1.** Molecular organization of DBE mutant alleles. Both gDNA and mRNA organizations are presented for each DBE gene of Arabidopsis. Red flags specify T-DNA insertion sites. Bold lines correspond to exons, while thin lines represent introns. 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 sequences). Images below mRNA structure correspond to agarose gels performed with RT-PCR amplification products. RT-PCR amplifications were produced upstream, downstream, and spanning the T-DNA insertion site. M, mutant line; W, wild-type line.



**Figure 2.** Zymograms of starch-modifying enzymes. A and B, Approximately 100  $\mu$ g of soluble proteins from a leaf crude extract were loaded onto a starch-containing polyacrylamide gel. After migration under native conditions, gels were incubated overnight at pH 6. Starch-modifying activities were visualized by iodine staining. C, Approximately 100  $\mu$ g of soluble proteins from a leaf crude extract were loaded onto a red pullulan-containing gel. After migration under native conditions, the gel was incubated overnight at pH 8. White bands correspond to pullulanase activity where red pullulan was degraded.

A pale blue band situated at the edge of the starch-containing gel is missing in *Atisa1-1*, *Atisa2-1*, and *Atisa2-2* (Fig. 2, A and B). This band, which we have named Iso1, corresponds to the previously described isoamylase activity lacking in the *dbe1* mutant, which was localized within the plastid (Zeeman et al., 1998). This result indicates that both *AtISA1* and *AtISA2* genes are required for the normal activity of this enzyme in Arabidopsis leaves. Nevertheless, it is yet impossible to determine whether both proteins belong to the same heteromultimeric complex or whether their activities are simply interdependent. Despite several attempts (performed under several condi-

tions), it was impossible to restore any visible Iso1 activity on the zymogram by mixing crude extracts produced from single-mutant lines (i.e. lines *Atisa1-1* and *Atisa2-2*). This suggests either the instability of monomers in the single-mutant lines or the presence of an intricate mechanism, not reproduced in our crude in vitro conditions, required for the formation of an active Iso1 enzyme. We have established by the zymogram technique that this enzyme is not only active on starch but also on various substrates such as maize amylopectin and  $\beta$ -limit dextrins (Fig. 3, A and B). However, this enzyme appears as a brown-staining band on glycogen- and phytyglycogen-containing zymograms (Fig. 3, C and D, respectively) that is specifically lacking in the lines mutated at genes *AtISA1* and *AtISA2*. Such coloration for isoamylase activity on glycogen-containing gel was previously described for *C. reinhardtii* (Colleoni et al., 1999). Although it is not very obvious from the figure, a clearer region was observable in the center of the brownish band, indicating that the substrate is only slowly degraded by the enzyme within the gel (Fig. 3C). To ensure that this brown band is not related to  $\alpha$ -4-glucanotransferases ( $\nu$ -enzyme), we have loaded onto the same glycogen-containing gel the cellular extracts prepared from two mutant lines defective for *dpe1* and *dpe2* genes (At5g64860 and At2g40840 genes, respectively, corresponding to both forms of  $\nu$ -enzyme found in the Arabidopsis genome). The brown band was still present in both  $\nu$ -enzyme mutant lines (Fig. 3C). This result suggests that glycogen and phytyglycogen do not represent the best substrates for Iso1, as these molecules seem to be only slowly degraded within the gel.

The situation is different in *Atisa3-1*. Although this gene is expressed in the leaves during the illuminated period (<http://www.starchmetnet.org/Datapages/AtISA3/AtISA3Frameset.htm>), no modification of the zymogram profile was reported in this mutant line (Fig. 2A). Zymograms performed with other types of polysaccharides (glycogen, amylopectin, maize phytyglycogen,  $\beta$ -limit dextrins) entrapped within the polyacrylamide matrix also failed to detect any modification of activity in Arabidopsis leaves (Fig. 3). The missing activity might thus require other components to be active in vitro or might be extremely sensitive to the surrounding conditions such as polysaccharide concentration and/or redox environment that are not reproduced in our in vitro conditions.

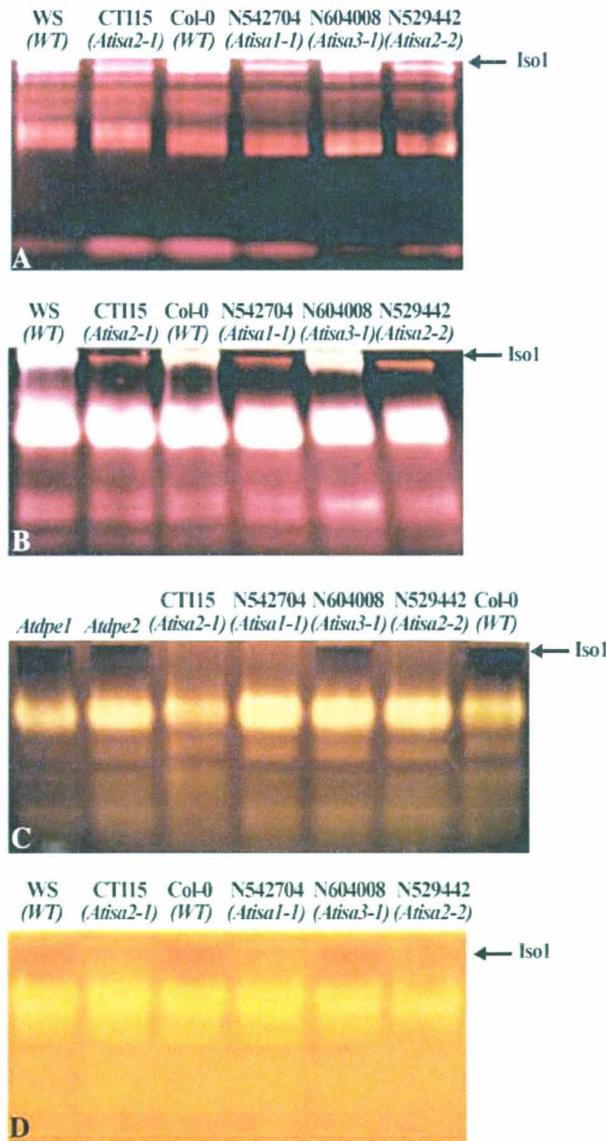
Both Iso1 and pullulanase activities were lacking in the two double-mutant lines *Atisa2-1/Atpu1-1*, as shown in Figure 2, B and C.

No other hydrolytic activity (as well as other starch-metabolizing enzymes; data not shown) was affected by the different mutations that were studied in this work.

#### Starch and WSP Accumulation Phenotypes

We have performed a complete study of the polysaccharide accumulation phenotype for every mutant

line. Starch and WSP content was measured at the end of the illuminated period (Fig. 4). We have used both Wassilewskija (WS) and Columbia-0 (Col-0) ecotypes as wild-type references since the mutant lines were produced in both genetic backgrounds (WS for Génoplante lines and Col-0 for NASC lines). Starch levels were expressed in comparison to the corresponding wild type (starch content in wild-type lines was arbitrarily assigned a value of 100%).



**Figure 3.** Zymograms of starch-modifying enzymes. Approximately 100  $\mu$ g of soluble proteins from a leaf crude extract were loaded onto polyacrylamide gels containing different substrates. A to D, Maize amylopectin, maize  $\beta$ -limit dextrins, rabbit liver glycogen, and maize phytglycogen, respectively. After migration and incubation overnight at room temperature at pH 6, starch-modifying activities were revealed by iodine staining. *Atdpe1* and *Atdpe2* lanes correspond to mutant lines defective for genes *At5g64860* and *At2g40840*, respectively.

Starch content was not significantly modified in mutant lines defective for pullulanase activity (*Atpu1-1*). Conversely, the starch level was strongly reduced in mutant lines affected at *AtISA1* or *AtISA2* loci that are both required for Iso1 activity in leaves. In these cases, starch amounts were only 15% to 21% of the wild-type content. Whereas WSP content was only slightly increased in line CQU5 (2-fold increase), a strong increase (50-fold increase) in WSP content was recorded in Iso1-defective mutants.

The starch accumulation level in the double mutant (*Atisa2-1/Atpu1-1*) was also strongly reduced when compared to the wild-type reference (about 8% of remaining starch). The starch content was even lower when compared to *Atisa1* and *Atisa2* single mutants (an approximately 2-fold decrease). WSP amounts were strongly increased when compared to the wild type and were even higher than those measured in the single-mutant lines defective for Iso1 activity. Therefore, our results indicate that the combination of mutations at both *AtISA2* and *AtPU1* genes leads to a more severe phenotype regarding starch and WSP content in leaves.

The situation was different in *Atisa3-1*. In this case, a strong increase of the starch amount was monitored in the leaves at the end of the day (a 2.5-fold increase on average at the end of the day), while no striking modification of WSP content was observed. The same increase in leaf starch content was measured at the end of the dark period, as shown in Figure 4C (a 3.5-fold increase in average at the end of the dark period). No modification in WSP level at the end of the dark period was reported in *Atisa3-1* when compared to the wild type (data not shown).

Finally, no significant alteration of the amylase-to-amylopectin ratio was observed in the different mutant lines analyzed in this study (determined by size exclusion chromatography performed on a Sepharose CL-2B column; data not shown).

### Structural Analysis of Mutant Amylopectin and WSP

The impact of the different mutations or combination of mutations on amylopectin structure was analyzed and compared to the wild type. Amylopectin was purified by size exclusion chromatography on a Sepharose CL-2B column and subsequently analyzed. The wavelength of the maximal absorbance of the iodine-polysaccharide complex ( $\lambda_{max}$ ) of amylopectin was recorded (Table II). The values measured clearly indicate that the amylopectin structure is modified in *Atisa1* and *Atisa2* mutant lines. Conversely, the amylopectin structure seems to remain unaffected by a mutation at *AtISA3* or *AtPU1* as no significant modification of the amylopectin  $\lambda_{max}$  could be observed in these samples when compared to the wild-type (Table II) references. Surprisingly, the  $\lambda_{max}$  value of the residual amylopectin of the double-mutant line (*Atisa2-1/Atpu1-1*) was slightly lower than that of the wild type

and consequently much lower than that of the corresponding single-mutant lines.

Purified amylopectin was debranched to completion by a mix of two bacterial DBEs (isoamylase and pullulanase). Resultant linear glucans were separated and quantified by fluorophore-assisted capillary electrophoresis (FACE) or high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD; Fig. 5) and compared to the corresponding wild-type reference (Fig. 6). Chain-length (CL) distribution profiles for both *Atisa1-1* and *Atisa2-2* mutants were very similar but different from those of the wild-type reference (Fig. 5, B, C, and A, respectively). Both mutant amylopectins showed a strong increase in the number of small chains ( $5 < \text{degree of polymerization [DP]} < 9$ ) together with a significant decrease in the number of longer chains (11–17 DP; Fig. 6, A and B). The same results were obtained with *Atisa2-1*. This result could partly explain the increase in  $\lambda_{\text{max}}$  of the residual amylopectin observed in both lines since glucans shorter than 12 Glc residues in length are unable to interact with iodine (Banks et al., 1971).

These results were strikingly different from those previously reported by Zeeman et al. (1998) for the *dbe1* mutant line. No modification of amylopectin CL distribution was reported by these authors. It is not clear yet whether this difference is a consequence of culture conditions or starch extraction, purification methods or analysis procedures. Nevertheless, whatever the mutation (to be found at the *AtISA1* or *AtISA2* gene), the Iso1 complex seems to be required for normal amylopectin synthesis in Arabidopsis leaves.

On the contrary, no significant alteration of the CL distribution profile of amylopectin was observed in *Atisa3-1* (Figs. 5D and 6C). On the other hand, the *Atpu1-1* mutant displayed a small, yet significant, difference (Figs. 5E and 6D). This result suggests that *Atisa3* either is not extensively involved in amylopectin synthesis or is involved at such a low level that its absence does not lead to a significant modification of the amylopectin structure when the Iso1 complex is present and active. The result obtained with *Atpu1-1* is suggestive of a small impact on amylopectin structure that is qualitatively similar, but not identical to, that of Iso1.

The amylopectin CL profile of the *Atisa2-1/Atpu1-1* double mutant was established (Fig. 5G) and compared to that of the corresponding wild-type reference (Fig. 5F). The difference plot, shown in Figure 6E, displays the profile similar to those of the *Atisa1* and *Atisa2* single mutants, although to a significantly less severe extent. This result could explain why the  $\lambda_{\text{max}}$  of the residual amylopectin in the double-mutant line is reduced when compared to wild-type and single-mutant lines.

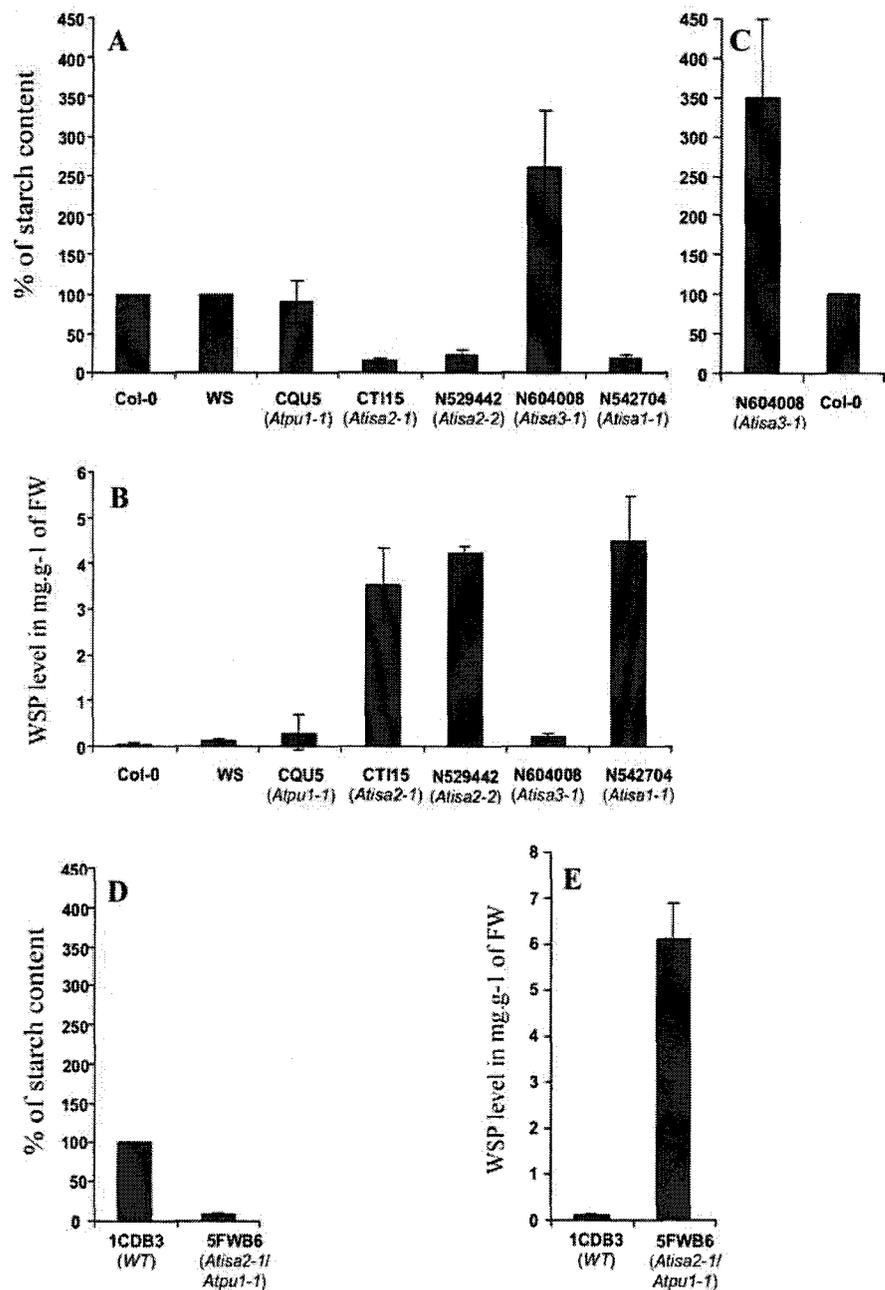
Finally, we have investigated the structure of the WSP that accumulates in Iso1-defective (*Atisa1* and *Atisa2*) and Iso1/pullulanase-defective (*Atisa2-1/Atpu1-1*) lines. After purification, WSPs were first

submitted to size exclusion chromatography on a Sephadex TSK HW50 column (Fig. 7, A–C, respectively). Two peaks were observed for each mutant line. The elution volume of the first peak (peak I in Fig. 7, A–C) matches that of rabbit liver glycogen, while the elution volume of the second peak (peak II in Fig. 7, A–C) corresponds to that of Glc. About two-thirds of the loaded material were found in peak I and one-third in peak II (determined from amyloglucosidase test after subtracting the tiny amount of free hexose assayed in the samples) whatever the line under study. The CL distributions of these peaks were determined by high-performance anion-exchange chromatography pulsed-amperometric detection (HPAEC-PAD) after complete debranching with a mixture of both isoamylase and pullulanase. Peak I CL profiles of the three mutant lines were essentially the same (Fig. 7, E–G) and were very similar to those of glycogen (Fig. 7D). As for glycogen, chains of DP 7 were the most abundant glucans within this soluble polymer. Peak II was almost solely composed of maltose (only a tiny amount of free hexose was also measured in peak II; data not shown).

## DISCUSSION

We have shown that insertions at either *AtISA1* (At2g39930) or *AtISA2* (At1g03310) specifically lead to the disappearance in Arabidopsis leaves of one form of isoamylase, named Iso1. The same activity, demonstrated to be located within the plastid, is specifically absent in the *dbe1* mutant described by Zeeman et al. (1998). In both cases, the absence of Iso1 leads to a dramatic decrease of starch content together with the accumulation of large amounts of WSP generally not found in wild-type plants. However, we have shown that the residual starch is composed of a structurally modified amylopectin. These results strongly suggest a direct function of Iso1 during the synthesis process of amylopectin as proposed by Ball et al. (1996). Observations of the same nature have been performed in both maize and rice, where modification in the nature of the isoamylase activity is accompanied by a change in amylopectin CL distribution (Kubo et al., 1999; Dinges et al., 2001). By contrast, an indirect function limited to the clearing of soluble glucans whose synthesis would otherwise compete with that of amylopectin (Zeeman et al., 1998) is difficult to reconcile with our observations in Arabidopsis and with those obtained in maize and rice. Moreover, our results indicate that Iso1 is much less active on both glycogen and phytoglycogen (Fig. 3, C and D) when compared to starch, amylopectin, or  $\beta$ -limit dextrins. This suggests that, if the clearing process effectively occurs within the cell, this isoamylase activity might not represent the major enzyme involved in the degradation of WSP in vivo or at such a low level that WSP would have to be observable in the wild-type line during starch synthesis.

**Figure 4.** Comparison of leaf starch and WSP content in wild-type and mutant lines. Both starch and WSP were assayed by amyloglucosidase assay. The results presented here are the mean of several independent extractions ( $\pm$ se shown as thin bars). Starch levels (A, C, and D) were standardized to the wild-type content, which was arbitrarily assigned a value of 100% ( $n = 4$  for WS, *Atisa2-1*, *Atpu1-1*, and *Atisa2-1/Atpu1-1*;  $n = 3$  for Col-0, *Atisa1-1*, and *Atisa3-1*;  $n = 2$  for *Atisa2-2* and 1CDB3). WSP amounts (B and E) are expressed in mg g<sup>-1</sup> of fresh weight ( $n = 5$  for *Atisa2-1/Atpu1-1*;  $n = 4$  for *Atisa2-1*;  $n = 3$  for WS;  $n = 2$  for other lines). Samples were collected at the end of the light period (16-h-light/8-h-dark cycle), except for C, where samples were collected at the end of the dark period. FW, Fresh weight; WT, wild type.



It is yet impossible to indicate precisely how both *AtISA1* and *AtISA2* function together to produce an active Iso1 enzyme. It was already suggested that different isoamylase isoforms might interact together to form a functional hetero- or homomultimeric complex (Beatty et al., 1999; Fujita et al., 1999; Dauvillée et al., 2001; Hussain et al., 2003). A comparable situation might occur within *Arabidopsis* leaves. In this context, *Atisa1* and *Atisa2* might represent two subunits of the same heteromultimeric complex. Absence of either subunit would, therefore, destabilize such a complex and lead to the same phenotype as those observed in the different mutant lines. Therefore,

combination of both mutations at *AtISA1* and *AtISA2* genes in one single plant is likely to produce more or less the same phenotype as that observed for single-mutant lines analyzed in this work. Further investigation is required to check whether both proteins are catalytically active.

The strong increase in starch content at the end of the illuminated and dark periods displayed by the *Atisa3* mutant, together with the absence of modification in the amylopectin structure, strongly suggest that this isoamylase isoform defines a major enzyme of starch catabolism. This represents a demonstration of the involvement of a particular isoamylase-like activity in

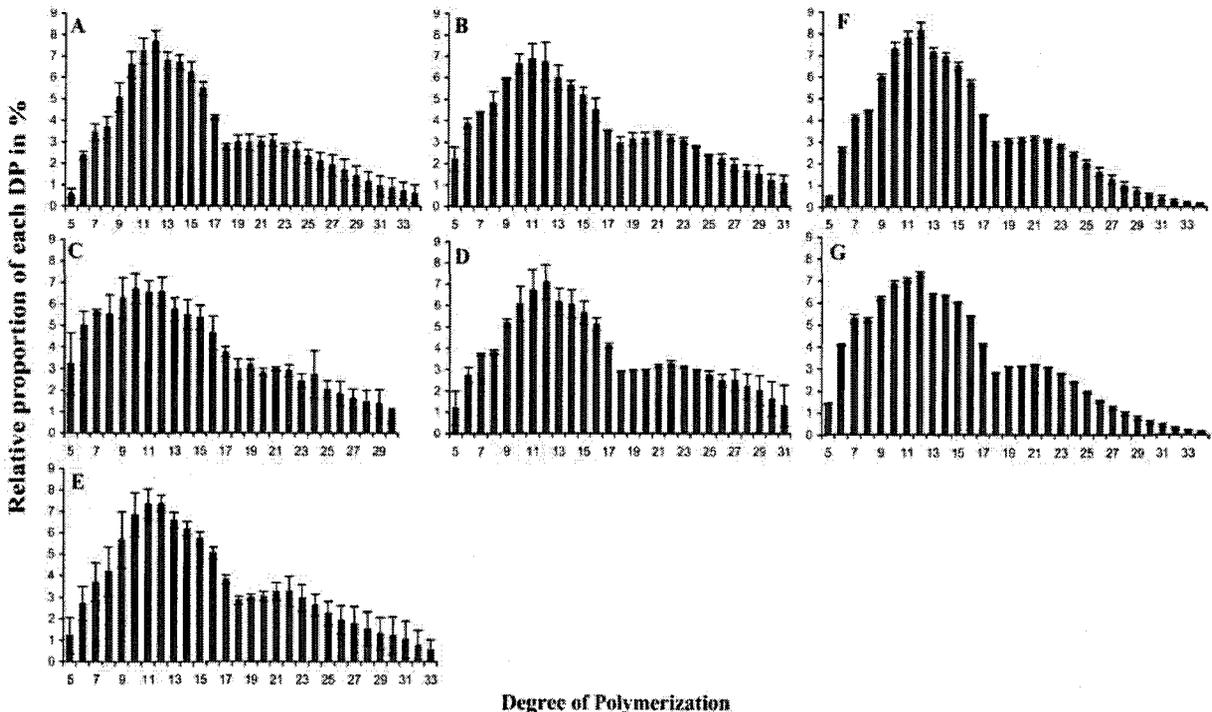
**Table II.**  $\lambda_{max}$  Wavelength at the maximal absorbance of the amylopectin-iodine complex; Col-0, Columbia; WS, Wassilewskija

Arabidopsis Line	$\lambda_{max}$ of Amylopectin <sup>a</sup>	n	P Value <sup>b</sup>
	nm		
Col-0	556 ± 5	2	∅
WS	557 ± 2	4	∅
<i>Atisa1-1</i> (N542704)	570 ± 1.5	2	0.0656
<i>Atisa2-2</i> (N529442)	570.5 ± 3.5	2	0.0828
<i>Atisa2-1</i> (CT115)	573.5 ± 5	2	0.0196
<i>Atisa3-1</i> (N604008)	559.5 ± 6	2	0.6512
<i>Atpu1-1</i> (CQU5)	558.5 ± 6	3	0.7985
1CDB3 <sup>c</sup>	560 ± 5	2	∅
<i>Atisa2-1/Atpu1-1</i> (5FWB6)	550 ± 3	4	0.14

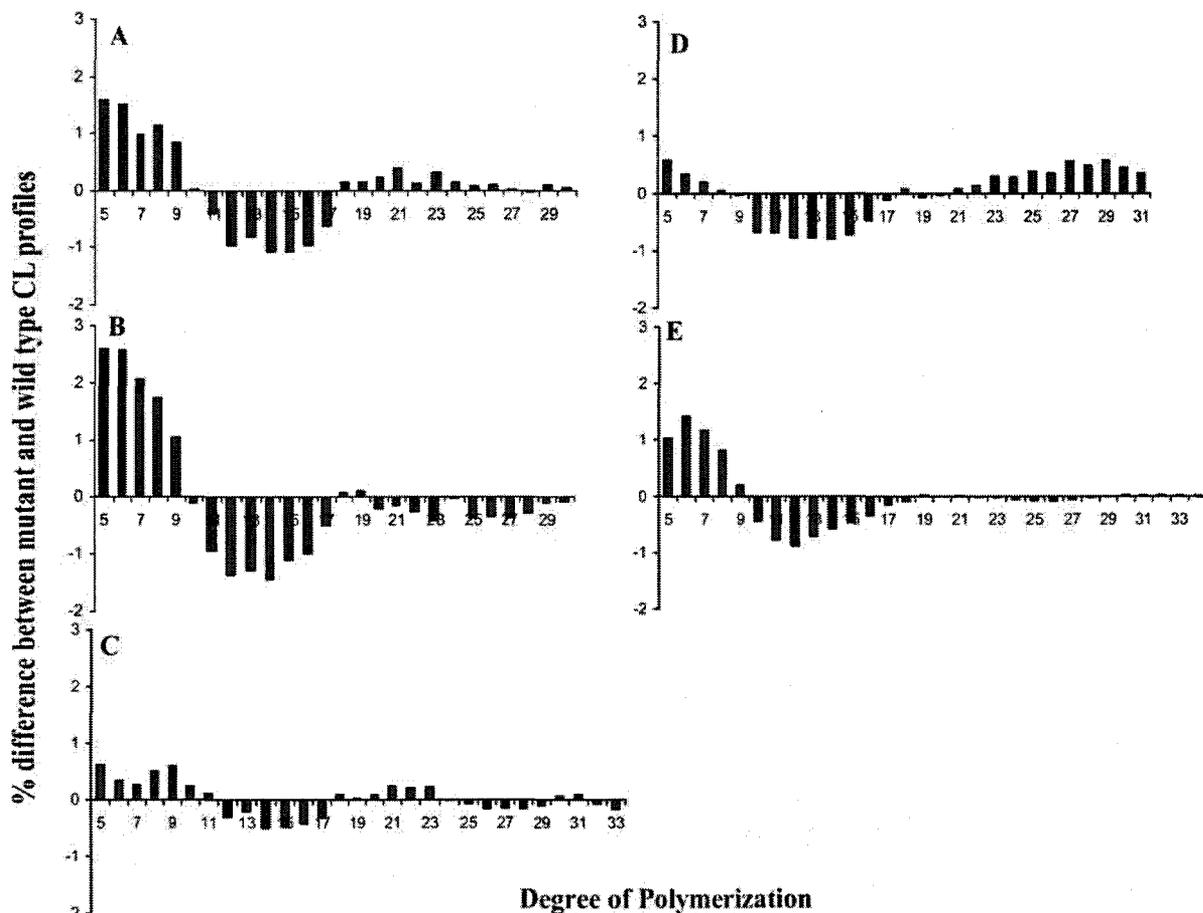
<sup>a</sup>Mean of n measures ± se. <sup>b</sup>Calculation based on Student's two-sample t-test (P value was calculated with the corresponding wild-type line). <sup>c</sup>Line 1CDB3 is a wild-type offspring selected from a cross between single-mutant lines CT115 and CQU5.

starch degradation. This hypothesis is strongly supported by the transcript expression profile for *AtISA3* provided by transcriptomic analysis performed on short (8 h) and normal (12 h) day length (<http://www.starchmetnet.org/Datapages/AtISA3/AtISA3Frameset.htm>; Smith et al., 2004, respectively). The mRNA level

of the *AtISA3* gene perfectly matches those of other genes known to be involved in transient starch mobilization at night (mRNA level is maximal at the transition between the light and dark period, whatever the length of the illuminated period). In addition, the potato recombinant protein corresponding to *AtISA3* was shown to be predominantly active on  $\beta$ -limit dextrans (Hussain et al., 2003). *Atisa3* and the *Escherichia coli* GlgX DBE both display a significantly shorter loop (loop 4) in the enzyme structure that is thought to correlate with the substrate preference. Indeed, according to Abe et al., (1999), longer loops would be required to accommodate the longer outer chains of glycogen or amylopectin, while shorter loops would be adapted to hydrolysis of short outer chains such as those displayed by both phosphorylase or  $\beta$ -amylase-limit dextrans. It is striking to note that both the *E. coli* GlgX and the Arabidopsis *Atisa3* display similar phenotypes consisting of polysaccharide overproduction due to a defect in catabolism (Dauvillée et al., 2005). It has been known since the pioneering work of Scheidig et al. (2002) that  $\beta$ -amylolysis is the major pathway of starch catabolism in plant leaves.  $\beta$ -Amylase defines an exo-hydrolase that processively digests the outer chains of starch polymers. However,



**Figure 5.** CL distribution profiles of amylopectin purified from different lines. After purification by size exclusion chromatography on Sepharose CL-2B columns, amylopectin was completely debranched by a mix of isoamylase and pullulanase. The resulting glucans were analyzed by FACE (A–E) or HPAEC-PAD (F and G). The diagrams represent the percentage (y axis) of each glucan (x axis) in the total population of glucans that can be detected for each sample. Thin bars correspond to so calculated on three independent analyses for each line, except for lines *Atisa1-1* and *Atisa2-1/Atpu1-1* ( $n = 2$ ) and for WT ( $n = 4$ ). A, Wild-type amylopectin (WS and Col-0 profiles were essentially the same and were combined). B, *Atisa1-1* (N542704). C, *Atisa2-2* (N529442). D, *Atisa3-1* (N604008). E, *Atpu1-1* (CQU5). F, Line 1CDB3 (wild-type progeny from a cross between lines CT115 and CQU5). G, Double-mutant line *Atisa2-1/Atpu1-1* (5FWB6). Individual glucans were normalized to total peak area showed in the diagram.

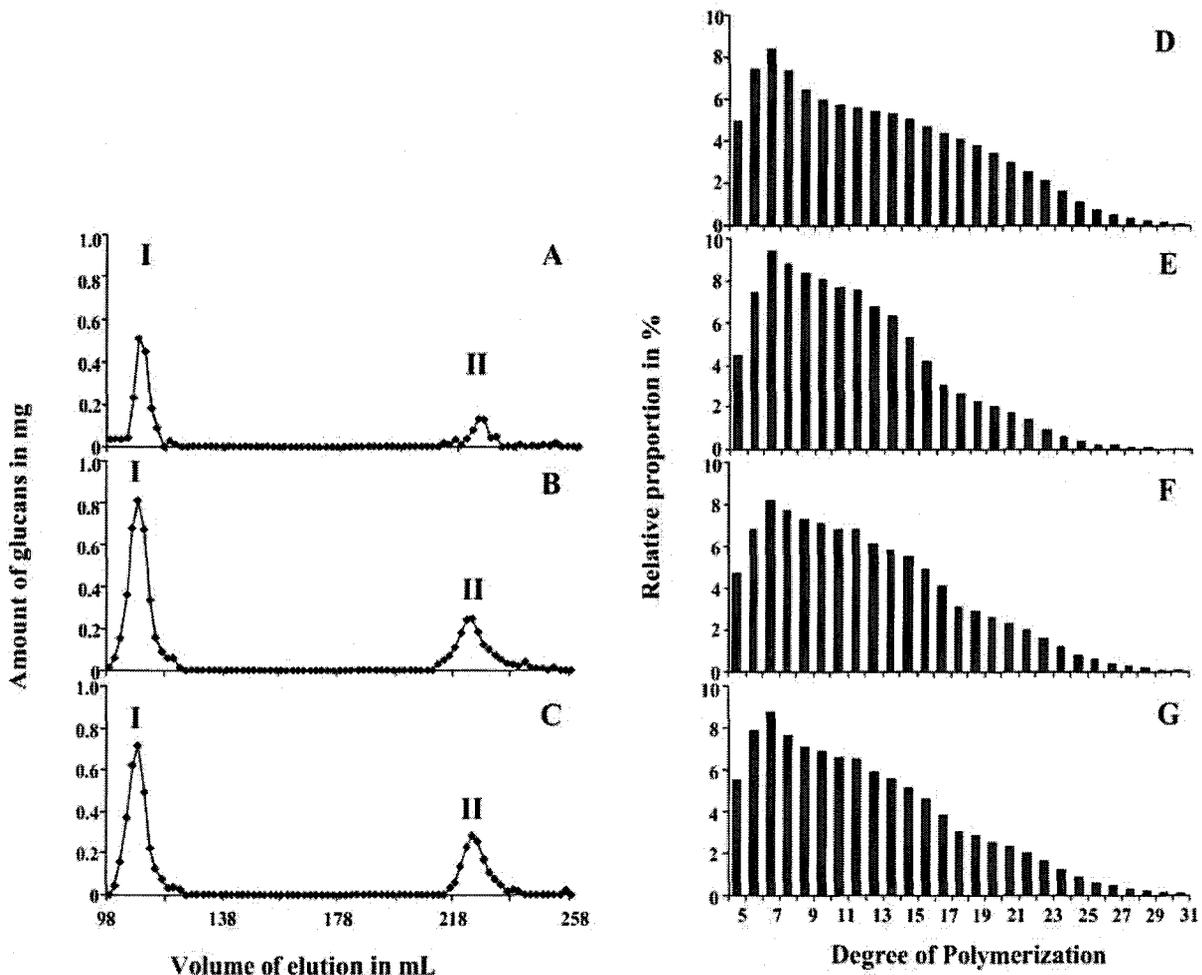


**Figure 6.** Difference plots corresponding to CL distribution profiles presented in Figure 5 (mutant-wild-type profile). A, *Atisa1-1*-wild type. B, *Atisa2*-wild type. C, *Atisa3-1*-wild type. D, *Atpu1-1*-wild type. E, *Atisa2-1/Atpu1-1*-CDB3. Mean profiles of each sample displayed in Figure 5 were used to draw the difference plot.

$\beta$ -amylase cannot bypass the branches and will stop degrading two to three residues from the  $\alpha$ -1,6 branch. We propose that *Atisa3* defines the major DBE required to assist  $\beta$ -amylases for starch degradation in plant leaves at night. This will lead to the production of both  $\alpha$ -maltotriose and  $\alpha$ -maltose, which need to be metabolized. While a disproportionating enzyme (*Dpe1*) is expected to efficiently metabolize maltotriose, maltose is expected to define a very poor substrate for this enzyme. Conflicting results have been published concerning the cellular location of amylopectinase (*Dpe2*) in potato and Arabidopsis (Chia et al., 2004; Lloyd et al., 2004; Lu and Sharkey, 2004). In theory, this enzyme would effectively metabolize the  $\alpha$ -maltose produced by *Atisa3*. The precise localization of the enzyme and its substrate preferences toward  $\alpha$ -maltose and  $\beta$ -maltose needs to be readdressed.

No significant modification of the starch accumulation phenotype was observed in the *Atpu1-1* mutant. Only a very small increase in WSP content was recorded. The modification of amylopectin structure reported in our study is small by comparison to those recorded for the *Atisa1* and *Atisa2* mutants. Neverthe-

less, the defective pattern is similar, suggesting that both activities may play partly redundant functions during starch biosynthesis. The relative increase in chains above DP20 is small and endowed with large errors. We think this general increase stems from the selective decrease of chains between DP9 to DP17, which is not compensated in the pullulanase mutant by an increase in the amount of very small chains. This result is similar to that previously reported in maize leaves (Dinges et al., 2003), although with less expressivity in the case of Arabidopsis. This difference might reflect distinct enzymatic situations between the Arabidopsis and maize leaf. Pullulanase is known to be very effective in the hydrolysis of dextrans produced through  $\alpha$ -amylases during starch degradation. We believe that the absence of a clear impact of pullulanase defect on starch amounts suggests an alternative function of this activity during starch mobilization. Indeed, pullulanase, also named limit dextrinase, is expected to be important whenever  $\alpha$ -dextrans are produced. The latter are defined as the product of degradation of starch by  $\alpha$ -amylases. The absence of impact on starch accumulation levels of the absence



**Figure 7.** Structural characterization of WSPs. After purification, WSPs extracted from *Atisa1-1* (N542704), *Atisa2-1* (CT115) single-mutant lines (A and B, respectively), and the *Atisa2-1/Atpu1-1* (5FWB6) double-mutant line (C) were loaded onto a TSK HW50 column. Elution was carried out in 10% DMSO at a flow rate of 12 mL h<sup>-1</sup>. Two-milliliter fractions were collected and assayed for  $\alpha$ -1,4-linked glucans by amyloglucosidase test. y axis, glucan content in milligrams (after subtracting free hexose content). x axis, Elution volume in milliliters. Peak I was submitted to complete debranching and the resultant linear glucans were separated and quantified by HPAEC-PAD analysis. E to G correspond to peak I glucans from *Atisa1-1* (N542704), *Atisa2-1* (CT115), and *Atisa2-1/Atpu1-1* (5FWB6), respectively. D corresponds to CL distribution profile of rabbit liver glycogen.

of pullulanase may reflect the relatively low importance of  $\alpha$ -amylases for starch degradation in leaves (Scheidig et al., 2002). It remains likely that pullulanase plays an important role in starch degradation in tissues or physiological situations different from those defined by the mature leaf.

However, when the mutated copy of the *AtPUI1* gene was combined to the mutation at the *AtISA2* locus in one single plant, a more severe phenotype for starch and WSP accumulation was observed, while the structure of the residual amylopectin was less severely modified. This result strongly suggests that pullulanase is partially redundant with the function of Iso1 for the trimming of pre-amylopectin chains during starch synthesis. However, pullulanase may only account for a minor part of this process in Arabidopsis leaves. This result correlates to those already reported in maize and rice endosperm (Kubo et al., 1999; Dinges

et al., 2003). The impact on amylopectin structure of the loss of pullulanase in the absence of Iso1 might reflect the different substrate specificity displayed by pullulanase when compared to isoamylase.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

A CL-2B Sepharose column and Percoll were obtained from Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala); a TSK HW50F Sephadex column was obtained from Tosoh Bioscience (Stuttgart, Germany); the starch assay kit (EnzyPlus) was purchased from Enzytec (Toulouse, France); and the protein assay kit (Lowry method) was obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA).

### Arabidopsis Lines, Growth Conditions, and Media

Wild-type (WS and Col-0) and mutant lines of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) were obtained from the T-DNA mutant collections at Unité de

Recherche en Génétique Végétale (URGV), INRA, Versailles, France (Bechtold et al., 1993; Bouchez et al., 1993; Balzergue et al., 2001) and NASC (Alonso et al., 2003). Standard procedures were employed for plant germination and growth. The plants were grown on peat-based compost (seeds were previously incubated at 4°C for 3 d before sowing) under 16-h-light/8-h-dark cycles with temperatures ranging from 16°C during the night to 21°C during the illuminated period.

### RT-PCR Amplification

RT-PCR amplification was performed with the one-step RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA). Approximately 100 mg of fresh tissue were harvested (see culture conditions described above) for total RNA extraction with the Plant RNeasy kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. After extraction, total RNA preparations were treated by RNase-free DNase (1 unit for 30 min at 37°C; Promega, Madison, WI) to ensure the complete removal of any contaminating gDNA into samples. Eighty to 100 ng of purified total RNA were used to complete the RT-PCR amplification. Supplemental Table 1 lists the different primer pairs that were used during this work. To ensure that RNA extraction was correctly performed, we have systematically amplified, as a positive control, a 315-bp fragment corresponding to 18S rRNA (Quantum RNA universal 18S; Ambion, Austin, TX).

### Leaf Crude Extract Preparation

Three to four leaves were harvested at the middle of the light period and kept on ice during the whole extraction procedure. Leaves were homogenized in 100  $\mu$ L of cold extraction buffer (MOPS 100 mM; EDTA 1 mM; dithiothreitol [DTT] 1 mM; glycerol 10%) using a polytron blender (Tissue Tearor; BioSpec Products, Bartlesville, OK). The homogenate is centrifuged twice for 10 min at 10,000g and 4°C. The resulting supernatant is immediately used to perform zymograms (after protein assay).

### Zymograms of Hydrolytic Activities

One hundred micrograms of leaf extract proteins were loaded onto a native PAGE (7.5% acrylamide) and separated for 3 h at 4°C and 15 mA  $\text{cm}^{-1}$ . The gels were incubated overnight at room temperature in the following buffer: trisodium citrate 50 mM, pH 6,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, and DTT 5 mM, except for the pullulanase zymogram, which was incubated in Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8.2, DTT 1 mM. Hydrolytic activities were revealed by iodine solution (I<sub>2</sub> 0.2% [w/v] and KI 2% [w/v]) except for pullulanase gel. Depending on the tested substrate, soluble potato (*Solanum tuberosum*) starch (0.3%), maize (*Zea mays*) amylopectin (0.3%), maize  $\beta$ -limit dextrins (0.3%), maize phytyloglycogen (0.3%), rabbit liver glycogen (0.3%), or red pullulan (0.6%) was added to the gel (final concentration of the substrate in the gel is given within brackets).

### Extraction of Starch from Arabidopsis Leaves

Arabidopsis leaves were harvested at the end of the light period unless otherwise specified. Approximately 10 g of fresh material were homogenized using a polytron blender in 30 mL of the following buffer: 100 mM MOPS, pH 7.2, 5 mM EDTA, 10% (v/v) ethanediol. The homogenate was filtered through two layers of Miracloth (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA) and centrifuged for 15 min at 4°C and 4,000g. The pellet was resuspended in 30 mL Percoll 90% (v/v) and centrifuged for 40 min at 4°C and 10,000g. The starch pellet was washed six times with sterile distilled water (10 min at 4°C and 10,000g). Starch was finally stored at 4°C in 20% ethanol.

### Determination of Starch and WSP Levels and Spectral Properties of the Iodine-Starch Complex

A full account of amyloglucosidase assays and  $\lambda_{\text{max}}$  (wavelength at the maximal absorbance of the iodine polysaccharide complex) measures can be found in Delrue et al. (1992).

### Separation of Starch Polysaccharides by Size Exclusion Chromatography

A total of 1.5 to 2.0 mg starch were dissolved in 500  $\mu$ L of 10 mM NaOH and subsequently applied to a Sepharose CL-2B column (0.5-cm i.d.  $\times$  65-cm

height), which was equilibrated and eluted with 10 mM NaOH. Fractions of 300  $\mu$ L were collected at a rate of 1 fraction/1.5 min. Glucans were detected by their reaction with iodine and the levels of amylopectin and amylose were determined by amyloglucosidase assays after fraction assembling.

### WSP Extraction and Purification

Approximately 10 g of fresh leaves were homogenized using a polytron blender in 30 mL of the following buffer: 100 mM MOPS, pH 7.2, 5 mM EDTA, 10% (v/v) ethanediol. The homogenate was centrifuged for 10 min at 4,000g at 4°C and the resulting supernatant was immediately boiled in a water bath for 30 min and centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C. The supernatant was subsequently lyophilized and the resulting pellet was dissolved in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) before loading onto a TSK HW50F column (90-cm height, 2.2-cm i.d.). Elution is performed by DMSO 10% at a flow rate of 12 mL  $\text{h}^{-1}$ . Two-milliliter fractions were collected and analyzed for glucan content by amyloglucosidase assay. Peak fractions were collected, debranched, and analyzed by HPAEC-PAD. Debranching and HPAEC-PAD procedures were the same as those described for amylopectin (below). Approximately 1 mg of material was used for debranching reaction by isoamylase and pullulanase.

### CL Distribution of Amylopectin after Complete Debranching

FACE of debranched amylopectin: After purification on a Sepharose CL-2B column, 500  $\mu$ g of amylopectin were dialyzed against distilled water and subsequently lyophilized. The amylopectin pellet was resuspended in 1 mL of 55 mM sodium acetate, pH 3.5 buffer, and incubated overnight at 42°C with 20 units of isoamylase isolated from *Pseudomonas amyloclavata* (Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japan) and 1 unit of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* (Sigma, St. Louis). Salts were subsequently removed by passage through an extract-clean carbograph column (Alltech, Deerfield, IL).

Derivatization procedure: Glucans were derivatized with 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) according to the manufacturer's recommendations (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Briefly, 2  $\mu$ L APTS in 15% acetic acid solution and 2  $\mu$ L of 1 M of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in tetrahydrofolate were added and the coupling reaction was allowed overnight at 37°C in the dark.

Capillary electrophoresis analysis: Separation and quantification of APTS-coupled glucans were carried out on a P/ACE System 5000 (Beckman Coulter) equipped with a laser-induced fluorescence system using a 4-mW argon ion laser. The excitation wavelength was 488 nm and the fluorescence emitted at 520 nm was recorded on the Beckman P/ACE station software system (version 1.0). Uncoated fused-silica capillaries of 57-cm length  $\times$  75- $\mu$ m i.d. were used. Running buffers were from Beckman Coulter. Samples were loaded into the capillaries by electroinjection at 10 kV for 10 s and a voltage of 30 kV was applied for 20 min at a constant temperature of 25°C.

HPAEC-PAD (Dionex, Sunnyvale, CA) of debranched polysaccharides: A complete description of this technique can be found in Fontaine et al. (1993). Polysaccharides were debranched as described above before submission to HPAEC-PAD. HPAEC-PAD analysis was performed on Dionex DX600 equipped with a CarboPac PA100 column (4-mm i.d.  $\times$  250-mm length).

Flow rate: 0.8 mL  $\text{min}^{-1}$ . After a 1-min equilibration step with 100 mM NaOH, sample elution was carried out with a linear gradient of sodium acetate (1–40 min, 0–400 mM) in 100 mM NaOH. Peak integration was performed with a C-R8A Chromatopac integrator (Shimadzu, Duisburg, Germany).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Frédéric Chirat and Yves Leroy for their successful help with FACE and HPAEC-PAC analysis.

Received January 26, 2005; returned for revision March 1, 2005; accepted March 3, 2005.

### LITERATURE CITED

- Abe J, Ushijima C, Hizukuri S (1999) Expression of the isoamylase gene of *Flavobacterium odoratum* KU in *Escherichia coli* and identification of essential residues of the enzyme by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol* 65: 4163–4170

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, et al (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657
- Ball S, Guan HP, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buleon A, Colonna P, Preiss J (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86: 349–352
- Ball SG, Morell MK (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 54: 207–233
- Balzergue S, Dubreucq B, Chauvin S, Le-Clainche I, Le Boulaire F, de Rose R, Samson F, Biauudet V, Lecharny A, Cruaud C, et al (2001) Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *Biotechniques* 30: 496–504
- Banks W, Greenwood CT, Khan KM (1971) The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydr Res* 17: 25–33
- Beatty MK, Rahman A, Cao H, Woodman W, Lee M, Myers AM, James MG (1999) Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize. *Plant Physiol* 119: 255–266
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194–1199
- Bouchez D, Camilleri C, Caboche M (1993) A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *CR Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1188–1193
- Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 23: 85–112
- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, Laurie DA, Parker M, Waite D, van Wegen S, et al (2002) Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J* 31: 97–112
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2215–2220
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J* 37: 853–863
- Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, Morell M, Samuel M, Slomiany M-C, Liénard L, Wattedled F, D'Hulst C, Ball S (1999) Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* 120: 1005–1014
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, Morell MK, D'Hulst C, Wattedled F, Liénard L, Delvallé D, Ral J-P, Myers AM, et al (2001) Biochemical characterization of wild type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol* 125: 1723–1731
- Dauvillée D, Kinderf IS, Li Z, Kosar-Hashemi B, Samuel MS, Rampling L, Ball S, Morell MK (2005) Role of the *Escherichia coli* *gigX* gene in glycogen metabolism. *J Bacteriol* 187: 1465–1473
- Delrue B, Fontaine T, Routier F, Decq A, Wieruszeski J-M, van den Koornhuise N, Maddelein M-L, Foumet B, Ball S (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch-synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J Bacteriol* 174: 3612–3620
- Dinges JR, Colleoni C, James MG, Myers AM (2003) Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell* 15: 666–680
- Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, James MG (2001) Molecular structure of the three mutations at the maize *sugary1* locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol* 125: 1406–1418
- Fontaine T, D'Hulst C, Maddelein M-L, Routier F, Marianne-Pepin T, Decq A, Wieruszeski JM, Delrue B, van den Koornhuise N, Bossu JP, et al (1993) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J Biol Chem* 268: 16223–16230
- Fujita N, Kubo A, Francisco PB Jr, Nakakita M, Harada K, Minaka N, Nakamura Y (1999) Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta* 208: 283–293
- Hizukuri S (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr Res* 147: 342–347
- Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman S, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, et al (2003) Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* 15: 133–149
- James MG, Robertson DS, Myers AM (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 7: 417–429
- Kubo A, Fujita N, Harada K, Matsuda T, Satoh H, Nakamura Y (1999) The starch-debranching enzymes isoamylase and pullulanase are both involved in amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol* 121: 399–410
- Kubo A, Rahman S, Utsumi Y, Li Z, Mukai Y, Yamamoto M, Ugaki M, Harada K, Satoh H, Konik-Rose C, et al (2005) Complementation of *sugary1*-phenotype in rice endosperm with the wheat *Isoamylase1* gene supports a direct role for isoamylase1 in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* 137: 43–56
- Lloyd JR, Blennow A, Burhenne K, 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 Physiol* 134: 1347–1354
- Lu Y, Sharkey TD (2004) The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 218: 466–473
- Manners DJ (1989) Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers* 11: 87–112
- 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. *Plant Cell* 8: 1353–1366
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 122: 989–997
- Nakamura Y, Umemoto T, Ogata N, Kuboki Y, Yano M, Sasaki T (1996) Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. *Planta* 199: 209–218
- Pan D, Nelson OE (1984) A debranching enzyme deficiency in endosperms of the *sugary-7* mutants of maize. *Plant Physiol* 74: 324–328
- Scheidig A, Fröhlich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J (2002) Down-regulation of a chloroplast-targeted  $\beta$ -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* 30: 581–591
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC, Smith AM (2004) Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 136: 2687–2699
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J (1998) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* 10: 1699–1712

# **RESULTATS SUPPLEMENTAIRES**

## L'analyse des doubles mutants *isa1-isa3-* et *isa3-pul-*

### La construction des lignées doubles mutantes

Afin d'écarter ou de valider l'hypothèse d'un effet redondant entre les isoformes de DBE, les lignées doubles mutantes ont été construites chez *Arabidopsis*. L'objectif est ici de démontrer si il existe une relation fonctionnelle entre les activités des isoamylases et des pullulanases. Dinges et coll. (2003) ont observé que chez le maïs la mutation *zpul* (le gène de structure de la pullulanase) associée à un fond mutant pour l'isoamylase conduit à l'augmentation de la quantité de WSP et à la réduction de la quantité d'amidon. Un phénotype similaire a été observé dans le double mutant *isa2-pul-* d'*Arabidopsis thaliana* présenté dans la première partie de cette section des résultats. L'analyse menée sur ces deux lignées doubles mutantes (maïs et *Arabidopsis*) suggère que la pullulanase serait impliquée dans la synthèse de l'amidon et compenserait partiellement l'activité de Iso1. Dans la partie précédente des résultats, nous avons décrit que *Isa3* intervient plutôt dans la dégradation de l'amidon, car en son absence, la plante

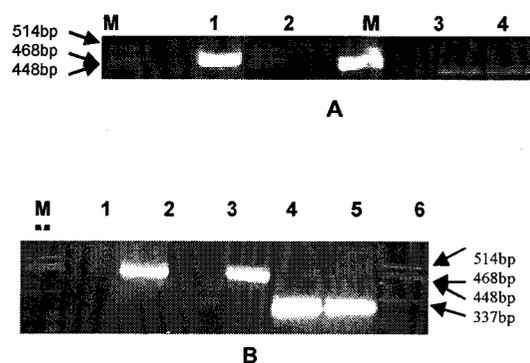
montre une perturbation de la dégradation de l'amidon pendant la nuit. Néanmoins, on ignore si l'activité de *Isa3* peut éventuellement intervenir dans le processus de synthèse de l'amidon. Donc, deux lignées doubles mutantes *isa1-isa3-* et *isa3-pul-* ont été produites par croisements entre les lignées simples mutantes aux loci correspondants.

Après le croisement initial des deux lignées simples mutantes, nous obtenons dans les siliques qui se développent des graines à l'état hétérozygote pour les deux mutations d'intérêt. Ces graines sont alors semées et les individus correspondants produisent par autopollinisation un pool de graines dans les siliques avec un mélange de génotypes parmi lesquels on trouvera théoriquement un seizième de génotypes doubles homozygotes mutants. Afin de faciliter la tâche de sélection des individus doubles mutants, une présélection est réalisée par une coloration à l'iode des feuilles de ces individus de 2<sup>ème</sup> génération (dont 1/16<sup>ème</sup> sont théoriquement doubles mutants). Les feuilles sont prélevées en milieu de photopériode. Dans ces conditions, les feuilles du sauvage se colorent en brun-gris. Par contre, on s'attend à ce que les feuilles des homozygotes mutants *isa1-isa3-* se colorent en jaune (typique d'une absence d'amidon ou d'une chute importante du contenu en amidon). Inversement, on

s'attend à ce que les feuilles du double mutant *isa3-/pul-* affichent une coloration brun-gris foncé avec l'iode. La configuration génotypique des lignées sélectionnées précédemment est ensuite confirmée par une analyse d'amplification des copies sauvages et mutantes des gènes concernés par PCR.

Des expériences de RT-PCR ont permis de vérifier si les ARN messagers des gènes mutés étaient encore exprimés dans les deux lignées doubles mutantes. Pour le double mutant *isa1-/isa3-*, comme chez les simples mutants *isa1-* et *isa3-*, les transcriptions des gènes correspondants semblent être modifiées aux sites d'insertions de l'ADN-T, comme l'indique l'absence d'amplification lorsque les couples d'oligonucléotides amorces utilisés chevauchent les sites d'insertion de l'ADN-T (Figure 1A). De même, chez le double mutant *isa3-/pul-*, la transcription d'*ISA3* est modifiée au site d'insertion de l'ADN-T comme chez le simple mutant *isa3-* et la transcription de *PUI* est abolie totalement comme chez le simple mutant *pul-* (Figure 1B).

Bien que les ARN messagers des gènes mutés soient encore présents chez les doubles mutants, il semble qu'avec leur structure altérée ils n'aboutissent pas à la production d'une protéine active. L'absence des activités enzymatiques concernées est confirmée par zymogramme.



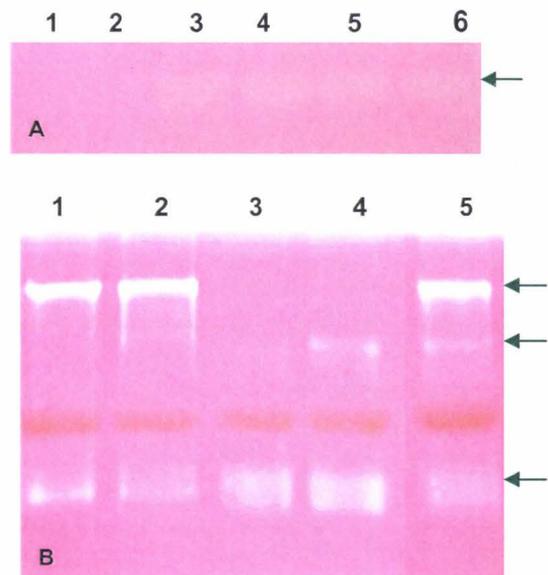
**Figure 1:** amplification par RT-PCR des transcrits chez les doubles mutants. Les chiffres impairs représentent les mutants et les chiffres pairs la lignée sauvage. La piste M indique le marqueur de taille. La figure A représente les résultats d'amplification RT-PCR réalisées avec les ARNm du mutant *isa1-/isa3-* en utilisant les couples d'amorce qui chevauchent le site d'insertion de l'ADN-T dans le gène *ISA1* (pistes 1 et 2) et *ISA3* (pistes 3 et 4) et le couple d'amorce universel pour l'ARNr 18S (pistes 5 et 6). La figure B représente les résultats d'amplification RT-PCR réalisées avec les ARNm du mutant *isa3-/pul-* en utilisant les couples d'amorce qui chevauchent le site d'insertion de l'ADN-T dans le gène *ISA3* (pistes 1 et 2) et *PUI* (pistes 3 et 4) et le couple d'amorce universel pour l'ARNr 18S (pistes 5 et 6).

## Caractérisation enzymatique

Les activités enzymatiques ont été observées par zymogramme. Cette méthode permet de discerner les modifications de certaines des activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon. Le défaut de l'activité de la pullulanase dans le mutant *isa3-/pul-* se traduit par la disparition d'une bande blanche unique sur le zymogramme contenant du rouge-pullulane (Figure 2A). L'activité

enzymatique de la protéine ISA3 n'est pas discernable sur le gel natif contenant de l'amidon soluble de pomme de terre comme substrat (contrairement à Iso1). Afin de nous assurer de l'absence de l'activité d'ISA3 dans les deux doubles mutants, nous avons utilisé un gel contenant des  $\beta$ -dextrines-limites comme substrat selon la méthode de Delatte et coll. (2006). La durée de l'incubation du gel dans le tampon après migration des protéines est limitée à 2 heures seulement afin de réduire l'impact des activités des amylases sur le substrat contenu dans le gel. Une légère bande blanche est spécifiquement absente chez les mutants *isa3-/pul-* et *isa1-/isa3-* alors qu'elle est bien présente dans les lignées sauvage et mutantes *pul-* et *isa1-* (Figure 2B). Ainsi, l'apparition de cette bande claire sur le gel d'activité est donc spécifiquement liée à l'activité d'ISA3. En haut du gel, une autre bande blanche disparaît chez le mutant *isa1-/isa3-* et le mutant *isa1*, alors qu'elle est présente chez la lignée sauvage, le mutant *isa3-/pul-* et le mutant *pul*. Cette bande représente l'activité de complexe Iso1 qui est formé par ISA1 et ISA2 (Figure 2B). L'activité de pullulanase est également observable en bas du gel contenant les  $\beta$ -dextrines-limites. Nous avons également réalisé une série de gels contenant différents substrats tels que le glycogène ou l'amylopectine, mais

l'activité de ISA3 est révélée uniquement sur le gel contenant les  $\beta$ -dextrines-limites (expériences non montrées). Cette observation confirme que ce type de substrat est préférentiellement utilisé par ISA3 *in vitro*. Ce phénomène avait déjà été rapporté par Hussain et coll. (2003) chez la pomme de terre.



**Figure 2 :** Zymogramme des activités hydrolytiques. Environ 100  $\mu$ g de protéines d'un extrait brut de feuilles sont déposés dans les puits du gel. Le gel A contient 0,3% de rouge-pullulane comme substrat ; la flèche indique l'activité de la pullulanase. Les pistes de 1 à 6 représentent respectivement les mutants *isa3-/pul-*, *pul-*, *isa1-*, *isa2-*, *isa3-* et la lignée sauvage. Le gel B contient 0,2% de  $\beta$ -dextrines-limites ; la flèche d'en haut indique l'activité du complexe Iso1, la flèche au milieu montre l'activité d'ISA3 et la flèche du bas correspond à l'activité de la pullulanase. Les lignes chiffrées de 1 à 5 représentent respectivement les mutants *isa3-/pul-*, *pul-*, *isa1-/isa3-*, *isa1-* et la lignée sauvage.

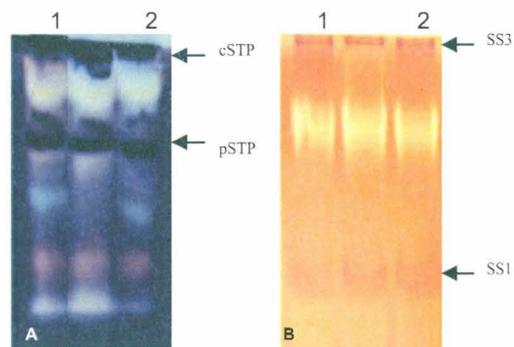
Les effets pléiotropes des mutations sont souvent observés dans les mutants

concernant le métabolisme de l'amidon. Par exemple, la mutation *sugary-1* du maïs et du riz conduit aussi à une diminution de l'activité de pullulanase (Pan et coll., 1984 ; Nakamura et coll., 1997). La mutation *zpul* du maïs abolit en même temps l'accumulation de *SBEIIa* dans les feuilles et entraîne l'apparition d'une nouvelle amylase dans l'endosperme (Dinges et coll., 2003). En 2006, Delatte et coll. ont rapporté que l'activité d'AMY3, une  $\alpha$ -amylase chloroplastique, est augmentée dans les mutants *isa3-* et *isa3-/pul-*. Ils trouvent que cette augmentation est plus flagrante chez le double mutant que le simple mutant. Afin de vérifier les effets des mutations sur les autres enzymes du métabolisme de l'amidon, les activités enzymatiques chez *Arabidopsis* ont été examinées par zymogramme et/ou dosage *in vitro*.

Nous avons mesuré l'activité d' $\alpha$ -amylases par l'intermédiaire d'un kit de dosage spécifique des  $\alpha$ -amylases (Megazyme). Cependant, aucune augmentation significative de l'activité  $\alpha$ -amylase totale n'est observée dans les mutants *isa3-* et *isa3-/pul-* (Tableau 1). Aucune autre activité enzymatique dosée n'est modifiée chez le double mutant *isa3-/pul-*.

Par contre, dans les mutants *isa1-/isa3-* et *isa1-* nous avons observé une légère augmentation de l'activité de

pullulanase. L'augmentation de cette activité est plus flagrante chez le double mutant que le simple mutant. Ce résultat suggère que l'activité de la pullulanase est partiellement redondante avec celles des isoamylases et que cet effet de redondance n'est particulièrement visible que lorsqu'une ou les deux isoamylases sont absentes. Les autres activités enzymatiques chez le double mutant *isa1-/isa3-* ne présentent pas d'altération significative (Figure 3 et Tableau 1).



**Figure 3 :** Partie A: zymogramme des activités amidon-phosphorylases. Le gel de polyacrylamide contient 0,3% d'amidon soluble de pomme de terre. Après la migration, le gel est incubé pendant une nuit à température ambiante dans un tampon en présence de Glc-1-P à 20 mM. Les activités des amidon-phosphorylases sont révélées par coloration à l'iode. Les pistes numérotées représentent respectivement les mutants *isa1-/isa3-* (1), *isa3-/pul-* (2) et le sauvage (3). cSTP : phosphorylase cytosolique, pSTP : phosphorylase plastidiale.

Partie B: zymogramme des activités amidon-synthétases. Le gel de polyacrylamide contient 0,3% de glycogène de foie de lapin. Après la migration, le gel est incubé pendant une nuit à température ambiante dans un tampon en présence d'ADP-Glc à 1 mM. Les activités d'amidon-synthétases sont révélées par coloration à l'iode. Les pistes numérotées représentent respectivement le sauvage (1), les mutants *isa1-/isa3-* (2) et *isa3-/pul-* (3).

	WT	<i>isa1-</i>	<i>isa1-/isa3-</i>	<i>isa3-</i>	<i>pu1-</i>	<i>pu1-/isa3-</i>
AGPase (+3PGA) (1)	46,7±0,7	45,4±0,3	47,2±0,3	ND	ND	ND
AGPase (+3PGA) (2)	19,3±3,2	ND	ND	16,7±1,0	22,9±6,3	29,1±5,9
Phosphorylase	6,4±0,5	7±0,6	11,1±2,5	6,2±1,6	6,1±1,2	7,3±1,4
D-enzymes	86±9	114±26	107±10	105±1	113±5	114±7
Pullulanase	21,1±3,4	34±4,4	56,4±17,0	23,5±3,6	ND	ND
α-amylase	9,1±2	8,6±0,9	7,8±0,5	8,8±2,6	4,6±0,7	8±3
β-amylase	148±19	119±3	128±3	110±24	99±7	99±19

**Tableau 1:** Dosages in vitro de certaines activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon effectués sur des extraits bruts de feuilles de différents mutants et du sauvage. Les activités ont été exprimées en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  de protéines (moyenne±écart type,  $n=3$ , expériences indépendantes). ND, non déterminé. Les chiffres (1) et (2) pour les dosages AGPase représentent deux séries de dosages sur deux cultures différentes.

### Caractérisation de l'accumulation des polysaccharides dans les doubles mutants

Pour les deux doubles mutants, *isa3-/pu1-* et *isa1-/isa3-*, aucune modification n'est observée au niveau de la germination des graines, de la croissance des plantes, du fleurissement et de la formation des siliques avec les conditions de culture décrites dans la partie « matériels et méthodes » (16h lumière/8h nuit ou 12h lumière/12h nuit). Cependant, Delatte et coll. (2006) ont rapporté que les individus doubles mutants *isa3-/pu1-* cultivés en condition 12h lumière/12h nuit présentaient un retard de croissance. Nous n'avons observé une telle différence.

Nous avons quantifié l'accumulation d'amidon (Figure 4A) et de polysaccharides solubles (Figure 4B) chez

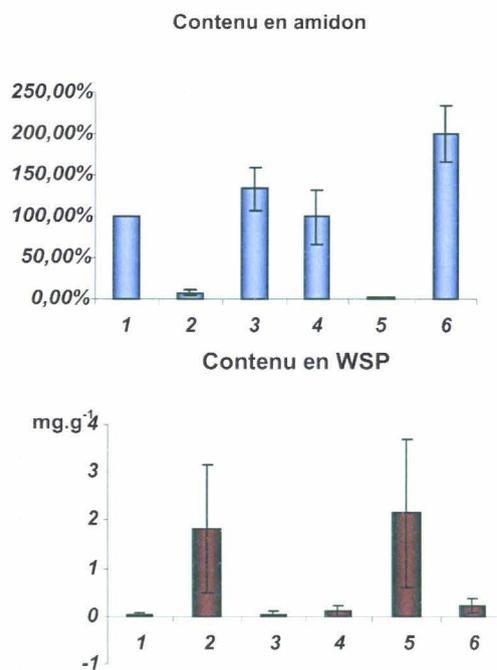
les doubles mutants. L'amidon et les polysaccharides solubles sont extraits et mesurés en fin de photopériode. Pour rappel, la mutation au locus *ISA3* entraîne une suraccumulation d'amidon alors que la mutation au locus *ISA1* produit une forte réduction de 90% de la quantité d'amidon par rapport au sauvage qui s'accompagne d'une accumulation de polysaccharide soluble en fin de photopériode. Comme le simple mutant *isa-1*, le double mutant *isa1-/isa3-* n'accumule que très peu d'amidon en fin de photopériode. Toutefois, cette réduction de la quantité d'amidon est encore plus sévère chez le double mutant. En effet, il n'accumule qu'environ 1,5% d'amidon par rapport au sauvage et 10% par rapport au mutant *isa1-*. De même, le mutant *isa1-/isa3-* accumule une quantité importante de polysaccharides solubles (WSP pour Water Soluble Polysaccharide),

dont la quantité est similaire à celle du simple mutant *isa1-*.

Inversement, le double mutant *isa3-/pul-* présente un phénotype de suraccumulation de l'amidon comme le mutant *isa3-* décrit précédemment. Les études précédentes indiquent qu'Isa3 est impliquée dans la dégradation d'amidon et que Pul contribue, elle aussi, pour une faible part à l'activité de synthèse de l'amidon. Le mutant *pul-* présente un très léger décroissement de la teneur en amidon en fin de journée et le mutant *isa3-* accumule environ 130% d'amidon par rapport au sauvage. De son côté, le double mutant *isa3-/pul-* produit jusqu'à 180% d'amidon à la fin de photopériode par rapport au sauvage (Figure 4A). Ce phénotype suggère fortement que l'activité de Pul pourrait également participer à la dégradation de l'amidon avec une activité partiellement redondante de celle d'ISA3. En outre, la teneur en WSP est légèrement mais significativement élevée chez le double mutant *isa3-/pul-* en regard du sauvage ( $P=0,02$ , T test) alors que ce phénotype n'avait jamais été observé ni chez le mutant *isa3-* ni chez le mutant *pul-*.

Nous avons dosé la quantité d'amidon (Figure 5A) et de WSP (Figure 5B) accumulée à différents temps pendant un cycle jour/nuit (12h lumière/12h nuit) chez les différentes lignées. Le mutant *isa3-/pul-* montre une vitesse de synthèse

de l'amidon similaire à celle du sauvage, mais sa vitesse de dégradation est réduite.

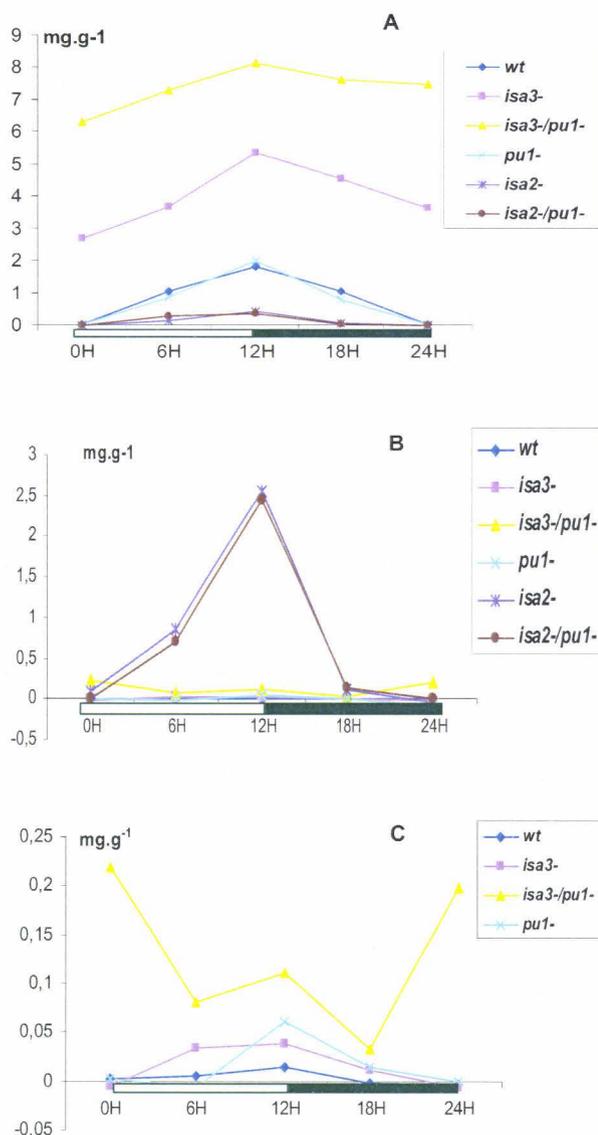


**Figure 4:** La teneur en amidon et en polysaccharide soluble (WSP) chez les mutants et le sauvage à la fin de la photopériode (16h lumière/8h nuit). Les quantités d'amidon et de WSP ont été mesurées par la méthode à l'amyloglucosidase. Les chiffres 1 à 6 représentent dans l'ordre la lignée sauvage, les mutants *isa1-*, *isa3-*, *pul-*, *isa1-/isa3-* et *isa3-/pul-*. Les résultats présentés ici sont les moyennes de trois expériences indépendantes. A: La teneur en amidon est représentée par le pourcentage. La teneur en amidon chez le sauvage est assignée de la valeur 100%. B: La teneur en WSP est représentée en  $\text{mg.g}^{-1}$  de feuilles fraîches.

Par contre, dans les mutants *isa2-* et *isa2-/pul-*, la vitesse de synthèse d'amidon est fortement ralentie par rapport au sauvage. Les amidons de ces deux mutants sont presque totalement dégradés dans les 6 premières heures de la nuit.

Le métabolisme des WSP chez les différents mutants étudiés ici, sauf pour le

mutant *isa3/pu1* est similaire au métabolisme de l'amidon : les WSP



**Figure 5:** cycle de synthèse et de dégradation de l'amidon (A) et des WSP (B) pendant un cycle jour/nuit. La figure B est agrandie dans la figure C en enlevant les données pour les lignes *isa2-* et *isa2-/pu1-*. La quantité d'amidon et de WSP est dosée par la méthode à l'amyloglucosidase. Les plantes sont cultivées en conditions de 12h lumière/ 12h nuit. Les valeurs sont des moyennes de trois expériences indépendantes. L'axe d'abscisse représente le temps en heures et l'axe des ordonnées est la quantité de polysaccharides en mg.g<sup>-1</sup> de feuilles fraîches.

s'accumulent au cours de la journée pour être dégradés la nuit. De plus, les WSP

dans les mutants *isa2-* et *isa2-/pu1-* sont dégradés presque totalement dans les 6 premières heures de la nuit comme pour la dégradation de l'amidon dans ces lignées. Un rythme particulier de la dégradation de WSP est observé dans le mutant *isa3-/pu1-* : les WSP s'accumulent pendant la nuit pour être dégradés la journée. Ce phénotype signifie que le WSP accumulé dans *isa3-/pu1-* est produit par un processus totalement différent de celui de la synthèse de l'amidon. Sa production est très probablement liée à la forte perturbation de la dégradation d'amidon.

Une augmentation de la teneur en saccharose a été reportée à la fin de photopériode dans les feuilles du mutant *zpu1* du maïs (Dinges et coll., 2003). Nous avons déterminé les quantités de saccharose, de fructose et de glucose à la fin de photopériode chez le double mutant *isa3-/pu1-*, les simples mutants *isa1-*, *pu1-* et la lignée sauvage (Tableau 2). Cependant, aucune variation significative n'a été observée dans ces lignées.

	Glucose	Fructose	Saccharose
WT	0,41±0,036	0,21±0,012	0,14±0,026
<i>Atisa3</i>	0,60±0,037	0,35±0,018	0,15±0,014
<i>Atpu1</i>	0,68±0,032	0,41±0,011	0,10±0,011
<i>Atisa3/Atpu1</i>	0,45±0,014	0,29±0,029	0,13±0,036

**Tableau 2 :** Les teneurs en sucres sont exprimées en mg.g<sup>-1</sup> de feuilles fraîches (moyenne ± écart type, n=2, expériences indépendantes). Les feuilles sont récoltées à la fin de photopériode à partir de plantes cultivées en condition de 16h lumière/8h nuit.

## Des polysaccharides structurellement modifiés s'accumulent dans les deux doubles mutants

Les amidons de différentes lignées ont été fractionnés par chromatographie d'exclusion stérique sur une résine de Sepharose CL-2B. La mesure de la longueur d'onde du maximum d'absorbance du complexe de l'amylopectine avec l'iode ( $\lambda_{\max}$ ) révèle une différence structurale de cette molécule entre ces mutants et le sauvage. L'amylopectine de la lignée sauvage présente une  $\lambda_{\max}$  à environ 552 nm. Ce chiffre augmente à 576 nm chez le mutant *isa1-isa3-* (Tableau 3). Ce phénotype d'augmentation de la  $\lambda_{\max}$  de l'amylopectine était observé auparavant chez les mutants *isa1-* et *isa2-*. Au contraire, la  $\lambda_{\max}$  de l'amylopectine est diminué à 537 nm chez le mutant *isa3-pul-* bien que les mutants *isa3-* et *pul-* ne présentaient aucune différence de  $\lambda_{\max}$  de l'amylopectine par rapport au sauvage. Les fractions d'amylopectine et d'amylose ont été assemblées séparément et dosées par la méthode à l'amyloglucosidase. La proportion d'amylopectine et d'amylose ne montre aucune variation statistiquement significative entre le sauvage et les lignées mutantes analysées dont *isa1-*, *isa3-*, *pul-*, *isa1-isa3-* et *isa3-pul-* (Tableau 3).

Le taux de branchement de

l'amylopectine mesuré par RMN du proton ne semble pas varier entre les mutants et le sauvage. Néanmoins, il est intéressant de noter que les mutants *isa1-isa3-*, *isa3-* et surtout *isa1-* présentent tous une tendance à la diminution du taux de branchement de l'amylopectine en comparaison du sauvage, alors que l'amylopectine des mutants *isa3-pul-* et *pul-* présente un taux de branchement presque identique à celui du sauvage (il ne s'agit ici que d'une tendance puisque les mesures n'ont été effectuées qu'une seule fois). Les taux de branchement présentés ici sont inférieurs à la valeur moyenne de l'amylopectine déjà rapportée par ailleurs (environ 5%). Mais nous avons analysé plusieurs échantillons standards différents, y compris le glycogène du foie de lapin commercial et l'amylopectine de pomme de terre commerciale, qui indique que la technique de RMN du proton donne systématiquement les valeurs inférieures aux valeurs standards.

## L'analyse structurale de l'amylopectine et des WSP

Afin de déterminer la nature des modifications structurales soupçonnées par les analyses précédentes, les amylopectines des mutants et du sauvage ont été

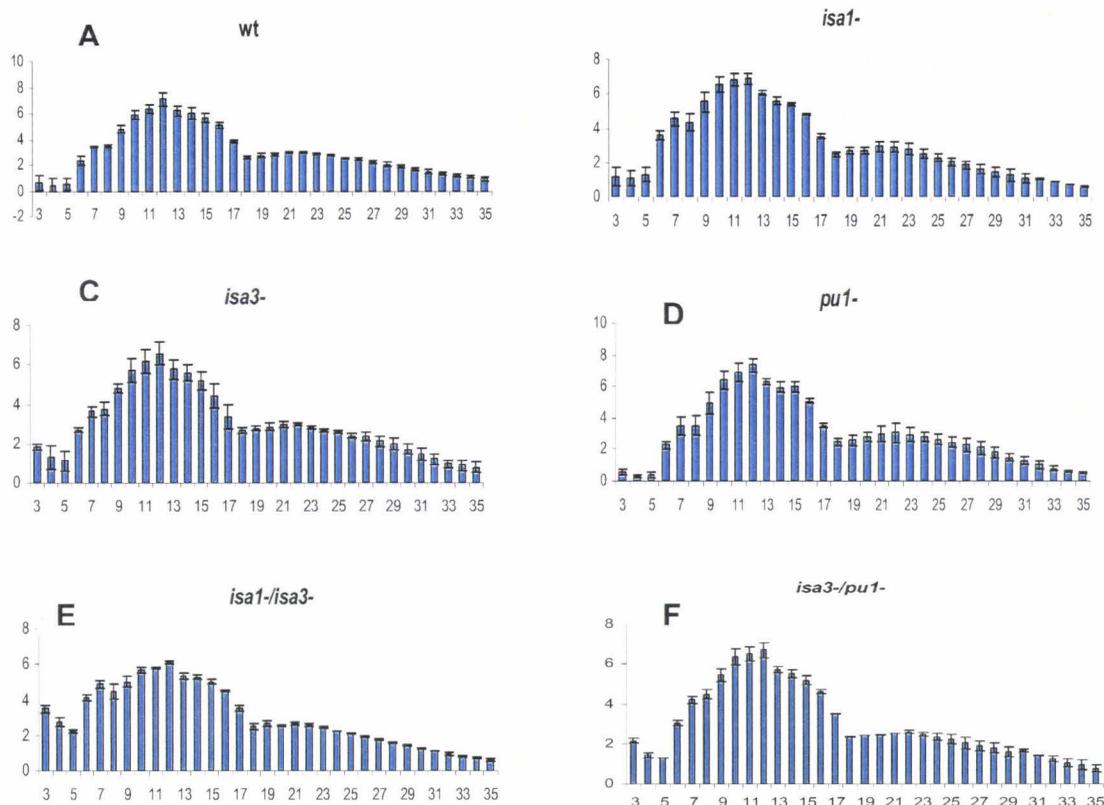
Arabidopsis lignée	WT	<i>isa1</i> -	<i>isa3</i> -	<i>isa1</i> -/ <i>isa3</i> -	<i>pul</i> -	<i>isa3</i> -/ <i>pul</i> -
$\lambda$ max d'amylopectine (n=3)	552 ± 3,5	573 ± 3 (P=0,001)	552 ± 0,5 (P=0,44)	576 ± 8,5 (P=0,012)	ND	537 ± 4,5 (P=0,007)
Ratio d'amylose (n=4)	22% ± 9,6%	27% ± 9,3% (P=0,24)	29% ± 8,4% (P=0,15)	30% ± 9,5% (P=0,13)	21% ± 7,5% (0,43)	20% ± 7% (P=0,41)
Taux de branchement d'amylopectine (n=1)	3,2%	2,2%	2,8%	2,8%	3,4%	3,4%

**Tableau 3:** les résultats représentés ici sauf le taux de branchement sont des moyennes de plusieurs expériences indépendantes (moyenne ± écart type). L'amidon est extrait à la fin de photopériode.  $\lambda$ max d'amylopectine et le ratio d'amylose sont mesurés après la purification par chromatographie d'exclusion stérique sur la colonne CL-2B. La valeur P est calculée d'après le test de Student sur deux échantillons. Le taux de branchement est analysé par RMN.

débranchées par un mélange d'isoamylase et de pullulanase commerciales. Les malto-oligosaccharides libérés après cette réaction ont été dérivés par l'APTS, une substance fluorescente. Le chromophore de l'APTS est complexé sur l'extrémité réductrice des  $\alpha$ -1,4-glucanes. Ensuite, les glucanes dérivées sont séparés par électrophorèse capillaire. Après l'électrophorèse, les surfaces de pics qui représentent l'abondance d'une population de glucanes avec un certain degré de polymérisation (DP) peuvent être directement comparés entre les échantillons (Figure 6).

Dans la première partie de cette section consacrée aux résultats, nous avons montré que les mutations aux loci *ISA1*, *ISA2* entraînaient une modification de la structure de l'amylopectine. Cependant l'altération est très faible voire inexistante

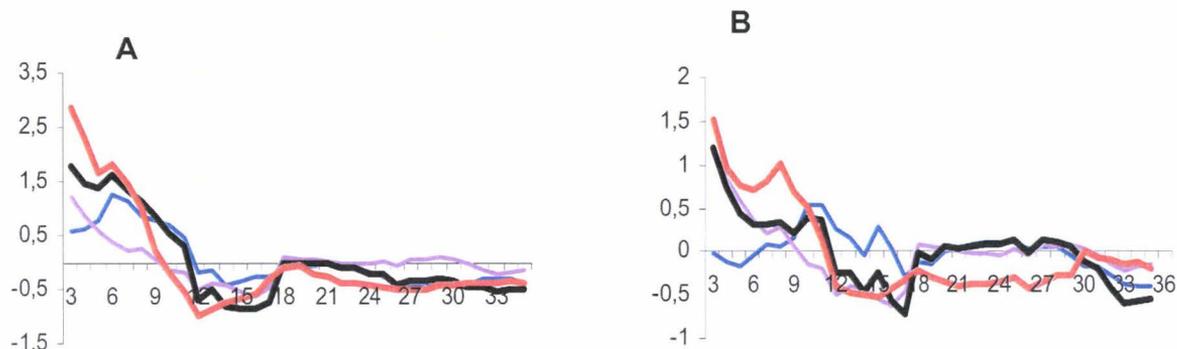
chez les mutants *isa3*- et *pul*-. Cette modification s'exprime par une augmentation de la proportion des chaînes courtes (degré de polymérisation [DP] < 9) et une légère baisse de la quantité relative des chaînes plus longues (DP9-DP18) (Wattebled et coll., 2005 ; Delatte et coll., 2005). De même, des phénotype similaires sont observés dans les mutants pour les isoamylases des autres plante (Dinges et coll., 2001 ; Fujita et coll., 2003). Chez le double mutant *isa1*-/*isa3*-, on observe aussi la forte augmentation de la proportion des chaînes courtes (DP < 9) et la diminution de celle des chaînes un peu plus longues (DP9-DP18) (Figure 6E, 7A). Toutefois, d'après la comparaison des différences des distributions de longueur des chaînes existantes entre les mutants et la lignée sauvage, nous avons observé que l'amylopectine du double mutant possède



**Figure 6 :** Profils de distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine des différentes lignées faisant l'objet de ce travail. Après la purification par chromatographie d'exclusion stérique sur une résine de Sepharose CL-2B, l'amylopectine est débranchée par un mélange d'isoamylase et de pullulanase (d'origine bactérienne). Les glucanes débranchés sont marqués par l'APTS et soumis à une séparation par électrophorèse capillaire (FACE). L'axe des abscisses représente le degré de polymérisation (DP) des glucanes, l'axe des ordonnées représente le pourcentage des glucanes d'un DP donné dans la population totale de glucanes détectés. Les résultats présentés ici pour chaque lignée sont des moyennes obtenus de 3 expériences indépendantes, sauf le sauvage ( $n=4$ ) et les doubles mutants *isa1-/isa3-* et *isa3-/pu1-* ( $n=2$ ).

encore plus de courtes chaînes que l'amylopectine du simple mutant *isa1-*. La structure de l'amylopectine du mutant *isa1-/isa3-* ressemble plutôt à celle du mutant *isa1-* qu'à celle du mutant *isa3-*. Ceci suggère que l'activité d'Isa1 serait prédominante sur l'activité d'Isa3 pour la formation de la structure de l'amylopectine. Cette suggestion serait raisonnable puisque nous avons montré qu'Isa3 est plutôt impliquée dans le catabolisme de l'amidon.

Afin d'analyser le rapport existant éventuellement entre la modification structurale de l'amylopectine du double mutant et celles des simples mutants correspondants, nous avons additionné la différence de la distribution de la longueur des chaînes entre le mutant *isa1-* et le sauvage et celle entre le mutant *isa3-* et le sauvage (Figure 7A). Il s'avère que le profil calculé présente une similitude évidente avec la différence structurale existant réellement entre le double mutant



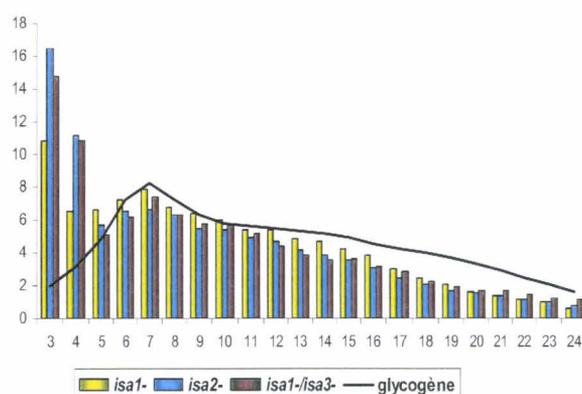
**Figure 7 :** comparaison des distributions de la longueur des chaînes de l'amylopectine. L'axe des abscisses représente le degré de polymérisation (DP) et l'axe des ordonnées représente la variation du pourcentage de chaque DP entre mutant et sauvage.

En **A** : la ligne rouge représente le double mutant *isa1-/isa3-*, la ligne bleue le mutant *isa1-*, la ligne rose le mutant *isa3-*. La ligne noire représente la combinaison calculée des variations des simples mutants *isa1-* et *isa3-*.

En **B** : la courbe rouge représente le profil du double mutant *isa3-/pul-*, la bleue celui du mutant *pul-*, la rose celui du mutant *isa3-*. La courbe noire représente la combinaison des variations des simples mutants *pul-* et *isa3-*.

*isa1-/isa3-* et le sauvage. Cette comparaison suggère que les effets des mutations aux loci *ISA1* et *ISA3* sont additifs sur la structure de l'amylopectine. Ce phénotype suggère que l'enzyme *Isa3* contribue, pour une part mineure mais significative, à la synthèse de l'amylopectine distincte de celle d'*Isa1*.

La structure de l'amylopectine du double mutant *isa3-/pul-* présente quant à elle une légère altération. La comparaison de la différence de la distribution de la longueur de chaînes entre ce mutant et le sauvage montre que l'amylopectine du mutant présente un enrichissement en chaînes courtes (DP < 11). En conséquence, l'abondance des chaînes plus longues est diminuée. Les études précédentes montrent que chez les simples mutants *isa3-* et *pul-* l'amylopectine est faiblement enrichie en chaînes courtes. Toutefois, la proportion



**Figure 8 :** Profils de la longueur des chaînes des polysaccharides solubles des mutants *isa1-*, *isa2-* et *isa1-/isa3-* après débranchement enzymatique. Les WSP ont été fractionnés par chromatographie d'exclusion stérique (TSK HW50). Les fractions de phytoglycogène ont été collectées puis débranchées comme pour l'amylopectine. L'axe des abscisses représente le degré de polymérisation (DP) et l'axe des ordonnées représente la quantité relative (pourcentage) des glucanes d'un DP donné dans la population totale de glucanes détectés.

des chaînes courtes (DP < 11) dans le mutant *isa3-/pul-* reste très faible par rapport à celle du mutant *isa1-/isa3-*.

La différence des profils de distribution de la longueur des chaînes entre le simple mutant *isa3*- et le sauvage et celle entre le mutant *pul* et le sauvage ont été combinées. Ce résultat calculé a ensuite été comparé avec la différence expérimentale observée entre le double mutant *isa3/pul* et le sauvage (Fig. 7B). Les profils calculés et observés vont dans le même sens (les différences sont ici plus faibles que celles observées dans les mutants précédents et sont donc plus facilement sujettes à des variations) ce qui suggère que les simples mutations *isa3* et *pul* ont un simple effet additif sur la structure de l'amylopectine et non pas un effet synergétique (on pourrait s'attendre dans ce dernier cas à une modification de la distribution de la longueur des chaînes dans le double mutant très différente de la distribution théorique calculée). Cette analyse structurale suggère que, même si PUI pourrait compenser une partie de la déficience de l'activité d'ISA3 dans le mutant *isa3*-, PUI pourrait également porter sa propre fonction dans le catabolisme de l'amidon différente de celle d'ISA3.

Nous avons analysé la structure des WSP qui s'accumulent dans le double mutant *isa1-isa3*-. Après la purification, le WSP est fractionné par chromatographie d'exclusion stérique sur matrice de sephadex TSK HW50. Deux pics de

glucanes sont observés après l'élution, comme cela avait été le cas avec les mutants *isa1*-, *isa2*- et *isa2-pul*-. La taille moléculaire des glucanes dans le premier pic correspond à celle du glycogène de foie de lapin. La taille moléculaire du deuxième pic correspond à celles de courts malto-oligosaccharides. Ces deux populations de glucanes ont été regroupées séparément puis débranchées par un mélange d'isoamylase et de pullulanase. Les distributions de la longueur des chaînes ont ensuite été établies comme pour l'amylopectine. La substance dans le premier pic est du phytoglycogène dont la structure ressemble à celle du glycogène. La structure du phytoglycogène chez ce double mutant est similaire à celle des WSP qui s'accumulent dans les mutants *isa1*-, *isa2*- et *isa2-pul*-. Le deuxième pic est constitué principalement de glucose (environ deux tiers) et de maltose (environ un tiers) d'après l'analyse du matériel de ce pic sans débranchement par HPAEC-PAD.

Enfin, la structure de l'amylopectine des deux doubles mutants *isa1-isa3*- et *isa3-pul*- et du sauvage a été analysée après digestion par  $\beta$ -amylase. Cette exoamylase libère du maltose depuis l'extrémité non réductrice d'un glucane jusqu'à deux ou trois résidus de glucose

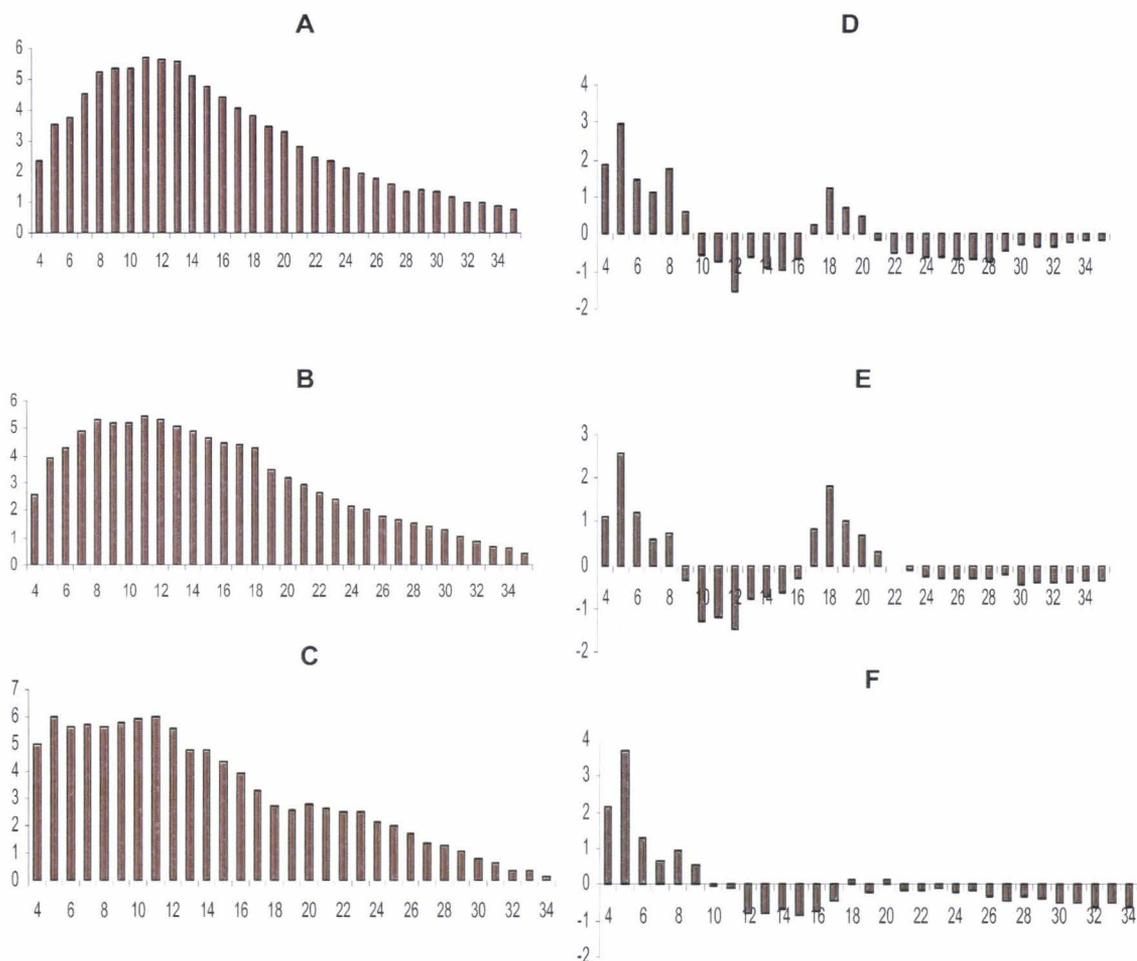


Figure 9 : diagrammes A, B, C, profils de distribution de la longueur des chaînes des BLD de différentes lignées. L'amylopectine est d'abord digérée par une  $\beta$ -amylase commerciale. La digestion complète est confirmée par dosage des extrémités réductrices formées par l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS). La BLD ainsi obtenue est débranchée par un mélange d'isoamylase et de pullulanase commerciales. Les glucanes débranchés sont marqués par l'APTS et soumis à une séparation par électrophorèse capillaire (FACE). L'axe des abscisses représente le degré de polymérisation (DP) des glucanes, l'axe des ordonnées représente le pourcentage des glucanes d'un DP donné dans la population totale des glucanes détectés. Diagrammes D, E, F : profils différentiels entre la BLD et l'amylopectine correspondant (profil de la BLD moins le profil de l'amylopectine). A, D : sauvage. B, E : mutant *isa3-/pu1-*. C, F : mutant *isa1-/isa3-*.

avant un point de branchement. Les chaînes externes de l'amylopectine sont de fait presque totalement dégradées, alors que les chaînes internes sont peu affectées puisque la  $\beta$ -amylase s'arrête au premier point de branchement qu'elle rencontre. Ainsi, le produit résiduel après digestion par la  $\beta$ -amylase est appelé la  $\beta$ -dextrine limite (ou BLD pour  $\beta$ -limit-dextrin en

anglais). La distribution de la longueur des chaînes (Figure 9, A-C) de ces BLDs correspondants aux deux mutants et au sauvage a été analysée par électrophorèse capillaire après débranchement par l'isoamylase et la pullulanase. Contrairement aux profils des BLD du sauvage et du mutant *isa3-/pu1-*, la BLD du mutant *isa1-/isa3-* montre encore une

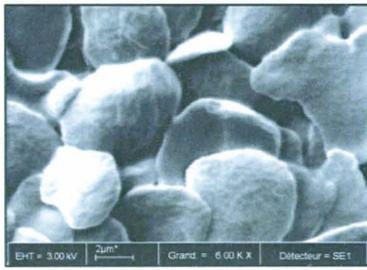
distribution bimodale. Les profils différentiels entre la BLD et l'amylopectine sont montrés dans les figures 9 D à F. On observe que les BLDs provenant de toutes les lignées possèdent plus de chaînes très courtes ( $DP < 10$ ). Ce résultat est logique vu l'activité de dégradation de la  $\beta$ -amylase. Chez la lignée sauvage, les quantités relatives des chaînes plus longues ( $10 \leq DP < 35$ ) sont réduits sauf les chaînes d'une longueur comprise entre 17 et 20 résidus de glucose (déjà rapporté par Delvallé et al 2005). Ce profil a été conservé chez le mutant *isa3-/pul-*. Cependant, chez le mutant *isa1-/isa3-* le pic des chaînes de DP17 à 20 disparaît du profil différentiel. Ce changement de profil indique l'existence d'une modification de l'arrangement des glucanes internes de l'amylopectine de ce double mutant. De fait cette analyse confirme qu'Isa1 est une enzyme absolument requise pour l'édification de la structure normale de l'amylopectine chez *A. thaliana*.

### **L'impact des mutations sur la morphologie des grains d'amidon**

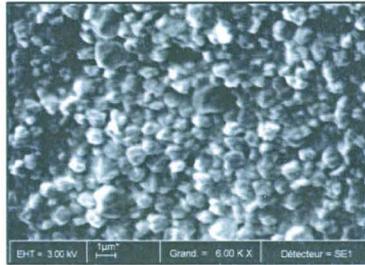
Les études sur les mutants d'isoamylase des autres plantes, tels que le maïs, le riz, l'orge ou la pomme de terre, ont révélé qu'une mutation du gène ISA1,

s'accompagne d'une réduction de la taille des grains d'amidon et d'une augmentation de leur nombre (Creech et coll., 1968 ; Fujita et coll., 2003 ; Burton et coll., 2002 ; Bustos et coll., 2004). S'appuyant sur ces phénotypes, Burton et coll. (2002) ont même attribué à ISA1 (ou au complexe Iso1, selon les origines botaniques) un rôle de contrôle négatif de l'initiation de la synthèse du grain d'amidon. L'impact des mutations sur la morphologie du grain d'amidon chez *Arabidopsis* a été analysé par microscopie électronique à balayage (SEM) et par microscopie électronique à transmission (TEM) (Figure 10). La taille du grain d'amidon est fortement réduite chez les mutants *isa1-* et *isa1-/isa3-* (comme cela a pu être observé dans le cas de l'orge). Selon les photos de SEM, le double mutant *isa1-/isa3-* produit des grains d'amidon encore plus petits que ceux du mutant *isa1-*. En plus, la surface des grains dans ces deux mutants apparaît irrégulière, différente de la surface lisse du grain d'amidon du sauvage. En revanche, les grains d'amidon chez le mutant *isa3-* sont en moyenne plus grands que ceux du sauvage. Ce phénotype est encore plus remarquable chez le double mutant *isa3-/pul-*. En plus, les grains d'amidon sont déformés significativement chez le mutant *isa3-/pul-* : les grains deviennent plus épais et la surface du grain est plus rugueuse que celle du sauvage. En

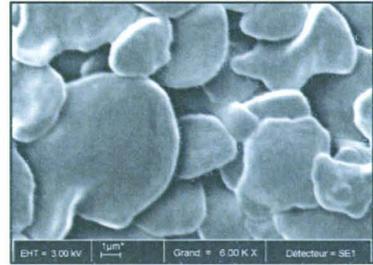
**A**



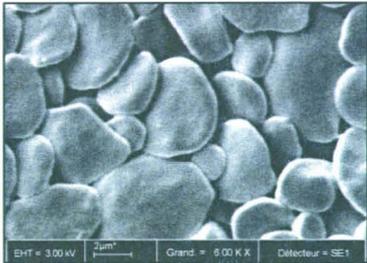
**WT-Col**



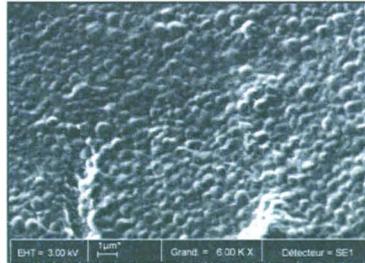
**isa1-**



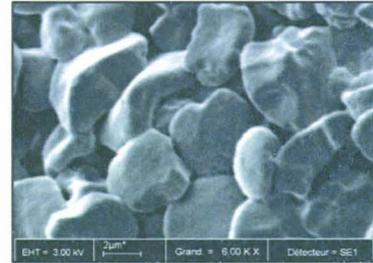
**isa3-**



**pu1-**



**isa1/isa3-**

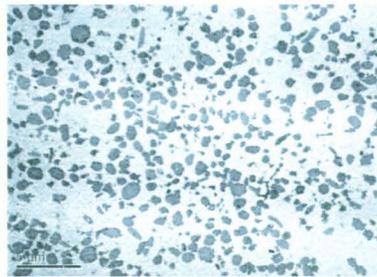


**isa3/pu1-**

**B**



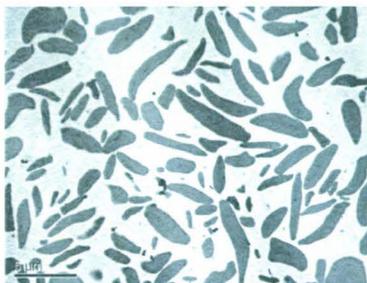
**WT-Col**



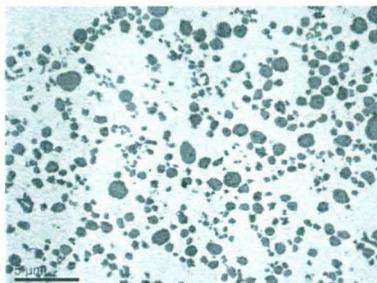
**isa1-**



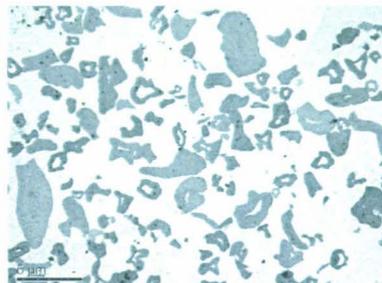
**isa3-**



**pu1-**



**isa1/isa3-**



**isa3/pu1-**

Figure 10 : images des grains d'amidon de différentes lignées par microscopie électronique à balayage (A) et microscopie électronique à transmission sur des coupes ultrafines d'amidon (B). Les échelles sont indiquées sur chaque photo.

examinant les grains d'amidon de ce mutant par TEM, on observe généralement la présence d'une zone peu dense aux électrons laissant supposer que les grains d'amidon sont creux. Ce phénotype n'est observé ni chez *isa3-* ni chez *pul-*. Par contre, on n'observe pas de modification significative de la morphologie des grains chez le mutant *pul-*. La variation des morphologies des grains observée entre les simples mutants *isa3-*, *pul-* et double mutant *isa3-/pul-* suggère bien que l'activité d'ISA3 est prédominante dans la dégradation de l'amidon (les grains deviennent plus volumineux car ils sont moins bien dégradés la nuit), et que la pullulanase PU1 pourrait bien avoir une activité partiellement redondante de celle d'Isa3.

### **L'Analyse préliminaire du triple mutant *isa1-/isa3-/pul-***

#### **La construction du triple mutant**

Nous avons indiqué dans la partie précédente, que la lignée *isa1-/isa3-* accumule encore 1% d'amidon par rapport au sauvage. Comme les protéines ISA1 et ISA2 forment probablement un complexe enzymatique et sont indispensables l'une pour l'autre, cette lignée *isa1-/isa3-* peut être considérée comme un mutant

dépourvu des activités de ISA1, ISA2 (par conséquence) et ISA3. Une seule enzyme de débranchement est encore présente : la pullulanase. Afin de comprendre si la pullulanase contribue effectivement à la synthèse de ce 1% d'amidon encore présent dans la lignée *isa1-/isa3-* et si l'accumulation de l'amidon nécessite la présence d'au moins une forme de DBE, nous avons construit un triple mutant *isa1-/isa3-/pul-*. Ce mutant a été sélectionné à partir de la descendance d'un individu triple hétérozygote obtenu par le croisement effectué entre les doubles mutants *isa1-/isa3-* et *isa3-/pul-*.

#### **L'analyse des activités enzymatiques**

Ce triple mutant ne présente aucune altération de sa croissance en condition de culture de 16h lumière/8h nuit. La caractérisation enzymatique a été réalisée par zymogramme contenant 0,2% de  $\beta$ -dextrine-limite comme substrat. Les deux activités isoamylasiques (le complexe Iso1 et ISA3), et l'activité pullulanase sont absentes sur le gel. Une activité hydrolytique inconnue (située juste au dessus de l'activité de la pullulanase) semble un peu plus élevée chez le triple mutant. Il pourrait s'agir d'une activité de type amylase (Figure 1).

## L'accumulation des polysaccharides

L'amidon a été dosé dans les feuilles du triple mutant en fin de photopériode. Une trace d'amidon a été encore observée après l'extraction. D'après le dosage à l'amyloglucosidase, ce triple mutant n'accumule plus que 0,15% d'amidon par rapport au sauvage, donc dix fois moins d'amidon que le double mutant *isa1/isa3*. Par contre, le triple mutant accumule du phytoglycogène en quantité (3,53 mg/g) relativement équivalente à celle mesurée chez le mutant *isa1-* ou le double mutant *isa1-/isa3-* (Tableau 1).

Le complexe formé par l'amidon résiduel avec l'iode donne une  $\lambda_{\max}$  à 556 nm. Ce chiffre est significativement plus bas que celui des amidons des autres lignées mutantes et est plus proche de la  $\lambda_{\max}$  de l'amylopectine. Cette diminution de la  $\lambda_{\max}$  dans le triple mutant peut être liée à une réduction du contenu en amylose, ou à une forte modification de la structure de l'amylopectine, par exemple une

réduction de la taille moyenne des chaînes.

Les WSP du triple mutant ont été purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur TSK HW50. Il présente deux pics après élution de la colonne : un pic à la position du phytoglycogène et un pic à la position des courts malto-oligosaccharides, comme c'est le cas pour les WSP des mutants *isa1-*, *isa2-*, *isa2-/pu1-* et *isa1-/isa3-*. Le deuxième pic représente environ un tiers de la quantité totale de WSP. Le phytoglycogène du triple mutant a été débranché et analysé par électrophorèse capillaire. La distribution de la longueur des chaînes des WSP de ce triple mutant ressemble à celle des WSP observés dans les mutants *isa1-*, *isa2-*, *isa2-/pu1-* et *isa1-/isa3-*. La caractérisation de la structure de l'amidon résiduel du triple mutant n'a malheureusement pas pu être réalisée dans le cadre de ce travail de thèse. Les niveaux d'accumulation sont si faibles qu'il faudrait cultiver des milliers d'individus pour obtenir suffisamment de matériel pour en faire l'analyse.

	WT	<i>isa1-</i>	<i>isa1-/isa3-</i>	<i>isa1-/isa3-/pu1-</i>
La quantité d'amidon en %	100%	7,63%	1,65%	0,15%
La quantité de WSP en mg.g <sup>-1</sup> feuilles fraîches	0,04±0,02	1,82±1,35	2,15±1,53	3,53
$\lambda_{\max}$ de l'amidon	577±7 nm (n=2)	567,5±1,5 nm (n=2)	590±1 nm (n=2)	556 nm (n=1)

Tableau 1: les amidons ont été extraits en fin de photopériode. La  $\lambda_{\max}$  a été mesurée sur l'amidon total après l'extraction.

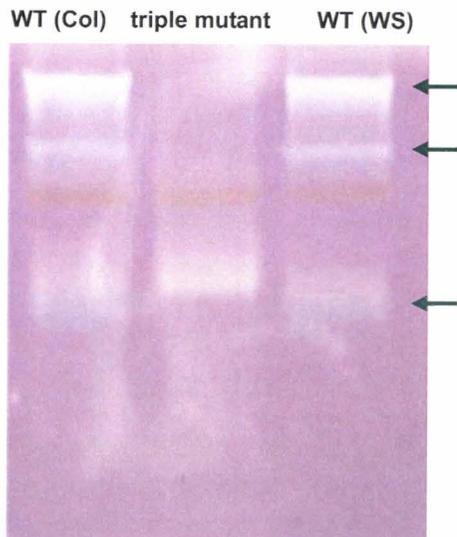


Figure2 : Zymogramme des activités hydrolytiques. Le gel contient 0,2% de  $\beta$ -dextrine limite comme substrat. 100  $\mu\text{g}$  protéines d'un extrait brut de feuilles sont déposés par puits. Après la séparation des protéines à  $15\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$  pendant 3h à  $4^\circ\text{C}$ , le gel est incubé 2h à température ambiante avant la révélation par coloration à l'iode. Col et WS sont les lignées de références sauvages. La flèche en haut indique l'activité de Iso1, la flèche du milieu représente l'activité d'ISA3 et la flèche du bas indique l'activité de la pullulanase.

# **DISCUSSION**

## A. La fonction du complexe Iso1

Dans la première partie de cette étude, nous avons décrit les lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* défectueuses spécifiquement pour chacun des quatre gènes des enzymes de débranchement de l'amidon. Nous avons montré que la mutation *isa1-* ou la mutation *isa2-* conduit à la disparition de la même activité de type isoamylase dans les feuilles (que nous avons dénommée Iso1). Cette activité, localisée au sein du chloroplaste, était la même absente dans le mutant *dbe1* rapporté par Zeeman et coll. (1998). Récemment, et contrairement au phénotype décrit chez le mutant *dbe1*, nous avons observé une modification structurale de l'amylopectine chez les mutants *isa1-* et *isa2-*. La déficience de cette activité Iso1 dans les deux simples mutants d'*Arabidopsis* induit des phénotypes identiques avec les effets suivants: diminution drastique du contenu en amidon, accumulation massive de WSP et modification de structure de l'amylopectine. La similarité des phénotypes observés chez les mutants *isa1-* et *isa2-* nous mène à la conclusion que les protéines Isa1 et Isa2 forment un même complexe enzymatique fonctionnel.

En effet, des études antérieures réalisées sur d'autres modèles ont permis

de suggérer que cette activité isoamylase est en réalité supportée par un complexe hétéro ou homo multimérique (Ishizaki et coll., 1983 ; Hussain et coll., 2003 ; Dauvillée et coll., 2001 ; Fujita et coll., 1999). Récemment, par une étude réalisée sur des mutants DBE d'*A. thaliana*, Delatte et coll. (2005) ont observé l'existence d'un complexe protéique de 500 kDa qui peut être révélée par un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine Isa1. Ces résultats laissent donc penser que la situation doit être semblable chez *A. thaliana*.

Selon les études pratiquées par gels d'activités (zymogramme), les expressions conjointes d'*ISA1* et d'*ISA2* sont indispensables pour obtenir une isoamylase fonctionnelle sur tous les substrats disponibles (l'amylopectine, le glycogène, le phytoglycogène et la  $\beta$ -dextrine limite). Cependant, le travail de Hussain et coll. (2003) montre que chez la pomme de terre, StIsa1 recombinante présente, seule, une activité évidente sur l'amylopectine. La première explication de cette différence proviendrait de la configuration protéique du complexe. On peut supposer qu'Isa1 nécessite la présence d'Isa2 pour constituer une configuration convenable et ainsi accomplir sa fonction enzymatique. L'analyse de la séquence polypeptidique a démontré qu'Isa2 chez *A. thaliana*, comme StIsa2 chez la pomme de terre, a perdu six

des huit résidus d'acides aminés conservés pour la fonction catalytique dans la famille de DBE. Néanmoins, Isa2 garderait encore la capacité de fixer les substrats comme son homologue de la pomme de terre. Une deuxième explication a été avancée par Delatte et coll. (2005). En purifiant la protéine Isa1 native à partir du mutant *isa2-*, ils ont observé une nette diminution de son expression chez ce mutant (le mutant *dbe1*, précédemment décrit par Zeeman et coll., 1998). Cependant, aucune description sur l'activité enzymatique de la protéine n'est mentionnée dans leur étude.

Nous avons essayé d'exprimer les protéines Isa1 et Isa2 chez *E. coli* par l'intermédiaire du système Gateway ou par un clonage dans un vecteur d'expression plus classique. Toutefois, malgré les expressions d'Isa1 et d'Isa2 aucune activité enzymatique n'a pu être révélée par zymogramme. Cette observation suggère que les modèles de fonction pour Isa1 et StIsa1 seraient probablement différents et que l'activité d'Isa1 nécessiterait la présence indispensable d'Isa2 chez *A. thaliana*.

En 1996, Ball et coll. ont proposé que l'isoamylase participait directement à la maturation d'une structure intermédiaire de l'amylopectine, nommée préamylopectine. Cette structure hyperbranchée résulterait de l'action synergique

des amidon-synthétases et des enzymes de branchement. L'arrangement irrégulier des points de branchement empêche la formation correcte des lamelles amorphes, perturbant ainsi la formation des doubles hélices de glucanes dans la lamelle cristalline. L'analyse structurale révèle que les amylopectines extraites des mutants *isa1-* et *isa2-* présentent un fort enrichissement des chaînes courtes ( $DP < 11$ ) et une réduction relative du nombre des chaînes de taille moyenne ( $11 < DP < 18$ ). Les glucanes les plus nombreux dans ces mutants sont obtenus pour les DP6 et DP7. Ce résultat signifie que l'activité Iso1 se chargerait de l'élimination des chaînes inférieures à DP11 et notamment DP 6-7 (résultats probables de l'action directe des enzymes de branchement). L'étude de mutants pour les enzymes de branchement de type II chez *A. thaliana* a permis de démontrer que les BE de type II transféraient principalement des chaînes de DP 6-7 (Dumez et coll., 2006). Les chaînes inférieures à DP12 sont synthétisées directement par SS1 d'après les études obtenues par Delvallé et coll. (2005). Cette cohérence de résultats obtenus ces dernières années confirme l'hypothèse de l'épissage (ou synthèse discontinue) de la préamylopectine proposée par Ball et coll. (1996). Le dépôt chaotique des chaînes produites par BE et SS bloque très rapidement la formation des doubles

hélices linéaires de la lamelle cristalline de l'amylopectine conférant ainsi une structure qui s'apparente plutôt à celle du glycogène.

L'analyse du cycle de synthèse et de dégradation de l'amidon et des WSP montre que ces derniers, présents dans les mutants *isa1-* et *isa2-* suivent la même tendance métabolique que l'amidon : ils sont synthétisés pendant la photopériode et dégradés durant la nuit. Ce phénomène corrobore le fait que les WSP s'accumulent lorsque la synthèse de l'amidon est altérée, auquel cas ils se substituent à l'amidon. De plus, comme cela a été indiqué dans la première partie des résultats, le phytoglycogène ne représente pas le substrat le plus favorable pour Iso1. Ainsi, la fonction du complexe Iso1 ne serait pas impliquée dans l'élimination de WSP (proposé par Zeeman et coll., 1998), mais plutôt dans celle de courtes chaînes externes de l'amylopectine qui empêcheraient la formation de doubles hélices de la lamelle cristalline de l'amylopectine si elles n'étaient pas enlevées.

La diminution de la taille des grains d'amidon chez les mutants pour les activités de débranchement a été rapportée chez l'orge, la pomme de terre, le riz et le mutant *dbe1* d'*A. thaliana*. De même, le mutant *isa1-* que nous avons analysé produit des grains d'amidon beaucoup plus

petits que ceux du sauvage. S'appuyant sur ce phénotype, Burton et coll. (2002) proposent que la fonction d'Iso1 est liée au contrôle de l'initiation de la synthèse du grain d'amidon. Toutefois, cette hypothèse est loin de faire l'unanimité. En effet, les résultats les plus récents concernant l'initiation de la synthèse de l'amidon qui ont été obtenus suggèrent que le mécanisme d'amorçage de la synthèse de l'amidon est plutôt contrôlé par les amidon-synthétases solubles et en particulier la SS4 (Roldan et coll., 2007). L'apparition des petits grains d'amidon chez les mutants pour Iso1 serait plutôt une conséquence du blocage de la cristallisation de l'amylopectine lors de la première période de synthèse et de l'apparition de grandes quantités de polysaccharides solubles qui représentent des sites potentiels d'initiation de synthèse de grains d'amidon. L'effet de l'absence d'Iso1 sur la taille des grains d'amidon risque donc probablement d'être uniquement indirect. Il serait par ailleurs indispensable afin de corroborer cette hypothèse d'induire une surexpression de cette activité enzymatique pour vérifier si dans ces conditions on observe une augmentation de la taille des grains (les possibilités d'initiation seraient alors réduites). Par ailleurs, l'existence concrète des WSP au cours de la synthèse de l'amidon dans les plantes sauvages n'a

jamais été démontrée.

Cependant, la présence d'amidon résiduel dans les mutants pour l'activité Iso1 et l'existence de grains insolubles suggèrent que les autres DBEs (Isa3 et Pu1) interviennent, de façon mineure, lors de la synthèse de l'amidon et peuvent donc en partie compenser la perte d'Iso1.

## B. La fonction d'ISA3

D'après les résultats obtenus grâce aux travaux présentés dans la première partie de la section réservée aux résultats, Isa3 semble être un élément essentiel de la dégradation de l'amidon pendant la nuit dans la feuille d'*A. thaliana*. Une déficience de cette protéine conduit à une suraccumulation d'amidon en fin de journée mais aussi en fin de nuit. De plus, l'analyse du rythme de synthèse et de dégradation de l'amidon révèle que ce mutant synthétise l'amidon à une vitesse normale pendant la journée, tandis que la dégradation de l'amidon est fortement perturbée et ralentie dans la nuit. La perturbation du catabolisme de l'amidon peut également être prouvée par la présence de grains plus volumineux. Ce phénotype suggère qu'Isa3 serait impliquée dans les premières phases de la dégradation. Selon des études antérieures, la  $\beta$ -amylolyse serait la voie privilégiée de

la dégradation de l'amidon (Scheidig et coll., 2002) et le maltose serait le principal métabolite exporté à partir du chloroplaste (Weise et coll., 2004) pour alimenter le métabolisme des sucres dans le cytosol et l'exportation du carbone vers les autres organes de la plante. Néanmoins, l'activité de la  $\beta$ -amylase s'arrête à deux ou trois résidus de glucose en amont d'un site de ramification. De fait on comprend bien dans ce contexte l'importance des enzymes de débranchement dans la dégradation de l'amidon. L'enzyme de pomme de terre StIsa3 recombinante chez *E. coli* montrait une activité prédominante sur les  $\beta$ -dextrines limites (Hussain et coll., 2003). De même, Isa3 chez *A. thaliana* ne semble pouvoir utiliser que les  $\beta$ -dextrines limites comme substrat dans les conditions expérimentales utilisées *in vitro*.

Le mutant *isa3-* présente un léger enrichissement en nombre de chaînes courtes (DP 3-9) comme les mutants de l'activité Iso1. La surabondance des chaînes est maximale pour DP3 et ensuite décroît progressivement jusqu'à DP9. Selon cette observation, nous pouvons imaginer que l'enzyme Isa3 éliminerait principalement les chaînes de DP3 *in vivo* laissées par les  $\beta$ -amylases qui ne peuvent plus agir. Ainsi, au cours du métabolisme de l'amidon, Isa3 jouerait un rôle plus important dans la dégradation que dans la synthèse puisque le substrat le plus adapté

pour cette enzyme (les  $\beta$ -dextrines limites), est produit lors de la dégradation de l'amidon. Toutefois, nous n'avons aucune raison d'exclure une activité potentielle d'Isa3 dans le processus de synthèse.

Le phénotype du double mutant *isa1-/isa3-* ressemble beaucoup à celui du simple mutant *isa1-*, ce qui révèle un comportement épistasique de Iso1 sur Isa3. De fait l'activité d'Isa3 fonctionnerait en aval de la synthèse de l'amidon. Cependant, une réduction plus sévère du contenu en amidon observée chez ce double mutant, qui n'accumule qu'environ 1,5 % d'amidon par rapport au sauvage, suggère qu'Isa3 doit aussi contribuer pour une faible mais sensible part à la biosynthèse de l'amidon. Nous supposons que Iso1 et Isa3 doivent avoir des activités additives dans le processus de synthèse de l'amidon d'après l'analyse de la distribution de longueur des chaînes du double mutant et des deux simples mutants concernés. Il s'avère que le profil calculé présente une similitude évidente avec la différence structurale existant réellement entre le double mutant et le sauvage. Cette différence structurale réelle se manifeste nettement par la présence de deux pics, le premier à DP3 et le deuxième à DP7, qui caractérisent respectivement la déficience pour les deux isoamylases. En fait, il est plausible qu'Isa3 maintient un rôle très restreint, mais se différencie de celui

d'Iso1 au moment de la synthèse de l'amylopectine dans les lignées sauvages. La fonction limitée d'Isa3 pour le processus de synthèse résiderait dans sa faible affinité pour les substrats en présence au cours de la synthèse.

Cependant, la présence d'amidon résiduel (environ 1,5 % du contenu normal) chez le double mutant *isa1-/isa3-* nous suggère qu'il existe encore une activité, telle que la pullulanase, qui compense dans une certaine mesure la perte des fonctions d'Iso1 et d'Isa3 au cours du processus de synthèse.

### **C. La fonction de la pullulanase**

Selon les études de la première partie des résultats de ce mémoire, à part une légère augmentation du contenu en WSP, aucune modification significative de la quantité d'amidon n'est observée chez le mutant *pul-*. L'altération de la structure de l'amylopectine est insignifiante par rapport à la lignée sauvage. Les études sur le mutant *zpul-* du maïs n'ont pas permis d'observer non plus de modifications significatives du contenu et de la structure de l'amidon de l'albumen (Dinges et coll., 2003). Chez le maïs et le riz, l'effet de la pullulanase devient plus flagrant lorsqu'elle est absente dans un fond génétique mutant pour l'isoamylase (Kubo

et coll., 1999 ; Dinges et coll., 2003). De la même manière, chez le double mutant *isa2-/pul1-*, la réduction de la quantité d'amidon devient plus sévère (environ 8 % d'amidon résiduel). Ces résultats nous suggèrent que la pullulanase jouerait aussi un rôle partiellement redondant dans le processus de biosynthèse de l'amidon. Toutefois, son activité resterait très minoritaire, puisque le défaut supplémentaire de la pullulanase dans un fond génétique *isa2-* n'a pas entraîné une modification structurale supplémentaire de l'amylopectine en comparaison de l'amylopectine du mutant *isa2-* (ou de celui de *isa1-* qui conduit à la disparition de la même fonction enzymatique Iso1). En fait, la présence d'amidon résiduel chez ce double mutant doit être probablement sous la dépendance de l'activité d'Isa3, de même que l'amidon résiduel du double mutant *isa1-/isa3-* résulterait de l'activité Pul1. Si on compare le contenu en amidon résiduel chez les deux doubles mutants, *isa1-/isa3-* et *isa2-/pul1-*, on obtiendrait une idée des proportions approximatives de la contribution des activités des différentes isoformes dans la biosynthèse de l'amidon : Iso1 est l'activité dominante (90 %) dans le processus de synthèse d'amylopectine, alors qu'Isa3 compte pour environ 8 % de l'activité de synthèse, tandis que Pul1 contribue pour seulement 2 %. Mais nous avons observé avec surprise l'existence

d'une minuscule quantité d'amidon dans le triple mutant où toutes les activités de DBE connues sont supprimées. Mais puisque les activités de SS et BE, deux groupes d'enzymes fondamentales pour l'initiation et la synthèse de l'amidon, interviennent dans le processus de synthèse de l'amidon avant les DBEs, elles pourraient déjà construire une minuscule quantité de polysaccharide insoluble dont la structure reste à déterminer. Cependant, ces activités sont très rapidement « bloquées » en l'absence de l'activité de débranchement et ne peuvent maintenir un haut niveau de synthèse d'amidon. Toutefois, l'existence d'autres activités de débranchement jusqu'à présent inconnues ou de toute autre activité susceptible d'être responsable de la synthèse de ce polysaccharide insoluble dans le triple mutant ne peut être exclue.

Dans le même temps, l'analyse effectuée sur un autre double mutant, *isa3-/pul1-*, suggère une fonction de dégradation de l'amidon pour la pullulanase. Quand on compare la quantité d'amidon produite chez ce double mutant (180 % de celle du sauvage en fin de journée) et celle chez *isa3-* (130 % de celle du sauvage en fin de journée), on suppose que la pullulanase contribuerait pour une part importante dans le processus de dégradation de l'amidon en l'absence d'Isa3. Comme dans le cas des mutations *isa1-* et *isa3-*, les simples mutations *isa3-* et *pul1-* ont un simple effet

additif sur la structure de l'amylopectine et non pas un effet synergétique. De plus, on observe chez ce double mutant une nette croissance du contenu en WSP. Il est accumulé pendant la nuit et dégradé au cours de la photopériode. Ce phénotype n'est observé ni chez le mutant *isa3-*, ni le mutant *pul1-*. Contrairement au WSP produit au moment où la voie de synthèse de l'amidon est bloquée, le WSP apparaissant chez ce mutant serait lié à la forte perturbation de dégradation. Selon les études réalisées par Delatte et coll. (2006), ce WSP se présente sous la forme de malto-oligosaccharides branchés qui ont été observés dans l'endosperme du mutant *zpul1-* du maïs (Dinges et coll., 2003). En tout cas, le phénotype plus sévère présenté par le double mutant *isa3-/pul1-* suggère une implication claire pour la pullulanase dans la dégradation de l'amidon. Comme l'absence seule de pullulanase n'entraîne aucun changement significatif du contenu en amidon, il est suggéré que l'activité de la pullulanase interviendrait en aval de celle d'Isa3 et dominée par cette dernière. Ainsi, le malto-oligosaccharide branché (Delatte et coll., 2006) apparaissant chez le double mutant serait éliminé par la pullulanase dans les conditions normales. Delatte et coll. supposent que ce MOS branché, qui n'existerait pas dans les conditions normales serait produit par l' $\alpha$ -amylase, puisqu'ils ont observé que

l'activité de l' $\alpha$ -amylase est élevée chez le mutant *isa3-* et surtout le double mutant *isa3-/pul1-*. Nous n'avons pas pu observer ce phénotype dans le cas de notre lignée double mutante *isa3-/pul1-* que ce soit par dosage enzymatique *in vitro* ou par zymogramme. Cependant, l'activité des enzymes disproportionnantes est légèrement augmentée chez les mutants *isa3-/pul1-* et *pul1-*. Ce phénomène est encore difficile à expliquer. Toutefois, l'activité DPE1 interviendrait aussi dans le métabolisme des MOS branchés, la suppression de pullulanase stimulerait l'expression de DPE1.

## Bibliographie

- Abe, J., Ushijima, C. and Hizukuri, S.** (1999) Expression of the isoamylase gene of *Flavobacterium odoratum* KU in *Escherichia coli* and identification of essential residues of the enzyme by site-directed mutagenesis. *Applied and environmental microbiology*, **65**, 4163-4170.
- Albrecht, T., Haebel, S., Koch, A., Krause, U., Eckermann, N. and Steup, M.** (2004) Yeast glycogenin (Glg2p) produced in *Escherichia coli* is simultaneously glucosylated at two vicinal tyrosine residues but results in a reduced bacterial glycogen accumulation. *European journal of biochemistry / FEBS*, **271**, 3978-3989.
- Ball, S., Guan, H. P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buleon, A., Colonna, P. and Preiss, J.** (1996) From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell*, **86**, 349-352.
- Ball, S.G., van de Wal, M.H.B.J. and Visser, R.G.F.** (1998) Progress in understanding the biosynthesis of amylose *Trends in Plant Science*, **3**, 462-467.
- Ballicora, M. A., Frueauf, J. B., Fu, Y., Schurmann, P. and Preiss, J.** (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 1315-1320.
- Banks, W. and Greenwood, C. T.** (1975) Starch and its Components. *Edinburgh University Press, Edinburgh (England)*, 342.
- Baunsgaard, L., Lutken, H., Mikkelsen, R., Glaring, M.A., Pham, T. T. and Blennow, A.** (2005) A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J*, **41**, 595-605.
- Beatty, M. K., Rahman, A., Cao, H., Woodman, W., Lee, M., Myers, A. M. and James, M. G.** (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.

**Beck, E. and Ziegler, P.** (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 95-117.

**Bertoldo, C. and Antranikian, G.** (2002) Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current opinion in chemical biology*, **6**, 151-160.

**Bhatty, R. S. and Rossnagel, B. G.** (1997) Zero amylose lines of hull-less barley. *Cereal chem.*, **74** 190-191.

**Blakeney, A. B. and Matheson, N. K.** (1984) Some properties of the stern on pollen starches of rice. *Stärke*, **36**, 265-269.

**Blauth, S. L., Yao, Y., Klucinec, J. D., Shannon, J. C., Thompson, D. B. and Gultinan, M. J.** (2001) Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn. *Plant physiology*, **125**, 1396-1405.

**Blauth, S. L., Kim, K. N., Klucinec, J., Shannon, J. C., Thompson, D. and Gultinan, M.** (2002) Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (Sbe1) in *Zea Mays* L. *Plant Mol. Biol.*, **48**, 287-297.

**Blennow, A., Nielsen, T. H., Baunsgaard, L., Mikkelsen, R. and Engelsen, S. B.** (2002) Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci*, **7**, 445-450.

**Bouchez, D., Camilleri, C. and M., C.** (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

**Bresolin, N. S., Li, Z., Kosar-Hashemi, B., Tetlow, I. J., Chatterjee, M., Rahman, S., Morell, M. K. and Howitt, C. A.** (2006) Characterisation of disproportionating enzyme from wheat endosperm. *Planta*, **224**, 20-31.

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

**Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S.** (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International journal of biological macromolecules*, **23**, 85-112.

- Buleon, A. D., Dupart, F., Booy, F. P. and Chanzy, H.** (1984) Single crystals of amylose with a low degree of polymerization. *Carbohydrate polymers*, **4**, 161-173.
- Burton, R. A., Bewley, J. D., Smith, A. M., Bhattacharyya, M. K., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilton, W. D. and Martin, C.** (1995) Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J*, **7**, 3-15.
- Burton, R. A., Zhang, X. Q., Hrmova, M. and Fincher, G. B.** (1999) A single limit dextrinase gene is expressed both in the developing endosperm and in germinated grains of barley. *Plant physiology*, **119**, 859-871.
- Burton, R. A., Johnson, P. E., Beckles, D. M., Fincher, G. B., Jenner, H. L., Naldrett, M. J. and Denyer, K.** (2002) Characterization of the genes encoding the cytosolic and plastidial forms of ADP-glucose pyrophosphorylase in wheat endosperm. *Plant physiology*, **130**, 1464-1475.
- Burton, R. A., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G. B., Hylton, C., Laurie, D. A., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., Verhoeven, T. and Denyer, K.** (2002) Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J*, **31**, 97-112.
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C. M., Seale, R., Nebane, N. M., Edwards, A., Martin, C. and Smith, A. M.** (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 2215-2220.
- Buttrose, M. S.** (1962) The influence of environment on the shell structure of starch granules. *J Cell Biol*, **14**, 159-167.
- Chatterjee, M., Berbezy, P., Vyas, D., Coates, S. and Barsby, T.** (2005) Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in Arabidopsis leaves. *Plant Sci.*, **168**, 501-509.
- Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M. G. and Roach, P. J.** (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator proteins 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. and**

- Smith, S. M.** (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *Plant J. Mar*, **37**, 853-863.
- Cho, M. J., Wong, J. H., Marx, C., Jiang, W., Lemaux, P. G. and Buchanan, B. B.** (1999) Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 14641-14646.
- Colleoni, C., Dauvillee, D., Mouille, G., Bul on, A., Gallant, D., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J. M. and Ball, S.** (1999 a) Genetic and biochemical evidence for the involvement of alpha-1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant physiology*, **120**, 993-1004.
- Colleoni, C., Dauville e, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomiany, M. C., Linard, L., Wattedled, F., D'Hulst, C. and Ball, S.** (1999 b) Biochemical characterization of the chlamydomonas reinhardtii alpha-1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant physiology*, **120**, 1005-1014.
- Commuri, P. D. and Keeling, P. L.** (2001) Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J*, **25**, 475-486.
- Coppin, A., Varre, J. S., Lienard, L., Dauvillee, D., Guerardel, Y., Soyer-Gobillard, M. O., Buleon, 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.
- Craig, J., Lloyd, J. R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T. L., Martin, C., Hedley, C. L. and Smith, A. M.** (1998) Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *The Plant cell*, **10**, 413-426.
- Crevillen, P., Ventriglia, T., Pinto, F., Orea, A., Merida, A. and Romero, J. M.** (2005) Differential pattern of expression and sugar regulation of Arabidopsis thaliana ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 8143-8149.
- 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. *Plant J*, **26**, 89-100.

**Dauter, Z., Persson, R., Rosengren, A. M., Nyman, P. O., Wilson, K. S. and Cedergren-Zeppezauer, E. S.** (1999) Crystal structure of dUTPase from equine infectious anaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex. *Journal of molecular biology*, **285**, 655-673.

**Dauvillee, D., Colleoni, C., Shaw, E., Mouille, G., D'Hulst, C., Morell, M., Samuel, M. S., Bouchet, B., Gallant, D. J., Sinskey, A. and Ball, S.** (1999) Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, **119**, 321-330.

**Dauvillee, D., Mestre, V. V., Colleoni, C., Slomianny, M., Mouille, G., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J. and Ball, S.** (2000) The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Science*, **157**, 145-156.

**Dauvillee, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, M. K., D'Hulst, C., Wattebled, F.,**

**Lienard, L., Delvalle, D., Ral, J. P., Myers, A. M. and Ball, S. G.** (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.

**Dauvillee, D., Colleoni, C., Mouille, G., Buleon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Morell, M. K., d'Hulst, C., Myers, A. M. and Ball, S. G.** (2001) Two loci control phytoglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology*, **125**, 1710-1722.

**Dauvillee, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, J. P., Colleoni, C., Hicks, G., Wattebled, F., Deschamps, P., D'Hulst, C., Lienard, L., Cournac, L., Putaux, J. L., Dupeyre, D. and Ball, S. G.** (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, **48**, 274-285.

**Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M. L. and Zeeman, S. C.** (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. *Plant J*, **41**, 815-830.

**Delatte, T., Umhang, M., Trevisan, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, S. M. and Zeeman, S.C.** (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 12050-12059.

**Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Van Den Koornhuysse, 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.

**Delvalle, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldan, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Merida, A. and D'Hulst, C.** (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J*, **43**, 398-412.

**Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjornsen, T., Keeling, P. and Smith, A. M.** (1996) The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is

extra-plastidial. *Plant physiology*, **112**, 779-785.

**Denyer, K., Barber, L. M., Edwards, E. A., Smith, A. M. and Wang, T. L.** (1997) Two isoforms of the GBSSI class of granule-bound starch synthase are differentially expressed in the pea plant (*Pisum sativum* L.) *Plant, Cell & Environment*, **20**, 1566-1572.

**Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Moller, B. L. and Smith, A. M.** (1999) Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *The Biochemical journal*, **340** (Pt 1), 183-191.

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

**Deschamps, P., Haferkamp, I., Dauvillee, D., Haebel, S., Steup, M., Buleon, A., Putaux, J. L., Colleoni, C., D'Hulst, C., Plancke, C., Gould, S., Maier, U., Neuhaus, H.E. and Ball, S.** (2006) Nature of the periplastidial pathway of starch synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryotic cell*, **5**, 954-963.

- Dhugga, K. S., Tiwari, S. C. and Ray, P. M.** (1997) A reversibly glycosylated polypeptide (RGP1) possibly involved in plant cell wall synthesis: purification, gene cloning, and trans-Golgi localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 7679-7684.
- Dian, W., Jiang, H. and Wu, P.** (2005) Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *Journal of experimental botany*, **56**, 623-632.
- Dinges, J. R., Colleoni, C., James, M. G. and Myers, A. M.** (2003) Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *The Plant cell*, **15**, 666-680.
- 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.
- Dumez, S., Wattebled, F., Dauvillee, D., Delvalle, D., Planchot, V., Ball, S. G. and D'Hulst, C.** (2006) Mutants of Arabidopsis lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation. *The Plant cell*, **18**, 2694-2709.
- Echt, C.G., and Schwartz, D.** (1981) Evidence for the inclusion of controlling elements within the structural gene at waxy locus in maize. *Genetics*, **99**, 275-284.
- Edwards, A., Fulton, D. C., Hylton, C. M., Jobling, S. A., Gidley, M., Rössner, U., Martin, C. and Smith, A. M.** (1999) A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *The Plant Journal*, **17**, 251 - 228.
- Eriksson, G.** (1969) The waxy character. *Hereditas*, **63**, 180-204.
- Erlander, S. R.** (1958) A proposed mechanism for the synthesis of starch from glycogen. *Enzymologia*, **19**, 273-283.
- Fettke, J., Chia, T., Eckermann, N., Smith, A. and Steup, M.** (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J*, **46**, 668-684.
- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberger, P. and Steup, M.** (2005) 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. *Plant J*, **43**, 568-585.

**Fettke, J., Poeste, S., Eckermann, N., Tiessen, A., Pauly, M., Geigenberger, P. and Steup, M.** (2005) Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme. *Plant & cell physiology*, **46**, 1987-2004.

**Fincher, G. B.** (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 305-346.

**Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M. L., Routier, F., Pepin, T. M., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Delrue, B., Van den Koornhuyse, N., Bossu, J. P. et al.** (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. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 16223-16230.

**French, D., Whistler, R. L., Bemiller, J. N., Parschall, E. F. and editors.** (1984)

Starch, Chemistry and Technology. *In: New York: Academic Press*, 183-247.

**French, D., Smith, E. E. and Whelan, W. J.** (1972) The structural analysis and enzymic synthesis of a pentasaccharide alpha-limit dextrin formed from amylopectin by *Bacillus subtilis* alpha-amylyase. *Carbohydr Res*, **22**, 123-134.

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

**Fujita, N., Kubo, A., Suh, D. S., Wong, K. S., Jane, J. L., Ozawa, K., Takaiwa, F., Inaba, Y. and Nakamura, Y.** (2003) Antisense inhibition of isoamylase alters the structure of amylopectin and the physicochemical properties of starch in rice endosperm. *Plant & cell physiology*, **44**, 607-618.

**Fujita, N. and Taira, T.** (1998) A 56-kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seed in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). *Planta*, **207**, 125-132.

**Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H. and**

- Nakamura, Y.** (2006) Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant physiology*, **140**, 1070-1084.
- Gallant, D. J.** (1974) Contribution à l'étude de la structure et de l'ultrastructure du grain d'amidon. *PhD thesis, University of Paris VI, France, No. CNRS AO 10823*.
- 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.
- Gao, M., Fisher, D. K., Kim, K. N., Shannon, J. C. and Gultinan, M. J.** (1997) Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA. *Plant physiology*, **114**, 69-78.
- 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., Stitt, M. and Heldt, H. W.** (1987) Subcellular Metabolite Levels in Spinach Leaves: Regulation of Sucrose Synthesis during Diurnal Alterations in Photosynthetic Partitioning. *Plant physiology*, **83**, 399-407.
- Gibbons, B. J., Roach, P. J. and Hurley, T. D.** (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *Journal of molecular biology*, **319**, 463-477.
- Goldraj, A., Miozzo, M. C. and Curtino, J. A.** (1993) Glycogen-bound protein in lower eukaryote and prokaryote. *Biochem. Mol. Biol. Int*, **30**, 453-460.
- Gomez-Casati, D. F. and Iglesias, A. A.** (2002) ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat endosperm. Purification and characterization of an enzyme with novel regulatory properties. *Planta*, **214**, 428-434.
- Guan, H., Kuriki, T., Sivak, M. and Preiss, J.** (1995) Maize branching enzyme catalyzes 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., 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.

- 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, H. P., Baba, T. and Preiss, J.** (1994) Expression of branching enzyme II of maize endosperm in *Escherichia coli*. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, **40**, 981-988.
- Guan, H. P. and Keeling, P. L.** (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, H. P. and Preiss, J.** (1993) Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant physiology*, **102**, 1269-.
- Hanashiro, I., Abe, J. and Hizukuri, S.** (1996) A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography *Carbohydrate Research*, **283**, 151-159.
- Heldt, H. W., Chon, C. J. and Maronde, D.** (1977) Role of Orthophosphate and Other Factors in the Regulation of Starch Formation in Leaves and Isolated Chloroplasts. *Plant physiology*, **59**, 1146-1155.
- Hendriks, J. H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M. and Geigenberger, P.** (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant physiology*, **133**, 838-849.
- Henrissat, B.** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *The Biochemical journal*, **280 (Pt 2)**, 309-316.
- 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) Starch: Structure and functionality. In: *Frazier PJ, Richmond P, Donald AM, editors. London: Royal Society of Chemistry*, 121.
- 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.

**Hobson, P. N., Whelan, W. J. and Peat, S.** (1950) A 'de-branching' enzyme in bean and potato. *The Biochemical journal*, **47**, xxxix

**Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E. and Ponstein, A. S.** (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, A. M., 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.

**Imberty, A., Chanzy, H., Perez, S., Buleon, A. and Tran, V.** (1987) New three-dimensional structure for A-type starch. *Macromolecules*, **20**, 2634-2636.

**Imberty, A. and Perez, S.** (1988) Crystal structure and conformational features of  $\alpha$ -panose. *Carbohydrate Research*, **181:41**, 41-55.

**Imparl-Radosevich, J. M., Li, P., Zhang,**

**L., McKean, A. L., Keeling, P. L. and Guan, H.** (1998) Purification and characterization of maize starch synthase I and its truncated forms. *Archives of biochemistry and biophysics*, **353**, 64-72.

**Ishikawa, M., Ishirawa, J. and Itoh, M.** (1995) Artificial induction and characterization of amylose-free mutants of barley. *Genet Newslett*, **24**, 49-53.

**Ishizaki, Y., Taniguchi, H., Maruyama, Y., and Nakamura, M.** (1983) Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L) I: Purification and some properties of potato isoamylase. *Agric. Biol. Chem*, **47**, 771-779.

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

**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.

**Johnson, P. E., Patron, N. J., Bottrill, A. R., Dinges, J. R., Fahy, B. F., Parker, M. L., Waite, D. N. and Denyer, K.** (2003) A low-starch barley mutant, riso 16, lacking

the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant physiology*, **131**, 684-696.

**Kainuma, K., Kobayashi, S. and Harada, T.** (1978) Action of *Pseudomonas* isoamylase on various branched oligo and poly-saccharides. *Carbohydrate Research*, **61**, 345-357.

**Kaiser, W. M. and Bassham, J. A.** (1979) Light-Dark Regulation of Starch Metabolism in Chloroplasts: I. Levels of Metabolites in Chloroplasts and Medium during Light-Dark Transition. *Plant physiology*, **63**, 105-108.

**Kaplan, F. and Guy, C. L.** (2004) beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant physiology*, **135**, 1674-1684.

**Kaplan, F. and Guy, C. L.** (2005) RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J*, **44**, 730-743.

**Kasemsuwan, T. and Jane, J.** (1994) Location of amylose in normal starch granules. II: Locations of phosphodiester

cross-linking revealed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. *Cereal Chem*, **71**, 282-287.

**Kasemsuwan, T., Jane, J., Schnable, P., Stinard, P. and Robertson, D.** (1995) Characterization of the dominant mutant Amylose-extender (Ae1-5180) maize starch. *Cereal Chem*, **72**, 457-464.

**Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M. and Matsuura, Y.** (1998) Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol*, **281**, 885-897.

**Kossmann, J., Abel, G. J., 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**, 399-410.
- Kuriki, T. and Imanaka, T.** (1999) The concept of the alpha-amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of bioscience and bioengineering*, **87**, 557-565.
- Laby, R. J., Kim, D. and Gibson, S. I.** (2001) The ram1 mutant of Arabidopsis exhibits severely decreased beta-amylase activity. *Plant physiology*, **127**, 1798-1807.
- Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R. M., Hibberd, J. M., Gray, J. C. and Kavanagh, T. A.** (1999) An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J*, **20**, 519-527.
- Larson, S. B., Greenwood, A., Casico, D., Day, J. and McPherson, A.** (1994) Refined molecular structure of pig pancreatic a-amylase at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **235**, 1560-1584.
- Lee, E. Y., Marshall, J. J. and Whelan, W.J.** (1971) The substrate specificity of amylopectin-debranching enzymes from sweet corn. *Archives of biochemistry and biophysics*, **143**, 365-374.
- Leloir, L. F.** (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science*, **172**, 1299-1303.
- Levi, C. and Gibbs, M.** (1976) Starch degradation in isolated chloroplasts. *Plant physiology*, **57**, 933-935.
- Li, B., Servaites, J. C. and Geiger, D. R.** (1992) Characterization and Subcellular Localization of Debranching Enzyme and Endoamylase from Leaves of Sugar Beet. *Plant physiology*, **98**, 1277-1284.
- Li, Z., Sun, F., Xu, S., Chu, X., Mukai, Y., Yamamoto, M., Ali, S., Rampling, L., Kosar-Hashemi, B., Rahman, S. and Morell, M. K.** (2003) The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. *Functional & integrative genomics*, **3**, 76-85.
- Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. and Preiss, J.** (1988) Isolation and Characterization of a Starchless Mutant of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh Lacking ADPglucose Pyrophosphorylase Activity. *Plant physiology*, **86**, 1131-1135.
- Lin, T. P., Caspar, T., Somerville, C. R. and Preiss, J.** (1988) 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, J. R., 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 amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*, **218**, 466-473.

**Lu, Y. and Sharkey, T. D.** (2006a) The importance of maltose in transitory starch breakdown. *Plant Cell Environ*, **29**, 353-366.

**Lu, Y., Steichen, J.M., Weise, S. E. and Sharkey, T. D.** (2006b) Cellular and organ level localization of maltose in maltose-excess Arabidopsis mutants. *Planta*, **224**, 935-943.

**Lu, Y., Steichen, J. M., Yao, J. and Sharkey, T. D.** (2006c) The role of cytosolic alpha-glucan phosphorylase in maltose metabolism and the comparison of amylomaltase in Arabidopsis and Escherichia coli. *Plant physiology*, **142**, 878-889.

**MacGregor, A. W., Donald, L. J., MacGregor, E. A. and Duckworth** (2003) Stoichiometry of the complex formed by barley limit dextrinase with its endogenous inhibitor. Determination by electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J. Cereal Sci.*, **37**, 357-362.

**Manners, D. J. and Rowe, K. L.** (1969) Studies on carbohydratemetabolizing enzymes. XX. Sweet corn debranching enzyme. *Carbohydrate Research*, **9**, 107-121.

**Manners, D. J.** (1989) Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers*, **11**, 87-112.

**Manners, D. J. and Rowe, K. L.** (1968) The specificity of barley limit dextrinase. *The Biochemical journal*, **110**, 35P.

**Maruo, B. and Kobayashi, T.** (1951) Enzymic scission of the branch links of amylopectin. *Nature*, **167**, 606-607.

- Matsuura, Y., Kusunoki, M., Harada, W. and Kakudo, M.** (1984) Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *Journal of biochemistry*, **95**, 697-702.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B. and Koncz, C.** (1991) T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *The EMBO journal*, **10**, 697-704.
- Mikami, B., Iwamoto, H., Malle, D., Yoon, H.J., Demirkan-Sarikaya, E., Mezaki, Y. and Katsuya, Y.** (2006) Crystal structure of pullulanase: evidence for parallel binding of oligosaccharides in the active site. *Journal of molecular biology*, **359**, 690-707.
- Mikkelsen, R., Baunsgaard, L. and Blennow, A.** (2004) Functional characterization of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *The Biochemical journal*, **377**, 525-532.
- Morell, M. K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, M., Samuel, M. S., Chandler, P., Rahman, S., Buleon, A., Batey, I. L. and Li, Z.** (2003) Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J*, **34**, 173-185.
- Morrison, W., Law, R. and Snape, C. J.** (1993) Swelling and Gelatinization of Cereal Starches. IV. Some Effects of Lipid-Complexed Amylose and Free Amylose in Waxy and Normal Barley Starches. *Cereal Sci*, **70** 385-391.
- Mouille, G., Maddelein, M. L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B. and Ball, S.** (1996) Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *The Plant cell*, **8**, 1353-1366.
- Murata, T., Sugiyama, T. and Akazawa, T.** (1965) Enzymatic Mechanism of starch synthesis in glutinous rice grains. *Biochem Biophys Res Commun*, **18**, 371-376.
- Myers, A. M., Morell, M. K., James, M. G. and Ball, S. G.** (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant physiology*, **122**, 989-997.
- Nakajima, R., Imanaka, T. and Aiba, S.** (1986) Comparison of amino acid sequences of eleven different  $\alpha$ -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **23**, 355-360.
- Nakamura, T., Vrinten, P., Hayakawa, K. and Ikeda, J.** (1998) Characterization of a

granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. *Plant physiology*, **118**, 451-459.

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

**Nakamura, Y., Francisco, P. B., Jr., Hosaka, Y., Sato, A., Sawada, T., Kubo, A. and Fujita, N.** (2005) Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties. *Plant molecular biology*, **58**, 213-227.

**Nakamura, Y., Umemoto, T., Ogata, N., Kuboki, Y., Yano, M. and Sasaki, T.** (1996) Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene. *Planta*, **199**, 209-218.

**Nelson, O. E. and Rines, H. W.** (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem Biophys Res Commun*, **9**, 297-300.

**Nelson, O. E. and Tsai, C. Y.** (1964) Glucose Transfer from Adenosine Diphosphate-Glucose to Starch in

Preparations of Waxy Seeds. *Science*, **145**, 1194-1195.

**Nielsen, T. H., Wischmann, B., Enevoldsen, K. and Moller, B. L.** (1994) Starch Phosphorylation in Potato Tubers Proceeds Concurrently with de Novo Biosynthesis of Starch. *Plant physiology*, **105**, 111-117.

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

**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.

**Oostergetel, G. T., and van Bruggen, E. F. J.** (1993) The crystalline domains in potato starch granules are arranged in a helical fashion. *Carbohydrate Polymers*, **21**, 7-12.

**Pan, D. and Nelson, O. E.** (1984) A Debranching Enzyme Deficiency in Endosperms of the Sugary-1 Mutants of Maize. *Plant physiology*, **74**, 324-328.

**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, A. M.** (2003) Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant physiology*, **132**, 365-371.

**Preiss, J.** (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu Rev Plant Physiol*, **33**, 431-454.

**Preiss, J.** (1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annual review of microbiology*, **38**, 419-458.

**Rahman, A., Wong, K., Jane, J., Myers, A. M. and James, M. G.** (1998) Characterization of SU1 isoamylase, a determinant of storage starch structure in maize. *Plant physiology*, **117**, 425-435.

**Ral, J. P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buleon, A., Slomianny, M. C., 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 tauri*. *Plant physiology*, **136**, 3333-3340.

**Renz, A., Schikora, S., Schmid, R., Kossmann, J. and Beck, E.** (1998) cDNA sequence and heterologous expression of monomeric spinach pullulanase: multiple isomeric forms arise from the same polypeptide. *The Biochemical journal*, **331** (Pt 3), 937-945.

**Ritchie, S., Swanson, S. J. and Gilroy, S.** (2000) Physiology of the aleurone layer and starchy endosperm during grain development and early seedling growth: new insights from cell and molecular biology. *Seed Sci. Res.*, **10**, 193-212.

**Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlow, S., Haebel, S., Kotting, O. and Steup, M.** (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS letters*, **580**, 4872-4876.

**Ritte, G., Lloyd, J. R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J. and Steup, M.** (2002) The starch-related R1 protein is an alpha -glucan, water dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **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.

**Robert, X., Haser, R., Gottschalk, T. E., Ratajczak, F., Driguez, H., Svensson, B. and Aghajari, N.** (2003) The structure of barley alpha-amylase isozyme 1 reveals a novel role of domain C in substrate recognition and binding: a pair of sugar tongs. *Structure*, **11**, 973-984.

**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.

**Rodriguez-Sanoja, R., Oviedo, N. and Sanchez, S.** (2005) Microbial starch-binding domain. *Curr. Opin. Microbiol*, **8**, 260-267.

**Roldan, I., Wattebled, F., Mercedes Lucas, M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, R., Ball, S., D'Hulst, C. and Merida, A.** (2007) The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J*, **49**, 492-504.

**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 / FEBS*, **268**, 6140-6145.

**Samson, F., Brunaud, V., Duchene, S., De Oliveira, Y., Caboche, M., Lecharny, A. and Aubourg, S.** (2004) FLAGdb++: a database for the functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Nucleic acids research*, **32**, D347-350.

**Sano, Y.** (1990) The genic nature of gamete eliminator in rice. *Genetics*, **125**, 183-191.

**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**, 1111-1121.

**Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R. and Kossmann, J.** (2002) Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J*, **30**, 581-591.

**Schindler, I., Renz, A., Schmid, F. X. and Beck, E.** (2001) Activation of spinach pullulanase by reduction results in a decrease in the number of isomeric forms.

*Biochimica et biophysica acta*, **1548**, 175-186.

**Schleucher, J., Vanderveer, P. J. and Sharkey, T.D.** (1998) Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant physiology*, **118**, 1439-1445.

**Seo, B. S., Kim, S., Scott, M. P., Singletary, G. W., Wong, K. S., James, M. G. and Myers, A. M.** (2002) Functional interactions between heterologously expressed starch-branching enzymes of maize and the glycogen synthases of Brewer's yeast. *Plant physiology*, **128**, 1189-1199.

**Shannon, J. C. and Garwood, D. L.** (1984) Genetics and physiology of starch development. *Starch: Chemistry and Technology*. Academic Press, Orlando.

**Shannon, J. C., Pien, F. M., Cao, H. and Liu, K.C.** (1998) Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP--glucose into amyloplasts of maize endosperms. *Plant physiology*, **117**, 1235-1252.

**Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N.** (1983) Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell*, **35**, 225-233.

**Singh, D. G., Lomako, J., Lomako, W. M., Whelan, W. J., Meyer, H. E., Serwe, M. and Metzger, J. W.** (1995) beta-Glucosylarginine: a new protein-glucose bond in a self-glucosylating protein from sweet corn. *FEBS letters*, **376**, 61-64.

**Smith, A. M., Denyer, K. and Martin, C.R.** (1995) What Controls the Amount and Structure of Starch in Storage Organs? *Plant physiology*, **107**, 673-677.

**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.

**Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P. and Trost, P.** (2006) Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of Arabidopsis. *Plant physiology*, **141**, 840-850.

**Sprague, G.F.** (1933) Pollen Tube Establishment and the Deficiency of Waxy Seeds in Certain Maize Crosses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **19**, 838-841.

**Steup, M.** (1988) Starch degradation *In Biochemistry of Plants (Preiss, J., ed.)*, **14**,

255-296, Academic Press.

**Stitt, M., and Heldt, H. W.** (1981) Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. *Biochim. Biophys. Acta*, **638**, 1-11.

**Sumner, J. B. and Somers, G. F.** (1944) The water-soluble polysaccharides of sweet corn. *Archives of biochemistry and biophysics*, **4**, 7-9.

**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.

**Takaha, T., Yanase, M., Okada, S. and Smith, S.M.** (1993) Disproportionating enzyme (4-alpha-glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of potato. Purification, molecular cloning, and potential role in starch metabolism. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 1391-1396.

**Takaha, T., Yanase, M., Takata, H., Okada, S. and Smith, S. M.** (1998) Cyclic glucans produced by the intramolecular transglycosylation activity of potato D-enzyme on amylopectin. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 493-497.

**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., and Preiss, J.** (1993) Branching of amylose by branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydrate Research*, **240**, 253-263.

**Tanaka, Y., Minagawa, S. and Akazawa, T.** (1967) Association of enzyme proteins with starch granules in rice grains. *Starch/Stärke*, **7**, 206-212.

**Tetlow, I. J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsheer, C. G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M.K. and Emes, M.J.** (2004) Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *The Plant cell*, **16**, 694-708.

**Thorbjornsen, T., Villand, P., Kleczkowski, L. A. and Olsen, O. A.** (1996) A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*). *The Biochemical journal*, **313 (Pt 1)**, 149-154.

**Tomlinson, K., Lloyd, J. and Smith, A. M.** (1997) Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining

the structure of starch in pea leaves. *Plant J*, **11**, 31-43.

**Torija, M. J., Novo, M., Lemassu, A., Wilson, W., Roach, P. J., Francois, J. and Parrou, J. L.** (2005) Glycogen synthesis in the absence of glycogenin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, **579**, 3999-4004.

**Tsai, C. Y.** (1974) The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical genetics*, **11**, 83-96.

**Ugalde, J. E., Parodi, A. J. and Ugalde, R.A.** (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. *Theor Appl Genet*, **104**, 1-8.

**Vallee, B. L.** (1959) Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiological reviews*, **39**, 443-490.

**Vallee, B. L. and Coombs, T. L.** (1959) Complex formation of 1,10-phenanthroline with zinc ions and the zinc of alcohol dehydrogenase of horse liver. *The Journal of biological chemistry*, **234**, 2615-2620.

**van Bueren, A. L., Finn, R. and Boraston, A. B.** (2004) Alpha-glucan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules found primarily in bacterial pathogens. *Biochemistry*, **43**, 15633-15642.

**van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buleon, 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.

**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.

**Vllareal, C. P. and Juliano, B. O.** (1986) Waxy gene factor and residual protein of rice starch granules. *Starch/Stärke*, **38**, 118-119.

- Wang, S.M., Chu, B., Lue, W. L., Yu, T. S., Eimert, K. and Chen, J.** (1997) adg2-1 represents a missense mutation in the ADPG pyrophosphorylase large subunit gene of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **11**, 1121-1126.
- Wang, S. M., Lue, W. L., Yu, T. S., Long, J. H., Wang, C. N., Eimert, K. and Chen, J.** (1998) Characterization of ADG1, an *Arabidopsis* locus encoding for ADPG pyrophosphorylase small subunit, demonstrates that the presence of the small subunit is required for large subunit stability. *Plant J*, **13**, 63-70.
- Wattebled, F., Buleon, A., Bouchet, B., Ral, J.P., Lienard, L., Delvalle, D., Binderup, K., Dauvillee, 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 / FEBS*, **269**, 3810-3820.
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvalle, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S. and D'Hulst, C.** (2005) Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phyto glycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant physiology*, **138**, 184-195.
- Wattebled, F., Ral, J.P., Dauvillee, D., Myers, A. M., James, M. G., Schlichting, R., Giersch, C., Ball, S. G. 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**, 137-145.
- Weatherwax, P.** (1922) A rare carbohydrate in waxy maize. *Genetics*, **7**, 568.
- Weber, A., Servaites, J. C., Geiger, D. R., Kofler, H., Hille, D., Groner, F., Hebbeker, U. and Flugge, U. I.** (2000) Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *The Plant cell*, **12**, 787-802.
- 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.
- Whelan, W. J.** (1986) The initiation of glycogen synthesis. *Bioessays*, **5**, 136-140.
- Wu, C., Colleoni, C., Myers, A. M. and James, M.G.** (2002) Enzymatic properties and regulation of ZPU1, the maize

pullulanase-type starch debranching enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*, **406**, 21-32.

**Wu, H.C.H. and Sarko, A.** (1978) The double-helical molecular structure of crystalline B-amylose. *Carbohydrate Research*, **61**, 27.

**Yamaguchi, M., Kainuma, K., and French, D. J.** (1979) Electron microscopic observation of waxy maize starch. *Ultrastruct Res*, **69**, 249-261.

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

**Yamanouchi, H., and Nakamura, Y.** (1992) Organ Specificity of Isoforms of Starch Branching Enzyme (Q-Enzyme) in Rice. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 985 - 991.

**Yamashita, M., Matsumoto, D. and Murooka, Y.** (1997) Amino acid residues specific for the catalytic action towards  $\alpha$ -1,6-glucosidic linkages in *Klebsiella* pullulanase. *J. Ferment. Bioeng*, **84**, 283-290.

**Yao, Y., Thompson, D. B. and 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., Hausler, R. E., Hille, D., Flugge, U. I., Zeeman, S. C., Smith, A. M., Kossmann, J., 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.

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

**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  $\alpha$ -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.

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

**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. and 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.

**Zhu, Q. and Bertoft, E.** (1996) Composition and structural analysis of alpha-dextrins from potato amylopectin. *Carbohydrate research*, **288**, 155-174.

**Zhu, Q. and Bertoft, E.** (1997) Enzymatic analysis of the structure of oxidized potato starches. *International journal of biological macromolecules*, **21**, 131-135.

**Zhu, Z. P., Hylton, C. M., Rossner, U. and Smith, A. M.** (1998) Characterization of starch-debranching enzymes in pea embryos. *Plant physiology*, **118**, 581-590.

**Zobel, H. F.** (1988 a) Starch Crystal transformation and their industrial importance. *Starch/Stärke*, **40**, 1-7.

## Annexe 1

### Couples d'amorces utilisés pour la sélection des lignées mutantes

Lignées	Allèle sauvage		Allèle mutant	
	Couple utilisé	Taille de l'amplicon	Couple utilisé	Taille de l'amplicon
<i>Atisa1</i>	isa1 for1-isa1 rev1	507 bp	Lbb1-isa1 rev1	456 bp
<i>Atisa2</i>	isa2 for1-isa2 rev1	548 bp	Lbb1-isa2 rev1	687 bp
<i>Atisa3</i>	isa3 for2-isa3 rev2	474 bp	Isa3 for2-Lbb1	656 bp
<i>Atpul</i>	pu1 for2-pu1 rev3	716 bp	pu1 for2-Tag5	N/B

Tag5 : CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC

Lbb1 : GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

isa1 for1: GTGCTTTTGCTGAATGTCGTG

isa1 rev1: CTCGCTAAGTGTCCTCCTG

isa2 for1: GGAAGAAGGAGCAACGAATAAATC

isa2 rev1: AAAACCCCGGGAAAGGAAG

isa3 for2: AATGAGTCAGCGCTTTATGTATCT

isa3 rev2: CACTGGAAATTGTTAAGGGAGGTA

pu1 for2: TATTTGTTTCCCTTCCTTGTTTAG

pu1 rev3: ATCTTAGGCATGGTTTGTTATCTG

## Annexe 2

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

Gène	Allèle mutant	Position du couple d'amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Taille de l'amplicon (en pb)
<i>ISA1</i> (At2g39930)	<i>isa1-</i>	En amont	Isa1 av up: CTATAATTATTCAGGCTGTGGTAA	446
		Chevauchement	Isa1 av lo: TTACCACAGCCTGAATAATTATAG	473
			Isa1 up en1: ACGGGGCTGATGTAGAA	
			Isa1 lo en: TCTCTTCACCGAGATACTC	
		En aval	Isa1 up en1 bis: TCTAACAATTTTGCTGGACGAG	910
			Isa1 lo en1: CTCTTCACCGAGATACTCGCAA	411
	Isa1 ap up: CGGTGAAGAGACTAAGGAAACGAC			
		Isa1 ap lo: GCGAAACAAGTGTGGCTAAATGAC		
<i>ISA2</i> (At1g03310)	<i>isa2-1</i>	En amont	Ø	
		Chevauchement	Ø	
	En aval	Isa2 ex up: AAACCTGGATCCGAGACACTAATG	512	
		Isa2 ex lo: TCCGGATCTCTACCTGACACTAAC		
	<i>isa2-2</i>	En amont	Isa2 av up: GTATTGGAGAGCTTGCGTTATTGG	516
		Chevauchement	Isa2 av lo: GCGGATTTGTTTTAGCCTTCTTTG	553
En aval	Isa2 en up: GGGGAAGAAGGAGCAACGAATAA	423		
	Isa2 en lo: AGAAAAACCCCGGGAAAGGAA			
	Isa2 ap up: ATCACGCAATTTATCTCCTTCAT			
	Isa2 ap lo: ACAACTGTACGGCTTCATCTCA			
<i>ISA3</i> (At4g09020)	<i>isa3-</i>	En amont	Isa3 av up: ACTTCATTTTCGTGGCATAGACAAC	446
		Chevauchement	Isa3 av lo: GAAGATCCAGAAACCCGAGTAGC	473
			Isa3 en up: AGGCAATGGAGAAGGAGGAA	
		En aval	Isa3 en lo: AAAGTAGTCGTGGGCGTTGAATG	437
	Isa3 ap up: CAGGGAACACCAATGATGCTAAT			
	Isa3 ap lo: ACACCGGCCACACCTTCC			
<i>Pu1</i> (At5g04360)	<i>pul-</i>	En amont	Pu1 av up: TCTCCAGTCCCAATTCTCAGTTTC	411
		Chevauchement	Pu1 av lo: TGTGCACCTAGGGGACCATCATA	451
			Pu1 en up: GGTCCCCTAGGTGCACATTTTACA	
En aval	Pu1 en lo: CCACGATTTTCAGGCTCAACAGTC	363		
	Pu1 ap up: AGGATGGGACAACCTTAGCAGA			
	Pu1 ap lo: TACCCCCAGTTATAGCCATCA			

## Annexe 3

Liste des 33 gènes qui ont retenu notre intérêt dans le projet Génoplande Af2001030.

<sup>a</sup> Les noms donnés sont assignés de telle manière à constituer une terminologie simple et significative pour chaque gène impliqué dans l'étude.

Nom du gène dans ce projet <sup>a</sup>	Autre nom du gène <sup>a</sup>	Numéro de gène nomenclature ACI	Fonction probable	Numéro d'accèsion 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	$\alpha$ -amylase	AC009978	17825-20092	I	11
<i>AtAAM2</i>		At4g25000	$\alpha$ -amylase	AL161562	128132-126416	IV	5
<i>AtAAM3</i>		At1g69830	$\alpha$ -amylase	AC010675	60344-64829	I	11
<i>AtBAM1</i>	<i>AT-<math>\beta</math>-AMY</i>	At4g15210	$\beta$ -amylase	AL161540	179882-177259	IV	7
<i>AtBAM2</i>		At2g32290	$\beta$ -amylase	AC005700	33282-31320	II	6
<i>AtBAM3</i>		At3g23920	$\beta$ -amylase	AP001297	44566-47043	III	4
<i>AtBAM4</i>		At2g45880	$\beta$ -amylase	AC004665	59299-56240	II	9
<i>AtBAM5</i>		At5g45300	$\beta$ -amylase	AB020744	35094-38154	V	10
<i>AtBAM6</i>		At5g55700	$\beta$ -amylase	AB009050	43455-46284	V	10
<i>AtBAM7</i>		At4g00490	$\beta$ -amylase	AL161472	29109-31549	IV	8
<i>AtBAM8</i>	<i>Ct-BMY</i>	At4g17090	$\beta$ -amylase	AL161545	155788-153954	IV	4
<i>AtBAM9<sup>b</sup></i>	<i>BMY3</i>	At5g18670	$\beta$ -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