

Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT
Ecole doctorale Biologie Santé

Présentée par

Aline DEVIN

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

**Etablissement de l'implication des α - et β -
amylases et des α -glucanes phosphorylases
au cours de la dégradation de l'amidon dans
la feuille d'*Arabidopsis thaliana*.**

Présentée le 17 Décembre 2010 devant la commission d'examen :

| | |
|-----------------------------|---|
| Président : | Dr Jean-Claude MICHALSKI |
| Rapporteurs : | Dr Denis FALCONET Dr Jean-Pierre RENOU |
| Examineurs : | Dr Cécile RAYNAUD |
| Directeur de thèse : | Pr Christophe D'HULST |
| Co-directeur : | Dr David DAUVILLEE |

RESUME

Différentes classes d'enzymes hydrolytiques (α - et β -amylases) et phosphorolytiques (amidon-phosphorylases) des α -glucanes sont impliquées dans le métabolisme de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. Pas moins de 9 β -amylases, 3 α -amylases et 2 glucane-phosphorylases ont été répertoriées dans le génome de cette plante à partir d'analyses bioinformatiques. Afin de leur attribuer une fonction précise, une étude phénotypique complète de lignées mutantes pour les formes plastidiales de ces enzymes a été menée au cours de ce travail.

Chaque isoforme d'amylase étudiée a également été croisée avec un double mutant d'enzymes de branchement, *be2- be3-*. Ce mutant, totalement dépourvu d'amidon, accumule du maltose de manière tout à fait inhabituelle. Afin de préciser l'implication de chaque forme d'amylase pour la production de ce maltose, le contenu en maltose des triples mutants a été analysé et comparé à celui du mutant *be2- be3-*. Nos résultats, notamment la cinétique d'accumulation d'amidon, nous permettent de conforter l'hypothèse d'une fonction de régulation de la β -amylase BAM4. Les perturbations observées dans les mutants dépourvus de BAM1 et BAM8 nous montrent l'importance de ces enzymes dans le métabolisme du polysaccharide mais ne nous permettent pas de connaître leur fonction propre. Enfin, les résultats obtenus avec le mutant *aam3-* ne nous permettent pas d'inclure cette enzyme dans le métabolisme de l'amidon et ne nous révèlent rien de sa fonction.

L'analyse de l' α -glucane phosphorylase plastidiale PHS1 a été couplée à celle du mutant *ss4-* (une forme d'amidon synthétase soluble) et du double mutant *ss4- phs1-*. En effet, on observe au sein de ce double mutant des grains d'une taille 4 à 5 fois supérieure à ceux de la souche sauvage ainsi qu'une très forte augmentation de la quantité d'amidon. Les résultats obtenus nous indiquent que PHS1 est impliquée dans la dégradation du polysaccharide. L'analyse des paramètres cinétiques de la protéine PHS1 recombinante nous montre qu'elle est similaire à ses homologues des plantes supérieures. L'ensemble des résultats nous permet d'impliquer PHS1 dans la dégradation de l'amidon, n'attaquant pas directement le grain natif mais pouvant être active après l'action d'une ou plusieurs autres enzymes cataboliques.

ABSTRACT

Different classes of α -glucans hydrolytic (α - and β -amylases) and phosphorolytic enzymes are implicated in starch metabolism in *Arabidopsis thaliana* leaves. At least, 9 β -amylases, 3 α -amylases and 2 α -glucan phosphorylases are listed in this plant genome. In order to allocate them a precise function, a complete phenotypic study of mutant lines for plastidial forms of these enzymes was investigated.

Each isoform of amylase studied was crossed with a double mutant of branching enzymes, *be2- be3-*. This mutant, free of starch, is accumulating maltose which is unusual in this plant. In order to specify the implication of each form of amylase for the production of maltose in the *be2- be3-* mutant, maltose content of the triple mutants was analyzed and compared to that of *be2- be3-*. Our results, especially starch accumulation's kinetic, allow us to strengthen the hypothesis of a regulating function of β -amylase BAM4. Alterations observed in mutants lacking BAM1 and BAM8 show us importance of these enzymes in the polysaccharide metabolism but don't allow us to know their own function. Finally, results obtained from analysis of *aam3-* mutant don't allow us to include this enzyme in starch metabolism and don't reveal anything about its function.

Analysis of plastidial α -glucan phosphorylase PHS1 was coupled with that of the mutant *ss4-* (a form of soluble starch synthase) and the double mutant *ss4- phs1-*. In fact, in this double mutant we observed starch granules 4 to 5 fold bigger than those of the wild-type strain and a strong increase of starch content. Results obtained show that PHS1 is implicated in the polysaccharide degradation. Analysis of kinetic parameters of the PHS1 recombinant protein shows us that it is similar to phosphorylases of land plants. All these results allow us to implicate PHS1 in starch degradation, don't breaking native granule directly, but being able to be active after the action of one or several other catabolic enzymes.

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 souhaite remercier en premier lieu le Dr Jean-Claude Michalski, directeur de l'unité, de m'avoir permis d'intégrer le C9 et d'avoir accepté de présider cette commission d'examen.

Je remercie les Drs Denis Falconet et Jean-Pierre Renou d'avoir accepté de faire partie de mon jury en qualité de rapporteurs et pour le travail que cela implique.

Je remercie le Dr Cécile Raynaud pour sa présence au sein de cette commission en tant qu'examinatrice.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Pr Christophe D'Hulst, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et permis de réaliser cette thèse. Merci pour le temps que tu m'as consacré et pour m'avoir accompagnée durant ces 4 années.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr David Dauvillée. Tu as toujours été d'une grande aide et j'ai toujours pu compter sur toi depuis le Master Recherche. Je regretterai nos pauses cigarette, mes surnoms et nos discussions pas toujours scientifiques mais tellement drôles.

Merci également aux membres de l'équipe, passés et présents, bien sûr pour l'aide apportée mais aussi pour la bonne ambiance : Fabrice, Nico, Maria-Cécilia (olé !). Un merci particulier à Xavier qui, tel Zorro, est arrivé (sans se presser) dans la dernière année de ma thèse pour m'apporter toute l'aide dont j'avais besoin à ce moment là. Je ne parle pratiquement pas l'allemand et tu ne comprends pas l'humour mais ça a été pour moi une belle rencontre.

Merci également au Pr Steven Ball de m'avoir accueillie eu sein de son équipe il y a quatre ans pour effectuer mon Master Recherche et ainsi entamer mon aventure amyliacée. Je pense aussi à l'équipe du 002-005, Thierry, Coco, Cathy, Ugo, Hande et la nouvelle venue, Virginie, pour les coups de main et tous les bons moments.

Merci également à l'ensemble des membres de l'UGSF qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. Merci particulièrement aux personnes qui m'ont permis de m'initier en douceur au monde de l'enseignement. Je pense à Marie-Ange, Sophie, Agnès et Sandrine. Merci aussi à Nadège pour avoir si bien réceptionné mes colis...

Je remercie également mes collègues de rédaction, Aurélie et Coralie. Forcément, dans la même situation on se comprend et se soutient. Merci aussi à Stéphanie. Tu m'as beaucoup écouté (peut être à l'insu de ton plein gré) et soutenue ces derniers temps mais on a eu également de bons fous rires ensemble.

Un grand merci à tous mes amis, thésards ou non, qui m'ont soutenu pendant ces années, qui ont été si importants pour le moral et avec qui je partage tellement de bons moments. Merci à Marion et Fabien, Vivi et Thomas, Anne-France et les anciens de Licence, Aurore, Florence, Sylvain et vos moitiés respectives.

Merci à Aurélie, ma Louloute, d'être toujours à mon écoute. Même si on ne se voit pas souvent (gnagnagna !) tu es toujours là, tu m'aides et tu me fais beaucoup rire et avancer.

Charlotte, tu m'as fait beaucoup avancer, au niveau de la thèse et au niveau personnel (si, si !). Merci pour l'aide au labo et pendant la rédaction mais aussi la solidarité féminine face à David. Ton pragmatisme m'a toujours été d'un grand secours et l'« éloignement » n'entame pas mon amitié. Merci d'être toujours là, à l'écoute.

Gilles, mon Bibi, nous nous suivons depuis la Licence, il y a fort longtemps. Tu m'as beaucoup supporté mais surtout aidé. Nous nous comprenons et nous avons partagé tellement de choses ensemble. Je ne pense pas en rajouter en te disant que je te considère comme mon frère... Toi aussi tu es « loin » mais ça ne change rien entre nous. Merci pour tout.

Enfin, un grand merci à ma famille. Tout particulièrement mes parents et ma tante, qui par leur aide et leur soutien m'ont permis d'en arriver là où je suis. Merci à vous d'être toujours là quand il faut.

Merci également à Ludovic et Maxime de n'avoir pas fait d'études pour que je puisse en faire... ;-)

ABREVIATIONS

| | |
|---------------|--|
| 3PGA : | 3-phosphoglycérate |
| AAM ou AMY : | α -amylase |
| ADNc : | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ADN-T : | ADN de transfert |
| ADP : | Adénosine diphosphate |
| ADP-glucose : | Adénosine diphospho-glucose |
| AGPase : | ADP-glucose pyrophosphorylase |
| Am : | Amylose |
| Ap : | Amylopectine |
| APTS : | Acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique |
| ARN : | Acide ribonucléique |
| ATP : | Adénosine triphosphate |
| BAM: | β -amylase |
| BSA : | Bovine serum albumin |
| CAZy : | Carbohydate active enzyme |
| CL-2B : | Cross-linked 2B |
| Col : | Columbia |
| CTAB : | Cetyltrimethylammonium bromide |
| DMSO : | Dimethyl sulfoxide |
| DNS : | Acide-3,5-dinitrosalicylique |
| dNTP : | Un des quatre désoxyribonucléotide |
| DO : | Densité optique |
| DP : | Degré de polymérisation |
| DPE : | Disproportionating enzyme |
| DTT : | Dithiothréitol |
| EDTA : | Ethylène diamine tetra-acétate |
| ET : | Ecart-type |
| EST : | Expressed sequence tag |
| FACE : | Fluorophore-assisted capillary electrophoresis |
| FJ : | Fin de jour |
| FN : | Fin de nuit |
| FPLC : | Fast Protein Liquid Chromatography |

| | |
|--------------------|--|
| Fru6P : | Fructose-6-phosphate |
| FST : | Flanking sequence tag |
| GBSS : | Amidon-synthétase liée au grain |
| GH : | Glycoside hydrolases |
| Glc : | Glucose |
| Glc1P : | Glucose-1-phosphate |
| Glc6P : | Glucose-6-phosphate |
| GT: | Glycosyltransférase |
| GWD : | Glucan water dikinase |
| HPAEC-PAD : | Hight performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection |
| ISA : | Isoamylase |
| kDa : | Kilo dalton |
| Ki : | Constante d'inhibition |
| Km : | Constante de Michaelis |
| λ_{\max} : | Longueur d'onde au maximum d'absorbance |
| LDA : | Limit-dextrinase (pullulanase) |
| MES : | Acide-2-(N-Morpholino)-éthanesulfonique |
| MEX : | Maltose exporter |
| MOS : | Malto-oligosaccharides |
| MOPS : | 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid |
| NADP : | Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate |
| pb : | Paires de bases |
| PCR : | Réaction de polymérisation en chaîne |
| PGI : | Phospho-glucose isomérase |
| PGM : | Phosphoglucomutase |
| pH : | Le potentiel hydrogène |
| PHS : | Phosphorylase |
| Pi : | Phosphate inorganique, orthophosphate |
| PPi : | Pyrophosphate inorganique |
| PVP : | Polyvinylpyrrolidone |
| PU : | Pullulanase |
| PWD : | Phosphoglucan water dikinase |
| SBE ou BE : | Starch branching enzyme |

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| SDS : | Sodium dodécyl sulfate |
| SEM : | Microscopie électronique à balayage |
| SEX : | Starch excess |
| SS : | Amidon synthétase soluble |
| THF : | Tetrahydrofuran |
| Tris : | Tris(hydroxyméthyl)aminomethane |
| UDP : | Uridine diphosphate |
| UDP-glucose: | Uridine diphospho-glucose |
| UTP : | Uridine triphosphate |
| Vmax : | Vitesse maximale |
| WS : | Wassilewskija |
| WSG : | Water soluble glucanes |
| WSP : | Water soluble polysaccharides |

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| RESUMES | 2 |
| REMERCIEMENTS | 3 |
| ABREVIATIONS | 5 |
| SOMMAIRE | 8 |
| GENERALITES | 11 |
| A. Structure des polysaccharides de réserve | 13 |
| a. L'amylopectine..... | 14 |
| b. L'amylose | 16 |
| c. Le grain d'amidon..... | 16 |
| B. La synthèse de l'amidon | 18 |
| a. La synthèse du glycosyl-nucléotide précurseur..... | 19 |
| b. L'étape d'initiation..... | 21 |
| c. L'élongation des glucanes..... | 23 |
| 1. La GBSSI..... | 23 |
| 2. La SS1 | 25 |
| 3. La SS2..... | 25 |
| 4. La SS3..... | 26 |
| 5. Les SS4 et SS5 | 27 |
| d. La ramification des chaînes | 27 |
| e. Les autres fonctions nécessaires..... | 29 |
| 1. Les isoamylases..... | 29 |
| 2. La pullulanase | 30 |
| 3. Le rôle de l'enzyme disproportionnante | 30 |
| C. La dégradation de l'amidon | 31 |
| a. Phosphorylation du grain | 32 |
| b. La voie hydrolytique | 33 |
| 1. Les α -amylases..... | 33 |
| 1.1. La super famille des α -amylases | 33 |
| 1.2. Rôle des α -amylases dans la feuille d'Arabidopsis | 35 |
| 2. Les β -amylases | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Classification, structure et mode d'action | 37 |
| 2.2. Rôle des β -amylases dans la feuille d' <i>Arabidopsis</i> | 38 |
| c. La voie phosphorolytique | 40 |
| 1. Classification, structure et mode d'action | 40 |
| 2. Rôle chez les plantes..... | 42 |
| 2.1. L'isoforme plastidiale | 42 |
| 2.2. L'isoforme cytosolique Pho2 | 44 |
| d. Devenir des produits de dégradation | 44 |
| D. Le modèle biologique : <i>Arabidopsis thaliana</i>..... | 45 |
| E. Objectif de la thèse | 48 |
| <i>RESULTATS</i> | 49 |
| A. Etude des β-amylases plastidiales | 50 |
| a. Etude des simples mutants..... | 50 |
| b. Etude des triples mutants..... | 56 |
| B. Etude de l'α-amylase plastidiale AAM3..... | 60 |
| C. Etude de la phosphorylase plastidiale PHS1 | 66 |
| a. Phenotypic characterization of mutants..... | 66 |
| b. Enzymological characterization | 68 |
| c. Structural analysis of starch | 71 |
| d. Enzymatic characterization of PHS1 | 72 |
| <i>DISCUSSION</i>..... | 76 |
| <i>MATERIEL ET METHODES</i>..... | 83 |
| A. Matériel..... | 84 |
| a. Produits | 84 |
| b. Les lignées d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et les conditions de culture..... | 84 |
| B. Méthodes | 84 |
| a. Croisements | 84 |
| b. Biologie moléculaire | 85 |
| 1. Extraction d'ADN génomique | 85 |
| 2. Sélection des lignées mutantes par PCR..... | 85 |
| 3. Clonage de l'ADNc et expression de l' α -glucanes phosphorylase plastidiale chez <i>E. coli</i> | 86 |
| 3.1. Souches d' <i>E. coli</i> | 86 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Plasmide..... | 86 |
| 3.3. Milieu de croissance bactérien..... | 86 |
| 3.4. Clonage de l'ADNc..... | 86 |
| 3.5. Expression de la protéine recombinante..... | 87 |
| c. Techniques biochimiques..... | 87 |
| 1. Test à l'iode..... | 87 |
| 2. Extraction et dosage de l'amidon..... | 87 |
| 3. Extraction et dosage des polysaccharides solubles..... | 88 |
| 4. Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique..... | 88 |
| 5. Analyse de la distribution de longueur de chaînes des polysaccharides par HPAEC-PAD ou par FACE..... | 89 |
| 6. Chromatographie sur couche mince..... | 89 |
| 7. Microscopie électronique à transmission..... | 89 |
| 8. Mesure de diffraction aux rayons X..... | 90 |
| 9. Purification de la protéine recombinante PHS1..... | 90 |
| d. Techniques enzymologiques..... | 90 |
| 1. Extraction des protéines des feuilles..... | 90 |
| 2. Dosage des protéines..... | 90 |
| 3. Les gels d'activité de type zymogramme..... | 91 |
| 3.1. Zymogramme des activités modifiant l'amidon..... | 91 |
| 3.2. Zymogramme des activités amidon-synthétases..... | 91 |
| 3.3. Zymogramme des activités amidon phosphorylases..... | 91 |
| 3.4. Zymogramme des activités hydrolytiques..... | 92 |
| 4. SDS-PAGE..... | 92 |
| 5. Dosage des activités enzymatiques <i>in vitro</i> | 92 |
| 5.1. Dosage des activités amidons phosphorylases..... | 92 |
| 5.2. Dosage de l'activité pullulanase..... | 93 |
| 5.3. Dosage de l'activité α -amylase..... | 93 |
| 5.4. Dosage de l'activité β -amylase..... | 93 |
| 5.5. Dosage des activités D-enzyme et maltase..... | 94 |

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....95

ANNEXES..... 113

Généralités

La quasi-totalité des réserves glucidiques du règne vivant sont constituées par l'amidon et le glycogène. L'amidon correspond au polysaccharide de réserve des végétaux. Il est retrouvé sous la forme de grain insoluble dans le plaste des cellules. Sa production étant aisée et ses propriétés facilement modifiables, par des techniques enzymatiques ou chimiques, l'industrie de l'amidon ne cesse de se développer et d'utiliser ce polymère et ses dérivés dans les domaines les plus variés.

La production d'amidon est principalement réalisée à partir du maïs, du blé ou de la pomme de terre. Il est également produit à partir du manioc et même plus récemment du pois. Les amidons natifs sont utilisés directement mais il est souvent nécessaire d'améliorer les « performances » de l'amidon pour répondre aux demandes des industriels. Ainsi des amidons modifiés ont été développés, et ceux-ci sont utilisés dans la majorité des applications. Plus de 50% de la production d'amidon est utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, tout d'abord pour ses valeurs nutritives et énergétiques, propres aux glucides, mais également pour ses propriétés épaississantes, gélifiantes ou encore comme stabilisant. Les dérivés de l'amidon, quant à eux, visent à améliorer la conservation des aliments, leur stabilité et leur aspect, mais aussi à faciliter leur préparation. Dans cette industrie, les domaines d'applications sont entre autres la confiserie, la boulangerie et l'alimentation pour animaux. Dans les industries non alimentaires ses utilisations sont également très diverses, le plus gros marché étant la papèterie. L'amidon est aussi utilisé dans l'industrie du textile, de la pharmacie, du bâtiment ou dans les adhésifs par exemple. Ce polymère trouve aussi sa place dans la protection de l'environnement avec le développement de nombreux produits biodégradables à base d'amidon tels que les films ou feuilles plastiques. Par ailleurs, l'amidon est utilisé dans la fabrication de bioéthanol qui peut représenter une alternative à l'utilisation du pétrole (www.fao.org ; www.blogagroalimentaire.com ; www.usipa.fr).

Ainsi, la connaissance des voies de biosynthèse de l'amidon et la maîtrise de ses propriétés physico-chimiques sont capitales afin de créer et d'améliorer les produits et procédés, tout en augmentant la rentabilité. Un grand nombre d'enzymes est nécessaire à l'élaboration du grain d'amidon, une grande partie d'entre elles ont été étudiées et sont maintenant bien caractérisées. Cependant, cette élaboration est complexe et n'est pas totalement maîtrisée à ce jour.

A. Structure des polysaccharides de réserve

La composition de l'amidon et du glycogène est la même. Ce sont deux polymères de D-glucose liés par des liaisons α -1,4 et ramifiés par des liaisons α -1,6 aux points dits « de branchement » (Figure 1). Bien que cette structure primaire soit identique, ces deux polymères possèdent des caractéristiques et donc des propriétés physico-chimiques divergentes.

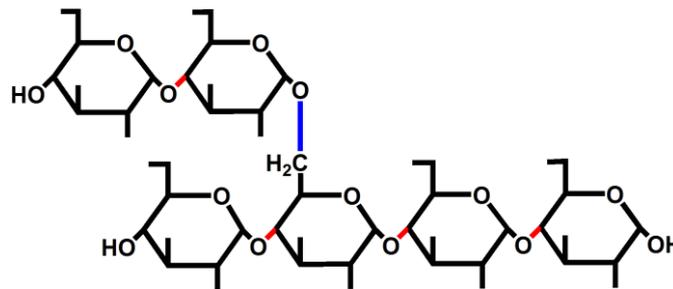


Figure 1 : Formule semi-développée d'un α -1,4 glucane ramifié une fois en α -1,6.

Les liaisons α -1,4 sont représentées en rouge et la liaison α -1,6 en bleu.

Ainsi, le glycogène est synthétisé sous la forme de grains hydrosolubles et possède une structure qualifiée d'« amorphe ». Cette caractéristique est une conséquence directe de la répartition homogène des ramifications, qui représentent 8 à 10% des liaisons observées dans le glycogène. Cette organisation entraîne également un encombrement stérique à la surface du polymère, ce qui empêche les enzymes d'accéder aux chaînes glucidiques (Figure 2), et limite la taille de la particule à 50 nm au maximum (Melendez et coll., 1999).

L'amidon, quant à lui, possède une organisation plus complexe. Ce polysaccharide insoluble dans l'eau présente un aspect semi-cristallin. Selon sa localisation, on trouve deux types d'amidon : on parlera d'amidon transitoire lorsqu'il est synthétisé dans les chloroplastes des organismes photosynthétiques, ou dans le cytoplasme des algues rouges (on l'appelle alors amidon floridéen). S'il est synthétisé dans les amyloplastes des organes de réserve, comme les tubercules de pomme de terre ou l'albumen de céréales, on parlera d'amidon de réserve. Deux sous-fractions peuvent être différenciées dans l'amidon en fonction de leurs structures, fortement conditionnées par leurs contenus en points de branchement, et de leur masse moléculaire : l'amylopectine et l'amylose.

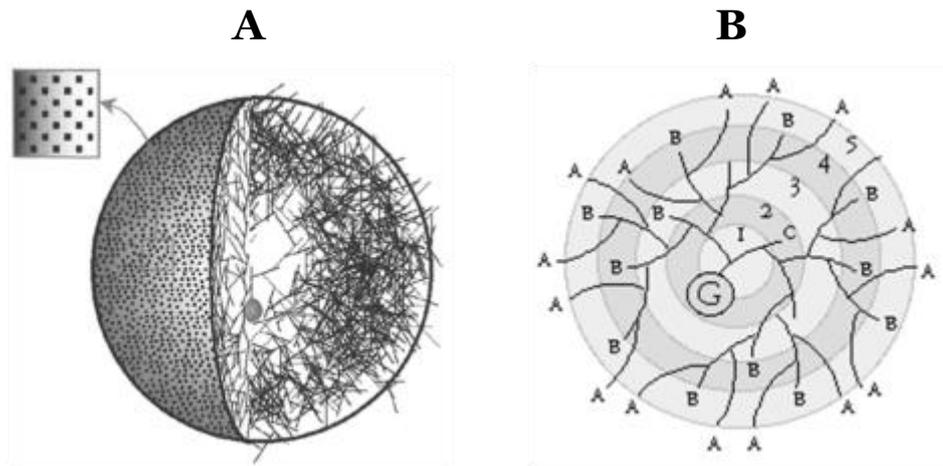


Figure 2 : Représentation schématique d'une molécule de glycogène et organisation des chaînes de glucose au sein de la molécule (d'après Meléndez et al. 1999). (A) Schéma réalisé à l'aide d'un modèle mathématique. L'organisation de la molécule entraîne un fort encombrement stérique et limite la taille de celle-ci. (B) Schéma représentant les premières couches de la particule de glycogène. Les chaînes sont toutes de même longueur moyenne et portent toutes en moyenne deux points de branchement.

a. L'amylopectine

L'amylopectine constitue la fraction majoritaire de l'amidon, puisqu'elle représente 70 à 80% du poids sec du grain : elle présente un degré de polymérisation de 10^5 à 10^6 résidus de glucose, liés en α -1,4, et une longueur moyenne de chaînes de 15 à 20 glucoses. L'amylopectine contient 5 à 6% de points de branchement répartis de façon asymétrique, contrairement à ceux du glycogène qui sont répartis de façon homogène. Ainsi, au sein de l'amidon, les points de branchement sont concentrés dans certaines régions, appelées lamelles amorphes. Les chaînes linéaires, elles, s'organisent en doubles hélices au sein de la lamelle cristalline. C'est cette répartition asymétrique qui confère à l'amidon sa structure en grappe (Robin et al., 1974 ; French 1972) et qui va engendrer le caractère semi-cristallin du grain. Une grappe est donc constituée d'une lamelle cristalline et une lamelle amorphe et mesure 9 nm quelle que soit l'espèce végétale considérée (Figure 3D).

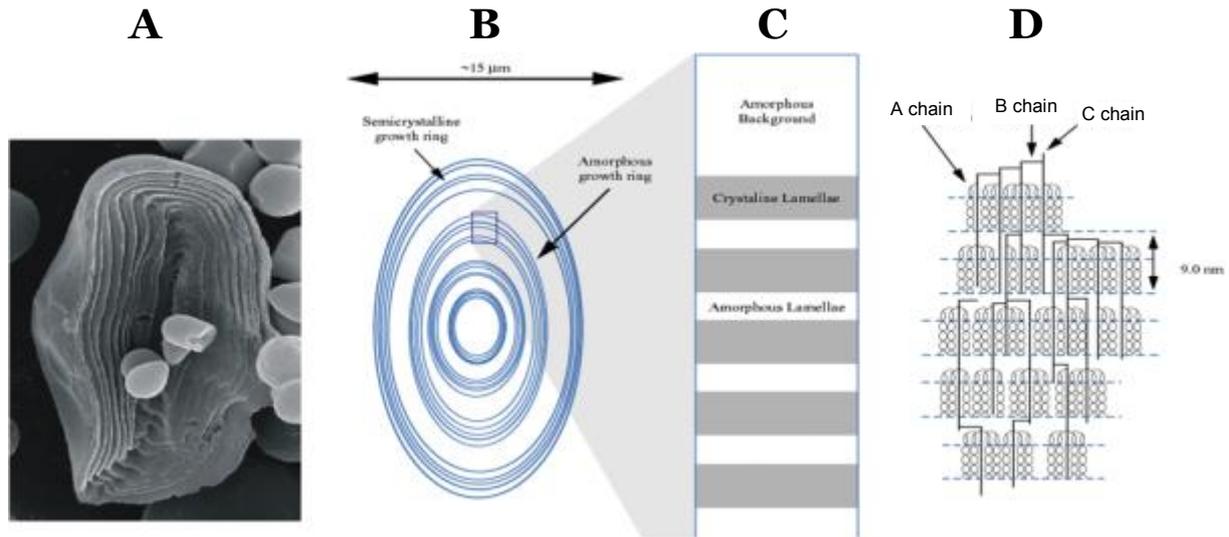


Figure 3 : Observation en microscopie électronique à balayage d'un grain d'amidon et représentations schématiques des différents niveaux d'organisation des chaînes de glucose de l'amylopectine au sein du grain d'amidon (d'après Ball et Morell, 2003). (A) L'hydrolyse acide ménagée d'un fragment de grain d'amidon met en évidence l'alternance de zones résistantes (régions semi-cristallines) et sensibles (régions amorphes). Les zones résistantes deviennent visibles en microscopie électronique à balayage sous la forme d'anneaux de « croissance » concentriques. (B) L'alternance des anneaux de croissance semi-cristallins (cercles bleus) et amorphes est représentée de manière schématique sur une section de $\sim 15\mu\text{m}$ d'un grain d'amidon. (C) L'agrandissement d'une région semi-cristalline montre une alternance de lamelles cristallines (rectangles gris) et amorphes (rectangles blancs). (D) Les lignes pointillées délimitent les régions cristallines et les régions amorphes des structures en grappe. Les doubles hélices de glucanes formées de 18 résidus de glucose sont responsables de la cristallinité de l'amylopectine. Elles sont séparées par les régions amorphes contenant les points de branchement. Il est remarquable de constater que la taille d'une grappe (région cristalline et amorphe) mesure 9-10 nm quelle que soit l'origine végétale de l'amidon analysé.

Les chaînes, au sein de l'amylopectine, sont classées en trois types différents (Figure 3D). On trouve tout d'abord les chaînes de type A qui sont les plus externes et les plus nombreuses. Elles sont aussi les plus courtes avec un degré de polymérisation inférieur à 16 résidus de glucose. Elles ramifient les chaînes B et s'étendent sur une seule grappe. Les chaînes B sont divisées en trois classes, selon leur longueur et le nombre de grappes successives sur lesquelles elles s'étendent. Ainsi, on trouve les chaînes B1, B2 et B3 qui s'étendent respectivement sur 1, 2 et 3 grappes. Les chaînes B1 ont un DP moyen de 19 résidus de glucose et portent les chaînes A. Les chaînes B2 et B3 ont un DP moyen de 41 résidus de glucose et portent les chaînes A et B1. Enfin, la chaîne C est la seule à posséder une extrémité réductrice et il y en a donc une seule par grain (Peat et al., 1952). Ces différents types de chaînes sont retrouvés dans le profil de distribution des longueurs de chaînes constitutives de l'amylopectine qui est polymodal (Hizukuri, 1986).

b. L'amylose

L'amylose, fraction minoritaire du grain, se caractérise par un degré de polymérisation faible de 100 à 10000 résidus de glucose liés en α -1,4. Elle est très faiblement ramifiée avec moins de 1% de points de branchement (Buléon et al., 1998). On retrouve cependant deux types de chaînes dans l'amylose : des chaînes strictement linéaires, et des chaînes modérément ramifiées, qui représentent 25 à 55% de la molécule selon l'espèce étudiée (Takeda et al., 1987). Elles comportent 2 à 8 points de branchements par molécule, avec des chaînes de 4 à plus de 100 résidus de glucose et sont organisées en petites grappes (Hizukuri et al., 1997).

Le rôle et l'agencement de l'amylose au sein du grain d'amidon demeurent sujets à débat puisque l'amidon de mutants accumulant uniquement de l'amylopectine conserve son caractère semi-cristallin. En conséquence, cette propriété physico-chimique du polysaccharide ne provient que de la structure en grappes de l'amylopectine.

c. Le grain d'amidon

L'amidon est donc synthétisé sous forme de grains insolubles dont la taille varie de 1 à 100 μm de diamètre selon l'origine végétale. On trouve généralement au sein d'un organisme des grains de taille similaire, cependant certaines espèces comme le blé, le maïs ou l'orge présentent deux populations de grains de tailles différentes : les grains de type « A » sont les plus grands avec un diamètre de 15 à 30 μm et les grains de type « B » ont un diamètre de 2 à 3 μm . Le grain présente également des formes très variées selon l'espèce, pouvant être sphérique, ovale ou encore en forme de disque (Buléon et al., 1998).

Les macromolécules au sein du grain, sont orientées de façon perpendiculaire au centre du grain, le hile, et à la surface du grain. Ceci est révélé par l'apparition d'une croix noire de biréfringence caractéristique et centrée sur le hile, lors de l'observation de grains à la lumière polarisée (Figure 4).

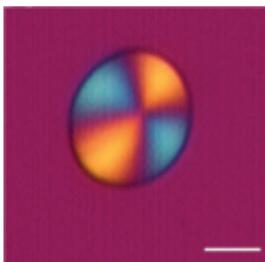


Figure 4 : Grain d'amidon de tubercule de pomme de terre observé en lumière polarisée. (d'après Zeeman et al., 2002). La croix de biréfringence bleue et orange révèle une organisation radiale des molécules dans le grain. La barre représente 5 μm .

Une hydrolyse acide ménagée du grain d'amidon laisse apparaître en microscopie électronique une alternance de zones denses et moins denses aux électrons (Yamaguchi et al., 1979) (Figure 3A). Ce sont les anneaux de croissance, qui s'étendent de façon concentrique du hile, vers la surface du grain. Les zones plus résistantes à l'hydrolyse sont les zones cristallines, alors que les zones amorphes sont moins résistantes. L'analyse des régions cristallines montre que celles-ci sont constituées par l'alternance des lamelles amorphes et cristallines résultant de l'organisation des chaînes d'amylopectine (Figure 3B, C et D).

Le taux de cristallinité du grain d'amidon varie de 15 à 45% (Zobel, 1988). Ce taux est dépendant de l'origine du grain mais également de la quantité d'eau dans celui-ci ou encore de la méthode utilisée pour l'analyse (Buléon et al., 1998). Cette cristallinité, qui dépend de l'agencement des doubles hélices de l'amylopectine est généralement déterminée par diffraction aux rayons X et peut être de différents types. Ainsi, on retrouve l'amidon de type A chez les céréales et le type B chez les tubercules, les amidons riches en amylose ou encore chez *Arabidopsis thaliana*. L'amidon de type B est plus lâche et plus hydraté que le type A (Imberty et al., 1988 ; Imberty et Pérez, 1989) (Figure 5). Il existe également un amidon de type C, qui est un mélange entre les types A et B et que l'on trouve chez les légumineuses (Gallant et al., 1997). Enfin, le type cristallin V, résulte de la formation de simples hélices entre l'amylose et d'autres composés comme les lipides mais ces structures sont rarement retrouvées au sein de l'amidon natif.

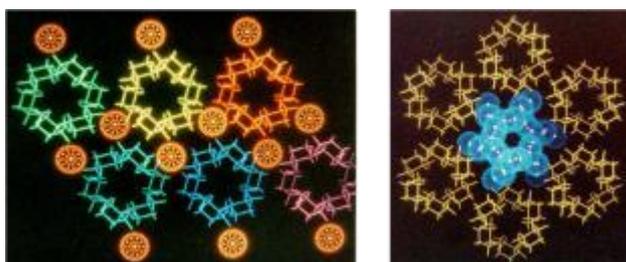


Figure 5 : Représentations en coupe transversale des mailles cristallines de type A (à gauche) et B (à droite) usuellement retrouvées au sein des grappes de l'amylopectine d'après Imberty et al., (1988) et Imberty et Perez (1989). Les sphères oranges (à gauche) et bleues (à droite) schématisent les molécules d'eau au sein des structures.

L'arrangement au sein du grain se ferait selon le modèle des « blocklets » (Figure 6). Ce concept est né de l'observation de grains d'amidon en microscopie électronique et en microscopie de force atomique par Gallant et al. en 1997, à la surface desquels apparaissaient des protubérances. Dans ce modèle, les lamelles cristallines et amorphes de l'amylopectine seraient organisées en structures plus ou

moins sphériques, les « blocklets », dont la taille varie entre 20 et 500 nm de diamètre selon l'amidon étudié et influence la cristallinité. Les régions semi-cristallines sont constituées de gros blocklets et sont plus résistantes à l'hydrolyse alors que les petits blocklets sont retrouvés dans les régions amorphes, plus sensibles. L'agencement réel de l'amylose dans le grain n'est pas encore connu mais l'hypothèse la plus largement acceptée est que l'amylose se répartit autour de l'amylopectine. D'après leurs études sur le pois, Ridout et al. (2003) ont suggéré que l'amylose forme un maillage autour des molécules d'amylopectine et stabilise la répartition des blocklets.

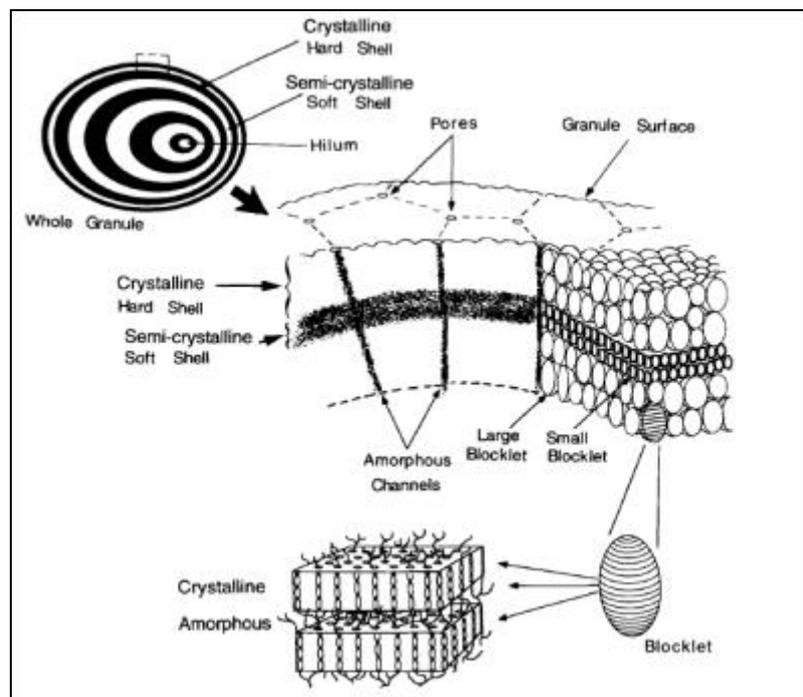


Figure 6 : Représentation schématique du modèle d'organisation des structures cristallines de l'amylopectine présentée par Gallant et coll. (1997). Les « blocklets » d'une taille variant de 20 à 500 nm sont plus grands dans les zones cristallines du grain (celles résistantes à une hydrolyse ménagée) alors que leur taille est réduite dans les zones semi-cristallines.

B. La synthèse de l'amidon

Comme nous l'avons vu précédemment, l'amidon et le glycogène possèdent une structure primaire identique mais des propriétés physico-chimiques différentes. 3 étapes majeures communes permettent de tracer un schéma métabolique global simplifié de la biosynthèse de ces polysaccharides.

En premier lieu, le glycosyl-nucléotide précurseur, l'ADP-glucose ou l'UDP-glucose selon l'organisme, est synthétisé à partir de glucose-1-phosphate et d'ATP ou d'UTP :



Ces glycosyl-nucléotides représentent les substrats uniques permettant d'allonger un glucane préexistant selon la réaction suivante :



Enfin, l'introduction des liaisons $\alpha\text{-1,6}$ s'effectue par le clivage d'une liaison $\alpha\text{-1,4}$ d'un glucane suivi du transfert du fragment obtenu en position $\alpha\text{-1,6}$ sur une chaîne « acceptrice ». Ce transfert peut être intra- ou intermoléculaire :



Cependant, la complexité de la structure de l'amidon nécessite au moins une étape supplémentaire. De plus, certaines étapes sont catalysées par plusieurs isoformes enzymatiques possédant la même activité catalytique et cette multiplicité ne semble pas dépendre de la complexité du génome de l'organisme puisqu'elle est retrouvée de la micro-algue *Ostreococcus tauri* jusqu'aux plantes supérieures (Ral et al., 2004).

Dans ce chapitre, nous allons donc présenter les connaissances actuelles sur la biosynthèse de l'amidon chez les plantes (Figure 7).

a. La synthèse du glycosyl-nucléotide précurseur

La synthèse du glycosyl-nucléotide précurseur est catalysée chez les plantes par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase, EC 2.7.7.27). Cette enzyme se présente sous la forme d'un hétérotétramère dont les deux petites sous-unités portent l'activité catalytique et les deux grandes sous-unités, l'activité régulatrice (Sivak et Preiss, 1998). Plus récemment, on a attribué des activités catalytiques aux grandes sous-unités chez *Arabidopsis thaliana*, la pomme de terre ou encore *Ostreococcus tauri* (Ventriglia et al., 2007 ; Hwang et al., 2006 ; Kuhn et al., 2009). Une forme cytosolique de cette enzyme est présente en plus de la forme plastidiale dans l'albumen des céréales comme le maïs (Denyer et al., 1996a), le riz (Sikka et al., 2001), l'orge (Thorbjørnsen et al., 1996) ou le blé (Tetlow et al., 2003).

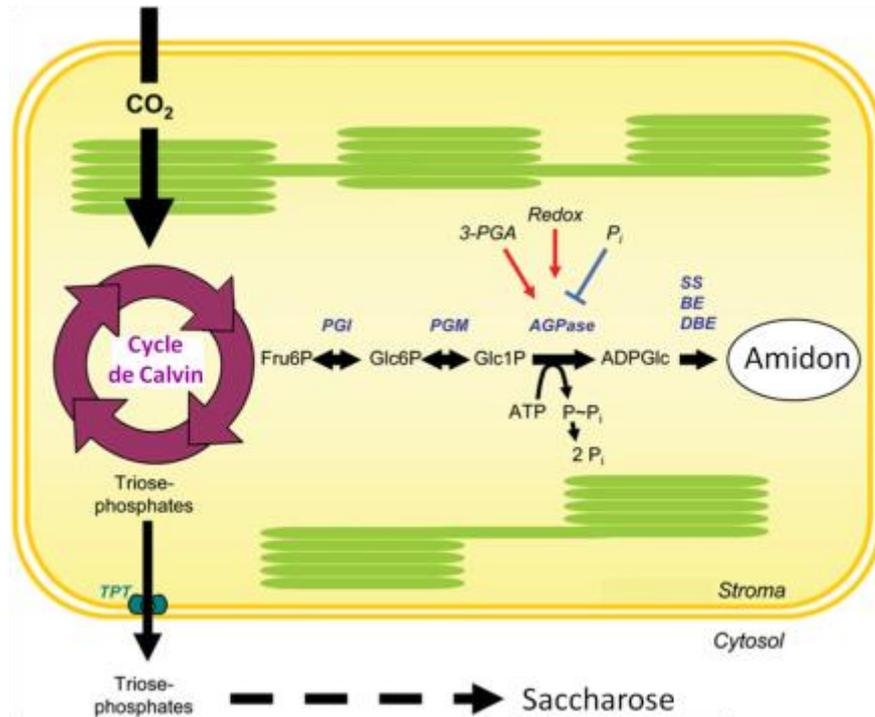


Figure 7 : Représentation de la voie de biosynthèse de l'amidon dans les tissus photosynthétiques d'après Zeeman et al (2007). Le carbone assimilé par le cycle de Calvin est en partie exporté vers le cytosol pour la synthèse du saccharose, et en partie retenu dans le chloroplaste pour la synthèse de l'amidon. PGI : phosphoglucose isomérase, PGM : phosphoglucomutase, AGPase : ADP-Glucose pyrophosphorylase, TPT : Triose phosphate/phosphate translocator, Fru6P : Fructose-6-phosphate, Glc6P : Glucose-6-phosphate, Glc1P : Glucose-1-phosphate.

Le Glc1P provient de la conversion du Glc6P par la phosphoglucomutase (PGM, EC 2.1.5.1) (Figure 7). Ce Glc6P est issu de la photosynthèse et plus particulièrement du cycle de Calvin dans les tissus photosynthétiques, ou de la conversion du saccharose dans les organes de réserve. Les mutants dépourvus de PGM étudiés chez *Arabidopsis thaliana* (Caspar et al. 1985), le tabac (Hanson et McHale, 1988), ou le pois (Harrison et al., 1998) montrent tous une baisse drastique du contenu en amidon. Toutefois, chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'absence de la PGM entraîne une chute moins sévère de la quantité d'amidon (van den Koornhuyse et al. 1996).

De nombreux mutants pour l'activité de l'AGPase, que ce soit pour la petite ou la grande sous-unité, ont été étudiés. Quel que soit l'organisme, l'absence d'activité AGPase conduit à une très forte diminution de la quantité voire à la disparition de l'amidon (Tsai et Nelson, 1966 ; Lin et al., 1988 ; Ball et al., 1991 ; van den Koornhuyse et al., 1996 ; Zabawinski et al., 2001). De manière générale, les nombreuses analyses dans les différents organismes montrent que la sur- ou sous-

expression de l'AGPase entraîne respectivement une augmentation ou une diminution proportionnelle du taux de synthèse de l'amidon. Ces résultats démontrent l'importance de cette activité dans le métabolisme de l'amidon et en font le point de contrôle.

Ainsi, cette étape est le seul point connu de régulation de ce métabolisme et l'activité de l'AGPase est contrôlée de façon très précise. Cette régulation possède tout d'abord un caractère allostérique. C'est le ratio acide-3-phosphoglycérique (l'activateur ou 3PGA)/phosphate inorganique (l'inhibiteur ou Pi) qui contrôle l'activité de l'enzyme et de ce fait, la totalité de la chaîne métabolique (Ghosh et Preiss, 1966 ; Ball et al., 1991 ; van den Koornhuyse et al., 1996). Cependant, les AGPases cytosoliques semblent moins sensibles à cette régulation (Thorbjørnsen et al., 1996 ; Sikka et al., 2001 ; Tetlow et al., 2003). L'enzyme est également contrôlée par une régulation de type redox. Ainsi, sous sa forme réduite, l'AGPase est activée, alors qu'elle est non-active sous la forme oxydée (Ballicora et al., 2000). Enfin, des travaux chez *Chlamydomonas reinhardtii* montrent que l'AGPase serait régulée par l'horloge circadienne qui modulerait le niveau d'expression des gènes de structure des sous-unités de l'enzyme (Zabawinski et al., 2001).

b. L'étape d'initiation

La synthèse d'un polysaccharide doit forcément passer par une étape d'initiation avant l'allongement des glucanes (pour revue D'Hulst et Mérida, 2010). Si dans le cas de l'amidon, cette étape n'est à ce jour pas encore totalement élucidée, elle est bien connue pour le métabolisme du glycogène chez les mammifères et les levures. Ainsi, on retrouve chez ces organismes, des protéines qui possèdent la capacité de s'autoglycosyler, les glycogénines. Ces enzymes, utilisent l'UDP-glucose et forment un court α -1,4 glucane, qui reste fixé à la protéine. Ce glucane sera ensuite utilisé comme amorce par la glycogène-synthétase qui est l'enzyme d'élongation. La mutation des deux gènes de glycogénines chez la levure, conduit à la disparition du glycogène (Cheng et al., 1995). Cependant, chez *Saccharomyces cerevisiae*, ces mutants accumulent toujours 1 à 5% de glycogène présent dans la souche sauvage. De plus, il a été montré plus récemment, qu'une petite proportion de ces souches est capable de synthétiser des taux normaux de glycogène quand la glycogène-synthétase est surexprimée ou en absence de la protéine TSP1, la tréhalose-6-phosphate

synthétase (Torija et al. 2005). Ces résultats laissent penser qu'il y aurait une voie d'initiation alternative, indépendante des glycogénines.

Chez les bactéries, aucune séquence analogue aux glycogénines n'a été identifiée à ce jour. Toutefois, la glyco-gène-synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens* est capable d'initier la synthèse d'une nouvelle molécule de glyco-gène tout en gardant sa capacité à allonger les chaînes de glucose (Ugalde et al., 2003).

Le glyco-gène et l'amidon étant des polysaccharides de la même famille, il est juste de penser que leur synthèse puisse être initiée selon le même mode. Cependant, même si des séquences analogues aux gènes des glyco-génines ont été identifiées au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana*, leur implication dans le métabolisme de l'amidon n'a pu être démontrée.

D'autres enzymes, les isoamylases (des enzymes de débranchement), joueraient quant à elles un rôle dans l'initiation. En effet, les mutants déficients pour ces enzymes chez l'orge, le riz ou la pomme de terre accumulent un plus grand nombre de grains qui sont de plus petite taille que ceux des souches sauvages (Burton et al., 2002 ; Kawagoe et al., 2005 ; Bustos et al., 2004). Les isoamylases agiraient sur l'initiation soit en dégradant des α -glucanes solubles, limitant ainsi les phénomènes de nucléation, soit en clivant l'amorce spécifique pour l'initiation du granule (Bustos et al., 2004). Cependant, la réduction de taille des grains d'amidon pourrait être due au fait que la machinerie de biosynthèse ne puisse pas contrebalancer l'absence de ces enzymes et ne synthétiserait pas l'amidon de façon correcte. De plus, ces mutants accumulent de grandes quantités de phyto-glyco-gène, un polysaccharide soluble. Ce polysaccharide pourrait être un bon substrat qui permettrait la formation de nombreux petits grains au sein de ces mutants (D'Hulst et Mérida, 2010).

Enfin, des travaux récents sur les amidon-synthétases solubles d'*Arabidopsis* permettent de suggérer l'implication de deux d'entre elles dans l'étape d'initiation. Ainsi, Roldán et al. (2007) ont observé chez le mutant dépourvu de la synthétase soluble de classe 4 (SS4) une augmentation de la taille des grains d'amidon s'accompagnant d'une diminution de leur nombre. De plus, le hile de ces grains présente une structure anormale avec la présence de régions moins denses aux électrons. Les auteurs en conclurent que la SS4 est nécessaire pour la nucléation et la genèse d'un nouveau grain. Cependant, cette enzyme ne doit pas être la seule à avoir

cette capacité puisque ces plantes contiennent toujours de l'amidon. L'étude de mutants dépourvus de plusieurs amidon-synthétases solubles apporte de nouvelles réponses (Szydlowski et al., 2009). En effet, le double mutant *ss3- ss4-* n'accumule plus du tout d'amidon. Ces résultats suggèrent une redondance entre ces deux enzymes. De plus, l'analyse de mutants dans lesquels il ne reste plus que l'activité de la SS3 ou de la SS4 démontre que ces deux synthétases sont capables d'initier la synthèse du polysaccharide, seules.

c. L'élongation des glucanes

L'élongation est catalysée par les synthétases (EC 2.4.1.21), qui sont responsables de la formation des liaisons α -1,4 contenues dans le polysaccharide. Pour cela, elles catalysent le transfert d'un résidu de glucose sur l'extrémité non réductrice d'un glucane préexistant (Figure 8). Dans le métabolisme du glycogène, une seule glycogène-synthétase assure l'élongation des glucanes. Chez les végétaux, il existe de multiples isoformes d'amidon-synthétases, de deux types : les amidon-synthétases liées au grain (GBSS : Granule Bound Starch-Synthase) et les amidon-synthétases solubles (SS : Soluble Starch-Synthase).

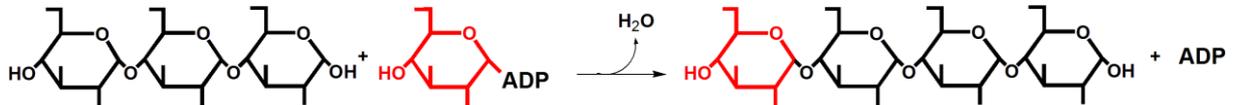


Figure 8 : Mode d'action des amidon-synthétases. Les extrémités non-réductrices se trouvent à gauche des molécules. Le résidu de glucose transféré apparaît en rouge.

1. La GBSSI

La biosynthèse de l'amylose est attribuée à l'amidon-synthétase liée au grain, la GBSSI, découverte par Leloir et al. (1961). Les premiers mutants *gbss1-* étudiés chez le maïs contiennent une quantité normale d'amidon, dont la fraction amylose est absente (Nelson et Rines, 1962). Des mutants similaires ont ensuite été obtenus dans de nombreuses espèces comme la pomme de terre (Hovenkamp-Hermelink et al., 1987), le riz (Villareal et Juliano, 1986), le pois (Denyer et al., 1995) ou encore *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et al., 1992). Ce phénotype suggère que la synthèse de l'amylose n'est pas nécessaire à la formation d'un grain d'amidon normal.

Cette enzyme, liée de façon non covalente à la matrice polysaccharidique (de Fekete et al., 1960), incorpore les résidus de glucose dans l'amylose mais est

également responsable de l'extension des longues chaînes au sein de l'amylopectine (Baba et al. 1987 ; Delrue et al., 1992 ; Maddelein et al., 1994). Ainsi, la GBSS allongerait les chaînes d'amylopectine pour produire ensuite l'amylose (Van de Wal et al., 1998). De plus, l'ajout de malto-oligosaccharides (MOS) active la GBSS chez le pois, suggérant que les MOS seraient le substrat de la GBSS (Denyer et al., 1996b). Cependant, van de Wal et al. (1998) ont montré chez *Chlamydomonas* que l'addition des MOS active également la synthèse de l'amylose mais au détriment de l'amylopectine. Les chaînes externes de l'amylopectine semblent donc être le substrat naturel de la GBSS. Ball et al. (1998) proposent alors un nouveau modèle de la synthèse d'amylose *in vivo* (Figure 9).

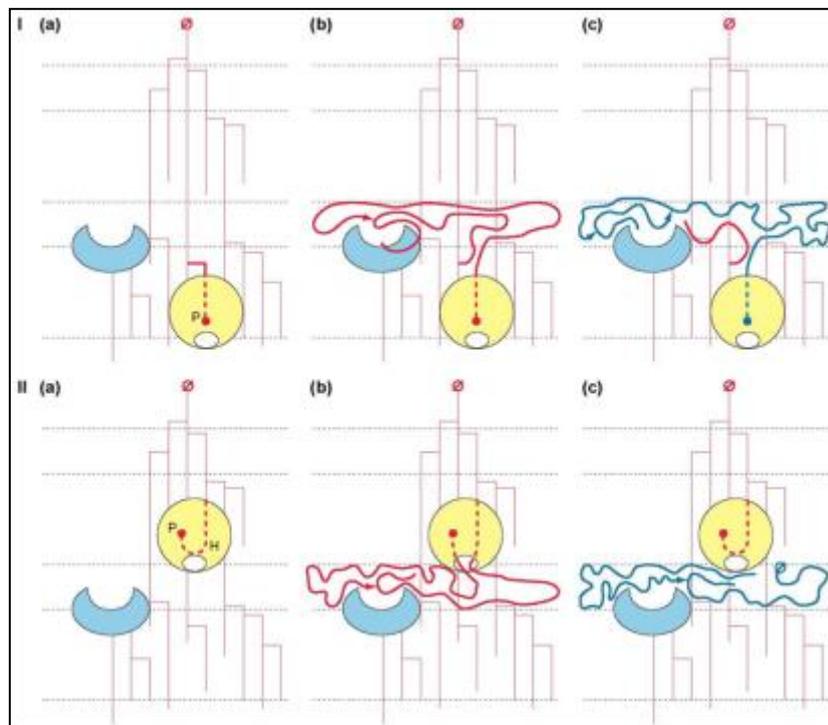


Figure 9 : Modèles de biosynthèse de l'amylose selon Ball et al. (1998). La matrice d'amylopectine d'origine est représentée par des traits fins rouges, alors que les chaînes externes allongées par la GBSS1 sont indiquées par des traits épais rouges. Les molécules d'amylose néo-synthétisées correspondent aux traits de couleur bleue. Les cercles barrés indiquent les extrémités réductrices de l'amylopectine alors que les cercles pleins correspondent aux extrémités non-réductrices. Les cercles jaunes symbolisent la GBSS1 et les formes en demi-lune de couleur bleu-claire évoquent une enzyme de branchement présente à l'intérieur du grain d'amidon. La lettre P indique la position du site catalytique de la GBSS1 et la lettre H, celle d'un hypothétique site d'hydrolyse. **(I)** Le clivage de la molécule d'amylose est assuré par l'enzyme de branchement ou par un autre type d'enzyme hydrolytique (non schématisé). L'initiation d'un nouveau round de biosynthèse est dépendant de la disponibilité d'une nouvelle extrémité non réductrice. **(II)** Le clivage est assuré par le site putatif d'hydrolyse H à proximité du site de polymérisation P, permettant la ré-initiation d'un cycle de biosynthèse à partir de l'extrémité non réductrice provenant de la molécule d'amylose néo-synthétisée.

2. La SS1

Bien que cette enzyme ait été identifiée dans de nombreuses espèces telles que le riz (Baba et al., 1993), le blé (Block et al., 1996) ou la pomme de terre (Kossmann et al., 1999) son rôle est longtemps resté incertain, du fait d'une absence de phénotype associé à la mutation. Ce n'est que récemment, que certains travaux ont permis de lever un coin de voile sur l'activité de la SS1. Ainsi, l'enzyme recombinante de maïs montre une affinité plus élevée pour les glucanes de plus grande taille et en revanche, une activité décroissante avec l'augmentation de la longueur de ces mêmes chaînes (Commuri et Keeling, 2001). De plus, l'activité de l'enzyme est proportionnelle à la moyenne des longueurs des chaînes externes de la molécule. L'enzyme catalyserait donc la synthèse des chaînes courtes de l'amylopectine. Ces travaux seront confirmés et affinés par l'étude d'un mutant chez *Arabidopsis thaliana* (Delvallé et al., 2005), dans lequel on trouve une forte diminution de la quantité des courtes chaînes de l'amylopectine, les chaînes A et B1, qui sont les plus externes. Ces chaînes manquantes sont précisément les chaînes synthétisées efficacement *in vitro* dans l'étude de Commuri et Keeling (2001). La SS1 apparaît donc nécessaire à la synthèse normale de l'amylopectine, et catalyserait l'élongation des chaînes les plus courtes et les plus externes de la grappe.

3. La SS2

L'étude d'un mutant de pois au locus *rug5* montre que celui-ci est déficient pour l'activité de la SS2. Chez ce mutant, la quantité d'amidon accumulé est plus faible par rapport à la souche sauvage et on y trouve une altération de la morphologie des grains et de la structure de l'amylopectine. En effet, on observe dans cette fraction une diminution du contenu en chaînes de taille intermédiaire ($12 < DP < 30$) qui s'accompagne d'une augmentation des courtes et longues chaînes (Craig et al., 1998). Le taux et le type de cristallinité se trouvent également affectés dans ce mutant (Hedley et al., 2002).

Chez les monocotylédones, on retrouve deux SS2, SS2a et SS2b, dans des organes et à des stades de développement différents. Le rôle de la SS2b n'est pas encore connu puisqu'il n'y a pas de mutant identifié et l'enzyme n'a pas encore été décrite. La SS2a, quant à elle, a été décrite chez le blé (Yamamori et al., 2000) et le riz (Umemoto et al., 2002) entre autres. De manière générale, la disparition de l'activité de la SS2 chez les dicotylédones ou de la SS2a chez les monocotylédones entraîne un

phénotype similaire, c'est-à-dire une diminution de la quantité d'amidon accumulé accompagnée d'altérations de la morphologie du grain et de sa cristallinité, ainsi que de la structure de l'amylopectine. Cette dernière se traduit par une diminution du contenu en chaînes intermédiaires de l'amylopectine.

Chez *Arabidopsis thaliana*, le phénotype observé est quelque peu différent puisque la perte de la SS2 n'entraîne pas de modification de la croissance ou de la quantité d'amidon (Zhang et al., 2008). On observe cependant une augmentation du contenu en amylose. La structure de l'amylopectine est également modifiée, de la même manière que chez les autres organismes, avec une réduction de la quantité des chaînes intermédiaires de DP 12 à 28. La SS2 semble donc catalyser spécifiquement la biosynthèse de ces chaînes.

4. La SS3

Le rôle de la SS3 a été étudié chez des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* (Fontaine et al., 1993), du maïs (Gao et al., 1998) ou de la pomme de terre par expression d'ARN antisens (Edwards et al., 1999). Ils accumulent tous des quantités inférieures d'amidon par rapport à la souche sauvage. La structure de l'amylopectine est altérée avec une modification de la distribution en longueur de chaînes. En effet, on observe une diminution de la quantité des chaînes de taille intermédiaire accompagnée d'une augmentation des chaînes courtes et longues. On observe également une forte modification de la morphologie du grain d'amidon. Chez *Chlamydomonas*, le tout s'accompagne d'une forte diminution de la cristallinité de l'amidon.

Récemment, l'étude d'un mutant pour la SS3 chez *Arabidopsis thaliana* suggère un autre rôle pour cette enzyme (Zhang et al., 2005). Le phénotype de ce mutant est assez surprenant puisque ce dernier accumule plus d'amidon. Les modifications structurales de la fraction d'amylopectine sont semblables à celles des autres mutants mais en revanche, il n'y a pas de changement de la morphologie du grain. Les auteurs émettent alors la possibilité que la SS3 joue un rôle dans la régulation de la synthèse de l'amidon et proposent deux hypothèses pour l'expliquer : la SS3 pourrait inhiber l'activité des autres enzymes impliquées dans la synthèse ou la structure de l'amylopectine du mutant pourrait être un meilleur substrat pour celles-ci.

L'analyse plus récente chez *Arabidopsis* d'un double mutant déficient à la fois pour la SS2 et la SS3, montre un phénotype différent de celui des deux simples mutants (Zhang et al., 2008). Ainsi, la croissance des plantes est ralentie et la quantité d'amidon accumulée est largement inférieure à celle de la lignée sauvage. La structure de l'amylopectine est également perturbée. On y observe les mêmes modifications qu'au sein du mutant *ss2-*, c'est-à-dire une diminution des chaînes de taille intermédiaire, mais ces changements sont plus dramatiques. Ainsi, SS2 et SS3 auraient une fonction partiellement redondante dans la production des chaînes intermédiaires de l'amylopectine. SS3 ne serait pas nécessaire à la production de ces chaînes mais paraît être capable de les produire. Les auteurs proposent que ces observations puissent s'expliquer par une compétition de ces enzymes pour la fixation au substrat.

5. Les SS4 et SS5

Des séquences d'amidon-synthétases de classes 4 et 5 apparaissent dans les banques d'EST de plusieurs espèces comme *Arabidopsis thaliana*, le blé, le riz ou encore *Chlamydomonas reinhardtii* (pour revue Ball et Morell, 2003).

Ce n'est que récemment que des mutants pour la SS4 ont été étudiés chez *Arabidopsis* (Roldán et al., 2007 ; Szydlowski et al., 2009), sans établir une quelconque implication de cette enzyme dans l'allongement des glucanes. Comme nous l'avons vu précédemment dans ce manuscrit, la SS4 jouerait plutôt un rôle important dans le phénomène d'initiation.

En ce qui concerne la SS5, aucun mutant n'a été décrit à ce jour et il n'y a pas de preuve que cette protéine soit réellement une synthétase soluble.

d. La ramification des chaînes

Ce sont les enzymes de branchement (EC 2.4.1.18) qui se chargent de l'introduction des liaisons α -1,6 au sein de la structure des polysaccharides (Figure 10).

La synthèse du glycogène ne fait appel qu'à une seule enzyme de branchement. En revanche, on retrouve deux classes d'enzymes de branchement (SBE: Starch Branching Enzyme) chez les végétaux : les SBE1 (ou B) et SBE2 (ou A). Ainsi, tous les végétaux contiennent une SBE1 et une ou deux SBE2 en fonction de l'origine

botanique. On distinguera une seule SBE2 chez les dicotylédones comme le pois ou la pomme de terre et deux SBE2, chez les monocotylédones telles que le maïs, le blé ou le riz, nommées SBE2a et SBE2b. La SBE2a est retrouvée dans tous les tissus de l'organisme alors que la SBE2b n'est trouvée que dans l'albumen. *Arabidopsis thaliana* apparaît ici comme une exception, puisque cette dicotylédone contient deux SBE2 et aucune SBE1.

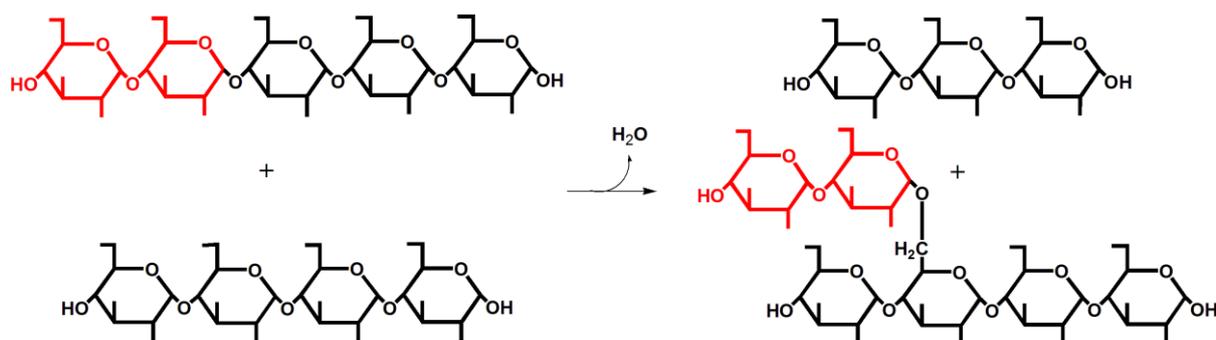


Figure 10 : Mode d'action des enzymes de branchement. Les extrémités non-réductrices se trouvent à gauche des molécules. Les résidus de glucose transférés sont colorés en rouge. Les enzymes de branchement clivent une liaison α -1,4 et transfèrent la partie clivée sur un autre glucane.

L'analyse *in vitro* de ces différentes isoformes montre qu'elles ont un mode d'action semblable mais des spécificités différentes. Les SBE1 transfèrent des glucanes d'un DP supérieur à 16 et jusqu'à 40 résidus de glucose sur des structures peu branchées alors que les SBE2 transfèrent des fragments plus courts, compris entre 6 et 15 résidus, sur des structures fortement branchées (Guan et al., 1997 ; Nakamura et al., 2010).

Les mutants affectés pour la SBE1 ne montrent pas de modifications significatives (Blauth et al. 2002). Cependant, les quelques altérations observées au sein de l'amylopectine de l'albumen de riz suggèrent un rôle de cette enzyme dans la synthèse des chaînes de type B1 (Satoh et al., 2003). La SBE1 ne semble toutefois pas essentielle à la synthèse de l'amylopectine.

En revanche, la déficience en SBE2 étudiée chez le maïs (Blauth et al., 2001), le riz (Nakamura, 2002), le pois (Tomlinson et al., 1997) ou encore la pomme de terre (Jobling et al., 1999) conduit à une baisse du contenu en amidon et une augmentation de la teneur en amylose. La modification structurale de l'amylopectine conduira à l'hypothèse que ces enzymes participent à la synthèse des chaînes de type A et qu'elles ont un rôle prépondérant dans l'élaboration de la molécule d'amylopectine. Cette hypothèse est renforcée par l'étude d'un mutant d'*Arabidopsis*, déficient pour

les deux formes de SBE2, dans lequel l'amidon a totalement disparu et qui accumule des quantités anormalement élevées de maltose dans son cytoplasme (Dumez et al., 2006).

e. Les autres fonctions nécessaires

L'édification de la structure particulière de l'amylopectine nécessite l'action d'activités enzymatiques supplémentaires. Ce sont les enzymes de débranchement (EC 3.2.1.10) qui assurent ce rôle. Ces enzymes hydrolysent les liaisons α -1,6 et sont de deux types chez les algues et les plantes vertes : les isoamylases et les pullulanases.

1. Les isoamylases

On retrouve chez les végétaux trois isoformes d'isoamylase nommées ISA1, ISA2 et ISA3. Elles sont capables de digérer l'amylopectine et le glycogène. Il a été montré qu'ISA1 et ISA2 s'associent en complexes hétéromultimériques chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Dauvillée et al., 2001), la pomme de terre (Hussain et al., 2003) et le riz (Utsumi et Nakamura, 2006). Les mutants dans lesquels le complexe ISA1/ISA2 est inactivé montrent tous une diminution plus ou moins marquée de la quantité d'amidon accompagnée d'une accumulation d'un polysaccharide soluble, le phytoglycogène (Mouille et al., 1996 ; Nakamura et al., 1996 ; James et al., 1995 ; Zeeman et al., 1998). On observe également au sein de ces mutants des modifications plus ou moins marquées de la structure de l'amylopectine.

Les mutants déficients pour la troisième isoforme, ISA3, présentent une suraccumulation d'amidon, impliquant cette enzyme dans la dégradation du polymère (Wattebled et al., 2005 ; Delatte et al., 2006). Cependant, l'inactivation simultanée des trois isoamylases conduit à des phénotypes plus marqués que dans les lignées simples mutantes pour chacune de ces enzymes (Wattebled et al., 2008 ; Streb et al., 2008). Ces résultats suggèrent que l'activité d'ISA3 est partiellement redondante de celle du complexe ISA1/ISA2.

Après les premières observations de mutants déficients pour les isoamylases, Ball et al. (1996) vont proposer un nouveau modèle de synthèse de l'amylopectine (Figure 11). Dans ce modèle, les enzymes de débranchement vont cliver certaines liaisons α -1,6 d'une molécule hyper branchée, la pré-amylopectine, ce qui permet le regroupement des points de branchement dans les lamelles amorphes et permet la cristallisation de la molécule.

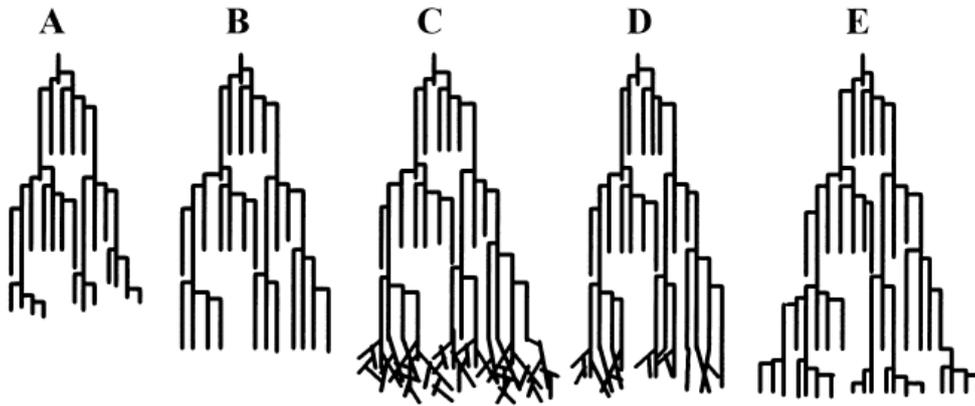


Figure 11 : Le modèle discontinu de biosynthèse de l'amylopectine (d'après Ball et coll, 1996). Les amidon-synthétases allongent les glucanes présents au niveau d'une lamelle amorphe (B). Lorsqu'une taille suffisante est atteinte, les enzymes de branchement créent de nombreuses liaisons α -1,6 (C) qui sont en partie clivées par les enzymes de débranchement (D). Seuls les points de ramification proches qui ne peuvent être clivés par les isoamylases subsistent et sont pris en charge par les enzymes d'élongation afin de débiter un nouveau cycle (E). Le composé intermédiaire hyperbranché (C) est appelé pré-amylopectine.

2. La pullulanase

Il n'y a au sein des plantes et des algues vertes qu'une seule isoforme de pullulanase (ou limit-dextrinase : LDA), PU1, qui est active sur l'amylopectine et le pullulane, un polymère bactérien formé de maltotrioses liés par des liaisons α -1,6. Comme ISA3, la pullulanase a un rôle dans le catabolisme de l'amidon (Delatte et al., 2006) mais aurait aussi une activité légèrement redondante à celle du complexe ISA1/ISA2 (Wattebled et al, 2005). En effet, l'inactivation de PU1 ne présente pas d'altération de l'accumulation d'amidon mais les doubles mutations de PU1 et ISA1 ou ISA2 conduisent à un phénotype plus sévère que les simples mutants dépourvus d'une seule de ces isoamylases (Dinges et al., 2003 ; Wattebled et al., 2008 ; Streb et al., 2008 ; Fujita et al., 2009).

3. Le rôle de l'enzyme disproportionnante

L'enzyme disproportionnante (ou D-enzyme ; EC 2.4.1.25) est une α -1,4 glucanotransférase qui hydrolyse les liaisons α -1,4 de malto-oligosaccharides (MOS) afin de libérer un résidu de glucose et de transférer le glucane résiduel sur l'extrémité non-réductrice d'un autre glucane (Figure 12). Cette enzyme a été isolée et caractérisée chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Arabidopsis thaliana* (Colleoni et al., 1999a et b ; Chritchley et al., 2001 ; Wattebled et al., 2003). De façon surprenante,

les mutants dans ces deux organismes présentent des phénotypes différents. Chez *Chlamydomonas*, la déficience en D-enzyme provoque une baisse drastique de la quantité d'amidon dont la forme et la structure sont altérées (Wattebled et al., 2003). On observe également une suraccumulation des MOS. Ces résultats suggèrent le rôle de la D-enzyme dans la synthèse de l'amidon. De plus, il a été montré *in vitro*, que l'enzyme est capable de transférer des MOS sur les chaînes externes de l'amylopectine (Colleoni et al., 1999a et b) ce qui intègre la D-enzyme dans le modèle de synthèse de l'amylopectine de Ball et al. (1996). Ainsi, elle prendrait en charge les malto-oligosaccharides libérés lors de l'épissage par les isoamylases et les transférerait sur la molécule d'amylopectine en formation.

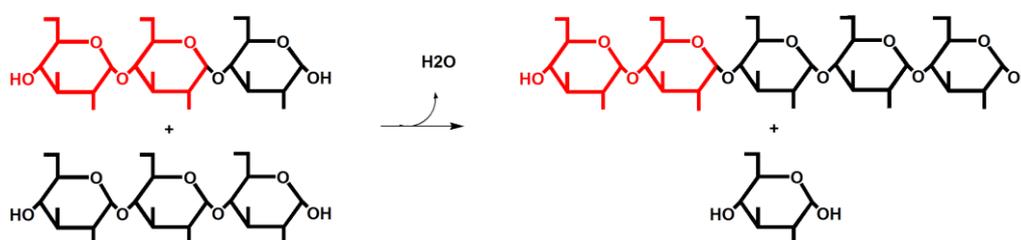


Figure 12 : Représentation schématique du mode d'action de la D-enzyme. Les extrémités non-réductrices se trouvent à gauche des molécules. Les résidus de glucose transférés par la D-enzyme sont colorés en rouge.

A contrario, chez *Arabidopsis*, on observe une légère augmentation de la quantité d'amidon, qui a une structure normale mais qui est enrichi en amylose, ainsi qu'une forte augmentation des MOS accumulés (Critchley et al., 2001). Les auteurs imputent donc à l'enzyme une activité liée au catabolisme du polysaccharide dans lequel elle participe au recyclage des MOS libérés lors de la dégradation.

Une explication alternative serait que la D-enzyme, qui est une enzyme majeure du métabolisme des malto-oligosaccharides, pourrait être impliquée de façon équivalente dans la synthèse et dans la dégradation de l'amidon. Les contradictions phénotypiques observées au sein des mutants de différentes espèces pourraient être la conséquence des environnements physiologiques des tissus considérés.

C. La dégradation de l'amidon

Il y a encore peu de temps, faute de mutants, le catabolisme de l'amidon restait une étape mal caractérisée. Cependant, depuis quelques années, des progrès rapides ont été réalisés à ce sujet. Il apparait clairement que les voies de dégradation diffèrent

selon les espèces végétales ou les organes de la plante et que des voies distinctes peuvent même être utilisées au sein d'un même organe. C'est dans les feuilles, où l'amidon transitoire est dégradé durant la nuit, et dans l'albumen des céréales, où l'amidon de réserve est utilisé durant quelques jours après la germination de la graine que le catabolisme de l'amidon est le plus connu. On considère que chez la plupart des plantes, la dégradation peut avoir lieu selon deux grandes voies métaboliques : la voie hydrolytique et la voie phosphorolytique. Cette dégradation est initiée par une étape importante de phosphorylation de l'amidon. Nous étudierons dans ce chapitre la dégradation de l'amidon telle qu'elle est imaginée à ce jour chez *Arabidopsis thaliana*.

a. Phosphorylation du grain

La phosphorylation de l'amidon semble être un pré-requis indispensable à la dégradation du polymère. Elle a lieu de jour comme de nuit à la surface du grain même si les taux de phosphorylation et les quantités de phosphate sont plus importants la nuit (Ritte et al., 2004).

Ce n'est que récemment que l'enzyme responsable de cette phosphorylation a été découverte chez la pomme de terre (Lorberth et al., 1998), dans un mutant présentant une suraccumulation d'amidon. D'autres études sur un mutant d'*Arabidopsis* montrent également une augmentation de la quantité d'amidon mais aussi une absence de groupements phosphate sur l'amylopectine (Yu et al., 2001). La GWD (Glucan Water Dikinase) transfère le groupement phosphate en position β d'une molécule d'ATP sur le carbone en position 6 d'un résidu de glucose de l'amylopectine (Ritte et al., 2006). Il a été démontré que la GWD est liée à l'amidon la nuit (Ritte et al., 2000). De plus, elle subit une régulation de type redox et se trouve sous forme inactive (oxydée) lorsqu'elle est liée à l'amylopectine (Mikkelsen et al., 2005).

Plus récemment encore, une deuxième enzyme responsable de la phosphorylation a été identifiée (Kötting et al., 2005). La PWD (Phosphoglucan Water Dikinase) transfère de la même façon un groupement phosphate de l'ATP mais en position C3 et seulement si le résidu de glucose est déjà phosphorylé en C6 (Baunsgaard et al., 2005). La PWD semble donc agir après la GWD et est dépendante de l'activité de cette dernière.

Le lien entre la phosphorylation et la dégradation n'est pas encore clairement établi mais une hypothèse plausible est que la présence des groupements phosphate désorganise les doubles hélices de l'amylopectine, rendant cette dernière plus accessible aux enzymes de dégradation. La phosphorylation apparaît donc comme indispensable à la dégradation de l'amidon et le contrôle de l'activité de la GWD pourrait être le principal régulateur de celle-ci. Un autre niveau de régulation de la voie de dégradation de l'amidon pourrait être assuré par une enzyme dénommée SEX4 (Starch Excess 4) qui contrôlerait le niveau de phosphorylation de l'amidon. Cette enzyme est une phosphoglucane phosphatase qui est capable de déphosphoryler la surface du grain d'amidon et les phosphoglucanes solubles *in vitro* (Kötting et al., 2009). Les mutants d'*Arabidopsis* déficient pour cette enzyme montrent une accumulation de glucanes phosphorylés produits au cours de la dégradation (Niittylä et al., 2006). Kötting et al. en concluent que SEX4 agirait en association avec les enzymes de phosphorylation et les hydrolases pour réguler la dégradation du polysaccharide.

b. La voie hydrolytique

Différentes familles d'enzymes sont capables d'hydrolyser l'amidon. Parmi elles, on retrouve les enzymes de débranchement, décrites en page 29, qui permettent l'élimination des points de branchement, ou encore la D-enzyme, décrite en page 30. On trouve également les α -glucosidases (EC 3.2.1.20) qui catalysent l'hydrolyse d'un α -1,4 glucane à partir de son extrémité non-réductrice en libérant du glucose, cependant aucune preuve de leur implication dans la dégradation de l'amidon n'est connue à ce jour. Enfin, on trouve les amylases, que nous allons décrire plus en détails.

1. Les α -amylases

1.1. La super famille des α -amylases

La super famille des α -amylases est aussi appelée la famille GH13 (Glycoside Hydrolases family 13) selon la classification CAZy définie par Henrissat et al. (2001). Cette famille regroupe des dizaines d'enzymes différentes catalysant plus de 20 réactions diverses (pour revues, Huriki et Imanaka, 1999 ; van der Maarel et al., 2002). Leurs actions touchent les liaisons O-glycosidiques α -1,4, α -1,6 ou encore α -1,1

avec des spécificités endo- ou exo-amylasiques, de transglycosylation ou simplement de clivage. La définition des enzymes appartenant à cette famille est la suivante :

- Elles agissent sur des liaisons α -glycosidiques.
- Elles hydrolysent ou transfèrent ces liaisons en conservant leur anomérie.
- Elles possèdent quatre régions peptidiques hautement conservées dans lesquelles se trouvent les sites catalytiques et de fixation du substrat.
- Elles possèdent toutes trois résidus impliqués dans la réaction catalytique qui sont deux résidus d'acide aspartique et un d'acide glutamique.

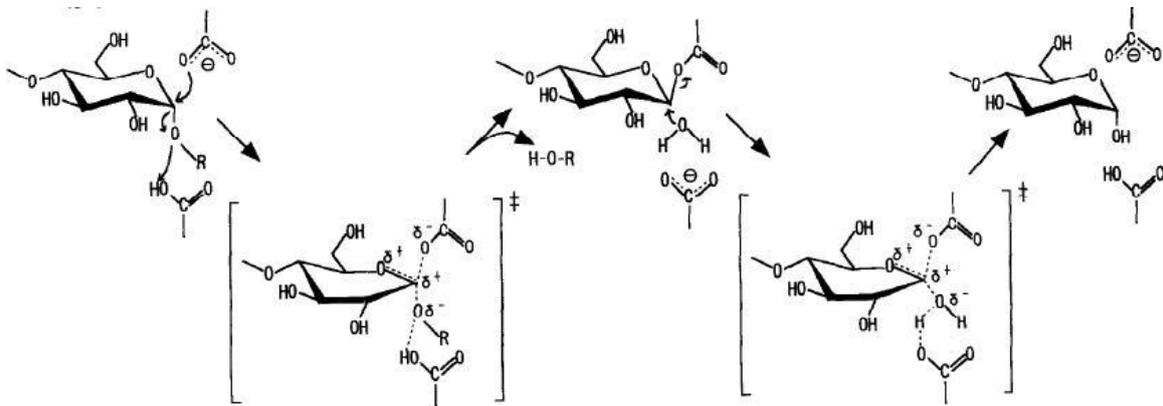


Figure 13 : L'hydrolyse d'une liaison α selon un mécanisme retenant l'anomérie. La catalyse de la coupure par une enzyme retenant l'anomérie nécessite deux étapes. Un résidu d'acide carboxylique va agir en tant que nucléophile dans la première partie de la réaction puis comme groupe partant dans la deuxième partie de la réaction. Le maintien de l'anomérie résulte de la succession de deux réactions inversant l'anomérie. Durant le processus de clivage, il y a formation d'un intermédiaire glycosyl-enzyme covalent. D'après Huriki et Imanaka (1999).

Les liaisons α -glycosidiques étant très stables, les α -amylases qui sont capables de les hydrolyser sont reconnues pour être parmi les enzymes les plus efficaces. Elles retiennent l'anomérie de la liaison par un mécanisme peu connu qui serait un mécanisme de double inversion, c'est-à-dire deux réactions d'inversion successives (Figure 13). Ce mécanisme implique deux des résidus catalytiques conservés, l'acide glutamique et un des acides aspartiques. Le dernier est lié aux groupements OH du substrat et joue un rôle dans la distorsion de ce dernier.

Après la résolution de plusieurs structures tridimensionnelles, il apparaît que ces enzymes ont une structure commune, sous forme de tonneau $(\beta/\alpha)_8$ ou TIM barrel (Figure 14). Plusieurs domaines conservés ont été identifiés. Le domaine A est le plus conservé et il est retrouvé au sein de toutes les enzymes de cette famille. Les résidus

conservés impliqués dans la réaction catalytique et la liaison au substrat se trouvent dans la boucle C-terminale des feuillets β de ce domaine.

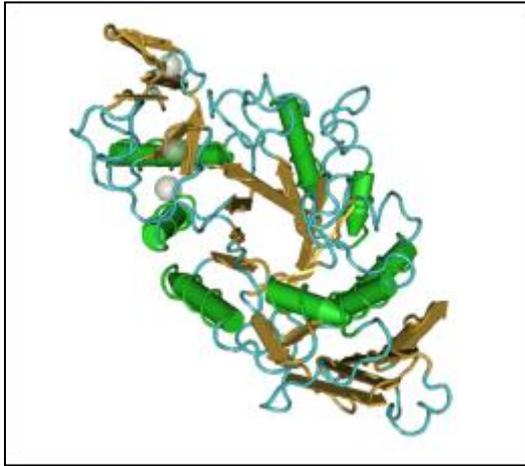


Figure 14 : Représentation des structures secondaire et tertiaire de l' α -amylase de l'orge (Kadziola et al., 1994). Les flèches cylindriques représentent les hélices α , et les flèches plates représentent les feuillets β . Les sphères translucides représentent les ions Ca^{2+}

Le domaine B est également retrouvé chez toutes ces enzymes et est impliqué dans la liaison au substrat ou la liaison au Ca^{2+} . Neuf autres domaines ont été identifiés notamment le domaine E ou « domaine de fixation à l'amidon » qui interagit avec le substrat, ou encore les domaines F, G et H retrouvés du côté N-terminal et présents chez les enzymes qui ont une activité endo-amylasique ou celles qui hydrolysent les liaisons α -1,6 de substrats branchés. Les α -amylases impliquées dans la dégradation de l'amidon contiennent les domaines A, B et C.

Les spécificités diverses, en substrats et en produits, des enzymes de cette famille pourraient s'expliquer par l'attachement de différents domaines au noyau catalytique en fonction de l'enzyme.

1.2. Rôle des α -amylases dans la feuille d'*Arabidopsis*

Les α -amylases (EC 3.2.1.1) sont des endo-amylases qui hydrolysent les liaisons O-glycosidiques de types α -1,4 à l'intérieur des chaînes de glucose et libèrent ainsi des glucanes linéaires ou branchés. La dégradation de l'amidon de réserve de l'albumen des céréales se déroule de façon différente à celle des feuilles. En effet, au sein des amyloplastes, les α -amylases initient la dégradation du polysaccharide en attaquant la surface du grain. Elles facilitent ainsi l'action des autres enzymes cataboliques et relarguent des substrats utilisables par d'autres enzymes (Sissons et MacGregor, 1994 ; Sun et Hensson, 1991). Ce mécanisme a ainsi été longtemps suggéré pour la dégradation de l'amidon transitoire.

Au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana*, trois séquences ont été identifiées comme des α -amylases potentielles : AMY1, 2 et 3. Parmi elles, seule AMY3 possède une séquence d'adressage au chloroplaste, ce qui en fait une exception au même titre que sa masse de 93 kDa, qui représente environ le double de la masse moyenne des autres α -amylases. L'extrémité C-terminale de la protéine porte le domaine spécifique des α -amylases qui lui confère son activité α -amylasique (Yu et al., 2005).

Un mutant de cette enzyme a été sélectionné et étudié (Yu et al., 2005). De façon surprenante, aucune modification du taux de dégradation n'a été observée, ce qui pourrait impliquer un phénomène de compensation de l'activité. De plus, le phénotype observé pour le triple mutant déficient pour les trois α -amylases est le même, c'est-à-dire que le taux de dégradation n'est pas affecté. Ainsi, les auteurs ont conclu que les α -amylases ne sont pas nécessaires à la dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis*. Ils émettent l'hypothèse de la présence d'une autre endo-amylase, qui posséderait une séquence peptidique primaire différente, ce qui expliquerait qu'elle ne soit pas reconnue. Leur deuxième hypothèse est qu'AMY3 serait importante pour le catabolisme dans des tissus ou des conditions particulières.

Cette hypothèse semble quelque peu se vérifier après l'analyse de mutants dépourvus à la fois de l'isoamylase ISA3 et de la pullulanase (Delatte et al., 2006). Au sein de cette lignée, l'activité d'AMY3 est augmentée. Ce mutant présente une suraccumulation d'amidon et ce phénotype est plus drastique que pour le simple mutant *isa3*-. Ces résultats semblent indiquer qu'il existe différents mécanismes de dégradation au sein du chloroplaste et qu'en l'absence de l'isoamylase 3, AMY3 pourrait dégrader l'amidon et fournir un substrat à la pullulanase permettant ainsi la présence d'un bas niveau de dégradation. Cependant, la dégradation via l' α -amylase 3 ne semble pas nécessaire dans des circonstances normales, ce qui est la situation la plus fréquente. Dans ce cas, comment l'activité d'AMY3 a-t-elle été maintenue chez la plante si celle-ci n'est utile que lorsque ISA3 est absente ? D'autre part, l' α -amylase n'est pas capable d'hydrolyser les liaisons de type α -1,6 et ne peut donc pas compenser la perte d'ISA3.

Plus récemment, il a été observé que l'introduction d'une mutation de l' α -amylase 3 dans un quadruple mutant dépourvu d'activité de débranchement, au sein duquel il n'y a pratiquement plus d'amidon, entraîne la restauration de la synthèse de polysaccharide insoluble à hauteur de 75% de la quantité d'amidon présente dans une

souche sauvage (Streb et al., 2008). La structure de ces polysaccharides insolubles diffère de celle de l'amylopectine d'une lignée sauvage mais de façon moins sévère que dans le quadruple mutant. Après l'étude de ces lignées quadruple et quintuple mutantes, les auteurs proposent un nouveau modèle : dans un contexte sauvage, les isoamylases clivent certaines liaisons α -1,6 de la pré-amylopectine pour permettre la cristallisation. AMY3 n'a alors pas accès aux chaînes naissantes et n'intervient donc pas dans la biosynthèse. Au contraire, dans une lignée dépourvue d'enzymes de débranchement, les amylases, dont AMY3, ont accès aux chaînes néosynthétisées qu'elles vont dégrader et ainsi générer de courtes chaînes, empêchant ainsi la cristallisation. L'absence d'AMY3 au sein du quintuple mutant, permet la diminution de la modification des chaînes naissantes ce qui entraîne un minimum de cristallisation, indépendante des enzymes de débranchement. Enfin, une forte augmentation de la quantité totale de glucanes est observée au sein du quintuple mutant par rapport au mutant dépourvu d'enzymes de branchement, ce qui implique AMY3 dans la dégradation des glucanes présents au sein de ce dernier.

Le rôle de cette enzyme au sein du catabolisme de l'amidon transitoire n'est donc toujours pas clairement établi et des études complémentaires restent donc nécessaires.

2. Les β -amylases

2.1. Classification, structure et mode d'action

Les β -amylases appartiennent à la famille GH14 (Glycoside Hydrolases family 14) selon la classification CAZy définie par Henrissat et al. (2001). Cette famille regroupe de nombreuses enzymes qui n'ont qu'une seule activité connue, l'activité β -amylase. Ces enzymes sont des exo-amylases qui hydrolysent les liaisons O-glycosidiques de type α -1,4 à partir de l'extrémité non-réductrice de la chaîne glucanique et libèrent du maltose. On retrouve au sein de leur séquence trois régions hautement conservées, dans lesquelles ont été identifiés deux résidus impliqués dans la réaction catalytique et qui sont deux résidus d'acide glutamique. Ce sont des enzymes qui inversent l'anométrie de la liaison selon un mécanisme en une seule étape (Figure 15) et le maltose libéré aura donc une anométrie β . La résolution de structures tridimensionnelles montre une structure commune à ces enzymes sous forme de tonneau $(\beta/\alpha)_8$ (Figure 16).

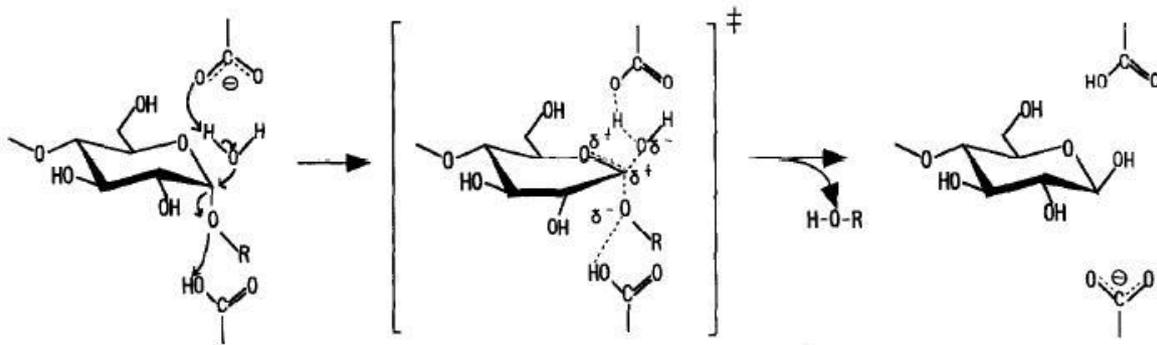


Figure 15 : L'hydrolyse d'une liaison α selon un mécanisme inversant l'anomérisation. Lors de l'action d'une enzyme inversant l'anomérisation (inverting enzyme) un résidu d'acide carboxylique agit en tant que base pour activer une molécule d'eau et un second agit en tant qu'acide pour faciliter le départ du groupe partant. Dans ce mécanisme, le clivage de la liaison s'effectue en une seule étape. D'après Huriki et Imanaka (1999).

2.2. Rôle des β -amylases dans la feuille d'*Arabidopsis*

Les β -amylases (EC 3.2.1.2) hydrolysent donc les liaisons α -1,4 des chaînes externes de l'amylopectine, jusqu'aux points de branchement qu'elles ne peuvent franchir. Cette dégradation aboutit à une structure appelée « β -limit dextrine » (Baba et Kainuma, 1987).

La première démonstration de l'importance de ces enzymes dans la dégradation de l'amidon transitoire a été apportée par l'étude d'une enzyme recombinante ainsi que d'une lignée « antisens » pour une β -amylase plastidiale chez la pomme de terre (Scheidig et al., 2002). Cette enzyme recombinante, très proche d'une β -amylase chloroplastique d'*Arabidopsis thaliana* (Lao et al., 1999), est elle-même adressée au plaste. Les tests *in vitro* prouvent qu'elle possède une activité β -amylase et qu'elle est dépourvue de toute autre activité amylolytique. De plus, elle produit bien du maltose et est capable de dégrader non seulement l'amidon soluble mais également des grains d'amidon natifs de pomme de terre.

L'inactivation de cette enzyme par l'expression d'un ARN antisens au sein de la pomme de terre, conduit à une diminution de l'activité β -amylase ainsi qu'à une suraccumulation d'amidon accompagnée d'une modification du taux de dégradation.

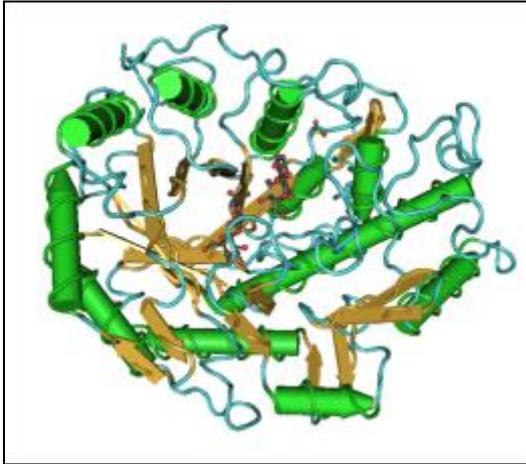


Figure 16 : Représentation des structures secondaire et tertiaire de la β -amylose de la graine de soja (Mikami et al., 1994). Les flèches cylindriques représentent les hélices α , et les flèches plates représentent les feuillets β .

Chez *Arabidopsis*, neuf gènes codent des β -amyloses potentielles nommées BAM1 à 9. Parmi elles, quatre séquences possèdent un peptide d'adressage au chloroplaste (BAM1, 2, 3 et 4) et une ne le possède pas de façon certaine (BAM8). BAM3 a été la première formellement localisée dans le plaste (Lao et al., 1999). Il a ensuite été montré que BAM1 code une β -amylose active adressée au chloroplaste (Sparla et al., 2006). Fulton et al., (2008) et Li et al., (2009) ont étudié les quatre β -amyloses possédant un peptide d'adressage au chloroplaste. Leurs expériences ont permis de localiser formellement ces enzymes au sein des chloroplastes. Les protéines recombinantes BAM1, 2 et 3 sont actives *in vitro*, BAM2 possédant toutefois une activité très inférieure à celles des deux autres enzymes. BAM4, quant à elle, apparaît inactive. De plus, la modélisation de la structure de cette enzyme permet aux auteurs de prédire que la protéine est inactive.

La mesure de l'activité β -amylose totale au sein des simples mutants pour chaque isoforme montre une forte diminution de celle-ci au sein des lignées dépourvues de BAM1 et BAM3 alors qu'elle est inchangée pour BAM2 et BAM4. Les mutants *bam1-* et *bam2-* présentent un phénotype d'accumulation d'amidon identique à celui du sauvage alors que *bam3-* et *bam4-* affichent une suraccumulation d'amidon accompagnée d'une baisse de la quantité de maltose au cours de la nuit, le phénotype de *bam3-* étant le plus sévère. Les différentes combinaisons de mutations ont été obtenues et étudiées. Il apparaît que la perte de BAM3 ou BAM4 conduit toujours à une augmentation de l'accumulation d'amidon et une diminution du niveau de maltose, la perte de BAM3 étant moins sévère si BAM1 est présente. L'absence de cette dernière n'a pas d'effet si BAM3 est présente mais possède un effet majeur quand elle est associée à la perte de BAM3. Enfin, la perte de

BAM2 n'a que peu d'effet. L'ensemble de ces résultats indique que BAM3 est la forme dominante qui contribue au processus de dégradation de l'amidon. BAM1 a un rôle lors de la mobilisation quand BAM3 est absente, indiquant un recouvrement partiel d'activité entre ces deux enzymes. La fonction de BAM2 ne peut quant à elle pas être déterminée ici. Enfin, BAM4 tient un rôle important dans la dégradation de l'amidon mais ne possède pourtant pas d'activité enzymatique. Les auteurs proposent donc que cette enzyme faciliterait ou régulerait l'activité des autres isoformes lors de la dégradation de l'amidon. Elle pourrait ainsi interagir avec les autres β -amylases afin de stimuler la dégradation. Cependant, les auteurs ont montré que BAM4 n'a pas d'effet direct sur l'activité des autres isoformes. Une autre hypothèse ferait interagir BAM4 avec d'autres enzymes nécessaires à la dégradation de l'amidon et dont l'action influe sur l'activité de BAM1 et 3, telles que la GWD ou ISA3 (Edner et al., 2007). Mais les résultats prouvent que BAM4 n'agit pas sur la GWD. Enfin, il a été montré dans cette étude que BAM4 a gardé sa capacité à se fixer à l'amylopectine ou l'amylose comme le font BAM1 et 3 alors que BAM2 présente une faible affinité pour ces deux substrats. Cette faible affinité pourrait expliquer le peu d'activité affichée par BAM2.

La manière dont BAM4 facilite ou régule le mécanisme de dégradation reste inconnue et les auteurs émettent l'hypothèse d'un nouveau mécanisme, faisant intervenir une interaction avec le grain d'amidon. Un taux minimal de dégradation étant toujours observé, même au sein du quadruple mutant, une ou plusieurs activités α - ou β -amylase additionnelles contribuent à la mobilisation de l'amidon.

c. La voie phosphorolytique

Elle est catalysée par les α -glucanes phosphorylases (EC 2.4.1.1), dont l'étude est présentée dans le paragraphe qui suit. Cependant, leur rôle dans le métabolisme de l'amidon reste sujet à débat et n'apparaît pas totalement clair.

1. Classification, structure et mode d'action

Les α -glucane phosphorylases appartiennent à la famille GT35 (Glycosyl Transferase family 35) selon la classification CAZy définie par Coutinho et al. (2003). Cette famille regroupe une multitude d'enzymes ne présentant qu'une seule activité enzymatique. Elles catalysent la phosphorolyse des α -1,4 glucanes en présence de

phosphate inorganique ou allongent les extrémités non réductrices d'un α -1,4 glucane à partir de Glucose-1-phosphate (Glc1P). Elles catalysent donc la réaction réversible :



Le glucane le plus court pouvant servir d'accepteur lors de la réaction de synthèse est le maltotétraose et c'est le maltopentaose qui représente le glucane de taille minimale pouvant être phosphorylé. Ces enzymes retiennent l'anométrie de liaison par un mécanisme qui serait le même que celui des α -amylases (Figure 13). Ce sont des glycosyl transférases de type GTB, c'est-à-dire que leur structure tridimensionnelle est composée de deux domaines Rossmann $\beta/\alpha/\beta$ qui se font face et sont liés de façon souple. Chaque monomère est composé de deux domaines séparés par une crevasse dans laquelle se trouve le site actif. Le domaine C-terminal contient le site impliqué dans la réaction catalytique et le domaine N-terminal contient les sites de fixation d'effecteurs allostériques et intervient donc dans la régulation de l'activité de l'enzyme.

La réaction catalytique nécessite dans tous les cas la présence d'un cofacteur qui est retrouvé dans tous les monomères d' α -glucane phosphorylase : le phosphate de pyridoxal. Il y a contact très proche entre le groupement phosphate du cofacteur et le phosphate inorganique dans le cas de la phosphorylyse, et entre ce même groupement phosphate et celui du Glc1P dans le cas de la synthèse (Palm et al., 1990).

Les α -glucanes phosphorylases sont toutes actives sous forme de dimères (Figure 17). Toutefois, la présence d'hétérodimères a été rapportée au sein des chloroplastes des feuilles de pomme de terre (Albrecht et al., 1998). Bien qu'ayant de nombreuses similitudes, ces enzymes présentent de grandes différences concernant leur spécificité de substrats ou encore leur régulation, ce qui entraîne une multiplicité d'isoformes au sein des organismes. Ainsi, chez un même organisme, on peut retrouver des phosphorylases à spécificité de substrats différente, ou encore exprimées différemment selon le stade de développement ou dont l'expression est spécifique à chaque organe.

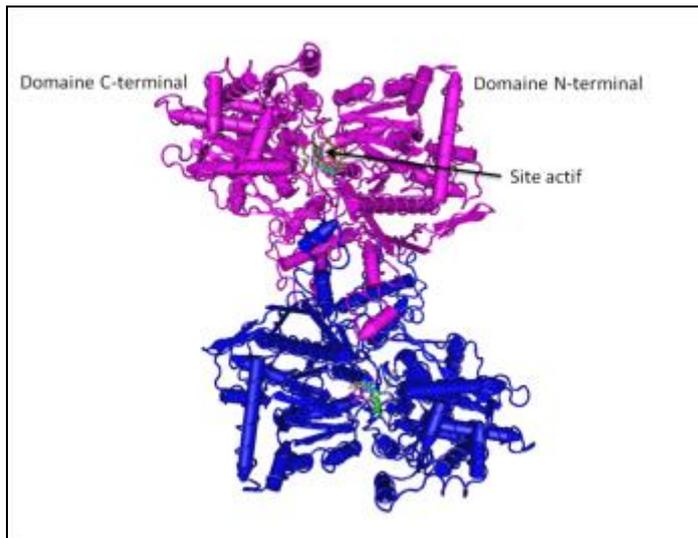


Figure 17 : Représentation des structures secondaire et tertiaire du dimère MalP, la phosphorylase bactérienne, d'*Escherichia coli* (d'après Watson et al., 1999) montrant la fixation d'un oligosaccharide dans la crevasse séparant les deux domaines de chaque monomère. Les flèches cylindriques représentent les hélices α , et les flèches plates représentent les feuillets β . Les sous-unités sont colorées en rose et bleu.

2. Rôle chez les plantes

Chez les plantes, notamment *Arabidopsis*, on retrouve deux types de phosphorylases ayant une spécificité de substrat et une localisation différentes. L'isoforme Pho1 est retrouvée au sein du plaste alors que Pho2 est cytosolique. On trouve des exceptions chez la pomme de terre et *Chlamydomonas reinhardtii* qui possèdent deux isoformes plastidiales et une dans le cytoplasme (Sonnewald et al., 1995 ; Dauvillée et al., 2006). Pho2 présente une très grande affinité pour les polysaccharides branchés (Steup, 1988) alors que Pho1 affiche une affinité moindre (Sonnewald et al., 1995 ; Shimomura et al., 1982).

2.1. L'isoforme plastidiale

Toutes les isoformes plastidiales d' α -glucane phosphorylases présentent une insertion de 80 acides aminés entre les domaines N- et C-terminaux, absente chez les autres phosphorylases. Cependant, cette insertion est également absente au sein de la séquence des phosphorylases plastidiales de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Dauvillée et al., 2006). Cette insertion pourrait être à l'origine de la faible affinité de cette isoforme pour l'amidon (Mori et al., 1993). Cette enzyme est inhibée par l'ADP-Glucose (Mu et al., 2001) et elle est incapable d'attaquer la structure cristalline de l'amidon (Steup et al., 1983).

On observe, selon les organismes étudiés et les conditions de culture utilisées, différents phénotypes chez les mutants déficients en phosphorylase plastidiale. Ainsi, l'expression d'ARN antisens chez la pomme de terre aboutit à un phénotype sauvage (Sonnewald et al., 1995). Cependant, la nature de la technique antisens et le fait qu'il

y ait une deuxième isoforme plastidiale exprimée dans les feuilles (Albrecht et al., 2001) laissent à penser qu'un rôle important de la phosphorylase dans le métabolisme de l'amidon ne peut pas être totalement écarté.

Dans l'albumen de riz, la mutation de l'isoforme Pho1 au sein de l'amyloplaste, conduit à des morphologies de graines très variables ainsi qu'à la diminution de la quantité d'amidon (Sato et al., 2008). La forme et la taille du grain sont également modifiées et on observe de petites modifications dans la structure de son amylopectine, avec une augmentation de la quantité de chaînes courtes de DP inférieur à 11 associée à une diminution des chaînes intermédiaires de DP 13 à 21. Ces modifications de structure étant mineures, le rôle de la phosphorylase n'apparaît pas comme étant fondamental. Pho1 est également capable de synthétiser des glucanes linéaires à partir de MOS de petite taille. L'ensemble de ces résultats tend à prouver un rôle de la phosphorylase dans la biosynthèse du polysaccharide au sein des plastes des tissus de réserve. Les auteurs émettent plusieurs hypothèses en impliquant Pho1 dans l'initiation de la synthèse ou encore en l'incluant dans des complexes protéiques avec d'autres enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'amidon.

Chez *Chlamydomonas*, le mutant *sta4* est déficient pour l'isoforme plastidiale PhoB (Dauvillée et al., 2006). Cette enzyme présente une faible affinité pour les MOS linéaires ainsi qu'une grande affinité pour les polysaccharides branchés comme le glycogène, à l'inverse des phosphorylases plastidiales des plantes supérieures. L'étude du mutant *sta4* montre une diminution de la quantité d'amidon accompagnée d'une augmentation du contenu en amylose. Les grains sont déformés et la structure de l'amylopectine est modifiée. Dans ces conditions, les résultats suggèrent à nouveau une fonction de la phosphorylase dans le processus de biosynthèse de l'amidon.

L'analyse d'un mutant d'*Arabidopsis thaliana* déficient pour la phosphorylase plastidiale dénommée PHS1, ne présente aucune altération du métabolisme de l'amidon (Zeeman et al., 2004). Les quantités accumulées sont similaires à celles du sauvage, la structure de l'amylopectine n'est pas modifiée et les ratios amylose/amylopectine sont inchangés. Ces plantes présentent cependant des lésions sur leurs feuilles en condition de stress hydrique, suggérant un rôle de la phosphorylase dans la tolérance au stress abiotique. Ainsi, PHS1 fournirait des hexoses-phosphates à la voie des pentoses-phosphates qui, par ses produits, permet de limiter le stress oxydatif et donc les nécroses tissulaires. Cependant, l'analyse du

même mutant au sein de notre laboratoire, qui fait l'objet de cette thèse, présente des résultats contradictoires qui seront exposés dans la partie appropriée et discutés par la suite.

2.2.L'isoforme cytosolique Pho2

Cette isoforme est plus petite que la phosphorylase plastidiale avec un poids moléculaire d'environ 90 kDa. Elle a une grande affinité pour le glycogène alors qu'elle n'a pas accès à l'amidon *in vivo* (Mori et al., 1991). Son substrat pourrait être un hétéroglycane soluble de haut poids moléculaire présent dans le cytosol (Fettke et al., 2005a et 2005b) et pour laquelle elle a une grande affinité (Fettke et al., 2005b). L'analyse de mutants antisens déficients pour Pho2 chez la pomme de terre ne montre aucun changement dans le métabolisme de l'amidon (Duwenig et al., 1997).

d. Devenir des produits de dégradation

Le principal produit de dégradation formé lors de la mobilisation de l'amidon la nuit est le β -maltose, résultat de l'activité des β -amylases (Weise et al., 2005). Sa translocation vers le cytosol est assurée par le transporteur de l'enveloppe du chloroplaste MEX1 (Niittylä et al., 2004). Dans le cytosol, l'assimilation du maltose est assurée par une α -1,4 glucanotransférase nommée DPE2 (Lu et Sharkey, 2004 ; Chia et al., 2004). L'analyse de lignées mutantes déficientes pour DPE2 présente un phénotype similaire à celui du mutant déficient pour MEX1. Ces deux types de mutants sont enrichis en amidon et présentent des quantités anormalement élevées de maltose dans les feuilles. De plus, DPE2 est capable *in vitro* de transférer un résidu de glucose à partir de maltose sur du glycogène (Chia et al., 2004). Sa fonction pourrait donc être de transférer un résidu de glucose sur un accepteur, libérant ainsi l'autre résidu, qui peut alors entrer dans les voies de dégradation des sucres. La nature de cet accepteur n'est pas encore établie de façon définitive, mais un hétéroglycane soluble pourrait jouer ce rôle (Fettke et al., 2005a et 2005b). Le recyclage de cet hétéroglycane complexe serait alors assuré par la phosphorylase cytosolique, Pho2, permettant la libération de Glc1P.

Les voies conduisant à la dégradation de l'amidon chez *Arabidopsis* telles qu'elles sont imaginées aujourd'hui sont représentées dans la figure 18.

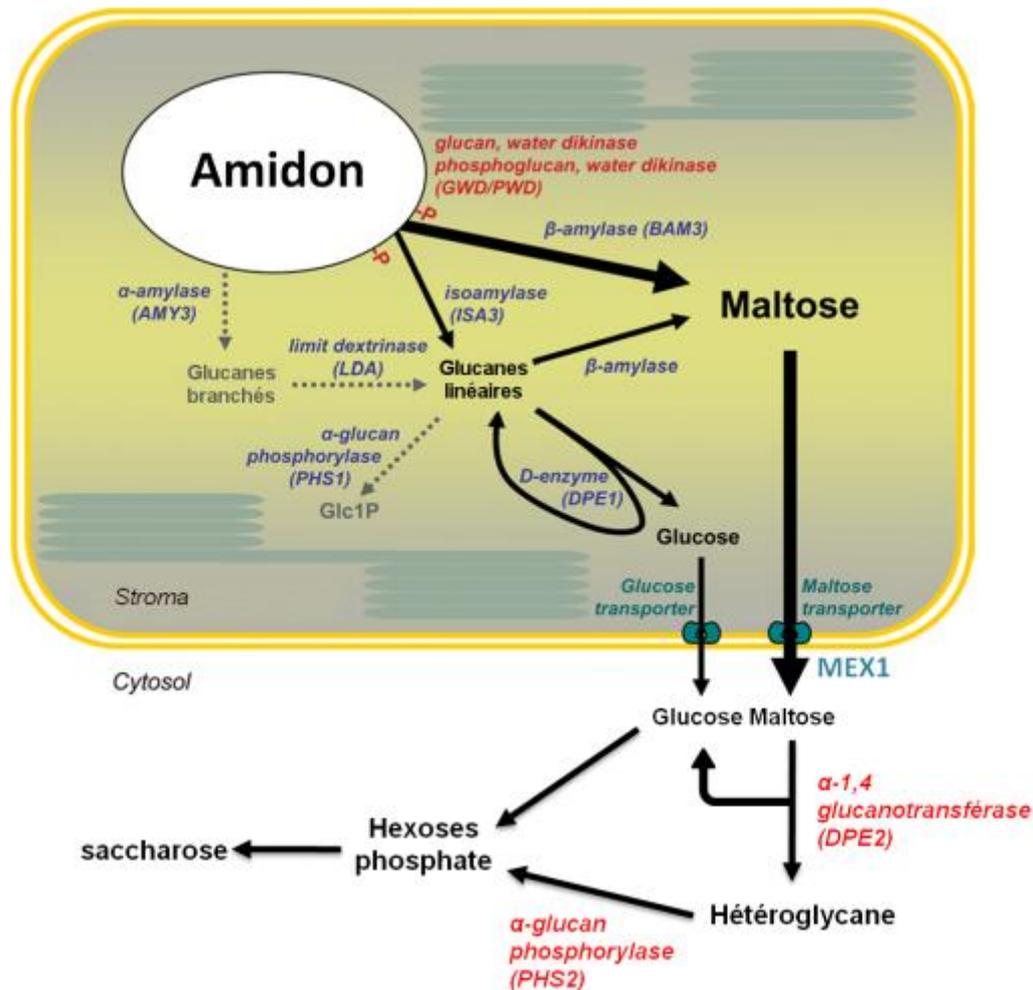


Figure 18 : Représentation des voies de dégradation de l'amidon dans les chloroplastes d'*Arabidopsis* modifiée à partir de Zeeman et al. (2007). Les réactions catalysées par AMY3, LDA et PHS1 sont représentées en gris avec des pointillés, car la perte de ces enzymes ne modifie pas le taux de dégradation de l'amidon. L'importance du transporteur de glucose dans la mobilisation de l'amidon n'a pas encore été prouvée.

D. Le modèle biologique : *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est une petite plante qui est largement utilisée comme organisme modèle en biologie végétale. Elle fait partie de la famille des Brassicaceae ou crucifères, comme certaines espèces cultivées utilisées dans l'alimentation que sont le chou ou le radis. A l'âge adulte, la plante mesure de 20 à 70 cm et possède à sa base, au ras du sol, une rosette de feuilles de 2 à 5 cm de diamètre. Le long de la tige, on trouve également des feuilles qui sont plus longues et plus étroites. Les fleurs blanches mesurent quelques millimètres et sont constituées de quatre sépales et quatre pétales disposés en croix, six étamines et un pistil, comme chez les autres

crucifères (Figure 19). Le mode de reproduction est principalement l'autofécondation et la fécondation amène la fleur à se transformer en une capsule allongée, la silique, offrant 30 à 60 graines. Il existe plus de 750 variétés naturelles d'*Arabidopsis* à travers le monde, qui diffèrent par leur forme, leur développement ou encore leur physiologie. Les écotypes couramment utilisés par les chercheurs sont Columbia (Col), Wassilewskija (WS) et Landsberg *erecta* (Ler) et sont disponibles dans les grands centres de semences tels qu'ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) ou NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre).

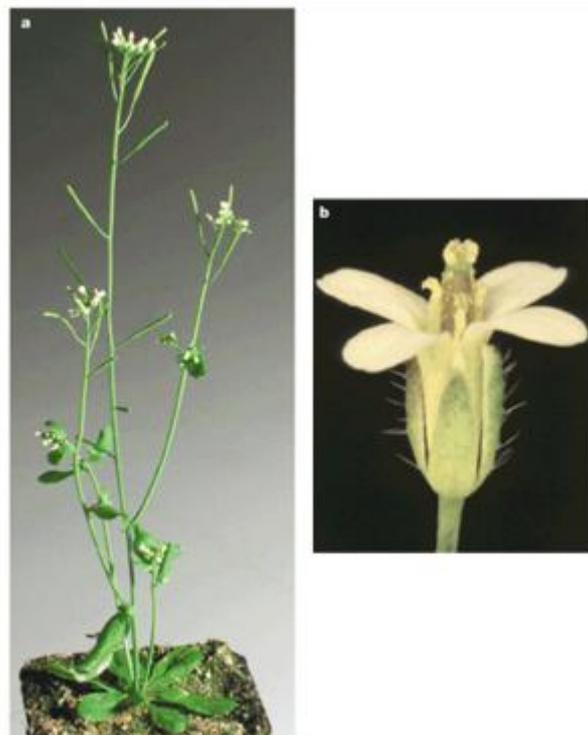


Figure 19 : Vues d'*Arabidopsis thaliana* d'après Page et Grossniklaus (2002). (a) Plant mature, Landsberg *erecta*. (b) Fleur mature.

Plusieurs raisons ont amené la communauté scientifique à faire *d'Arabidopsis thaliana* un modèle d'étude. En premier lieu, elle possède un génome de très petite taille, d'environ 125 Mbases. On y compte environ 26000 gènes répartis sur 5 chromosomes. De plus, ce génome a été totalement séquencé et publié en 2000 par The Arabidopsis Genome Initiative. Elle possède également un cycle de vie court, de 6 à 8 semaines, qui permet l'obtention de très nombreuses graines en peu de temps. Sa petite taille ne nécessite pas d'infrastructure trop lourde et sa culture est relativement

aisée. La mutagenèse insertionnelle, au moyen du phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, représente un système facile de transformation de la plante et la diploïdie de celle-ci permet une sélection plus facile de mutants homozygotes.

Ce phytopathogène est capable d'infecter la plante en présence d'une blessure. Il possède un plasmide Ti (Tumor inducer) qui contient un ADN-T mobile (ADN de transfert). Cet ADN-T intègre de façon aléatoire le génome de la plante lors de l'infection. Afin d'obtenir des mutants d'insertion chez *Arabidopsis*, les gènes de pathogénicité de cet ADN-T sont remplacés par des marqueurs génétiques de sélection et les plantes transformées sont sélectionnées par pulvérisation d'un herbicide (Figure 20). Si la cellule transformée est une cellule reproductrice, alors l'insertion est transmise à la descendance jusqu'à l'obtention d'individus mutants homozygotes. Les sites d'insertion sont ensuite séquencés pour générer les FST (Flanking Sequence Tag) qui sont les séquences bordant le site d'insertion. Il est ensuite aisé de retrouver *in silico* le site exact d'insertion dans le génome d'*Arabidopsis*. Différentes banques de mutants telles que SALK (Etats-unis), Gabi (Allemagne) ou l'INRA de Versailles (France) permettent de trouver facilement une lignée d'intérêt.

pGKB5 T-DNA

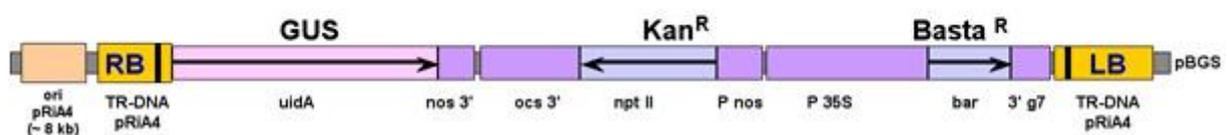


Figure 20 : Représentation schématique de l'ADN-T utilisé à l'INRA de Versailles pour la constitution d'une collection d'environ 50000 mutants. RB et LB : bordures conservées de l'ADN-T, nécessaires à la mobilisation et à l'intégration dans le génome nucléaire de la cellule hôte. GUS : gène rapporteur de la β -glucuronidase. Kan^R : gène de résistance à la kanamycine. Basta^R : gène de résistance à l'herbicide Basta.

E. Objectif de la thèse

L'objectif de cette thèse concerne l'étude de l'implication des enzymes hydrolytiques (amylases) et phosphorolytiques (phosphorylases) lors de la dégradation de l'amidon transitoire dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi, nous avons choisi de tenter de définir quelle(s) est (sont) la (les) forme(s) de β -amylase(s) requise(s) pour effectuer cette dégradation parmi les 9 qui ont été identifiées chez cette plante. Nous avons également cherché à donner une fonction aux α -amylases et à l' α -glucane phosphorylase plastidiales qui reste encore indéterminée. Ainsi, parmi les séquences présentes au sein du génome d'*Arabidopsis*, nous avons consacré notre travail aux enzymes plastidiales ou potentiellement plastidiales que sont AAM3 (At1g69830), BAM1 (At3g23920), 4 (At5g55700) et 8 (At5g45300) et enfin PHS1 (At3g29320).

En plus d'une étude phénotypique complète des lignées simples mutantes pour les amylases, ces dernières ont été croisées avec une lignée double mutante pour les enzymes de branchements, *be2- be3-*, que nous possédons au laboratoire. Cette lignée conduit à l'absence d'amidon ainsi qu'à une suraccumulation de maltose essentiellement présent dans le cytosol (Dumez et al., 2006) et les lignées triples mutantes ainsi construites ont été analysées par une étude phénotypique complète mais également pour leur capacité à produire du maltose tel qu'il s'accumule dans le double mutant *be2- be3-*.

Enfin, une analyse fouillée de la fonction de la phosphorylase plastidiale PHS1 a été entreprise avec l'analyse complète du simple mutant *phs1-* mais également d'un double mutant *ss4- phs1-*. En effet, l'analyse préliminaire de ce double mutant au sein de notre laboratoire montre un phénotype plus drastique que le simple mutant *ss4-*, à savoir, des grains 4 à 5 fois plus volumineux que dans la lignée sauvage et une augmentation spectaculaire de la quantité d'amidon, laissant présager d'une fonction essentiellement catabolique de PHS1 dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana* en absence de la SS4. Cette étude phénotypique sera complétée par l'analyse *in vitro* des caractéristiques enzymologiques de PHS1.

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

Résultats

A. Etude des β -amylases plastidiales

a. Etude des simples mutants

L'étude des β -amylases plastidiales a commencé par une analyse phénotypique complète des simples mutants correspondants *bam1-*, *bam4-* et *bam8-*. Les plantes ont été cultivées en serre avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. L'amidon a été extrait en fin de photopériode puis dosé par une approche enzymatique faisant intervenir une première étape de dégradation complète par l'amyloglucosidase puis une mesure spectrophotométrique de la production de glucose. Dans ces conditions les lignées *bam1-* et *bam8-* semblent accumuler moins d'amidon que la lignée sauvage de référence, Col-o, en fin de photopériode (Tableau 1). Le contenu en amidon est par contre inchangé dans le mutant *bam4-* par rapport au sauvage.

| | Col-o | <i>bam1-</i> | <i>bam4-</i> | <i>bam8-</i> |
|--------------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Quantité d'amidon | 6,8 \pm 0,67 | 4,6 \pm 1,32 | 7,2 \pm 0,95 | 3,5 \pm 1,03 |

Tableau 1 : Contenus en amidon des différentes lignées simples mutantes pour les β -amylases.

Les contenus en amidon ont été déterminés par dosage à l'amyloglucosidase à partir d'échantillons récoltés en fin de photopériode. Les valeurs sont les moyennes \pm ET de trois dosages indépendants.

Afin d'affiner ces résultats, une cinétique d'accumulation d'amidon a été réalisée en enceinte climatique (ce qui permet un meilleur contrôle des paramètres de culture). Les feuilles ont été prélevées toutes les deux heures, l'amidon a été extrait puis dosé. Cette analyse nous permet d'observer que dans ces conditions la lignée *bam1-* accumule environ les mêmes quantités d'amidon que la lignée sauvage (Figure 21). La lignée *bam8-* quant à elle, accumule moins de polysaccharide que la lignée sauvage. Enfin, la lignée *bam4-* accumule beaucoup plus d'amidon que la lignée sauvage avec des taux de synthèse et de dégradation plus élevés. De plus, la régulation du cycle « jour/nuit » semble modifiée dans cette lignée puisque la dégradation du polysaccharide anticipe l'arrivée de la nuit dans le mutant *bam4-*.

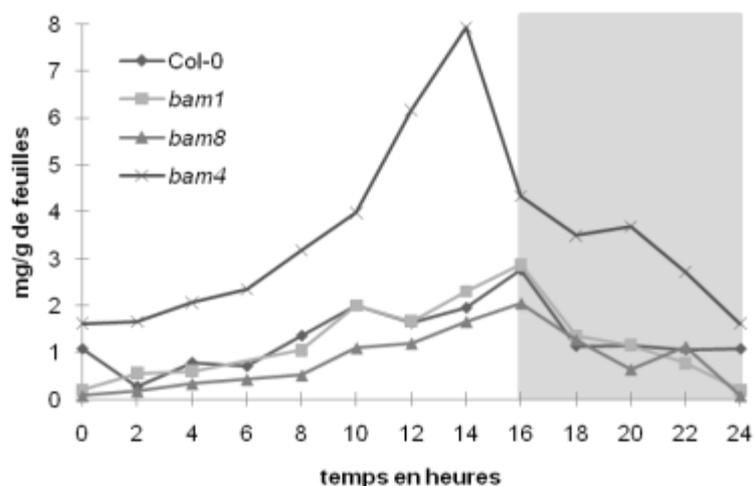


Figure 21 : Cinétique d'accumulation d'amidon dans les lignées Col-0, bam1-, bam4- et bam8-.

Les quantités d'amidon sont exprimées en mg.g⁻¹ de feuilles fraîches. La période de lumière (16 heures) est symbolisée par la zone blanche et la période de nuit (8 heures) par la zone grise.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de Fulton et al. (2008) qui suggèrent un rôle de BAM4 dans la régulation de la dégradation du polysaccharide. BAM8 semble également avoir un rôle important dans le métabolisme du polysaccharide.

Les glucanes et polysaccharides solubles de ces différentes lignées ont également été dosés (Figure 22) et aucune modification significative de la quantité de polysaccharides solubles n'a été observée. Les mutants contiennent cependant beaucoup moins de glucose que la lignée sauvage. La baisse du niveau de dégradation, due aux mutations des β -amylases, pourrait expliquer cette diminution. En effet, il y aurait moins de maltose libéré lors du catabolisme, entraînant une diminution du glucose dans le cytoplasme, après métabolisation de ce maltose.

| | Ap λ_{\max} | Am % |
|-------|---------------------|----------------|
| Col-0 | 559 \pm 5,6 | 29,8 \pm 4,1 |
| bam1- | 550 \pm 2,9 | 20,9 \pm 2,9 |
| bam4- | 545 \pm 3,2 | 21,9 \pm 4 |
| bam8- | 549 \pm 2,9 | 16,9 \pm 3,4 |

Tableau 2 : Structure et composition de l'amidon purifié à partir de la lignée sauvage et des différents mutants.

Les différentes fractions de l'amidon ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur une matrice Sepharose® CL-2B. Les fractions d'amylopectine et d'amylose ont été dosées permettant la détermination du contenu en amylose (Am %). La longueur d'onde au maximum d'absorbance (λ_{\max}) a été contrôlée pour l'amylopectine de chaque lignée (Ap λ_{\max}). Les valeurs représentent les moyennes \pm ET de trois expériences indépendantes.

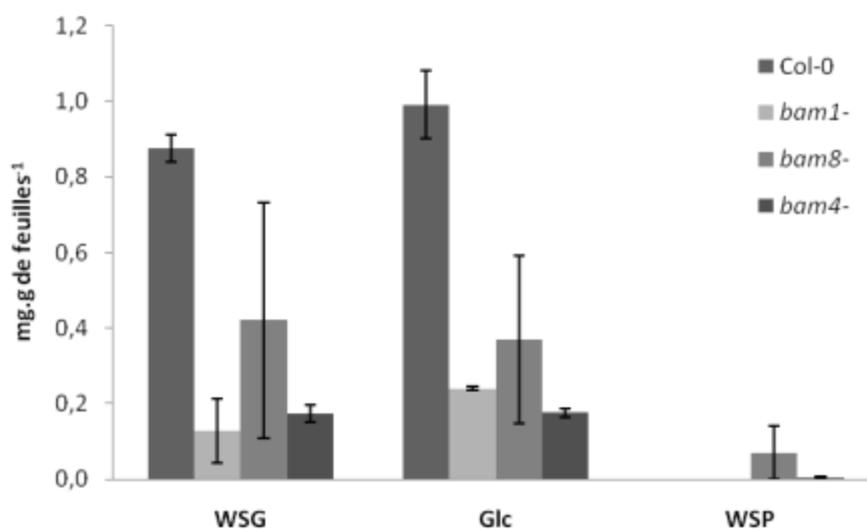


Figure 22 : Quantité de glucanes et polysaccharides solubles accumulés dans les feuilles des différentes lignées étudiées.

Les quantités sont exprimées en mg.g⁻¹ de feuilles et les résultats représentent la moyenne de deux dosages distincts pour chaque lignée. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. L'extraction a été réalisée sur des plantes en fin de jour. WSG: water soluble glucans; WSP: water soluble polysaccharides; Glc: glucose. WSP = WSG-Glc libre.

Nous avons ensuite effectué une analyse structurale de cet amidon avec en premier lieu l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique avec des amidons extraits en fin de jour, les plantes ayant été cultivées en serre avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Cette analyse nous permet d'observer des valeurs de λ_{\max} de l'amylopectine pour les mutants qui diffèrent significativement de la valeur du sauvage, aux alentours de 559 nm (Tableau 2). En effet, dans tous les mutants cette valeur est fortement diminuée, de 9 à 14 nm. La diminution la plus forte étant observée pour la mutant *bam4-* qui affiche un λ_{\max} aux alentours de 545 nm. Ces résultats suggèrent que la structure de l'amylopectine de ces mutants est modifiée, révélant notamment une réduction moyenne de la longueur des glucanes de cette fraction.

De plus, on observe une réduction du contenu en amylose dans tous les mutants, qui ne représente plus que 16 à 20% du contenu total en amidon contre 30% au sein de la lignée Col-0. Cette diminution pourrait être due à la réduction de la dégradation qui entrainerait un accroissement du contenu en amylopectine.

Afin de mettre en évidence les différences structurales des amylopectines mutantes, nous avons établi la distribution de la longueur des chaînes constitutives de la fraction amylopectine après débranchement enzymatique par HPAEC-PAD (Figure 23).

Nous pouvons ainsi observer chez le mutant *bam1-* une augmentation de la quantité de chaînes de DP 6 à 19 ainsi qu'une diminution du nombre de chaînes plus longues de DP 23 à 37. Une légère augmentation de la quantité de chaînes moyennes (DP 13 à 22) est également observée dans le mutant *bam8-* par rapport au sauvage. Le mutant *bam4-* ne présente lui aucune modification significative de distribution en longueur des chaînes d'amylopectine.

BAM1 et BAM8 apparaissent donc nécessaires dans l'édification d'une structure normale de l'amidon.

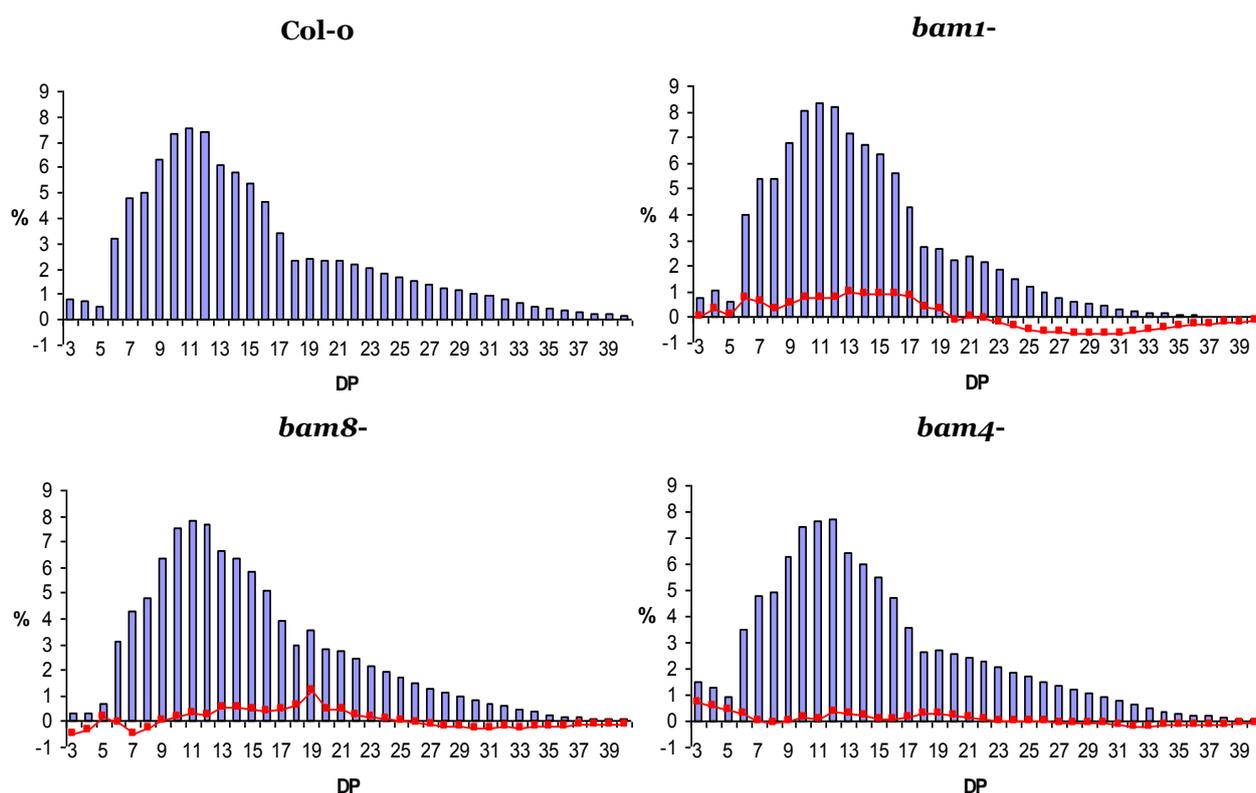


Figure 23 : Comparaison des distributions en longueurs des chaînes constitutives de l'amylopectine des différentes lignées.

Les histogrammes représentent la distribution en longueur de chaînes et la courbe rouge les différentiels entre les souches mutantes et la souche sauvage. Les axes des ordonnées correspondent aux pourcentages relatifs de chaque chaîne pour les histogrammes ou à la différence relative (exprimée en %) entre les deux amylopectines étudiées pour les courbes. L'axe des abscisses correspond aux différents degrés de polymérisation (DP) des chaînes. Ces données représentent les valeurs moyennes de 3 expériences indépendantes pour Col-o et *bam4-* et 2 pour *bam1-* et *bam8-*.

Nous avons ensuite réalisé une analyse enzymatique en dosant *in vitro* différentes activités hydrolytiques et phosphorolytiques impliquées dans le métabolisme de l'amidon. Les résultats de ces dosages (Tableau 3) ne montrent pas de différences significatives pour la plupart des activités testées. Cependant et de façon surprenante, l'activité β -amylase apparaît augmentée dans les lignées mutantes *bam8-* et *bam4-*. L'activité α -amylase, quant à elle, diminue dans les trois lignées mutantes. On remarque également l'augmentation des activités de la D-enzyme et des phosphorylases dans le mutant *bam4-*, qui semble donc être le plus perturbé.

| | α -amylase | β -amylase | D-enzyme | Phosphorylase | Pullulanase | Maltase |
|---------------------|-------------------|------------------|-----------------|---------------|-------------------|-----------------|
| Col-o | 0,27 \pm 0,08 | 2,78 \pm 1,19 | 1,11 \pm 0,58 | 0,437 | 20,66 \pm 10,51 | 0,27 \pm 0,31 |
| <i>bam1-</i> | 0,19 \pm 0,06 | 2,31 \pm 1,28 | 1,2 \pm 0,18 | 0,226 | 18,08 \pm 11,66 | 0,23 \pm 0,21 |
| <i>bam4-</i> | 0,17 \pm 0,05 | 3,48 \pm 1,04 | 1,76 \pm 0,24 | 0,698 | 21,66 \pm 10,2 | 0,31 \pm 0,4 |
| <i>bam8-</i> | 0,22 \pm 0,05 | 3,6 \pm 1,69 | 1,3 \pm 0,1 | 0,207 | 19,56 \pm 6,53 | 0,25 \pm 0,36 |

Tableau 3 : dosages des activités hydrolytiques et phosphorolytiques dans les lignées sauvages et mutantes.

Les activités α - et β -amylase sont exprimées en μ moles de paranitrophénol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité de la D-enzyme et la maltase en μ moles de glc.h⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité phosphorylase en nmoles de Glc1P.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité pullulanase en nmoles de maltotriose.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de trois expériences indépendantes pour la pullulanase et quatre pour les autres activités. L'activité phosphorylase n'a été testée qu'une fois. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Les extractions ont été réalisées en début de jour.

Enfin nous avons étudié les différentes activités enzymatiques par zymogrammes. Les extraits de protéines solubles ont été préparés à partir de feuilles de rosettes de plantes cultivées avec une photopériode 16 h jour/8 h nuit. Après la migration dans des conditions non-dénaturantes, les gels ont été incubés une nuit dans un tampon permettant l'activité des enzymes présentes, puis colorés dans une solution d'iode (I₂/KI).

Le gel révélant les activités synthétases (Figure 24A) nous montre que les différentes activités sont présentes dans toutes les lignées. Cependant, l'activité de la SS3 apparaît diminuée en fin de nuit chez le mutant *bam8-*. L'activité de la SS1 apparaît également diminuée chez ce dernier en fin de nuit et augmenté chez *bam4-*

en fin de jour. Le gel révélant les activités phosphorylases (Figure 24B) nous montre également que les deux activités sont présentes dans tous les échantillons. On observe une diminution de l'activité de la PHS2 dans les lignées *bam1-* et *bam8-* en fin de jour ainsi qu'en fin de nuit pour *bam8-*. L'activité de la PHS1 semble diminuée dans les mutants *bam1-* et *bam8-* en fin de jour. Enfin, le gel révélant les activités modifiant l'amidon (Figure 24C) nous montre que dans le mutant *bam1-* en fin de jour et en fin de nuit, une activité hydrolytique très haute dans le gel, l'activité de l'enzyme de branchement BE2, est fortement diminuée. On voit également dans ce mutant une activité hydrolytique qui semble être RAM1 (ou BAM5, AGI : At4g15210), une β -amylase cytosolique, augmentée dans le bas du gel. Le mutant *bam8-* présente quant à lui en fin de jour une activité hydrolytique non-identifiée fortement augmentée.

Toutes ces activités du métabolisme perturbées au sein des différents mutants témoignent de l'importance de ces enzymes au sein de la plante.

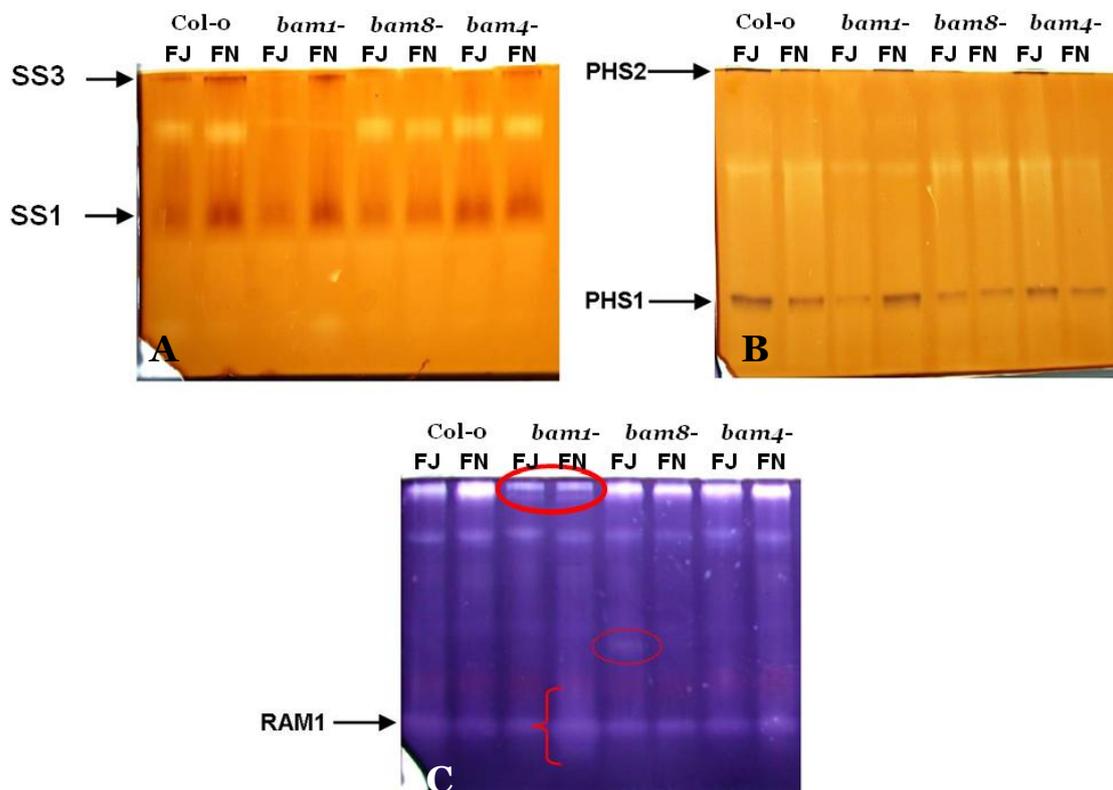


Figure 24 : Gels d'activités enzymatiques révélant les activités amidon synthétases solubles, les activités α -glucanes phosphorylases et les activités modifiant l'amidon.

Environ 100 μ g de protéines ont été déposés pour chaque échantillon. **(A)** Gel révélant les activités amidon synthétases solubles SSI et SSIII. **(B)** Gel révélant les activités α -glucane phosphorylases PHS1 et PHS2. Dans les deux cas (A et B), le gel contient du glycogène de foie de lapin. **(C)** Gel révélant les activités modifiant l'amidon, contenant de l'amidon. FJ : extraction des protéines en fin de jour. FN : extraction des protéines en fin de nuit.

Ces résultats concernant les simples mutants déficients pour les β -amylases laissent donc présager d'un rôle important de ces dernières dans le métabolisme de l'amidon.

b. Etude des triples mutants

Afin d'étudier plus en détail le rôle de chaque β -amylase, nous avons réalisé des croisements des souches simples mutantes *bam1-*, *bam4-* et *bam8-* avec une lignée double mutante pour les enzymes de branchement, *be2-1 be3-2*. Cette dernière ne contient plus d'amidon et sur-accumule du maltose dans le cytosol (Dumez et al, 2006). Les lignées ainsi obtenues seront analysées pour leur capacité à accumuler du maltose tel qu'il s'accumule dans la lignée double mutante *be2-1 be3-2*. Après criblage par PCR (recherche des allèles mutants par insertion de l'ADN-T), les trois triples mutants ont été obtenus. Ce sont les lignées *bam1- be2- be3-*, *bam4- be2- be3-* et *bam8- be2- be3-*. La croissance de ces lignées a été suivie en serre avec une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit (Figure 25).

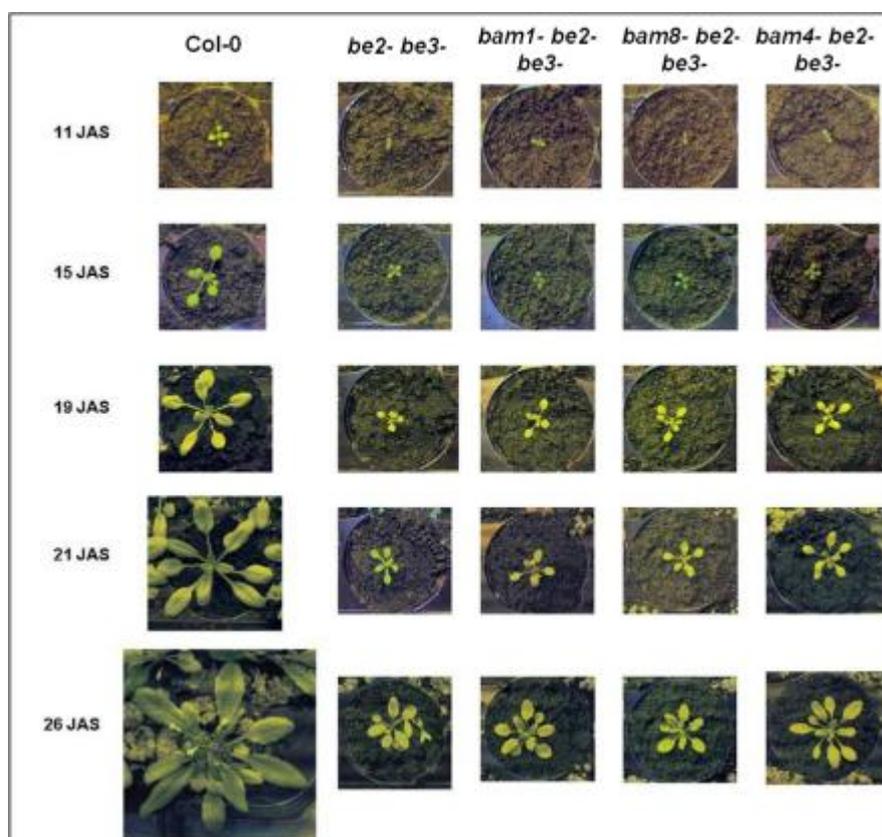


Figure 25 : Comparaison de la croissance des différentes lignées.

Les photos de la lignée sauvage et des différents mutants ont été prises régulièrement après le semis des graines. Les photos sont affichées à la même échelle pour permettre la comparaison directe entre les différentes lignées. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. JAS : Jour après semis.

Le mutant *be2- be3-* présente un sévère retard de croissance décrit dans Dumez et al. (2006). Les triples mutants présentent un retard de croissance similaire à celui-ci et présentent en plus un retard de l'apparition de la hampe florale.

Comme chez le double mutant *be2- be3-*, les triples mutants n'accumulent pas d'amidon. Les glucanes et polysaccharides solubles de ces différentes lignées ont ensuite été extraits et dosés (Figure 26). Le double mutant *be2- be3-* présente une quantité élevée de glucanes solubles. Cette accumulation a été rapportée par Dumez et al., en 2006 et ces glucanes sont pour la plupart du maltose. Les trois triples mutants présentent également cette augmentation des glucanes solubles ainsi que du glucose libre. Cependant cette augmentation est moins marquée chez le mutant *bam4- be2- be3-*.

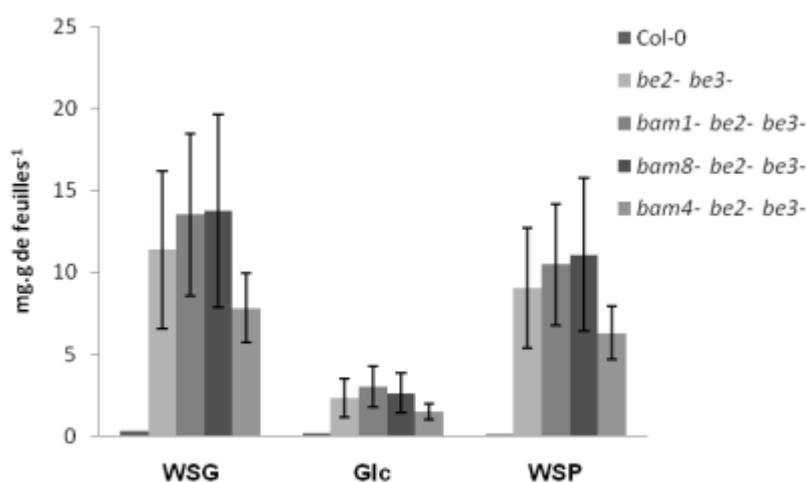


Figure 26 : Quantité de glucanes et polysaccharides solubles accumulés dans les feuilles des différentes lignées étudiées.

Les quantités sont exprimées en mg.g de feuilles⁻¹ et les résultats représentent la moyenne de deux dosages distincts pour chaque lignée. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. L'extraction a été réalisée sur des plantes en fin de jour. WSG: water soluble glucans; WSP: water soluble polysaccharides; Glc: glucose. WSP = WSG-Glc libre.

Afin de déterminer la nature des ces polysaccharides solubles, une étude par chromatographie sur couche mince de silice a ensuite été réalisée avec les WSPs des différentes lignées étudiées (Figure 27). Comme les WSPs du mutant *be2-/be3-* (Dumez et al., 2006), ceux des triples mutants contiennent essentiellement du maltose.

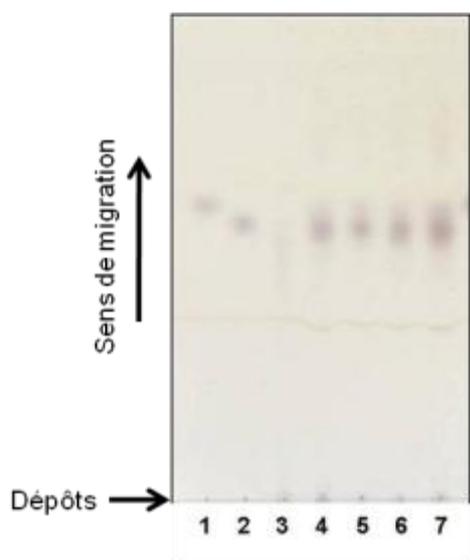


Figure 27 : Chromatographie sur couche mince des WSPs des différentes lignées mutantes.

- 1: Glucose
- 2: Maltose
- 3: Mélange de glucanes de différentes tailles (Glucidex G19)
- 4: *be2- be3-*
- 5: *bam1- be2- be3-*
- 6: *bam8- be2- be3-*
- 7: *bam4- be2- be3-*

Comme pour les simples mutants nous avons ensuite réalisé une analyse enzymatique de ces différentes lignées en faisant des dosages *in vitro* de différentes activités hydrolytiques et phosphorolytiques impliquées dans le métabolisme de l'amidon. Les résultats de ces dosages présentés dans le tableau 4, nous montrent que tous les mutants présentent une augmentation de l'activité α -amylase et de l'activité phosphorylase. Il n'y a par contre aucune différence pour l'activité β -amylase. L'activité D-enzyme est quant à elle augmentée chez les mutants *be2- be3-*, *bam1- be2- be3-* et *bam8- be2- be3-*.

| | α -amylase | β -amylase | D-enzyme | Phosphorylase | Maltase |
|-------------------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Col-o | 0,15 \pm 0,01 | 0,18 \pm 0,02 | 0,79 \pm 0,21 | 0,09 \pm 0,07 | 0,35 \pm 0,09 |
| <i>be2- be3-</i> | 0,22 \pm 0 | 0,13 \pm 0,01 | 1,5 \pm 0,41 | 1,54 \pm 0,12 | 0,59 \pm 0,44 |
| <i>bam1- be2- be3-</i> | 0,23 \pm 0,01 | 0,15 \pm 0,03 | 1,51 \pm 0,58 | 0,7 \pm 0,11 | 0,73 \pm 0,39 |
| <i>bam4- be2- be3-</i> | 0,23 \pm 0,01 | 0,15 \pm 0,01 | 0,62 \pm 0,07 | 0,86 \pm 0,19 | 0,31 \pm 0,11 |
| <i>bam8- be2- be3-</i> | 0,23 \pm 0 | 0,13 \pm 0,01 | 1,28 \pm 0,57 | 2,27 \pm 0,34 | 0,55 \pm 0,02 |

Tableau 4 : Dosages des activités hydrolytiques et phosphorolytiques dans les lignées sauvages et mutantes.

Les activités α - et β -amylase sont exprimées en μ moles de paranitrophénol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité de la D-enzyme et la maltase en mmoles de glc.h⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité phosphorylase en nmoles de Glc1P.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de deux expériences indépendantes pour la β -amylase et trois pour les autres activités. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Les extractions ont été réalisées en début de jour.

De plus, à l'aide de gels révélant les activités enzymatiques, nous observons que toutes les activités synthétases et phosphorylases sont présentes dans chaque mutant (Figure 28A et B). Cependant nous observons une augmentation de l'activité de la SS1 dans les lignées *bam8- be2- be3-* en fin de jour et fin de nuit et *bam4- be2- be3-* en fin de jour. L'activité de la PHS2 est augmentée chez le mutant *be2- be3-* en fin de jour alors que la PHS1 voit son activité augmentée chez tous les mutants. Enfin, le gel révélant les activités modifiant l'amidon (Figure 28C) montre une activité hydrolytique non-identifiée fortement augmentée chez *bam1- be2- be3-*.

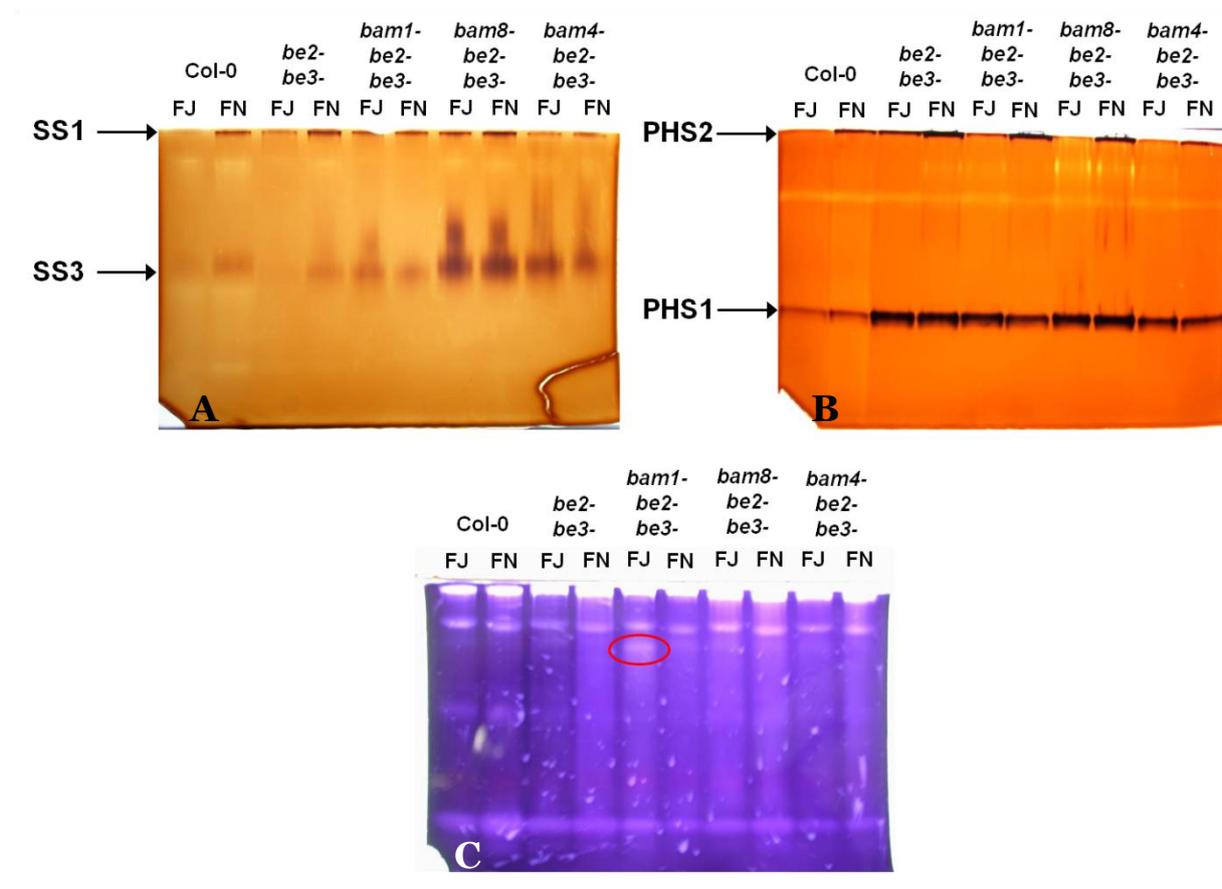


Figure 28 : Gels d'activités enzymatiques révélant les activités amidon synthétases solubles, les activités α -glucanes phosphorylases et les activités modifiant l'amidon.

100 μ g de protéines ont été déposés pour chaque échantillon. **(A)** Gel révélant les activités amidon synthétases solubles SSI et SSIII. **(B)** Gel révélant les activités α -glucane phosphorylases PHS1 et PHS2. Dans les deux cas (A et B), le gel contient du glycogène de foie de lapin. **(C)** Gel révélant les activités modifiant l'amidon, contenant de l'amidon. FJ : extraction des protéines en fin de jour. FN : extraction des protéines en fin de nuit.

L'ensemble de ces résultats ne nous a pas permis d'attribuer un rôle précis aux β -amylases étudiées, cependant BAM4 semble avoir un rôle important dans la régulation de la dégradation de l'amidon. BAM8 et BAM1 apparaissent importants dans le métabolisme du polysaccharide, leur absence entraînant une modification structurale ainsi que des modifications des activités d'autres enzymes.

B. Etude de l' α -amylase plastidiale AAM3

La lignée mutante homozygote *aam3-* a été étudiée et également croisée avec le double mutant *be2-be3-* afin d'analyser le contenu en maltose du triple mutant *aam3- be2- be3-*, comme pour l'étude des β -amylases. La croissance de ces différentes lignées a été suivie en serre avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit (Figure 29).

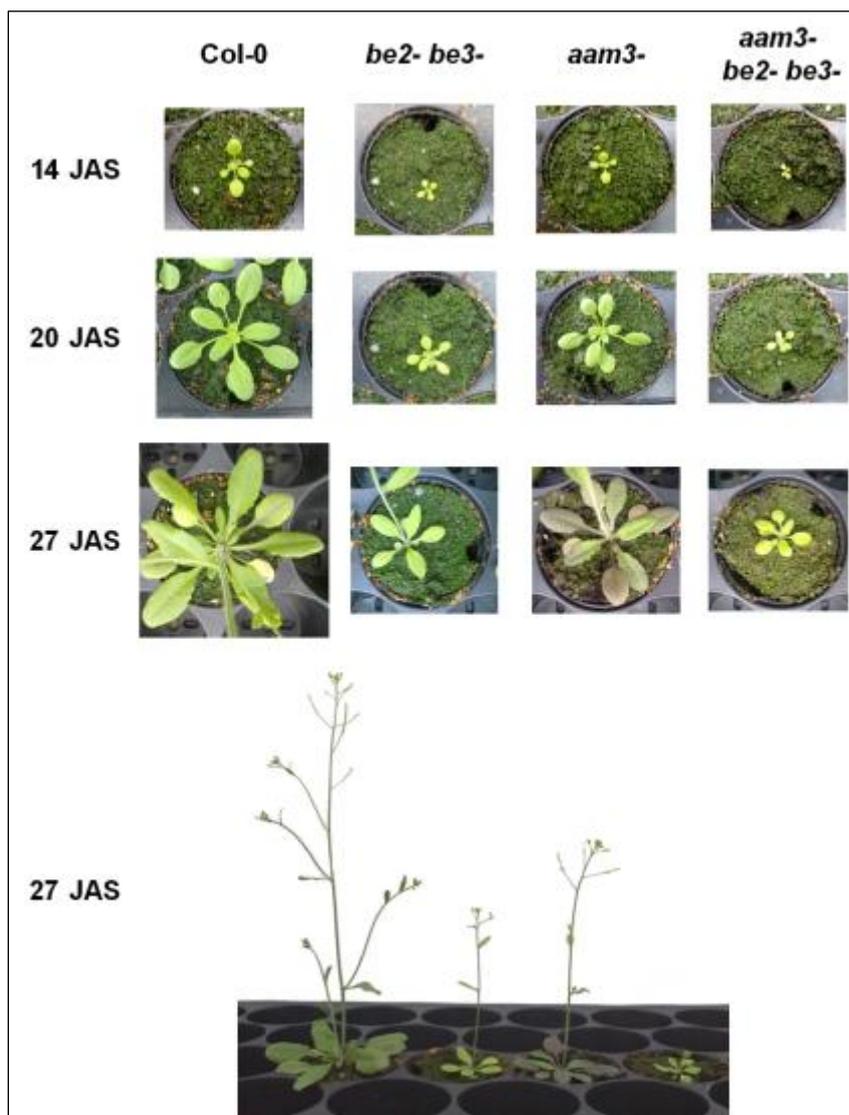


Figure 29 : Comparaison de la croissance des différentes lignées.

Les photos de la lignée sauvage et des différents mutants ont été prises régulièrement après le semis des graines. Les photos sont affichées à la même échelle pour permettre la comparaison directe entre les différentes lignées. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. JAS : Jour après semis.

La lignée mutante *aam3-* présente un retard de croissance moins sévère que celui du double mutant *be2- be3-*, alors que le triple mutant présente, lui, une croissance encore plus altérée, attestant de l'importance d'AAM3 au sein de la plante.

Les plantes ont été cultivées en serre avec une photopériode de 16h de jour et 8 h de nuit et récoltées en fin de phase lumineuse. La quantité d'amidon extrait a été déterminée par dosage à l'amyloglucosidase et comparée à celle de la lignée sauvage Col-o. Le triple mutant n'accumule plus d'amidon, comme le double mutant *be2- be3-*. Les résultats présentés dans le tableau 5 montrent que le simple mutant *aam3-*, déficient pour l' α -amylase 3, accumule un peu moins d'amidon que la lignée sauvage suggérant un rôle de cette dernière dans le métabolisme du polysaccharide, plutôt dans l'anabolisme.

| | Col-o | <i>aam3-</i> |
|--------------------------|-----------------|---------------------|
| Quantité d'amidon | 4,07 \pm 0,43 | 2,90 \pm 0,62 |

Tableau 5 : Contenus en amidon de la lignée sauvage Col-o et du mutant *aam3-*.

Les contenus en amidon ont été déterminés par dosage à l'amyloglucosidase à partir d'échantillons récoltés en fin de photopériode. Les valeurs sont les moyennes \pm ET de trois dosages indépendants.

Les sucres et polysaccharides solubles extraits à l'acide perchlorique ont ensuite été dosés. Le mutant *aam3-* ne présente pas de différence avec la souche sauvage (Figure 30). On retrouve chez le triple mutant la suraccumulation observée chez le double mutant *be2- be3-*.

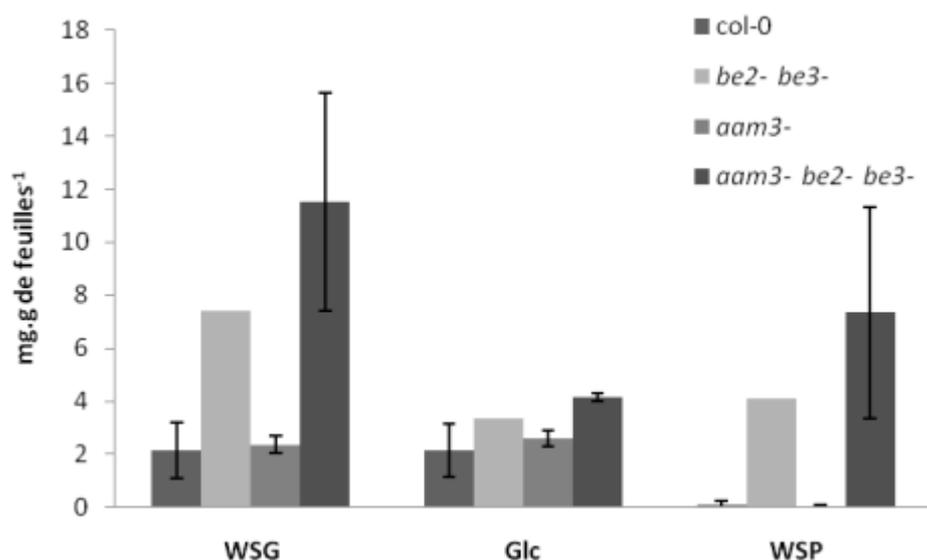


Figure 30 : Quantité de glucanes et polysaccharides solubles accumulés dans les feuilles des différentes lignées étudiées.

Les quantités sont exprimées en mg.g⁻¹ de feuilles et les résultats représentent la moyenne de quatre dosages distincts pour les lignées Col-o et *aam3-* et trois dosages pour le triple mutant. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. L'extraction a été réalisée sur des plantes en fin de jour. WSG: water-soluble glucans; WSP: water-soluble polysaccharides; Glc: glucose. WSP = WSG-Glc libre.

Afin d'analyser la structure et la composition de l'amidon produit par le mutant *aam3-*, l'amylose et l'amylopectine sont séparées par chromatographie d'exclusion stérique sur une matrice de Sepharose® CL-2B. Le pourcentage d'amylose et la longueur d'onde au maximum d'absorbance (λ_{\max}) de l'amylopectine ont ensuite été déterminés (Tableau 6). Aucune modification significative n'a été observée.

| | Ap λ_{\max} | Am % |
|--------------|---------------------|------------|
| Col-o | 550 ± 1,7 | 33,3 ± 7,4 |
| <i>aam3-</i> | 552 ± 1,2 | 36,3 ± 5,7 |

Tableau 6 : Structure et composition de l'amidon purifié à partir de la lignée sauvage et du mutant *aam3-*.

Les valeurs représentent les moyennes ± ET de trois expériences indépendantes.

Afin de pousser plus loin nos investigations, l'amylopectine purifiée a été débranchée et la distribution de la longueur des chaînes a été établie comme précédemment. On peut ainsi observer des différences mineures avec une légère augmentation des très courtes chaînes de DP 5 et 6 associée à une diminution de la quantité de chaînes intermédiaires de DP 17 et 18 au sein du mutant *aam3-* (Figure 31).

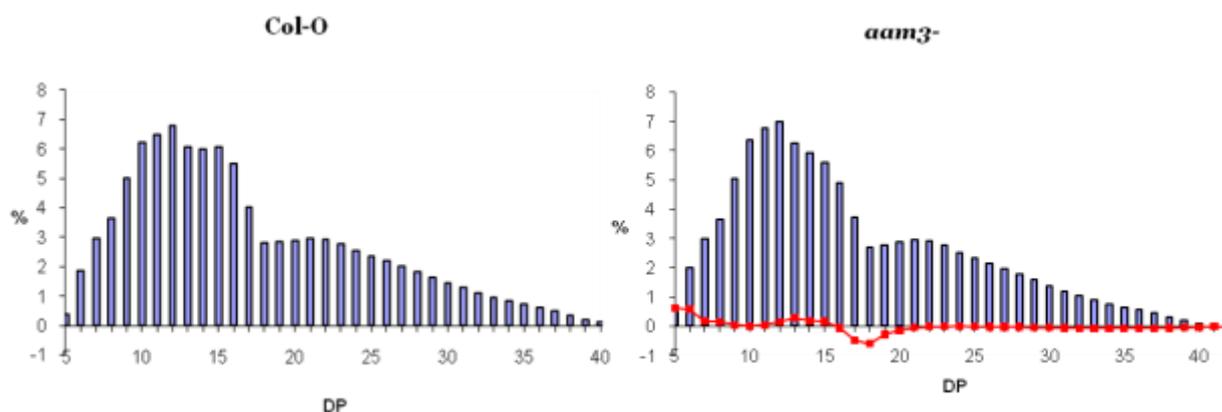


Figure 31 : Comparaison des distributions en longueurs des chaînes constitutives de l'amylopectine.

Les histogrammes représentent la distribution en longueur de chaînes et la courbe rouge les différentiels entre la souche mutante et la souche sauvage. Les axes des ordonnées correspondent aux pourcentages relatifs de chaque chaîne pour les histogrammes ou à la différence relative (exprimée en %) entre les deux amylopectines étudiées pour les courbes. L'axe des abscisses correspond aux différents degrés de polymérisation (DP) des chaînes. Ces données représentent les valeurs moyennes de trois expériences réalisées sur différents lots.

Les activités hydrolytiques et phosphorolytiques liées au métabolisme de l'amidon ont ensuite été testées *in vitro* et les résultats de ces dosages sont présentés dans le tableau 7. Seule l'activité de la maltase reste inchangée dans l'ensemble des lignées. Les activités α -glucanes phosphorylases et D-enzyme sont augmentées chez les mutants déficients en enzymes de branchement. Enfin, l'activité pullulanase et de façon plus surprenante l'activité des α -amylases sont largement augmentées dans tous les mutants par rapport à la lignée Col-o.

| | α-amylase | D-enzyme | Phosphorylase | Pullulanase | Maltase |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------------|--------------------|-----------------|
| Col-o | 0,16 \pm 0,02 | 0,80 \pm 0,38 | 1,68 \pm 0,58 | 36,33 \pm 5,69 | 1,82 \pm 0,16 |
| <i>be2- be3-</i> | 0,33 \pm 0,07 | 1,26 \pm 0,39 | 3,53 \pm 1,62 | 65,11 \pm 8,60 | 1,72 \pm 0,25 |
| <i>aam3-</i> | 0,28 \pm 0,01 | 0,79 \pm 0,68 | 1,30 \pm 0,61 | 65,35 \pm 10,26 | 1,61 \pm 0,52 |
| <i>aam3- be2- be3-</i> | 0,26 \pm 0,03 | 1,10 \pm 0,09 | 4,18 \pm 1,46 | 66,28 \pm 15,01 | 1,97 \pm 1,13 |

Tableau 7 : Dosages des activités hydrolytiques et phosphorolytiques dans les lignées sauvages et mutantes.

L'activité α -amylase est exprimée en μ moles de paranitrophénol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité de la D-enzyme et la maltase en mmoles de glc.h⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité phosphorylase en nmoles de Glc1P.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. L'activité pullulanase en nmoles de maltotriose.min⁻¹.mg de protéines⁻¹. Les valeurs représentent la moyenne \pm ET de trois expériences indépendantes pour chaque activité. Les plantes ont été cultivées en serre avec une période de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Les extractions ont été réalisées en début de jour.

Les autres activités enzymatiques ont été testées sur zymogrammes. On observe sur les gels révélant les activités synthétases que la SS1 voit son activité augmentée au sein des mutants dépourvus d'activités de branchement (Figure 32A). Le gel révélant les activités α -glucanes phosphorylases confirme les résultats obtenus *in vitro* avec l'augmentation de l'activité de PHS1 chez *be2- be3-* et le triple mutant *aam3- be2- be3-* (Figure 32B). Enfin l'activité de RAM1 (ou BAM5, AGI : At4g15210), une β -amylase cytosolique, semble être largement augmentée au sein du mutant *aam3-* et du double mutant *be2- be3-* en fin de nuit (Figure 32C).

Tous ces bouleversements au sein du métabolisme suggèrent une fonction importante de l' α -amylase 3 au sein de la feuille d'*Arabidopsis*, sans cependant nous éclairer sur celle-ci.

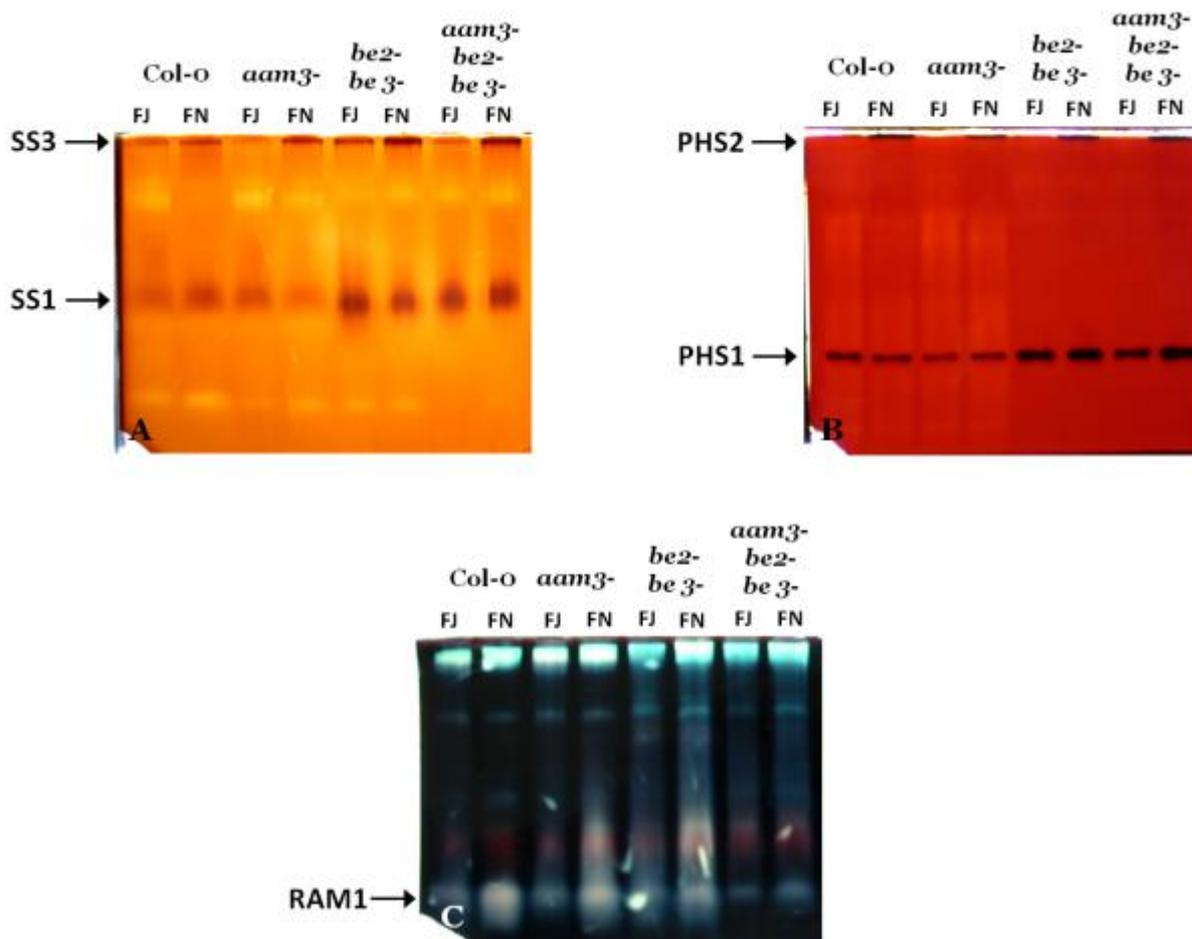


Figure 32 : Gels d'activités enzymatiques révélant les activités amidon synthétases solubles, les activités α -glucanes phosphorylases et les activités modifiant l'amidon.

100 μ g de protéines ont été déposés pour chaque échantillon. **(A)** Gel révélant les activités amidon synthétases solubles SSI et SSIII. **(B)** Gel révélant les activités α -glucanes phosphorylases PHS1 et PHS2. Dans les deux cas (A et B), le gel contient du glycogène de foie de lapin. **(C)** Gel révélant les activités modifiant l'amidon, contenant de l'amidon. FJ : extraction des protéines en fin de jour. FN : extraction des protéines en fin de nuit.

C. Etude de la phosphorylase plastidiale PHS1

Les résultats présentés dans cette partie feront l'objet d'une publication, en cours de rédaction. Cette partie est donc présentée en anglais avec une structure d'article.

a. Phenotypic characterization of mutants

Plants were cultured in growth cabinets under a 12-h-light/12-h-dark photoperiod at 70% humidity and growth phenotype was observed and compared with the wild-type plant (Figure 33). Mutants lacking the SSIV protein, *ss4-* and *ss4-phs1-* mutants, showed a lower growth rate, in accordance with previous results according to Roldàn et al. (2007) for *ss4-* mutants. In contrast, the *phs1-* mutant exhibited a phenotype close to the wild-type line. Under all growth conditions described in Methods, we have never observed more lesions on leaves of mature *phs1-* mutant in comparison to the wild-type plant. This result is different to that described by Zeeman et al. (2004), suggesting that growth conditions actually influence a lot appearance of this phenotype.

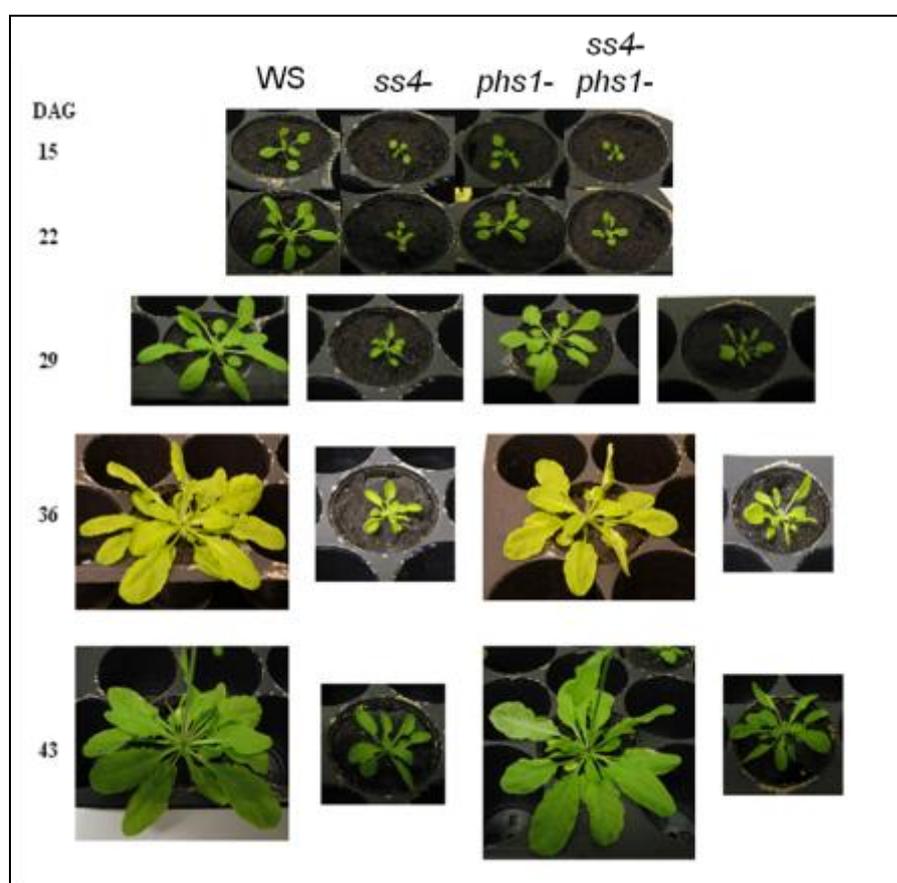


Figure 33 : Growth phenotypes of wild-type, *ss4-*, *phs1-* and *ss4-phs1-* mutants.

Plants were cultured in growth cabinets with a 12-h-light/12-h-dark photoperiod. Pictures were picked regularly after seed germination and are showed at the same ladder to allow direct comparison between different lines. DAG: Days After Germination

Starch levels in leaves were also determined in mutants. Growth conditions were the same but plants were placed in continuous dark after the final light period (Figure 34). *ss4-* and *phs1-* accumulated a little bit more starch than the wild-type at the end of the light period, in disagreement with both results from Roldàn et al. (2007), Szydlowski et al. (2009) and Zeeman et al. (2004). The most dramatic phenotype was observed in the double mutant *ss4- phs1-*, which accumulated 376% of the starch content determined in the wild type. Both synthesis and degradation rates were reduced in this double mutant than in WT ecotype and their regulation seemed to be altered. In addition, starch was not completely degraded after 60 hours of darkness. These data suggest that PHS1 is required for starch degradation in *Arabidopsis* leaves.

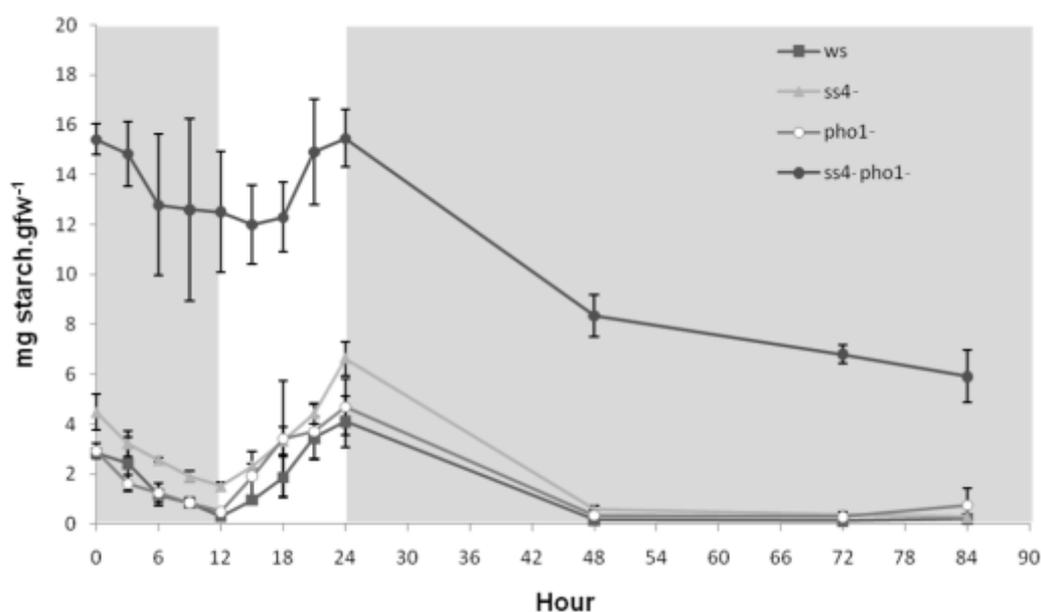


Figure 34 : Starch accumulation in wild-type, *ss4-*, *phs1-* and *ss4- phs1-* mutants.

Plants were cultured under a 12-h-light/12-h-dark photoperiod in growth cabinets for 21 d and then they were placed in continuous dark after the final light period. One leaf was collected from three plants for each line at the indicated time. The starch content in these leaves was determined by enzymatic assay as described in Methods. Each point is the mean \pm SE from three independent experiments. White and gray areas in the graph correspond to day and night, respectively. gfw, gram fresh weight.

Finally, the levels of water soluble polysaccharides (WSP) and glucose were determined in both mutant strains (Figure 35). No difference in the WSP level was observed between mutants and WT plants. However, the intracellular level of glucose

was higher in mutants lacking SSIV, which is consistent with result from Roldàn et al. (2007).

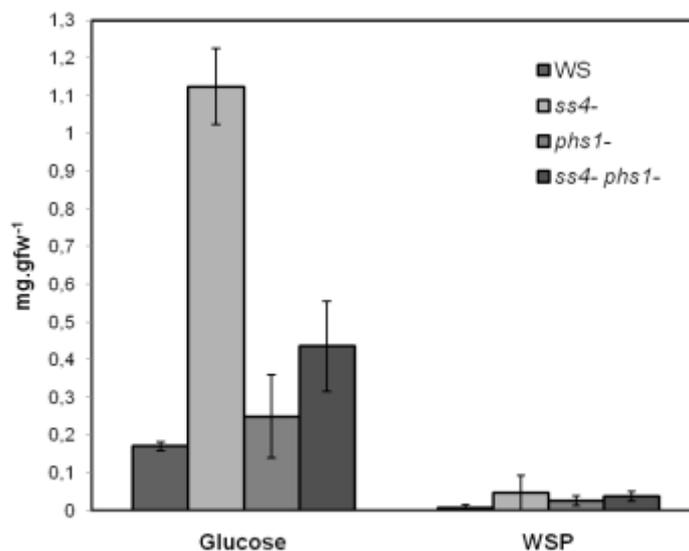


Figure 35 : Sugar Content in Leaves mutant and Wild-Type Plants.

Leaves from plants cultured under a 12-h-light/12-h-dark photoperiod in growth cabinets were collected at midday, and their levels of glucose and WSPs were determined as described in Methods. Each point is the mean \pm SE from two independent experiments.

b. Enzymological characterization

The levels of enzyme activities involved in the synthesis and the degradation of starch were determined in mutant lines using both zymograms and *in vitro* assays (see Methods). Total α -glucan phosphorylase activity was significantly lower in *phs1*-mutant than in the wild type at the end of both periods (Figure 36).

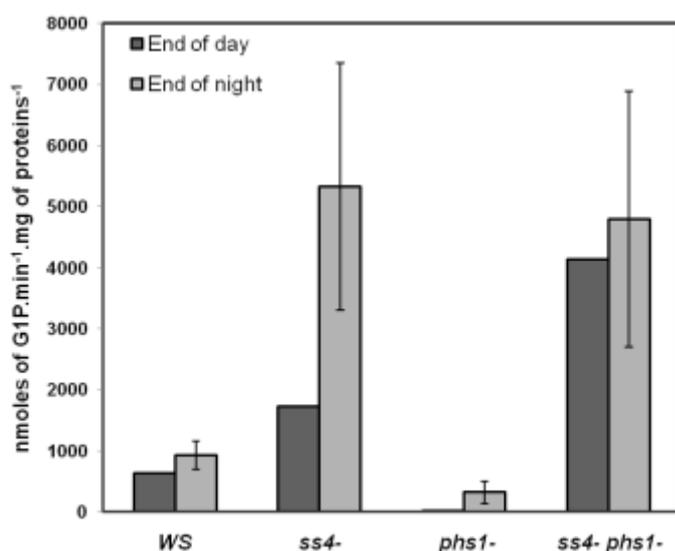


Figure 36 : α -glucan phosphorylase activity of the different mutants.

Leaves from 3-week-old plants cultured under a 12-h-light/12-h-dark photoperiod in growth cabinets were collected at the end of the day or the end of the night. The total α -glucan phosphorylase activity was determined as described in Methods. Each point is the mean \pm SE from three independent experiments for data at the end of the night.

This activity was increased in mutants lacking SSIV protein. Zymogram analysis showed that PHS1 protein is lacking in both *phs1-* and *ss4- phs1-* and that PHS2 activity was enhanced in the double mutant (Figure 37). Both α -glucan phosphorylase activities were enhanced in *ss4-* line, consistent with results described by Roldàn et al. (2007).

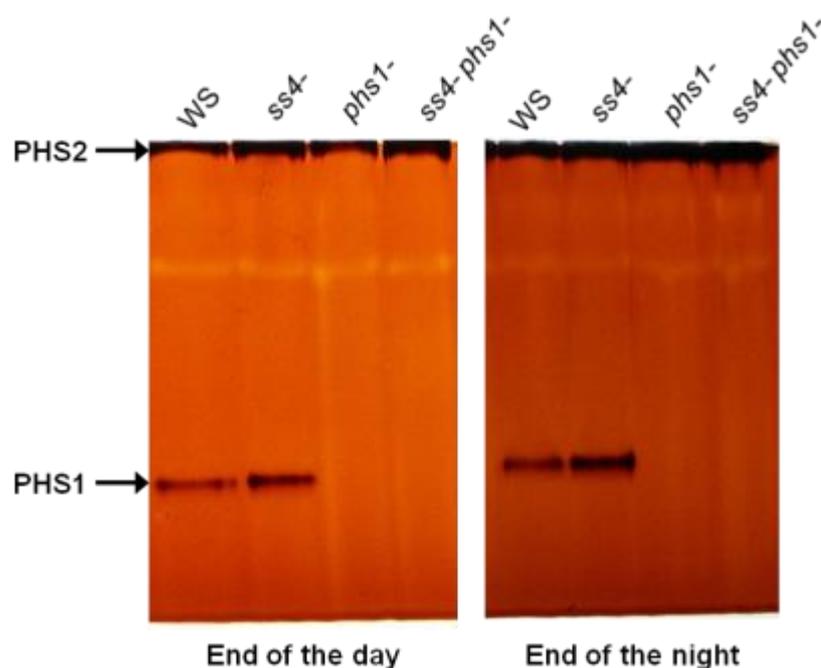


Figure 37 : Zymograms of starch phosphorylase activities.

Approximately 100 μ g of proteins from leaf crude extract were loaded on glycogen-containing polyacrylamide gel. After separation and incubation overnight at room temperature in the presence of Glc1P at 20 mM, starch-phosphorylase activities (in the sense of glucan synthesis) were revealed by iodine staining. PHS2, cytosolic form of starch phosphorylase (At3g46970); PHS1, plastidial form of starch phosphorylase (At3g29320).

Other enzymes of starch metabolism were assayed (Table 8). At the end of the light period, disproportioning enzyme activity remained unaffected. α -amylase and pullulanase activities were decreased, while maltase activity was increased in all mutants. At the end of the dark period, α -amylase and pullulanase activities were unchanged. Disproportioning enzyme activity was decreased in mutants lacking PHS1 and maltase activity was decreased in *ss4-* mutant.

| | α -amylase ^a | D-enzyme ^b | pullulanase ^c | Maltase ^b |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|
| End of light | | | | |
| WS | 0,23 | 4,14 | 48,3 | 1,02 |
| <i>ss4-</i> | 0,19 | 4,09 | 32,1 | 1,49 |
| <i>phs1-</i> | 0,13 | 3,38 | 28,4 | 1,39 |
| <i>ss4- phs1-</i> | 0,15 | 3,29 | 40,8 | 1,18 |
| End of darkness | | | | |
| WS | 0,14 ± 0.02 | 3,26 ± 0.48 | 30,5 ± 5.94 | 0,96 ± 0.2 |
| <i>ss4-</i> | 0,16 ± 0.04 | 4,46 ± 1.09 | 24,4 ± 8.57 | 1,54 ± 0.05 |
| <i>phs1-</i> | 0,14 ± 0.02 | 2,52 ± 0.37 | 24,8 ± 11.86 | 0,99 ± 0.14 |
| <i>ss4- phs1-</i> | 0,14 ± 0.02 | 2,53 ± 0.04 | 26,6 ± 5.02 | 1,01 ± 0.12 |

Table 8 : Activity of starch-related enzymes in the wild-type and mutants.

^a Ceralpha Units.

^b Activity defined as μ moles of glc.hour⁻¹.mg of proteins⁻¹.

^c Activity defined as nmoles of maltotriose.min⁻¹.mg of proteins⁻¹.

Values are the mean ± SE of three independent determinations for data at the end of the darkness.

In all conditions, starch synthase activities of SSI and SSIII proteins were unaffected (Figure 38A) whereas, β -amylase activity of RAM1 protein (or BAM5. AGI : At4g15210), a cytosolic β -amylase, appeared enhanced in mutants lacking SSIV (Figure 38B).

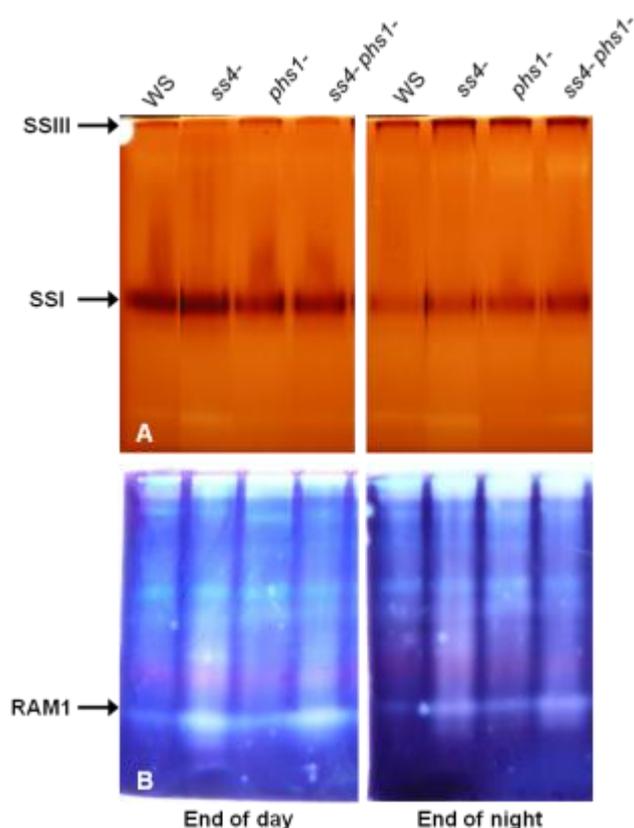


Figure 38 : Zymograms of starch-related enzymes activities.

Approximately 100 μ g of proteins from leaf crude extract were loaded.

(A) Zymogram of soluble synthase activities containing glycogen as substrate.

(B) Zymogram of starch modifying enzymes activities containing starch as substrate.

c. Structural analysis of starch

Microscopy analysis of starch showed the presence of larger starch granules with altered morphology in *ss4-* mutant (Figure 39B and F). In *ss4- phs1-* line, the enlargement of granules was more dramatic since granules in this mutant were 4 to 5 fold larger than those of the wild-type ecotype (Figure 39C and G).

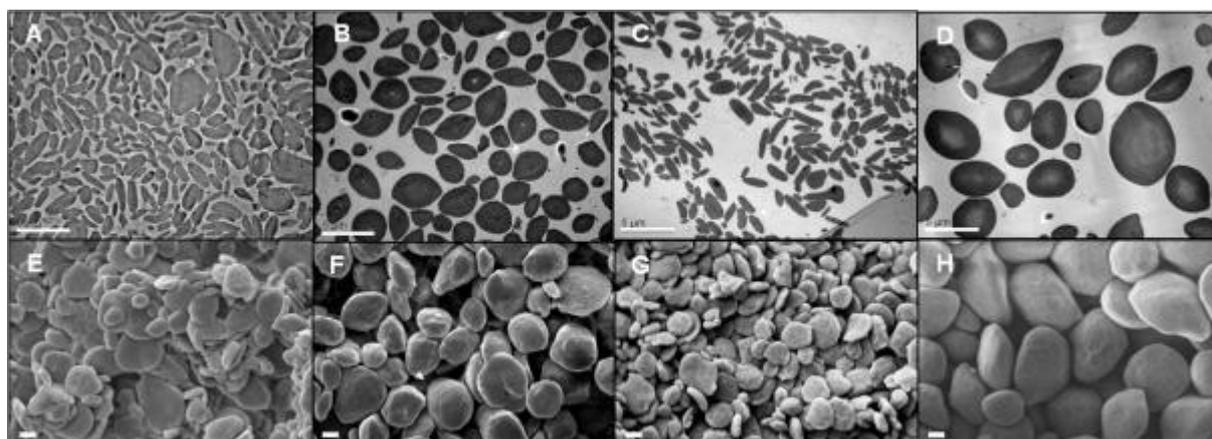


Figure 39 : Microscopy of purified starch from wild-type and mutant plants.

Transmission electron microscopy ([A], [B], [C] and [D]) and scanning electron microscopy ([E], [F], [G] and [H]) images show the differences in the starch granule sizes and morphology of the plants. Samples were processed for microscopy as described in Methods. The wild type ([A] and [E]) and *ss4-* ([B] and [F]), *phs1-* ([C] and [G]), and *ss4- phs1-* ([D] and [H]) mutant plants. Bars = 5 μ m in (A), (B), (C) and (D) and 1 μ m in (E), (F), (G) and (H).

We then proceeded to analyze the structure and composition of mutants' starch. Results displayed in table 9, showed a minor increase in amylose in both mutants lacking PHS1. λ_{\max} of amylopectin was also a little altered in those mutants, revealing some changes in amylopectin structure. No significant changes have been observed in *ss4-* mutant.

| | Ap λ_{\max} | Am % |
|-------------------|---------------------|--------------|
| WS | 566 \pm 7,2 | 17 \pm 4,2 |
| <i>ss4-</i> | 564 \pm 4,0 | 17 \pm 1,2 |
| <i>phs1-</i> | 562 \pm 6,3 | 22 \pm 7,0 |
| <i>ss4- phs1-</i> | 561 \pm 4,8 | 26 \pm 2,6 |

Table 9 : Structure and composition analyses of purified starch from wild-type and mutants.

2 mg of each starch sample were subjected to CL-2B gel permeation chromatography. Both amylopectin and amylose fractions were then assayed allowing the determination of the amylose content (Am %). The wavelength at the maximum absorption (λ_{\max}) was monitored for amylopectin of each strain (Ap λ_{\max}).

Values are the mean \pm se of four independent experiments.

Analyses of chain length (CL) distributions revealed significant differences for amylopectin purified from *phs1*- (Figure 40C and F) and *ss4-phs1*- (Figure 40D and G) mutants. In both mutants, we observed an enrichment of short glucans with a degree of polymerization (number of glucose residues [dp]) of 5 to 12. This enrichment is accompanied with a decrease of longer chains with a dp of 20 to 40 for amylopectin from *phs1*- line and 11 to 25 for the double mutant. We conclude that PHS1 is important for normal starch synthesis. In accordance with results described by Roldàn et al. (2007) and Szydłowski et al. (2009), *ss4*- line showed minor differences on amylopectin structure compared to wild-type ecotype (Figure 40B and E).

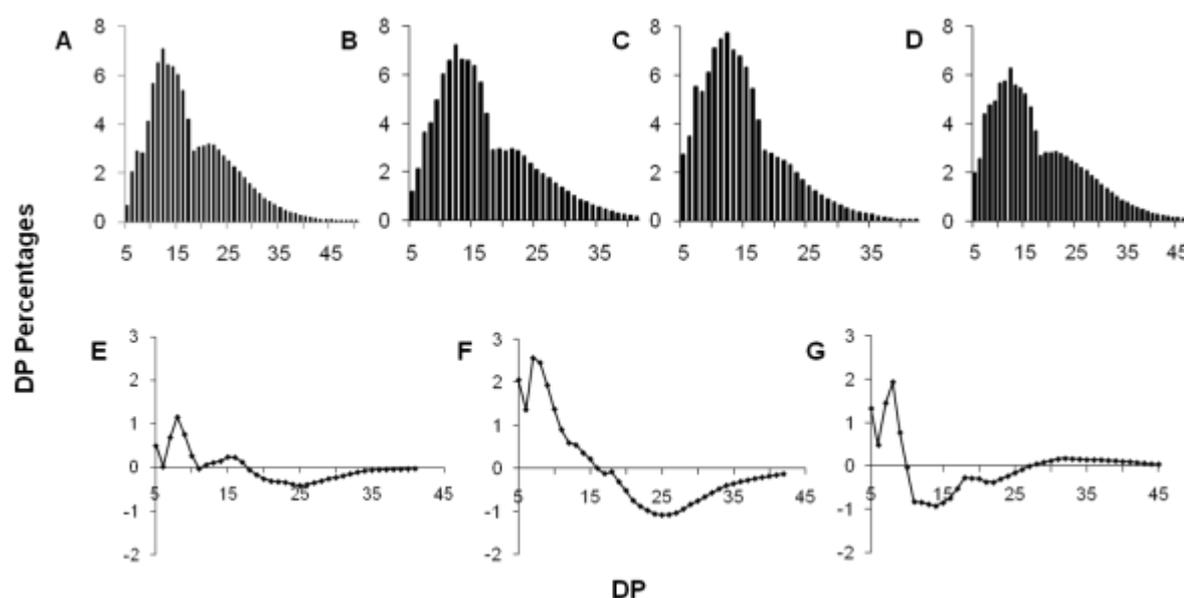


Figure 40 : Chain-length distribution of amylopectin extracted from wild-type and mutant strains.

Amylopectin was purified on a CL-2B column and subsequently debranched with isoamylase. The resulting linear glucans were analyzed by FACE. **(A)** Debranched chains of gel permeation chromatography purified amylopectin from wildtype. Plots **(B)**, **(C)** and **(D)** correspond respectively to the chain length distributions obtained for the amylopectins produced by the *ss4*-, *phs1*- and *ss4-phs1*- mutants. Plots **(E)**, **(F)** and **(G)** correspond respectively to the subtractive analysis from *ss4*-, *phs1*- and *ss4-phs1*- mutants minus that of the wild-type.

d. Enzymatic characterization of PHS1

We then proceeded to characterize the enzymatic parameters of His6-tagged recombinant PHS1 mature protein (excluding the chloroplast targeting peptide).

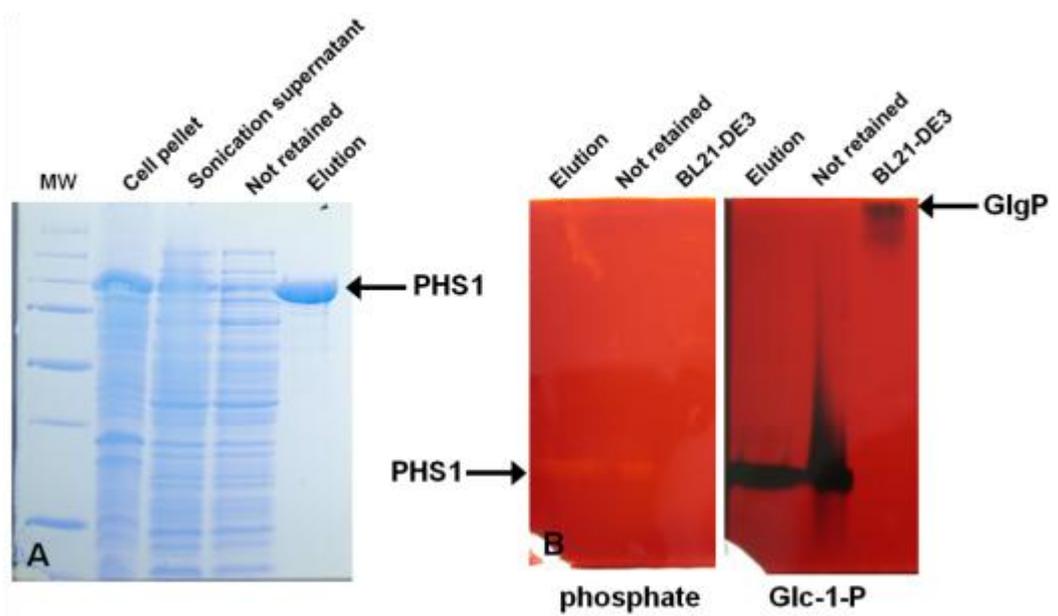


Figure 41 : Expression and activity of recombinant PHS1 expressed in *E.coli*.

Purified fractions of PHS1 were used to determine the activity of this protein.

A : SDS-PAGE revealing proteins. PHS1 protein have a theoretical mass of 108,5 kDa.

MW : molecular weight.

B : Detection of PHS1 activity in native PAGE containing glycogen. After electrophoresis, gels were incubated overnight in a medium containing phosphate (phosphorolysis) or Glc-1-P (synthesis) and then stained with iodine solution to reveal white and dark bands (indicated by arrows) where α -glucan phosphorylase had degraded or elongated linear chains respectively.

Recombinant PHS1 displayed activities of 53.6 ± 27.9 and 689.3 ± 244.3 nmol Glc1P.min⁻¹.mg protein⁻¹ using amylopectin and glycogen as substrate, respectively. As shown in Figure 41, *E. coli* expressed PHS1 produced only one activity band, corresponding to PHS1 activity detected in crude leaf extracts using this zymogram assay (see figure 37). The activity exhibits a temperature optimum of 30°C. The pH optimum was estimated at 7.5. We pursued the characterisation by measuring affinities and catalytic efficiencies (K_{catmax}/K_M) of PHS1 for different substrates and for orthophosphate (Table 10). The enzyme did not show any significant activity toward maltose and shown some detectable activity toward maltotriose (DP3) but significant degradation activity was detected for maltopentose (DP5) and longer MOSs. This result is consistent with previous findings (Steup, 1988).

In order to understand differences in granule size and starch content observed in the double mutant *ss4- phs1-*, we tested the recombinant protein ability to degrade different substrates, in particular starch extracted from the different mutants studied in this work (Table 10).

Affinity and catalytic efficiency measured with phytoglycogen were very close to those obtained with glycogen. These results are consistent with the fact that these two substrates share a very similar structure. Affinity and catalytic efficiency showed a real increase at the same time as MOSs lengthening, since these were 6 fold and more over 300 fold higher, respectively, toward DP7 than DP3. PHS1 exhibited also a very much higher affinity and catalytic efficiency for low branched substrates. The highest affinity was observed toward amylopectin extracted from wild-type line and was around 90 fold higher than the affinity toward glycogen. This amylopectin was purified using gel permeation chromatography and so, underwent some treatments such as heating with 100°C. Affinity toward DP7 was 40 fold higher than toward glycogen, which displays a branched structure. Catalytic efficiency measured for glycogen was from 60 fold to around 600 fold lower than for amylopectin and DP7, respectively.

| Co-substrate : Pi (mM) ^a | K _M | K _{catmax} (min ⁻¹) | K _{catmax} /K _m ^d | Ki |
|--------------------------------------|----------------|--|--|-----------|
| Amylopectin from potato | 2,6 ± 0,7 | 123 ± 9 | 47,30 | 1 |
| Glycogen | 1,8 ± 0,2 | 14 ± 0,3 | 7,78 | |
| Starch from WS (65°C) | 2,4 ± 1 | 136 ± 17 | 56,67 | 0,9 ± 0,1 |
| Starch from <i>ss4</i> - (65°C) | 7 ± 1 | 110 ± 8 | 15,71 | |
| Starch from <i>phs1</i> - (65°C) | 5 ± 2 | 95 ± 10 | 19,00 | |
| Starch from <i>ss4-phs1</i> - (65°C) | 2,9 ± 0,8 | 55 ± 5 | 18,97 | 0,8 ± 0,1 |
| Substrate (mg.mL ⁻¹) | | | | |
| Amylopectin from potato ^b | 0,19 ± 0,04 | 118 ± 5 | 621,05 | |
| Glycogen ^b | 2,4 ± 0,2 | 26 ± 0,2 | 10,83 | |
| Amylopectin from WS ^b | 0,027 ± 0,003 | 95 ± 2 | 3518,52 | |
| DP3 ^b | 0,4 ± 0,1 | 7,1 ± 0,7 | 17,75 | |
| DP5 ^c | 0,25 ± 0,04 | 590 ± 40 | 2360,00 | |
| DP7 ^c | 0,06 ± 0,01 | 344 ± 14 | 5733,33 | |
| Glucidex 19 ^{c,e} | 0,11 ± 0,02 | 323 ± 10 | 2936,36 | |
| β-limit dextrins ^c | 0,8 ± 0,3 | 38 ± 5 | 47,50 | |
| Phytoglycogen ^c | 3,4 ± 1,3 | 92 ± 23 | 27,05 | |

Table 10 : Kinetic properties of PHS1.

^a K_M values were obtained in the presence of 2 mg.mL⁻¹ of substrate.

^b K_M values were obtained in the presence of 20 mM Pi.

^c K_M values were obtained in the presence of 10 mM Pi.

^d Catalytic efficiency.

^e Glucidex 19 is a mix of MOSs from DP2 to DP20.

Native starch did not act as substrate under these conditions but PHS1 shown significant activity toward starch previously heated to 65°C for 15 min in water. Interestingly, catalytic efficiency was lower toward *ss4-* mutant's starch than that of the wild-type line. This result can explain the increase of starch content in the mutant lacking SS4. Indeed, even if an increase of phosphorylases activity was observed in the *ss4-* mutant (Roldan et al., 2008; Szydlowski et al., 2009), the decrease of PHS1 efficiency toward *ss4-* starch can be greatest and so the degradation will be attenuated meaning over accumulation of starch and enlargement of the granule. In the double mutant *ss4- phs1-*, there isn't any PHS1 activity and so increase of starch content and granules size is more dramatic. As β -limit dextrins are starch derivatives, we observed low catalytic efficiency of the recombinant enzyme. All these results are consistent with results found in other species such as *Chlamydomonas reinhardtii*, rice and maize (Dauvillée et al., 2006 ; Hwang et al., 2010 ; Mu et al., 2001).

Inhibition by ADP-glucose of PHS1 is a competitive inhibition (Figure 42) which is not consistent with results for enzymes from *Chlamydomonas* (Dauvillée et al., 2006) and rice endosperm (Hwang et al., 2010). K_i was determined at 0,9 mM ADP-glucose \pm 0,08.

From these results we can conclude that PHS1 appears to be important for starch catabolism in *Arabidopsis thaliana* leaves even if it can't attack the starch granule directly.

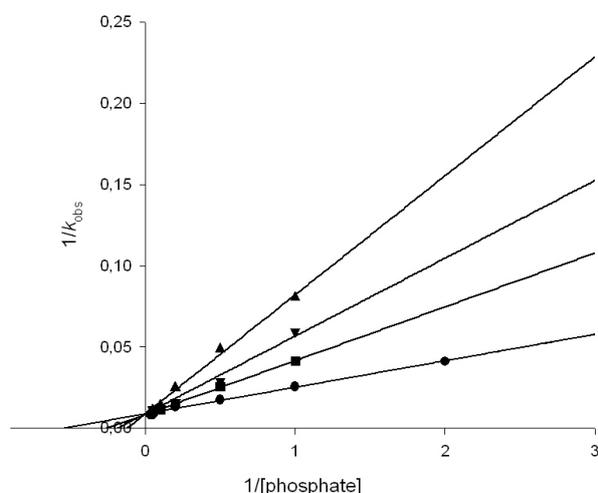


Figure 42 : Lineweaver-Burck representation of PHS1 inhibition.

PHS1 phosphorolysis activity was measured in the presence of 2 mg.mL⁻¹ amylopectin from sweet potato, different concentration of Pi and 0 mM (●), 1 mM (■), 2 mM (▼), 5 mM (▲) ADP-glucose

Discussion

Lors de cette étude, nous proposons d'étudier l'implication des enzymes hydrolytiques (amylases) et phosphorolytiques (phosphorylase) lors de la dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. Cette étude a donc été focalisée sur les isoformes plastidiales ou potentiellement plastidiales de ces enzymes.

L'analyse de la lignée déficiente pour l' α -amylase 3, AAM3, ne nous a pas permis de préciser sa fonction dans le métabolisme de l'amidon chez *Arabidopsis*. L'absence de cette enzyme conduit à un retard de croissance de la plante, attestant de l'importance d'AAM3. La quantité d'amidon accumulée en fin de phase lumineuse est inférieure à celle de la lignée sauvage, Col-0. Ce résultat, différent de celui observé par Yu et al. en 2005, semble impliquer l' α -amylase 3 dans la synthèse du polysaccharide et pourrait être dépendant des conditions de culture des plantes. L'analyse de la structure, en particulier la distribution en longueur des glucanes de l'amylopectine, n'indique pas de modifications de cette fraction dans le mutant. L'analyse par dosages *in vitro* ou par zymogrammes d'activités liées au métabolisme de l'amidon nous montre enfin que ce dernier est fortement perturbé. En effet, les activités pullulanase, β -amylase de l'isoforme RAM1 et de façon surprenante l'activité α -amylase globale sont augmentées dans la lignée mutante en comparaison du sauvage.

Nous avons également analysé trois lignées mutantes d'*Arabidopsis thaliana* déficientes pour trois isoformes de β -amylases différentes, BAM1, BAM4 et BAM8. BAM1 et BAM4 ont été formellement localisées dans le plaste (Lao et al., 1999 ; Sparla et al., 2006) alors que la localisation de BAM8 reste incertaine puisque la présence d'un peptide d'adressage au chloroplaste n'est pas clairement établie par les programmes ChloroP et TargetP (Fulton et al., 2008). L'analyse des quantités d'amidon accumulées par ces mutants, cultivés avec 16h de jour et 8h de nuit, nous montre des résultats différents pour chacun d'eux. Ainsi, le mutant *bam1-* accumule des quantités d'amidon semblables à celles de la lignée sauvage en fin de photopériode. Le mutant *bam4-* présente une suraccumulation d'amidon. Ces résultats concernant ces deux mutants sont identiques à ceux observés par Fulton et al. en 2008. On observe également, au sein du mutant *bam4-*, des taux de synthèse et de dégradation différents de ceux du sauvage. De plus, la dégradation anticipe l'arrivée de la nuit. La régulation du cycle « jour/nuit » semble donc perturbée dans

ce mutant. A nouveau, ce résultat est en accord avec les conclusions de Fulton et al. (2008) qui suggèrent que la fonction de BAM4 est de réguler la dégradation de l'amidon. La diminution du contenu en amidon observée chez le mutant *bam8-* par rapport à la lignée sauvage indique que BAM8 est importante au sein de ce métabolisme.

Les quantités de glucanes et polysaccharides solubles mesurées dans ces mutants, indiquent une baisse du contenu en glucose dans toutes les lignées par rapport à la lignée sauvage. Cette diminution pourrait s'expliquer par la baisse du niveau de dégradation de l'amidon, effectuée par les β -amylases, et donc la baisse de la libération de maltose. En effet, le maltose relargué dans le cytosol est pris en charge par l'enzyme disproportionnante DPE2 qui libérera alors du glucose. La baisse de la quantité de maltose libéré entraîne alors la baisse de la quantité mesurée de glucose total.

Nous avons ensuite réalisé une analyse structurale de l'amidon produit par ces mutants. Dans toutes les lignées mutantes, nous avons observé une diminution de la longueur d'onde du maximum d'absorbance du complexe iode-amylopectine, laissant présager la présence de modifications structurales au sein de cette fraction. On observe également une diminution du contenu en amylose puisqu'il ne représente plus que 17 à 20% du polysaccharide contre 30% dans la lignée sauvage. Cette réduction serait ici la conséquence directe de l'augmentation du contenu en amylopectine, moins dégradée dans les lignées mutantes. Une analyse plus poussée de la structure de l'amylopectine a ensuite été réalisée, par l'étude de la distribution de la longueur des chaînes constitutives de cette fraction. L'amylopectine du mutant *bam1-* est la plus fortement altérée avec une augmentation des chaînes de DP 6 à 9 résidus de glucose accompagnée d'une diminution des chaînes de DP 23 à 37. Une modification moins sévère est observée chez le mutant *bam8-* qui présente une légère augmentation des chaînes de DP 13 à 22. Ces deux isoformes semblent donc nécessaires à l'édification d'une structure normale de l'amidon. Le mutant *bam4-* lui ne présente pas de modifications de structure de son amylopectine. Cette isoforme n'agirait donc pas directement sur le grain lors de la phase de dégradation de l'amidon ce qui concorde avec les résultats de Fulton et al. (2008) qui ont montré que BAM4 est inactive.

Le métabolisme du polysaccharide semble également être largement perturbé puisque différentes activités testées sont modifiées dans ces mutants, notamment l'activité β -amylase totale, qui est augmentée au sein des mutants *bam4-* et *bam8-*. Le mutant *bam4-* apparaît d'ailleurs comme la lignée la plus perturbée.

Afin de préciser l'importance de chaque isoforme dans le métabolisme de l'amidon, nous avons entrepris la production et l'analyse de combinaisons triples mutantes de chaque amylase avec le double mutant *be2- be3-*, dépourvu d'enzymes de branchement. Ce mutant qui n'accumule plus d'amidon, sur accumule du maltose dans le cytosol (Dumez et al. 2006). En effet, dans cette lignée, les synthétases solubles sont probablement toujours capables de produire des α -glucanes linéaires. Les auteurs proposent que ces glucanes soient rapidement dégradés par les amylases, libérant en grande majorité du maltose. Les deux types d'amylases, α - et β -amylases, dégradent ici les glucanes linéaires puisque le maltose libéré possède les deux conformations, cependant, on observe une très grande proportion d' α -maltose. Cette suraccumulation de maltose en conformation α s'explique par la spécificité de l'enzyme disproportionnante cytosolique DPE2 pour le β -maltose (Dumez et al. 2006). En effet, le maltose libéré lors de la dégradation est exporté dans le cytosol via le transporteur MEX1 (Niittylä et al., 2004). Le β -maltose y est rapidement dégradé par DPE2 alors que l' α -maltose est lentement dégradé après sa mutarotation, entraînant une augmentation de sa concentration dans le mutant. Ainsi, l'analyse du contenu en maltose dans les triples mutants et l'observation de variations devrait nous permettre de déterminer la(les) forme(s) d'amylase(s) nécessaire(s) pour effectuer la dégradation du polysaccharide. Les contenus en polysaccharides et glucanes solubles mesurés chez les triples mutants ne sont cependant pas différents de ceux de la lignée *be2- be3-*. L'augmentation observée semble toutefois moins marquée dans la lignée *bam4- be2- be3-*. Comme chez *be2- be3-*, les polysaccharides solubles accumulés par les triples mutants sont essentiellement du maltose.

Une analyse phénotypique complète comme celle effectuée pour les simples mutants a été réalisée sur ces lignées triples mutantes et nous n'observons pas de modifications significatives dans la plupart des mutants par rapport au mutant *be2- be3-*. Seul le triple mutant *bam1- be2- be3-* présente une forte augmentation d'une enzyme hydrolytique non-identifiée en fin de nuit.

Si cette étude nous permet d'entrevoir l'importance de ces enzymes au sein du métabolisme de l'amidon, elle ne nous permet pas de conclure quant à la fonction précise de chacune d'elle. Ainsi, BAM4 semble bien être fortement impliquée dans la régulation du catabolisme du polysaccharide mais le mécanisme qu'elle utilise reste inconnu. Les perturbations d'accumulation d'amidon, de structure ou encore de l'activité des enzymes liées au métabolisme de l'amidon montrent l'importance de la présence de BAM1 et BAM8, mais ne nous donne pas d'indication plus précise sur leur fonction. Enfin, le peu de modifications observées dans le mutant dépourvu de l' α -amylase 3 ne nous permet pas d'avancer une quelconque conclusion quant à son importance ou encore sa fonction. Une caractérisation enzymatique complète de ces différentes isoformes devrait apporter un éclaircissement sur leur fonction au sein du métabolisme.

L'étude de la phosphorylase PHS1 a été menée en parallèle avec celle de la SS4 (synthétase soluble de type 4) et du double mutant *ss4- phs1-*. Les analyses préliminaires concernant ce double mutant laissent en effet présager d'une fonction importante de PHS1 dans la dégradation de l'amidon. Il a été observé chez le mutant *ss4-* des grains de plus grande taille que chez le sauvage (Roldán et al., 2007). Cette augmentation est encore plus dramatique chez le double mutant et la quantité d'amidon est spectaculairement plus élevée par rapport à la référence sauvage. De plus, cet amidon n'est jamais totalement dégradé durant une période d'obscurité continue. Au sein du mutant *phs1-* on observe une légère augmentation du contenu en amidon, contrairement à ce qui a été observé par Zeeman et al. (2004), qui laisse à nouveau entrevoir un rôle catabolique de cette enzyme.

La perte de PHS1 et/ou de SS4 entraîne des bouleversements au sein du métabolisme puisque plusieurs enzymes y intervenant voient leur activité modifiée. La structure du polysaccharide est elle aussi perturbée au sein des mutants dépourvus de PHS1 et l'analyse de la distribution de la longueur des chaînes constitutives de l'amylopectine montre un enrichissement en courtes chaînes de DP 5 à 12 accompagnée d'une diminution des chaînes plus longues de DP 20 à 40 pour *phs1-* et intermédiaires de DP 11 à 20 pour *ss4- phs1-*. Ces modifications de structure sont identiques à celles observées dans l'albumen de riz par Satoh et al. (2008) mais sont toutefois plus marquées. Cependant, chez le riz, les grains d'amidon observés dans le mutant étaient plus petits que ceux du sauvage et de ce fait les auteurs

impliquaient plutôt la phosphorylase dans la synthèse que dans la dégradation de l'amidon.

L'étude phénotypique de PHS1 a été complétée par une analyse enzymatique, qui a permis de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. Après détermination des température et pH optimum, nous avons pu observer que la taille minimale de chaîne étant dégradée efficacement par l'enzyme recombinante est de 5 résidus de glucose. De plus, elle a une plus grande affinité pour les α -glucanes non-branchés et plus long et est inhibée de façon compétitive par l'ADP-glucose. Ces résultats, en accord avec les observations faites dans d'autres organismes (Dauvillée et al., 2006 ; Hwang et al., 2010 ; Mu et al., 2001), nous montrent que PHS1 est très similaire aux phosphorylases des plantes supérieures.

Afin de tenter d'expliquer les différences de taille de grain et de quantité d'amidon observée chez le double mutant, la capacité de l'enzyme recombinante à dégrader l'amidon natif provenant des différents fonds génétiques analysés dans cette étude a été mesurée. Ainsi, l'enzyme recombinante n'est pas capable de dégrader l'amidon natif. Elle est cependant active sur l'amidon de structure modifiée, ayant ici été chauffé à 65°C pendant 15 minutes. De façon intéressante, l'enzyme est moins affine et également moins efficace sur l'amidon extrait du mutant *ss4-* que celui de la souche sauvage. Ce résultat pourrait expliquer l'augmentation de taille de grain et de quantité d'amidon que nous avons observé chez ce mutant. Au sein du mutant *ss4-* on observe une augmentation de l'expression mais aussi de l'activité des deux α -glucane phosphorylases (Roldán et al., 2008 ; Szydlowski et al., 2009). Cependant, cette augmentation d'activité ne compense peut être pas la baisse d'efficacité de PHS1 vis-à-vis de l'amidon produit par le mutant *ss4-*, entraînant ainsi une augmentation du contenu en amidon et de la taille des grains. En additionnant une mutation de PHS1 à celle de la *SS4*, la perte de l'activité phosphorylase est alors totale et l'effet sur la taille des grains et la quantité d'amidon accumulé est alors plus dramatique. Par ces analyses *in vitro*, on observe également une efficacité moins grande de l'enzyme recombinante vis-à-vis de l'amidon extrait des mutants dépourvus de PHS1, qui présente une structure modifiée par rapport à l'amidon sauvage. De plus, cette enzyme est beaucoup plus efficace sur l'amylopectine que sur le glycogène. La structure du polysaccharide joue donc bien un rôle important dans l'efficacité de la phosphorylase. L'ensemble de ces résultats nous permet d'impliquer la

phosphorylase dans la dégradation de l'amidon, n'attaquant pas directement le grain natif mais pouvant être active après l'action d'une ou plusieurs autres enzymes cataboliques. D'autres études restent cependant nécessaires afin de déterminer précisément sa fonction au cours de cette étape du métabolisme.

Matériel et Méthodes

A. Matériel

a. Produits

La résine de Sepharose® CL-2B et le Percoll® proviennent de Amersham Biosciences (Orsay, France). L'ADP-Glucose, le glucose-1-phosphate, le glycogène de foie de lapin et l'amidon de chez Sigma. Les kits de dosage de l'amidon sont obtenus chez Diffchamb (Lyon, France). L'amylopectine provient de chez Fluka. Le pullulane, les dextrans β -limites, et les kits de dosages des α - et β -amylases de chez Megazyme (Irlande).

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

Les lignées sauvages (Wassilewskija, WS et Columbia, Col-0) et mutantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été obtenues auprès des banques de mutants d'insertion générées à l'URGV de l'INRA de Versailles, par SALK et NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre). Les graines sont conservées à sec, à température ambiante. Elles sont stratifiées dans du phytigel 0,1% pendant 48 h à 4°C. Les plantes sont cultivées soit avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit en serre soit avec une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit ou de 12 h de jour et 12 h de nuit en phytotron. Les températures utilisées pour les plantes cultivées en serre et en phytotron sont respectivement de 21°C le jour, 16°C la nuit et de 23°C le jour, 20°C la nuit.

B. Méthodes

a. Croisements

Les croisements sont réalisés sous loupe binoculaire avec des plantes âgées d'environ 20 jours. Les lignées mutantes à croiser sont cultivées indépendamment pour prévenir les risques de pollinisation croisée. La plante désignée comme receveuse (utilisation des gamètes femelles) est débarrassée des fleurs ouvertes, pour ne laisser que quelques bourgeons. De la plante désignée comme donneuse (utilisation des gamètes mâles), ne seront utilisées que les étamines des fleurs ouvertes. Les bourgeons de la plante receveuse sont disséqués de manière à conserver uniquement le pistil non fécondé. Le pollen des étamines de la plante donneuse est

appliqué à l'extrémité des pistils nus de la plante receveuse, et cette dernière est mise en culture jusqu'au développement complet des siliques. Les graines récupérées à ce stade sont semées, et la progéniture des plantes obtenues est criblée pour la sélection des doubles ou triples mutants homozygotes.

b. Biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN génomique

Une feuille de rosette est prélevée sur la plante âgée de 2 semaines puis broyée dans l'azote liquide à l'aide de pilons stériles. Après addition de 400 µL de tampon d'extraction (Tris/HCl 100 mM pH 8 ; EDTA 20 mM pH8 ; NaCl 1,4 M ; CTAB 2 % (v/v) ; 0,064% β-mercaptoéthanol (v/v)), le mélange est incubé 30 min à 60°C. Après l'ajout de 400 µL de chloroforme le mélange est centrifugé (15 min à 4 °C et à 10000 g). La phase aqueuse est récupérée et l'ADN précipité par 300 µL d'isopropanol. Une centrifugation de 30 min à 4°C à 10000g permet de culotter l'ADN qui sera ensuite rincé par 300 µL d'éthanol 70 %. Après avoir fait sécher le culot, celui-ci est repris dans 50 µL d'eau stérile.

2. Sélection des lignées mutantes par PCR

L'état homozygote des mutations est vérifié par PCR sur l'ADN génomique extrait de feuilles de rosette. Une réaction de PCR avec des amorces s'hybridant de part et d'autre de l'insertion ne permet d'amplifier un fragment que si l'ADN-T est absent. Une deuxième réaction de PCR avec une amorce spécifique de l'ADN-T et une amorce spécifique du gène en amont ou en aval de l'insertion ne permet une amplification que si l'ADN-T est présent. Ainsi, dans le cas d'un individu homozygote mutant, seule la deuxième réaction de PCR permet une amplification.

Les fragments d'ADN sont amplifiés en utilisant 0,2 µM d'amorces sens et antisens, 200 µM de dNTP et une unité de Taq DNA polymérase (Promega), dans les conditions suivantes : 2 min à 95°C ; 6 cycles (45 sec à 95°C, 30 sec à 61°C avec un degré en moins à chaque cycle, 1 min d'élongation à 72°C) puis 35 cycles (45 sec à 95°C, 30 sec à 55°C, 1 min à 72°C) ; 2 min d'élongation finale à 72°C. Les séquences des amorces utilisées pour la sélection de chaque lignée mutante sont présentées en annexe.

3. Clonage de l'ADNc et expression de l' α -glucane phosphorylase plastidiale chez *E. coli*.

3.1. Souches d'*E. coli*

La souche TOP10 a été utilisée pour maintenir et conserver les différents plasmides.

Top10 : F⁻ *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(ara\ leu)$ 7697 *galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*

Les souches BL21-DE3 et BL21-DE3 Δ CAP ont été choisies pour l'expression des protéines recombinantes.

BL21-DE3 : F⁻ *ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm (DE3)*

La souche BL21-DE3 Δ CAP possède en plus une délétion complète de l'opéron *glgCAP* remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine.

3.2. Plasmide

Le vecteur pQE2 a permis l'expression de la protéine recombinante possédant une extension de 6 histidines à son extrémité N-terminale. Le vecteur pQE2-PHS1 résulte de la ligation du vecteur pQE2 avec l'ADNc de la phosphorylase PHS1 auquel a été ajouté les sites de restriction KpnI et HindIII.

3.3. Milieu de croissance bactérien

Milieu LB (Luria-Bertani) liquide :

- Bacto-tryptone 10 g/L
- Bacto-yeast extract 5 g/L
- NaCl 10 g/L pH 7.0

Le LB (Luria-Bertani) gélosé possède la même composition que le milieu liquide mais est solidifié avec 1,2% d'agar. Le milieu peut être sélectif, si besoin, en y ajoutant 100 μ g/mL d'ampicilline (LB-Amp) ou 25 μ g/mL de kanamycine (LB-Kan).

3.4. Clonage de l'ADNc

L'ADNc de la phosphorylase plastidiale PHS1 a été obtenu auprès de la banque NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre). L'ajout des sites de restriction KpnI et HindIII est réalisé par PCR en utilisant 0,4 μ M de dNTPs, 40 ng d'ADNc, 0,2 μ M d'amorces (voir annexe), 2 μ L de tampon 10X *pfu* et 1 U de *pfu* Turbo (Stratagene) pour un volume final de 20 μ L. Les produits de PCR sont purifiés sur gel d'agarose 1%

à l'aide du kit Wizard® SV (Promega), digérés, puis insérés dans le plasmide pQE2 par ligation à l'aide du kit Ligafast (Promega).

3.5. Expression de la protéine recombinante

Après une étape de préculture dans 5 mL de milieu LB-Amp ou LB-Kan à 30°C sous agitation, l'expression est induite à une $DO_{600} = 0,5-0,7$ par l'ajout de 1mM IPTG. Après une nuit d'incubation dans les mêmes conditions, les cellules sont culottées par centrifugation (20 min, 4500 g, 4°C) et les protéines sont extraites dans 4 mL de Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M par 4 cycles de sonication de 10 sec. L'homogénat est ensuite centrifugé (10 min, 4500 g, 4°C) et le surnageant, auquel est ajouté 40 mM d'imidazole, est conservé dans la glace pour être analysé par SDS-PAGE ou par gels d'activité (pages 91 et 92) et pour la purification de la protéine recombinante PHS1 (page 90).

c. Techniques biochimiques

1. Test à l'iode

Une feuille prélevée en fin de jour ou en fin de nuit est incubée dans l'éthanol 100%, à 80°C pendant 15 min. L'opération est répétée jusqu'à la décoloration totale. La feuille est ensuite plongée dans une solution d'iode (KI 0,2% ; I₂ 0,02%). L'iode moléculaire forme un complexe avec les polysaccharides produits par la souche analysée et une teinte caractéristique du contenu en amidon est révélée. Les souches sauvages présentent lors de ce test une coloration noire en fin de jour, quand l'accumulation d'amidon est maximale.

2. Extraction et dosage de l'amidon

Les feuilles sont broyées à raison de 0,5 g de feuille pour 10 mL de tampon d'extraction qui est le suivant : MOPS 100 mM pH 7,2 ; EDTA 5 mM, Ethylène glycol 10 %. Le broyat obtenu est centrifugé à 4000 g et 4 °C pendant 15 min après avoir été filtré à travers deux couches de miracloth (Calbiochem). Le culot ainsi obtenu est resuspendu dans du Percoll® 90 % (à raison de 3 mL pour 0,5 g de feuilles). L'échantillon est ensuite centrifugé à 13000 g et à 4 °C pendant 40 min. Une centrifugation permet de sédimenter l'amidon qui est le seul à avoir une densité suffisante pour traverser le Percoll®. Le culot d'amidon est enfin lavé 4 fois à l'eau et, s'il y a lieu, conservé à 4 °C dans l'éthanol 20 % ou il peut à ce stade être dosé ou

analysé par chromatographie de tamisage moléculaire. Pour le dosage (Kit Diffchamb), des dilutions de la suspension d'amidon sont bouillies 10 min puis hydrolysées par l'amyloglucosidase. Le glucose libéré est alors phosphorylé par une hexokinase et oxydé par la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ce qui permet la réduction du NADP en NADPH₂. La production de NADPH₂ est suivie au spectromètre à 365 nm.

3. Extraction et dosage des polysaccharides solubles

Environ 0,2 g de feuilles sont broyées dans l'azote liquide puis homogénéisées dans 500 mL d'acide perchlorique 0,7 M. Le broyat est ensuite centrifugé 15 min à 3000 g et à 4°C. Après récupération du surnageant 200 µL du mélange suivant sont ajoutés : KOH 2 M, MES 0,4 M, KCl 0,4 M. Le mélange est centrifugé 15 min à 13000 g et à 4°C. La quantité de polysaccharides est déterminée par dosage du glucose libéré après digestion par l'amyloglucosidase (kit Diffchamb).

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

L'amidon (2 mg) est dissout dans 200 µL de DMSO 100% pendant 10 min à 100°C. Il est ensuite précipité par 600 µL d'éthanol absolu. Le précipité obtenu par centrifugation est resuspendu dans 500 µL de soude 10 mM. Le dépôt s'effectue sur une colonne de Sepharose® CL-2B. L'élution se fait par la soude 10 mM à un débit de 12 mL/h. Des fractions de 300 µL sont récoltées. La λ_{\max} de chacune d'entre elle est mesurée au spectrophotomètre en mélangeant 80 µL de fraction à 20 µL de solution d'iode (KI 0,2% ; I₂ 0,02%). Cette valeur représente la longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe iode-polysaccharide. Un balayage de 500 à 700 nm est effectué afin de déterminer précisément la longueur d'onde donnant l'absorption maximale (λ_{\max}). Cette valeur est spécifique de la structure du polysaccharide complexé à l'iode (Thorn & Mohazzeb, 1990). De plus, cette analyse permet de séparer l'amylopectine de l'amylose permettant une caractérisation structurale précise du polysaccharide. Les concentrations en amylose et amylopectine sont mesurées par la méthode à l'amyloglucosidase après regroupement des fractions correspondant à chacun des deux polysaccharides.

5. Analyse de la distribution de longueur de chaînes des polysaccharides par HPAEC-PAD ou par FACE

Les fractions contenant l'amylopectine sont dialysées contre l'eau une nuit à 4°C puis lyophilisées. L'amylopectine est resuspendue dans 500 µL de tampon acétate de sodium 55 mM pH 3,5 puis mise en présence de 10 unités d'isoamylase (produite par *Pseudomonas amyloferamosa*, Laboratoires biochimiques Hayashibara) pendant un minimum de 4 h à 42°C. La réaction est arrêtée en plaçant le tube à 100°C pendant 5 min. L'échantillon est ensuite dessalé sur une colonne de Carbograph « Extract-clean » (Alltech, USA). Les échantillons sont analysés soit par chromatographie d'échange d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD, Dionex) soit par électrophorèse capillaire après dérivation des polysaccharides à l'APTS (FACE). Pour l'analyse par HPAEC-PAD, environ 15 µg d'échantillon sont repris dans l'eau et injectés. Pour l'analyse par électrophorèse capillaire, environ 200 µg de produit lyophilisé sont repris dans 2 µL de cyanoborohydrure de sodium 1 M (dissous dans le THF) et 2 µL d'APTS dissous dans l'acide acétique 15 %. L'échantillon est incubé une nuit à 42 °C, dilué au 500^{ème}, puis injecté.

6. Chromatographie sur couche mince

5 µg des polysaccharides solubles sont déposés sur une feuille de silice (Silica gel 60, Merck, Darmstadt, Allemagne). 2 µg de glucose, de maltose et de glucidex 19 sont utilisés sur la couche mince en guise de contrôles. La séparation s'effectue pendant 4 heures dans le tampon de migration suivant : butanol/éthanol/eau dans un rapport 1/1/1 (v/v/v). A l'issue de la migration, la feuille est séchée sous une sorbonne avant d'y pulvériser une solution d'orcinol sulfurique. La révélation se déroule à 120°C jusqu'à apparition des signaux bruns.

7. Microscopie électronique à transmission

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 1mm³ sont 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 sont finalement traités par une

solution d'AgNO₃ à 1% (PATAg) selon Gallant et coll., 1973. Les échantillons sont ensuite 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 découpées à l'aide d'un ciseau en diamant (Micro MT-7000) et examinées avec un microscope à transmission électronique (JEOL 100S) sous 80 keV.

8. Mesure de diffraction aux rayons X

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

9. Purification de la protéine recombinante PHS1

La protéine recombinante PHS1 a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne Hi-Trap chelating HP 5mL (GE Healthcare) en utilisant un système rapide de chromatographie liquide de protéines (FPLC). L'extrait protéique est déposé sur la colonne chargée en nickel et pré-équilibrée dans le tampon Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, imidazole 40 mM. L'élution se fait à 2 mL/min avec deux paliers à 150 mM puis 500 mM d'imidazole. Les fractions de 1 mL contenant la protéine sont regroupées et dessalées sur colonne EconoPac 10 DG (Biorad) dans du Tris 50 mM pH 7,5 et seront utilisées pour la caractérisation enzymatique.

d. Techniques enzymologiques

1. Extraction des protéines des feuilles

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

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

2. Dosage des protéines

La quantité de protéines contenue dans l'extrait brut est estimée par la méthode de Bradford (1976) à l'aide du kit de dosage Biorad Protein Assay. Trois

dilutions de l'extrait brut (1/500 ; 1/1000 ; 1/2000) réalisées dans un volume de 400 µL sont incubées en présence de 100 µL de réactif pendant 10 min à l'obscurité. L'absorbance est ensuite lue à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec la albumine sérique bovine (0 à 20 mg/mL).

3. Les gels d'activité de type zymogramme

Un aliquot d'extrait cellulaire de feuille correspondant à 100 µg de protéines totales est récupéré et 10% de tampon de chargement (saccharose 25% (p/v), bleu de bromophénol 0,001%) sont ensuite ajoutés à l'échantillon. L'électrophorèse est réalisée à l'aide du système MiniProtean II de BioRAD (Richmond, CA, USA). Les gels de concentration et de séparation ont une concentration finale en monomère de 2,5 % et 7,5 % (p/v) respectivement et sont tamponnés par le Tris/HCl 125 mM pH 6,8 et le Tris/HCl 375 mM pH 8,8. La migration s'effectue dans le tampon Tris 25 mM, Glycine 192 mM, DTT 1mM à 150 V pendant 3 heures à 4°C. Les activités sont révélées après incubation des gels par coloration dans une solution d'iode (I₂ 0,2 %, KI 2 %).

3.1.Zymogramme des activités modifiant l'amidon

Pour révéler ce type d'activité, le gel contient 0,3% d'amidon de pomme de terre soluble (Sigma). Après l'électrophorèse, le gel est incubé toute la nuit à température ambiante dans du Tris/HCl 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM.

3.2.Zymogramme des activités amidon-synthétases

Le gel contient cette fois du glycogène de foie de lapin (0,3%). Après l'électrophorèse, le gel est incubé une nuit à température ambiante dans le tampon suivant : Glygly/NaOH 50 mM pH 9.0, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,25 g/L, ADP-Glucose 1 mM. La réaction est arrêtée lors de la coloration du gel par une solution d'iode.

3.3.Zymogramme des activités amidon phosphorylases

Les tampons de chargement et de migration du gel d'activités phosphorylases sont différents et sont respectivement : Tris 62,5 mM, glycine 480 mM, glycérol 25%, bleu de bromophénol 0,001% et Tris 25 mM, Glycine 192 mM. Les gels de concentration et de séparation ont une concentration finale en monomère de 2,5 % et

7,5 % (p/v) respectivement et sont tamponnés par le Tris/H₃PO₄ 60 mM pH 7,3 et le Tris 110 mM pH 7,2, Temed 20 mM.

Le gel contient dans ce cas 0,45% de glycogène de foie de lapin. A l'issue de 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, Glc1P 20 mM pour le sens synthèse. Le gel est incubé dans le Tris 50 mM pH 7,5, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM pour le sens dégradation.

3.4.Zymogramme des activités hydrolytiques

Le gel contient 0,3% de polysaccharide qui est soit de l'amidon, soit de l'amylopectine ou encore des β -limit dextrines. Comme pour le gel des activités modifiant l'amidon, le gel est incubé après la migration dans du Tris/HCl 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM.

4. SDS-PAGE

Le gel de concentration présente une concentration finale en monomère de 4%. Il est tamponné par le Tris/HCl 125 mM pH 6,8. Le gel de séparation à 12% final en monomère est tamponné par le Tris/HCl 375 mM pH 8,8 et ne contient pas de polysaccharide. Les gels contiennent en plus 0,1% de SDS. Le tampon d'électrophorèse est le suivant : Tris 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,1%. L'électrophorèse dure 1h30 à 150V à température ambiante. Après celle-ci, le SDS est éliminé par plusieurs rinçages rapides à l'eau. Le gel est ensuite coloré quelques minutes dans du bleu de Coomassie puis est incubé une nuit dans une solution décolorante (Acide acétique 5%, méthanol 7%).

5. Dosage des activités enzymatiques *in vitro*

5.1.Dosage des activités amidons phosphorylases

Les activités amidon-phosphorylases sont déterminées par mesure du Glc1P libéré, sous l'action de l'extrait enzymatique sur de l'amylopectine ou du glycogène en solution. 50 μ L d'extrait protéique sont incubés 1 H à 30 °C en présence d'amylopectine 2,5 mg/mL, de Tris/HCl 50 mM et de NaH₂PO₄/NA₂HPO₄ 10 mM dans un volume final de 500 μ L. La réaction est arrêtée par chauffage à 100 °C pendant 10 min. Après centrifugation (10 min, 10000 g, 4°C) 500 μ L de tampon MgCl₂ 120 mM, Glc 1,6 diP 0,05 mM, NADP 0,5 M est ajouté et le Glc1P libéré est

dosé par conversion en Glc6P (ajout de 4U de phosphoglucomutase, 10min à température ambiante), puis quantification de ce dernier (tampon Triéthanolamine pH 7,6, 1,5mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM MgSO₄ (Diffchamb), et 1 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase (Sigma)).

5.2. Dosage de l'activité pullulanase

Les protéines sont extraites dans le tampon MOPS 100 mM pH 7,2, MgCl₂ 2 mM, DTT 10 mM, éthanediol 10% (v/v), PVP 50 mg/mL. L'activité pullulanase est déterminée par la mesure des groupes réducteurs libérés après incubation d'un extrait protéique en présence de pullulan. A 50 µL d'extrait, sont ajoutés 200 µL d'une solution de pullulane à 20 mg/mL, DTT 10 mM, MOPS 50 mM. Après incubation 1 h à 30 °C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 250 µL d'une solution de DNS froide et par chauffage 10 min à 100 °C. Le mix réactionnel est dilué avec 800 µL d'eau et l'absorbance est mesurée à 540 nm. La quantité de groupes réducteurs libérés pendant la réaction est déterminée à l'aide d'une gamme étalon de maltotriose traitée dans les mêmes conditions.

5.3. Dosage de l'activité α-amylase

L'activité α-amylase est mesurée à l'aide d'un kit de dosage basé sur la méthode CERALPHA (Megazyme). 100 µL d'extrait protéique préparé suivant les instructions du fabricant sont incubés 20 min à 40 °C, en présence de 100 µL d'«Amylase HR reagent» contenant le substrat (p-nitrophenyl maltoheptaoside) à 5,45 mg/mL, 1 unité de glucoamylase et 1 unité d'α-glucosidase. La réaction est arrêtée par l'ajout de 1,5 mL de Trizma base 1% fournie par le fabricant et l'absorbance mesurée à 400 nm est directement proportionnelle à la quantité de p-nitrophénol libérée au cours de la réaction.

5.4. Dosage de l'activité β-amylase

Cette activité est mesurée à l'aide du kit de dosage bétamyl (Mégazyme). L'extrait protéique est incubé 1 heure à température ambiante puis des dilutions sont réalisées dans le tampon Acide maléique 0,1 M, EDTA 1 mM, BSA 1 mg/mL. 100 µL de chaque dilution est ensuite incubé 10 minutes à 40°C avec 100 µL de tampon contenant le substrat (p-nitrophényl-β-D-maltotrioside) et la β-glucosidase. La réaction est arrêtée par ajout de 1,5 mL de Trizma base 1% et l'absorbance est mesurée à 400 nm.

5.5. Dosage des activités D-enzyme et maltase

Les activités D-enzyme et maltase sont déterminées en mesurant le glucose libéré après incubation de l'extrait protéique avec le maltotriose et le maltose, respectivement. Les protéines sont extraites en broyant environ 0,2 g de feuilles dans 200 μ L de MES (acide 2-(N-morpholino) ethanesulfonique) 20 mM pH 6,2. 50 μ L d'extrait sont incubés avec 450 μ L d'acétate de sodium 50 mM pH 5,2 ; maltose 90 mM pour le dosage de l'activité maltase ; ou avec 450 μ L de MOPS 50 mM pH 6,8 ; maltotriose 60 mM pour le dosage de l'activité D-enzyme. Le glucose libéré lors de la réaction est dosé par la méthode à l'amyloglucosidase (Diffchamb).

Références bibliographiques

- Albrecht, T., Greve, B., Pusch, K., Kossmann, J., Buchner, P., Wobus, U. and Steup, M.** (1998).
Homodimers and heterodimers of Pho1-type phosphorylase isoforms in *Solanum tuberosum* L. as revealed by sequence-specific antibodies.
European journal of biochemistry. **251** (1-2), 343-52.
- Albrecht, T., Koch, A., Lode, A., Greve, B., Schneider-Mergener, J. and Steup, M.** (2001).
Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analysis and immunochemical characterization.
Planta. **213** (4), 602-13.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000).
Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.
Nature. **408**, 796-815.
- Baba, T., Yoshii, M., Kainuma, K.** (1987).
Acceptor molecule for granule bound starch synthase from sweet potato roots.
Starch-Stärke. **39**, 52-56.
- Baba, T. and Kainuma, K.** (1987).
Partial hydrolysis of sweet-potato starch with β -amylase.
Agricultural and Biological Chemistry. **51**, 1365-1371.
- Baba, T., Nishihara, M., Mizumo, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Kobayashi, E., Ohnishi, S., Tanaka, K.I., and Arai, Y.** (1993).
Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds.
Plant Physiology. **103**, 565-573.
- Ball, S., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B. and Decq, A.** (1991).
A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase.
Planta. **185**, 17-26.
- Ball, S., Guan, H.P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P. and Preiss, J.** (1996).
From glycogen to amylopectin: a model 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.
- Ball, S. G., & Morell, M. K.,** (2003).
From bacterial glycogen to starch : understanding the biogenesis of the plant starch granule.
Annual Review of Plant Biology. **54**, 207-233.

Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y.B., Schurmann, P. and Preiss, J. (2000).

Activation of the potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase by thioredoxin.
Journal of Biological Chemistry. **275**, 1315-1320.

Baunsgaard, L., Lütken, 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 Journal. **41** (4), 595-605.

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 Molecular Biology. **48**, 287-297.

Block, M., Loerz, H. and Luetticke, S. (1996).

Triticum aestivum soluble starch synthase mRNA.
Genbank Accession U48227.

Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S. (1998).

Starch granules : structure and biosynthesis.
International Journal of Biological Macromolecules. **23**(2), 85-112.

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.
The Plant Journal. **31** (1), 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** (7), 2215-2220.

Caspar, T., Huber, S. C., and Somerville, C. (1985).

Alterations in growth, photosynthesis, and respiration in a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity.
Plant Physiology. **79**, 11-17.

Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M.G. and Roach, P.J. (1995).

Requirement of the self-glucosylating initiator protein Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molecular and Cellular Biology. **15**, 6632-6640.

Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M. and Smith, A.M. (2004).

A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night.

The Plant Journal. **37**, 853-863.

Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J.M. and Ball, S. (1999a).

Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis.

Plant Physiology. **120**, 993-1003.

Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Morell, M., Samuel, M., Slomiany, M.C, Liénard, L., D'Hulst, C., and Ball, S. (1999b).

Biochemical characterization of the *Chlamydomonas* α -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis.

Plant Physiology. **120**, 1005-1014.

Commuri, P. D. and Keeling, P. L. (2001).

Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucane affinity and catalytic properties.

Plant Journal. **25**, 475-486.

Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J. and Henrissat., B. (2003).

An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases.

Journal of Molecular Biology. **328** (2), 307-17.

Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., Smith, A.M. (1998).

Mutations in the Gene Encoding Starch Synthase II Profoundly Alter Amylopectin Structure in Pea Embryos.

Plant Cell. **10** (3), 413-426.

Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., and Smith, S.M. (2001).

A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*.

The Plant Journal. **26**, 89-100.

D'Hulst, C. and Mérida, A. (2010).

The priming of storage glucan synthesis from bacteria to plants: current knowledge and new developments.

New Phytol. **188** (1), 13-21.

- Dauvillée, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, M.K., d'Hulst, C., Wattebled, F., Liénard, L., Delvallé, 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.
- Dauvillée, 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., Liénard, 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 Journal. **48** (2), 274-85.
- De Fekete, M.A.R., Leloir, L.F. and Cardini, C.E.** (1960).
Mechanism of starch biosynthesis.
Nature. **187**, 918-19.
- 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.
Journal of Biological Chemistry. **281** (17), 12050-9.
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J-M., van den Koornhuysse, N., Maddelein, M.L., Fournet, B., and Ball, S.** (1992).
Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylase biosynthesis and granule-bound starchsynthase activity accumulate a structurally modified amylopectin.
Journal of Bacteriology. **174**, 3612-3620.
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, A. and D'Hulst C.** (2005).
Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves.
Plant Journal. **43**, 398-412.
- Denyer, K., Barber, L., Burton, R., Hedley, C., Hylton, C., Johnson, S., Jones, D., Marshall, J., Smith, A., Tatge, H., Tomlinson, K., and Wang, T.** (1995).
The isolation and characterization of novel low-amylose mutants of *Pisum sativum* L.
Plant Cell and Environment. **18**, 1019-1026.
- Denyer, K., Dunlap, F., Thorbjørnsen, T., Keeling, P. and Smith, A.M.** (1996a).
The major form of ADPglucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extraplastidial.
Plant Physiology. **112**, 779-783.

- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., and Smith, A.** (1996b).
The elongation of amylose and amylopectine chains in isolated starch granules.
The Plant Journal. **10**, 1135-1143.
- 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.
- Dumez, S., Wattedled, 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.
Plant Cell. **18**(10): 2694-2709.
- Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L. and Kossmann, J.** (1997).
Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism.
Plant Journal. **12** (2), 323-33.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M., Steup, M. and Ritte, G.** (2007).
Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial beta-amylases.
Plant Physiology. **145** (1), 17-28.
- Edwards, A., Fulton, D.C., Hylton, C.M., Jobling, S.A., Gidley, M., Martin, C. and Smith, A.M.** (1999).
A combined reduction in activity of starch synthase II and III of potato has novel effects on the starch of tubers.
The Plant Journal. **17**, 251-261.
- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberger, P. and Steup, M.** (2005a).
Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast.
Plant Journal. **43** (4), 568-85.
- Fettke, J., Poeste, S., Eckermann, N., Tiessen, A., Pauly, M., Geigenberger, P. and Steup, M.** (2005b).
Analysis of cytosolic heteroglycans from leaves of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) plants that under- or overexpress the Pho 2 phosphorylase isozyme.
Plant and Cell Physiology. **46** (12), 1987-2004.

- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.L., Routier, F., Marianne-Pepin, T., Decq, A., Wieruszeski, J. M., Delrue, B., van den Koornhuyse, N., Bossu, J. P., Fournet, B., and Ball, S. G.** (1993).
Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin.
Journal of Biological Chemistry. **268**, 16223-16230.
- French, D., 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-amylase.
Carbohydrate Research. **22**(1), 123-34.
- Fujita, N., Toyosawa, Y., Utsumi, Y., Higuchi, T., Hanashiro, I., Ikegami, A., Akuzawa, S., Yoshida, M., Mori, A., Inomata, K., Itoh, R., Miyao, A., Hirochika, H., Satoh, H. and Nakamura, Y.** (2009).
Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm.
Journal of experimental botany. **60** (3), 1009-23.
- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M. and Zeeman, S.C.** (2008).
Beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts.
Plant Cell. **20** (4), 1040-58.
- Gallant, D. J., Bouchet, B. and Baldwin, P. M.** (1997).
Microscopy of starch : evidence of a new level of granule organization.
Carbohydrate Polymers. **32**, 177-191.
- Gallant, D., Derrien, A., Aumaitre, A. and Guilbot, A.** (1973).
Dégradation in vitro de l'amidon par le suc pancréatique. Etude par microscopie électronique à transmission et à balayage.
Starch. **25**, 56- 64
- Gao, M., 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.
- Ghosh, H.P. and Preiss, J.** (1966).
Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts.
Journal of Biological Chemistry. **241**, 4491-4504.
- Guan, H.P., Li, P., Imparl-Radosevich, J., Preiss, J. and Keeling, P.** (1997).
Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme.
Archives of Biochemistry and Biophysics. **342**, 92-98.

Hanson, K. R., and McHale, N. A. (1988).

A starchless mutant of *Nicotiana glauca* containing a modified plastid phosphoglucomutase.

Plant Physiology. **88**, 838-844.

Harrison, C. J., Hedley, C. L. and Wang, T. L. (1998).

Evidence that the *rug3* locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate.

The Plant Journal. **13**, 753-762.

Hedley, C.L., Bogradeva, T.Y. and Wang, T.L. (2002).

A genetic approach to studying the morphology, structure and function of starch granules using pea as a model.

Starch/Starke. **54**, 235-242.

Helbert, W., Schulein, M. and Henrissat, B. (1996).

Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* α -amylase into corn starch granules.

International Journal of Biological Macromolecules. **19**, 165-169.

Henrissat, B., Coutinho, P.M. and Davies, G.J. (2001).

A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*.

Plant Molecular Biology. **47**, 55-72.

Hizukuri, S. (1986).

Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance.

Carbohydrate Research. **147**, 342-347.

Hizukuri, S., Takeda, Y., Abe, J., Hanashiro, I., Matsunobu, G. and Kiyota, H. (1997).

Starch : Structure and functionality.

London : Royal Society of Chemistry. **121**.

Hovenkamp-Hermelink, J., Jacobsen, E., Ponstein, A., Visser, R., Vos-Scheperkeuter, G., Bijmolt, E., de Vries, J., Witholt, B. and Feenstra, W. (1987).

Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.).

Theoretical and Applied Genetics. **75**, 217-221.

Huriki, T. and Imanaka, T. (1999).

The concept of the alpha-amylase family: structural similarities and common catalytic mechanism.

Journal of Bioscience and Bioengineering. **87**, 557-565.

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.

- Hwang, S.K., Hamada, S. and Okita, T.W.** (2006).
ATP binding site in the plant ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit.
FEBS Letters. **580** (28-29), 6741-8.
- Hwang, S.K., Nishi, A., Satoh, H. and Okita, T.W.** (2010).
Rice endosperm-specific plastidial alpha-glucan phosphorylase is important for
synthesis of short-chain malto-oligosaccharides.
Arch Biochem Biophys. **495** (1), 82-92.
- Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buléon, A. and Tran, V.** (1988).
New three-dimensional structure for A-type starch.
Macromolecules. **20**, 2634-2636.
- Imberty, A. and Pérez, S.** (1989).
A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch.
Biopolymers. **27**, 1205-1221.
- James, M.G., Robertson, D.S., and Myers, A.M.,** (1995).
Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in
kernels.
The Plant Cell. **7**, 417-429.
- Jobling, S.A., Schwall, G.P., Westcott, R.J., Sidebottom, C.M., Debet, M.,
Gidley, M.J., Jeffcoat, R. and Safford R.** (1999).
A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers
has a major effect on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms
of *SBE A*.
The Plant Journal. **18**, 163-171.
- Kadziola, A., Abe, J., Svensson, B. and Haser, R.** (1994).
Crystal and molecular structure of barley alpha-amylase.
Journal of Molecular Biology. **239** (1), 104-21.
- Kawagoe, Y., Kubo, A., Satoh, H., Takaiwa, F. and Nakamura, Y.** (2005).
Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis
in rice endosperm.
Plant Journal. **42** (2), 164-74.
- Kossmann, J., Abel, G. J. W., Springer, F., Lloyd, J. R. and Willmitzer, L.**
(1999).
Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato
(*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue.
Planta. **208**, 503-511.
- Kötting, 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** (1), 242-52.

Kötting, O., Santelia, D., Edner, C., Eicke, S., Marthaler, T., Gentry, M.S., Comparot-Moss, S., Chen, J., Smith, A.M., Steup, M., Ritte, G. and Zeeman, S.C. (2009).

STARCH-EXCESS4 is a laforin-like Phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in *Arabidopsis thaliana*.

The Plant Cell. **21** (1), 334-46.

Kuhn, M.L, Falaschetti, C.A. and Ballicora, M.A. (2009).

Ostreococcus tauri ADP-glucose pyrophosphorylase reveals alternative paths for the evolution of subunit roles.

Journal of Biological Chemistry. **284** (49), 34092-102.

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 β -amylase.

The Plant journal. **20**, 519-527.

Leloir, L.F., de Fekete, M.A.R. and Cardini, C.E. (1961).

Starch and oligosaccharide synthesis from uridine diphosphate glucose.

Journal of Biological Chemistry. **236**, 636-641.

Li, J., Francisco, P., Zhou, W., Edner, C., Steup, M., Ritte, G., Bond, C.S. and Smith, S.M. (2009).

Catalytically-inactive beta-amylase BAM4 required for starch breakdown in *Arabidopsis* leaves is a starch-binding-protein.

Archives of Biochemistry and Biophysics. **489** (1-2), 92-8.

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** (4), 1175-1181.

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** (5), 473-7.

Lu, Y. and Sharkey, T.D. (2004).

The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells.

Planta. **218**, 466-473.

Maddelein, M.L., Libessart, N., Bellanger, F., Delrue, B., D'Hulst, C., Van den Koornhuyse, N., Fontaine, T., Wieruszeski, J.M., Decq, A. and Ball S. (1994).

Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis.

Journal of Biological Chemistry. **269** (40), 25150-7.

- Melendez, R., Melendez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J. and Cascante, M.** (1999).
Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach.
Biophysical Journal. **75**, 106-14.
- Mikami, B., Degano, M., Hehre, E.J. and Sacchettini, J.C.** (1994).
Crystal structures of soybean beta-amylase reacted with beta-maltose and maltal: active site components and their apparent roles in catalysis.
Biochemistry. **33** (25), 7779-87.
- Mikkelsen, R., Mutenda, K.E., Mant, A., Schürmann, P. and Blennow, A.** (2005).
Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **102** (5), 1785-90.
- 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.
- Mori, H., Tanizawa, K. and Fukui, T.** (1991).
Potato tuber type H phosphorylase isozyme. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a full-length cDNA in *Escherichia coli*.
The Journal of biological chemistry. **266** (28), 18446-53.
- Mori, H., Tanizawa, K. and Fukui, T.** (1993).
A chimeric alpha-glucan phosphorylase of plant type L and H isozymes. Functional role of 78-residue insertion in type L isozyme.
The Journal of biological chemistry. **268** (8), 5574-81.
- Mu, H.H., Yu, Y., Wasserman, B.P. and Carman, G.M.** (2001).
Purification and characterization of the maize amyloplast stromal 112-kDa starch phosphorylase.
Archives of biochemistry and biophysics. **388** (1), 155-64.
- Nakamura, Y., Umemoto, T., Takahata, Y., Komae, K., Amano, E. and Satoh, H.** (1996).
Changes in structure of starch and enzyme activities affected by *sugary* mutations in developing rice endosperm. Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis.
Physiologia Plantarum. **97**, 491-498.
- Nakamura, Y.** (2002).
Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue.
Plant Cell Physiology. **43**, 718-725.

Nakamura, Y., Utsumi, Y., Sawada, T., Aihara, S., Utsumi, C., Yoshida, M. and Kitamura, S. (2010).

Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant and Cell Physiology*. **51** (5), 776-94.

Nelson, O.E. and Rines, H.W. (1962)

The enzymatic deficiency in the *waxy* mutant in maize.

Biochemical and Biophysical Research Communications. **9**, 297–300.

Niittylä, 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.

Niittylä, T., Comparot-Moss, S., Lue, W.L., Messerli, G., Trevisan, M., Seymour, M.D., Gatehouse, J.A., Villadsen, D., Smith, S.M., Chen, J., Zeeman, S.C. and Smith, A.M. (2006).

Similar protein phosphatases control starch metabolism in plants and glycogen metabolism in mammals.

The Journal of biological chemistry. **281** (17), 11815-8.

Page, D.R. and Grossniklaus, U. (2002).

The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*

Nature Reviews Genetics. **3**, 124-136.

Palm, D., Klein, H.W., Schinzel, R., Buehner, M. and Helmreich, E.J. (1990).

The role of pyridoxal 5'-phosphate in glycogen phosphorylase catalysis.

Biochemistry. **29** (5), 1099-107.

Peat, S., Whelan, W. J. and Rees, W. R. (1952).

The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XX, The disproportionating enzyme of potato.

Journal of Chemical Society, 44-53.

Pohu, A., Planchot, V., Putaux, J.L., Colonna, P. and Buléon, A. (2004).

Split crystallisation during debranching of maltodextrins at high concentration by isoamylase.

Biomacromolecules. **5**, 1792-1798

Ral, J.P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buléon, 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 taurii*.

Plant Physiology. **136**, 3333-3340.

Ridout, M.J., Parker, M.L., Hedley, C.L., Bogracheva, T.Y. and Morris V.J. (2003).

Atomic force microscopy of pea starch granules : granule architecture of wild-type parent, r and rb single mutants, and the rrb double mutant.

Carbohydrate Research. **338** (20), 2135-47.

- Ritte, G., Lorberth, R. and Steup, M.** (2000).
Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules.
Plant Journal. **21** (4), 387-91.
- Ritte, G., Scharf, A., Eckermann, N., Haebel, S. and Steup, M.** (2004).
Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation.
Plant Physiology. **135** (4), 2068-77.
- Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlow, S., Haebel, S., Kötting, O. and Steup, M.** (2006).
Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases.
FEBS Letters. **580** (20), 4872-6.
- 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.
- Roldán, I., Wattedled, F., Mercedes Lucas, M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C. and Mérida, 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.
The Plant Journal. **49** (3), 492-504.
- Satoh, H., Nishi, A., Yamashita, K., Takemoto, Y., Tanaka, Y., Hosaka, Y., Sakurai, A., Fujita, N. and Nakamura, Y.** (2003).
Starch-branching enzyme I-deficient mutation specifically affects the structure and properties of starch in rice endosperm.
Plant Physiology. **133**, 1-11.
- Satoh, H., Shibahara, K., Tokunaga, T., Nishi, A., Tasaki, M., Hwang, S.K., Okita, T.W., Kaneko, N., Fujita, N., Yoshida, M., Hosaka, Y., Sato, A., Utsumi, Y., Ohdan, T. and Nakamura, Y.** (2008).
Mutation of the plastidial alpha-glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm.
The Plant Cell. **20** (7), 1833-49.
- Scheidig, A., Fröhlich, A., Schulze, S., Lloyd, J. R. and Kossmann, J.** (2002).
Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves.
The Plant Journal. **30**, 581-591.
- Shimomura, S., Nagai, M. and Fukui, T.** (1982).
Comparative glucan specificities of two types of spinach leaf phosphorylase.
Journal of Biochemistry. **91** (2), 703-17.

- Sikka, V.K., Choi, S., Kavakli, I.H., Sakulsingharoj, C., Gupta, S., Ito, H. and Okita, T.W.** (2001).
Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase.
Plant Science. **161**, 461–468.
- Sissons, M.J. and MacGregor, C.A.** (1994).
Hydrolysis of barley starch granules by α -glucosidase from malt.
Journal of Cereals Science. **19**, 161-169.
- Sivak, M. N. and Preiss, J.** (1998).
Starch : basic science to biotechnology.
In Advances in Food and Nutrition Research. **41**, Academic Press, San Diego, N.Y.
- 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** (3), 840-50.
- Steup, M., Robenek, H. and Melkonian, M.** (1983).
In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts.
Planta. **158**, 428-436
- Steup, M.** (1988).
Starch degradation.
In Biochemistry of plants, vol. 14, Carbohydrates (Preiss, J., ed.), Academic Press, New-York. 255-296.
- Streb, S., Delatte, T., Umhang, M., Eicke, S., Schorderet, M., Reinhardt, D. and Zeeman, S.C.** (2008).
Starch granule biosynthesis in Arabidopsis is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase.
Plant Cell. **20** (12), 3448-66.
- Sun, Z.T. and Henson, C.A.** (1991).
A quantitative assessment of the importance of barley seed α -amylase, β -amylase, debranching enzyme, and α -glucosidase in starch degradation.
Archives of Biochemistry and Biophysics. **284**, 298-305.
- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldán, I., Montero, M., Muñoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., Pozueta-Romero, J., D'Hulst, C. and Mérida, A.** (2009).
Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either class IV or class III starch synthases.
Plant Cell. **21** (8),2443-57.

- Takeda, Y., Hizukuri, S., Takeda, C. and Suzuki, A.** (1987).
Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules.
Carbohydrate Research. **165**, 139–145.
- Tetlow, I.J., Davies, E.J., Vardy, K.A., Bowsher, C.G., Burrell, M.M. and Emes, M.J.** (2003).
Subcellular localization of ADPglucose pyro-phosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of a plastidial isoform.
Journal of Experimental Botany. **54**, 715–725.
- Thorbjørnsen, T., Villand, P., Denyer, K., Olsen, O.A. and Smith, A.M.** (1996).
Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm.
The Plant Journal. **10**, 243–250.
- Thorn, W., and Mohazzeb, S.** (1990).
 α -D-polyglucane-iodine complexes.
Starch. **42**, 455-459.
- Tomlinson, K.L., Lloyd J.R. and Smith A.M.** (1997).
Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves.
The Plant Journal. **11** (1), 31-43.
- Torija, M.J., Novo, M., Lemassu, A., Wilson, W., Roach, P.J., François, 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. and Nelson, O.** (1966).
Starch-deficient maize mutant lacking adenosine dephosphate glucose pyrophosphorylase activity.
Science. **151**, 341-343.
- Ugalde, J.E., Parodi, A.J. and Ugalde, R.A.** (2003).
De novo synthesis of bacterial glycogen : *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucane initiation and elongation.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **100**, 10659-10663.
- Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A., and Nakamura, Y.** (2002).
Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between *japonica*-type and *indica*-type rice varieties.
Theoretical and Applied Genetics. **104**, 1-8.
- Utsumi, Y. and Nakamura, Y.** (2006).
Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1–isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm.
Planta. **225** (1), 75-87.

- van de Wal, M., D'Hulst, C., Vincken, J.P., Buléon, A., Visser, R. and Ball, S.** (1998).
Amylose is synthesized in vitro by extension of and cleavage from amylopectin.
The Journal of Biological Chemistry. **273**, 22232-22240.
- van den Koornhuise, N., Libessart, N., Delrue, B., Zabawinski, C., Decq, A., Iglesias, A., Carton, A., Preiss, J., and Ball, S.**, (1996).
Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*.
The Journal of Biological Chemistry. **271**, 16281-16287.
- van der Maarel, M.J., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L.** (2002).
Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family.
Journal of Biotechnology. **94** (2), 137-55.
- Ventriglia, T., Ballicora, M.A., Crevillén, P., Preiss, J. and Romero, J.M.** (2007).
Regulatory Properties of Potato-Arabidopsis Hybrid ADP-Glucose Pyrophosphorylase.
Plant Cell Physiology. **48** (6), 875-880.
- Villareal, CP. and Juliano, BO.** (1986).
Waxy gene factor and residual protein of rice starch granules.
Starch/Staerke. **38**, 118-119.
- Watson, K.A., McCleverty, C., Geremia, S., Cottaz, S., Driguez, H. and Johnson, L.N.** (1999).
Phosphorylase recognition and phosphorolysis of its oligosaccharide substrate: answers to a long outstanding question.
EMBO Journal. **18** (17), 4619-32.
- 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**, 137-45.
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, 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 phytyloglycogen and an abnormal form of amylopectin.
Plant Physiology. **138**, 184-195.
- Wattebled, F., Planchot, V., Dong, Y., Szydowski, N., Pontoire, B., Devin, A., Ball, S., D'Hulst, C.** (2008).
Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves.
Plant Physiol. **148** (3), 1309-23.

- Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P. and Sharkey, T.D.** (2005).
beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation.
Plant Physiology. **137**, 756-761.
- Yamaguchi, M., Kainuma, K. and French, D.** (1979).
Electron microscopic observations of waxy maize starch.
Journal of Ultrastructure Research. **69** (2), 249-61.
- Yamamori, M., Fujita, S., Hayakawa, K. and Matsuki, J.** (2000).
Genetic elimination of a starch granule protein, SGP-1, of wheat generates an altered starch with apparent high amylose.
Theoretical and Applied Genetics. **101**, 21-29.
- Yu, T.S., Kofler, H., Häusler, R.E., Hille, D., Flügge, 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.
Plant Cell. **13** (8), 1907-18.
- Yu, T.S., Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Fulton, D.C., Dunstan, H., Lue, W.L., Hegemann, B., Tung, S.Y., Umemoto, T., Chapple, A., Tsai, D.L., Wang, S.M., Smith, A.M., Chen, J., Smith, S.M.** (2005).
Alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves.
Journal of biological Chemistry. **280**, 9773-9779.
- 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., Northrop, F., Smith, A.M., and ap Rees, T.** (1998).
A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch hydrolysing enzyme.
Plant Journal. **15**, 357-365.
- Zeeman, S.C., Tiessen, A. Pilling, E., Kato, K.L., Donald, A.M., and Smith, A.M.** (2002).
Starch Synthesis in Arabidopsis. Granule Synthesis, Composition, and Structure.
Plant Physiol. **129**, 516-529.
- 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** (2), 849-58.

Zeeman, S.C., Smith, S.M. and Smith, A.M. (2007).

The diurnal metabolism of leaf starch.

The Biochemical journal. **401** (1), 13-28.

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.

Zhang, X., Szydlowski, N., Delvallé, D., D'Hulst, C., James, M.G. and Myers, A.M. (2008).

Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in Arabidopsis.

BMC Plant Biol. **8**, 96.

Zobel, H.F. (1988).

Molecules to granules : a comprehensive review.

Starch/Stärke. **40**, 1-7.

Annexes

1. Couples d'amorces utilisés pour la sélection des lignées mutantes :

| Lignées | Allèle sauvage | | Allèle mutant | |
|--------------|---------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|
| | Couple utilisé | Taille de l'amplicon (en pb) | Couple utilisé | Taille de l'amplicon (en pb) |
| <i>aam3-</i> | Amy3-4For-Amy3-4Rev | 490 | Amy3-4For-LBa1 | 552 |
| <i>bam1-</i> | bam3LP-bam3RP | 867 | bam3LP-LBa1 | 707 |
| <i>bam4-</i> | bam6For-Bam6Rev | 455 | Bam6Rev-LBa1 | 629 |
| <i>bam8-</i> | bam5LP-bam5RP2 | 999 | bam5LP-LBa1 | 543 |
| <i>be2-</i> | be2For3-be2Rev2 | 802 | be2For3-TAG5 | 542 |
| <i>be3-</i> | Be3Rev1-Be3For2 | 459 | Be3Rev1-TAG6 | 640 |

Séquence des amorces :

Bam3RP : GATAAGACAATGACATCTTCACTCC

Bam3LP : ACCGCCGATGAGTCCAATTTT

Bam5LP : AGGAGGTGGAGGAGGGAAAGG

Bam5RP2 : CACCTTCAGGATCAACCAACTG

Bam6For : GGCATCCCAAGAAGGCAAACC

Bam6Rev : GAGAGCAGCACCATGACGAGACA

Amy3-4For : CAGGTGAGTTCCGCATTTTTATC

Amy3-4Rev : AATTTGCCTCGTTTTCGTTCTAT

LBa1 : TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG

TAG5 : CTACAAATTGCCTTTTTCTTATCGAC

TAG6 : CACTCAGTCTTTCATCTACGGCA

2. Couple d'amorces utilisé pour l'ajout des sites de restrictions à l'ADNc de PHS1 :

Pho1ForKpn : GGGTACCATGAATCCGTTTGCGCCAGATG

Pho1RevHind : GAAGCTTTCATGGAAGTTCCACTTGCTTAATATTC

Les séquences sur fond gris correspondent aux sites de restrictions KpnI et HindIII.