

## L'amidon : sa synthèse, sa mobilisation, son histoire évolutive

Christophe Colleoni  
Steven Ball

Unité de glycobiologie structurale  
et fonctionnelle  
UMR du CNRS n° 8576  
CNRS-université des sciences  
et technologies de Lille  
Bâtiment C9 – Cité-scientifique  
59655 Villeneuve d'Ascq cedex  
<steven.ball@univ-lille1.fr>

### Résumé

L'amidon constitue un des composants majeurs des productions végétales. Pourtant, ses modalités de synthèse et de mobilisation, impliquant le fonctionnement d'un réseau de plus de 40 gènes, restent imparfaitement connues. Nous avons synthétisé l'essentiel des données acquises dans ce domaine chez les plantes et algues vertes. Nous rapportons également l'origine évolutive particulière de cette structure caractéristique du règne végétal chez les cyanobactéries. Les conséquences de ces connaissances sur les perspectives d'amélioration des plantes cultivées sont discutées

**Mots clés :** amélioration des plantes ; amidon ; amylose ; amylopectine ; évolution ; métabolisme.

**Thèmes :** amélioration génétique ; métabolisme ; productions végétales.

### Abstract

#### Starch synthesis degradation and evolution

Starch defines one of the major fractions produced and processed from crops. Nevertheless, knowledge of the intricate pathway of starch synthesis and mobilization which requires the coordinated function of a network of over 40 genes is still not completely elucidated. In this review we summarize the essential features of this complex pathway in land plants and green algae. We also report on the evolutionary origin of this plant-specific structure within cyanobacteria. The consequences of this knowledge with respect to its possible use in plant breeding of major crops are discussed.

**Key words:** amylose; amylopectin; evolution; plant breeding; plant metabolism; starch.

**Subjects:** genetic improvement; metabolism; vegetal productions.

L'amidon occupe une place prépondérante, non seulement comme apport calorique principal dans les alimentations humaines et animales, mais aussi comme substrat de transformation pour les industries spécialisées d'extraction et de transformation. Plus de 600 produits distincts sont commercialisés à partir d'amidons purifiés, dont la moitié à vocation non alimentaire, dans des secteurs aussi variés que la chimie, le textile, le bâtiment ou la papeterie. La structure fine du polysaccharide a une influence considérable sur sa digestibilité

alimentaire (amidons dits « résistants », peu ou pas digestibles, recherchés pour leurs qualités diététiques et considérés comme « fibres alimentaires ») ou sur l'ensemble des propriétés technologiques intervenant dans sa transformation (viscosité, solubilité, gélification, rétrogradation...). L'amidon fait partie d'une classe de polysaccharides dits de réserve très largement répandue dans le monde vivant : celle des  $\alpha$ -1,4-glucanes ramifiés en  $\alpha$ -1,6. Ces polysaccharides se présentent la plupart du temps sous forme soluble dans l'eau (le glycogène) et plus rarement

sous forme insoluble (l'amidon, le granulose). Le glycogène définit de loin la structure la plus communément rencontrée, puisqu'on le retrouve largement distribué dans les trois domaines du vivant (archéens, bactéries et eucaryotes). Les particules de glycogène contiennent entre 8 et 12 % de liaisons de type  $\alpha$ -1,6, appelés points de ramification ou « branchements », uniformément et symétriquement distribués. Cette distribution de la ramification provoque rapidement un encombrement stérique à la périphérie de la particule  $\beta$  de glycogène. Les chaînes de glucose périphériques, alors inaccessibles aux sites catalytiques des enzymes de synthèse, définissent le contour de la molécule de glycogène. C'est donc à la fois la distribution des ramifications et la conformation des sites actifs des enzymes de synthèse qui limiteront le diamètre des particules  $\beta$  de glycogène à 42 nm (Melendez-Hevia *et al.*, 1993). Des dimensions supérieures peuvent être cependant atteintes par des conglomerats de ces dernières appelés particules  $\alpha$ . Le granulose et l'amidon ne sont, par contre, pas limités en taille. Le granulose se définit par un assemblage amorphe et insoluble d' $\alpha$ -1,4 glucanes dépourvus de ramifications. Sa distribution se borne à certaines bactéries anaérobies du genre *Clostridium* (Preiss et Romeo, 1989). L'amidon se définit comme un mélange de deux types de polymères, l'amylopectine, fraction modérément ramifiée (5 % de branchements), forme l'ossature semi-cristalline du grain d'amidon au sein de laquelle s'enchaînent les longues chaînes d'amylose peu ou pas ramifiées (< 1 % de branchements). La distribution asymétrique de la ramification donne lieu à un regroupement de chaînes en grappes (*figure 1*)<sup>1</sup>. Au sein de celles-ci les chaînes s'enlacent, forment des doubles hélices et cocristallisent donnant lieu à l'effondrement de la structure hydratée et à la formation d'un empilage macrogranulaire insoluble et semi-cristallin : le grain d'amidon. L'amidon est retrouvé dans le chloroplaste des algues vertes et de toutes les plantes terrestres qui en dérivent. Un amidon aux propriétés similaires est aussi retrouvé dans le cytoplasme des algues rouges (Viola *et al.*, 2001), des glaucophytes (Plancke *et al.*, 2008), des dinoflagellées (Deschamps *et al.*, 2008c), de certains parasites *apicomplexa* (Coppin *et al.*, 2005) et dans le périplaste des algues

cryptophytes (Deschamps *et al.*, 2006). Tous ces organismes dérivent soit directement (algues vertes et plantes terrestres, algues rouges, glaucophytes) soit indirectement (dinoflagellées, parasites apicomplexes et cryptophytes) de l'endosymbiose primaire du plaste qui s'est déroulée il y a approximativement 1,5 milliard d'années (Yoon *et al.*, 2004). À cette époque, la rencontre d'une cellule eucaryote et d'une cyanobactérie s'est soldée par l'ingestion de cette dernière et l'établissement d'une relation symbiotique entre celle-ci et son hôte. Cet événement d'une importance considérable a abouti à l'acquisition par les cellules eucaryotes d'un métabolisme typiquement bactérien : la photosynthèse oxygénique. La cyanobactérie allait lentement évoluer en organite cellulaire et se transformer progressivement en plaste (appelé chloroplaste, rhodoplaste ou cyanelle respectivement chez les algues vertes et rouges et les glaucophytes). Trois lignées distinctes ont ensuite émergé de cette endosymbiose : les algues vertes qui donneront ensuite toutes les plantes terrestres, les algues rouges et les glaucophytes. Ces lignées, également baptisées lignées d'endosymbiose primaire, se distinguent par la nature de leurs antennes photosynthétiques constituées soit de chlorophylle b et a, soit de chlorophylle a et de phycobilisomes, soit encore des seuls phycobilisomes – en ce qui concerne respectivement les algues vertes, les algues rouges, et les glaucophytes. Les glaucophytes ont divergé en premier de l'ancêtre commun, les algues rouges et vertes se différenciant plus tardivement (Reyes-Prieto et Bhattacharya, 2007). Dans ce contexte, et pour beaucoup d'autres raisons, non reprises ici mais détaillées par Deschamps *et al.* (2008a), il est logique de penser que la présence d'amidon dans le cytoplasme définit un caractère ancestral, tandis que la présence d'amidon dans les plastes serait un caractère dérivé. Pour des raisons historiques, l'amidon cytosolique sera baptisé amidon floridéen, les premières algues rouges analysées sur ce plan faisant partie du groupe des *Florideophycideae* (Viola *et al.*, 2001). Dans cette synthèse, nous nous attacherons à résumer l'état de nos connaissances sur le métabolisme de l'amidon chez les algues vertes et les végétaux terrestres, et à comprendre l'impact que peuvent avoir ces connaissances sur l'amélioration des plantes cultivées. Nous nous pencherons également sur l'origine évolutive de cette structure si particulière au règne végétal.

## La synthèse de l'amidon chez les *Chloroplastida*

La lignée verte (*Chloroplastida*) comprend la plupart des algues vertes et l'intégralité des plantes terrestres.

Comme on peut s'en douter, vue l'importance économique des plantes cultivées, l'essentiel des premières études concernait l'amidon dit de réserve accumulé dans les graines au niveau de l'albumen des céréales (surtout le maïs et le riz et, dans une moindre mesure, l'orge) ou des embryons de pois. L'ensemble des résultats concernant cette voie métabolique est résumé dans la *figure 2*. La toute première expérience de génétique réalisée sur les pois lisses et ridés par Grégor Mendel impliquait une lignée défectueuse pour l'enzyme de branchement de l'amidon (Bhattacharyya *et al.*, 1990). C'est Luis Leloir et son équipe qui, les premiers, en 1961, ont révélé que la synthèse d'amidon se réalisait essentiellement par l'entremise de l'ADP-glucose (Recondo et Leloir, 1961). Cette propriété semblait rapprocher le métabolisme du polysaccharide végétal de celui du glycogène des bactéries (Preiss et Romeo, 1989). En effet, toutes les lignées eucaryotes productrices de glycogène le synthétisent à partir d'UDP-glucose qui définit un carrefour métabolique commun à un grand nombre de biosynthèses très différentes. En revanche, l'ADP-glucose n'est utilisé chez les bactéries et les plantes que pour la synthèse des polysaccharides de réserves (Preiss et Romeo, 1989). La synthèse d'ADP-glucose dans ces deux cas définit donc la première étape spécifique de la voie de synthèse de l'amidon. Comme c'est souvent le cas, ce sera cette première étape qui sera sujette à la régulation métabolique la plus fine, et ce sera donc elle qui contrôlera l'essentiel du flux de carbone dans cette voie. Cette hypothèse a été validée par un grand nombre d'études réalisées non seulement chez les plantes cultivées, mais aussi, plus récemment, chez les systèmes modèles tels que la crucifère *Arabidopsis thaliana* ou la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Lin *et al.*, 1988a, b ; van den Koornhuysse *et al.*, 1996 ; Zabawinski *et al.*, 2001). Il est donc possible d'accroître ou, au contraire, de diminuer la teneur en amidon de n'importe quel tissu dans n'importe quelle plante en manipulant l'activité de l'ADP-glucose pyrophosphorylase, l'enzyme responsable de la synthèse du nucléotide-sucre. Cette enzyme, qui synthétise l'ADP-glucose à

<sup>1</sup> Pour une discussion plus détaillée, voir Buléon *et al.*, (1998).

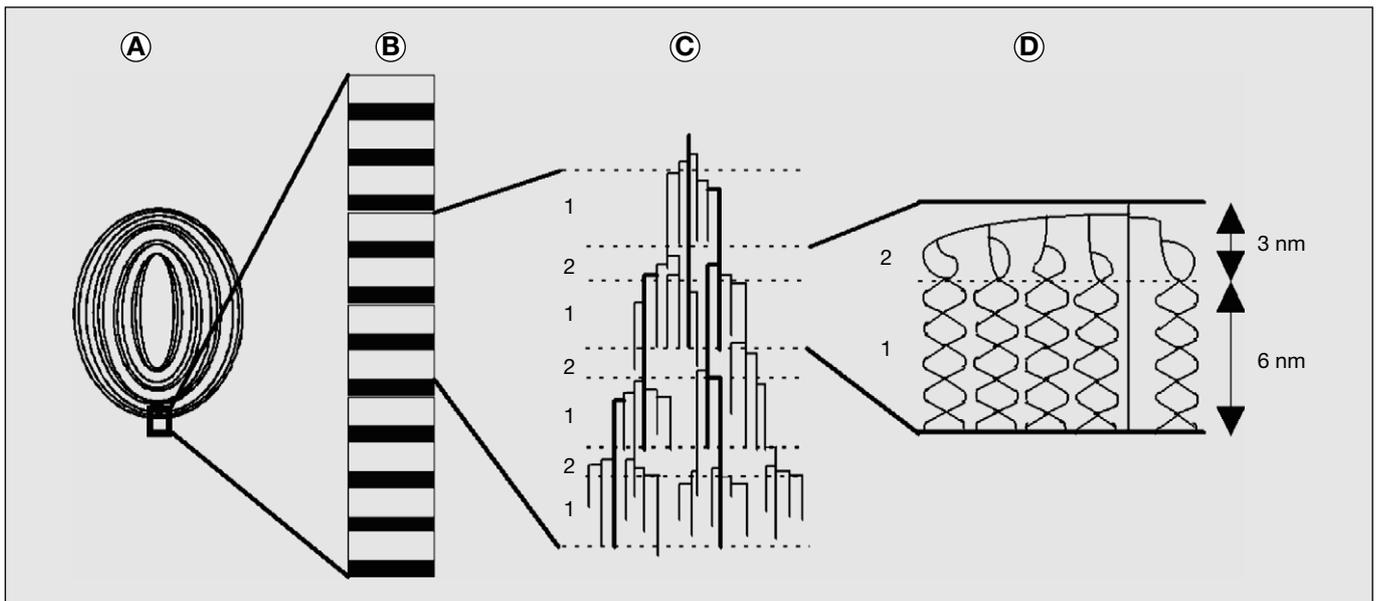


Figure 1. Structure de l'amidon

Figure 1. Starch structure

Agrandissements successifs d'une région d'un grain d'amidon représenté en tranche (A) dont on distingue l'alternance des régions amorphes et semi-cristallines correspondant aux anneaux de croissance. La projection en B reproduit l'agrandissement d'une région semi-cristalline où des lamelles amorphes (en noir) et cristallines, visualisée par diffraction des RX aux petits angles, se succèdent avec une étonnante régularité tous les 9 nm. Sur la partie C, la succession de 7 lamelles amorphes et cristallines est rapportée à la structure primaire proposée pour un segment de molécule d'amylopectine. Chaque ligne représente une chaîne d' $\alpha$ -1,4 glucose et les points d'intersection des lignes symbolisent les liaisons  $\alpha$ -1,6. Les lignes en gras soulignent les chaînes qui relient les grappes entre elles et dont la synthèse dépend principalement de la SSIII (et/ou) de la GBSS (*Granule-bound Starch Synthase*). En D la structure secondaire en double hélices est représentée pour une de ces grappes. La position de l'amylose au sein de cette structure reste encore incertaine et n'est donc pas représentée (pour plus de détails se rapporter à Buléon *et al.*, 1998).

partir de glucose-1-P et d'ATP, est activée par le 3-phosphoglycerate et inhibée par l'orthophosphate (Ballicora *et al.*, 2003). Cette régulation est retrouvée à l'identique chez les cyanobactéries. Il ne fait d'ailleurs aucun doute que le gène codant cette enzyme a été hérité de celui de la cyanobactérie ancêtre du plaste.

Le glucose du nucléotide-sucré est ensuite transféré en position  $\alpha$ -1,4 à l'extrémité non réductrice d'une chaîne en croissance. Cette réaction catalysée par des enzymes d'élongation baptisées amidon synthétases est retrouvée à l'identique chez les bactéries pour la synthèse de glycogène. D'ailleurs, la phylogénie des enzymes végétales les rapproche à nouveau incontestablement des cyanobactéries. La plupart de ces enzymes sont incapables d'amorcer la réaction *de novo* sans l'aide d'une amorce oligo- ou polysaccharidique. Cette remarque doit être cependant nuancée, en tous cas pour les activités bactériennes, et probablement aussi pour les enzymes végétales qui en dérivent. En effet, certaines enzymes bactériennes se sont récemment révélées capables d'initier la réaction de synthèse, une propriété qui ne semble

pas partagée par les glycogène synthétases fongiques ou animales (Ugalde *et al.*, 2003). Ces dernières sont assistées pour l'initiation de la synthèse par des enzymes aux propriétés autoglucosylantes : les glycogénines. Il semble bien que celles-ci n'aient aucun rôle à jouer dans la synthèse de l'amidon dans la mesure où elles sont absentes des génomes de six algues vertes récemment séquencés (Deschamps *et al.*, 2008b). Pas moins de quatre amidons synthétases solubles différentes (parfois cinq ou six) sont requises pour la synthèse de l'amidon. Elles sont toutes impliquées dans des facettes différentes de l'édification de sous-structures de l'amylopectine. Ces enzymes multiples sont aussi partiellement redondantes : une amidon synthétase particulière est souvent capable de prendre partiellement en charge la synthèse de chaînes majoritairement sous la dépendance d'une autre amidon synthétase. Pour résumer, nous dirons que chaque enzyme d'élongation semble contrôler au sein de l'amylopectine la synthèse de classes de chaînes de tailles différentes avec des domaines de recouvrement fonctionnels importants. Un rôle plus particulier semble toutefois

se dessiner pour la SSSIV (*Soluble Starch Synthase IV*). En effet, des mutants ou lignées transgéniques sous-exprimant ou surexprimant cette enzyme voient le nombre total de grains synthétisés parfaitement corrélé au niveau de cette activité (Roldan *et al.*, 2007). Cette observation semble donc donner à cette enzyme une fonction importante dans l'initiation de la formation de nouveaux grains. Aucune des amidons synthétases solubles n'a de rôle à jouer dans la formation de l'amylose. La synthèse de cette sous-fraction dépend uniquement de la seule enzyme présente et uniquement active au sein de la matrice semi-cristalline du grain amidon, la GBSS (*Granule-bound Starch Synthase*) ou amidon synthétase liée au grain (Ball *et al.*, 1998). Cette enzyme séquestrée dans le grain d'amidon bâtit de manière processive de longues chaînes de glucose qui ne sont que rarement accessibles aux enzymes de branchement. En effet, ces dernières, comme l'intégralité des autres enzymes du métabolisme de l'amidon, à l'exception de la GBSS, sont actives dans la phase soluble du plaste (le stroma) et non au sein du grain. Elles n'ont, de ce fait, pas accès

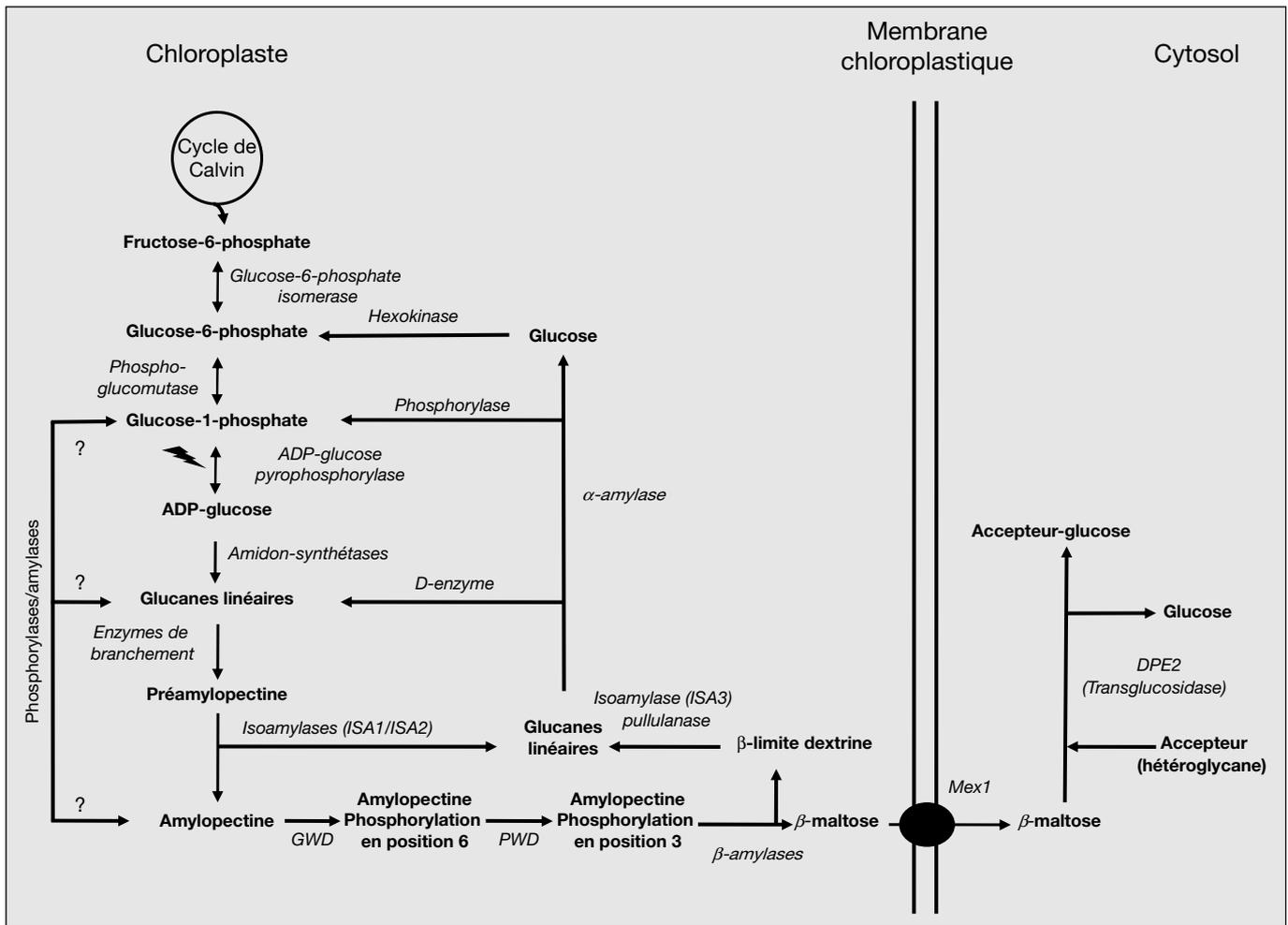


Figure 2. Métabolisme de l'amidon chez les végétaux et algues vertes.

Figure 2. Starch metabolism in land plants and green algae.

Au cours de la photosynthèse, le fructose-6-phosphate est produit au cours du cycle de Calvin et de la néoglucogenèse. Ce métabolite est converti en glucose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate isomérase, puis en glucose-1-phosphate par la phosphoglucomutase. La synthèse du nucléotide-sucré, l'ADP-glucose, est réalisée en présence d'ATP et de glucose-1-phosphate par l'ADP-glucose pyrophosphorylase, une enzyme hautement régulée, qui contrôle le flux dans la voie. Le glucose activé est transféré à l'extrémité non réductrice d'un  $\alpha$ -1,4 glucane en croissance par l'entremise des amidons synthétases solubles (SSS). Les enzymes de branchement introduisent les liaisons  $\alpha$ -1,6 – ou points de branchement – en catalysant le clivage d'une liaison  $\alpha$ -1,4, puis le transfert de l'extrémité réductrice sur le carbone 6 d'un résidu de glucose d'une chaîne de glucose voisine. Le cycle de ramifications et d'élongations par les multiples isoformes d'amidon synthétases et d'enzymes de branchement produit de la préamylopectine un polymère branché incapable de s'insolubiliser et de cristalliser sans l'action des enzymes de débranchement (ISA1 et ISA2). Les branches de la préamylopectine qui sont fortement espacées sont hydrolysées par les isoamylases au profit de celles qui sont rapprochées générant de cette manière les grappes d'amylopectine qui s'insolubiliseront et cristalliseront sous forme d'un grain d'amidon structuré. Les chaînes débranchées sont recyclées par la D-enzyme ou DPE1. La dégradation de l'amidon sera provoquée par phosphorylation de la surface du grain d'amidon. La phosphorylation de l'amidon est catalysée par deux activités dikinases : *Glucan Water Dikinase* (GWD) et la *Phosphoglucan Water Dikinase* (PWD). La GWD phosphoryle le carbone 6 d'un résidu de glucose. Cette réaction est indispensable pour permettre la phosphorylation du carbone 3 par la PWD. La présence de groupements phosphates à la surface permettrait de perturber la structure cristalline des grappes d'amylopectine afin d'être accessible à l'hydrolyse par les activités  $\beta$ -amylasiques. Les  $\beta$ -amylase sont des exoenzymes qui libèrent du  $\beta$ -maltose à partir de l'extrémité non réductrice d'une chaîne de glucose et stoppent à trois ou quatre résidus de glucose avant un point de branchement. Le  $\beta$ -limite dextrine branchée (le produit final de l'action de la  $\beta$ -amylase) est hydrolysée complètement sous l'action conjuguée des enzymes de débranchement (ISA3 et pullulanase), de la phosphorylase et des  $\alpha$ -amylases. Le  $\beta$ -maltose produit est exporté du plaste vers le cytosol par l'entremise du transporteur MEX1. Dans le cytosol, le  $\beta$ -maltose est hydrolysé par la transglucosidase (DPE2) avec transfert d'un des deux résidus glucose sur un hétéroglycane accepteur. Il est probable que cet hétéroglycane glucosylé est ensuite rogné par une phosphorylase cytosolique (non montré). Outre la voie impliquant les  $\beta$ -amylases il est plausible que des voies hydrolytiques et phosphorytiques intraplastidiales soient également accessibles. Ces voies sont représentées sous forme de points d'interrogation puisque des preuves expérimentales convaincantes de leur existence n'ont pas encore été acquises.

aux chaînes d'amylose protégées par la matrice polysaccharidique. Si les amidons synthétases solubles participent uniquement à la synthèse de l'amylopectine, la GBSS participe à la synthèse des deux fractions (Maddelein *et al.*, 1994). En effet, la GBSS semble partager avec la

SSSIII un rôle très particulier dans la synthèse des plus longues chaînes de l'amylopectine, celles qui relient les différentes grappes entre elles. La plupart des végétaux renferment trois enzymes de branchement différentes dont deux appartiennent à une même sous-famille (la sous-

famille des BEII [*Branching Enzyme II*]). Ces enzymes hydrolysent des liaisons  $\alpha$ -1,4 et prennent en charge un segment de chaîne hydrolysée pour le transférer en position  $\alpha$ -1,6 sur une chaîne voisine. L'importance des BEII est clairement attestée par l'analyse d'un grand nombre

de mutants dans différents systèmes (Ball et Morell, 2003). Par contre, celle des BEI semble moins évidente. Il existe, en effet, quelques rares espèces de plantes dont le génome est dépourvu du gène BEI. Les BE participent avec les SSS (*Soluble Starch Synthétases*) à l'édification de l'amylopectine. Le système se caractérise par sa complexité et sa non-linéarité. Chaque amidon synthétase soluble forme un produit susceptible d'être un substrat pour une autre amidon synthétase ou une enzyme de branchement dont le produit peut redevenir un substrat pour la première enzyme. Ce système non linéaire est peut-être plus ordonné qu'il ne paraît. En effet, plusieurs complexes multi-enzymatiques dont la formation et la dissociation semblent dépendre de l'état de phosphorylation des sous-unités ont été clairement documentées chez le maïs et le blé (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008 ; Tetlow *et al.*, 2008). Une majorité des enzymes d'élongation et de ramification semble partie prenante de ces complexes dont les géométries doivent encore être précisées. Il se pourrait donc que les différentes enzymes d'élongation et de ramification aient un mode de fonctionnement conjoint hiérarchisé qui reste encore à élucider. Malgré cette organisation, les enzymes d'élongation et de ramification semblent incapables de synthétiser un polysaccharide dont la distribution asymétrique des ramifications conduise à la cristallisation du polymère et à son agrégation au sein d'un grain insoluble. Malgré de nombreuses tentatives, personne n'a réussi à produire de l'amidon *in vitro* à partir d'enzymes d'élongation et de ramification végétales. En revanche, la synthèse de glycogène ou d'oligosaccharides peut être aisément reproduite *in vitro* à partir d'enzymes, qu'elles soient végétales ou d'origines diverses. Il est probable que même les complexes multi-enzymatiques précités soient incapables *in vivo* d'assurer la synthèse d'amylopectine semi-cristalline. Les premiers indices suggérant l'existence d'un procédé additionnel, requis pour la cristallisation de l'amylopectine, sont venus de l'analyse du phénotype de mutants particuliers chez le maïs et la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* par l'équipe d'Alan Myers à l'Iowa State University et par notre équipe à Lille (James *et al.*, 1995 ; Mouille *et al.*, 1996). Dans les deux cas, la mutation portait sur une activité que l'on pensait impliquée dans la dégradation de l'amidon et non sa synthèse. En effet, des mutants défectueux

pour une forme particulière d'enzyme de débranchement appelée isoamylase substituèrent, soit partiellement, soit totalement, la synthèse de l'amidon par celle du glycogène. L'enzyme de débranchement hydrolyse la liaison  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine ou du glycogène et, ce faisant, libère un oligosaccharide. Plusieurs types d'enzymes débranchantes sont attestés chez les végétaux. L'isoamylase se distingue par sa capacité à digérer les branches lorsque ces dernières sont suffisamment espacées, comme c'est le cas pour le glycogène. L'isoamylase, par contre, est beaucoup moins efficace lorsqu'il s'agit d'hydrolyser les branches présentes à la racine des grappes d'amylopectine. D'autres enzymes débranchantes végétales telles que la pullulanase ou le produit du gène ISA3 d'*Arabidopsis* (une enzyme de phylogénie proche des isoamylases, mais aux propriétés d'hydrolyse totalement différentes) sont en revanche beaucoup plus efficaces pour la dégradation des branches de l'amylopectine. Au regard des propriétés catalytiques des isoamylases et du phénotype singulier des mutants qui en sont dépourvus, un modèle expliquant les différences principales entre métabolismes du glycogène et de l'amidon a été construit (Ball *et al.*, 1996). Ce modèle suggère que la fonction de l'isoamylase serait d'épisser le précurseur de l'amylopectine (la préamylopectine synthétisée par les complexes multi-enzymatiques précités) en hydrolysant des branches qui ne sont pas fortement rapprochées les unes des autres, autorisant de cette manière la formation des grappes, l'entrelacement des chaînes voisines, et leur cristallisation. En absence de cette activité correctrice, le système biosynthétique aboutira à la synthèse de glycogène. Ce modèle, proposé en 1996, rend compte aujourd'hui encore de l'ensemble des résultats obtenus. Les travaux génétiques menés par notre équipe chez *Chlamydomonas* et par celle de Yasunori Nakamura au Japon ont très tôt mis en évidence l'existence de complexes isoamylasiques formés de plusieurs sous-unités dont l'architecture semble au moins aussi importante que l'activité (Fujita *et al.*, 1999 ; Dauvillée *et al.*, 2001a, b). À l'évidence, l'isoamylase, en libérant les chaînes mal placées, pose le problème du métabolisme de ces dernières et, surtout, de l'économie énergétique du processus. À nouveau, l'analyse génétique de mutants de *Chlamydomonas* allait révéler l'importance de l'enzyme disproportionnante (D-enzyme), une  $\alpha$ -

1,4-glucanotransférase capable de transférer des segments de chaînes de malto-oligosaccharides donneurs aux chaînes acceptrices constituées soit par d'autres malto-oligosaccharides, soit par les chaînes externes du polysaccharide en croissance (la préamylopectine) (Colleoni *et al.* 1999a,b). Dans le cas d'un transfert sur la préamylopectine, l'économie énergétique de l'épissage se borne à deux ATP par chaîne déplacée quelle qu'en soit la longueur. Chez *Chlamydomonas*, l'absence d'enzyme disproportionnante aboutit à un effondrement de la synthèse d'amidon qui résulte des contraintes énergétiques imposées par un mauvais recyclage des oligosaccharides libérés par l'isoamylase (Colleoni *et al.*, 1999a). L'ensemble du système de biosynthèse précité est compartimenté dans le stroma des plastes photosynthétiques ou dans celui des amyloplastes des organes de réserve. Les voies de synthèse dans les deux types de plastes sont identiques. Il faut cependant ajouter que dans le cas des albumens de graines de céréales, le système biosynthétique est complété par l'existence d'une forme supplémentaire d'ADP-glucose pyrophosphorylase localisée dans le cytosol. L'ADP-glucose cytosolique est importé dans l'amyloplaste des albumens de graines de céréales, par l'intermédiaire d'un transporteur localisé sur les enveloppes de l'organelle (Ball et Morell, 2003).

## La mobilisation récurrente de l'amidon chez les *Chloroplastida*

La mobilisation récurrente de l'amidon dans les chloroplastes des feuilles définit un processus physiologique très différent de la dégradation spécialisée des réserves lors de la germination des graines. Nous ne nous attacherons pas à décrire ce dernier, qui s'accompagne, d'ailleurs, de destructions et de compartimentations cellulaires importantes de l'albumen. De fait, la dégradation récurrente de l'amidon qui se produit dans la plupart des tissus de la plante est un processus de complexité analogue à sa synthèse. Il n'est pas inutile de rappeler que la plupart des enzymes végétales hydrosolubles n'ont aucune prise sur l'amidon semi-cristallin intact. Les équipes dirigées par Jens Kossmann et Martin Steup à Golm en Allemagne ont, les pre-

mières, démontré la présence de protéines capables de phosphoryler l'amidon, protéines qui semblaient requises pour sa dégradation récurrente dans les chloroplastes de feuille (Lorberth *et al.*, 1998 ; Ritte *et al.*, 2002). Ces protéines appelées GWD (*Glucan-Water Dikinase*) renferment un domaine de liaison au grain d'amidon et un domaine dikinase assurant la phosphorylation du carbone 6 du glucose de l'amylopectine cristalline. Les équipes de Martin Steup et d'Andreas Blenow de Copenhague ont, ensuite, démontré l'existence d'autres dikinases responsables de la phosphorylation du glucose de l'amylopectine sur le carbone 3 (Baunsgaard *et al.*, 2005 ; Kötting *et al.*, 2005). Ces dernières appelées PWD (*Phosphoglucan Dikinase*) ne sont d'ailleurs capables de phosphoryler l'amidon que si celui-ci a été préphosphorylé en position 6. Le rôle suggéré de ces phosphorylations consisterait à rendre plus hydrophiles et accessibles les doubles hélices de l'amylopectine cristalline (Hejazi *et al.*, 2008). Ces dernières sont ensuite attaquées par des  $\beta$ -amylases qui produisent du  $\beta$ -maltose de manière récurrente à partir des extrémités non réductrices de ces doubles hélices phosphorylées (Scheidig *et al.*, 2002). Les chaînes de l'amylopectine seraient ensuite déramifiées par une enzyme débanchante spécifique appelée ISA3 (Edner *et al.*, 2007). Le  $\beta$ -maltose ne peut être digéré à l'intérieur du plaste. Il n'est d'ailleurs pas un substrat utilisable par la D-enzyme plastidiale. En revanche, il existe dans le cytosol une  $\alpha$ -1,4 glucanotransférase capable de cliver la liaison glycosidique du  $\beta$ -maltose, pourvu qu'un des deux résidus glucose du disaccharide soit transféré sur un polysaccharide accepteur. L'inactivation de cette transglucosidase cytosolique conduit d'ailleurs à une inhibition de la mobilisation de l'amidon et une accumulation de maltose (Lu et Sharkey, 2004 ; Lloyd JR *et al.*, 2004 ; Chia *et al.*, 2004). Le  $\beta$ -maltose semble transporté par l'entremise d'une protéine exportatrice de maltose présente sur les enveloppes du plaste (Niittylä *et al.*, 2004). Le phénotype des mutants de ce transporteur est d'ailleurs analogue à celui des plantes privées de transglucosidase. Le meilleur accepteur polysaccharidique de la transglucosidase *in vitro* est de loin le glycogène. Or il n'existe pas de glycogène dans le cytosol des cellules végétales. Martin Steup et son équipe ont découvert l'existence d'un hétéroglycane cytosolique dont les chaînes externes sont constituées de chaînes de glucose liées en  $\alpha$ -1,4 (Fettke *et al.*,

2004). Ces chaînes seraient donc allongées par la transglucosidase pour être ensuite dégradées par une phosphorylase cytosolique (Fettke *et al.*, 2006). Les phosphorylases sont les enzymes principales de la dégradation du glycogène fongique animal et bactérien. Elles attaquent le glucose en position terminale non réductrice en présence d'orthophosphate pour générer du glucose-1-P et ne peuvent dégrader les branches ou des chaînes ou oligosaccharides de moins de 5 résidus de glucose de longueur. Il existe chez les végétaux des phosphorylases plastidiales et cytosoliques. On soupçonne les phosphorylases plastidiales de jouer un rôle important dans une voie de dégradation intraplastidiale de l'amidon, indépendante de la production de  $\beta$ -maltose. Cette voie permettrait de maintenir une glycolyse intraplastidiale active à l'obscurité. Pour l'instant, aucun mutant n'est venu véritablement étayer ce rôle supposé. La même remarque vaut pour les  $\alpha$ -amylases plastidiales et la pullulanase. Le seul phénotype rapporté pour une déficience en phosphorylase plastidiale consiste en un défaut de synthèse d'amidon analogue à celui que l'on enregistre chez des mutants déficients en enzyme de branchement (Dauvillée *et al.*, 2006). Ce défaut s'expliquerait par l'existence d'un complexe multienzymatique impliquant la phosphorylase et les enzymes de branchement.

## Origine évolutive du métabolisme de l'amidon

Comme nous l'avons précisé plus haut, la présence du métabolisme de l'amidon est corrélée avec l'endosymbiose plastidiale. Des études biochimiques, bio-informatiques et génétiques ont été entreprises dans les lignées sœurs des *Chloroplastida* : les algues rouges (Rhodophyceae) et les glaucophytes (Coppin *et al.*, 2005 ; Plancke *et al.*, 2008). Ces études mettent en lumière une origine phylogénétique commune du métabolisme de l'amidon dans les trois lignées, qui confirment leur origine unique (Rodriguez-Ezpeleta *et al.*, 2005). Les glaucophytes et les algues rouges diffèrent cependant des *Chloroplastida* non seulement par la localisation de l'amidon qui, rappelons le, est cytosolique, mais aussi par la présence

d'un métabolisme basé sur l'UDP-glucose comme c'est le cas pour le glycogène chez les eucaryotes. Les amidon synthétases de ces deux lignées ont, d'ailleurs, contrairement aux *Chloroplastida*, une phylogénie eucaryote (Nyvall *et al.*, 1999 ; Coppin *et al.*, 2005 ; Plancke *et al.*, 2008 ; Deschamps *et al.*, 2008a). De plus, les enzymes de branchement, les  $\beta$ -amylases, les phosphorylases, la transglucosidase font également preuve d'une origine eucaryote commune dans les trois lignées de l'endosymbiose (Deschamps *et al.*, 2008a). Les seules fonctions d'origine cyanobactérienne présentes chez les glaucophytes et les algues rouges sont constituées par l'isoamylase et la GBSS. Ces deux activités enzymatiques sont associées soit à la production de polysaccharides semi-cristallins, soit encore à la synthèse d'amylose au sein de la matrice semi-cristalline. Il est désormais clair que le métabolisme de l'amidon est défini par une mosaïque de gènes d'origine soit eucaryote soit cyanobactérienne qui résulte de la rencontre d'une cellule eucaryote hétérotrophe et d'une cyanobactérie voici 1,5 milliard d'années (Coppin *et al.*, 2005 ; Deschamps *et al.*, 2008a). Mais d'où vient cette structure si particulière qui n'est retrouvée, en apparence, chez aucune cyanobactérie ni aucun eucaryote indépendamment de l'endosymbiose ?

La présence chez les végétaux d'enzymes de phylogénie eucaryote et cyanobactérienne laisse penser que chacun des deux partenaires de l'endosymbiose synthétisait des polysaccharides formés de glucose lié en  $\alpha$ -1,4 et ramifiés en  $\alpha$ -1,6, mais sous quelle forme ? Le fait que l'isoamylase et la GBSS, toutes deux associées à la nature semi-cristalline de l'amidon, soient de phylogénie cyanobactérienne nous a suggéré que des structures analogues à l'amidon végétal existaient peut-être parmi elles. La plupart des cyanobactéries accumulent cependant du glycogène. Le groupe de Yasunori Nakamura (Nakamura *et al.*, 2005) au Japon a le premier rapporté des structures de glycogène anormal baptisé semi-amylopectine dans un sous-groupe particulier de cyanobactéries : le sous-groupe V selon la classification de Honda *et al.* (1999). Parmi les cyanobactéries du sous-groupe V, nous avons, à Lille, identifié et axénisé une cyanobactérie marine fixatrice d'azote qui contenait des grains de morphologie et de dimensions comparables à l'amidon des végétaux. Nous avons révélé que ces grains contenaient

de l'amylose et de l'amylopectine et qu'ils affichaient des spectres de diffraction aux rayons X identiques à ceux qui caractérisent l'amidon (Deschamps *et al.*, 2008a). Après avoir analysé les protéines liées au grain d'amidon, nous avons eu la surprise d'y découvrir une GBSS capable de synthétiser de l'amylose *in vitro*. Cette découverte était importante parce que, malgré sa phylogénie bactérienne, la distribution de la GBSS semblait jusque là restreinte aux plantes. Pourquoi seules les cyanobactéries du sous-groupe V synthétisent-elles de telles structures? La réponse saute aux yeux lorsqu'on examine les particularités physiologiques de ce sous-groupe. Les cyanobactéries du sous-groupe V accumulatrices d'amidon sont toutes unicellulaires et fixatrices d'azote (diazotrophes). La diazotrophie impose l'isolement de l'enzyme fixatrice d'azote atmosphérique baptisée nitrogénase, relativement à l'oxygène ambiant. En effet, celle-ci est inactivée par la présence d'oxygène. Or, la photosynthèse oxygénique que pratiquent les cyanobactéries et les plantes, qui en ont hérité, dégage des quantités importantes d'oxygène. Comment donc protéger la nitrogénase de son inactivation par l'oxygène? Les cyanobactéries ont résolu le problème de deux manières. Les espèces filamenteuses multicellulaires cantonnent la diazotrophie à des cellules spécialisées qui ne sont pas photosynthétiques et s'isolent de l'air ambiant. Les cyanobactéries unicellulaires diazotrophes du sous-groupe V, ne pouvant faire de même, séparent la diazotrophie de la photosynthèse temporairement en cantonnant la fixation d'azote à la nuit, grâce à une régulation médiée par l'horloge circadienne (Schneegurt *et al.*, 1994). La diazotrophie étant particulièrement gourmande en énergie, cette stratégie d'isolement impose la mise en réserve de l'énergie captée la journée par la photosynthèse pour son utilisation la nuit. Les quantités d'énergie à mettre en réserves pour ces cyanobactéries sont donc beaucoup plus importantes que pour les autres membres du groupe. L'invention des polysaccharides semi-cristallins par ces cyanobactéries a permis de réduire la dégradation du polysaccharide de réserve pendant le jour en insolubilisant des polymères qui, *ipso facto*, deviennent inaccessibles aux enzymes de dégradation. Cette invention a permis de mettre en réserve d'avantage de glucose sous forme osmotiquement inerte que ne l'aurait permis le glycogène.

## Conclusions et perspectives pour l'amélioration des plantes cultivées

Une demi-douzaine de mutations distinctes ont été jusqu'ici utilisées, seules ou en combinaison, dans le but d'obtenir des productions de « spécialité » surtout chez le maïs. Ceux-ci incluent les maïs « *waxy* », « *sugary* » (maïs doux), « *amylose extender* » « *dull* », « *sbrunken* » et « *brittle* », dont les gènes mutés correspondent respectivement à la GBSS, à l'isoamylase, à la BEIIb, à la SSIII et aux deux sous-unités des ADP-glucose pyrophosphorylases dont nous venons d'évoquer les fonctions. Pourtant le métabolisme de l'amidon chez les plantes vertes se caractérise non par le fonctionnement coordonné de six loci, mais par la présence d'un réseau de plus de 40 gènes (Deschamps *et al.*, 2008b). Ce réseau est notoirement plus complexe que celui qui caractérise les algues rouges, les cyanobactéries ou les glaucophytes. Cette complexité est très ancienne et partagée par l'ensemble de la lignée verte (algues vertes et plantes) (Deschamps *et al.*, 2008b). Les possibilités offertes par la modification d'une ou plusieurs composantes de ce réseau sont donc pratiquement infinies. On peut s'interroger sur le peu d'efforts conduits par les améliorateurs dans cette direction. La première explication vient probablement du peu de lisibilité que nous avons concernant la relation qui existe entre la fonctionnalité industrielle d'un amidon et sa structure. Le travail que nous venons de synthétiser ci-dessus vise à déterminer la relation qui existe entre la structure et les gènes qui la déterminent. Ce travail toujours en cours aujourd'hui chez les plantes modèles *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* sera terminé dans probablement moins d'une quinzaine d'années. Or, la structure conditionne de manière prépondérante la fonctionnalité industrielle (viscosité, solubilité, gélification, rétrogradation...), mais comment? Force nous est de constater que cette relation est loin d'être simple et comprise : il est aujourd'hui impossible de réellement prévoir la fonctionnalité industrielle d'un amidon donné et donc son utilisation possible. Les améliorateurs ne savent donc pas vraiment quelle cible choisir, ni comment améliorer les propriétés fonctionnelles du polysaccharide.

La deuxième explication réside dans les difficultés qu'il y a à transposer aux plantes cultivées les découvertes acquises dans les systèmes modèles. Ce n'est pas un hasard si tous les mutants utilisés par les industriels chez le maïs concernent les gènes qui donnent des phénotypes majeurs sur l'aspect des graines. En effet, c'est comme cela qu'ils ont été criblés et découverts. Pourtant ces gènes sont très minoritaires parmi le réseau des 40 loci précités. Ce type de criblage n'a pas permis de révéler l'existence de gènes potentiellement très importants pour une utilisation future, comme, par exemple, les loci codant des enzymes responsables de la phosphorylation de l'amidon ou ceux qui contrôlent le nombre de grains et en définitive leur granulométrie. Il faut donc resélectionner ces contextes d'extinction de fonctions chez les plantes cultivées, ce qui est loin d'être aisé si l'on s'interdit les approches de type OGM impliquant la transgénèse, surtout chez une espèce polyploïde comme le blé.

Enfin la dernière raison expliquant le peu de progrès enregistrés dans ce domaine réside dans la faible pression à l'innovation existant dans le secteur de l'utilisation de l'amidon pris dans son sens le plus large. L'amidon reste un produit à faible valeur ajoutée exigeant des procédés de purification bien adaptés à une ressource abondante et bon marché. Toute modification de ces procédés pour une adaptation à des polymères modifiés ou toute baisse de rendement est proscrite *a priori*, ce qui laisse peu de place pour l'ingénierie raisonnée de nouveaux types de polysaccharides. L'ensemble de ces raisons allié à l'impact particulièrement désastreux de la crise des OGM sur la recherche en biologie végétale explique peut-être pourquoi, malgré son importance centrale comme aliment ou substrat de transformation, moins de 20 équipes dans le monde étudient le métabolisme de ces polymères. ■

## Références

- Ball S, Guan HP James M, *et al.* From glycogen to amylopectin: a model explaining the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 1996; 86: 349-52.
- Ball S, van de Wal M, Visser R. Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends in Plant Sciences* 1998; 3 : 462-7.
- Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann Rev Plant Biol* 2003; 54 : 207-33.
- Ballicora MA, Iglesias AA, Preiss J. ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67 : 213-25.

- Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, *et al.* A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated -glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J* 2005 ; 41 : 595-605.
- Bhattacharyya MK, Smith AM, Ellis, *et al.* The wrinkled-seed character of a pea described by Mendel is caused by a transposon-like insertion in a gene encoding starch-branching enzyme. *Cell* 1990; 60: 115-22.
- Buléon A, Colonna P, Planchot V, *et al.* Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 1998 ; 23 : 85-112.
- Chia T, Thorncroft D, Chapple A, *et al.* A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J* 2004 ; 37 : 853-63.
- Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, *et al.* Genetic and biochemical evidence for the involvement of  $\alpha$ -1,4 glucanotransferases in amylopectin synthesis. *Plant Physiol* 1999a ; 120 : 993-1003.
- Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, *et al.* Biochemical characterization of the *Chlamydomonas*  $\alpha$ -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis. *Plant Physiol* 1999b ; 120 : 1005-14.
- Coppin A, Varre JS, Lienard L, *et al.* Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J Mol Evol* 2005 ; 60 : 257-67.
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, *et al.* Two loci control phytylglucan production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 2001a ; 125 : 1710-22.
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, *et al.* Biochemical characterization of wild type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol* 2001b ; 125 : 1723-31.
- Dauvillée D, Chochois V, Steup M, *et al.* Plastidial phosphorylase is required for normal starch granule biogenesis in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2006 ; 48 : 274-85.
- Deschamps P, Haferkamp I, Dauvillée D, *et al.* The nature of the periplastidial pathway of amylose synthesis in the cryptophyte *Guillardia theta*. *Eukaryot Cell* 2006 ; 5 : 954-63.
- Deschamps P, Colleoni C, Moreira D, *et al.* Metabolic symbiosis and the birth of the plant kingdom. *Mol Biol Evol* 2008a ; 25 : 536-48.
- Deschamps P, Moreau H, Worden AZ *et al.* Early Gene Duplication within Chloroplasts and its correspondence with Relocation of Starch Metabolism to Chloroplasts. *Genetics* 2008b ; Published Articles Ahead of Print, published on February 3, 2008 as 10.1534/genetics.108.087205
- Deschamps P, Guillebeault D, Devassine J, *et al.* The heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* defines a model genetic system to investigate cytoplasmic starch synthesis. *Eukaryot Cell* 2008c ; published on line ahead of print on February 29 2008 doi:10.1128/EC.00461-07.
- Edner C, Li J, Albrecht T, *et al.* Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial  $\beta$ -amylases. *Plant Physiology* 2007 ; 145 : 17-28.
- Fettke J, Chia T, Eckermann N, *et al.* A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J* 2006 ; 46 : 668-84.
- Fettke J, Eckermann N, Poeste S, *et al.* The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J* 2004 ; 39 : 933-46.
- Fujita N, Kubo A, Francisco Jr PB, *et al.* Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta* 1999 ; 208 : 283-93.
- Hejazi M, Fettke J, Haebel S, *et al.* Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltoextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J* 2008 ; 2 : 323-334. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03513.x
- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, *et al.* Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol* 2008 ; 146 : 1892-908.
- James MG, Robertson DS, Myers AM. Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* 1995 ; 7 : 417-29.
- Honda D, Yokota A, Sugiyama J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol* 1999 ; 48 : 723-39.
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, *et al.* Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves: the phosphoglucan, water dikinase (PWD). *Plant Physiol* 2005 ; 137 : 242-52.
- Lin TP, Caspar T, Somerville C, *et al.* Isolation and characterisation of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynth lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol* 1988a ; 86 : 1131-5.
- Lin TP, Caspar T, Somerville C, *et al.* A starch deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity lacks one of the two subunits of the enzyme. *Plant Physiol* 1988b ; 88 : 1175-81.
- Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, *et al.* Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat Biotechnol* 1998 ; 16 : 473-7.
- Lloyd JR, Blennow A, Burhenne K, *et al.* Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDP2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol* 2004 ; 134 : 1347-54.
- Lu Y, Sharkey TD. The role of amylomaltase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 2004 ; 218 : 466-73.
- Maddelein ML, Libessart N, Bellanger F, *et al.* Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule: Determination of granule-bound and soluble starch synthetase functions in amylopectin synthesis. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 25150-7.
- Melendez-Hevia E, Waddell TG, Shelton ED. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem J* 1993 ; 295 : 477-83.
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, *et al.* Preamylopectin Processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* 1996 ; 8 : 1353-66.
- Nakamura Y, Takahashi J, Sakurai A, *et al.* Some cyanobacteria synthesize semi-amylopectin type -polyglucans instead of glycogen. *Plant Cell Physiol* 2005 ; 46 : 539-45.
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, *et al.* A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 2004 ; 303 : 87-9.
- Nyvall P, Pelloux J, Davies HV, *et al.* Purification and characterisation of a novel starch synthase selective for uridine 5'-diphosphate glucose from the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* 1999 ; 209 : 143-52.
- Plancke C, Colleoni C, Deschamps P, *et al.* Pathway of cytosolic starch synthesis in the model glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. *Eukaryot Cell* 2008 ; 7 : 247-57 Doi : 10.1128/EC.00373-07.
- Preiss J, Romeo T. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv Microb Physiol* 1989 ; 30 : 183-238.
- Recondo E, Leloir L. Adenosine diphosphate glucose and starch biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1961 ; 6 : 85-8.
- Reyes-Prieto A, Bhattacharya D. Phylogeny of nuclear encoded plastid targeted proteins supports an early divergence of glaucophytes within Plantae. *Mol Biol Evol* 2007 ; 24 : 2358-61.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, *et al.* The starch-related R1 protein is an -glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 7166-71.
- Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, *et al.* Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: Green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 1325-30.
- Roldán I, Wattedled F, Lucas MM, *et al.* The phenotype of Soluble Starch Synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J* 2007 ; 49 : 492-504.
- Scheidig A, Fröhlich A, Schulze S, *et al.* Down-regulation of a chloroplast-targeted  $\beta$ -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* 2002 ; 30 : 581-91.
- Schneegurt MA, Sherman DM, Nayar S, *et al.* Oscillating behavior of carbohydrate granule formation and dinitrogen fixation in the cyanobacterium *Cyanoseta* sp. strain ATCC 51142. *J Bacteriol* 1994 ; 176 : 1586-97.
- Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, *et al.* Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol* 2008 ; 146 : 1878-91.
- Ugalde JE, Parodi AJ, Ugalde RA. *De novo* synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 10659-63.
- Van den Koornhuysen N, Libessart N, Delrue B, *et al.* Control of starch composition and structure through substrate supply in the monocellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 16281-8.
- Viola R, Nyvall P, Pedersen M. The unique features of starch metabolism in red algae. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2001 ; 268 : 1417-22.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, *et al.* A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 2004 ; 21 : 809-18.
- Zabawinski C, Van den Koornhuysen N, D'Hulst C, *et al.* Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of an heterotetrameric ADPglucose pyrophosphorylase. *J Bacteriol* 2001 ; 183 : 1069-77.