

Université des sciences et technologies de Lille

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale Biologie Santé

Présentée par

Nicolas Szydlowski

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

**Contribution à l'étude fonctionnelle des amidon-
synthétases dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana* :
initiation et élongation du polysaccharide de
réserve.**

Présentée le 2 Octobre 2009 devant la commission d'examen :

Président :	Dr Jean Claude MICHALSKI
Rapporteurs :	Pr Martin STEUP Dr Grégory MOUILLE
Examineurs :	Dr Angel MERIDA Pr Steven G. BALL
Directeur de thèse :	Pr Christophe D'HULST

RESUME

Cinq isoformes d'amidon-synthétase ont été identifiées dans le génome des plantes supérieures. L'une d'entre elles, la GBSS (pour « Granule Bound Starch Synthase ») est liée de manière non covalente au grain d'amidon. Trois autres isoformes, SS1, SS2 et SS3, sont présentes sous forme soluble dans le chloroplaste, où elles participent à l'allongement des glucanes de l'amylopectine. Récemment, il a été proposé qu'une autre isoforme, la SS4, soit impliquée dans le contrôle du nombre de grains d'amidon par chloroplaste et de leur taille.

Nous rapportons dans ce travail, l'analyse phénotypique des combinaisons doubles mutantes impliquant les mutations aux loci *SS1*, *SS2* et *SS3*. Nos résultats, notamment les analyses de distribution de longueur des glucanes de l'amylopectine, montrent que la SS2 et la SS3 sont partiellement redondantes pour l'allongement des glucanes de DP 12 à DP 28. Par ailleurs, l'étude de la structure de l'amylopectine après digestion par la β -amylase, indique que la synthèse normale du « squelette » du polymère nécessite la présence d'au moins deux des trois isoformes.

Nous présentons par ailleurs, un ensemble de données qui indiquent que la SS4 est impliquée dans l'initiation de la synthèse d'amidon, et qu'elle est nécessaire et suffisante pour la production d'un nombre correct de grains d'amidon dans le chloroplaste. La fonction de la SS4 dans l'initiation peut être en partie assumée par la SS3, et la présence de l'une des deux isoformes est suffisante pour initier la synthèse d'amidon dans les triples mutants *ss1- ss2- ss3-* ou *ss1- ss2- ss4-*.

ABSTRACT

Five isoforms of starch synthase (the elongation enzyme of the starch pathway) have been identified in land plants genomes. One of them, the GBSS (Granule Bound Starch Synthase) is non-covalently bound to the starch granule and is responsible for amylose synthesis. Three other isoforms, SS1, SS2 and SS3, are soluble within the chloroplast, where they elongate the amylopectin-forming glucans. Recently, it has been proposed that another isoform, SS4, is involved in the control of the size and the number of starch granules per chloroplast.

We are now reporting, the phenotypic analysis of double mutant combinations including mutations at *SS1*, *SS2* and *SS3* loci. The analysis of amylopectin glucan length distribution shows that SS2 and SS3 isoforms are partially redundant for the elongation of DP12 to DP28 glucans. In addition, structural studies of amylopectin after β -amylolysis, suggest that the normal synthesis of amylopectin internal molecular structure requires the presence of at least two of the three isoforms.

We also provide in this work, further evidences indicating that SS4 is involved in the initiation of starch synthesis, and that this isoform is necessary and sufficient for the production of the regular number of starch granules per chloroplast. However, SS3 activity is partially redundant to that of SS4 in this regard, and the presence of one of these isoforms is sufficient to initiate starch biosynthesis in the triple mutant lines *ss1- ss2- ss3-* and *ss1- ss2- ss4-*.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle à l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Je tiens à remercier le directeur de l'unité, le Dr. Jean Claude Michalski, pour les conditions dans lesquelles ces travaux ont pu être réalisés et pour avoir accepté de présider la commission d'examen de cette thèse. Merci à l'ensemble du personnel de l'UGSF pour les moments passés en son sein. Ma gratitude va également à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, ici, à Nantes, en Espagne et aux Etats Unis.

Je remercie le Dr. Grégory Mouille pour avoir accepté de faire partie de cette commission en qualité de rapporteur, et pour le travail que ceci implique. I would like to thank Pr. Martin Steup who accepted to report this manuscript, and for the work it represents.

Merci au Pr. Steven Ball pour sa présence au sein de la commission en tant qu'examineur, pour ses nombreux conseils et les discussions au cours des quatre dernières années. I would like to thank Dr. Angel Merida for his presence in the examination commission of this work. Thank's also for the time I've been working in your team, for the discussions we had, and your sympathy.

Je remercie profondément mon directeur de these, Pr. Christophe D'Hulst, pour m'avoir accueilli, permis de travailler et de m'épanouir dans son équipe, d'abord pour la réalisation de mon stage de Master recherche, puis pour ces quatre années de thèse. Merci pour tes conseils, ton encadrement, les savoirs transmis et tes nombreuses blagues.

Merci aux personnes avec qui j'ai travaillé pendant ces années pour les bons moments que nous avons passés, pour la bonne ambiance et pour m'avoir initié aux différentes techniques d'étude. Je fais bien sur référence à Fabrice, David, Sylvain, Ying, Aline, Yves et Cécilia, sans oublier les copains du 005, Coco, David, Charlotte, Cathy, Philippe et Jénie. Thank's also to my Spanish friends, in particular Isaac, Paula and Sandy.

Je tiens à remercier chaleureusement ma famille, tout particulièrement ma mère Denise et mes sœurs Véronique et Marianne, pour m'avoir soutenu dans tous les domaines. Vous êtes pour beaucoup dans l'aboutissement de ce projet. Merci aux amis, que je ne peux citer ici, pour leur aide et pour avoir partagé les instants de détente. Merci enfin à Marie qui m'a éclairé dans les pires moments. Pour ton amour, ton aide et ta patience.

A mon père.

ABREVIATIONS

ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADN-T:	ADN de transfert
ADP:	Adénosine diphosphate
ADPG ou ADP-Glc:	Adénosine diphospho-glucose
AGPase:	ADPG pyrophosphorylase
AMY:	α -amylase
AMP:	Adénosine monophosphate
Am:	Amylose
Ap:	Amylopectine
APTS:	Acide 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonique
ARN:	Acide ribonucléique
ARNi:	ARN interférence
ARNm:	ARN messenger
ATP:	Adénosine triphosphate
BAM:	β -amylase
BSA:	Bovine serumalbumin
CAZy:	Carbohydate active enzyme
CL-2B:	Cross-linked 2B
Col:	Columbia
CTAB:	Cetyltrimethylammonium bromide
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
dNTP:	Désoxyribonucléotide triphosphate
DP:	Degré de polymérisation
DPE:	Disproportionating enzyme
DTT:	Dithiotréitol
EDTA:	Ethylène diamine tetra-acétate
FACE:	Fluorophore-assisted capillary electrophoresis
Fru-6-P:	Fructose-6-Phosphate

FST:	Flanking sequence tag
GBSS:	Granule bound starch synthase
Glc-1-P:	Glucose-1-phosphate
GN:	Glycogénine
GT:	Glycosyltransférase
GWD:	Glucan water dikinase
HPAEC-PAD:	Hight performance anion exchange chromatography - pulsed amperometric detection
ISA:	Isoamylase
KDa:	KiloDalton
Km :	Constante de Michaelis
λ_{max} :	Longueur d'onde du maximum d'absorbance
MALDI-TOF:	Matrix assited laser desorption/ionization-time of flight
MFA:	Microscopie de force atomique
MES:	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
MEX:	Maltose exporter
MOPS:	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
MTT:	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
NADP:	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
PCR:	Polymerization chain reaction
3-PGA:	3-Phospho-Glycérate
PGI:	Phospho-glucose isomérase
PGM:	Phosphoglucomutase
PHS:	Phosphorylase
Pi:	Orthophosphate, Phosphate inorganique
PMS:	N-Methylphenazonium methyl sulfate
PPi:	Pyrophosphate inorganique
PU:	Pullulanase
PWD:	Phosphoglucan water dikinase
RT-PCR:	Reverse transcription PCR

SBD:	Starch binding domain
SBE ou BE:	Starch branching enzyme
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
SEX:	Starch excess
SS:	Starch synthase
THF:	Tetrahydrofuran
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDPG ou UDP-Glc:	Uridine diphospho-glucose
WS:	Wassilewskija
WSG:	Water soluble glucan

SOMMAIRE

RESUME	2
REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS	4
SOMMAIRE	7
GENERALITES	12
I. Structure de l'amidon	14
1. <u>Structure de l'amylose</u>	14
2. <u>Structure de l'amylopectine</u>	15
3. <u>Cristallinité</u>	17
4. <u>Morphologie du grain</u>	18
II. Le métabolisme de l'amidon	21
1. <u>Anabolisme</u>	22
a. Biosynthèse du nucléotide sucre précurseur : l'ADP-Glucose	22
b. Elongation des α -glucanes	24
c. Initiation de la biosynthèse	24
i. Le cas du glycogène	25
ii. Le cas de l'amidon	27
d. Formation des points de branchement	28
e. Formation de la grappe d'amylopectine : le rôle des enzymes de débranchement	30
2. <u>Catabolisme</u>	32
a. Phosphorylation de l'amylopectine	32
b. Dégradation des α -1,4 glucanes branchés	33
i. Les amylases	33
ii. Les enzymes de débranchement	35

c. Métabolisation des produits de dégradation	35
d. L'enzyme D et l'amidon-phosphorylase	35
III. Les amidon-synthétases	37
1. <u>Classification</u>	38
2. <u>Caractéristiques structurales</u>	39
a. Domaine catalytique	39
b. Région N terminale	41
3. <u>Fonction des amidon-synthétases dans l'élaboration du grain d'amidon</u>	42
a. L'amidon-synthétase liée au grain d'amidon (GBSS1)	42
b. La SS1	44
c. La SS2	45
d. La SS3	46
e. La SS4	47
f. Redondances fonctionnelles des amidon-synthétases	48
4. <u>Les amidon-synthétases au sein de complexes multimériques</u>	49
IV. <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
V. Objectifs de la thèse	52
MATERIEL ET METHODES	55
I. Matériels	56
II. Méthodes	56
1. <u>Méthodes de biologie moléculaire</u>	56
a. Croisements	56
b. Extraction d'ADN génomique	57
c. Sélection des lignées mutantes par PCR	57
d. Analyse de la transcription des gènes mutés par RT-PCR	57
2. <u>Dosages d'activités enzymatiques in vitro</u>	58
a. Dosage de l'activité des enzymes de branchement	58

b. Dosage de l'activité des amidons synthétases solubles	58
c. Dosage de l'activité pullulanase	58
d. Dosage de l'activité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase	59
e. Dosage de l'activité α -amylasique	59
f. Dosage des activités D-enzyme et maltase	59
g. Dosage de l'activité amidon-phosphorylase	60
h. Dosage de l'activité amidon-synthétase liée au grain d'amidon	60
3. <u>Zymogrammes</u>	60
a. Zymogramme des activités amidon-synthétases	60
b. Zymogramme des activités modifiant l'amidon	60
c. Zymogramme des activités modifiant les dextrines β -limites	61
d. Zymogramme des activités amidon-phosphorylases	61
e. Zymogramme des activités phosphoglucomutases	61
f. Zymogramme des activités pullulanases	61
4. <u>Méthodes biochimiques</u>	62
a. Dosage de la quantité d'amidon	62
b. Extraction et purification de l'amidon	62
c. Extraction et dosage des polysaccharides solubles	62
d. Fractionnement de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique	62
e. Analyse de la distribution de longueur des glucanes par électrophorèse capillaire ou HPAEC-PAD	63
f. Production des β -limite dextrines de l'amylopectine	63
g. Microscopie électronique à transmission	63
h. Mesure de diffraction aux rayons X	64
i. Extraction des protéines liées au grain d'amidon	64
j. Western blot et SDS-PAGE	64

RESULTATS	65
PARTIE 1 : Etude des interactions et niveaux de redondance entre les isoformes SS1, SS2 et SS3 dans l'allongement des différentes classes de glucanes de l'amylopectine	66
- <u>Contribution au travail</u>	67
- <u>Publication 1</u> : Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in Arabidopsis	68
- <u>Construction et analyse phénotypique des lignées ss1- ss2- et ss1- ss3-</u>	97
I. Construction des lignées doubles mutantes ss1- ss2- et ss1- ss3- et analyse des phénotypes de croissance	97
II. Effet des mutations sur l'activité amidon-synthétase soluble et les autres activités du métabolisme de l'amidon	98
III. Effet des mutations sur les contenus en amidon et en glucanes solubles	101
IV. Effet des mutations sur la structure et la composition de l'amidon	102
1. Morphologie des grains	102
2. Ratios amylopectine / amylose	104
3. Structure de l'amylopectine	105
- <u>Construction et analyse phénotypique d'une lignée triple mutante ss1- ss2- ss3-</u>	112
I. Construction de la lignée ss1- ss2- ss3-	112
II. Effet des mutations sur la composition et la structure de l'amidon	112
PARTIE 2 : Etude de l'implication de la SS3 et de la SS4 dans l'initiation de la biosynthèse d'amidon	115
- <u>Contribution au travail</u>	116
- <u>Publication 2</u> : Starch granule initiation in Arabidopsis requires the presence of either Class IV or Class III starch synthase	117

PARTIE 3 : Etude de l'impact d'une mutation au locus GBSS1 sur le phénotype des simples mutants <i>ss2</i>-, <i>ss3</i>- et <i>ss4</i>-	154
I. Construction des lignées doubles mutantes <i>gbss1- ss2</i>-, <i>gbss1- ss3</i>-, <i>gbss1- ss4</i>- et analyse des phénotypes de croissance	155
II. Effet des mutations sur les activités du métabolisme de l'amidon.	156
III. Effet de la présence des deux mutations sur le contenu en amidon	157
IV. Effet des mutations sur la composition et la structure de l'amidon	159
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	161
I. Etude des fonctions, interactions et redondances des amidon-synthétases solubles SS1, SS2 et SS3	162
1. <i>La SS2 est responsable de la synthèse des glucanes de DP 12 à 28 de l'amylopectine</i>	162
2. <i>La redondance fonctionnelle existe essentiellement entre la SS2 et la SS3, et la biosynthèse normale du squelette de l'amylopectine nécessite la présence d'au moins SS1 et SS2 ou SS1 et SS3</i>	165
3. <i>L'absence conjointe des SS1, SS2 et SS3 conduit à l'accumulation de matériel insoluble</i>	168
II. Implication de SS3 et SS4 dans l'initiation de la synthèse de l'amidon	169
1. <i>La SS3 et la SS4 sont indispensables pour initier la synthèse d'amidon</i>	169
2. <i>La présence de la SS4 ou de la SS3 est suffisante pour initier la synthèse d'amidon</i>	170
3. <i>Les deux isoformes ont des rôles différents dans l'initiation</i>	171
BIBLIOGRAPHIE	174
ANNEXES	186

GENERALITES

L'amidon est, après la paroi, la plus importante réserve d'hydrates de carbone des organismes végétaux. Il prend la forme de grains cristallins insolubles dans l'eau, présents en quantités variables dans les graines, les fruits, les tubercules, les racines et les feuilles des plantes. Ce polymère de glucose y constitue une réserve d'énergie et de carbone qui peut être remobilisée durant les périodes de levée de dormance, ou de croissance. L'amidon est, par ailleurs, le premier pourvoyeur de calories dans les alimentations humaine et animale. Il est ainsi le principal facteur influençant l'index glycémique contenu dans les aliments que nous absorbons. La production mondiale d'amidon provient essentiellement de l'exploitation du maïs et de la pomme de terre et, dans une moindre mesure, du blé, du sorgho et du sagou. Il est extrait des graines, des gousses et tubercules, dans lesquels sa proportion varie de 30 à 90 % par rapport au poids sec.

L'abondance, le faible coût et la facilité à modifier ses propriétés par des traitements chimiques ou enzymatiques, en font une matière première massivement utilisée à des fins industrielles et commerciales. Dans l'industrie agroalimentaire, il est utilisé plus pour ses propriétés structurantes que nutritionnelles. Dans les industries non agroalimentaires, il est utilisé pour des applications diverses, et sous une grande variété de formes, en papèterie, textile, cosmétique, pharmaceutique, dans le traitement des eaux ou dans l'industrie du bâtiment. L'enjeu de la protection de l'environnement, au cours des dernières décennies, a conduit à la mise en valeur des ressources énergétiques naturelles, qui peuvent représenter une alternative à l'utilisation du pétrole. Ainsi l'amidon est aujourd'hui utilisé pour la production de bioéthanol, principalement aux Etats Unis, en Europe et en Amérique du sud. Il entre également dans la composition de « plastiques » biodégradables, utilisés notamment comme films d'emballage.

L'amidon est uniquement constitué de résidus de glucose mais l'architecture du grain est complexe et pas encore totalement résolue à ce jour. Pour établir cette structure macromoléculaire, les végétaux disposent d'une batterie d'enzymes qui exercent chacune une fonction spécifique, avec parfois des recouvrements fonctionnels entre isoformes. Ces fonctions ont, pour la plupart, été identifiées par analogie avec le métabolisme du glycogène (glucane de réserve, chez les animaux, les bactéries et les champignons). Les récents progrès techniques, en particulier dans les domaines de la Génétique et de la Biologie Moléculaire, ont provoqué un rebond dans la recherche sur le métabolisme de l'amidon. Six gènes de structure des isoformes d'amidon-synthétases (les enzymes responsables de l'allongement des glucanes de l'amidon) ont ainsi été identifiées dans les génomes des plantes supérieures. Dans le contexte énoncé, l'étude des fonctions, redondances et interactions de ces isoformes au cours de l'édification de la structure de l'amidon revêt une importance particulière. Avant de détailler les objectifs de cette thèse et de présenter les résultats obtenus, nous

ferons un bref rappel des connaissances sur la structure et le métabolisme de l'amidon, ainsi que sur la famille des amidon-synthétases à laquelle nous nous sommes intéressés.

I. Structure de l'amidon

L'amidon et le glycogène sont tous deux composés de résidus de glucose liés par des liaisons O-glycosidiques α -1,4 ; et par des liaisons O-glycosidiques α -1,6 également appelées « points de branchement ». Le glycogène contient 8 à 12 % de points de branchement répartis de manière homogène. Il s'organise en particules solubles dans l'eau, d'un diamètre inférieur à 50 nm. L'amidon prend la forme de grains semi-cristallins insolubles dans l'eau et de taille variable en fonction de l'espèce étudiée (de 0,1 à plus de 50 μ m de diamètre). La structure de l'amidon est plus complexe que celle du glycogène car il est composé de deux types de polymères. Le premier polymère, appelé amylose, est essentiellement linéaire avec moins de 1 % de liaisons α -1,6. Le deuxième, appelé amylopectine, possède une structure très organisée avec 5 à 6 % de liaisons α -1,6. Il est admis que la structure particulière de l'amylopectine, liée à la répartition des liaisons α -1,6, confère le caractère semi-cristallin au grain d'amidon. Dans cette partie nous décrirons la structure de l'amylose et de l'amylopectine en nous intéressant aux différents types de cristallinité. Nous présenterons par ailleurs l'organisation architecturale macromoléculaire du grain d'amidon (pour revue, voir Buléon et al., 1998).

1. Structure de l'amylose

L'amylose représente 20 à 30 % du poids sec du grain d'amidon. Le degré de polymérisation moyen de l'amylose varie de 500 à 6000 résidus de glucose pour une masse moléculaire de 10^5 à 10^6 Daltons. C'est une molécule essentiellement linéaire composée d' α -1,4 glucanes dont certains sont très modérément branchés. On étudie classiquement le caractère branché d'une molécule telle que l'amylose, l'amylopectine ou le glycogène par sa susceptibilité à la dégradation par la β -amylase. Cette enzyme agit sur les extrémités non réductrices des chaînes de glucose en hydrolysant les liaisons α -1,4. Les liaisons α -1,6 ne peuvent pas être clivées, et la molécule obtenue après digestion est appelée « β -dextrine limite ». Il existe deux populations de chaînes d'amylose au sein du grain d'amidon. Le premier type de chaînes, strictement linéaire, est complètement dégradé par l'action de la β -amylase. Le deuxième type de chaînes, qui représente 25 à 55 % de l'amylose en fonction de l'espèce étudiée, est digérée par la β -amylase à raison de 60 %, montrant la présence de liaisons α -1,6 (Takeda et al., 1987). On y trouve en effet 2 à 8 points de branchements par molécule. Les

chaines ainsi branchées sont organisées en grappes et comprennent de quatre à plus de cent résidus de glucose (Hizukuri et al., 1997).

De nombreux mutants dépourvus de l'enzyme responsable de la synthèse d'amylose ont été décrits. La structure et l'activité de cette enzyme, nommée GBSS (Granule Bound Starch Synthase), seront détaillées dans la partie « Amidon-synthétases » de l'exposé. Les mutants pour la GBSS, dépourvus d'amylose, accumulent néanmoins un nombre normal de grains d'amidon dont l'organisation cristalline est identique à celle d'un grain sauvage. Il est par conséquent admis que la synthèse de l'amylose n'est pas indispensable à la biogenèse d'un grain d'amidon d'apparence normale.

2. Structure de l'amylopectine

L'amylopectine représente la fraction majoritaire de l'amidon puisqu'elle compose 70 à 80 % de la masse sèche du grain. C'est un polymère branché dont le degré de polymérisation est compris entre 10^5 et 10^6 résidus de glucose, et dont la masse moléculaire (de 10^7 à 10^8 Daltons) est de loin supérieure à celle de l'amylose. Le taux de ramification de l'amylopectine oscille entre 5 et 6 %, ce qui correspond à une limite de β -amylolyse d'environ 55 %.

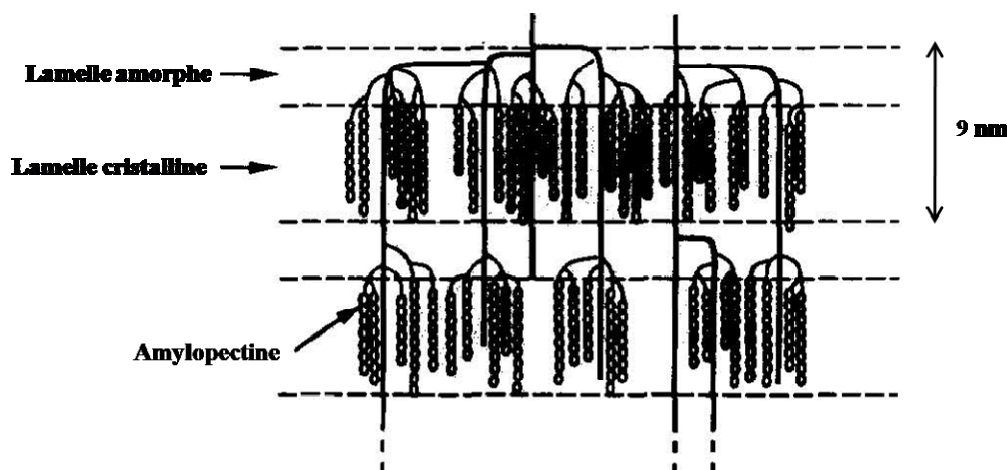


Figure 1 : Représentation de l'amylopectine selon Jenkins et al. (1995). Ce modèle tient compte de la répartition hétérogène des points de branchement. Ces derniers sont localisés au niveau des lamelles amorphes alors que les parties linéaires des glucanes s'organisent en doubles hélices parallèles au sein des lamelles cristallines. La périodicité invariable de 9 nm pour le couple lamelle amorphe / lamelle cristalline est indiquée.

La particularité de la molécule d'amylopectine réside dans sa structure complexe en grappe ou « cluster ». Les grappes de l'amylopectine sont le résultat de la distribution asymétrique des points de branchement (French et al., 1972 ; Robin et al., 1974). Contrairement aux liaisons α -1,6 du

glycogène, qui sont réparties de manière homogène à travers la molécule, celles de l'amylopectine sont concentrées dans des régions régulièrement espacées de 22 résidus de glucose en moyenne. Dans ces zones pauvres en point de branchement, les glucanes s'organisent en doubles hélices parallèles maintenues par des ponts hydrogènes (Hizukuri et al., 1986). Le caractère semi cristallin de l'amylopectine découle de cette organisation particulière. Les grappes sont ainsi subdivisées en lamelles cristallines contenant les doubles hélices, et lamelles amorphes contenant l'essentiel des points de branchement. Il est intéressant de noter que la taille du couple lamelle amorphe / lamelle cristalline est conservée quel que soit l'amidon étudié (Jenkins et al., 1995) (figure 1). Cette taille a été évaluée à 9-10 nm.

Dans la molécule d'amylopectine, on distingue 3 populations de chaînes (A, B et C) (figure 2A). Les chaînes A représentent les glucanes les plus externes du polymère. Elles sont branchées sur d'autres glucanes mais n'en portent elles mêmes aucun. Les chaînes A sont parmi les plus courts glucanes de l'amylopectine ($DP < 15$) et leur extension se limite à une seule grappe. Les chaînes B se subdivisent en 3 groupes en fonction de leur taille et de leur extension sur une ou plusieurs grappes. Les chaînes B1 ont un degré de polymérisation (DP) moyen de 19 et ne s'étendent que sur une seule grappe. C'est sur les chaînes B1 que les chaînes de type A sont reliées par l'intermédiaire de liaisons α -1,6. Les chaînes B2 et B3 ont un DP moyen de 41. Elles s'étendent sur deux ou trois grappes successives et portent les chaînes A et B1. Enfin, les chaînes C contiennent la seule extrémité réductrice de l'amylopectine (Peat et al., 1952). Il n'en existe donc qu'une seule par molécule.

L'étude de la structure de l'amylopectine passe par la quantification relative de chaque type de glucane en fonction de leur degré de polymérisation. Après le clivage hydrolytique des points de branchement par l'isoamylase (une enzyme qui hydrolyse spécifiquement les liaisons α -1,6) (figure 2B), les α -1,4 glucanes sont séparés en fonction de leur taille et quantifiés par électrophorèse capillaire (mesure de fluorescence après greffage d'APTS du côté réducteur) ou par chromatographie liquide à haute performance (avec détection ampérométrique pulsée). L'histogramme représenté dans la figure 2C schématise le profil polymodal habituellement observé pour la distribution de la longueur des glucanes de l'amylopectine. Ce profil se subdivise en trois parties d'allure gaussienne qui se chevauchent et qui correspondent aux différentes populations de chaînes décrites plus haut.

La structure de l'amylopectine, que nous venons de décrire, est sensiblement identique pour les amidons de toutes les origines botaniques. Il existe cependant une exception pour certains amidons riches en amylose tels que ceux du maïs et du pois (Buléon et al., 1998). Dans ceux-ci, environ 20 % du poids est constitué d'amylopectine de faible masse moléculaire, enrichie en chaînes B. Ces

chaines de type B sont plus longues de 5 à 15 résidus de glucose par rapport à celles de l'amylopectine classique. Notons que ce type particulier d'amylopectine, appelé matériel intermédiaire, est également retrouvé dans la partie interne de grains d'amidon de maïs sauvages (Pan et al., 2000).

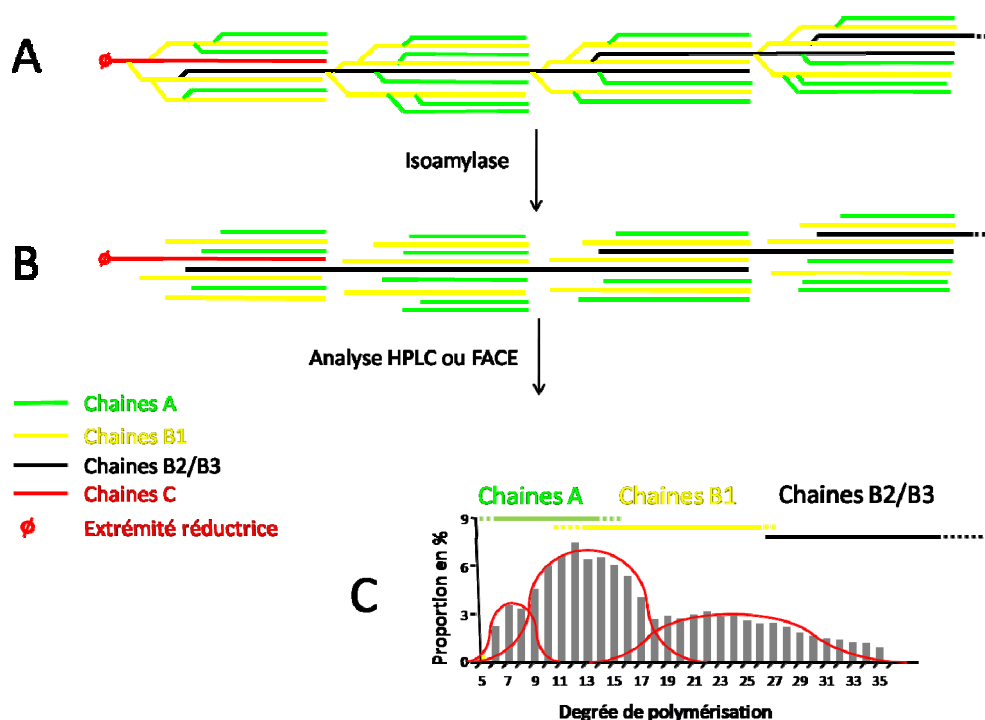


Figure 2 : Représentation schématique d'une molécule d'amylopectine et des différentes populations de chaînes. Principe de l'analyse de la distribution de la longueur des glucanes. A. Schématisation d'une molécule d'amylopectine. Les chaînes A sont représentées en vert, les chaînes B1 en jaune, les chaînes B2 et B3 en noir et la chaîne C en rouge. L'extrémité réductrice est indiquée par un cercle barré. **B.** Résultat de la digestion de la molécule d'amylopectine présentée en A par l'isoamylase. **C.** Distribution trimodale de l'amylopectine sauvage et correspondance avec les différentes classes de chaînes.

3. Cristallinité

Pour un grain d'amidon natif sauvage, la cristallinité varie de 15 à 45 %. Celle-ci découle de l'agencement des chaînes de l'amylopectine qui forment des doubles hélices parallèles présentées ci-dessus. Ces hélices s'associent entre elles et constituent une maille cristalline. La diffraction des rayons X est la méthode classique d'étude de la cristallinité de l'amidon. On en distingue trois allomorphes spécifiques de l'origine botanique et/ou du fond génétique de l'amidon étudié. Le type A est ainsi retrouvé dans les amidons de céréales mais aussi chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Dans ce type de structure, les doubles hélices sont compactées et enserrent huit molécules d'eau. Le type B est essentiellement observé dans les amidons de tubercules et les amidons de feuilles (*Arabidopsis thaliana* par exemple). Ce type cristallin découle d'une

organisation des doubles hélices plus lâche que pour le type A. Celles-ci forment un hexagone au sein duquel s'insèrent 36 molécules d'eau (Imberty et al., 1988) (figure 3). Enfin, le type cristallin C est retrouvé chez la plupart des légumineuses. Il ne s'agit pas d'un type cristallin différent des deux premiers, car il résulte de la présence simultanée dans un même grain des deux types cristallins A et B, localisés respectivement en périphérie et au centre de la structure (Buléon et al., 1998b).

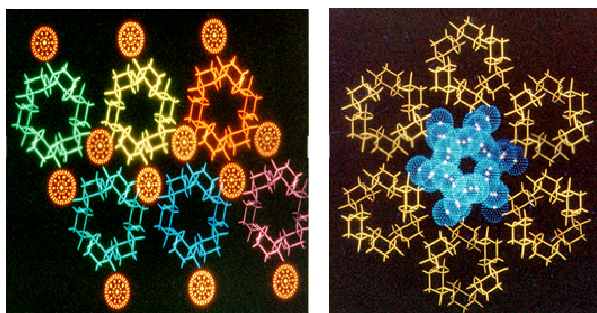


Figure 3 : Représentation en coupe transversale des types cristallins A et B. Les mailles cristallines A et B sont respectivement représentées à gauche et à droite de la figure. Les sphères oranges (à gauche) et bleues (à droite) représentent les molécules d'eau.

Il fut démontré en outre que l'amylose peut adopter une structure cristalline *in vitro*, où elle forme une simple hélice en complexe avec des composés tels que les lipides (Godet et al., 1995). Toutefois, la présence de ce type de structure, nommé V-amylose, au sein du grain d'amidon natif, ainsi que la contribution de l'amylose à la cristallinité sont encore sujettes à débat. Wattebled et al. ont montré en 2002, que la synthèse d'amylose entraîne la formation de cristallites de type B dans l'amidon de *Chlamydomonas Reinhardtii*. Toutefois, il n'est pas possible d'indiquer si ceci résulte de la cristallisation de l'amylose néo synthétisée, ou d'un effet indirect sur de l'amylopectine amorphe préexistante (Wattebled et al., 2002).

4. Morphologie du grain

En fonction de l'origine botanique, le grain d'amidon peut adopter une grande variété de tailles. Son diamètre moyen peut varier de 0,1 μm chez certaines algues picophytoplanctoniques ou mutants d'*Arabidopsis*, à 100 μm chez la pomme de terre. En général, la répartition de la taille des grains au sein d'une plante est homogène, mais chez le blé, l'orge ou l'avoine, on retrouve deux populations de grains de tailles différentes. Ces populations dénommées A et B, sont respectivement de grande (15 à 30 μm) et de petite (2 à 3 μm) tailles (Buléon et al., 1998).

Il existe par ailleurs une grande diversité de formes du grain d'amidon. On en trouve par exemple en forme de disque chez le blé ou de forme ovoïde avec une cavité chez le cryptophyte *Guillardia theta* (Deschamps et al., 2006). Ces observations indiquent que l'amidon peut être

synthétisé en lien avec l'environnement cellulaire ou avec les organites, comme le pyrénioïde de *Guillardia*, pour reprendre l'exemple précité.

Malgré leurs différences morphologiques, il existe une caractéristique commune dans l'organisation des grains d'amidon. On observe en effet l'apparition d'une croix de biréfringence ou « croix de malte » quand ils sont exposés à la lumière polarisée (figure 4). Ceci est révélateur d'une organisation radiale (perpendiculaire à la surface du grain) des molécules d'amylose et d'amylopectine.

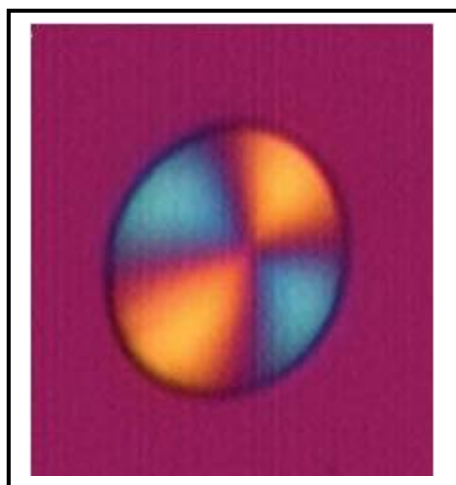


Figure 4 : Photographie d'un grain d'amidon de pomme de terre observé au microscope photonique en lumière polarisée (Zeeman et al., 2002). La croix de biréfringence bleue et orange révèle une organisation radiale des molécules dans le grain.

Un grain d'amidon soumis à une hydrolyse ménagée (hydrolyse enzymatique ou acide) puis observé par microscopie électronique laisse paraître une alternance concentrique de zones denses et de zones non denses aux électrons depuis le hile vers la périphérie du grain (Yamaguchi et al., 1979) (figure 5A). Ces zones, également appelées anneaux de croissance, correspondent à du matériel plus ou moins sensible à l'hydrolyse. Au niveau des anneaux de croissance résistants à l'hydrolyse se situe l'amylopectine semi cristalline avec l'alternance des lamelles cristallines, qui correspondent aux associations de doubles hélices, et des lamelles amorphes qui correspondent à la concentration de points de branchement (figure 5B et 5C).

L'organisation de l'amylopectine dans les anneaux de croissance amorphes n'est pas bien connue du fait de l'inefficacité des techniques disponibles pour l'étude de ce type de matériel. Toutefois ces anneaux pourraient simplement être constitués d'amylopectine de qualité différente résultant des variations du flux de carbone au cours du cycle jour / nuit. Galland et al. (1997) ont établi le concept de « blocklets » après avoir observé des protubérances à la surface de grains d'amidon de blé et de pomme de terre par microscopie de force atomique (MFA). Les blocklets sont des ensembles de grappes d'amylopectine reliés entre eux par des longues chaînes. La taille des

blocklets est variable et influe sur la cristallinité. Les zones amorphes et semi cristallines du grain sont, dans ce modèle, constituées respectivement de petits et de gros blocklets (Galland et al., 1997 ; Baker et al., 2001) (figure 6).

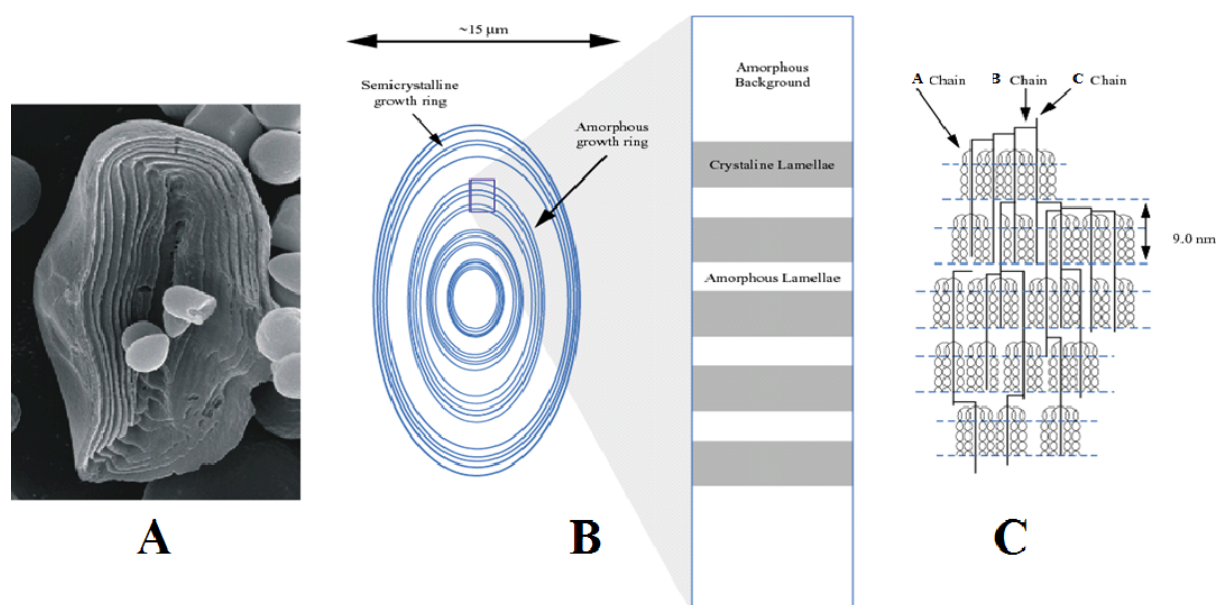


Figure 5 : Représentation des différents niveaux d'organisation d'un grain d'amidon. A : photo d'un grain d'amidon de blé ayant subi une hydrolyse ménagée observé par microscopie électronique à balayage. Les structures concentriques encore visibles (0,1 à 1 μm d'épaisseur) correspondent aux zones cristallines plus résistantes à la dégradation. **B :** représentation schématisée de l'alternance des régions amorphes et semi-cristallines et agrandissement d'une zone semi-cristalline où alternent lamelles amorphes et cristallines. **C :** schématisation d'une molécule d'amylopectine en relation avec la partie B. Les sites de branchement sont essentiellement présents dans les lamelles amorphes à la racine des grappes, alors que les parties linéaires des glucanes, qui s'organisent en doubles hélices, forment les lamelles cristallines.

La présence de ces blocs d'amylopectine a également été identifiée dans l'amidon du pois. Les auteurs ont montré que l'absence d'amylose entraîne la disparition des anneaux de croissance et la réorganisation des blocklets. Une hypothèse largement acceptée prédit que l'amylose se répartit au sein du grain entre les molécules d'amylopectine. Les auteurs ont suggéré que l'amylose forme un maillage autour de l'amylopectine et stabilise la répartition des blocklets (Ridout et al., 2003).

Peu d'éléments descriptifs de la structure du hile (essentiellement amorphe) sont disponibles dans la littérature, pour des raisons de limitation technique déjà évoquées. On peut définir le hile comme la zone proche du centre des grains d'amidon sphériques ou elliptiques, ou la zone proche de l'apex des grains de forme atypique. Buléon et al. (1997), et Waigh et al. (1997), ont étudié les profils de diffraction de rayons X du hile de grains d'amidon de maïs. Les molécules y apparaissent beaucoup moins orientées qu'au niveau des anneaux de croissance du grain, mais l'interprétation de

ces résultats est ardue car les signaux observés résultent de la moyenne des signaux, découlant des divers types d'orientation moléculaire. Par ailleurs, plusieurs éléments suggèrent la présence de polymères de faible masse moléculaire au niveau du hile. Ces glucanes semblent correspondre à de l'amylose ou du matériel intermédiaire (Ziegler et al., 2005).

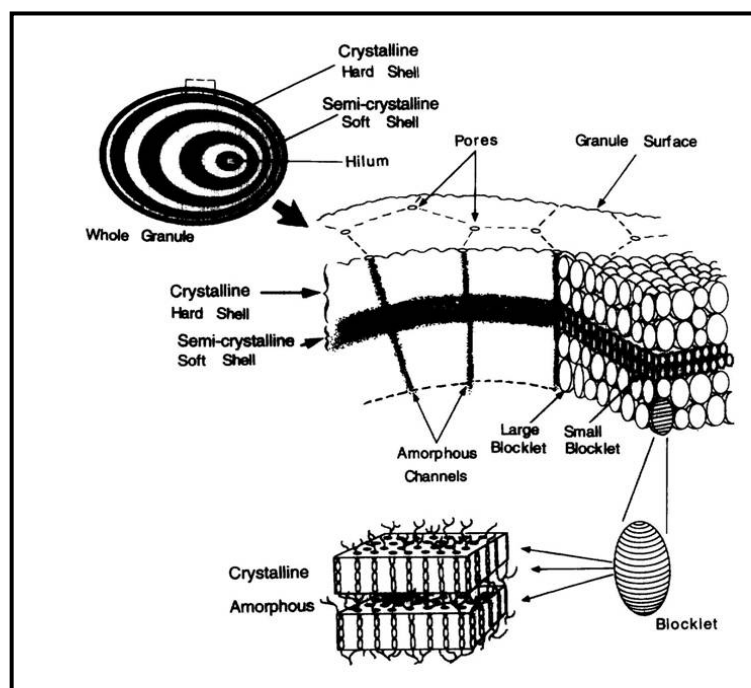


Figure 6 : Représentation schématique du modèle d'organisation des structures cristallines de l'amylopectine présentée par Galland et coll. (1997). Les « blocklets » d'une taille variant de 20 à 500 nm sont plus grands dans les zones cristallines du grain (celles résistantes à une hydrolyse ménagée)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

II. Le métabolisme de l'amidon

Comme nous venons de le décrire, l'amidon est composé d'un seul type de résidu de sucre et de deux types de liaisons. Ces éléments de base sont organisés pour former des grains semi cristallins d'architecture complexe. L'amidon des feuilles des plantes (qualifié d'amidon transitoire) est synthétisé pendant la journée dans le chloroplaste par une batterie d'enzymes spécifiques. Ce polymère représente le principal produit de la photosynthèse, et permet le stockage d'énergie carbonée pour subvenir aux besoins de la plante pendant la nuit. La dégradation de cet amidon au cours de la nuit constitue en effet un apport continu en sucres, en partie utilisé pour le maintien du métabolisme des feuilles, et en partie exporté vers les organes de réserve (essentiellement sous la forme de saccharose) pour permettre la synthèse de l'amidon de stockage. Les progrès dans la

connaissance des enzymes du métabolisme de l'amidon ont été déterminants au cours des dernières années. La plupart des gènes impliqués ont été clonés et les séquençages total ou partiel de génomes végétaux ont permis d'identifier les isoformes de chaque famille d'enzymes. Les études de lignées mutées pour des gènes du métabolisme de l'amidon ont permis en outre de comprendre les différentes étapes qui conditionnent la biosynthèse et la dégradation du polymère. Dans cette partie, nous ferons l'inventaire des connaissances sur le métabolisme, de la synthèse du glycosyl-nucléotide précurseur à la métabolisation des produits de dégradation, en passant par l'allongement des α -glucanes et l'élaboration de la structure cristalline de l'amylopectine.

1. Anabolisme

a. Biosynthèse du nucléotide sucre précurseur : l'ADP-Glucose

Les végétaux, à l'exception des Rhodophytes et des Glaucophytes, utilisent l'ADP-Glucose (ADPG) comme précurseur pour la synthèse des α -glucanes de l'amidon. L'ADP-Glucose pyrophosphorylase (AGPase) est l'enzyme responsable de la formation de cette molécule. Il s'agit d'un hétérotétramère de type $\alpha_2\beta_2$ composé de deux petites sous-unités catalytiques et de deux grandes sous-unités régulatrices (Copeland et Preiss, 1981). Ce n'est que plus récemment, que des propriétés catalytiques ont été attribuées aux grandes sous-unités de l'AGPase d'*Arabidopsis thaliana* et de la pomme de terre (Ventriglia et al., 2007 ; Hwang et al., 2006).

L'AGPase utilise le Glucose-1-phosphate (Glc1P) et l'ATP pour générer l'ADPG et du pyrophosphate (PPi). Dans les tissus photosynthétiques, l'ADPG est synthétisé dans le chloroplaste. Le Glc1P provient de la conversion par deux enzymes du Fructose-6-phosphate (Fru6P) issu du cycle de Calvin : la phosphoglucose isomérase (PGI) convertit le Fru6P en Glucose-6-phosphate (Glc6P) qui est ensuite transformé en Glc1P par la phosphoglucomutase (PGM) (figure 7). Dans les tissus non photosynthétiques, le Glc6P substrat de la PGM provient de la conversion du saccharose dans le cytoplasme. Il est ensuite importé dans le plaste et utilisé pour la biosynthèse de l'amidon comme dans les tissus photosynthétiques (Harrison et al., 1998 ; Tauberger et al., 2000). Toutefois, dans l'albumen des céréales, l'ADP-glucose semble être produit majoritairement dans le cytosol et importé dans le plaste par un transporteur membranaire (Denyer et al., 1996 ; Sikka et al., 2001).

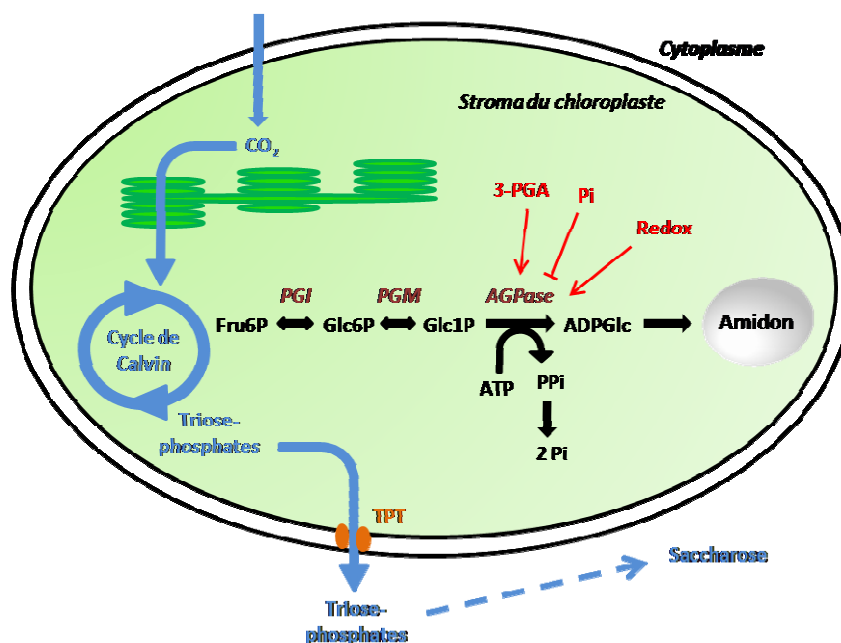


Figure 7 : Représentation de la voie de biosynthèse de l'amidon dans les tissus photosynthétiques d'après Zeeman et al (2007). Le carbone assimilé par le cycle de Calvin est en partie exporté vers le cytosol pour la synthèse du saccharose, et en partie retenu dans le chloroplaste pour la synthèse de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

La production d'ADPG par l'AGPase est l'unique porte d'entrée du carbone dans le métabolisme de l'amidon. Quel que soit l'organisme étudié, la déficience de l'activité de l'AGPase conduit en effet à une diminution drastique, voire à l'abolition de la synthèse d'amidon (Tsai et Nelson, 1966 ; Lin et al., 1988 ; Ball et al., 1991). L'étape catalysée par cette enzyme est donc l'unique point de régulation du flux carboné vers la biosynthèse de l'amidon, et trois types de mécanismes de régulation de l'AGPase ont été identifiés. Le premier mécanisme de régulation est de type allostérique : l'activité de l'enzyme est contrôlée négativement par l'orthophosphate (P_i), et positivement par l'acide 3- phosphoglycérique (3-PGA) (Gosh et Preiss, 1966 ; Ball et al., 1991).

En effet, la réaction catalysée par l'AGPase est réversible dans les conditions physiologiques, mais l'activité de la pyrophosphatase plastidiale modifie l'équilibre vers la production d'ADPG en hydrolysant le PP_i en P_i (Weiner et al., 1987). Le 3-PGA est quant à lui le premier composé formé par le cycle de Calvin après fixation du CO_2 gazeux. Le ratio 3-PGA / P_i permet donc de coupler l'activité photosynthétique au métabolisme de l'amidon via la régulation de l'activité de l'AGPase. Le deuxième mode de régulation de l'AGPase est de type redox, et implique des protéines de la famille des thiorédoxines. En effet, dans le tubercule de pomme de terre, l'AGPase est activée par la réduction du pont disulfure existant entre les deux Cystéines 12 des petites sous-unités. Ce

mécanisme est réversible et le pont disulfure se reforme en présence des thiorédoxines oxydées. Ce contrôle de l'activité de l'AGPase est indépendant du ratio 3-PGA / Pi et serait influencé par la disponibilité du saccharose (Ballicora et al., 2000 ; Tiessen et al., 2002) (figure 7). Le troisième type de régulation fut observé chez *Chlamydomonas reinhardtii*, chez qui l'activité de l'AGPase est soumise à la régulation par l'horloge circadienne via la modulation du niveau d'expression des gènes de structure de l'enzyme. Par ce biais, le métabolisme de l'amidon se trouve lui aussi soumis à une régulation dépendante de l'horloge circadienne (Zabawinski et al., 2001).

b. Elongation des α -glucanes

Après avoir été activé sous forme d'ADP-Glucose, le glucose est utilisé par les amidon-synthétases pour l'élongation des α -glucanes constitutifs de l'amidon. Ces enzymes transfèrent le résidu de glucose de l'ADP-glucose vers l'extrémité non réductrice d'un glucane en élongation en créant une liaison O-glycosidique de type α -1,4 (figure 8). Il existe 6 classes d'amidon-synthétases : l'amidon-synthétase liée au grain ou GBSS1 (pour granule bound starch synthase 1) et les amidon-synthétases solubles SS1, SS2, SS3, SS4 et SS5. Une description détaillée de cette famille d'enzymes ainsi que de leur fonction sera faite dans la partie qui leur est spécialement consacrée plus loin dans ce manuscrit.

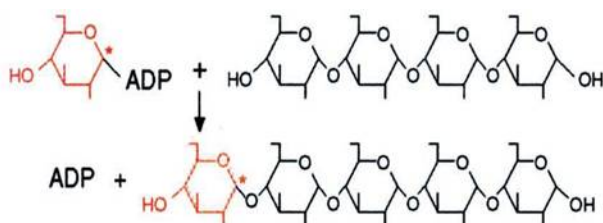


Figure 8 : Schématisation du mode d'action des amidon-synthétases selon Myers et coll. (2000). Les extrémités non réductrices des glucanes sont indiquées à gauche des molécules. En rouge figure le résidu de glucose transféré.

c. Initiation de la biosynthèse

Le glycogène se compose, comme l'amidon, de résidus de glucose liés par des liaisons α -1,4 et α -1,6. Ce polymère est synthétisé par les animaux, les champignons et les bactéries. Il se distingue de l'amidon par la distribution des liaisons α -1,6 conduisant ainsi à des propriétés physico-chimiques radicalement différentes entre les deux polymères. Les glycogène-synthétases animales et fongiques sont incapables d'initier la synthèse des glucanes qu'elles allongent. Ces enzymes requièrent la présence d'une amorce, et l'on définit généralement l'amorçage comme le processus qui permet de synthétiser un α -1,4 glucane à partir du glycosyl nucléotide précurseur. Dans le cas du glycogène

animal ou fongique, l'initiation résulte de l'autoglucosylation d'une enzyme particulière : la glycogénine. Dans le cas de l'amidon ou du glycogène bactérien le processus d'initiation de la synthèse des glucanes est apparemment différent. En tout état de cause, les bactéries sont dépourvues de glycogénine, impliquant de fait un mécanisme différent de celui à l'œuvre chez les animaux et les champignons. Dans le cas de l'amidon ce processus d'amorçage n'est pas connu non plus.

Les grains d'amidon se présentent sous une grande variété de formes en fonction de leur origine botanique. Mais qu'il soit sphérique, ovoïde ou ogival, celui-ci est constitué de l'alternance d'anneaux de croissance concentriques qui prennent naissance autour du hile. Si l'on considère que la biosynthèse du grain d'amidon commence par la formation du hile et se poursuit par la croissance du grain autour de ce dernier, un processus particulier doit être à l'œuvre chez les plantes. Le phénomène peut résulter soit d'une activité enzymatique et/ou être sous la dépendance de l'action de complexes protéiques, soit être le résultat d'un simple assemblage physique des polymères, en lien avec l'environnement cellulaire. La compréhension des modalités d'initiation de la synthèse et de la formation du grain d'amidon (l'initiation de la synthèse des polymères de l'amidon peut être déconnectée du processus d'amorçage de la formation du grain), représente à ce jour l'étape la plus méconnue du métabolisme.

i. Le cas du glycogène

Le métabolisme du glycogène chez les mammifères et les levures débute par l'action de protéines appelées glycogénines qui sont capables de s'autoglucosyler (Blumenfeld et al., 1983 ; Lomako et al., 1988). Ces enzymes synthétisent un court α -1,4 glucane greffé sur un résidu interne de tyrosine à partir d'UDP-Glucose. L'amorce ainsi produite est allongée par une forme de glycogène-synthétase appelée pro-glycogène-synthétase. Il existe deux isoformes de glycogénines chez la levure : Glg1p et Glg2p. L'inactivation de l'une des deux isoformes n'a pas d'effet sur la quantité de glycogène accumulé. Toutefois l'interruption simultanée des deux gènes correspondants conduit à l'abolition de la biosynthèse du polymère (Cheng et al., 1995). Chez les mammifères, il existe également deux formes de glycogénines. L'une, appelée GN-1, est retrouvée chez la totalité des espèces étudiées, alors que l'autre isoforme, GN-2, est uniquement présente chez les primates, dans le foie, le cœur et le pancréas (Lomako et al., 2004).

Deux modèles ont été proposés pour le mécanisme d'autoglucosylation (figure 9). L'un implique une activité intramoléculaire, où une molécule de glycogénine catalyse le transfert du glucose sur elle-même. L'autre, appelé autoglucosylation intermoléculaire, sous-tend que deux molécules de

glycogénines catalysent le transfert de glucose l'une sur l'autre (Lin et al., 1999). A partir de l'amorce créée sur la molécule de glycogénine, l'action concertée de la glycogène-synthétase et de l'enzyme de branchement (qui catalyse la formation des liaisons α -1,6) aboutit à la formation de la particule de glycogène.

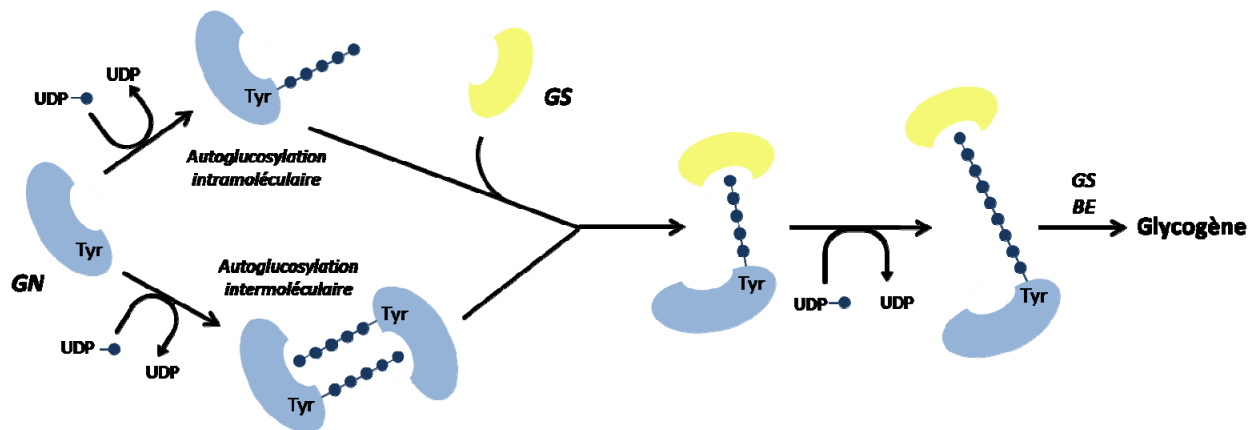


Figure 9 : Représentation du modèle de l'initiation de la synthèse du glycogène via l'autogluco-sylation de la glycogénine. Les molécules de glycogénines (GN) s'autogluco-sylent de manière intra ou intermoléculaire en catalysant le transfert de glucose (cercles bleus) à partir d'UDP-glucose sur un résidu de tyrosine (Tyr). La glycogène-synthétase (GS) allonge l'amorce formée par la réaction d'autogluco-sylation, et l'action concertée de la glycogène-synthétase et de l'enzyme de branchement (BE) aboutit à la formation des particules de glycogène.

Les particules de glycogène ont une structure homogène et sont constituées de couches concentriques qui découlent d'un nouveau niveau de ramification des glucanes. Ces particules ont une taille limitée par l'encombrement spatial des chaînes de la dernière couche, qui empêche l'accès des enzymes de synthèse et stoppe la croissance (Melendez et al., 1998). Ce type d'agencement des glucanes, conduisant à la limitation de la taille des particules, indique que l'action des enzymes de l'anabolisme n'est pas coordonnée, et que la formation de la structure sphérique du glycogène découle des phénomènes physiques existants entre les glucanes (figure 10).

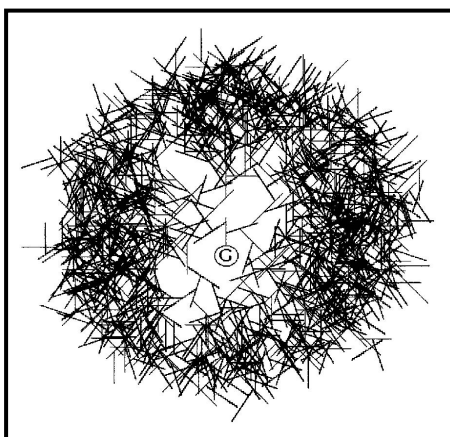


Figure 10 : Modèle de la molécule de glycogène proposé par Melendez et al., 1998. Ce modèle montre l'enchevêtrement des chaînes situées à la périphérie de la macromolécule, qui empêche l'action ultérieure des enzymes de biosynthèse. La molécule de glycogénine, au centre de la structure, est représentée par la lettre G.

Chez les procaryotes, il n'existe pas de séquences homologues aux glycogénines, mais il fut montré par Ugalde et al. (2003) que la glycogène-synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens* est capable de s'autoglycosyler et de synthétiser des glucanes *de novo*. Cette enzyme posséderait ainsi deux fonctions : une fonction d'élongation commune à toutes les glycogène-synthétases, et une fonction d'autoglycosylation qui s'apparente à celle des glycogénines. D'après cette étude, il est aujourd'hui proposé que l'initiation de la biosynthèse du glycogène chez les bactéries s'effectue par un mécanisme identique à celui observé chez les eucaryotes via la glycogène-synthétase.

ii. Le cas de l'amidon

De nombreuses similitudes existent entre le métabolisme du glycogène et celui de l'amidon, et la plupart des enzymes impliquées sont de même nature (Ball et Morell, 2003). La compréhension de l'initiation de la synthèse d'amidon passerait donc par la recherche de protéines de type glycogénines par homologie avec le métabolisme du glycogène. On trouve en effet, des séquences de glycogénines dans le génome de plusieurs végétaux, et huit séquences susceptibles de coder des glycogénines ont été identifiées dans le génome nucléaire d'*Arabidopsis thaliana*. Seule l'une d'entre elle possède un peptide d'adressage au chloroplaste. L'expression d'un ARNi de cette séquence entraîne une diminution de la quantité d'amidon accumulé (Chatterjee et al., 2005). Toutefois, l'ARNi utilisé n'est pas spécifique de la séquence cible et l'implication du produit de ce gène dans l'initiation de la synthèse de l'amidon n'est pas formellement démontrée. Par ailleurs, aucune séquence similaire aux glycogénines n'est présente dans les génomes des algues unicellulaires *C. reinhardtii* et *O. tauri*, alors que ces espèces possèdent toutes les séquences des autres familles d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon (Ral et al., 2004). Ce dernier élément est important, car il indique que les protéines de type glycogénine ne sont pas indispensables à l'initiation de la biosynthèse de l'amidon, contrairement au glycogène des mammifères et des levures. Le mécanisme d'amorçage de la synthèse de l'amidon reste donc aujourd'hui un sujet d'étude ouvert.

Un rôle lors de l'initiation de la biosynthèse de l'amidon a été attribué aux isoamylases. Les isoamylases clivent les liaisons α -1,6 de l'amylopectine et, nous le verrons plus loin dans cette partie, jouent un rôle dans le processus de formation de la structure de l'amylopectine lui permettant de cristalliser (Ball et al., 1996 ; Myers et al., 2000). Des mutants de pomme de terre et d'orge, déficients pour l'isoamylase, accumulent des grains d'amidon plus petits et en plus grand nombre que les références sauvages (Burton et al., 2002 ; Bustos et al., 2004). Il fut proposé par les auteurs que les isoamylases contrôlent le nombre d'évènement d'initiation en limitant le nombre d'amorces branchées solubles disponibles pour initier la synthèse des grains. Le rôle des isoamylases pourrait

être, dans ce modèle, de cliver des glucanes liés à des protéines de type glycogénine, qui serviraient d'amorce pour l'élongation par les amidon-synthétases, ou de dégrader des amorces branchées solubles, et ainsi contrôler le nombre d'évènements d'initiation (Bustos et al., 2004).

Comme c'est le cas pour l'amorçage de la synthèse des polymères, peu d'éléments sont disponibles concernant l'initiation de la formation du grain. Ziegler et al. (2005) ont proposé que le hile résulte de la cristallisation d'amylose ou de matériel intermédiaire, selon un processus similaire à la formation des sphérulites. Les sphérulites sont des particules sphériques, cristallines formées par chauffage et refroidissement rapide de polymères synthétiques en solution. Le modèle proposé par les auteurs se base sur l'analyse de sphérulites formés à partir d'amidon de haricot riche en amylose. Les structures synthétisées ont une cristallinité faiblement marquée de type B, ce qui coïncide avec les éléments disponibles concernant la structure du hile des grains d'amidon de tubercules et de légumineuses. Toutefois les paramètres de température utilisés dans cette étude sont incompatibles avec les conditions physiologiques et ne peuvent donc à eux seuls expliquer les processus observés *in vivo*, sauf à imaginer l'implication d'éléments particuliers qui pourraient contribuer de manière active à la formation de telles structures.

Enfin, en 2007, Roldan et collaborateurs ont suggéré que l'amidon-synthétase de classe 4 (ou SS4) intervient au cours de l'initiation de la synthèse du grain d'amidon. Cette étude est basée sur l'analyse du phénotype d'une lignée mutante *ss4-* et constitue la base d'une partie du travail de thèse présenté ici. Elle sera donc décrite plus en détail dans la partie consacrée aux amidon-synthétases.

d. Formation des points de branchement

Le caractère ramifié de l'amylopectine est conféré à la molécule par la présence de liaisons α -1,6. Ce sont les enzymes de branchement qui catalysent la formation des points de ramification. Elles hydrolysent une liaison α -1,4 puis ajoutent le malto-oligosaccharide libéré sur un glucane adjacent, en formant une liaison O-glycosidique de type α -1,6 (figure 11).

L'analyse phylogénétique des séquences de SBE (Starch Branching Enzyme) permet de les rassembler en deux classes : les SBE de classe 2 ou A et les SBE de classe 1 ou B. Les deux classes de SBE se distinguent par la longueur des glucanes transférées, les SBE1 transférant des chaînes plus longues (DP > 14) que les SBE2 (DP 5-6) (Guan et Preiss, 1993 ; Guan et al., 1997). Nakamura et al. (2002) ont suggéré l'action séquentielle des deux classes de SBE au cours de laquelle les produits de la SBE2 formeraient des substrats pour la SBE1.

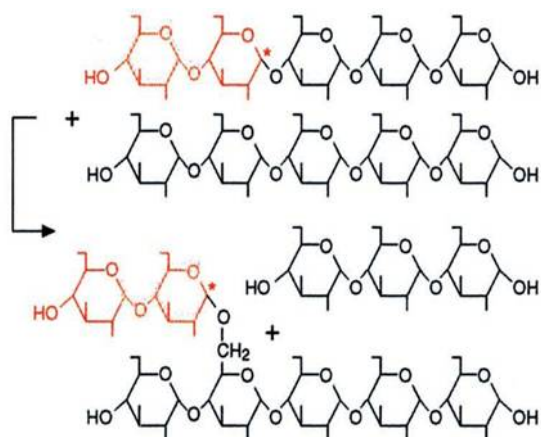


Figure 11 : Schématisation du mode d'action des enzymes de branchement selon Myers et al. (2000). Les extrémités réductrices des glucanes sont indiquées à la droite des molécules, les extrémités non-réductrices à gauche. Les résidus de glucose qui subissent la réaction de transfert en position α -1,6 sont indiqués en rouge.

L'analyse de mutations spécifiques de gènes de SBE1 chez la pomme de terre et les céréales montrent que l'absence de cette classe d'enzymes a peu d'effet sur les quantités d'amidon accumulées, ainsi que sur la structure de l'amylopectine. En revanche, l'inactivation de la SBE2 chez la pomme de terre, le pois ou les céréales entraîne une diminution de la quantité d'amidon. L'amylopectine accumulée par ces mutants est très peu branchée et la proportion de longues chaînes est fortement augmentée. Ces études de mutagenèse suggèrent que la SBE1 n'est pas capable à elle seule de brancher correctement les chaînes constitutives de l'amylopectine, alors que la SBE2 joue un rôle prépondérant. Par ailleurs, l'expression simultanée d'ARN antisens des gènes des deux isoformes chez la pomme de terre conduit à l'absence d'amylopectine, à l'accumulation de longs glucanes, et la modification de la forme des grains accumulés (Schwall et al., 2000). Le génome d'*Arabidopsis* constitue une exception chez les dicotylédones puisque qu'il contient deux séquences de SBE de classe 1 et aucune séquence correspondant à une SBE de classe 2 (alors que chez les autres dicotylédones, une forme de chaque classe est présente). Il a été montré par Dumez et al. (2006), que l'interruption simultanée des deux gènes de SBE2 chez *Arabidopsis* conduit à la disparition complète de la synthèse d'amidon et à l'accumulation anormale de maltose dans le cytoplasme. Ce phénotype peut s'expliquer si l'on considère qu'en absence d'activité adéquate, les ramifications ne peuvent pas être formées empêchant ainsi la synthèse de l'amylopectine. Les glucanes linéaires, produits des amidon-synthétases, s'accumuleraient alors, et seraient rapidement dégradés en maltose par les amylases.

e. Formation de la grappe d'amylopectine : le rôle des enzymes de débranchement

Il existe deux classes d'enzymes de débranchement : les isoamylases et les pullulanases, qui hydrolysent toutes deux les liaisons O-glycosidiques de type α -1,6 (figure 12). Les isoamylases sont actives sur les liaisons de l'amylopectine et du glycogène, alors que les pullulanases hydrolysent préférentiellement le pullulane, un polymère bactérien composé de résidus de maltotriose liés par des liaisons α -1,6. Les pullulanases sont en outre capables d'agir sur l'amylopectine et modérément sur le glycogène.

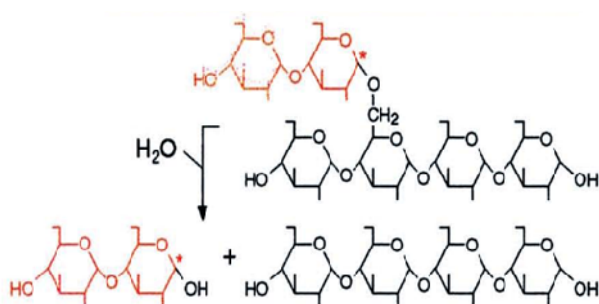


Figure 12 : Schématisation du mode d'action des enzymes de débranchement selon Myers et al. (2000). Les résidus de glucose qui sont libérés par hydrolyse de la liaison α -1,6 sont indiqués en rouge.

Pour que l'amylopectine puisse cristalliser, il est nécessaire que les points de branchements introduits par les BE soient ordonnés au niveau des lamelles amorphes du grain d'amidon (Ball et al., 1996). Les enzymes de débranchement clivent alors certaines liaisons α -1,6 de la pré-amylopectine afin de lui permettre d'adopter une structure conforme à sa cristallisation ultérieure sous forme d'amylopectine. Le caractère indispensable de cette étape pour la biosynthèse de la macromolécule et donc la biogénèse du grain d'amidon est maintenant largement établie (Wattebled et al., 2008) même si quelques points restent encore à éclaircir (Streb et al., 2008). La figure 13 résume ce processus de maturation de la structure de l'amylopectine.

Chez les plantes et les algues vertes, 3 isoformes d'isoamylases (ISA1, ISA2 et ISA3) et 1 isoforme de pullulanase (PU1) ont été identifiées. ISA1 et ISA2 participent à la même activité enzymatique et s'associent en complexes hétéromultimériques pour exercer cette fonction. La capacité qu'ont ISA1 et ISA2 de s'associer sous forme de complexes a été suggérée chez *Chlamydomonas* (Dauvillée et al., 2001), puis mise en évidence chez la pomme de terre (Hussain et

al., 2003) et le riz (Utsumi et Nakamura, 2006). Seule ISA1 possède une activité catalytique car l'autre isoforme est dépourvue de certains acides aminés essentiels à l'activité catalytique (Hussain et al., 2003). L'inactivation du complexe formé par ISA1 et ISA2 conduit à une diminution drastique du contenu en amidon et à l'apparition de phytyglycogène (un polysaccharide branché soluble, dont la structure ressemble à celle du glycogène, avec des points de branchement répartis de manière homogène sur la molécule ; et une augmentation des DP < 10 comparé à l'amylopectine) que ce soit chez le maïs (James et al., 1995), le riz (Nakamura et al., 1996), *Chlamydomonas* (Mouille et al., 1996), l'orge (Burton et al., 2002), la pomme de terre (Bustos et al., 2004), ou encore *Arabidopsis* (Zeeman et al., 1998 ; Wattebled et al., 2005). L'accumulation de phytyglycogène dans ces lignées s'accompagne par ailleurs d'une modification de structure de l'amylopectine plus ou moins marquée.

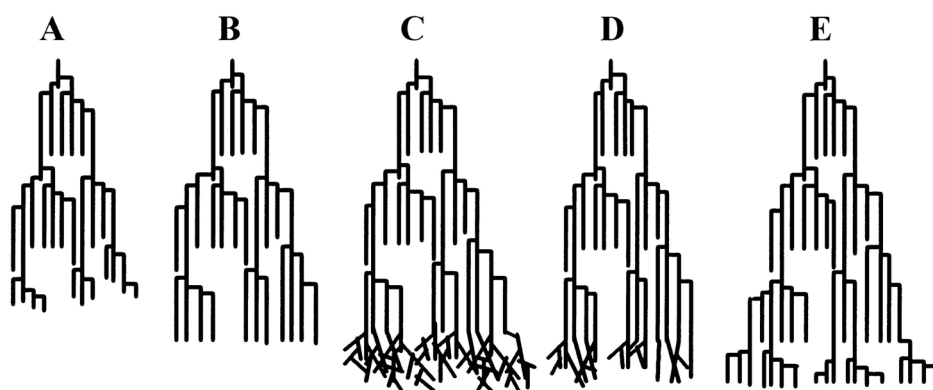


Figure 13 : Modèle de maturation de la pré-amylopectine d'après Ball et al (1996). A : Deux grappes successives et une lamelle amorphe néo synthétisée (en bas ; l'extrémité réductrice est représentée en haut du dessin). B : lamelle amorphe après allongement des chaînes par les amidon-synthétases. Lorsque la taille des glucanes devient suffisante ceux-ci peuvent être l'objet de l'action des enzymes de branchement qui incorporent les liaisons α -1,6. C : structure intermédiaire hyper-ramifiée après action des enzymes de branchement. D : Lamelle amorphe subissant le clivage de certains points de branchement par les enzymes de débranchement. E : lamelle amorphe correctement organisée. L'espace entre les points de branchement permet la synthèse d'une nouvelle lamelle cristalline.

ISA3 et PU1 jouent un rôle important dans le catabolisme de l'amidon (Wattebled et al., 2005 ; Delatte et al., 2006). Toutefois, en parallèle de ces fonctions que nous décrirons plus loin dans l'exposé, ISA3 et PU1 sont également impliquées dans la biosynthèse de l'amylopectine mais de façon plus anecdotique que ISA1 et ISA2. Des lignées d'*Arabidopsis* complètement exemptes d'activité isoamylasique présentent un phénotype plus marqué que les lignées déficientes uniquement en ISA1, ISA2 ou ISA3, indiquant que l'activité ISA3 est partiellement redondante à celle du complexe formé par ISA1 et ISA2 (Wattebled et al., 2008 ; Streb et al., 2008). De même, bien que la mutation du locus *PUI* n'ait aucun effet sur le phénotype d'accumulation d'amidon, la double mutation *isa1-pu1-* ou *isa2-pu1-* conduit à un phénotype plus prononcé que dans les simples

mutants *isa-*. Ces observations, réalisées chez *Arabidopsis*, le riz ou le maïs prouvent l'existence d'un phénomène de redondance peu marqué entre les isoamylases et la pullulanase pour la biosynthèse de l'amidon (Wattebled et al., 2008 ; Streb et al., 2008 ; Fujita et al., 2009 ; Dinges et al., 2003).

2. Catabolisme

a. Phosphorylation de l'amylopectine

La phosphorylation de l'amylopectine a lieu aussi bien au cours de la journée pendant la biosynthèse, qu'au cours de la nuit pendant la dégradation (Nielsen et al., 1994). Le taux de phosphate du grain d'amidon est néanmoins plus important au cours de cette dernière (Ritte et al., 2004). Ceci s'explique du fait que la première étape du catabolisme de l'amidon consiste en la phosphorylation de l'amylopectine par l' α -glucan water dikinase (GWD) (Ritte et al., 2002) et la phosphoglucan water dikinase (PWD).

La GWD catalyse le transfert d'un groupement phosphate à partir de l'ATP sur des résidus de glucose de l'amylopectine en position C6 (Ritte et al., 2006). L'inactivation de cette enzyme conduit, chez la pomme de terre, à la réduction de la dégradation de l'amidon et à sa suraccumulation, aussi bien dans les feuilles que dans les organes de réserve (Lorberth et al., 1998). De même, chez *Arabidopsis*, la mutation du gène de structure de la GWD conduit à une suraccumulation d'amidon, et à une diminution du taux de phosphate de l'amidon (Yu et al., 2001). La GWD est, de plus, retrouvée liée au grain d'amidon de la feuille de pomme de terre uniquement au cours de la phase obscure (Ritte et al., 2000). La PWD transfère un groupement phosphate sur le carbone C3 d'un résidu de glucose. Son action est dépendante de celle de la GWD. En effet elle n'est active que sur un résidu de glucose déjà phosphorylé en position C6, et l'inactivation de la GWD conduit à l'absence de groupement phosphate sur l'amidon (Baunsgaard et al., 2005).

Le lien entre la phosphorylation de l'amylopectine et l'initiation de la dégradation de l'amidon n'est pas encore clairement établi. Mais l'explication la plus logique est que la présence des groupements phosphate désorganise l'amylopectine à la surface du grain, et permet aux enzymes de dégradation, que nous allons maintenant décrire, d'accéder à leurs substrats. Mikkelsen et al. (2005) ont montré que la GWD de pomme de terre est régulée par oxydoréduction. Elle est inactivée par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire en conditions oxydantes et c'est sous cette forme qu'elle se trouve liée au grain d'amidon. La raison pour laquelle la GWD est sous forme inactive quand elle est liée au grain d'amidon n'est pas encore bien comprise, mais le mécanisme de

régulation redox mis en évidence par Mikkelsen et al pourrait être le principal régulateur de la dégradation de l'amidon, vu que la phosphorylation semble être la première étape de l'anabolisme et conditionner l'activité des enzymes de dégradation qui interviennent en aval. Une autre enzyme nommée SEX4 (starch excess 4) semble impliquée dans la régulation de la dégradation en contrôlant le niveau de phosphorylation de l'amidon. Cette enzyme est une phosphoglucane phosphatase de type laforine. Les laforines sont des phosphoprotéines phosphatases qui seraient impliquées dans la régulation du métabolisme du glycogène (Liu et al., 2008). SEX4 est capable de déphosphoryler la surface du grain d'amidon, ainsi que les phosphoglucanes solubles *in vitro* (Kötting et al., 2009). Un mutant d'*Arabidopsis* au locus *SEX4* accumule, de plus, des glucanes phosphorylés produits au cours de la dégradation (Niittylä et al., 2006). Kötting et al. ont proposé que SEX4 agit en synergie avec les enzymes de phosphorylation et les hydrolases pour contrôler la dégradation.

b. Dégradation des α -1,4 glucanes

Plusieurs familles d'enzymes sont impliquées dans la dégradation de l'amidon. Ceci est clair pour certaines d'entre elles comme les β -amylases ou les enzymes de débranchement. Pour les autres, la situation est différente, soit car le phénotype des mutants correspondants est masqué par d'autres activités enzymatiques, soit car les résultats obtenus diffèrent selon le modèle d'étude, conduisant à des interprétations contradictoires. C'est le cas pour les α -amylases, qui jusqu'à peu, ne semblaient jouer aucun rôle dans la dégradation de l'amidon transitoire. Récemment, il fut montré que le phénotype associé à l'inactivation d'une α -amylase d'*Arabidopsis*, n'est visible que dans un fond génétique quadruple mutant. C'est également le cas de l'enzyme disproportionnante 1 (ou enzyme D) et de l'amidon-phosphorylase pour lesquelles différents phénotypes d'accumulation d'amidon sont observés en fonction de l'organisme muté. Dans ce paragraphe, nous décrirons les fonctions des α et β -amylases, ainsi que des enzymes de débranchement dans la dégradation de l'amidon. Les informations concernant l'enzyme D et la phosphorylase seront présentées dans le point d. de la partie « métabolisme de l'amidon ».

i. Les amylases

Les α -amylases sont des endoamylases qui hydrolysent une liaison α -1,4 au sein d'un glucane et libèrent des petits oligosaccharides branchés ou non. Chez les céréales, l'amylase joue un rôle dans la dégradation de l'amidon au cours de la germination des graines. Dans ce cas, l'enzyme hydrolyse l'amidon et produit des glucanes branchés et des glucanes linéaires (Sissons et Mc Gregor, 1994). La

situation semble différente pour le métabolisme de l'amidon transitoire. Il existe trois gènes d' α -amylases dans le génome d'*Arabidopsis*. L'une des trois séquences (AMY3) possède un peptide d'adressage au chloroplaste. La mutation de ce locus n'entraîne aucun phénotype, même dans un fond génétique double mutant où les deux autres gènes de structure d' α -amylases (non plastidiales) sont inactivés (Yu et al., 2005). Toutefois, un phénotype se révèle si l'on introduit la mutation *amy3* dans mutant exempt d'activité de débranchement qui n'accumule pratiquement plus d'amidon. La mutation *amy3*, dans ce type de fond génétique, restaure la biosynthèse de polysaccharides insoluble à un niveau d'environ 75 % de celui du sauvage (Streb et al., 2008). Les auteurs ont proposé qu'AMY3 dégrade la pré-amylopectine en l'absence des enzymes de débranchement, mais sa fonction dans un contexte sauvage reste à déterminer. On peut même se demander pourquoi une telle fonction a été maintenue dans la plante alors que son effet ne devient perceptible que lorsque les quatre enzymes de débranchement sont simultanément inactivées (ce qui est somme toute fort peu probable dans la nature). De fait la fonction d'AMY3 reste encore à découvrir.

Les β -amylases sont des exoamylases qui catalysent l'hydrolyse d'une liaison α -1,4 en libérant du maltose. Ces enzymes agissent sur les extrémités non réductrices des glucanes qu'elles dégradent en les rognant progressivement jusqu'à la barrière infranchissable que représente un point de branchement. Chez la pomme de terre, l'inactivation de cette enzyme par l'expression d'un ARN antisens entraîne la diminution du taux de dégradation dans les feuilles (Scheidig et al., 2002). La protéine recombinante correspondante est, de plus, capable de libérer du maltose à partir de grains d'amidon natifs *in vitro*. On trouve 9 gènes susceptibles de coder des β -amylases dans le génome d'*Arabidopsis*. Quatre de ces séquences contiennent un signal d'adressage au chloroplaste et le produit de l'une d'entre elles y a été identifiée (Lao et al., 1999). Fulton et al. (2008) ont étudié les quatre isoformes de β -amylases d'*Arabidopsis* potentiellement adressées au chloroplaste (BAM1, BAM2, BAM3 et BAM4). Il ressort de cette étude que seules les protéines recombinantes BAM1, BAM2 et BAM3 sont actives *in vitro*. Les phénotypes d'accumulation d'amidon de combinaisons mutantes pour les différentes isoformes, montrent que BAM1 et BAM3 sont impliquées dans la dégradation des chaînes de l'amidon. L'activité de BAM3 est majoritaire, alors que celle de BAM1 est modérément redondante avec celle de BAM3. L'isoforme BAM4 est par ailleurs impliquée dans la dégradation, bien qu'inactive *in vitro*. Les auteurs suggèrent, pour cette dernière isoforme, un mode d'action différent de celui de BAM1 ou BAM3 et une fonction potentielle de régulation de la dégradation.

ii. Les enzymes de débranchement

Nous avons décrit, dans la partie « anabolisme », que le rôle générique des enzymes de débranchement est d'hydrolyser les liaisons O-glycosidiques de type α -1,6. Elles participent à différents degrés à l'acquisition du caractère cristallin de l'amylopectine. L'isoamylase 3 et la pullulanase participent également au catabolisme de l'amidon en clivant les points de branchement de l'amylopectine en parallèle de la dégradation des glucanes par les β -amylases. C'est d'ailleurs la fonction principale d'ISA3. L'étude de lignées d'*Arabidopsis* mutantes pour ISA3 montre que l'absence de l'enzyme entraîne une augmentation importante du contenu en amidon ainsi que la diminution du taux de dégradation (Wattebled et al., 2005 ; Delatte et al., 2006). Le phénotype est plus marqué chez des individus doubles mutants *isa3 pul*, montrant l'existence d'une redondance fonctionnelle partielle entre ces deux enzymes (Delatte et al., 2006 ; Wattebled et al., 2008).

c. Métabolisation des produits de dégradation

Le principal produit de dégradation exporté du chloroplaste est le β -maltose (Weise et al., 2005). Le maltose est exporté du plaste vers le cytosol via un transporteur nommé MEX1 (maltose excess 1) (Niittylä et al., 2004). Il semble être ensuite dégradé par une enzyme disproportionnante cytosolique appelée DPE2. Une mutation au locus *DPE2* entraîne un phénotype similaire à celui du mutant *mex1*, c'est-à-dire une suraccumulation d'amidon et de maltose (Lu et Sharkey, 2004 ; Chia et al., 2004). DPE2 est de plus capable de transférer un résidu de glucose à partir de maltose sur le glycogène *in vitro*. Ces éléments suggèrent que la dégradation du maltose est liée au métabolisme d'un glucane cytosolique accepteur. Le meilleur candidat pour ce rôle est un hétéroglycane composé d'arabinose, de galactose, de glucose, de fructose, de rhamnose, de xylose et de mannose. Celui-ci semble être en outre un bon substrat pour la phosphorylase cytosolique dont le rôle pourrait être de dégrader l'hétéroglycane en hexoses phosphates (Yang et Steup, 1990 ; Fettke et al., 2004 ; Fettke et al., 2005).

d. L'enzyme D et l'amidon-phosphorylase

Les fonctions de l'enzyme D et de l'amidon phosphorylase sont des sujets de controverse, principalement car la mutation des gènes correspondants conduit à des phénotypes opposés selon l'organisme étudié. L'enzyme D est similaire à l'amylomaltase d'*E. coli*, une enzyme impliquée dans la dégradation du maltose chez la bactérie. C'est une α -1,4 glucanotransférase qui hydrolyse un

malto-oligosaccharide pour libérer un résidu de glucose et transférer l'autre partie sur un α -glucane (figure 14) (Walker et Whelan, 1957).

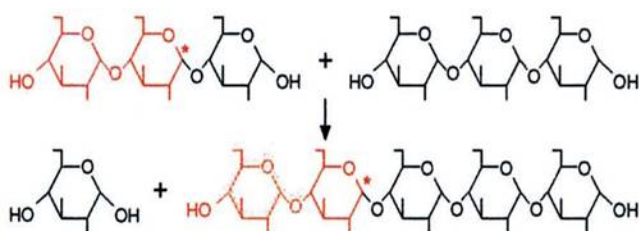


Figure 14 : Représentation schématique du mode d'action de l'enzyme D d'après Myers et coll. (2000). Les extrémités réductrices et non-réductrices des glucanes sont positionnées respectivement à droite et à gauche sur le schéma. Les résidus de glucose en rouge sont ceux qui subissent la réaction de transfert catalysée par l'enzyme D.

Le mutant *stall* de *Chlamydomonas* est déficient pour l'enzyme D. La quantité d'amidon synthétisé par ce mutant atteint à peine 10 % de celle du sauvage (Wattebled et al., 2003). Ce phénotype s'accompagne d'une accumulation anormalement élevée de malto-oligosaccharides solubles linéaires et d'une modification de la structure de l'amylopectine avec un enrichissement des chaînes de DP < 16. L'enzyme D est en outre capable de transférer des glucanes linéaires sur de l'amylopectine *in vitro*, en libérant un résidu de glucose par glucane transféré (Colleoni et al., 1999a ; Colleoni et al., 1999b). Sur la base de ces éléments, il a été proposé un modèle d'implication de l'enzyme D dans la synthèse de l'amylopectine. Dans ce modèle, les glucanes linéaires, produits par les enzymes de débranchement au cours de l'épissage de la pré-amylopectine, sont recyclés par l'enzyme D qui catalyse leur transfert sur l'amylopectine, limitant ainsi la perte à un seul résidu de glucose par glucane débranché. Le mutant *dpe1* d'*Arabidopsis* est lui aussi déficient pour l'enzyme D. Celui-ci ne présente pas de modification de la structure de l'amylopectine, mais accumule trois fois plus d'amidon et huit fois plus de malto-oligosaccharides, particulièrement du maltotriose en fin de nuit. Ces résultats ont amené les auteurs à proposer une fonction de cette enzyme dans la dégradation. Dans ce modèle, l'enzyme participe au recyclage des malto-oligosaccharides libérés lors de la dégradation du grain au cours de la nuit. Elle formerait, à partir des produits de dégradation, des glucanes plus longs qui sont de meilleurs substrats pour les amylases (Critchley et al., 2001).

Les α -1,4-glucane-phosphorylases catalysent le clivage d'une liaison α -1,4 en présence d'orthophosphate pour libérer du G1P. Cette enzyme agit préférentiellement sur des glucanes linéaires d'une taille minimale de cinq résidus de glucose (Steup et al., 1981). La réaction catalysée par la phosphorylase est réversible, et la fonction de cette enzyme dans le métabolisme de l'amidon n'est pas bien déterminée. Chez *Arabidopsis*, il existe une forme cytosolique et une forme chloroplastique de phosphorylase (Zeeman et al., 2004). Chez la pomme de terre et *Chlamydomonas*,

on en trouve deux formes plastidiales et une cytoplasmique (Sonnewald et al., 1995 ; Dauvillée et al., 2006).

Les phénotypes mutants déficients en phosphorylase plastidiale varient selon l'organisme étudié et les conditions de culture utilisées. Son inactivation par ARNi conduit à un phénotype sauvage chez une lignée de pomme de terre (Sonnewald et al., 1995). Dans le cas d'*Arabidopsis*, le mutant *phs1* décrit par Zeeman et al. (2004) accumule des quantités normales d'amidon de structure non modifiée. Une sensibilité accrue de ce mutant aux stress abiotiques a amené les auteurs à proposer une fonction de cette enzyme dans la tolérance aux stress via la voie des pentoses phosphates. Néanmoins, le même mutant, cultivé par notre laboratoire, accumule des grains d'amidon plus grands que les grains sauvages, et montre une légère augmentation du contenu en amidon en fin de journée par rapport au sauvage, ce qui laisse présager une fonction catabolique pour l'enzyme (résultat non publiés). Weise et al. (2006) ont montré, à partir d'analyses sur le haricot et *Arabidopsis*, que PHS1 joue un rôle dans la dégradation de l'amidon en condition de photo-respiration. PHS1 rendrait ainsi disponibles les hexoses phosphates pour le cycle de Calvin. Les séquences des phosphorylases plastidiales de *Chlamydomonas* diffèrent des séquences de plantes supérieures par l'absence d'une insertion de 80 acides aminés. Le mutant *sta4* de *Chlamydomonas* est déficient pour une des isoformes appelée Pho B. Ce mutant accumule moins d'amidon que le sauvage, les grains sont déformés, la structure de l'amylopectine modifiée et le contenu en amylose augmenté. Toutes ces informations suggèrent que Pho B est impliquée dans la biosynthèse de l'amidon dans ce contexte biologique (Dauvillée et al., 2006).

III. Les amidon-synthétases

Nous avons vu que les amidon-synthétases sont importantes dans la biogenèse du grain d'amidon puisqu'elles en allongent les α -glucanes. Elles transfèrent le résidu de glucose de l'ADP-glucose vers l'extrémité non réductrice d'un glucane en élongation par l'intermédiaire d'une liaison O-glycosidique de type α -1,4. Il existe deux types majeurs d'amidon-synthétases : celui des amidon-synthétases liées au grain d'amidon (ou GBSS pour Granule Bound Starch-Synthase) responsables de la biosynthèse de l'amylose, et celui des amidon-synthétases solubles (ou SS pour Soluble Starch-Synthase) responsables de la biosynthèse de l'amylopectine. On distingue cinq isoformes ou « classes » d'amidon-synthétases solubles nommées SS1, SS2, SS3, SS4 et SS5.

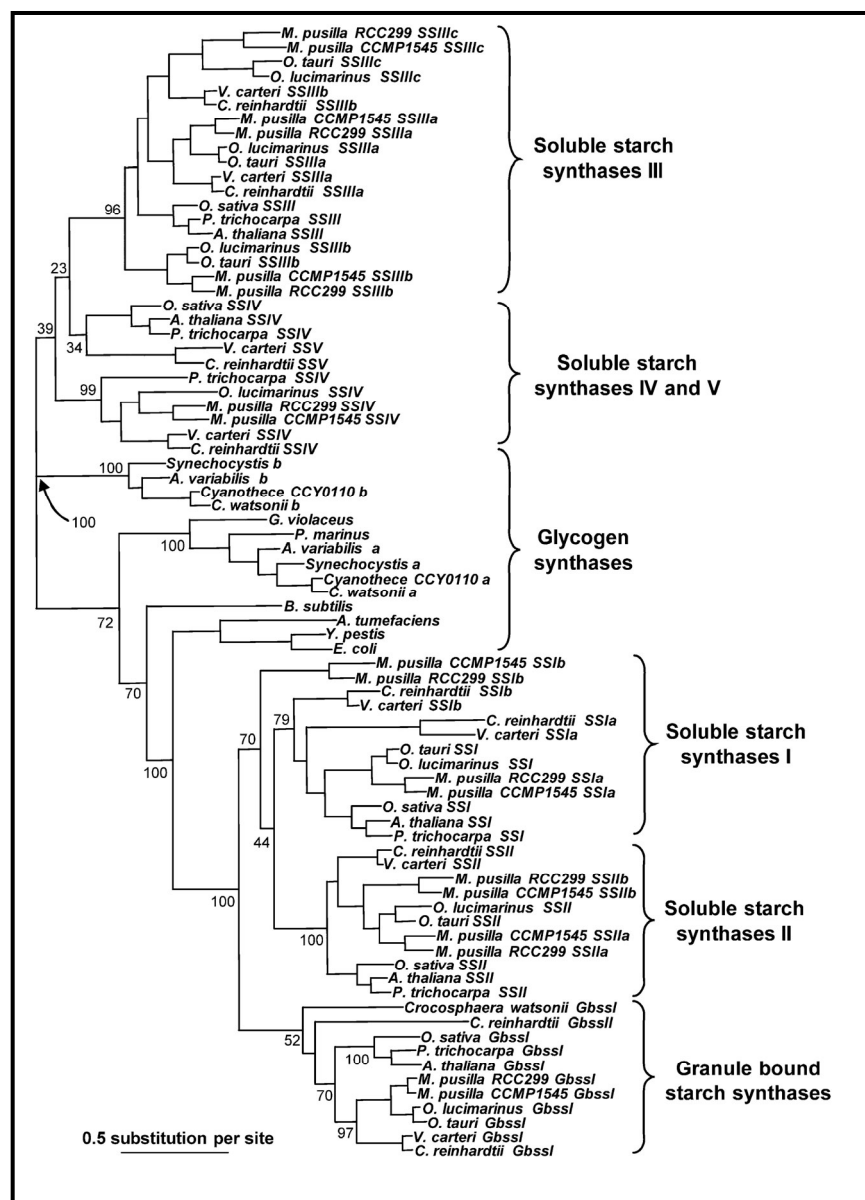


Figure 15 : Arbre phylogénétique des 5 classes d'amidon-synthétases d'après Deschamps et al. (2008). Les cinq classes d'amidon-synthétases forment deux sous-groupes en fonction de leur origine évolutive. Chaque sous-groupe est relié à une des deux glycogène-synthétases cyanobactériennes. Le premier contient les SS1, SS2 et GBSS ; le deuxième contient les SS3, SS4 et SS5. La barre d'échelle correspond à 0,5 substitutions / site. Les valeurs de bootstrap sont indiquées à chaque nœud.

1. Classification

L'analyse phylogénétique de 66 séquences d'amidon-synthétases de Chloroplastidiae a permis d'établir une classification des isoformes d'amidon-synthétases en fonction de leur origine évolutive en deux sous-groupes (Deschamps et al., 2008). Le sous-groupe A comprend les amidon-synthétases solubles de classe 1 et de classe 2 ainsi que la GBSSI. Le sous-groupe B contient quant à lui les amidon-synthétases de classes 3, 4 et 5. Ce deuxième sous-groupe d'amidon-synthétases est phylogénétiquement très proche d'une des deux glycogène-synthétases cyanobactériennes ancestrales (figure 15). Même si la classe des SS5 est reliée aux amidon-synthétases du sous-groupe B, aucune lignée mutée spécifiquement pour cette isoforme ni aucune étude enzymatique n'ont

permis de déterminer son éventuelle implication dans la biosynthèse de l'amidon. Nous ne traiterons donc dans ce chapitre que des GBSS1, SS1, SS2, SS3 et SS4.

2. Caractéristiques structurales

a. Domaine catalytique

Les amidon-synthétases, au même titre que les glycogène-synthétases à ADP-Glucose, font toutes partie de la famille 5 (GT-5) des glycosyltransférases de la classification CAZy (Carbohydrate Active enZyme) proposée par B. Henrissat (Coutinho *et al.*, 2003). Cette classification se base sur la nature modulaire du domaine catalytique des glycosyltransférases et les similarités de séquence qu'elles présentent. En effet, toutes les amidon-synthétases possèdent une région d'environ 450 acides aminés similaire aux séquences de glycogène-synthétases, et conservée dans leur partie C terminale. Cette région porte l'activité catalytique, et on y distingue 8 domaines maintenus entre les différentes classes. Il existe par ailleurs deux motifs strictement conservés dans toutes les séquences d'amidon-synthétases. Ces motifs : K-X-G-G-L et X-X-G-G-L, sont respectivement localisés aux extrémités N et C terminales de la région catalytique, au niveau des domaines *I* et *VIII* (figure 16) (Cao *et al.*, 1999).

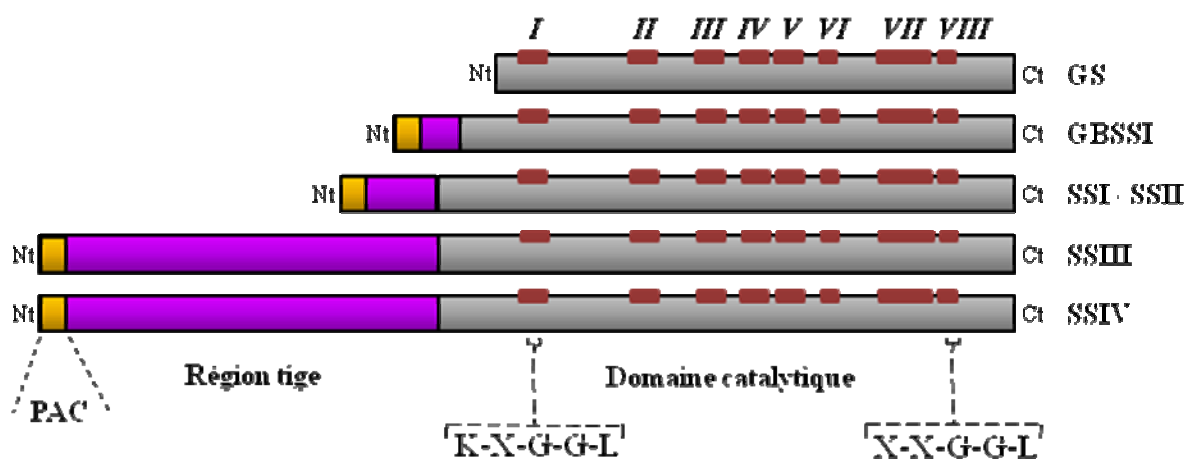


Figure 16 : Alignement schématique des séquences d'amidon-synthétases et d'une séquence de glycogène-synthétase procaryote. Les amidon-synthétases ont une organisation structurale commune avec un peptide d'adressage au chloroplaste (PAC) N-terminal (Nt), une région tige de taille variable et un domaine catalytique C-terminal (Ct). Les huit domaines conservés (*I* à *VIII*) sont situés dans la région catalytique, et les motifs K-X-G-G-L et X-X-G-G-L sont respectivement localisés au niveau des domaines *I* et *VIII*.

Ces séquences sont des « signatures » des amidon-synthétases et l'implication du premier motif dans l'activité enzymatique est largement documentée. Les travaux de Furukawa *et al.*, (1990) sur la

glycogène-synthétase d'*E. coli* ont montré que le résidu de lysine participe à la fixation de l'ADP-Glucose. Le résidu de glycine voisin de l'acide aminé variable semble quant à lui intervenir lors de la catalyse enzymatique, et le deuxième résidu de glycine est impliqué dans la fixation du glycosyl-nucléotide (Furukawa et al., 1990 ; Furukawa et al., 1993). Il faut également noter que la nature de l'acide aminé variable est différente entre les amidon-synthétases des sous-groupes A et B. Celui-ci est polaire dans le cas des SS du sous groupe B, et apolaire dans le cas des SS du sous groupe A. Cette différence de structure pourrait notamment être liée aux spécificités de substrats des amidon-synthétases des deux sous-groupes (Leterrier et al., 2008).

D'autres résidus d'acides aminés conservés dans le domaine catalytique des amidon-synthétases semblent être impliqués dans leur activité. Le résidu d'arginine 214 de la SS2a du maïs (Imparl-Rodosevich et al., 1999) ou les résidus d'aspartate 19, 139 et de glutamate 391 de la SS2b (Nichols et al., 2000) ont par exemple été identifiés. La lysine 277 de la glycogène-synthétase d'*E. coli* (conservée chez les végétaux) est elle aussi importante dans le processus catalytique (Furukawa et al., 1994). Yep et collaborateurs ont en outre montré en 2000 l'implication des résidus asparagine 137, histidine 161, arginine 300 et lysine 305, chez cette même glycogène-synthétase, notamment dans la fixation de l'ADP-glucose.

Les régions catalytiques de la GS d'*E. coli*, de la SS3 d'*Arabidopsis* et de la SS4 du blé ont été récemment modélisées par homologie de séquence. Ces modèles sont basés sur la structure tridimensionnelle de la glycogène-synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenue par cristallographie. L'organisation des régions catalytiques de la SS3 et de la SS4 est la même que pour les autres « retaining glycosyltransferases » (glycosyltransférases ne modifiant pas la stéréochimie de la liaison glycosidique) de type B cristallisées à ce jour (Buschiazzo et al., 2004 ; Busi et al., 2007 ; Leterrier et al., 2008). Le domaine catalytique de ces amidon-synthétases se compose de deux hélices de type « Rossmann-like » (hélice α – feuillet β – hélice α) séparées par une boucle flexible où se trouve la « poche » de fixation de l'ADP-Glucose qui contient le motif K-X-G-G-L (figure 17) (Buschiazzo et al., 2004 ; Yep et al., 2006).

Les études structurales, menées pour la glycogène-synthétase d'*A. tumefaciens* cristallisée en présence et en absence d'ADP-Glucose, montrent que la boucle flexible située entre les domaines « Rossmann-like » passe d'un état relâché à un état fermé en présence d'ADP-Glucose (Buschiazzo et al., 2004). L'enzyme semble donc être « activée », par un changement de conformation après fixation du glycosyl-nucléotide. Ce changement de conformation de la boucle flexible permet le rapprochement des deux domaines « Rossmann-like », la « fermeture » de l'enzyme sur son substrat

et le confinement des acides aminés catalytiques au niveau de la poche ainsi formée. Le mécanisme semble être analogue dans le cas de la SS4 (Leterrier et al., 2008) et de la SS3 (Busi et al., 2007). Notons également que le niveau d'homologie de séquence entre les différentes classes de SS laisse présager une structure tertiaire similaire pour les domaines catalytiques des amidon-synthétases du sous-groupe A (Leterrier et al., 2008). Toutefois aucune étude bioinformatique approfondie sur la structure des domaines catalytiques de la SS1, la SS2 ou la GBSS1 n'a été publiée à ce jour.

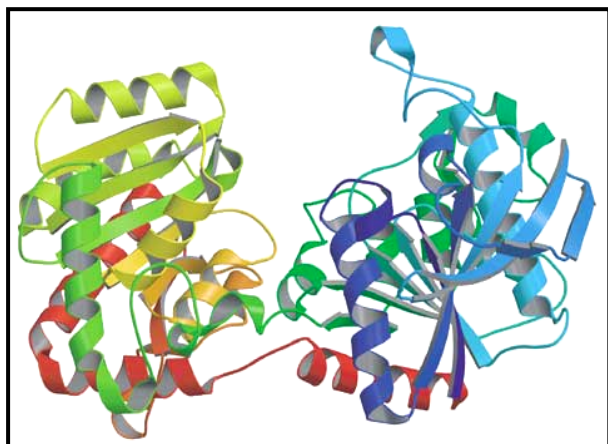


Figure 17 : Représentation des structures secondaires et tertiaire de la glycogène-synthétase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Buschiazzi et al., 2004). Le dégradé de couleurs du bleu vers le rouge indique la direction de l'extrémité N terminale vers l'extrémité C terminale. Les spirales représentent les hélices α , et les flèches représentent les feuillets β . La cavité contenant le site de fixation du glycosyl nucléotide est visible, entre les deux hélices « Rossmann-like ».

b. Région N terminale

La région N terminale des amidon-synthétases présente, à l'inverse de leur domaine catalytique, une très grande variabilité en termes de taille et de séquence. Elle varie de quelques dizaines d'acides aminés dans le cas de la SS1 à plusieurs centaines dans le cas des SS3 et SS4 (figure 16).

Trois domaines de liaison à l'amidon ou SBD (Starch Binding Domains), similaires aux SBD des enzymes de dégradation de l'amidon ou des enzymes microbiennes du métabolisme du glycogène, ont été identifiés au sein de la région tige N terminale de la SS3 (Palopoli et al., 2006). Ces domaines contiennent les résidus spécifiquement impliqués dans la fixation à l'amidon et permettraient de réguler la catalyse enzymatique (Valdez et al., 2008). Cinq domaines de la région N terminale non conservée de la SS3 sont en outre, capables d'interagir physiquement et de se lier à la SS1 et à la BE2a chez le maïs (Hennen-Bierwagen et al., 2008).

Les SBD sont absents de la séquence de la SS4, mais celle-ci présente une autre singularité. En effet, deux domaines « coiled coil » ont été identifiés dans la région N terminale de cette enzyme. Ce type de motifs est retrouvé dans de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la localisation de complexes protéiques dans la cellule (Rose et al., 2004). La conservation de ces

domaines dans les SS4 d'*Arabidopsis thaliana*, de *Vigna unguiculata*, du blé, ou encore du riz suggère qu'ils doivent avoir une fonction bien particulière dans cette classe d'amidon-synthétases qu'il faudra déterminer.

3. Fonction des amidon-synthétases dans l'élaboration du grain d'amidon

a. L'amidon-synthétase liée au grain d'amidon (GBSS1)

La GBSS1 est l'amidon-synthétase responsable de la biosynthèse de l'amylose (Nelson et Rines, 1962). La mutation du gène de structure de cette enzyme conduit invariablement, quelle que soit l'espèce, à la synthèse de grains d'amidon composés uniquement d'amylopectine. Le premier mutant pour une GBSS1 fut découvert chez le maïs et nommé mutant « Waxy » en raison de l'aspect cireux des grains (Tsaï et al., 1974). Pour cette raison, l'appellation « Waxy » fut étendue aux autres mutations pour la GBSS1 découvertes et étudiées par la suite chez les autres espèces. Parmi ces mutants, citons par exemple le mutant « amylose-free » de la pomme de terre (*amf*, Hovenkamp-Hermelink et al., 1987), le mutant « low-amylose » du pois (*lam*, Denyer et al., 1995) ou encore le mutant « *sta2* » de *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et al., 1992). Toutes ces lignées accumulent un nombre normal de grains d'amidon, dont l'organisation cristalline est identique à celle d'un grain sauvage (Buléon et al., 1997). De fait, l'absence d'amylose n'est pas incompatible avec la constitution d'un grain d'amidon d'apparence normale.

La GBSS est appelée ainsi car elle est naturellement associée de manière non covalente au grain d'amidon *in vivo* (Fekete et al., 1960), et qu'elle n'est pleinement active que sous cette forme. Cette enzyme utilise l'ADP-Glucose comme les amidon-synthétases solubles (Recondo et Leloir, 1961), et possède un mode de synthèse processif (Denyer et al., 1999). Il est facile d'étudier l'activité de la GBSS1 *in vitro*, simplement en incubant des grains d'amidon natifs avec de l'ADP-Glucose. De cette manière, il fut démontré que la GBSS catalyse l'incorporation de glucose radiomarké dans l'amylose mais également dans les longues chaînes externes de l'amylopectine (Leloir et al., 1961 ; Baba et al., 1987 ; Maddelein et al., 1994). Cette incorporation montre que les longues chaînes de l'amylopectine ainsi synthétisées ne sont pas des produits finaux de la GBSS1 mais des intermédiaires de biosynthèse de l'amylose (van de Wal et al., 1998). Par ailleurs, l'ajout de malto-oligosaccharides (MOS) au milieu d'incubation permet d'augmenter de manière significative l'incorporation de glucose dans l'amylose au détriment de l'amylopectine, suggérant que la GBSS utilise les MOS comme substrat pour l'élongation des chaînes de l'amylose (Denyer et al., 1996). Toutefois l'étude de ce phénomène chez *C. reinhardtii* montre que les MOS entrent directement en

compétition avec les chaînes externes de l'amylopectine, qui semblent être le substrat naturel de la GBSS (van de Wal et al., 1998). Deux modèles furent proposés pour expliquer le mécanisme de biosynthèse de l'amylose. Ils sont résumés dans la figure 17 (pour revue : Ball et al., 1998).

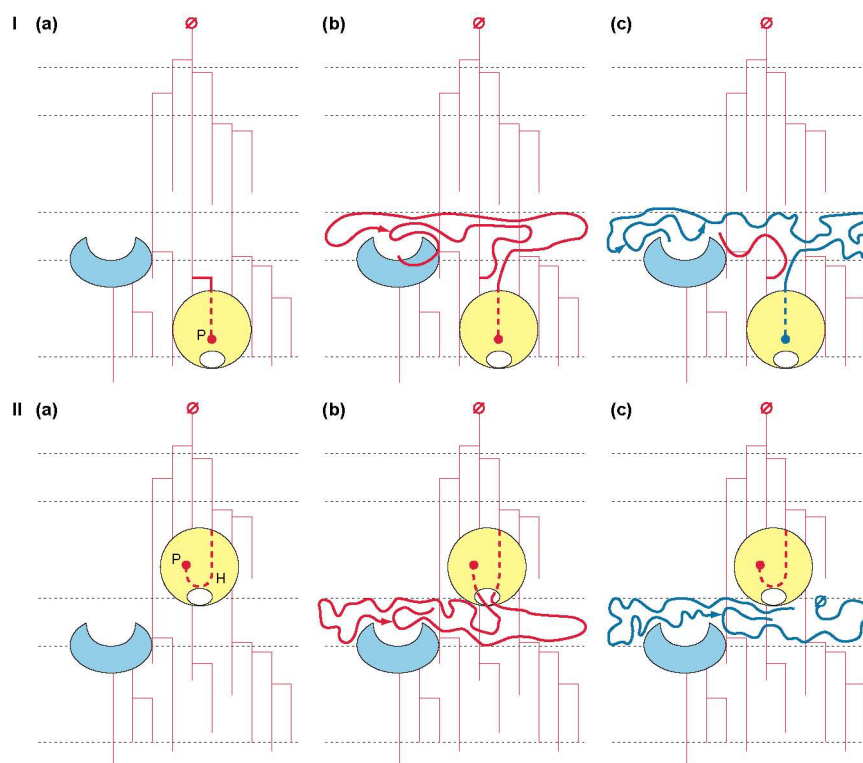


Figure 17 : Modèles de biosynthèse de l'amylose selon Ball et al. (1998). La matrice d'amylopectine d'origine est représentée par des traits fins rouges, alors que les chaînes externes allongées par la GBSS1 sont indiquées par des traits épais rouges. Les molécules d'amylose néo-synthétisées correspondent 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.

Ces deux modèles suggèrent que l'amylose est synthétisée par l'allongement des chaînes externes de l'amylopectine suivi du clivage du glucane néo-synthétisé. Ils diffèrent par la nature de l'activité hydrolytique impliquée dans le clivage. Dans le premier modèle, il s'agit d'une enzyme de branchement ou d'une enzyme hydrolytique (qu'on suppose être associée à l'amidon comme la GBSS1 mais à un niveau beaucoup plus faible). Dans le deuxième modèle, c'est la GBSS1 elle-même qui assure cette fonction (non démontrée jusqu'à présent). Ce dernier modèle est basé sur le

postulat que la GBSS1 possède deux types d'activité catalytique et que les deux sites protéiques impliqués sont proches dans l'espace au sein de l'enzyme.

b. La SS1

La SS1 fut pour la première fois isolée à partir du maïs par Boyer et Preiss (1979). Cette enzyme fut également identifiée chez de nombreux organismes tels que le riz (Baba *et al.*, 1993), le maïs (Mu *et al.*, 1994), le blé (Li *et al.*, 1999), le taro (Lin *et al.*, 2005) ou encore la pomme de terre (Kossmann *et al.*, 1999).

Tyynelä *et al.* (1995) décrivaient un mutant de l'orge déficient pour la SS1 (mutant *shx* pour *shrunk x*). Dans ce mutant, la diminution de l'activité amidon-synthétase soluble s'accompagne d'une diminution du contenu en amidon des grains. Néanmoins l'activité de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase est aussi nettement diminuée dans ce mutant et le métabolisme carboné y est très perturbé. En outre, aucune description de la structure de l'amidon résiduel n'a été présentée par les auteurs laissant ainsi planer un doute sur la spécificité de la mutation *shx*.

Une lignée transgénique de pomme de terre exprimant un ARN antisens de la SS1 fut produite et décrite par Kossmann *et al.* (1999). Dans cette lignée, aucune modification du contenu en amidon ou de sa structure n'a été mise en évidence.

Ce sont les travaux de Commuri et Keeling (2001), puis de Delvallé *et al.* (2005) qui levèrent le voile sur la fonction probable de la SS1 dans le métabolisme de l'amidon. Commuri et Keeling (2001) montrèrent que la SS1 de maïs exprimée chez *E. coli* voit son activité diminuer concomitamment à l'augmentation de la longueur des α -glucanes substrats utilisés. De plus, l'affinité de l'enzyme recombinante augmente avec la taille des substrats. La SS1 semble donc catalyser l'allongement des courtes chaînes de l'amylopectine, auxquelles elle resterait fixée au cours de la croissance. Cette hypothèse expliquerait notamment pourquoi dans certains cas, la SS1 est retrouvée partiellement liée au grain d'amidon (Li *et al.*, 1999). Delvallé *et al.* (2005) décrivirent le phénotype d'une lignée d'*A. thaliana* mutante pour la SS1. Cette étude a permis de mettre en évidence que cette enzyme d'élongation est nécessaire à la synthèse normale de la molécule d'amylopectine. Les auteurs ont par ailleurs montré, en accord avec les conclusions de Commuri et Keeling (2001), que la SS1 est responsable de la biosynthèse des courtes chaînes de l'amylopectine. De plus, les chaînes de DP17 à DP19 de l'amylopectine sauvage sont plus sensibles à la digestion par

la β -amylase que les mêmes chaînes de l'amylopectine mutante, suggérant que la SS1 intervient dans la biosynthèse des glucanes les plus externes des grappes de l'amylopectine.

c. La SS2

Originellement, les amidon-synthétases de classe 2 ont été décrites chez le pois (Dry et al., 1992), la pomme de terre (Edwards et al., 1995), et le blé (Denyer et al., 1995). Il existe deux isoformes de SS2 chez le maïs (SS2a et SS2b) et trois chez le riz (SS2-1, SSII-2 et SSII-3). Celles-ci sont exprimées différemment en fonction de l'organe ou du stade de développement. Chez le maïs, la SS2a, se retrouve principalement dans l'albumen alors que la SS2b est exprimée majoritairement dans les feuilles (Harn et al., 1998). Chez le riz, la SS2-2 est exprimée dans les feuilles, la SS2-3 dans l'albumen et la SS2-1 dans les deux tissus (Jiang et al., 2004). Chez cette même espèce, SS2-1 est exprimée tout au long du développement, alors que les SS2-2 et SS2-3 sont respectivement exprimées dans les phases précoces et tardives du développement (Hirose et Terao, 2004). Ces éléments indiquent que les différentes isoformes de SS2 pourraient avoir des fonctions spécifiques dans la biosynthèse de l'amidon de réserve ou de l'amidon transitoire. Il a été démontré en outre, que les SS de classe 2 sont en partie associées au grain d'amidon *in vivo* comme la GBSS (Denyer et al., 1993 ; Lin et al., 2005), bien que leur implication dans la biosynthèse de l'amylose soit inexistante (Denyer et al., 1995).

Des mutants spécifiquement déficients pour l'activité de la SS2 furent décrits chez le pois (*rug5*) (Craig et al., 1998), l'orge (*sex6*) (Morell et al., 2003) et le maïs (*su2*) (Zhang et al., 2004). Ces mutants présentent des phénotypes très semblables, donnant des indications claires sur la fonction de la SS2. Ainsi l'inactivation de cette isoforme conduit à une diminution significative du contenu en amidon et une augmentation du contenu en amylose de l'amidon résiduel. De plus, la structure de l'amylopectine est fortement modifiée avec une augmentation de la proportion relative des chaînes de DP < 12. Cette augmentation est associée à une diminution de la proportion des chaînes de DP compris entre 12 et 30. La SS2 semble ainsi spécifiquement impliquée dans le processus de synthèse de ce type de glucanes. La mutation du gène de structure de la SS2 conduit par ailleurs des modifications de la morphologie du grain d'amidon, avec une perte de sa forme caractéristique, ainsi qu'à la modification de sa cristallinité.

Une autre indication renforce l'hypothèse sur le rôle spécifique de la SS2 dans la production des chaînes de $12 < DP < 30$. L'analyse de l'amidon produit par les deux cultivars de riz *japonica* et *indica*, montre une différence dans la structure de leurs amylopectines. L'amylopectine du cultivar

japonica est enrichie en chaînes de DP < 12 et appauvrie en chaînes de 12 < DP < 30 (Umemoto et al., 2002), tout comme l'amylopectine d'un mutant déficient pour la SS2. Ces différences structurales sont en effet liées à une modification allèle spécifique du gène codant la SS2a chez le cultivar *japonica*. Les différences entre les propriétés des deux types de riz sont d'ailleurs vraisemblablement liées aux différences structurales entraînées par la modification de l'activité SS2a.

d. La SS3

Les amidon-synthétases de classe 3 ont été identifiées chez la pomme de terre (Abel et al., 1996), le blé (Li et al., 1999) et le maïs (Gao et al., 1998). Comme pour les amidon-synthétases de classe 2, il existe chez le riz différentes isoformes de SS3 dont le profil d'expression diffère en fonction de l'organe et du stade de développement. Ces deux isoformes sont appelées SS3-1 et SS3-2. Dian et al. (2005) ont montré que seule la SS3-1 est exprimée dans les feuilles, alors que les deux isoformes sont exprimées dans l'albumen. La SS3-1 est exprimée dans les étapes précoces du développement alors que SS3-2 est exprimée en milieu de développement.

L'impact de l'absence de la SS3 sur la structure de l'amidon fut étudié par mutagenèse chez le maïs (mutant *du1*) (Gao et al., 1998) et *Chlamydomonas reinhardtii* (mutant *sta3*) (Fontaine et al., 1993), ou par l'expression d'un ARN antisens chez la pomme de terre (Abel et al., 1996 ; Marshall et al., 1996). Mis à part les études par ARN antisens pour lesquelles les phénotypes sont très modérés, dans chaque cas l'organisme synthétise seulement 40 à 70 % de l'amidon normalement contenu dans le sauvage. La structure de l'amylopectine est fortement modifiée avec un enrichissement des glucanes de DP < 10 et DP > 40, et une diminution de la proportion des glucanes de taille intermédiaire. La morphologie des grains est, de plus, fortement perturbée. Chez *Chlamydomonas*, ce phénotype s'accompagne d'une diminution de la cristallinité et d'un passage du type cristallin A vers le type cristallin B. La SS3 semble donc impliquée dans l'allongement des glucanes de taille intermédiaire de l'amylopectine nécessaires à la formation de la lamelle cristalline.

Zhang et al (2005) ont proposé une nouvelle fonction pour la SS3 en lien avec la régulation de la synthèse de l'amidon. La mutation du gène de structure de la SS3 chez *Arabidopsis thaliana* s'accompagne d'une augmentation du contenu en amidon dans les feuilles ainsi que d'une modification de la structure de l'amylopectine telle que celle décrite chez les mutants étudiés auparavant. De plus l'activité amidon-synthétase soluble totale mesurée chez le mutant *ss3* est augmentée. La SS3 d'*A. thaliana* semblerait donc jouer, en plus de son rôle dans l'élongation les

glucanes de taille intermédiaire de l'amylopectine, un rôle de régulateur négatif de la biosynthèse de l'amidon, en inhibant par exemple les autres amidon-synthétases au cours de l'allongement des chaînes de l'amylopectine. Récemment, deux équipes ont montré que les SBD présents dans la partie N terminale des SS3 permettent la fixation de l'enzyme sur l'amidon, étant ainsi probablement capables de moduler ses propriétés catalytiques, et expliquer sa fonction de régulation (Senoura et al., 2007 ; Valdez et al., 2008).

e. La SS4

Les profils d'expression des amidon-synthétases de classes 4 ont été étudiés chez le riz (Dian et al., 2005) et chez le blé (Leterrier et al., 2008). Chez le riz, il existe comme pour les SS de classe 2 et 3, deux isoformes de SS4 (SS4-1 et SS4-2). Bien que l'expression de ces deux isoformes soit constante au cours du développement (Hirose et Terao, 2004), la SS4-2 est préférentiellement exprimée dans les feuilles, alors que la SS4-1 l'est principalement dans l'albumen (Dian et al., 2005).

Le phénotype découlant de l'interruption du gène de structure de la SS4 fut décrit chez *A. thaliana* par Roldan et al (2007). D'après cette étude, l'amidon-synthétase de classe 4 ne semble avoir aucun rôle dans l'allongement des chaînes de l'amylopectine, à l'inverse des autres amidon-synthétases solubles. En effet, la mutation n'entraîne aucune modification significative du ratio amylose / amylopectine ou de la distribution de longueur des glucanes de l'amylopectine. Toutefois, cette étude montre que l'absence de la SS4 entraîne l'augmentation de la taille des grains d'amidon (figure 18) et la diminution de leur nombre par chloroplaste. En effet, alors qu'un chloroplaste sauvage contient 4 à 5 grains d'amidon, les chloroplastes mutants contiennent un seul, plus rarement deux, grains d'amidon. Ce phénotype peut s'expliquer notamment, si l'on considère que l'absence de la SS4 diminue le nombre d'évènements d'amorçage ou de nucléation du grain d'amidon, conduisant à la concentration du carbone sur un seul grain et à l'augmentation anormale de sa taille. L'analyse par microscopie électronique à transmission de sections de grains d'amidon sauvages et *ss4-* montre la présence d'une zone beaucoup moins dense aux électrons au niveau du hile dans ces derniers (figure 18). Cette zone correspond à une structure très désorganisée. Si on considère qu'elle découle directement de la mutation, deux hypothèses sont envisageables : soit la SS4 synthétise les glucanes qui constituent le hile du grain d'amidon, soit elle est en partie associée au grain (seule, en complexe, ou associée à d'autres molécules) à cet endroit et permet de stabiliser la structure macromoléculaire.

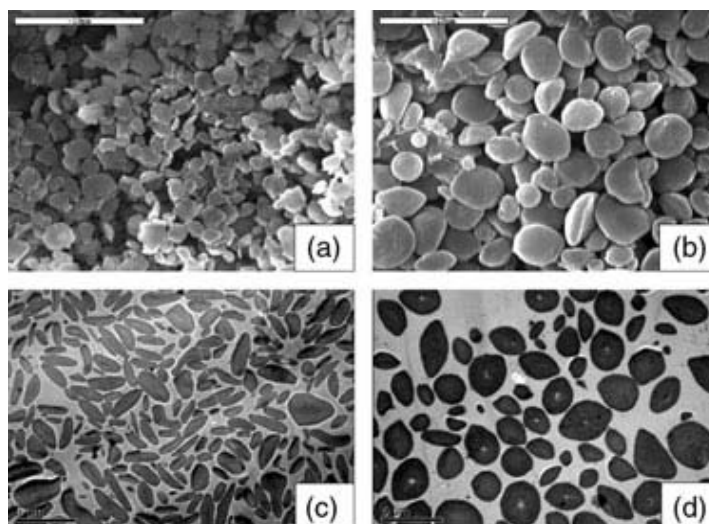


Figure 18 : Photographies de microscopie électronique à balayage (a et b) et à transmission (c et d) de grains d'amidon sauvages (a et c) et mutants *ss4* (b et d). Les barres représentent 10 μm.

f. Redondances fonctionnelles des amidon-synthétases

Comme nous l'avons décrit dans cette partie, contrairement au métabolisme du glycogène qui nécessite une seule glycogène-synthétase pour l'allongement des glucanes du glycogène, plusieurs isoformes d'amidon-synthétases sont présentes dans les tissus accumulant de l'amidon. Chaque classe de SS est largement conservée dans le règne végétal et semble jouer un rôle spécifique, que ce soit dans l'élaboration de l'amylopectine, ou dans d'autres processus comme la régulation du taux de synthèse de l'amidon avec la SS3, ou l'initiation de la biosynthèse avec la SS4. Toutefois, vu les similarités de séquences des amidon-synthétases, des phénomènes de redondances partielles ou totales ne sont pas à exclure pour l'une ou l'autre des fonctions précitées.

Il existe vraisemblablement des similitudes entre les fonctions des SS de classe 2 et SS de classe 3. Les phénotypes mutants pour ces deux classes d'enzymes, en termes de modifications de la structure de l'amylopectine, suivent la même tendance. Par ailleurs, l'inactivation simultanée des SS2 et 3 par l'expression d'ARN antisens dans une lignée de pomme de terre conduit à une modification de la structure de l'amylopectine du même type que les modifications observées dans le cas des mutants *rug5* ou *dull1* (Lloyd et al., 1999 ; Edwards et al., 1999 ; Craig et al., 1998 ; Gao et al., 1998), alors que l'inactivation d'une seule enzyme n'entraîne pas de phénotype marqué (Abel et al., 1996 ; Marshall et al., 1996). Ces résultats semblent indiquer que les SS2 et SS3 ont des activités au moins partiellement redondantes dans l'amyloplaste du tubercule de pomme de terre. A ce jour, ce sont les seules études ayant mis en évidence une redondance fonctionnelle entre deux classes

d'amidon synthétases solubles. L'étude des mêmes phénomènes pouvant exister entre les autres classes représente l'un des objets de ce travail de thèse.

4. Les amidon-synthétases au sein de complexes multimériques

Nous avons décrit dans cette partie, les différentes fonctions et redondances connues pour les amidon-synthétases. Chaque isoforme semble jouer un ou plusieurs rôles plus ou moins spécifiques et représentatifs de la classe à laquelle elle appartient. Néanmoins il est fort probable qu'il existe des redondances au moins partielles entre ces isoformes puisqu'elles catalysent toutes la même réaction avec un substrat donneur commun : l'ADP-Glucose. De plus, comme nous l'avons vu dans la partie « Métabolisme de l'amidon », les amidon-synthétases ne sont pas la seule famille d'enzymes impliquée dans la synthèse du polymère de réserve. Les enzymes de branchement et de débranchement sont indispensables pour synthétiser l'amylopectine. Il est envisageable que les amidon-synthétases, comme les autres acteurs de la biosynthèse, agissent indépendamment et de manière stochastique au sein du chloroplaste, et que le produit d'une enzyme soit le substrat d'une autre. Toutefois, des études récentes ont montré que les amidon-synthétases s'associent entre elles, ou avec d'autres familles d'enzymes comme les enzymes de branchement (Hennen-Bierwagen et al., 2008 ; Tetlow et al., 2008). Auparavant, Tetlow et al (2004) avaient déjà montré que chez le blé, les BE1 et BE2b s'associent à l'amidon-phosphorylase sous la forme de complexes multiprotéiques stabilisés par la phosphorylation de résidus de sérine. Hennen-Bierwagen et al. (2008) ont montré que la SS3 du maïs est capable d'interagir avec la SS1 et la BE2a via certaines régions de son extrémité N terminale. Les autres isoformes d'amidon-synthétases et d'enzymes de branchement chez cette même espèce, sont elles aussi associées sous la forme de complexes hétéromultimériques. Tetlow et al (2008) ont publié une étude prouvant l'existence de phénomènes comparables chez le blé. Au moins deux complexes distincts contenant les SS1, SS2a, BE2a et BE2b ont été identifiés, et leur formation semble être sous la dépendance d'un mécanisme de phosphorylation de certains résidus d'acides aminés (figure 19).

Au regard de ces découvertes récentes, il semble que l'action des amidon-synthétases, de même que celle des enzymes de branchement, soit orchestrée par un mécanisme d'assemblage supramoléculaire qui constitue une nouvelle forme de régulation du métabolisme de l'amidon.

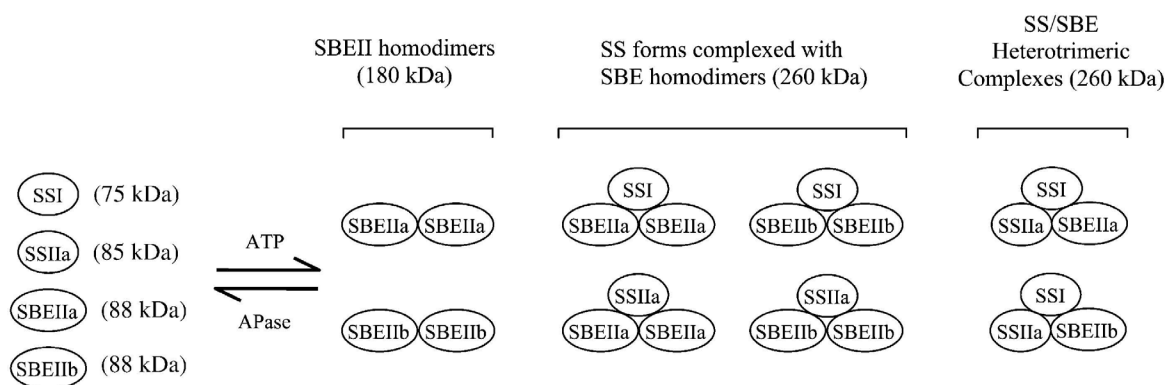


Figure 19 : Représentation des interactions entre les SS et SBE du blé (Tetlow et al., 2008). Les résultats obtenus par les auteurs permettent de former trois groupes d'interactions potentielles : dans le premier groupe, les SBE forment des homodimères ; dans le deuxième, ces homodimères sont complexés avec les isoformes de SS ; dans le troisième, les SS1 et SS2a s'associent en hétérotrimère avec une isoforme de SBE.

IV. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est une plante de la famille des Brassicaceae, ou crucifères, qui peut atteindre 20 à 70 cm de haut. Elle doit son nom au botaniste Johannes Thal qui la découvrit au XVI^e siècle. Les feuilles de la base de cette plante sont petites et arrondies et forment la « rosette ». Les feuilles « aériennes » situées sur la tige sont plus longues et plus étroites et diffèrent de part leur nombre. Les fleurs mesurent environ 3 mm de long pour 1 mm de large et sont constituées, comme pour les autres crucifères, de 4 pétales, 4 sépales, 6 étamines et un pistil (figure 20).

Plus de 750 variétés ou « écotypes » d'*Arabidopsis* ont été récoltées à travers le monde. Elles diffèrent de part leur taille, la forme des feuilles ou le temps de floraison par exemple. Les écotypes couramment utilisés en recherche sont Landsberg erecta, Columbia (Col) et Wassilewskija (WS) et sont disponibles dans les grandes banques de semences. *Arabidopsis thaliana* est un modèle d'étude pertinent pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cette espèce possède un génome de taille relativement petite (120 000 Kb) organisé en 5 chromosomes, soit environ 8 fois celui de la levure, totalement décodé et annoté depuis 2001. Ensuite le cycle de vie de la plante est court (6 à 8 semaines du semis à la récolte des graines de la génération suivante) et permet la production importante de graines (plusieurs milliers par individu). La petite taille d'*Arabidopsis* est un atout pour la culture de masse, qui ne nécessite pas d'infrastructure importante. La diploïdie de cet organisme constitue par ailleurs, un avantage certain pour la sélection de mutants comparé à d'autres végétaux comme le blé hexaploïde ou la pomme de terre tétraploïde. Enfin, il existe un moyen facile de transformer *Arabidopsis thaliana* grâce à une bactérie phytopathogène du sol appelée *Agrobacterium*

tumefaciens. Cette bactérie est capable d'infecter la plante en pénétrant par une blessure ou une autre zone sensible. Elle possède un plasmide naturel appelé plasmide Ti qui contient des gènes de virulence capable de mobiliser un court fragment interne dénommé ADN-T (ADN de transfert) qui s'intégrera dans le génome végétal afin d'en détourner les voies métaboliques à l'avantage de la bactérie. En utilisant une forme modifiée de cet ADN-T, il est possible de créer de nombreux mutants par insertion aléatoire de l'ADN-T dans le génome nucléaire de la plante (figure 21).



Figure 20 : Représentation d'un plant d'*Arabidopsis thaliana* âgé d'environ 6 semaines.

La plante est transformée par trempage dans une suspension de la bactérie, sous vide ou en présence de détergent (Silwet) pour favoriser l'infection. Les transformants sont ensuite sélectionnés par pulvérisation d'un herbicide : le Basta. L'intégration de l'ADN-T s'effectue de manière aléatoire, à l'état hémizygote, dans le génome des cellules de la plante hôte. Lorsque la cellule transformée est une cellule reproductrice, l'insertion peut être transmise à la descendance et ségréger de façon mendélienne. Ceci permet d'aboutir à la sélection d'individus mutants homozygotes. Les mutants peuvent ensuite être identifiés grâce aux FST (Flanking Sequence Tag) qui correspondent aux séquences nucléotidiques bordant directement le site d'insertion de l'ADN-T dans le génome nucléaire. Par analyse *in silico*, on localise ainsi très facilement, en lien avec la séquence nucléaire, le site d'insertion de l'ADN-T dans le génome de la plante. Les principales banques de mutants

d'insertion d'*Arabidopsis* sont la banque américaine SALK, la banque allemande GABI, ou celle de l'INRA de Versailles en France. Notre laboratoire possède une forte expertise dans l'utilisation d'*Arabidopsis thaliana* en tant qu'outil de génétique inverse pour l'étude du métabolisme de l'amidon. Nous étudions ainsi les fonctions biologiques des différentes familles d'enzymes du métabolisme du polymère de réserve, et nous déterminons les niveaux de redondance fonctionnelle ou les interactions entre isoformes par l'étude de combinaisons de mutations.

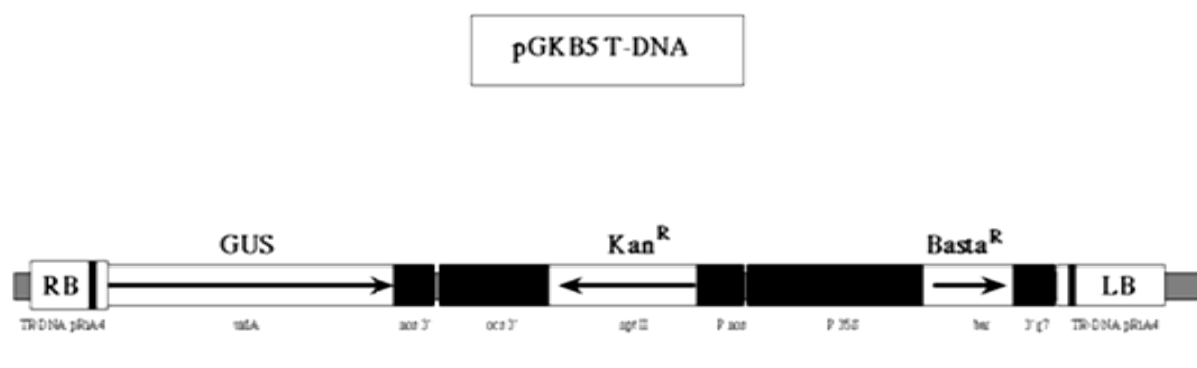


Figure 21 : Représentation schématique de l'ADN-T utilisé à l'INRA de Versailles pour la constitution d'une collection d'environ 50000 mutants. RB et LB : bordures conservées de l'ADN-T, nécessaires à la mobilisation et à l'intégration dans le génome nucléaire de la cellule hôte. GUS : gène rapporteur de la β -glucuronidase. Kan^R : gène de résistance à la kanamycine. Basta^R : gène de résistance à l'herbicide Basta.

V. Objectifs de la thèse

Pour les raisons évoquées dans le chapitre précédent, *Arabidopsis thaliana* est un modèle efficace pour l'étude du métabolisme de l'amidon par génétique inverse. Le génome d'*Arabidopsis* contient, de plus, les séquences codant les cinq isoformes fonctionnelles d'amidon-synthétases identifiées chez les végétaux (les informations concernant ces séquences sont présentées dans le tableau 1).

Nous disposions déjà au laboratoire, de lignées d'*Arabidopsis* spécifiquement déficientes pour les quatre isoformes d'amidon-synthétases solubles, ainsi que d'une lignée double mutante *ss1- ss3-*. Nous nous sommes procuré une lignée mutée dans le gène de structure de la GBSS1, et avons construit par croisement les combinaisons mutantes suivantes : *ss1- ss2-*, *ss1- ss4-*, *ss2- ss4-*, *ss1- ss2- ss3-*, *gbss1- ss2-*, *gbss1- ss3-* et *gbss1- ss4-*.

Tableau 1 : Résumé des informations concernant les séquences d'amidon-synthétases présentes dans le génome d'*A. thaliana*.

Nom de gène	<i>GBSSI</i>	<i>SSI</i>	<i>SS2</i>	<i>SS3</i>	<i>SS4</i>
Nomenclature AGI	At1g32900	At5g24300	At3g01180	At1g11720	At4g18240
Numéro d'accèsion	AC006424	AB006701	AC008261	AC007296	AL161548
Localisation de l'ORF	43039-40115	54498-58424	31487-34709	38926-34597	49502-54325
Chromosome	I	V	III	I	IV
Nombre d'introns	12	15	8	14	16
Isoformes	GBSSI	SS1	SS2	SS3	SS4

L'objectif de ce travail consistait en outre à analyser les phénotypes de chaque lignée, en termes de modification des activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon, de quantités d'amidon accumulé et de structure de l'amylopectine. Les résultats obtenus seront organisés et présentés en trois parties :

- Le premier point concerne l'évaluation des interactions et niveaux de redondance pouvant exister entre les isoformes SS1, SS2 et SS3 dans l'allongement des différents types de glucanes de l'amylopectine. Nous avons, pour cela, étudié les doubles mutants *ss1- ss2-*, *ss1- ss3-* et *ss2- ss3-*. L'étude du mutant *ss2- ss3-* a été menée en collaboration avec l'équipe du Pr. Alan Myers de l'« Iowa State University ». Les résultats obtenus font partie d'un article publié dans la revue « BMC Plant Biology » et seront présentés en Anglais. Les résultats concernant l'analyse des lignées *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* n'ont pas encore fait l'objet d'une publication dans une revue scientifique et seront présentés en Français.

- La deuxième partie du travail concerne l'étude de l'implication de la SS3 et de la SS4 dans l'initiation de la biosynthèse d'amidon. Nous avons produit et analysé, en collaboration avec l'équipe du Dr. Angel Merida de l'IBVF de Séville, les lignées doubles mutantes *ss1- ss4-*, *ss2- ss4-* et *ss3- ss4-* ainsi que les lignées triples mutantes *ss1- ss2- ss4-* et *ss1- ss2- ss3-*. Nous avons de plus, contribué à la caractérisation enzymatique de la SS4 recombinante produite chez *E.coli*. Ces résultats, obtenus à Lille, ou à Séville au cours de séjours pré-doctoraux, ont fait l'objet d'un article en collaboration accepté pour publication dans la revue « The Plant Cell ». Ils seront présentés en Anglais sous forme de manuscrit.

- Enfin, nous avons construit et analysé les lignées doubles mutantes *gbss1- ss2-*, *gbss1- ss3-* et *gbss1- ss4-* afin d'étudier l'impact de la mutation au locus *GBSS-1* sur le phénotype des simples mutants *ss2-*, *ss3-* et *ss4-*, et de rechercher l'existence d'interactions fonctionnelles.

A la lumière de ces résultats, les spécificités de chaque isoforme, ainsi que les interactions fonctionnelles et redondances seront discutées.

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

1. Produits

L'ADP [$U-^{14}C$] Glucose, le Glucose-1-phosphate [$U-^{14}C$], la résine de sepharose CL-2B et le percoll proviennent de Amersham Biosciences (Orsay, France). L'ADP-Glucose, le glycogène de foie de lapin et l'amidon de chez Sigma. Les kits de dosage de l'amidon sont obtenus chez Enzytec (Toulouse, France). L'amylopectine provient de chez Fluka. Le pullulan, les dextrines β -limites, et les kits de dosages des α et β -amylases de chez Megazyme (Irlande).

2. Lignées d'*Arabidopsis thaliana*

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 GABI. Les provenances de chaque lignée mutante sont détaillées en annexe.

3. Conditions de culture

Les graines sont stratifiées dans du phytigel 0,1 % pendant 48 h à 4 °C. Les plantes sont cultivées avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit en serre ou avec une photopériode 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.

II. Méthodes

1. Méthodes de biologie moléculaire

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. 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 μ L de tampon d'extraction (Tris/HCl 100 mM pH 8 ; EDTA 20 mM pH8 ; NaCl 1,4 M ; CTAB 2 % ; (32 μ L de β -mercaptoéthanol sont ajoutés à 50 mL de tampon juste avant utilisation), le mélange est incubé 30 min à 60°C. Une centrifugation (15 min à 4 °C et à 10000 g) est effectuée après l'ajout de 400 μ L de chloroforme. Le surnageant est récupéré et l'ADN précipité par 300 μ L d'isopropanol. Une centrifugation de 30 min à 4°C à 10000 g permet de culotter l'ADN qui sera ensuite rincé par 1 mL d'éthanol 70 %. Après avoir fait sécher le culot, celui-ci est repris dans 50 μ L d'eau contenant de la RNaseA (Sigma) à 1 μ g/mL.

c. 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 μ M d'amorces sens et antisens, 200 μ M de dNTP et une unité de Taq DNA polymérase (Promega), dans les conditions suivantes : 2 min à 95°C ; 35 cycles (1 min à 95°C, 30 sec à 55°C, 1 min à 72°C) ; 10 min à 72°C.

Les séquences des amorces utilisées pour la sélection de chaque lignée mutante sont présentées en annexe.

d. Analyse de la transcription des gènes mutés par RT-PCR

Environ 200 mg de tissus frais sont récoltés en milieu de photopériode et utilisés pour l'extraction des ARN totaux à l'aide du kit Plant Rneasy (Qiagen), selon les instructions du fournisseur. Environ 20 ng d'ARN sont utilisés pour les expériences de RT-PCR, réalisées à l'aide du kit One Step RT-PCR (Qiagen).

2. Dosages d'activités enzymatiques in vitro

a. Dosage de l'activité des enzymes de branchement

L'activité des enzymes de branchement est mesurée en quantifiant l'incorporation de Glc-1-P marqué au ^{14}C sur une matrice polysaccharidique via la synthèse de maltooligosaccharides par la phosphorylase a. 100 mg de protéines sont incubés 30, 45 et 60 min à 30 °C en présence de 50 mM de Glc-1-P (50 dpm / nmol) et de 3,2 unités de phosphorylase a dans un volume final de 200 mL du tampon suivant : citrate de sodium 0,1 M pH 7, AMP 1 mM. La réaction est arrêtée par chauffage 5 min à 100 °C et 100 μL de glycogène à 1 % sont ajoutés. Les polysaccharides sont précipités dans 1 mL de mélange méthanol 75 % / KCl 1 %. Après centrifugation 5 min à 13000 t/min, le précipité est lavé 3 fois avec le mélange cité avant. Le précipité est resuspendu dans 100 μL d'eau, déposé dans une fiole de comptage avec 4 mL de liquide à scintillation et la radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation.

b. Dosage de l'activité des amidons synthétases solubles

L'activité des amidon-synthétases solubles est mesurée par quantification de l'incorporation de Glc marqué au ^{14}C sur une matrice polysaccharidique. 125 μg de protéines sont incubés 30 min à 30 °C en présence de 1 mM d'ADP-Glc (3,7 GBq/mol) et de glycogène 1 %, dans un volume final de 100 μL du tampon suivant : tricine 100 mM pH 8, acétate de potassium 25 mM, citrate de sodium 0,5 M, EDTA 5 mM, DTT 10 mM, BSA 0,05 %. La réaction est arrêtée par chauffage 5 min à 100 °C. Les polysaccharides sont précipités dans 1 mL de mélange méthanol 75 % / KCl 1 %. Après centrifugation 5 min à 13000 t/min, le précipité est lavé 3 fois avec le mélange. méthanol 75 % / KCl 1 % Le précipité est resuspendu dans 100 μL d'eau, déposé dans une fiole de comptage avec 4 mL de liquide à scintillation et la radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur à scintillation.

c. Dosage de l'activité pullulanase

L'activité pullulanase est déterminée par la mesure des groupes réducteurs libérés après incubation d'un extrait protéique en présence de pullulan. 0,2 g de feuilles sont broyées dans 200 μL de tampon MOPS 100 mM pH 7,2 ; MgCl_2 2 mM, DTT 10 mM, éthanediol 10 %. A 50 μL d'extrait, sont ajoutés 200 μL d'une solution de pullulan à 25 mg / mL, DTT 10 mM, MOPS 37,5 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.

d. Dosage de l'activité de l'ADP-Glc pyrophosphorylase

L'activité ADP-Glc pyrophosphorylase est mesurée dans le sens de la dégradation de l'ADP-Glc en ATP et en Glc-1-P. 100 μ L d'extrait protéique sont incubés 30 min à 30 °C en présence d'ADP-Glc 1 mM, de NADP 0,25 mM, de PPi 1 mM et de Glc-1,6-diP 0,05 mM dans un volume final de 1 mL du tampon suivant : GlyGly/NaOH 80 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 60 mM, NaF 10 mM. Si nécessaire, du 3-PGA à une concentration de 3 mM est ajouté au mix réactionnel. La réaction est arrêtée par chauffage à 100 °C pendant 5 min et le Glc-1-P libéré est dosé par conversion en Glc-6-P (ajout de 2 U de phosphoglucomutase), puis quantification de ce dernier (tampon Triéthanolamine pH 7,6, 1,5 mM NADP, 5 mM ATP, 11 mM MgSO₄, et 1 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase (Enzytec)).

e. Dosage de l'activité α -amylasique

L'activité α -amylasique est mesurée à l'aide d'un kit de dosage basé sur la méthode CERALPHA (Megazyme). 100 μ L d'extrait protéique préparé suivant les instructions du fabricant sont incubés 20 min à 40 °C, en présence de 100 μ L 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 libéré au cours de la réaction.

f. 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 (Enzytec, Toulouse, France).

g. Dosage des activités amidon-phosphorylases

Les activités amidon-phosphorylases sont déterminées par mesure du Glc-1-P libéré, sous l'action de l'extrait enzymatique sur de l'amylopectine en solution. 50 μ L d'extrait protéique sont incubés 1 h à 30 °C en présence d'amylopectine 2,5 mg / mL ; de NADP 2,7 mM et de Glc1,6diP 4 μ M ; dans un volume final de 1 mL du tampon suivant : MOPS 20 mM pH 7 ; NaP 20 mM ; $MgCl_2$ 10 mM. La réaction est arrêtée par chauffage à 100 °C pendant 10 min et le Glc-1-P libéré est dosé comme décrit précédemment (voir 2.d Dosage de l'activité pyrophosphorylase).

h. Dosage des activités amidon-synthétases liées au grain d'amidon

500 μ g d'amidon, extrait comme décrit dans le point 3.b, sont resuspendus dans 100 μ L du mix suivant : GlycylGlycine / NaOH 100 mM pH 8,5 ; acétate de potassium 25 mM, DTT 10 mM, EDTA 5 mM, ADP[U- ^{14}C]Glucose 10 mM (activité spécifique de 7,4 GBq/mol). Le point t0 est réalisé en faisant bouillir l'échantillon pendant 10 min. Les autres échantillons sont incubés 30 min puis la réaction est arrêtée par ébullition pendant 10 min. L'amidon est lavé 3 fois avec une solution de méthanol 70 %, KCl 1 % et la radioactivité incorporée dans l'amidon est mesurée avec un compteur à scintillation.

3. Zymogrammes

a. Zymogramme des activités amidon-synthétases

100 μ g de protéines provenant d'un extrait cellulaire de feuilles sont déposés sur le gel contenant 0,3% (p/v) de glycogène de foie de lapin, ou aucun substrat (pour visualiser les activités d'amorçage). Après la migration (15 V.cm⁻¹ pendant 2h30 à 4°C), le gel (7,5% (p/v) pour le gel de séparation et 4% (p/v) pour le gel de concentration, respectivement tamponnés par le Tris/HCl 125 mM pH 6,8 et par le Tris/HCl 375 mM pH 8,8) est incubé toute la nuit en présence de Glygly/NaOH 50 mM pH 9.0, (NH₄)₂ SO₄ 100 mM, β -mercaptoethanol 5 mM, $MgCl_2$ 5 mM, BSA 0,25 g/L, ADP-Glc 1 mM (L'absence de malto-oligosaccharides dans la source d'ADP-Glucose est vérifiée par MALDI-TOF). Les activités amidon-synthétases sont révélées par coloration à l'iode.

b. Zymogramme des activités modifiant l'amidon

Le gel est préparé comme précédemment avec 0,3% d'amidon soluble de pomme de terre (Sigma), et les mêmes quantités de protéines sont déposées. Les conditions de migration sont identiques à celles décrites ci-dessus. Après migration, le gel est incubé une nuit en présence de

Tris/HCl 100 mM pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM. Les activités modifiant l'amidon sont révélées par coloration à l'iode.

c. Zymogramme des activités modifiant les dextrines β -limites

La méthode est identique à celle présentée dans le point 3.b. Le gel contient 0,3 % de dextrines β -limites (Megazyme).

d. Zymogramme des activités amidon-phosphorylases

Le gel contient 0,45% de glycogène de foie de lapin ou 0,2% d'amidon de pomme de terre. Il est tamponné par le Tris/HCl 110 mM pH 7,2. Le gel de concentration à 2,5% final en monomère est tamponné par le Tris/H₃PO₄ 60mM pH 7,3. Le tampon de migration utilisé pour l'électrophorèse est le Glycine/Tris 40 mM pH 8,5. A 100 μ g d'extrait protéique sont ajoutés 10 μ L de Tris/H₃PO₄ 60 mM pH 7.3 et 20 μ L de tampon de chargement : saccharose 25% (p/v), bleu de bromophénol 0,001%. La migration se déroule à 4°C durant 2h30 à 15 mA et 250V. A l'issue de celle-ci, le gel est équilibré dans le Citrate/NaOH 100 mM pH 7.0 pendant 10 min. avant d'être incubé une nuit à température ambiante dans le citrate/NaOH 100 mM pH 7.0, G1P 20 mM. Les activités sont révélées par coloration à l'iode.

e. Zymogramme des activités phosphoglucomutases

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

f. Zymogramme des activités pullulanases

La méthode est identique à celles présentées dans les points 3.b et 3.c pour les zymogrammes des activités modifiant l'amidon et les dextrines β -limites. Le gel contient 0,3 % de « red pullulan » (Megazyme).

4. Méthodes biochimiques

a. Dosage de la quantité d'amidon

Environ 0,2 g de feuilles sont décolorés dans l'éthanol 80 % par chauffage à 70 °C pendant 15 min. L'opération est répétée trois fois pour que la décoloration soit totale, puis les feuilles sont broyées dans 2 mL de KOH 0,2 N et le broyat est chauffé 30 min à 100 °C. Après une centrifugation à 10000 t / min pendant 15 min, 1 mL d'acide acétique 1 N est ajouté au surnageant. La quantité de Glc est enfin mesurée à l'aide du kit de dosage à l'amyloglucosidase (Enzytec).

b. Extraction et purification 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 t / min 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 t / min et à 4 °C pendant 40 min (l'opération peut être répétée si nécessaire). 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 %.

c. 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. Au surnageant sont ajoutés 200 µL du mélange suivant : KOH 2 M, MES 0,4 M, KCl 0,4 M. Le mélange est centrifugé 15 min à 20000 g et à 4°C. La quantité de polysaccharides est déterminée par dosage du glucose (kit Enzytec) libéré après digestion par l'amyloglucosidase.

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

1,5 g d'amidon sont dispersés dans 200 µL de DMSO 100 % à 100 °C. Le polysaccharide est ensuite précipité par l'ajout de 800 µL d'éthanol et incubation pendant 2 heures à -20 °C. Après centrifugation 10 min à 13000 t/min et à 4 °C, le culot d'amidon est repris dans 500 µL de NaOH 10 mM et déposé sur une colonne de Sépharose Cl-2B. Des fractions de 300 µL sont collectées avec un débit de 12 mL/h et chaque fraction est analysée indépendamment après ajout de lugol à raison de 20 µL pour 80 µL d'éluat. Les concentrations en amylose et amylopectine sont mesurées par la méthode

à l'amyloglucosidase après regroupement des fractions correspondant à chacun des deux polysaccharides.

e. Analyse de la distribution de longueur de chaînes des polysaccharides par électrophorèse capillaire ou HPAEC-PAD

L'amylopectine purifiée sur colonne de Sépharose Cl2B est dialysée contre de l'eau une nuit à 4 °C, puis lyophilisée. Le polysaccharide est ensuite repris dans 500 µL d'acétate de sodium 55 mM pH 3,5 puis débranché par ajout de 16 unités d'isoamylase (megazyme) et incubation à 42 °C pendant une nuit. 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. 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^e, puis injecté.

f. Production des β-limite dextrines de l'amylopectine

L'amylopectine purifiée sur colonne de Sépharose Cl2B est dialysée contre de l'eau une nuit à 4 °C, puis lyophilisée. Le polysaccharide est ensuite repris dans 500 µL d'acétate de sodium 55 mM pH 3,5 et incubé 4h à 30°C en présence de 17 unités de β-amylase (Sigma). Pour s'assurer que la digestion est complète, 17 unités de β-amylase sont ajoutées, et l'échantillon est incubé toute la nuit. Après 5 min à 100 °C, l'échantillon est débranché par ajout de 16 unités d'isoamylase (megazyme) et incubation à 42 °C pendant une nuit. L'échantillon est ensuite dessalé sur une colonne de Carbograph « Extract-clean » (Alltech, USA) puis analysé par HPAEC-PAD.

g. 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.

h. 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 Pohu et coll., 2004.

i. Extraction des protéines liées au grain d'amidon

1 mg d'amidon est incubé à 100 °C pendant 10 min dans 40 µL de tampon d'extraction (850 µL d'eau, 100 µL SDS 20%, 50 µL β-mercaptoéthanol). Après centrifugation (10 min), le surnageant est recueilli. L'extraction est répétée avec 30 µL de tampon et les deux surnageants sont poolés.

j. Western blot et SDS-PAGE

Les échantillons de protéines sont repris dans du tampon Laemli et mis à bouillir pendant 5 min. 25 µL sont déposés sur un gel SDS-PAGE 10 %. 5 µL de témoin de masse (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas) sont déposés pour suivre la migration qui se fait à 35 mA dans un tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 % pendant 1h30. Les gels SDS-PAGE ont été colorés au bleu de Coomassie (1g de bleu de Coomassie, 120 mL d'acide acétique, 120 mL de méthanol, 120 mL H₂O), au nitrate d'argent (Rabilloud et al., 2001), ou utilisés pour le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (une nuit, 4°C, 20 V). Après transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, la membrane est saturée 45 min avec du lait 4 % / TBS-Tween 0,05 %. Celle-ci est ensuite incubée 1h30 avec l'anticorps primaire dilué dans du lait 4 % / TBS-Tween 0,05 %. La membrane est lavée 3 fois pendant 10 min avec du tampon TBS-Tween 0,05 % puis incubée 1h avec un anticorps secondaire dilué dans du lait 4 % / TBS-Tween 0,05 % (pour la production de l'anticorps anti-GBSS1, voir Wattebled et al., 2002). Après 2 lavages de 10 min avec du TBS-Tween 0,05 %, la membrane est révélée avec le kit ECL (Enhanced ChimioLuminescence) (Amersham).

RESULTATS

Partie 1 :

Etude des interactions et niveaux de redondance entre les isoformes SS1, SS2 et SS3 dans l'allongement des différentes classes de glucanes de l'amylopectine

Contribution au travail

Dans ce chapitre, nous présentons l'analyse des combinaisons mutantes *ss1- ss2-*, *ss1- ss3-*, *ss2- ss3-* et *ss1- ss2- ss3-*, ainsi que des simples mutants correspondants. Nous avons construit et analysé ces lignées afin d'étudier d'éventuels phénomènes de redondance ou interaction fonctionnelle entre les isoformes d'amidon-synthétases solubles SS1, SS2 et SS3.

Une partie de ce travail est présentée sous forme d'un article publié dans *BMC Plant Biology* en 2008 pour lequel je suis deuxième auteur. Il concerne l'étude de la mutation *ss2-* et la caractérisation du double mutant *ss2- ss3-*, que nous avons effectuées en collaboration avec l'équipe du Pr. Alan Myers de « l'Iowa State University ». J'ai contribué à ce travail en réalisant l'étude phénotypique de l'allèle *Atss2-3*, en termes de quantité d'amidon accumulé, de composition de l'amidon et de distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine. J'ai par ailleurs réalisé les dosages d'activité des enzymes du métabolisme de l'amidon dans la lignée double mutante *ss2- ss3-*.

La seconde partie de ce travail a été réalisée à l'UGSF de Lille, et à l'IBVF de Séville et porte sur la construction et l'analyse des doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*. J'ai contribué à ce travail en produisant la lignée *ss1- ss2-* et en étudiant le phénotype des deux doubles mutants. Les analyses de l'amidon par microscopie électronique ont été réalisées à l'INRA de Nantes par l'équipe du Dr. Véronique Planchot.

Enfin, la troisième partie du travail concerne l'étude de la composition et de la structure de l'amidon d'une lignée triple mutante *ss1- ss2- ss3-*, que j'ai effectuée à l'UGSF.

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

Xiaoli Zhang^{1,2}, Nicolas Szydlowski³, David Delvallé³, Christophe D'Hulst³, Martha G. James¹, Alan M. Myers^{1,§}

¹ Department of Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, Iowa, USA,

² Current address: The Ohio State University, Center for Biostatistics, M200 Starling Loving Hall, 320 W. 10th Avenue, Columbus, OH 43210, ³ Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 du CNRS, IFR 147, Bâtiment C9, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Abstract

Background: The biochemical mechanisms that determine the molecular architecture of amylopectin are central in plant biology because they allow long-term storage of reduced carbon. Amylopectin structure imparts the ability to form semi-crystalline starch granules, which in turn provides its glucose storage function. The enzymatic steps of amylopectin biosynthesis resemble those of the soluble polymer glycogen, however, the reasons for amylopectin's architectural distinctions are not clearly understood. The multiplicity of starch biosynthetic enzymes conserved in plants likely is involved. For example, amylopectin chain elongation in plants involves five conserved classes of starch synthase (SS), whereas glycogen biosynthesis typically requires only one class of glycogen synthase.

Results: Null mutations were characterized in *AtSS*, which codes for SSII, and mutant lines were compared to lines lacking SSIII and to an *Atss*, *Atss* double mutant. Loss of SSII did not affect growth rate or starch quantity, but caused increased amylose/amylopectin ratio, increased total amylose, and deficiency in amylopectin chains with degree of polymerization (DP) to DP. In contrast, loss of both SSII and SSIII caused slower plant growth and dramatically reduced starch content. Extreme deficiency in DP to DP chains occurred in the double mutant, far more severe than the summed changes in SSII- or SSIII-deficient plants lacking only one of the two enzymes.

Conclusions: SSII and SSIII have partially redundant functions in determination of amylopectin structure, and these roles cannot be substituted by any other conserved SS, specifically SSI, GBSSI, or SSIV. Even though SSIII is not required for the normal abundance of glucan chains of DP12 to DP18, the enzyme clearly is capable of functioning in production such chains. The role of SSIII in producing these chains cannot be detected simply by analysis of an individual mutation. Competition between different SSs for binding to substrate could in part explain the specific distribution of glucan chains within amylopectin.

Background

Insoluble starch granules function as a central component of plant metabolism to store reduced carbon produced during photosynthesis. Starch is made up of two types of glucan homopolymer, amylose and amylopectin [1]. Amylose molecules typically comprise several thousand glucose units joined by α -(14) glycoside bonds, with a low frequency of branch points provided by α -(16) glycoside bonds. Amylopectin has a degree of polymerization (DP) on the order of 10 glucose units per molecule, and contains a relatively high frequency of branch linkages, approximately 5%. A specific distribution of α -(14)-linked glucan chain lengths, together with clustered positioning of α -(16) branch linkages, provides structure to amylopectin that allows crystallization and formation of insoluble starch granules [2-4]. The ability to crystallize in turn provides the functionality of starch because very large numbers of glucose units can be stored as an energy source to be used later when photosynthesis is not operative. Thus, an important objective towards the aim of fully understanding plant physiology is to determine how each of the enzymes involved in starch biosynthesis functions to produce a polymer with a crystallization-competent architecture.

Starch is produced by the coordinated actions of the following enzymes: 1) ADPGlc pyrophosphorylase (ADPGPP), which provides the nucleotide sugar donor ADPGlc ; 2) starch synthase (SS), which catalyzes the transfer of a glucosyl unit from ADPGlc to a growing polymer chain through an α -(1 $\rightarrow$ 4) glycoside bond ; 3) starch branching enzyme (SBE), which cleaves an internal α -(1 $\rightarrow$ 4) linkage and transfers the released linear chain to a C-6 hydroxyl, thus forming a new α -(1 $\rightarrow$ 6) branch point ; 4) starch debranching enzyme (DBE), which selectively hydrolyzes α -(1 $\rightarrow$ 6) linkages and has been proposed to provide an editing function in selection of branch points [5-8]. Most organisms outside the plant kingdom possess a single class of glycogen synthase (GS), in some instances comprising two closely related isoforms, which catalyzes the same glycosyl transferase reaction as the plant SSs. In contrast, a highly conserved feature of starch biosynthesis in

diverse plant species is the presence of five distinct classes of SS [9, 10], again often with multiple isoforms in each class. Each SS class is found in unicellular green algae and thus likely was established prior to the evolution of land plants [11]. Such conservation suggests that each SS is functionally significant for synthesis of granular starch as opposed to water-soluble glycogen, presumably through its influence on the architectural structure of amylopectin. Some functions of SSs with regard to amylopectin architecture are relatively well understood; however, for the most part their functional relationships to each other remain to be determined.

One SS is nearly exclusively granule-bound (GBSS), whereas the other four classes are distributed between granules and stroma (SSI, SSII) or are located nearly entirely in the stroma (SSIII, SSIV) [12-18]. Genetic evidence indicates that all five SSs have specific functions that cannot be provided by any other SS class. For example, elimination of GBSS by mutation or antisense gene expression conditions loss of the amylose component of starch granules without major effects on amylopectin [19, 20]. Thus, it appears that GBSS is specifically involved in amylose biosynthesis and that no other SS can provide this function. SSII deficiency in numerous species results in increased frequency of short glucan chains (DP6 to DP11) within amylopectin, decreased abundance of DP12 to DP25 chains, and in most instances an elevated amylose to amylopectin ratio [18, 21-27]. A possible explanation for these results is that SSII catalyzes formation of chains of DP12 - DP25, and that the other SS isoforms cannot fulfil this function. The uniformity of the SSII-mutant phenotype also indicates that the physiological function of SSII is conserved across plant species, in addition to the paralogous amino acid sequences.

Arabidopsis is useful as a model organism for study of SS function, as well as starch biosynthesis in general, owing to genome-wide reverse genetic resources that can provide null mutations in all of the individual enzyme classes. Using such tools the effects of eliminating either SSI, SSIII or SSIV on *Arabidopsis* leaf starch have been determined. Mutations that eliminate SSI cause decreased frequency of the shortest linear chains within amylopectin, of DP6 to DP12 [28]. Loss of SSIII causes increased frequency of long glucan chains greater than DP60 but has relatively little effect on the abundance of any chains less than DP50 [29]. SSIV deficiency did not cause any noticeable changes in amylopectin structure, however, this enzyme has a function in initiation of starch granule formation [30].

These unique phenotypes provide further evidence that each SS isoform serves a role in starch biosynthesis that cannot be supplied by any of the other enzyme classes. Genetic data alone, however, cannot fully determine the specific physiological functions of any enzyme because the

phenotypic effects on starch structure might not necessarily be direct. Such considerations are important in light of the findings that SSI, SSII, and SSIII from either wheat or maize are capable of assembling with each other into various multiple subunit complexes [31, 32]. Thus, analysis of plants lacking multiple SSs may be informative regarding the comprehensive mechanisms by which the chain length distribution within amylopectin molecules is determined. This approach has been reported previously using antisense technology to simultaneously repress the levels of 2 SSII and SSIII in potato tubers, and synergistic effects indicative of functional 3 interactions between the two enzymes were observed [22, 27]. *Arabidopsis* provides a tractable genetic system to further these studies owing to the ability to completely eliminate any SS class by null mutation and to couple these mutations in desired combinations by standard genetic manipulations. Also, studying SS functions in different organisms and in a transient starch system in leaves compared to storage starches in tubers or other tissues, likely will reveal conserved biochemical functions that are significant in determination of amylopectin structure.

In this study analysis of SS functions in *Arabidopsis* leaves was extended by characterization of mutations in *AtSS2*, the gene coding for SSII, and by construction of a double mutant line that is completely deficient in both SSII and SSIII activity. Loss of SSII in *Arabidopsis* has effects very similar to those observed in other species. Elimination of SSII and SSIII together causes synergistic defects more severe than those resulting from mutation of only one of the two enzymes with regard to starch content and amylopectin structure. Thus, designation of SS function based on particular chain length ranges synthesized by each enzyme class is not likely to fully explain the conservation of multiple SSs. The data suggest that competition between different SS enzymes for binding to the ends of growing linear chains is an additional factor important for the determination of amylopectin structure.

Results

Identification of null mutations in the gene coding for SSII

The *Arabidopsis* genomic locus At3g01180, hereafter referred to as *AtSS2*, codes for a protein highly similar in amino acid sequence to SSII proteins from rice, wheat, barley, pea, potato, and maize [21-26] that clearly falls into the conserved group of orthologous SSII genes distinct from any other SS [9-11]. Comparison of the genomic sequence to the corresponding cDNA sequence (Genbank accession number NM_110984) revealed that *AtSS2* comprises eight exons and seven

introns (Figure 1A). The 5'-untranslated region of the mRNA contains at least 168 nt upstream of the initiation codon. The computational programs ChloroP and TargetP [33, 34] predict that the first 55 amino acids of the polypeptide coded for by *AtSS2* are likely to function as a chloroplast targeting peptide, and the predicted molecular weight of the mature protein is approximately 81 kDa.

Three independent *Arabidopsis* lines with T-DNA insertion mutations in the *AtSS2* locus were identified. Two T-DNA insertion mutant lines, Salk_065639 and Salk_102650, were obtained from the Salk collection [35], and a third T-DNA insertion line, EIB123, was obtained from the T-DNA mutant collection at INRA of Versailles, France [36-38]. Thus, all subsequent analyses were performed independently in two different *Arabidopsis* wild type backgrounds, Columbia for the Salk lines and WS for the INRA Versailles line. The mutations in these lines were designated as *Atss2-1*, *Atss2-2*, and *Atss2-3*, respectively.

PCR amplification of genomic DNA was used to identify homozygous mutant lines for each allele. Gene specific primer pairs flanking the approximate site of the T-DNA insertion identified the wild type allele, and one gene specific primer in combination with a T-DNA end primer revealed the mutant allele (Figure 1A) (primer pair sequences for genotype assignment are specified in Methods). The nucleotide sequences of the fragments amplified by one gene specific primer and a T-DNA end primer were determined in order to identify the exact insertion sites. These results showed that the T-DNA element in *Atss2-1* is located in exon 2, and those in *Atss2-2* and *Atss2-3* are located at distinct sites in exon 8 (Figure 1A). Several successive generations of plants were genotyped by PCR analysis to confirm that each line was homozygous for its *Atss2* allele.

RT-PCR analysis was used to confirm that the three T-DNA insertion in the *AtSS2* locus effectively prevented expression of normal mRNA. For all three *Atss2* alleles, primers flanking the known insertion site failed to generate any RT-PCR signal, whereas the same primer set generated a fragment of the expected size from wild type mRNA (Figure 1B and data not shown). Thus, normal *AtSS2* transcripts are lacking in all three mutant lines. Some abnormal transcripts, however, do accumulate from the mutant genes. RT-PCR signal was detected when mRNA from an *Atss2-1* plant was amplified using primers located in the downstream region of the gene (Figure 1A, primer pair 2LP2/2RP2). Similarly, amplification of an upstream region was detected from mRNA of an *Atss2-2* plant (Figure 1A, primer pair 2LP1/2RP1) or an *Atss2-3* plant (Figure 1A, primer pair For51/Rev51) (Figure 1B).

In the case of *Atss2-1*, immunoblot analysis was used to determine whether the mutation

prevented accumulation of the protein product. Total soluble leaf extracts were first fractionated by anion exchange chromatography in order to partially purify SSII and thus facilitate its detection. Proteins in selected chromatography fractions were separated by SDS-PAGE and probed with a monoclonal antibody, referred to as α AtSSII, elicited using full-length recombinant *Arabidopsis* SSII as the antigen. Wild type extracts analyzed in this way revealed a signal at an apparent molecular mass of approximately 80 kDa (Figure 1C), which matches the predicted molecular mass for mature SSII after removal of the putative plastid targeting peptide. This band was not detected in the same chromatography fractions from *Atss2-1* homozygous mutant leaf extracts (Figure 1C). These results, together with the RT-PCR data, indicate that *Atss2-1* is a null allele in the sense that no detectable SSII protein is present in the homozygous mutant plants. *Atss2-2* and *Atss2-3* are also likely to be null alleles based on the demonstrated disruption of the mRNA structure.

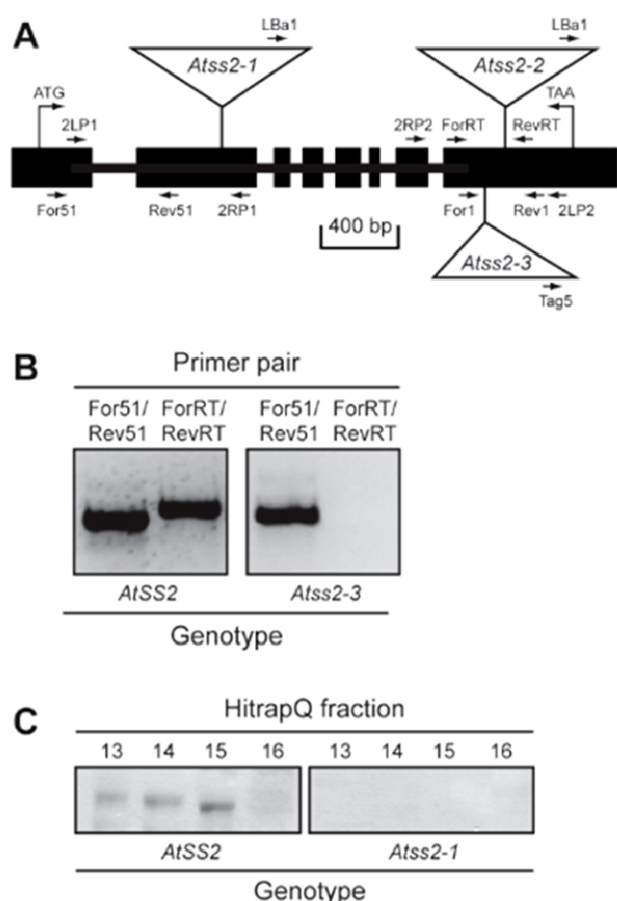


Figure 1 Gene structure and allele verification. **A**, *AtSS2* gene map. The scaled linear map depicts the eight exons as black boxes and the seven introns as lines between the exons. The positions of the translational start and stop codons are noted. The locations of specific primer sequences used for PCR amplification are noted, as well as the locations of three T-DNA insertions in the gene. **B**, RT-PCR analysis of transcripts from the *Atss2-3* mutant. Total RNA from leaves of WS wild type plants or the *Atss2-3* mutant was amplified by RT-PCR using the indicated primer pairs. **C**, Immunoblot analysis. Total soluble proteins from crude leaf extracts were separated by anion exchange chromatography, then selected fractions were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis using anti-AtSSII antibody.

Construction of an Atss2, Atss3 double mutant and analysis of plant growth phenotypes

A double mutant was generated in order to examine for possible synergistic effects of

simultaneous elimination of both SSII and SSIII. The particular alleles involved in the cross were *Atss2-1* (Figure 1A) and *Atss3-1*, previously shown to be a null mutation [29]. Double homozygous mutant lines were identified at approximately the expected Mendelian ratio among the progeny of a double heterozygote, using PCR analysis to assign genotypes.

Single and double mutant plants were compared to wild type with regard to seed germination rate, plant growth rate, flowering time, and silique formation. When grown under constant light or under a 16 h light /8 h dark long day photoperiod (LD), no significant differences were noted between wild type, *Atss2* single mutants, *Atss3* single mutants, or the *Atss2*, *Atss3* double mutant plants (data not shown). In contrast, when plants were grown under a 8 h light/16 h dark short day photoperiod (SD), a significantly reduced growth rate was observed uniformly for every *Atss2*, *Atss3* double mutant tested as compared to wild type or either single mutant line (Figure 2). One double homozygous mutant line was characterized by RT-PCR to confirm that the normal mRNA for both of the genes was absent (data not shown), and this particular *Atss2*, *Atss3* line was used in all further analyses.



Figure 2: Plant growth phenotype. Plants of the indicated genotype were germinated in soil in a growth room under long day conditions (16 h light/8 h dark). Small plants were then transferred to pots and grown in a growth chamber under short day conditions (8 h light/16 h dark) for three weeks.

Effects of mutations on SS activity and other starch metabolizing enzymes

Two-dimensional zymograms were used to determine the effects of the SSII single mutations and the SSII/SSIII double mutation on specific SS enzyme activities. Soluble leaf extracts were fractionated by anion exchange chromatography, and equal volumes of selected fractions were loaded onto non-denaturing PAGE gels containing 0.33% glycogen. After electrophoresis, the gels

were incubated in a buffer containing ADPGlc and glycogen, and then stained with I2/KI solution. Gel zones that contain an active SS stain dark brown in these assays because the enzyme lengthens exterior glucan chains on the glycogen substrate. Two major SS activity bands were observed in wild type leaf extract (Figure 3). The more slowly migrating band was previously identified as SSIII [29]. The faster migrating band was identified as SSI based on its absence from *Atss1* mutants [28]. The minor band visible below the major SSI band in the double mutant (Figure 3) also requires a functional *AtSSI* gene (data not shown) and thus is identified as a form of that enzyme. The faint band visible in fractions 18 and 19 in the analysis of wild type and the *Atss2-1* mutant in Figure 3 is not an SS activity because it appears even when ADPGlc is omitted from the incubation medium [29].

As expected SSIII was missing in the *Atss2-1*, *Atss3-1* double mutant (Figure 3). No difference was observed in the SS activity pattern between the *Atss2-1* line and wild type (Figure 3), and the wild type pattern was also observed for the *Atss2-2* mutant (data not shown). The zymogram was also performed on total soluble leaf extract, i.e., without prior anion exchange fractionation, and again both *Atss2* mutants exhibited the same pattern as wild type (data not shown). Therefore, SSII either is present in very low abundance in leaf extracts, or the zymogram assay is ineffective in detecting this particular SS form as compared to SSI or SSIII.

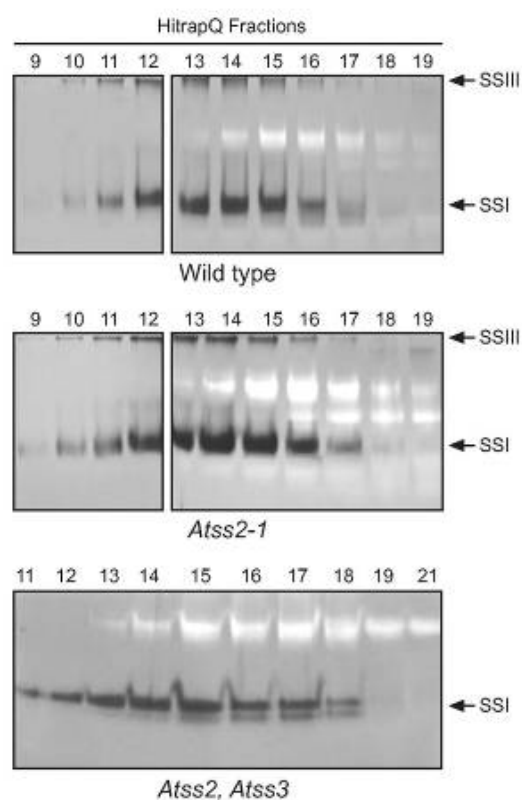


Figure 3: SS activities observed by two dimensional zymogram. Soluble leaf extracts from plants of the indicated genotype were separated by anion exchange chromatography followed by native PAGE in the presence of 0.3% glycogen. SS activity was then qualitatively assayed in place in the gel by addition of ADPGlc and subsequent staining with I2/KI solution.

Total soluble SS activity in soluble leaf extracts was measured in the various mutant strains by an in vitro assay using C-ADPGlc as a substrate. Total SS activity was not significantly decreased in *Atss2* mutant plants or the *Atss2*, *Atss3* double mutant compared to wild type control lines (Table 1). The reason that eliminating two of the three major soluble SS classes does not affect total enzyme activity in the leaf extracts is not obvious, however, the explanation may involve increased SSI activity in the absence of the other SSs. This situation has been observed in other species, specifically maize and rice, where elevation of SSI activity in extracts lacking SSIII compared to wild type has been described previously [13, 39, 40].

Table 1: Starch metabolic enzyme activities in soluble leaf extracts

Enzyme	Activity by genotype			
	Wild type	<i>Atss2-1</i>	<i>Atss3-1</i>	<i>Atss2/Atss3</i>
SS ^a	212 ± 8.66 (4)	237 ± 8.74 (4)	265 ± 18.6 (4)	190 ± 8.78 (4)
SS	9.24 ± 0.80 (2)	9.19 ± 0.16 (2)	9.82 ± 0.07 (2)	9.85 ± 0.41 (2)
SBE ^b	50.3 ± 7 (1)	52.6 ± 9.9 (1)	45.8 ± 5.7 (1)	51.5 ± 10.0 (1)
ADPGPP	15.5 ± 3.8 (3)	19.9 ± 3.1 (3)	14.5 ± 2.4 (3)	14.5 ± 2.5 (3)
ADPGPP + 3PGA	35.3 ± 1.8 (3)	33.7 ± 4.0 (3)	22.1 ± 6.9 (3)	23.2 ± 13.0 (3)
α-amylase	32.6 ± 2.0 (3)	33.7 ± 3.4 (3)	35.5 ± 1.3 (3)	44.1 ± 3.7 (3)
β-amylase	191 ± 27 (3)	237 ± 46 (3)	259 ± 22 (3)	243 ± 30 (3)
Pullulanase-type DBE	8.40 ± 1.7 (3)	15.4 ± 1.8 (3)	2.06 ± 0.34 (3) ^c	3.90 ± 1.9 (3)
DE	25.6 ± 5.8 (3)	29.3 ± 3.0 (3)	30.4 ± 0.65 (3)	32.8 ± 1.8 (3)
Maltase	42.5 ± 4.7 (3)	37.6 ± 0.59 (3)	40.5 ± 4.9 (3)	38.5 ± 9.8 (3)
SP ^b	1.34 ± 0.20 (1)	2.86 ± 0.22 (1)	0.70 ± 0.35 (1)	0.97 ± 0.08 (1)

Unless otherwise noted, units are nmol product/min/mg protein. Values in parentheses indicate the number of independent biological replicates used to generate the mean and standard error values indicated.

Abbreviations are as follows: DE: disproportionating enzyme; SP, starch phosphorylase; ADPGPP: ADPGlc pyrophosphorylase; DBE: starchdebranching enzyme; 3PGA: 3-phosphoglycerate.

^a SS activity was measured independently in two completely separate sets of assays. For the assays in this row only the units are nmol glucose incorporated /g FW/min.

^b The values for SP and BE activity were determined by triplicate measurements from a single plant extract. ^c Value is significantly different from wild type after Dunnet's adjustment for multiple comparisons. Unless so indicated, values are not significantly different from wild type.

Two dimensional starch zymogram analysis [41] was used to examine whether the mutations pleiotropically affect BE, DBE, or amylolytic activities. Anion exchange column fractions were separated by non-denaturing PAGE, and then the gels were electro-blotted to a second polyacrylamide gel impregnated with 0.3% starch. After incubation the gels were stained with I2/KI solution, so that colored bands above the dark background revealed the presence of starch modifying enzymes. No differences in the banding pattern were observed between the wild type and mutant lines for the isoamylase-type DBEs, BEs, or amylolytic activities detected in this assay (Figure 4 and data not shown).

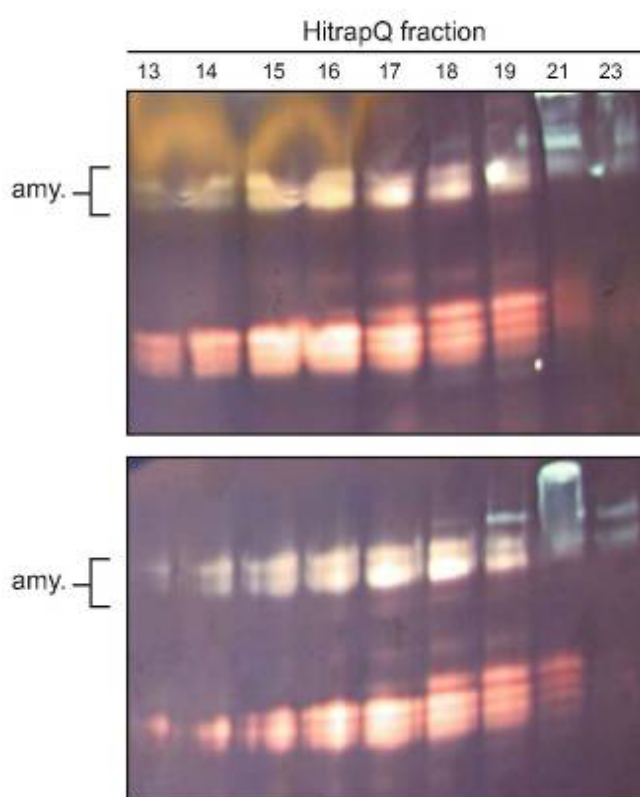


Figure 4: Starch modifying activities observed by two dimensional zymogram. Proteins in total soluble leaf extracts were separated by anion exchange chromatography and then by native PAGE. The proteins in these gels were transferred to a second polyacrylamide gel containing 0.3% potato starch. Gels were then stained with I2/KI solution.

Other starch metabolic enzymes were characterized by standard biochemical assays of total soluble leaf extracts, again to examine for major pleiotropic effects that could affect phenotype (Table 1). Only minor changes likely due to statistical variation were observed for total BE activity, ADPGPP (particularly in the absence of 3-PGA as an activator), α -amylase, β -amylase, disproportionating enzyme (DE), and maltase. Potentially significant changes were observed in the mutants with regard to pullulanasetype DBE and starch phosphorylase (SP), although the nature of these changes requires further investigation. Taken together the data indicate that the phenotypic

effects of *Atss2* mutation and *Atss2*, *Atss3* double mutation likely result directly from the effects on SS as opposed to pleiotropic effects on other starch metabolic enzymes.

Effects of mutations on glucan and sugar content

Starch content was examined in leaves from the various mutants harvested throughout the diurnal cycle. As a first approximation, leaves collected at the end of the light phase of the LD cycle were decolorized by boiling in ethanol and then stained with I2/KI solution. In this assay there was no difference in the apparent starch content between wild type and *Atss2* mutants, and the previously reported increase in staining intensity in the *Atss3* mutants [29] was again observed (data not shown). In contrast to the single mutants, the *Atss2*, *Atss3* double mutant appeared to contain very low amounts of starch as detected by staining of leaves with iodine (Figure 5A).

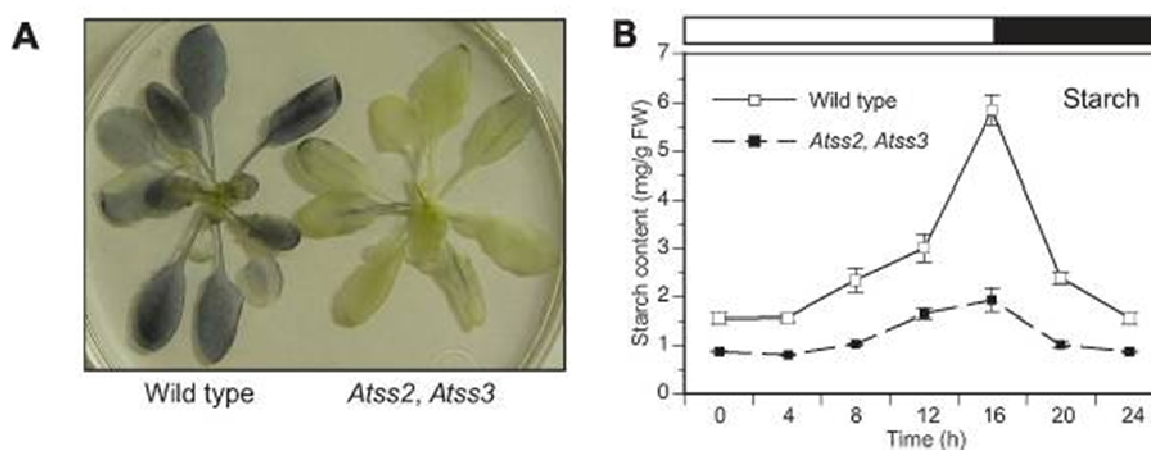


Figure 5: Glucan content. **A**, Iodine staining. Leaves were harvested at the end of the light phase from plants of the indicated genotype grown for several weeks in long day growth room conditions. These leaves were then decolorized, stained with I2/KI solution, and destained for 5 - 10 min in water. **B**, Starch quantification. Starch was isolated from leaves of plants grown under long day growth room conditions, harvested at specific times in the 16 h light/8 h dark diurnal cycle. Granules were collected by low-speed centrifugation and the glucan content in the pellet quantified. Each point is the average of leaves from six individual plants, and standard error is indicated.

Starch content was quantified by chemical assay in leaves collected at the end of the light phase in plants grown in either the LD diurnal cycle, when all the mutant plants appear to grow at the same rate as wild type, or the SD cycle when the double mutant lacking both SSII and SSIII exhibits a clear growth defect. The results confirmed that *Atss2* mutations do not cause a major change in leaf starch content and that in these growth conditions the *Atss3* mutation conditions an apparent increase in starch content (Table 2), in agreement with previously published results [29]. The major decrease in starch content seen by leaf staining in the *Atss2*, *Atss3* double mutant was also detected with clear

statistical significance in the quantitative assay (Table 2) in either LD or SD growth conditions. In these two growth conditions the double mutant contained 28% or 53%, respectively, of the wild type starch content.

Table 2: Carbohydrate content

Genotype	Starch		WSP ^a		Sucrose	Glucose	Fructose
	LD	SD	LD	SD	SD	SD	SD
WT ^b	5.54 ± 0.35	4.39 ± 0.39	0.15 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.35 ± 0.09	0.15 ± 0.03	0.08 ± 0.02
<i>Atss2-1</i> ^b	5.22 ± 0.37	4.91 ± 0.20	0.14 ± 0.05	0.11 ± 0.02	0.33 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.06 ± 0.01
<i>Atss2-2</i> ^b	6.16 ± 0.30	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Atss3-1</i> ^b	6.77 ± 0.24	6.02 ± 0.11 ^c	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.30 ± 0.09	0.22 ± 0.07	0.08 ± 0.01
<i>Atss2</i> , <i>Atss3</i> ^a	1.56 ± 0.07 ^d	2.34 ± 0.29 ^d	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.04 ^d	0.36 ± 0.08	0.69 ± 0.10 ^d	0.26 ± 0.04 ^d
WT ^c	8.60 ± 0.54	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Atss2-3</i> ^c	7.00 ± 0.60	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aWSP indicates water soluble glucan polysaccharide

^bColumbia genetic background

^cWS genetic backgrounddValues significantly different from wild type after adjustment for multiple comparisons. Any values not so noted were not significantly different from wild type. Units are mg/g FW. The values shown are the mean and standard deviation from four independent leaf extractions, each of which was assayed in duplicate. Abbreviations are as follows: LD: 16 h light/8 h dark long day diurnal cycle; SD: 8 h light/16 h dark short day diurnal cycle; ND: not determined.

Starch content was also quantified at various times through a single LD diurnal cycle in the *Atss2*, *Atss3* double mutant as compared to wild type. The reduced granular starch content of the double mutant was evident throughout the entire cycle (Figure 5B). The timing of starch synthesis was not affected in the *Atss2*, *Atss3* line, as accumulation was noted at the end of the light phase. Starch content in the *Atss2-1* single mutant was also quantified throughout the diurnal cycle. In this instance there were no major differences from the wild type values (data not shown).

The levels of water-soluble glucan polysaccharide (WSP) were quantified in order to examine whether a glycogen-like polymer or low-molecular weight maltooligosaccharides (MOS) might accumulate in the *Atss2*, *Atss3* double mutant in place of crystalline starch granules. Statistically significant differences from wild type were not observed in LD conditions, however, in SD conditions this component was elevated in the double mutant approximately 4.5-fold compared to wild type (Table 2).

Simple sugar levels also were quantified in plants grown under SD and LD conditions. In SD conditions sucrose levels were not significantly different from wild type in either single mutant line or the *Atss2*, *Atss3* double mutant (Table 2). Monosaccharide levels in SD-grown plants, specifically glucose and fructose, were elevated in the double mutant compared to the other strains (Table 2). The increase compared to wild type was approximately 4.5-fold for glucose and 3.4-fold for fructose, and these differences were statistically significant. In contrast to the SD conditions, LD-grown plants did not exhibit significant difference between the *Atss2*, *Atss3* double mutant and wild type (data not shown). The reason that the double mutation has significant effects on soluble carbohydrate content, i.e., WSP, glucose, and fructose, in SD conditions but not in LD conditions, is not obvious but may be related to the rate of starch accumulation in the different diurnal cycles.

Effects of mutations on starch structure and composition

Granule morphology

The morphology of leaf starch granules isolated from wild type and the various mutant lines was examined by scanning electron microscopy (Figure 6). As previously reported, starch granules of the *Atss3-1* mutant have normal morphology [29]. Granules from both *Atss2-1* and *Atss2-2* are distorted in shape and seemingly larger than those of the wild type control (Figure 6 and data not shown). Starch granules in the *Atss2*, *Atss3* double mutant are also distorted in shape, similar to the *Atss2* single mutants, and the phenotype appears to be more exaggerated in the double mutant line.

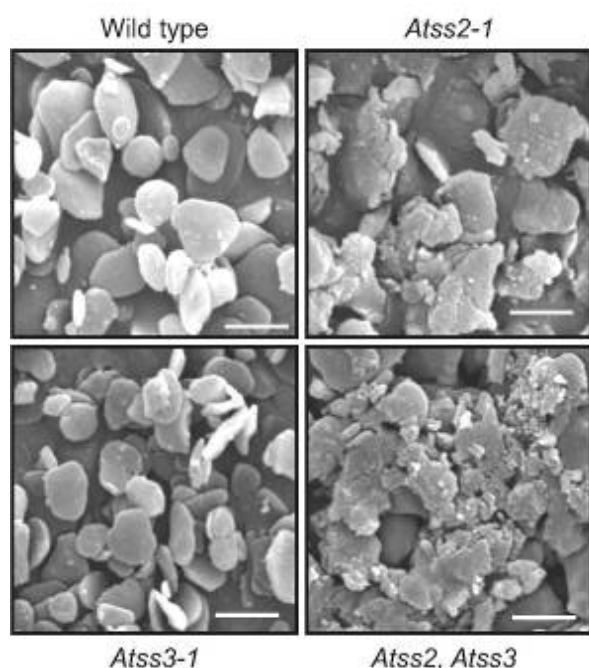


Figure 6: Starch granule morphology. Purified starch granules from plant leaves of different genotype were coated with gold particles, visualized by scanning electron microscopy, and then photographed. Bar = 18 μ m.

Amylose content and amylose/amylopectin ratio

The relative amounts of amylose and amylopectin in starch granules were compared between wild type and the three mutant lines after separating starch polymers by gel permeation chromatography (GPC). The apparent amylose peak from the *Atss2* mutant lines exhibited a maximal absorbance wavelength when complexes with iodine (λ_{max}) of approximately 610 nm, closely matching the wild type value (Figure 7). Thus, the slower-eluting glucan present in the mutants is identified as amylose, as opposed to a modified amylopectin of anomalously low molecular mass. The single measurement of the *Atss3-1* mutant showed no obvious difference in amylose:amylopectin ratio compared to wild type (Table 3), confirming the previously published result [29]. All three *Atss2* mutations conditioned an increase in the apparent amylose content. In the WS background, the wild type starch contained 25% amylose and the *Atss2-3* mutant contained 43% amylose, and this difference was shown to be statistically significant (Table 3). Both *Atss2* mutant alleles in the Columbia background also exhibited increased amylose content compared to wild type (Figure 7A, Table 3). These results are similar to the reported effect of SSII deficiency on starch composition in other species [21-26]. In the single analysis of the *Atss2*, *Atss3* double mutant starch an even greater increase in amylose content was observed (Figure 7A, Table 3).

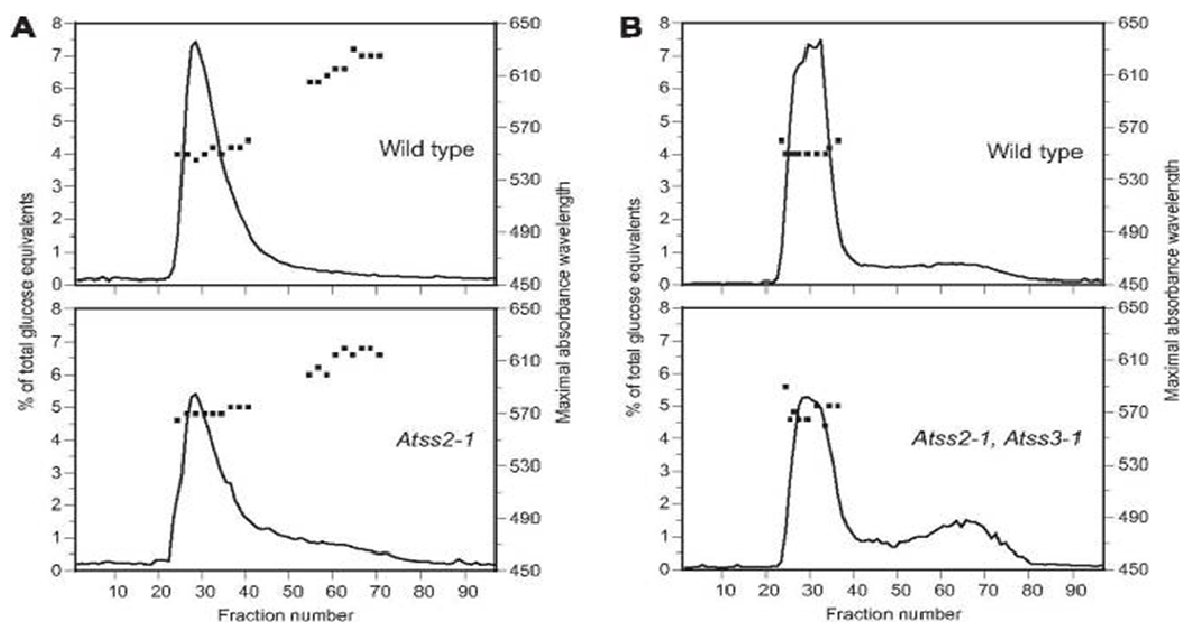


Figure 7: Glucan separation by gel permeation chromatography. **A**, Wild type and *Atss2-1*. Purified granules from plants of the indicated genotypes were dissolved by boiling in DMSO, and the polymers present were separated by GPC on Sepharose CL-2B on a column measuring 1.8 cm i.d. x 1 m height. Glucan polymer in each fraction was enzymatically quantified, and samples of each fraction were stained with I2/KI solution. Visible absorbance spectra were recorded and the maximal absorbance wavelength is noted. **B**, Wild type and *Atss2*, *Atss3*. Analysis was as in panel A, except that the column size was 1.2 cm i.d. x 50 cm height.

In addition to the increased ratio of amylose to amylopectin, increased total accumulation of amylose was observed in all three SSII single mutant lines. Normalizing the amount of amylose to the mass of leaf fresh weight revealed increases between 38% and 76% (Table 3). This effect was not observed in the *Atss2*, *Atss3* double mutant, presumably because of the low total starch content in that line.

Table 3: Leaf starch properties

Genotype	Amylose content		Amylopectin $\lambda_{\max}$	Phosphate
	%	(mg/g FW)		
Wild type ^a	21.6 ± 1.4 (5)	1.20	545 nm	4.35 ± 0.43 (2)
<i>Atss3-1</i> ^a	20.7	1.40	555 nm	10.7 ± 0.03 (2)
<i>Atss2-1</i> ^a	33.7	1.75	565 nm	3.01 ± 0.24 (2)
<i>Atss2-2</i> ^a	34.2	2.11	565 nm	NA
<i>Atss2</i> , <i>Atss3</i> ^a	40.1	0.63	575 nm	NA
Wild type ^b	25.2 ± 1.8 (5)	2.17	549 nm	NA
<i>Atss2-3</i> ^b	42.7 ± 6.7 (5) ^c	2.99	555 nm	NA

^aColumbia genetic background

^bWS genetic background

^cValue significantly different from wild type as indicated by P-value < 0.05.

Starch was analyzed from leaves harvested at the end of the light period of the LD diurnal cycle. GPC fractions 42 and lower were designated as amylopectin and fractions 43 and higher were designated as amylose (Figure 7). Parentheses indicate the number of independent biological replicate assays used to generate the mean and standard deviation. The *Atss2-1* and *Atss2-2* mutant lines were analyzed only once, however, these assays are independent biological replicates for the condition in which SSII is absent. Amylose content was normalized to leaf fresh weight by multiplying the normalized total starch amount from Table 3 by the amylose percentage determined for each genotype. Phosphate content units are nmol phosphoryl groups/mg starch. "NA" indicates data not available. Data for *Atss3-1* were previously published [29] in a study using identical analytical methodology.

Phosphate content

The phosphate content of starch is known to be influenced by SS mutations, either positively or negatively depending on the affected isoform [27, 29, 42]. To extend this analysis the phosphoryl group frequency in *Atss2-1* mutant starch was quantified, with the result that phosphate content was decreased by approximately 30% compared to wild type (Table 3). This is in contrast to *Atss3* mutations, which are known to result in significantly increased phosphate content [29]. The

phosphate content could not be determined in the *Atss2*, *Atss3* double mutant owing to sample limitation.

Amylopectin structure

Absorption spectra of glucan-iodine complexes indicated distinct amylopectin structures in the mutants as compared to wild type. In the Columbia background the λ_{max} for both *Atss2-1* and *Atss2-2* mutants was 565 nm, whereas wild type amylopectin had a λ_{max} value of 545 nm (Figure 7, Table 3). Elevated λ_{max} for the *Atss2-3* mutant compared to wild type in the WS background was also observed (Table 3). The λ_{max} value for amylopectin from the *Atss2*, *Atss3* double mutant was further elevated to 570 nm (Figure 7B, Table 3), indicating a structure different from either wild type or the *Atss2* single mutants.

The glucan chain length distribution in total leaf starch was determined for wild type and the mutant lines using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) [43, 44]. The frequency of each individual chain length was calculated as a percentage of the total chains analyzed (Figure 8A). To enable comparison between genotypes, the normalized wild type distribution value for each chain length was subtracted from the equivalent value for a particular mutant (Figure 8B). Positive values indicate enrichment of that chain length in the mutant relative to wild type, whereas negative values indicate reduced frequency of such chains.

The difference plots for *Atss2-1* and *Atss2-2* are very similar, showing a significant enrichment in chains from DP5 to DP10 and depletion in chains from DP12 to DP28 (Figure 8B). A qualitatively similar result was observed for the *Atss2-3* mutant analyzed in the WS genetic background, with the distinction that the degree of difference was larger compared to the Columbia lines (Figure 8B). In a previous report the *Atss3-1* and *Atss3-2* mutations were shown to have very small changes in these chain length ranges [29] (Figure 8B). The double mutant shows enrichment and depletion in the same chain length regions as those affected by the *Atss2* single mutants, but the degree of the change was extreme (Figure 8B). In the most extreme case, DP8 chains represented 2.2% of the normalized total in wild type or the *Atss3-1* mutant, 5.6% in either of the *Atss2* mutants, and approximately 14% in the *Atss2*, *Atss3* double mutant (Figure 8A and data not shown). Thus, the *Atss2*, *Atss3* double mutant profile was quantitatively distinct from the sum of the patterns of the *Atss2* and *Atss3* single mutants (Figure 8C).

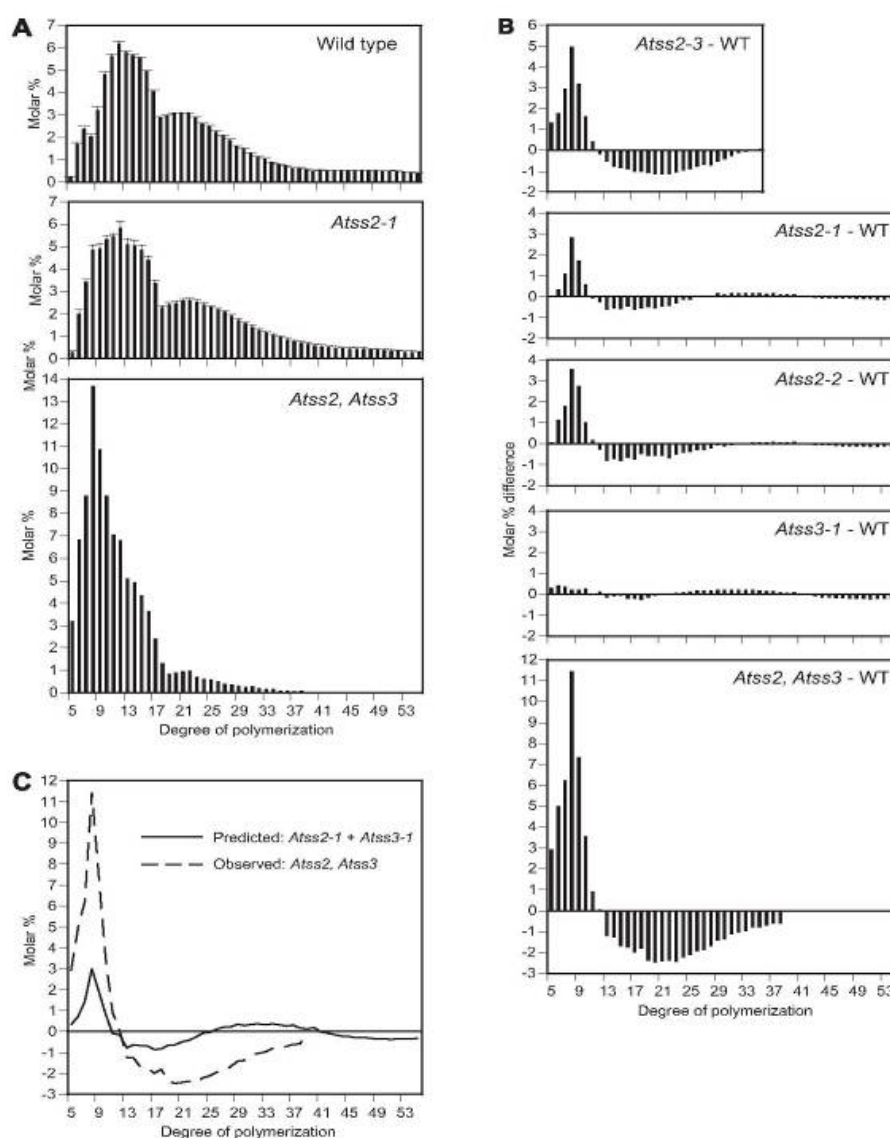


Figure 8: Amylopectin chain length distribution. **A**, Chain length distributions. The population distribution of chains of a given DP was normalized to the total number of chains in the DP range of 5-55. For wild type and *Atss2-1* the values shown are the mean from at least three independent biological replicates, with error bars indicating the standard error. Starch from the *Atss2, Atss3* double mutant was analyzed only once owing to sample limitation. **B**, Difference plot comparison of chain length distributions. For each given DP, the distribution mean value for wild type was subtracted from that of the indicated mutant strain. The chain length distribution means used to generate the difference plots for the *Atss2-2* and *Atss2-3* lines are taken from data not shown. Appropriate wild type controls were used, i.e., Columbia for the *Atss2-1* and *Atss2-2* mutants, and WS for the *Atss2-3* mutant. For comparison, the difference plot for the *Atss3-1* line is shown from previously published results [29]. **C**, Pleiotropic effect plot. The predicted sum of the *Atss2-1* and *Atss3-1* effects in single mutants (solid line) is compared to the observed result for the double mutant (dotted line).

Discussion

Atss2 single mutation

The phenotype described here for amylopectin structure and amylose content can be definitively assigned as a result of the *Atss2* mutations, as opposed to any other unidentified mutation(s) present in the T-DNA insertion lines. Three independent alleles of the *AtSS2* locus were analyzed for phenotypic effects, and in all instances essentially identical results were obtained regarding starch structure and amylose content. Each T-DNA insertion allele originated in a distinct line as an independent event, so the probability is negligible that any unidentified second mutation in the genetic background could be the causative agent of the phenotype. Furthermore, major effects of the *Atss2* mutations on other starch metabolic enzymes were not detected, so that pleiotropic effects are not a likely explanation for the changes in starch structure.

The effects of eliminating SSII on amylopectin structure in *Arabidopsis* leaves closely resembled the phenotype caused by SSII deficiency in other plant species including maize, barley, wheat, potato, rice, and pea [18, 21-27]. In all these species SSII mutations cause altered amylopectin structure such that the frequency of linear glucan chains of DP6 to DP10 is significantly increased while the abundance of DP12 to DP28 chains is decreased. Like most of the other plant species, *Arabidopsis* granules exhibit distorted morphology when SSII is inactive.

From these observations it is clear that the physiological function of SSII is highly conserved among plants. The current study indicates that this function also applies to transient starch in leaves, in addition to storage starch in the other species analyzed previously. This conservation applies regardless of the abundance of SSII activity in the soluble phase of each tissue examined. For example, in pea embryos SSII represents up to 60-70% of the total soluble SSII activity [14], in pea leaves SSII is a minor but detectable isoform and SSIII accounts for the major portion of the activity [45], and in the current study SSII was undetectable in soluble extracts of *Arabidopsis* leaves. A possible explanation for this apparent discrepancy may be that the portion of SSII that is present within granules is the determining factor in amylopectin structure, as opposed to that in the soluble fraction. This parameter has not been tested in *Arabidopsis* leaves, however, in all storage starches examined SSII has been observed to partition to some extent within the insoluble granules [14, 16, 18, 21, 23, 26, 46, 47]. Another possible explanation is that the in vitro measurement of SSII activity does not accurately reflect the enzyme's activity in vivo, owing to an unidentified effect of the assay conditions employed.

Analysis of leaf starch offered an advantage in observing the effects of SSII on total starch levels, because during the diurnal cycle the starch content is reduced to near zero at the end of the dark phase. Thus, the starch that accumulates during the light phase is synthesized nearly entirely over the previous 16 h in the light regime used in this study. This is in contrast to storage starch that accumulates over a period of weeks. The observed result is that SSII mutation did not cause a major change in the starch levels at the end of the day, indicating that despite the significant change both in amylopectin structure and amylopectin/amylose ratio the overall rate of starch accumulation is not decreased by loss of SSII.

An interesting feature of starch biosynthesis in all three *Atss2* mutants is that the amount of amylose produced in leaves relative to the total tissue fresh weight is increased. The fact that the percentage of amylose in starch granules rises in the absence of SSII was known from previous studies in other species. This effect on relative amylose content could result from decreased amylopectin directly caused by the SS defect. The current study, however, demonstrates that the absolute amount of amylose is increased in the mutants over that found in wild type leaves. Presumably the activity of GBSS, the isoform responsible for amylose production, is increased in *Atss2* mutant granules compared to wild type.

Increased abundance of GBSS does not appear to be the explanation for the elevated total amylose content, because approximately equal amounts of this enzyme were observed by immunoblot analysis in wild type and *Atss2-3* mutant granules (CD and NS, unpublished results). Possible explanations for the increased amylose content are a direct regulation of GBSS by SSII, or that the altered amylopectin structure resulting from loss of SSII affects the GBSS activity. The latter explanation could occur through an allosteric regulation of GBSS by the glucan environment in which it is located [48]. Alternatively, it has been proposed that GBSS directly uses amylopectin as a precursor to the synthesis of amylose [49]. According to this hypothesis the structurally altered amylopectin of the *Atss2* mutants may provide a more effective substrate for GBSS, allowing greater levels of amylose production. Yet another possible explanation for the increased total amylose content is that elevated MOS levels stimulate GBSS activity by acting as a primer, as has been demonstrated in vitro [50]. This explanation is unlikely to apply, however, because WSP levels were not elevated in any of the mutants grown in LD conditions (Table 2) yet the total amylose increase was clearly evident (Table 3).

Atss2, Atss3 double mutation

Combining mutations that eliminate SSII or SSIII in a single line provided a test of whether or not those two enzymes act independently in starch biosynthesis. Previous analysis of *Atss3* mutants showed no change in amylose content or granule morphology, and only minor changes in amylopectin chain length distribution on a much smaller scale than were observed here for *Atss2* mutation [29]. Accordingly, if SSII and SSIII act independently then the expected amylopectin structure in the double mutant would be the nearly same as that of the *Atss2* single mutants. To the contrary, the starch phenotype of the double mutant was far different than that of either *Atss2* or *Atss3* single mutants. The most likely explanation for these results is that SSII and SSIII are capable of executing the same or similar functions in the determination of amylopectin structure.

The chain length range affected in the double mutant is the same as in the *Atss2* single mutants, however, the magnitude of the change is far greater. In fact, the glucan structure of the *Atss2, Atss3* line is highly abnormal and resembles glycogen more than it does amylopectin, even though the mutant polymer is still present in water-insoluble granules. Synergism is also evident in the starch content, which is reduced in the double mutant by more than 70% at the end of the day. This compares to no reduction in content owing to the SSII deficiency, and an increase in the starch content conditioned by SSIII mutation in the growth environment used in this study.

The current study confirms the synergistic effects of simultaneous reduction in SSII and SSIII observed previously in antisense potato plants [22, 27], and in addition reveals several distinctions between the leaf and tuber systems. First, the total amounts of starch produced were not affected in SSII/SSIII antisense tubers [22, 27], whereas the *Arabidopsis* mutant lacking both enzymes clearly exhibited a starch deficiency. This effect is likely due to the nature of the transient system in which starch present at the end of the light phase accrues during the course of single day, compared to tubers where starch accumulates steadily over a much longer period of time. Second, more severe effects on chain length distribution were detected in *Arabidopsis* double mutant compared to the potato antisense plants. Most notably, the extreme magnitude of the synergistic effects of simultaneous loss of SSII and SSIII on chains of DP6 to DP10 is most clearly observed in the current study. The technique applied for measurement of chain length frequency in one of the potato antisense studies prevented accurate quantification of the synergistic effects [27]. In the other antisense study in potato tubers synergism was detected regarding the DP range of the chains that were affected, however the change in relative abundance of any particular length chain was the same in the single and double antisense lines [22]. This result is different than the synergistic effects

observed in *Arabidopsis* leaves. A possible explanation for the differences is that in *Arabidopsis* the insertion mutations completely eliminated each enzyme activity, whereas in potato the SS activities were reduced but not necessarily lost entirely. Alternatively, although the individual roles of each SS appear to be conserved in plants, the nature of the interactions in these two comprehensive biosynthetic systems may vary. These observations point out the utility of the *Arabidopsis* genetic system.

The observed changes in starch metabolism in the *Atss2*, *Atss3* double mutant occurred despite the fact total SS activity in soluble leaf extracts was not significantly reduced compared to wild type (Tables 1 and 2). This observation is unexpected in light of the fact that SSI activity appears to account for only approximately 50% of the total, as determined by analysis of *Atss1* mutants [28]. However, neither *Atss2* nor *Atss3* mutations alone diminish total SS activity (Tables 1 and 2) [29]. This apparent paradox may be explained by the proposal that SSIII serves as a negative regulator of SSI [29], potentially through interactions in the same multi-subunit complex [31], so that SSI activity could be elevated compared to wild type in the double mutant. Similar observations were made in maize endosperm extracts in which mutations affecting SSIII caused increased total SS activity as opposed to the expected reduction [13, 39], and nearly all of the elevated activity could be attributed to SSI [13]. A similar relationship also was demonstrated in rice endosperm, in which SSI activity was shown to be elevated 1.3 to 1.7-fold as the result of a mutation affecting SSIIIa [40].

These considerations emphasize the point that total SS activity is not entirely responsible for amylopectin structure determination, and that the relative abundance of each conserved class of SS enzyme likely is an important factor. Similarly, total soluble activity is not solely responsible for determining starch content, because the *Atss2*, *Atss3* double mutant is deficient in starch even though the remaining SS classes are able to provide a high level of activity. Either SSII or SSIII, acting in concert with SSI, are able to support the wild type level of starch synthesis. A possible explanation of this fact is that SSI may be unable to extend chains to a length suitable for BE action, whereas either SSII or SSIII can produce suitable BE substrate chains.

Functional interaction among SS classes

The effects of single and double mutations in *Arabidopsis* genes raise the idea that normal amylopectin chain length distribution is determined in large part by competition between different SSs for binding to any glucan chain substrate along with the inherent ability of each SS class to catalyze elongation of chains of particular lengths. The latter point is illustrated by the extreme

deficiency of chains of DP12 to DP25 in the *Atss2*, *Atss3* double mutant. In this instance the major soluble SS remaining is SSI. Thus, this enzyme appears to be unable to elongate glucan chains much beyond DP10, which is consistent with the known biochemical properties of maize SSI measured in vitro [51].

Competition between SSI and SSII or SSIII for binding to each glucan chain is suggested from the phenotype caused by the *Atss1* mutation [28] or the analogous mutation in rice [52]. Amylopectin from these mutants exhibits increased frequency of chains in the length region of DP12 to DP28 and a relative deficiency in short chains of DP6 to DP10. In the absence of SSI, access of SSII or SSIII to substrate chains may be increased owing to reduced competition with SSI. If the catalytic efficiency of SSII or SSIII relative to chain length is extended compared to SSI, then the population of DP13 to DP25 chains would rise compared to the wild type condition in which SSI to some extent prevents SSII or SSIII action. In this view, SSI may bind to the shorter chains of approximately DP10 but have a low probability of catalytic activity, thus acting as a negative regulator of SSII or SSIII by means of steric interference. The balance between short chains of DP6 to DP10 and intermediate chains of DP12 to DP28 would be determined by the relative abundance of the three enzymes, their affinities for glucan chains as a function of DP, and their catalytic efficiencies after binding to substrate, again as a function of DP. The proposal that different SS classes would compete with each other for binding to potential substrate chains is consistent with the observation that SSII from pea embryos is a distributive enzyme that dissociates from the glucan substrate after each glucose unit addition [48, 50]. Thus SSII and SSIII might compete for binding to potential glucan substrates during each cycle of chain elongation.

In order to explain the chain length profile of the *Atss2*, *Atss3* double mutant, SSIII is proposed to partially overlap with SSII with regard to the DP region suitable for catalysis, but not with that of SSI. In the absence of SSII, SSIII would still be available to produce chains in the intermediate length region, and to compete with SSI for binding to potential substrates. SSIII is proposed to compete with SSI less effectively than does SSII, in order to explain the reduction in intermediate length chains of DP12 to DP20 in the *Atss2* mutants. The fact that the *Atss3* mutation alone has only a minor effect on amylopectin chains shorter than DP40 could be explained by a competitive advantage of SSII over SSIII for binding to short glucan chains. Accordingly, SSIII would not be involved to a great extent in intermediate chain length production in the wild type condition, but could provide that function in the absence of SSII.

Conclusion

The activity of SSII is required in *Arabidopsis* for production of the normal frequency of amylopectin chains of DP12 to DP25, and thus the protein exhibits the same function that is conserved in numerous other plant species. None of the other SS classes can completely compensate for loss of SSII, however, SSIII is able to partially function in production of DP12 to DP25 chains. SSIII is not required for the normal population of these chains. These observations can be explained by competition between SSII and SSIII for binding to the non-reducing end of each potential substrate chain. Finally, loss of SSII affects the activity of GBSS such that the total amount of amylose in leaves is increased.

Methods

Plant materials and growth conditions

Wild type *Arabidopsis thaliana* of the ecotype Columbia (Col-0), and *Atss2-1* or *Atss2-2* mutant lines in this background, were sown in Sunshine Soil mix. Sown seeds were incubated at 4°C for 2-3 days then grown either in a growth room under a 16-h light/8-h dark photoperiod at 21°C and 60% relative humidity, or in a growth chamber under a 8-h night/16-h dark photoperiod and the same temperature and relative humidity. These growth facilities are located at Iowa State University in Ames, IA. Wild type *Arabidopsis* of the WS background, and the congenic *Atss2-3* mutant line, were grown similarly. The growth facilities used for all lines in the WS background were located at the University of Science and Technology of Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France. All subsequent analyses of the Columbia and WS lines were performed independently, the former at Iowa State University and the latter at USTL. Appropriate wild type control lines were used in all instances, i.e., Columbia for the *Atss2-1* and *Atss2-2* mutants, and WS for the *Atss2-3* mutant.

Identification of mutant alleles by PCR, and generation of mutant lines

Standard methods were used for isolation of genomic DNA from leaf tissue, and PCR amplification. PCR primers used to identify the mutant alleles were derived from the TDNA left border (LBa1, TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G) and from the *AtSS2* gene sequence (2RP1, GCT ACC AAT ATC ACA TTC ATG AC; 2LP1, CTT ACC ATG ATT TGC CTT CTG; 2LP2, CCT CTT CTC TGA AGC CCT TCC C; 2RP2, AGT GGT GGA AAA TTA GGG GCG) (Figure 1A). Nucleotide sequence analysis of PCR products generated by the LBa1/2RP1 primer pair or the

LBa1/2LP2 primer pair revealed the genomic location of the T-DNA insertion generating *Atss2-1* or *Atss2-2*, respectively (Figure 1A). The primer sets used for identification of *Atss2-3* in the WS genetic background were as follows: Rev1, TGG TTC CAT AGT TCA TTG CGT AAA; For1, GAA GGA GGT TGG GGT CTG C; Tag5, CTA CAA ATT GCC TTT TCT TAT CGA C (Figure 1A). The *Atss2*, *Atss3* double mutant was generated by crossing homozygous *Atss2-1* and *Atss3-1* homozygous single mutant lines, then allowing the double heterozygous F1 plants to self pollinate. Genomic DNA from segregants was screened by PCR to reveal the presence of each insertion allele. The mutant allele *Atss2-1* was revealed by amplification with the LBa1/2RP1 primer pair, and the wild type allele *AtSS2* was identified by the 2RP1/2LP1 primer pair. Primer combinations for identification of *Atss3-1* and the wild type *AtSS3* allele were LBa1/SS3-TU1 and SS3-TU1/SS3-TL1, respectively [29]. One double homozygous line identified in the F2 generation was propagated for several more generations, and PCR genotyping consistently revealed all individuals in the lineage to be double homozygous mutants (data not shown).

RT-PCR

Total RNA was isolated from approximately 100 mg of fresh leaf tissue from leaves harvested approximately 20 days after germination using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Total RNA was treated with RNase-free DNase (Promega) (1 U, 30 min, 37°C) to remove any contaminating genomic DNA in the samples. A commercial enzyme kit (Invitrogen Superscript III) was used to synthesize cDNA. The sequences of the primers used to amplify the *AtSS2* mRNA are specified in the previous section, or were as follows: For51, GCT GAG GCA TTC CCG TGT TTC T; Rev51, TGC GGT TCT TCA AGG ATT CAG TA; ForRT, GGG GAC CGG TAG ATG ATT TC, and RevRT, CGG TCG CCC TGT GCC TAA C. The primers used to amplify the *AtSS3* mRNA were described previously [29], except for 3-EU1 located near the *AtSS3* initiation codon (GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CCT GGT GCC ACG CGG3 TTC CGG AAG TGC TCA GAA AAG AAC).

Expression of recombinant SSII in E. coli and monoclonal antibody production

Cloned, full length SSII cDNA was obtained from Riken (resource number: pda04163). The coding region of the SSII cDNA, minus the 120 nucleotide sequence at the 5' end coding for a predicted transit peptide, was cloned into pDONR201 using Gateway cloning technology (Invitrogen) to generate plasmid pESS2. The native stop codon of the SSII cDNA was included in the cloned region. The SSII cDNA sequence was then transferred by in vivo recombination to

the expression vector pDEST15 to create expression plasmid pDSS2. In pDSS2, the SSII coding region is fused at its 5' end to a sequence coding for glutathione-S-transferase (GST). SSII was expressed from pDSS2 in *E. coli* BL-21 AI cells (Invitrogen). The fusion gene was induced by addition of 0.2% arabinose and induced cells were grown at room temperature for approximately 6 h. The SSII fusion protein was purified from *E. coli* lysates by binding to glutathione-agarose (Sigma) on a GST affinity column. Monoclonal antibody against this full length SSIIGST recombinant protein was generated as described previously [29]. The hybridoma culture fluid containing SSII antibody (α AtSSII) was used undiluted for immunoblot analysis.

Partial purification of leaf proteins and enzyme activity measurements

Leaf extracts were prepared and fractionated by anion exchange on HiTrapQ (Pharmacia) as described previously [29]. Proteins from selected fractions were analyzed by immunoblot using α AtSSII monoclonal antibody. Fractions or whole leaf extracts were also analyzed by starch synthase zymogram [29] or by native starch zymogram [43], as described previously.

Total soluble starch synthase activity in leaf extracts was assayed essentially as described previously [13]. Fresh leaves (200 mg) were ground into fine powder in liquid nitrogen and suspended in 400 μ L Extraction Buffer (50 mM Tris-acetate, pH 7.5, 10 mM DTT). After centrifugation to remove insoluble materials, protein concentration was determined by the Bradford method, and the starch synthase activity assay was then conducted with different quantities of protein. Control experiments demonstrated that the amount of C incorporated into methanol-precipitable product is linear with respect to the amount of protein in the assay (data not shown). Enzyme assays for BE, ADPGPP, α -amylase, β -amylase, DE, maltase, pullulanase-type DBE, and SP were performed as described previously [28, 53].

Analysis of starch quantity and structure

The methods used for analysis of starch content in leaves, amylopectin chain length distribution, granule morphology, starch phosphate content, and separation of amylose and amylopectin by GPC on Sepharose CL-2B have all been described previously [29, 43]. Two different sizes of Sepharose CL-2B column were used, either 1.2 cm i.d. x 50 cm height, or 1.8 cm i.d. x 1 m height. The smaller column was eluted at a flow rate of 0.26 mL/min and 1.5 mL fractions were collected. The larger column was eluted at a flow rate of 0.5 mL/min and 3 mL fractions were collected. The starch granule glucans separated by GPC were characterized by staining the column fractions with $\frac{1}{2}$ volume of I2/KI solution, obtaining a visible spectrum from 400 nm to 700 nm and then recording

the $\lambda_{\max}$ value. Glucan concentration in each fraction was quantified by determination of glucose units following complete hydrolysis with amyloglucosidase, using a commercial assay kit (Catalogue No. 10 207 748 035; R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

In order to measure both WSP and insoluble glucans, i.e., starch, in the same leaf extracts, the ground leaf material suspended in 1 ml of water was centrifuged at full speed in a microfuge for 10 min, and the supernatant and pellet were both collected. The pellet was washed twice with 1 ml of 80% ethanol, and then suspended in 1 ml of distilled water. Glucan present in the soluble and granule fractions was enzymatically quantified as described in the previous paragraph. To quantify sucrose, D-fructose, and D-glucose, the pooled aqueous supernatant from six plants were quantified in triplicate with a Sucrose/D-Glucose/D-Fructose assay kit (Catalogue No. 10 716 260 035; R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Statistical analyses

To evaluate the effects of SSII and/or SSIII mutations on starch and soluble carbohydrate content, and other starch metabolic enzymes compared to wild type, one-way ANOVA and two-sample t-tests were used for the comparisons. Since most of the experiments involved comparing single and/or double mutants to the common wild type control with multiple endpoints, Dunnett's and Bonferroni methods were used to adjust for multiple comparisons. Only experiments that had more than two independent replicates were considered for statistical analysis.

Authors' contributions

XZ performed genetic manipulations, phenotypic determinations, and biochemical analyses involving the *Atss2-1* and *Atss2-2* single mutant lines and the *Atss2-1*, *Atss3-1* double mutant, and helped to draft the manuscript. DD performed the genetic and biochemical analyses of the *Atss2-3* mutant line. NS carried out biochemical assays of starch metabolic enzymes shown in Table 2. MGJ, CD, and AMM conceived the study and participated in its design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the manuscript prior to submission.

Acknowledgements

This research was supported by National Science Foundation award no. DBI-0209789 to A.M.M. and M.G.J., and by grants from the Region Nord Pas de Calais, the European Union

(ARCir) and from Genoplante (Af2001030) to C.D., D.D., and N.S. The authors thank Tracie Hennen-Bierwagen for technical assistance and for critical reading of the manuscript, and Fabrice Wattebled for critical reading of the manuscript.

References

- 1. Buleon A, Colonna P, Planchot V, Ball S:** Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 1998, **23**:85-112.
- 2. Gallant DJ, Bouchet B., Baldwin, P.M.:** Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr Polymers* 1997, **32**:177-191.
- 3. Hizukuri S:** Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectin, and its significance. *Carbohydr Res* 1986, **147**:342-347.
- 4. Thompson DB:** On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydr Polymers* 2000, **43**:223-239.
- 5. Ball S, Morell M:** From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* 2003, **54**:207-233.
- 6. James MG, Denyer K, Myers AM:** Starch synthesis in the cereal endosperm. *Curr Opin Plant Biol* 2003, **6**:215-222.
- 7. Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG:** Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol* 2000, **16**:989-997.
- 8. Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ:** Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* 2004, **55**:2131-2145.
- 9. Leterrier MS, Holappa LD, Broglie KE, Beckles DM:** Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol* 2008, **8**:in press.
- 10. Li Z, Sun F, Xu S, Chu X, Mukai Y, Yamamoto M, Ali S, Rampling L, KosarHashemi B, Rahman S et al:** The structural organisation of the gene encoding class II starch synthase of wheat and barley and the evolution of the genes encoding starch synthases in plants. *Func Integ Genomics* 2003, **3**:76-85.
- 11. Ral JP, Derelle E, Ferraz C, Wattebled F, Farinas B, Corellou F, Buleon A, Slomianny MC, Delvalle D, d'Hulst C et al:** Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol* 2004, **136**:3333-3340.
- 12. Ball SG, van de Wal MHB, Visser RGF:** Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant Sci* 1998, **3**.
- 13. Cao H, Imparl-Radosevich J, Guan H, Keeling PL, James MG, Myers AM:** Identification of the soluble starch synthase activities of maize endosperm. *Plant Physiol* 1999, **120**:205-216.
- 14. Denyer K, Sidebottom C, Hylton CM, Smith AM:** Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos. *Plant J* 1993, **4**:191-198.
- 15. Denyer K, Sidebottom C, Hylton CM, Smith AM:** Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta* 1995, **196**.
- 16. Edwards A, Marshall J, Sidebottom C, Visser RG, Smith AM, Martin C:** Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers. *Plant J* 1995, **8**:283-294.
- 17. Mu-Forster C, Huang R, Powers JR, Harriman RW, Knight M, Singletary GW, Keeling PL, Wasserman BP:** Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm. Granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II.

Plant Physiol 1996, **111**:821-829.

18. Nakamura Y, Francisco PB, Jr., Hosaka Y, Sato A, Sawada T, Kubo A, Fujita N: Essential amino acids of starch synthase IIa differentiate amylopectin structure and starch quality between japonica and indica rice varieties. *Plant Mol Biol* 2005, **58**:213-227.

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

20. Klösgen RB, Gierl A, Schwarz-Sommer Z, Saedler H: Molecular analysis of the waxy locus of *Zea mays*. *Mol Gen Genet* 1986, **203**:237-244.

21. Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM: Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 1998, **10**:413-426.

22. Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, Jobling SA, Gidley M, Rossner U, Martin C, Smith AM: A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J* 1999, **17**:251-261.

23. Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, Samuel MS, Chandler P, Rahman S, Buleon A, Batey IL, Li Z: Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J* 2003, **34**:173-185.

24. Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y: Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica-type and indica-type rice varieties. *Theor Appl Genet* 2002, **104**:1-8.

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

26. Zhang X, Colleoni C, Ratushna V, Sirghie-Colleoni M, James MG, Myers AM: Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol Biol* 2004, **54**:865-

879.

27. Lloyd JR, Landschutze V, Kossmann J: Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochem J* 1999, **338**:515-521.

28. Delvallé D, Dumez S, Wattebled F, Roldán I, Planchot V, Berbezy P, Colonna P, Vyas D, Chatterjee M, Ball S *et al*: Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J* 2005, **43**:398-412.

29. Zhang X, Myers AM, James MG: Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol* 2005, **138**:663-674.

30. Roldan I, Wattebled F, Lucas MM, Delvallé D, Planchot V, Jimenez S, Perez R, Ball S, D'Hulst C, Merida A: 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.

31. Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, Tetlow IJ, Emes MJ, James MG, Myers AM: Starch biosynthetic enzymes from developing *Zea mays* endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol* 2008, **146**:1892-1908.

32. Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin NS, Wait R, Morell MK, Emes MJ: Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol* 2008, **146**:1878-1891.

33. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G: Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 2000, **300**:1005-1016.

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

35. Salk Institute Genomic Analysis Laboratory

[<http://signal.salk.edu/>]

36. Data Available for *Arabidopsis thaliana* [<http://urgv.evry.inra.fr/projects/FLAGdb++/HTML/data.shtml#ara>]

37. Balergue S, Dubreucq B, Chauvin S, Le-Clainche I, Le Boulair F, de Rose R, Samson F, Biaudef V, Lecharny A, Cruaud C *et al*: Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders. *Biotechniques* 2001, **30**:496-503.

38. Samson F, Brunaud V, Balergue S, Dubreucq B, Lepiniec L, Pelletier G, Caboche M, Lecharny A: FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:94-97.

39. Singletary GW, Banisadr R, Keeling PL: Influence of gene dosage on carbohydrate synthesis and enzymatic activities in endosperm of starchdeficient mutants of maize. *Plant Physiol* 1997, **113**:293-304.

40. Fujita N, Yoshida M, Kondo T, Saito K, Utsumi Y, Tokunaga T, Nishi A, Satoh H, Park JH, Jane JL *et al*: Characterization of SSIIa-deficient mutants of rice: the function of SSIIa and pleiotropic effects by SSIIa deficiency in the rice endosperm. *Plant Physiol* 2007, **144**:2009-2023.

41. Colleoni C, Myers AM, James MG: One- and two-dimensional native PAGE activity gel analyses of maize endosperm proteins reveal functional interactions between specific starch metabolizing enzymes. *J Appl Glycosci* 2003, **50**:207-212.

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

43. Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, James MG: Molecular structure of three mutations at the maize *sugary1* locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiol* 2001, **125**:1406-1418.

44. O'Shea MG, Samuel MS, Konik CM, Morell MK: Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of

oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydr Res* 1998, **307**:1-12.

45. Tomlinson K, Craig J, Smith AM: Major differences in isoform composition of starch synthase between leaves and embryos of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 1998, **204**:86-92.

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

47. Li Z, Chu X, Mouille G, Yan L, Kosar-Hashemi B, Hey S, Napier J, Shewry P, Clarke B, Appels R *et al*: The localization and expression of the class II starch synthases of wheat. *Plant Physiol* 1999, **120**:1147-1156.

48. Denyer K, Waite D, Edwards A, Martin C, Smith AM: Interaction with amylopectin influences the ability of granule-bound starch synthase I to elongate malto-oligosaccharides. *Biochem J* 1999, **342**:647-653.

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

50. Denyer K, Waite D, Motawia S, Moller BL, Smith AM: Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem J* 1999, **340**:183-191.

51. Commuri PD, Keeling PL: Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J* 2001, **25**:475-486.

52. Fujita N, Yoshida M, Asakura N, Ohdan T, Miyao A, Hirochika H, Nakamura Y: Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol* 2006, **140**:1070-1084.

53. Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, Rees T: A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J* 1998, **15**:357-365.

Construction et analyse phénotypique des lignées *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*

*I. Construction des lignées doubles mutantes *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* et analyse des phénotypes de croissance*

Deux lignées doubles mutantes ont été générées afin d'étudier d'éventuels phénomènes de redondance ou interactions fonctionnelles entre SS1 et SS2 ou SS1 et SS3. Les allèles utilisés sont *Atss2-3* (Zhang et al., 2008) (FST : 549A11, cf annexe), *Atss3-3* (David Delvallé, thèse de Doctorat, 2005) (FST : 117H05) et *Atss1-1* (Delvallé et al., 2005) (FST : 203C08). Tous trois proviennent de la collection de mutants de l'INRA de Versailles, se trouvent dans le fond génétique Wassilewskija (WS), et entraînent la disparition de la synthèse normale des ARN messagers correspondants.

La lignée *ss1- ss3-* fut générée par David Delvallé (Thèse de doctorat, 2005) et les croisements pour l'obtention du mutant *ss1- ss2-* furent initiés à mon arrivée au laboratoire. Les progénitures des lignées doubles hétérozygotes ont été criblées par PCR à la recherche d'individus doubles homozygotes mutants. La figure 22 résume les structures des trois gènes *SS1*, *SS2* et *SS3* et les amorces utilisées pour la vérification des allèles mutants.

Les deux doubles mutants et les simples mutants correspondants ont été cultivés en serre avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit, ou en chambre de culture, avec une photopériode de 12 h de jour et 12 h de nuit. Les développements des feuilles, des tiges, des fleurs et des siliques des plantes mutantes ont été étudiés en comparaison avec la référence sauvage. En accord avec les descriptions de Delvallé et al., 2005 ; Zhang et al., 2008 ; et Zhang et al., 2005 ; les lignées simples mutantes *ss1-*, *ss2-* et *ss3-* se développent sans distinction des plantes sauvages. Aucun phénotype de croissance n'a par ailleurs été observé pour les deux lignées doubles mutantes dans ces conditions de culture.

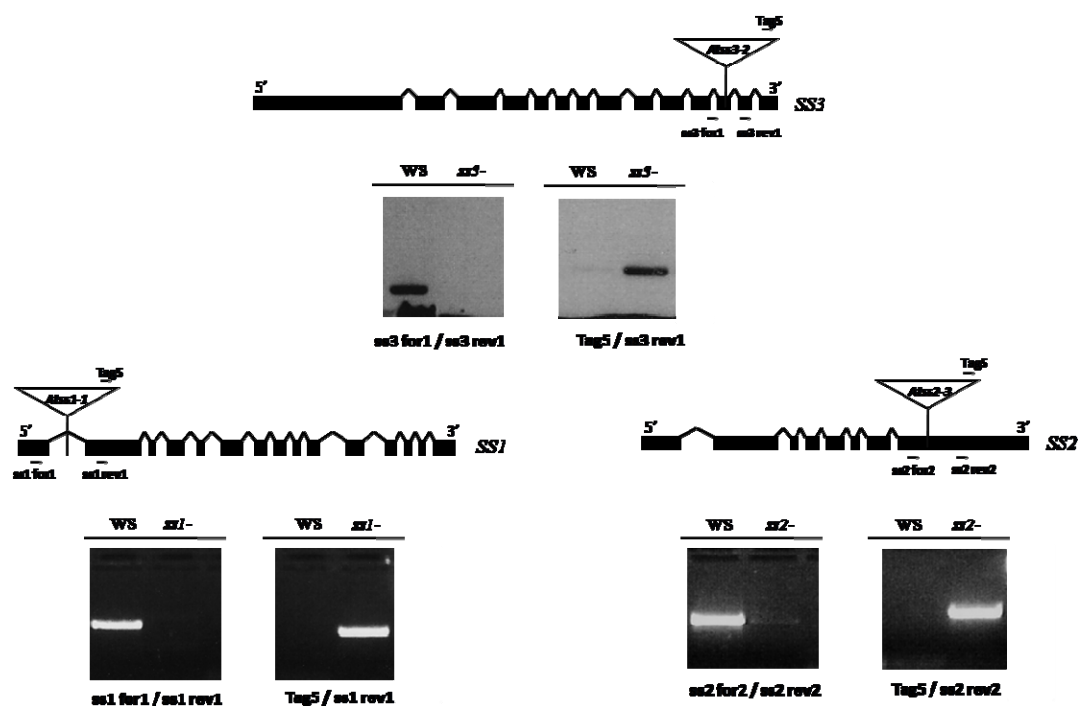


Figure 22 : Structure des gènes *SS1*, *SS2* et *SS3* et vérification des allèles mutants. Pour chaque gène, les exons sont représentés par des rectangles noirs et les introns par des lignes brisées entre les exons. Les extrémités 5' et 3' sont indiquées, ainsi que la position des insertions et les amorces utilisées pour la sélection. Les photos d'électrophorèse en gel d'agarose correspondent à l'analyse des produits d'amplification par PCR (la nature des ADN génomiques testés et les amorces utilisées sont indiquées au dessus et au dessous de chaque photo).

II. Effet des mutations sur l'activité amidon-synthétase soluble et les autres activités du métabolisme de l'amidon

L'effet des mutations sur les activités amidon-synthétase solubles a été étudié par zymogramme (figure 23A). 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 et récoltées en milieu de phase lumineuse. Ces échantillons ont été déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide contenant 0,33 % de glycogène de foie de lapin. Après migration, en conditions non dénaturantes, les gels ont été incubés une nuit avec de l'ADP-Glc puis colorés par une solution de I_2/KI . Les bandes de teinte marron correspondent aux zones du gel où les glucanes du glycogène ont été allongés par les amidon-synthétases. Dans l'extrait protéique sauvage (WS), deux activités SS peuvent être observées. Les bandes situées en haut et en bas du gel correspondent respectivement aux activités de SS3 et SS1 (Zhang et al., 2005, Delvallé et al., 2005). Ces bandes sont en effet absentes dans les pistes correspondantes aux extraits protéiques des mutants *ss3-* et *ss1-*. Aucune différence ne peut être observée entre le profil du mutant *ss2-* et celui de la référence sauvage car l'activité de la SS2 n'apparaît pas sur ce type de zymogramme. Ceci peut s'expliquer, soit par un niveau d'expression

très faible de l'isoforme par rapport aux SS1 et SS3, soit par l'incapacité de la SS2 d'allonger les chaînes du glycogène présent dans le gel. De manière prévisible, les activités de SS1 et SS3 sont absentes dans l'extrait protéique du double mutant *ss1- ss3-*, et l'activité de la SS1 disparaît dans celui du double mutant *ss1- ss2-*.

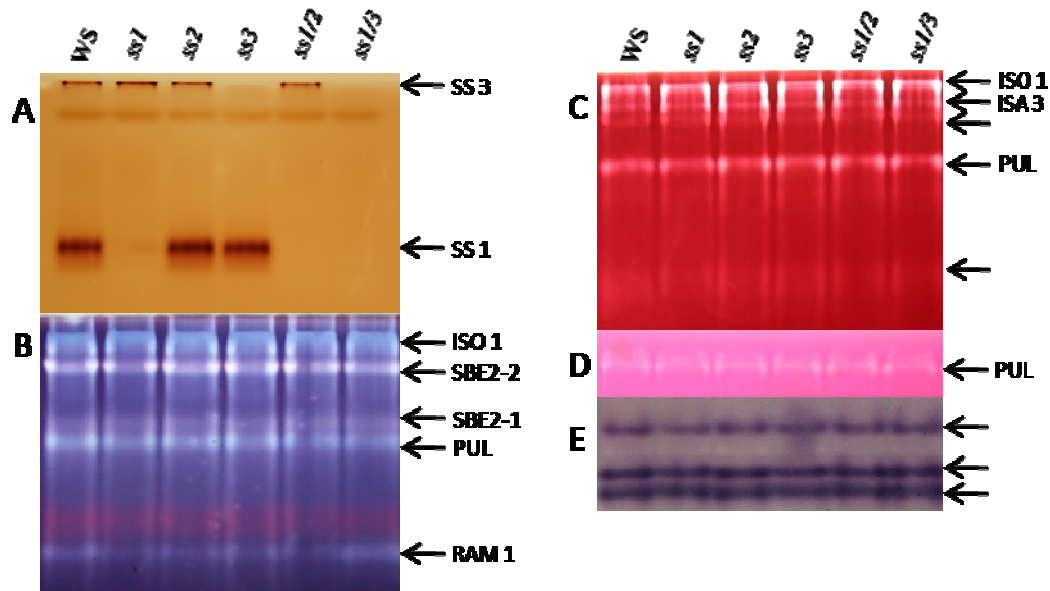


Figure 23 : Zymogrammes des enzymes du métabolisme de l'amidon. **A. Zymogramme des activités amidon synthétases** sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % (p/v) de glycogène. Le gel est incubé toute une nuit à température ambiante avec 1mM d'ADP-Glucose. Les activités amidon-synthétases sont révélées en immergeant le gel dans une solution de lugol. **B. Zymogramme des activités modifiant l'amidon** sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % (p/v) d'amidon soluble de pomme de terre. Après migration et incubation une nuit à température ambiante, les activités enzymatiques sont révélées par coloration à l'iode. Les différentes bandes ont été identifiées par l'analyse de mutants d'*A. thaliana* déficients pour chaque type d'activité (Delvallé et al., 2005). **C. Zymogramme des activités modifiant l'amidon** sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % (p/v) de β -limite dextrines. Après migration et incubation une nuit à température ambiante, les activités enzymatiques sont révélées par coloration à l'iode. Les différentes bandes ont été identifiées par l'analyse de mutants d'*A. thaliana* déficients pour chaque type d'activité. **D. Zymogramme pullulanase** sur un gel de polyacrylamide contenant 1 % (p/v) de « red pullulan ». Après migration et incubation une nuit à température ambiante, l'activité pullulanase apparaît sous la forme de bandes blanches dans le gel. **E. Zymogramme des activités phosphoglucomutases.** Sur un gel de polyacrylamide ne contenant pas de substrat. Après migration, le gel est incubé à l'obscurité et à température ambiante. Le développement de la coloration est suivi tout au long de l'incubation (1 heure maximum).

L'activité amidon-synthétase soluble totale (SS) a été mesurée *in vitro* dans les extraits protéiques préparés comme décrit précédemment (tableau 2). Les protéines totales ont été incubées avec de l'ADP-Glc radiomarqué et du glycogène. L'activité SS est diminuée d'environ 50 % dans le mutant *ss1-*, en accord avec les travaux de Delvallé et al., 2005. Aucune modification d'activité n'a par ailleurs été observée dans le mutant *ss2-*. En revanche, elle est diminuée de 10 % dans l'extrait du mutant *ss3-*, alors que Zhang et al (2005) ont décrit une augmentation de l'activité SS totale et du contenu en amidon dans les deux allèles mutants *Atss3-1* et *Atss3-2*. Les auteurs ont proposé qu'en

absence de la SS3, l'activité de la SS1 augmentait comme c'est le cas chez le riz ou le maïs (Cao et al., 1999), et entraînait une hausse de l'activité totale mesurée. Afin d'expliquer les différences apparentes de phénotypes entre les allèles étudiés par notre équipe et celle du Pr. Alan Myers de « l'Iowa State University », nous avons échangé les différentes lignées *ss3-*, et montré que ces variations sont liées aux conditions de culture. En effet, l'activité SS dans la lignée *Atss3-1*, cultivée dans notre laboratoire, est diminuée de 10 % par rapport au sauvage.

Tableau 2 : Activités des enzymes du métabolisme de l'amidon dans les extraits protéiques solubles de WS et des mutants *ss1-*, *ss2-*, *ss3-*, *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*. Les unités, pour chaque dosage, sont des nmol de produit / min / mg de protéines. Les valeurs pour les activités enzymes de branchement et amidon-synthétases (excepté dans le mutant *ss3-*) ont été déterminées avec deux essais biologiques indépendants. Les autres résultats sont les moyennes de trois essais biologiques indépendants. Les écarts-types sont indiqués pour chaque dosage. Pyrophosphorylase = ADP-Glucose pyrophosphorylase

	Enzymes de branchement	Pullulanase	Pyrophosphorylase-3PGA	Pyrophosphorylase+3PGA
WS	136,2±10,6	7,6±1,6	3,5±0,8	12,4±2,1
<i>ss1</i>	144,5±14,8	8,1±0,7	3,1±1,6	11,1±1,7
<i>ss2</i>	118,6±17,4	7,6±1,5	3,7±1,4	13,8±3,5
<i>ss3</i>	161,3±3,4	7,3±0,9	3,4±1,6	12,2±2,6
<i>ss1 ss2</i>	171,3±23,4	8,7±1,3	4,2±0,9	15,2±1,8
<i>ss1 ss3</i>	191,1±12,9	8,1±1,6	5±1	15,2±5

	D-enzyme	Maltase	Amidon-synthétases	α-amylases
WS	29,7±0,6	27±1,2	100	75,8±4,5
<i>ss1</i>	28,2±2,2	33,5±6,5	50±8,8	77,4±16,2
<i>ss2</i>	27,1±1,1	27,7±4,2	100,3±5,1	77±4,6
<i>ss3</i>	ND	ND	92,7	70,6±13,2
<i>ss1 ss2</i>	25,6±2,1	32±5,4	25,4±2,2	80,7±3
<i>ss1 ss3</i>	ND	ND	9,8±4,5	83,1±9,8

Dans les doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*, les diminutions d'activité SS sont respectivement de l'ordre de 75 et 90 %. Celles-ci sont significativement plus importantes que l'addition des phénotypes simples mutants (50 % pour *ss1- + ss2-*, et 60 % pour *ss1- + ss3-*). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour expliquer ce phénomène qui suggère une perturbation de complexes impliquant différentes isoformes d'amidon-synthétases. Les autres activités du métabolisme de l'amidon ont elles aussi été analysées par zymogramme (figure 23B, 23C, 23D et 23E) ou par les essais *in vitro* standards (tableau 2). Les activités des enzymes de branchement, de la pullulanase, de l'ADP-Glucose pyrophosphorylase, D-enzyme, maltase et α -amylase varient très peu et de manière non significative dans l'ensemble des mutants.

III. Effet des combinaisons de mutations sur les contenus en amidon et en glucanes solubles

Les contenus en amidon ont été déterminés en fin de photopériode avec des plantes cultivées en cycle jour / nuit de 16 h / 8 h ou 12 h / 12 h (figure 24). Les mutants *ss1*- et *ss2*- accumulent des quantités normales d'amidon après 16 heures d'illumination comme ce fut décrit par Delvallé et al. (2005) et Zhang et al. (2008). La quantité accumulée par le mutant *ss2*- en photopériode plus courte est toutefois diminuée de 55 %. Ceci s'explique par l'augmentation du contenu en amylose dans la lignée *Atss2-3*, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, et par le fait que celle-ci est synthétisée en fin de photopériode à partir de l'amylopectine préalablement produite par les SS (Wattebled et al., 2002).

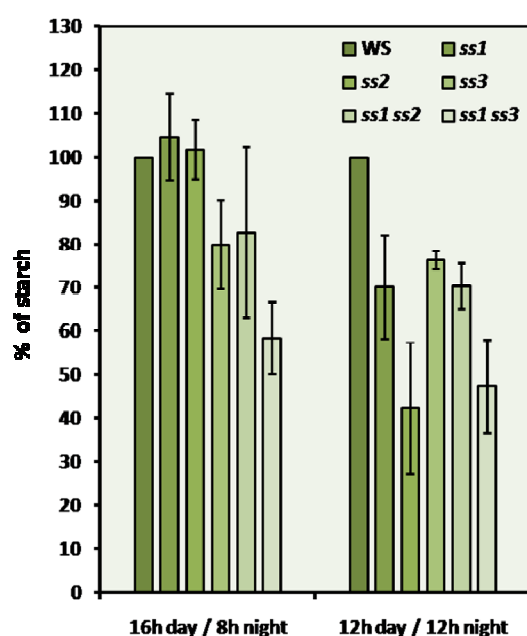


Figure 24 : Contenus en amidon dans le sauvage WS et les mutants *ss1*-, *ss2*-, *ss3*-, *ss1*- *ss2*- et *ss1*- *ss3*-. Les contenus en amidon ont été déterminés par dosage à l'amyloglucosidase à partir d'échantillons de plantes récoltés en fin de photopériode. Les résultats, exprimés en % d'amidon accumulé par rapport au sauvage, représentent la moyenne des dosages effectués sur trois échantillons biologiques différents. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types pour chaque mutant.

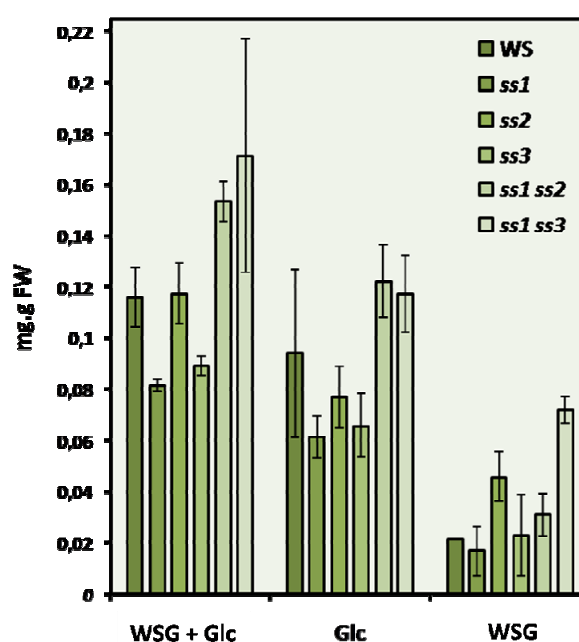


Figure 25 : Contenus en WSG (Water soluble glucans) et glucose, déterminés par dosage à l'amyloglucosidase, dans le sauvage WS et les mutants *ss1*-, *ss2*-, *ss3*-, *ss1*- *ss2*- et *ss1*- *ss3*-. Les WSG correspondent à la totalité du matériel mesuré (excepté le glucose) par la méthode de dosage employée. Les résultats, exprimés en mg. par g. de poids frais, représentent la moyenne de dosages effectués sur trois échantillons biologiques indépendants. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types pour chaque dosage.

Quelles que soient les conditions de culture, le mutant *ss3-* présente une baisse de la quantité d'amidon d'environ 20 %. Ce résultat est contraire aux observations faites par Zhang et al. (2005) qui ont rapporté une augmentation de la quantité d'amidon dans ce même mutant. Nous avons vérifié que ces différences de phénotype sont elles aussi liées aux conditions de culture utilisées. La lignée mutante *Atss3-1*, présentée dans les travaux de Zhang et al. a été cultivée dans notre laboratoire. Dans ces conditions, la quantité d'amidon accumulée est d'environ 80 % par rapport au sauvage, ce qui correspond aux résultats que nous présentons ici pour la lignée *Atss3-3*. Enfin, la combinaison des mutations *ss1- ss3-* entraîne une baisse de la quantité d'amidon accumulée (50 %) plus importante que chez le double mutant *ss1- ss2-* (25 %), ce qui corrèle avec les diminutions d'activité SS observées sur zymogramme et par dosage *in vitro*.

Les contenus en glucanes solubles (WSG), comprenant sans distinction, les malto-oligosaccharides solubles et le phytoglycogène, ont également été mesurés dans chaque mutant (figure 25). Seule la quantité de WSG accumulés par le double mutant *ss1- ss3-* est augmentée (3 fois par rapport au sauvage). Toutefois les quantités mesurées sont très faibles (0,02 mg / g de feuilles dans WS) et cette augmentation pourrait simplement être liée à la variation statistique.

IV. Effet des mutations sur la structure et la composition de l'amidon

1. Morphologie des grains

La morphologie des grains d'amidon extraits des lignées sauvage et mutantes a été observée par microscopie électronique à balayage en collaboration avec l'équipe du Dr. Véronique Planchot de l'INRA de Nantes (figure 26). Des analyses par microscopie électronique à transmission de coupes ultrafines de grains ont également été menées afin d'étudier l'apparence de l'intérieur des grains d'amidon (figure 27).

Les grains *ss1-* et *ss3-* ont une morphologie classique (bien que de taille légèrement diminuée pour *ss3-*) (figures 26B et 26D), alors que les grains *ss2-* sont déformés et légèrement plus gros que les grains sauvages (figure 26C). Les grains d'amidon *ss1- ss3-* sont légèrement plus petits que les grains sauvages, tout comme ceux du simple mutant *ss3-* (figure 26F). La morphologie des grains *ss1- ss2-* correspond à celle des grains *ss2-*, avec toutefois une déformation légèrement moins marquée (figures 26E). Enfin, quel que soit le génotype étudié, aucune perturbation de l'intérieur des grains n'a pu être observée (figure 27).

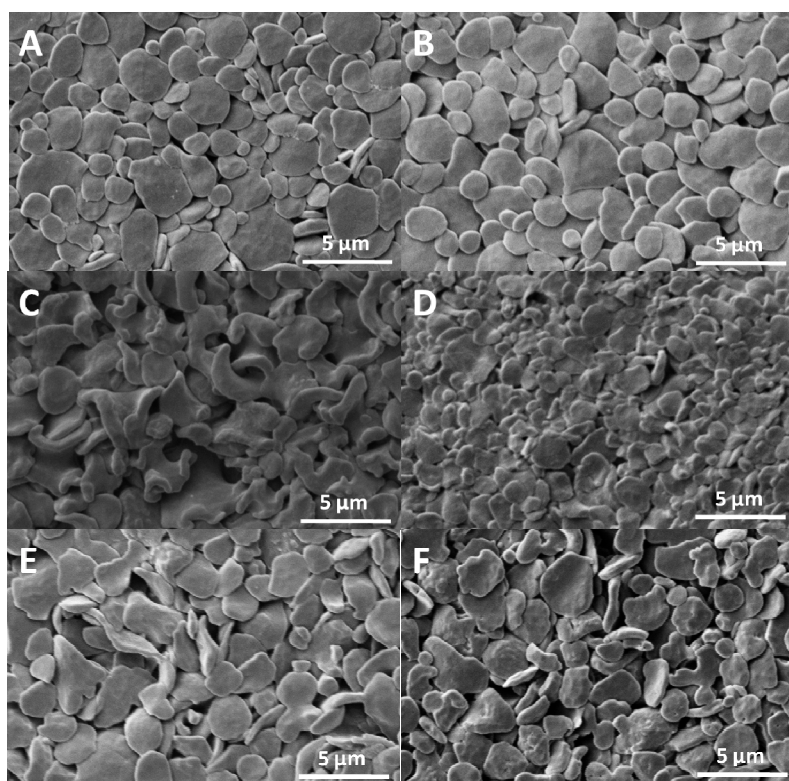


Figure 26 : Observation des grains d'amidon WS, *ss1*-, *ss2*-, *ss3*-, *ss1*- *ss2*- et *ss1*- *ss3*- par microscopie électronique à balayage. Les grains ont été extraits en fin de photopériode et purifiés par gradient de Percoll. Les analyses ont été réalisées à l'INRA de Nantes par l'équipe du Dr. Véronique Planchot. **A :** WS, **B :** *ss1*-, **C :** *ss2*-, **D :** *ss3*-, **E :** *ss1*- *ss2*-, **F :** *ss1*- *ss3*-.

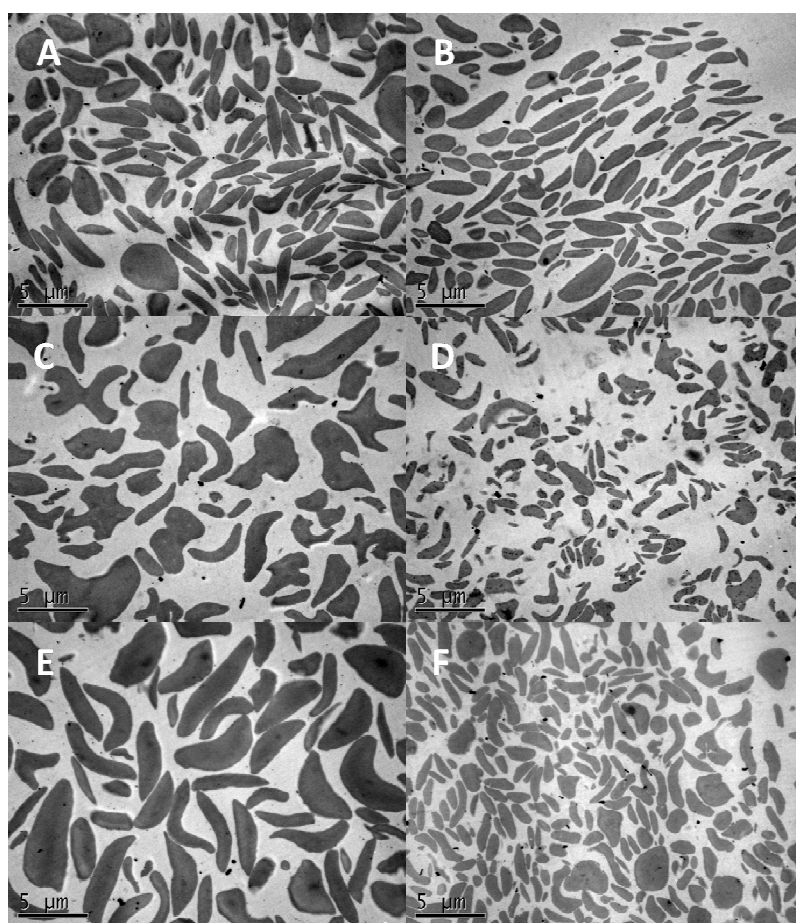


Figure 27 : Observation de coupes de grains d'amidon WS, *ss1*-, *ss2*-, *ss3*-, *ss1*- *ss2*- et *ss1*- *ss3*- par microscopie électronique à transmission. Les grains ont été extraits en fin de photopériode et purifiés par gradient de Percoll. Les inclusions, coupes et analyses ont été réalisées à l'INRA de Nantes par l'équipe du Dr. Véronique Planchot. **A :** WS, **B :** *ss1*-, **C :** *ss2*-, **D :** *ss3*-, **E :** *ss1*- *ss2*-, **F :** *ss1*- *ss3*-.

2. Ratios amylopectine / amylose

L'amylose et l'amylopectine des amidons mutants ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique (figure 28). La longueur d'onde du maximum d'absorption du complexe iode-polysaccharide ($\lambda_{\max}$) a été mesurée dans chaque fraction afin d'identifier les pics d'élution des deux polymères. La $\lambda_{\max}$ fournit également des informations quant à la structure du polymère étudié. Une augmentation de la $\lambda_{\max}$ traduit une augmentation générale de la taille des glucanes des molécules. Inversement, une réduction de la $\lambda_{\max}$ indique une réduction moyenne de la longueur des glucanes. Les pics d'amylose des mutants *ss1-*, *ss2-*, *ss3-* et *ss1- ss3-* présentent une $\lambda_{\max}$ d'environ 620 nm, très proche de celle observée pour le pic d'amylose sauvage (figure 28B, C, D, F). Dans l'amidon *ss1- ss2-* (figure 28E), le pic d'amylose présente une $\lambda_{\max}$ plus élevée (environ 650 nm) que celui du sauvage et des autres mutants.

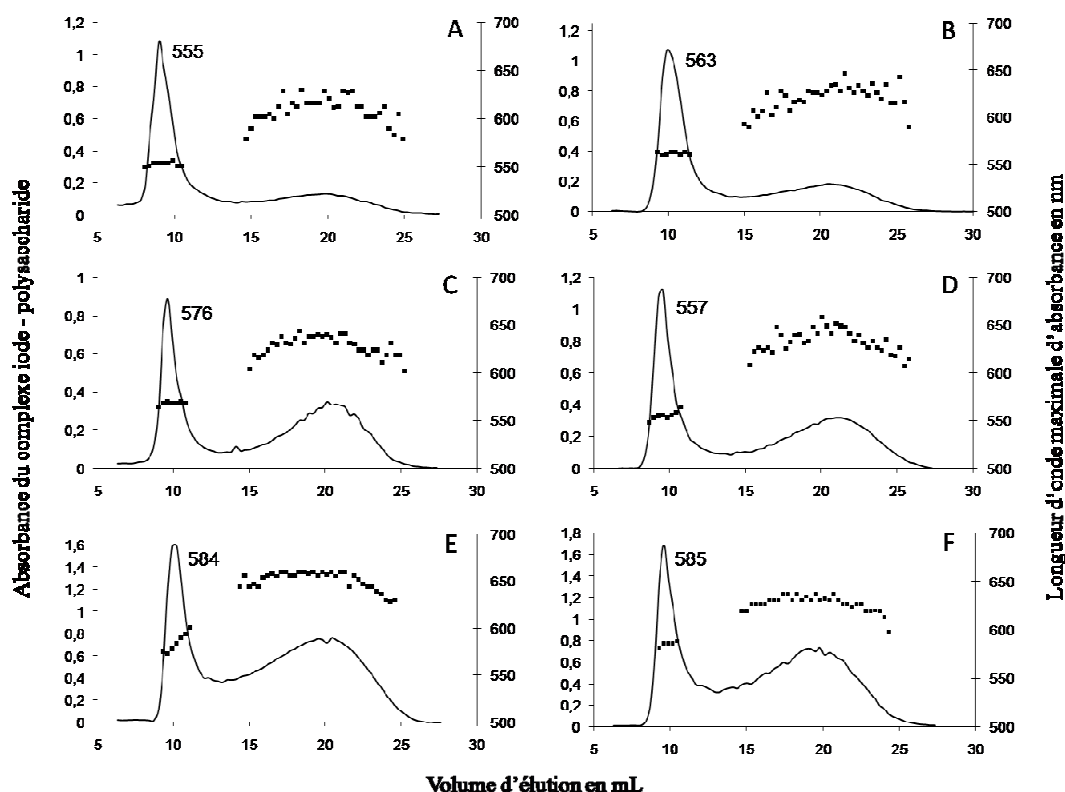


Figure 28: Profils d'exclusion stérique des polysaccharides constitutifs des amidons WS, *ss1-*, *ss2-*, *ss3-*, *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*. L'amidon extrait de plantes sauvages et mutants est dissous par chauffage à 100 °C dans du DMSO. L'amylose et l'amylopectine sont séparés par chromatographie d'exclusion stérique sur une matrice de Sépharose CL-2B. La présence des polysaccharides dans chaque fraction est déterminée par mesure de l'absorbance du complexe iode-polysaccharide après ajout d'une solution de I₂ / KI. Pour chaque fraction, le spectre d'absorption du complexe entre 500 et 700 nm est déterminé et l'absorbance maximale (ligne continue, axe de gauche) ainsi que la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe est reportée (points noirs, axe de droite). La $\lambda_{\max}$ du pic d'amylopectine est indiquée à côté du pic (en nm). A : WS. B : *ss1-*. C : *ss2-*. D : *ss3-*. E : *ss1- ss2-*. F : *ss1- ss3-*.

Les fractions contenant chaque polymère ont été regroupées et la quantité de polysaccharides déterminée par dosage à l'amyloglucosidase. Les proportions relatives en amylose et amylopectine ont été exprimées en pourcentage par rapport à la quantité d'amidon, pour étudier les éventuelles variations du ratio amylose / amylopectine (Am / Ap) (tableau 3).

Tableau 3 : Proportions d'amylose dans les amidons sauvage et mutants et quantités d'amylose en mg / g de feuilles. Les proportions en amylose ont été déterminées par dosage à l'amyloglucosidase de l'amylose et l'amylopectine après séparation sur colonne de CL-2B. Le nombre d'essais biologiques indépendants pour chaque génotype est indiqué entre parenthèses. Les quantités d'amylose ont été déterminées en normalisant les proportions d'amylose avec la quantité d'amidon accumulée par les plantes correspondantes cultivées en photopériode 16h de jour / 8h de nuit.

	WS	ss1	ss2	ss3	ss1 ss2	ss1 ss3
Proportion en amylose en %	26,7 ± 2,4 (6)	28 (1)	39,2 ± 2,3 (6)	32,5 ± 4,5 (2)	48 (1)	47,3 ± 4,2 (3)
Quantité d'amylose en mg / g de feuilles	0,62	0,66	0,89	0,58	1,032	0,62

L'amidon *ss1*- contient 28 % d'amylose, ce qui est équivalent à la proportion mesurée pour de l'amidon sauvage (26,7 %). En revanche, la proportion d'amylose varie dans les mutants *ss2*- et *ss3*-, où elle représente respectivement 39,2 et 32,5 % de l'amidon. Dans les doubles mutants, l'augmentation observée est plus importante avec 48 % d'amylose dans l'amidon *ss1*- *ss2*- et 47,3 % dans l'amidon *ss1*- *ss3*-. L'expression de la quantité d'amylose par rapport à la masse de feuille permet de déterminer si l'augmentation du ratio Am / Ap est liée ou non à la diminution du taux de synthèse de l'amylopectine. C'est le cas pour l'amidon des mutants *ss3*- et *ss1*- *ss3*- puisque la quantité d'amylose en mg / g feuille est identique dans les mutants et le sauvage (tableau 3). Au contraire, les quantités d'amylose dans les mutants *ss2*- et *ss1*- *ss2*- sont respectivement augmentées de 44 % et 66 %, indiquant une augmentation du taux de synthèse de l'amylose dans ces mutants.

3. Structure de l'amylopectine

La $\lambda_{\max}$ du pic d'amylopectine est augmentée dans les différents amidons mutants par rapport à la référence sauvage (figure 28). Cette augmentation est plus faible dans le cas des simples mutants que dans le cas des doubles mutants, mais indique à chaque fois que la structure du polymère est modifiée. La distribution de la longueur des glucanes constitutifs des amylopectines sauvage et mutantes a donc été déterminée par FACE (Fluorophore-Assisted Capillary Electrophoresis) et/ou par HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection) (figure 29). Les proportions relatives de chaque type de glucane ont été exprimées en %

par rapport au nombre total. Les résultats obtenus étaient identiques quelle que soit la méthode empruntée (FACE ou HPAEC-PAD). Afin de mieux visualiser les modifications de structure induites par les différentes mutations, le profil de l'amylopectine sauvage a été soustrait des profils de chaque mutant.

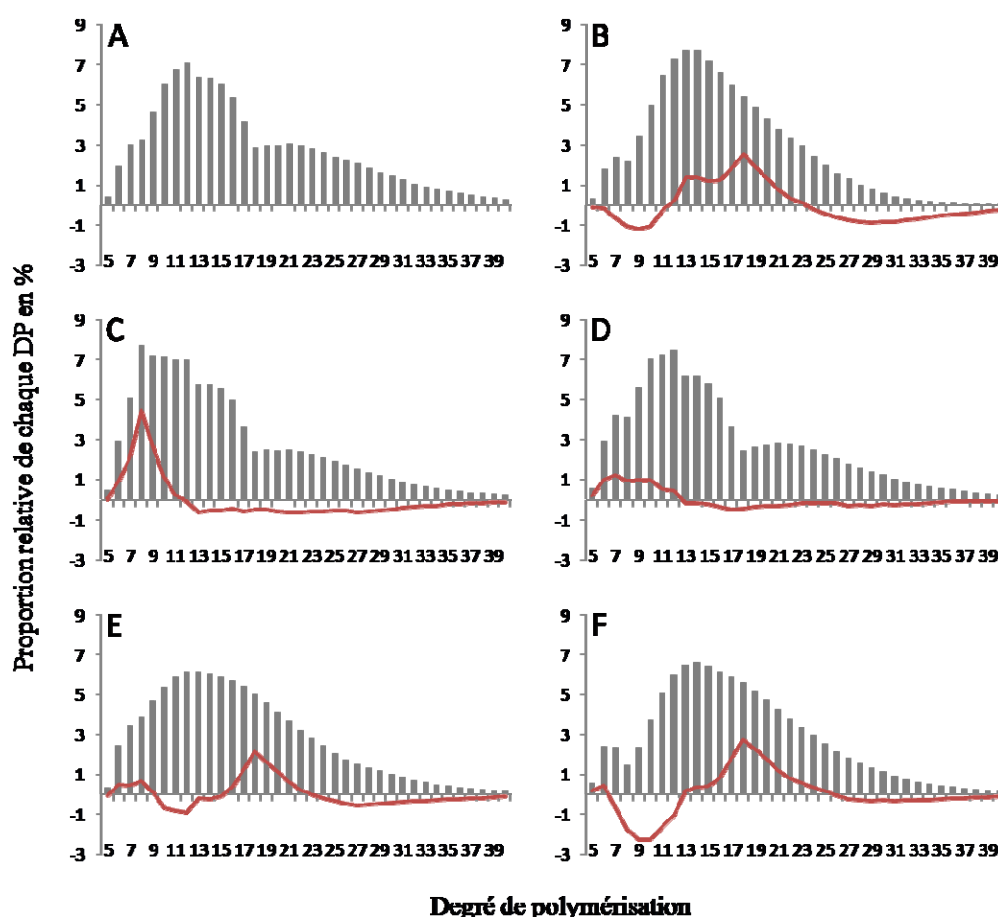


Figure 29 : Distribution de la longueur des glucanes constitutifs de l'amylopectine. Après purification sur colonne de Sépharose CL-2B, l'amylopectine est débranchée par une isoamylase bactérienne. Le produit de la digestion est analysé par HPAEC-PAD ou par FACE. Les proportions relatives de chaque type de glucane au sein de la population totale sont exprimées en % par rapport au nombre total de glucanes. A : WS, B : *ss1-*, C : *ss2-*, D : *ss3-*, E : *ss1- ss2-*, F : *ss1- ss3-*. Les courbes rouges continues sont le résultat de la différence entre les profils de chaque mutant et celui du sauvage.

La différence obtenue est représentée par une courbe rouge continue superposée à chaque profil mutant de la figure 29. Les valeurs positives traduisent un enrichissement en glucanes de longueurs correspondantes dans le mutant, alors que les valeurs négatives y traduisent une baisse. Le profil de l'amylopectine sauvage suit une distribution polymodale avec un maximum à DP 12 (figure 29A). Ce type de distribution, caractéristique de l'amylopectine quelle que soit l'origine botanique étudiée, est remplacé par une distribution unimodale dans le mutant *ss1-* où les chaînes les plus représentées

sont celles de DP 11 (Delvallé et al., 2005). La proportion des courtes chaînes, de DP 5 à 10, est significativement diminuée, alors que les chaînes de DP 13 à 21 (DP 18 en particulier) sont plus nombreuses, comparé à l'amylopectine sauvage (figure 29B). On retrouve, par ailleurs l'augmentation des chaînes de DP 18 liée à l'absence de la SS1 dans les profils des doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* (figures 29E et 29F). Le profil de l'amylopectine *ss2-* est lui aussi considérablement modifié. La proportion des chaînes de DP 5 à 10 est largement augmentée, avec un maximum pour les chaînes de DP 8 (figure 29C). Le profil du mutant *ss3-* est modifié de manière similaire au profil *ss2-* (figure 29D). Ces modifications sont toutefois nettement moins marquées, comme ce fut montré par Zhang et al. (2008).

Afin de déterminer si les phénotypes de structure des amylopectines *ss1-* et *ss2-* ou *ss1-* et *ss3-* sont additifs, la combinaison calculée des profils des simples mutants (courbes en trait plein de la figure 30) a été comparée avec le profil effectivement observé pour les doubles mutants (courbes en pointillés de la figure 30).

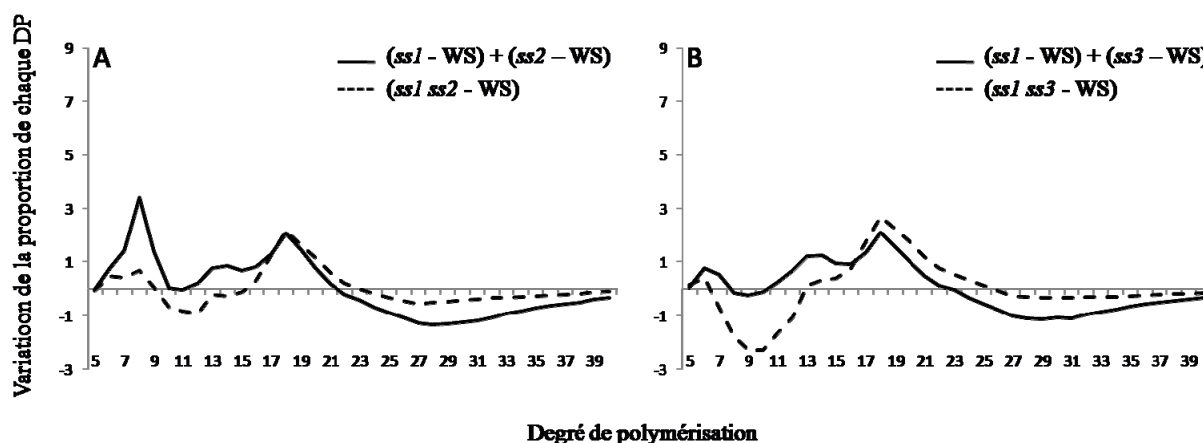


Figure 30 : Comparaison des différentiels observés et calculés pour les doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*. Les différentiels des profils de distribution de longueur des glucanes des amylopectines doubles mutants et sauvages (courbes rouges des figures 29E et 29F) sont représentés en pointillés. Les sommes des différentiels entre les profils des amylopectines simple mutants (courbes rouges des figures 29B, 29C et 29D), et le profil de la référence sauvage sont représentées en trait plein. A : Comparaison entre le différentiel réel du double mutant *ss1- ss2-* (*ss1 ss2* – WS) et le différentiel calculé ((*ss1* – WS) + (*ss2* – WS)). B : Comparaison entre le différentiel réel du double mutant *ss1- ss3-* (*ss1 ss3* – WS) et le différentiel calculé ((*ss1* – WS) + (*ss3* – WS)).

On remarque que les profils des deux doubles mutants suivent la même tendance que les profils calculés (figure 30A et 30B). Toutefois les phénotypes ne sont pas strictement additifs. Les profils sont en effet sensiblement différents en particulier pour les glucanes de faible DP. Le double mutant *ss1- ss2-*, présente une augmentation des DP 6 à 9 moins marquée comparé au profil *ss2-* (figure

30A), et le profil *ss1- ss3-*, présente une diminution du nombre de glucanes de DP 7 à 12 correspondant au phénotype *ss1-* mais un peu plus marqué (figure 30B).

La distribution de la taille des glucanes constitutifs des amylopectines sauvages et mutantes a également été étudiée après digestion par la β -amylase. La β -amylase est une exo-amylase qui clive les liaisons α -1,4 à partir de l'extrémité non réductrice d'un glucane en libérant du maltose. Cette enzyme n'est pas capable d'agir sur les liaisons α -1,6 et s'y arrête en amont à une distance de deux ou trois résidus de glucose (les points de branchement représentent donc des barrières infranchissables pour les β -amylases). La molécule résultant de l'action de cette enzyme est appelée « β dextrine-limite » et correspond à la partie interne ou « squelette » de l'amylopectine. Les profils de répartition de la longueur glucanes des amylopectines sauvage et mutantes après digestion sont présentés dans la figure 31.

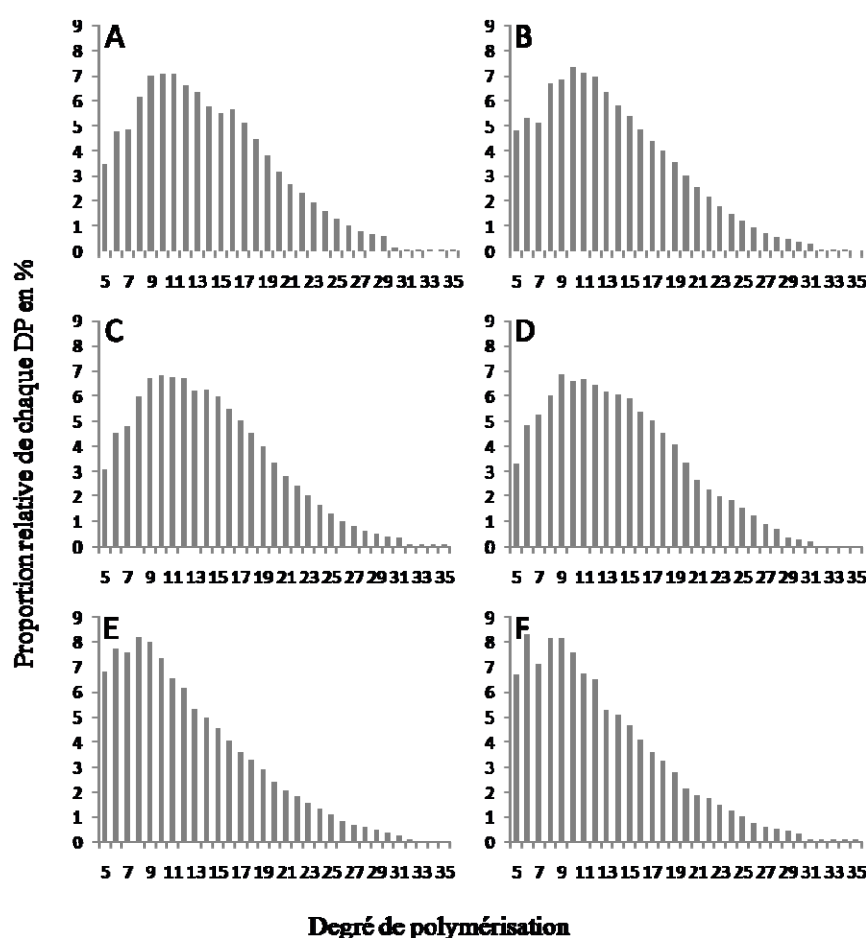


Figure 31 : Distribution de la longueur des glucanes de l'amylopectine après β -amylolyse. Après purification sur colonne de Sepharose CL-2B, l'amylopectine est incubée avec de la β -amylase puis débranchée par de l'isoamylase. Les produits de la réaction sont analysés par HPAEC-PAD. Les proportions relatives de chaque type de glucanes au sein de la population totale en cours d'analyse sont exprimées en %. A : WS, B : *ss1-*, C : *ss2-*, D : *ss3-*, E : *ss1- ss2-*, F : *ss1- ss3-*.

Les différentiels entre les profils après et avant digestion par la β -amylase, pour l'amylopectine sauvage et les amylopectines mutantes sont présentés dans la figure 32. Des valeurs positives traduisent une résistance des glucanes correspondants à la β -amylolyse, alors que des valeurs négatives montrent qu'ils sont susceptibles à la digestion. La susceptibilité à la β -amylolyse est caractéristique des glucanes externes de la molécule d'amylopectine (glucanes des types A et B1 qui sont limités à une seule grappe d'amylopectine). Pour l'amylopectine sauvage, les valeurs sont positives pour les glucanes de DP 5 à 10 et 17 à 19 (figure 32A). Par ailleurs, les glucanes de DP 17 à 19 du mutant *ss1-*, ainsi que des doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* sont sensibles à la digestion (figures 32B, E et F).

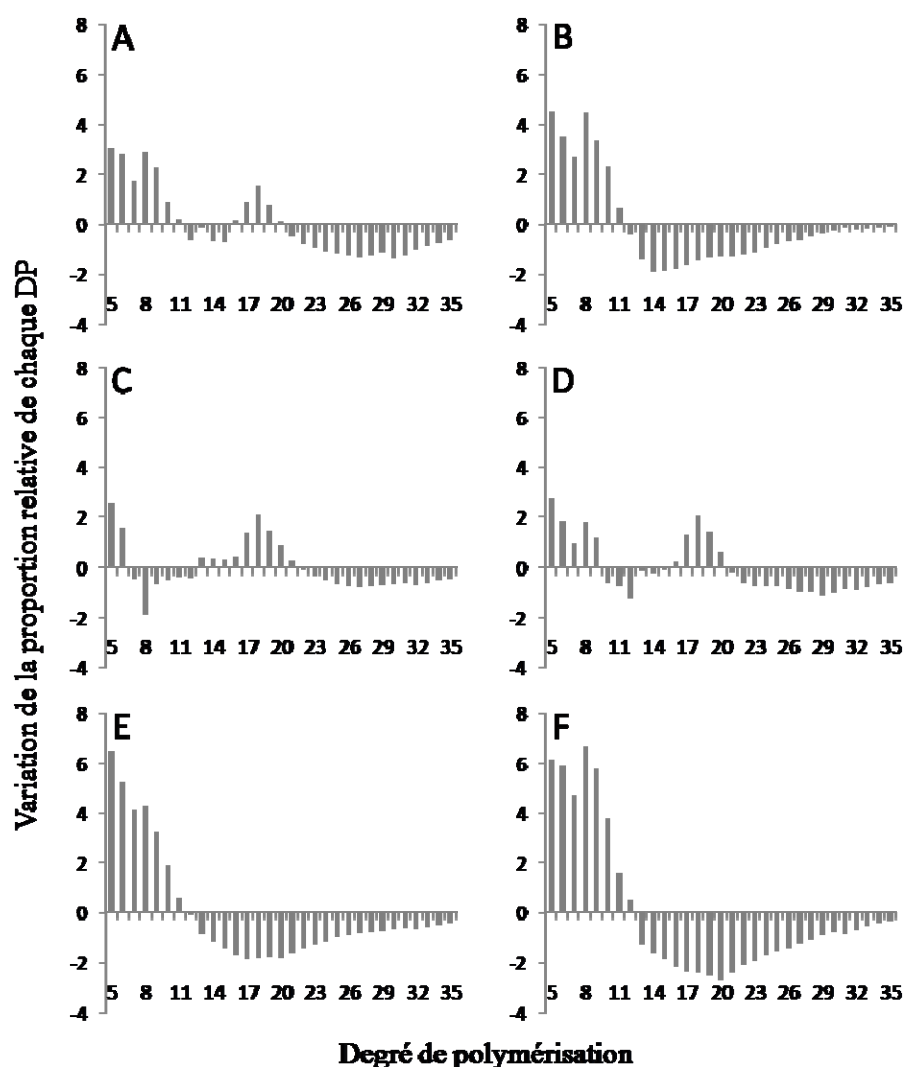


Figure 32 : Différentiels des profils de distribution de longueur de chaîne avant et après β -amylolyse. Les profils représentent, pour chaque mutant et la référence sauvage, la différence entre les proportions relatives de chaque type de chaîne après β -amylolyse (présentées en figure 31) et sans β -amylolyse (présentées en figure 29). A : WS, B : *ss1-*, C : *ss2-*, D : *ss3-*, E : *ss1- ss2-*, F : *ss1- ss3-*.

Ceci indique que ces glucanes, dont la proportion est augmentée dans l'amylopectine des combinaisons mutantes impliquant l'allèle *Atss1-1* (Delvallé et al., 2005) (figures 29B, E et F), sont

accessibles à la β -amylase et se situent donc en surface de l'amylopectine. De même, les glucanes de DP 8 dont la fréquence est augmentée dans le mutant *ss2*-, sont eux aussi très susceptibles à la digestion par la β -amylase (figure 32C) indiquant qu'ils se trouvent essentiellement en surface de la molécule. Les différentiels des deux doubles mutants, suivent la tendance observée pour le mutant *ss1*-. Toutefois l'augmentation de la proportion des glucanes de DP 5 à 11 après β -amylolyse, est plus marquée dans les amylopectines *ss1*-, *ss2*- et *ss1*- *ss3*- (figure 32E et 32F).

Afin d'étudier les modifications structurales du squelette de l'amylopectine des différents mutants, le profil de répartition de longueur de glucane obtenu après β -amylolyse pour l'amylopectine sauvage a été soustrait du profil obtenu pour l'amylopectine de chaque mutant (figure 33).

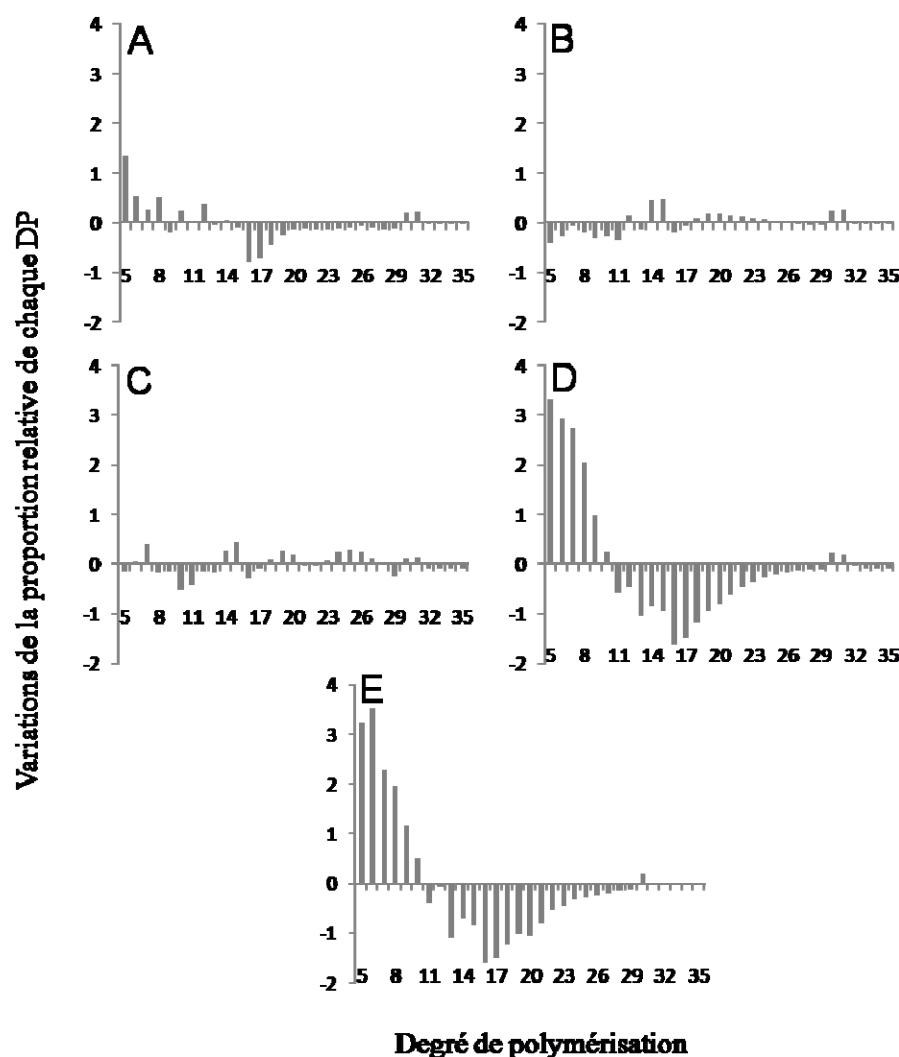


Figure 33 : Différentiels des profils de distribution de longueur de chaîne sauvages et mutants après β -amylolyse. Les profils représentent la différence entre les proportions relatives de chaque type de glucane pour l'amylopectine mutante et l'amylopectine sauvage après β -amylolyse (présentées en figure 31). A : (*ss1*-)-(WS), B : (*ss2*-)-(WS), C : (*ss3*-)-(WS), D : (*ss1*- *ss2*-)-(WS), E : (*ss1*- *ss3*-)-(WS).

Des valeurs positives indiquent que les glucanes sont en plus grand nombre dans la molécule mutante. A l'inverse, des valeurs négatives traduisent un déficit des glucanes dans l'amylopectine mutante. Aucune perturbation significative de la structure ne peut être observée chez les mutants *ss2-* et *ss3-* (figure 33B, C). Dans le mutant *ss1-*, les glucanes de DP 5 à DP 10 sont légèrement plus représentés que dans la référence sauvage, et les glucanes de DP 15 à 29 sensiblement moins nombreux (figure 33A). Dans les doubles mutants, la répartition des glucanes est complètement perturbée (figures 33D, E). Les proportions des glucanes de DP 5 à 10 sont augmentées, avec un maximum pour les DP 5 et 6 (3,5 points). Les proportions des glucanes de DP 11 à 29 sont, de plus, significativement diminuées, indiquant un déficit de ces types de chaînes dans le squelette des amylopectines *ss1-* *ss2-* et *ss1- ss3-*.

Construction et analyse phénotypique d'une lignée triple mutante *ss1- ss2- ss3-*

Toujours dans l'objectif d'étudier les interactions fonctionnelles et redondances entre les isoformes d'amidon-synthétases solubles, nous avons produit et analysé la lignée triple mutante *ss1- ss2- ss3-*. Nous présenterons uniquement ici, les analyses de composition en amylose et amylopectine de l'amidon résiduel, ainsi que l'étude de la distribution de longueur de chaînes de l'amylopectine avant et après β -amylolyse. Les autres résultats concernant cette lignée sont inclus dans l'article présenté dans la deuxième partie des résultats de ce mémoire.

*I. Construction de la lignée *ss1- ss2- ss3-**

Les allèles utilisés pour la construction de cette lignée sont *Atss2-3* (Zhang et al., 2008) (FST : 549A11), *Atss3-3* (David Delvallé, thèse de Doctorat, 2005) (FST : 117H05) et *Atss1-1* (Delvallé et al., 2005) (FST : 203C08). Ils proviennent de la collection de mutants produite à l'INRA de Versailles et correspondent au fond génétique WS. Ils entraînent tous l'incapacité pour les lignées correspondantes de synthétiser les ARNm normaux. La lignée triple mutante a été obtenue par croisement des lignées *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*, présentées dans le chapitre précédent. Les progénitures des lignées homozygotes pour la mutation *ss1-*, et hétérozygotes pour les deux autres mutations, ont été criblées par PCR et le nombre des plantes triples homozygotes identifiées suivait approximativement le ratio attendu de la ségrégation Mendélienne (pour la structure des gènes et les amorces utilisées, voir la figure 22).

II. Effet des trois mutations sur la composition et la structure de l'amidon

L'amylose et l'amylopectine des amidons mutant et sauvage ont été séparés par chromatographie d'exclusion stérique (figure 34). La $\lambda_{\max}$ du pic correspondant à l'amylose dans l'amidon triple mutant est d'environ 650 nm (figure 34A). Cette valeur est plus élevée que celle mesurée pour l'amylose de l'amidon sauvage (environ 630 nm) (figure 34B), ce qui traduit une augmentation globale de la longueur des glucanes de l'amylose dans le triple mutant. La structure de l'amylopectine semble par ailleurs, drastiquement modifiée. En effet la $\lambda_{\max}$ mesurée pour le pic correspondant est de 615 nm alors qu'elle oscille autour de 565 nm pour l'amylopectine du sauvage.

Cette forte augmentation de λ_{max} indique que la moyenne de la taille des glucanes de l'amylopectine du mutant est augmentée. Ceci est probablement dû au fait qu'en l'absence des SS1, SS2 et SS3, la quantité de substrat disponible augmente pour la GBSS1 (qui catalyse l'élongation des longues chaînes de l'amylose) ou la SS4 (dont l'activité catalytique reste à déterminer).

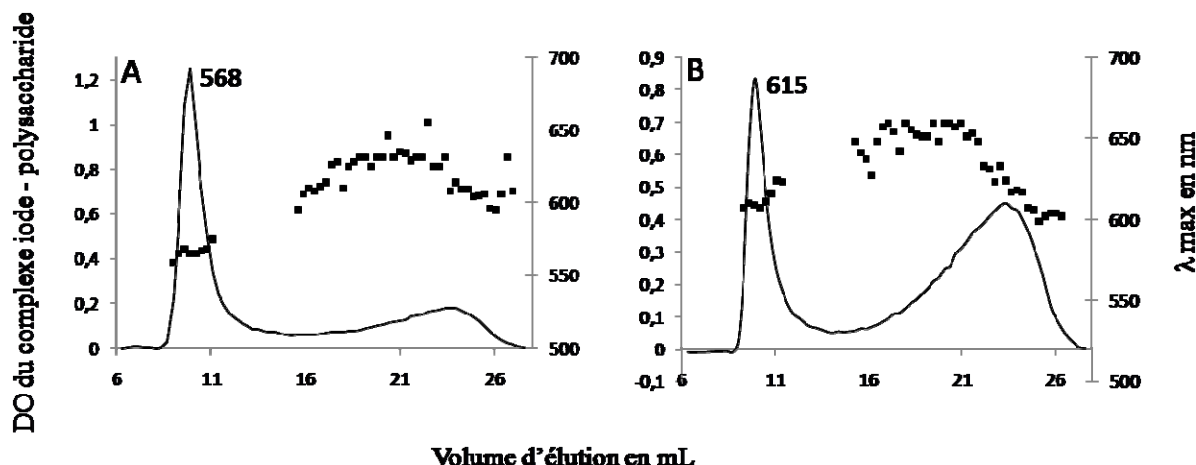


Figure 34: Profils d'exclusion stérique des polysaccharides contenus dans les amidons WS et *ss1- ss2- ss3-*. L'amidon extrait de plantes sauvages et mutantes est dissous par chauffage à 100 °C dans du DMSO. L'amylose et l'amylopectine sont séparés par chromatographie sur une matrice de Sepharose CL-2B. Les quantités de polysaccharides présents dans chaque fraction sont estimées par mesure de l'absorbance du complexe iode-polysaccharide après ajout d'une solution de I₂ / KI. Pour chaque fraction, le spectre d'absorption du complexe est déterminé entre 500 et 700 nm. La courbe noire continue indique la valeur de l'absorbance maximale alors que la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe est rapportée par les points noirs. La λ_{max} de l'amylopectine est indiquée à côté du pic. A : WS. B : *ss1- ss2- ss3-*.

La distribution de longueur des glucanes de l'amylopectine de la lignée triple mutante a également été étudiée avant et après β -amylolyse (figure 35). La figure 35A représente le profil de distribution de longueur de chaîne de l'amylopectine triple mutante. La courbe rouge est la différence entre le profil mutant et le profil sauvage présenté dans la figure 29A. Les valeurs positives sur cette courbe indiquent une augmentation de la proportion des chaînes de taille correspondante et inversement. Les proportions des glucanes de DP 5 à 9 et de DP 17 à 20 sont augmentées comme dans respectivement les amylopectines des mutants *ss2-* et *ss1-* (figures 29B et C). La figure 35B représente le profil de l'amylopectine *ss1- ss2- ss3-* après β -amylolyse. La différence entre les profils après et avant β -amylolyse pour l'amylopectine mutante est présentée dans la figure 35C. Ce différentiel permet d'évaluer la susceptibilité de chaque population de glucanes en comparaison avec le différentiel correspondant au sauvage qui est représenté dans la figure 32A. Il indique que les glucanes de DP 7, dont la proportion au sein de l'amylopectine est augmentée, se trouvent en position externe (type A et/ou B1). Le profil de la figure 35D est la

différence entre les profils de l'amylopectine mutante et de l'amylopectine sauvage après β -amylolyse, et représente les modifications de structure du squelette de l'amylopectine *ss1- ss2- ss3-*. Les modifications observées suivent la même tendance que celle du squelette des amylopectines *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* (figures 33D et E) avec une proportion en chaînes de DP 6 plus importante.

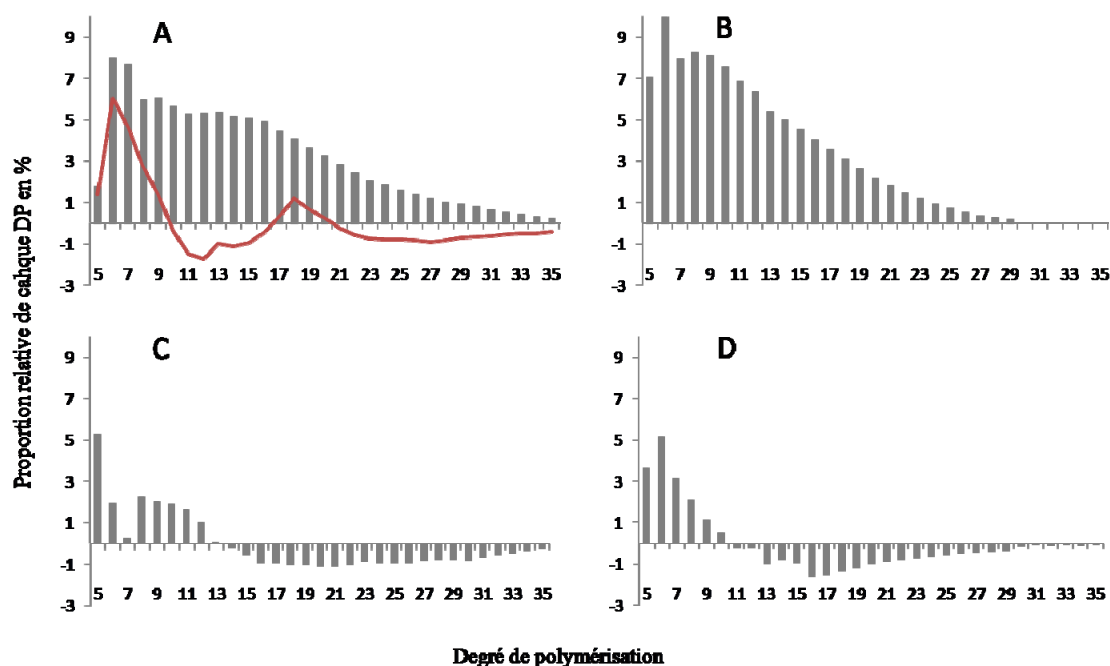


Figure 35 : Distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine *ss1- ss2- ss3-*. Après purification sur colonne de CL-2B, l'amylopectine est digérée ou non par la β -amylase, puis débranchée par une isoamylase d'origine bactérienne. Le produit de la digestion est analysé par HPAEC-PAD. Les proportions relatives de chaque type de glucane au sein de la population totale analysée sont exprimées en %. A : Profil de distribution de la longueur des glucanes de l'amylopectine mutante avant β -amylolyse. La courbe rouge représente la différence entre le profil du mutant et celui du sauvage (figure 29A). B : Profil de l'amylopectine mutante après β -amylolyse. C : Différentiel des profils mutants avant (figure A) et après β -amylolyse (figure B). D : Différentiel des profils sauvage (figure 31A) et mutant (figure B) après β -amylolyse.

Partie 2 :

Etude de l'implication de la SS3 et de la SS4 dans l'initiation de la biosynthèse d'amidon

Contribution au travail

Dans cette partie, nous présentons l'analyse phénotypique des doubles mutants *ss1- ss4-*, *ss2- ss4-*, *ss3- ss4-* et des triples mutants *ss1- ss2- ss4-*, *ss1- ss2- ss3-*. Nous rapportons par ailleurs, la caractérisation enzymatique des protéines SS3 et SS4 recombinantes produites en système hétérologue. Enfin, nous présentons l'étude de la localisation subcellulaire de la SS4 fusionnée à la GFP par microscopie confocale. Ces études nous ont permis de mettre en lumière l'implication des isoformes SS3 et SS4 dans l'initiation de la biosynthèse de l'amidon.

Ce travail est présenté sous la forme d'un article que je cosigne en premier auteur, actuellement sous presse dans la revue *The Plant Cell*. Ma contribution a été de produire les combinaisons doubles mutantes *ss1- ss4-* et *ss2- ss4-* et les combinaisons triples mutantes *ss1- ss2- ss3-* et *ss1- ss2- ss4-*. J'ai réalisé l'étude de la composition de l'amidon dans l'ensemble des lignées mutantes présentées, ainsi que la détermination des répartitions de longueur des glucanes de l'amylopectine, et contribué à l'analyse des activités enzymatiques du métabolisme de l'amidon. J'ai par ailleurs, participé, au cours de trois séjours à l'IBVF de Séville dans l'équipe du Dr. Angel Merida (pour une durée totale de 8 mois), à la caractérisation enzymatique de la SS3 et de la SS4 ainsi qu'à l'étude des contenus en amidon dans les différentes lignées.

Starch granule initiation in *Arabidopsis* requires the presence of either Class IV or Class III starch synthase

Nicolas Szydlowski^{b1}, Paula Ragel^{a1}, Sandy Raynaud^a, M. Mercedes Lucas^c, Isaac Roldán^a, Manuel Montero^e, Francisco José Muñoz^e, Miroslav Ovečka^f, Abdellatif Bahaji^e, Véronique Planchot^d, Javier Pozueta-Romero^e, Christophe D'Hulst^b, and Ángel Mérida^{a2}

a. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. CSIC-US. Avenida Américo Vespucio 49. Isla de la Cartuja, 41092-Sevilla (Spain).

b. Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 CNRS/USTL, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, (France).

c. Instituto de Recursos Naturales. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. c/ Serrano 115bis, 28006-Madrid (Spain).

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

e. Instituto de Agrobiotecnología (CSIC, UPNA, Gobierno de Navarra). Mutiloako etorbidea zenbaki gabe, 31192 Mutiloabeti, Nafarroa, (Spain).

f. Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dubravská cesta 14, SK-84523 Bratislava, Slovakia.

1. These authors contributed equally to this work and should be considered as first authors.

2. Address correspondence to angel@ibvf.csic.es (Ángel Mérida).

Abstract

The mechanisms underlying the initiation process of a new starch granule remain unknown. We have recently reported that the defect in soluble starch synthase IV (SSIV) in leaves of *Arabidopsis thaliana* restricts the number of starch granules to a single, large, molecularly unmodified particle per plastid, thereby defining an important component of the starch priming machinery. In this work we provide further evidence for the implication of SSIV in the priming process of starch granule formation and show that SSIV is necessary and sufficient to establish the correct number of starch granules observed in wild-type chloroplasts. The role of SSIV in granule seeding can be replaced, in part, by the phylogenetically related SSIII. Indeed, the simultaneous elimination of both proteins prevents *Arabidopsis* from synthesizing starch, thus demonstrating that other starch synthases cannot support starch synthesis despite remaining enzymatically active. Herein we describe the substrate-

specificity and kinetic properties of SSIV and its sub-chloroplastic localization in specific regions associated with the edges of starch granules. The overall data presented in this work point to the existence of a complex mechanism of starch granule formation and the different abilities of SSIV and SSIII to support this process in *Arabidopsis* leaves.

Introduction

Starch and glycogen are the most widespread glucose-based reserve polymers in living cells. Both polysaccharides share the common feature of being composed of linear chains of (1→4)-linked α -D-glucose residues, which are interlinked by (1→6) α -D-glucosidic linkages, whereas other characteristics displayed by these polymers are completely different. Thus, glycogen is a homogeneous water-soluble polymer whose unit particles are less than 50 nm in diameter (Manners, 1991), whereas starch accumulates in the form of a huge water-insoluble quaternary structure complex (from 0.1 to over 50 μ m in diameter depending on botanical or tissue origins) composed of two structurally distinct polysaccharides. The major component, which comprises around 75% of the starch dry weight, is amylopectin, which contains around 5% of non-randomly distributed α (1→6) glycosidic bonds. The clustered nature of the α (1→6) branch-points allows glucan side-chains to form double-helical structures and confers semi-crystallinity to amylopectin. The minor component of starch is amylose, an almost unbranched polymer of α (1→4)-linked glucose residues (Buleon et al., 1998).

Glycogen (GS) and starch synthases (SS) are involved in the elongation of the linear chains of glycogen and starch respectively, by catalyzing the transfer of the glucosyl moiety of the activated glucosyl donor (UDP-glucose or ADP-glucose, depending on the organism in question) to the nonreducing ends of a preexisting α (1→4) glucan primer (for a review, see (Ball and Morell, 2003). An enzyme, known as glycogenin, participates in the initiation of glycogen primer formation in yeast, fungi and mammalian cells. Glycogenin synthesizes an α (1→4)-linked glucan covalently bound to a tyrosine residue of the protein from UDP-glucose (Alonso et al., 1995; Cao et al., 1995). The glycogenin-linked maltooctasaccharide thus formed is used as a primer by GS for further elongation. The priming process in bacterial glycogen seems to be controlled by the GS itself, which apparently displays a self-glucosylating activity that results in a GS-linked maltooligosaccharide which then becomes the substrate for further GS-catalyzed glucan elongation (Ugalde et al., 2003). In contrast, almost nothing is known about the biochemical and physical processes underlying the initiation of starch granule formation. It has been proposed that debranching enzymes (essentially

isoamylases) may play a role in controlling the number of starch granules in barley endosperm (Burton et al., 2002) and in potato tuber (Bustos et al., 2004), although it now seems clear that debranching enzymes are not directly involved in the priming of starch synthesis (Delatte et al., 2005; Wattebled et al., 2005; Streb et al., 2008; Wattebled et al., 2008). More recently, Satoh et al. (2008) have suggested that starch phosphorylase is involved in starch biosynthesis together with a hypothetical, and as yet unidentified, factor X. However, evidences concerning the role of these proteins in the initiation of starch granule formation is still lacking. Finally, the fact that *Arabidopsis* mutants lacking SS class IV (SSIV) are unable to synthesize more than one starch granule per chloroplast has been considered as a clear indication that SSIV is probably involved in the initiation of starch granule formation (Roldán et al., 2007).

Five distinct classes of SS are known in all plants: granule-bound SS (GBSSI), which is responsible for the synthesis of amylose, and SS classes I, II, III, and IV (SSI, SSII, SSIII, and SSIV). These classes are broadly conserved in plant species, thus suggesting that their specific functions have been selected during evolution. Mutational analyses corroborate this hypothesis, as elimination of a specific class results in the alteration of one or more starch features, such as amylopectin structure, amylopectin/amylose ratio, shape, morphology or number of starch granule (Craig et al., 1998; Delvallé et al., 2005; Zhang et al., 2005; Roldán et al., 2007; Zhang et al., 2008). Thus, SSs do not substitute fully one for another.

We have previously characterized *Arabidopsis* mutant plants lacking SSIV (Roldán et al., 2007). The elimination of SSIV determines that chloroplasts accumulate only one large starch granule in most of the cases. However, the molecular structure of the residual starch (amylose content, amylopectin chain length distribution etc...) is not modified when compared with wild-type (WT) starch. Taken together, our data showed that SSIV is necessary for the synthesis of the regular number of starch granules observed in WT chloroplasts and suggested that SSIV may play a role in the initiation process of starch granule synthesis. The loss of SSIV does not, however, prevent starch granules formation in chloroplasts, thereby suggesting a certain degree of redundancy in the function of SSIV.

In this work, we have analyzed different combinations of SSs mutations in an *ssIV* mutant background in order to identify the activity responsible for the formation of starch granules found in *ssIV* mutant plants and show that only the simultaneous elimination of SSIII and SSIV completely abolishes starch synthesis in *Arabidopsis*. In addition, by the production and analysis of several combinations of SSs mutations, we show that SSIII or SSIV are sufficient to allow the synthesis of

starch, although SSIV is mandatory to produce the regular number of starch granule found in WT plants. The results presented in this work are therefore consistent with the idea that SSIV participates in the initiation of starch granule formation. This function can only be partially substituted by SSIII.

RESULTS

Starch synthesis in ssI-ssIV, ssII-ssIV, and ssIII-ssIV double mutants

Arabidopsis double mutant plants lacking SSIV activity and each one of the other SS activities were selected by crossing the respective single null, knock-out mutants described previously: *ssIV-1* (Col-0 ecotype) and *ssIV-2* (WS ecotype) (Roldán et al., 2007), *ssIII-1* (Col-0 ecotype) (Zhang et al., 2005), *ssII-3* (WS ecotype) (Zhang et al., 2008), and *ssI-1* (WS ecotype) (Delvallé et al., 2005) or selected for this work: *ssIII-2* (WS ecotype; line DSC44, FTS 117H05 from the mutant collection INRA of Versailles, France). Homozygous double mutants were identified by PCR amplifications of WT and mutants alleles of the corresponding genes (see Supplemental Table 1 for a detailed description of the primers used) and selected for further studies.

Plants were cultured under 16-hours day/8-hours night photoperiod conditions and starch levels in leaves were determined in the different double mutants and compared to their respective parental lines and WT ecotype plants over a diurnal cycle (Figure 1). The decrease in the levels of starch accumulated in *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV* double mutants was found to be equal to the sum of the decreases found in their respective single mutant parental lines (Figure 1A and 1B).

Supplemental Table 1: Starch synthase genes, mutant lines and primers used to select mutant alleles

Gene AGI code	Line identifier/mutation	Primers used in this work (5'-3')	Ecotype	Reference
SSI At5g24300	Genoplante_203C08/ insertion at intron 1	Fwd: TTTCCGTCGATCGCCAGTCTC Rev: TACGCCAAAGTCAGCCATTACAA Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	WS	Delvallé et al (2005)
SSII At3g01180	Genoplante_549A11/ insertion at exon 8	Fwd: GGGGACCGGTAGATGATTTTC Rev: CGGTGCTCCATCACCCTAAC Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	WS	Zhang et al. (2008)
SSIII At1g11720	SALK_065732/ insertion at exon 13	Fwd: AAAGGGCACAAGCTCAAGTTC Rev: TCTTGCTCCATCACCCTCTT Lba1 (T-DNA): TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	Col	Zhang et al (2005)
	Genoplante_117H05/ insertion at exon 12	Fwd: ATACGGCGCTGTTCTGTTGTTA Rev: ATTCATCTTAGAGCTTCCATTTTA Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	WS	This work
SSIV At4g18240	GABI_290D11/ insertion at exon 11	Fwd: CATTGTAACAACCGTGTCCCC Rev: GTTGTTCAATACCTTCAAATTCCC GABI-1 (T-DNA): CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	Col	Roldán et al. (2007)
	Genoplante_559H08/ insertion at intron 1	Fwd: AACCCATGGATTAGCAGGAA Rev: CAAATGGGAAATGAAAGGAAC Tag5 (T-DNA): CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	WS	Roldán et al. (2007)

A different situation was found for the *ssIII-ssIV* double mutant, where the parental lines accumulated 122% (*ssIII*) and 62% (*ssIV*) of starch determined in WT plants by the end of the light period, in accordance with previous results described by Zhang et al. (2005) and Roldán et al. (2007). However, the *ssIII-ssIV* double mutant did not accumulate measurable amounts of starch throughout the day/night cycle (Figure 1C).

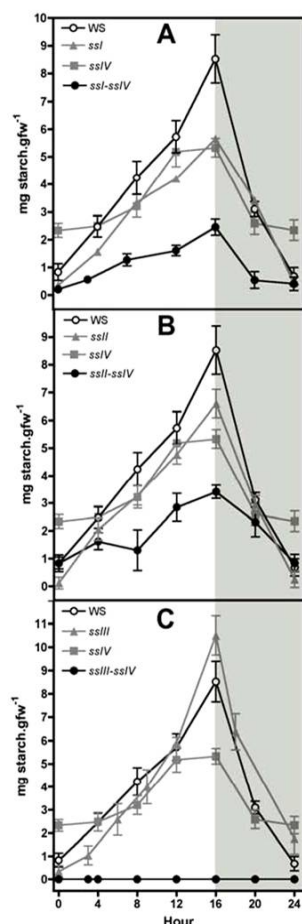


Figure 1. Starch accumulation in leaves of wild type, *ssI-ssIV* (A), *ssII-ssIV* (B), and *ssIII-ssIV* (C) double mutants and their respective parental lines during a day/night cycle. Plants were cultured under a 16h light/8 h dark photoperiod for 21 days and then one leaf was collected from three plants for each line at the indicated time. The starch content in these leaves was determined by enzymatic assay as described in the Materials and Methods section. Each point is the mean $\pm$ standard error from three independent experiments. Open and gray areas in the graph correspond to day and night respectively.

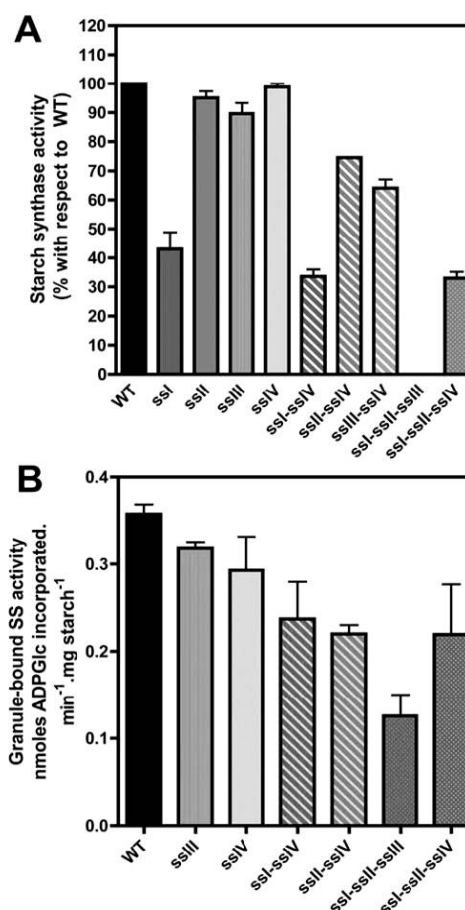


Figure 2. Starch synthase activities of the different double and triple *ss* mutants. Leaves from three-week-old plants were collected at midday. The material was disrupted using a tissue homogenizer in the presence of 50 mM Hepes, pH 7.6 and proteases inhibitor cocktail. The crude extract was centrifuged for 15 min at 13.000 x g and 4°C and the total soluble starch synthase activity (Panel A) and granule-bound starch synthase activity (Panel B) were determined in the supernatant and the purified starch granule, respectively, as described in the Materials and Methods section. Data in Panel A are presented as percentage of activity found in wild-type plants. Each point is the mean $\pm$ standard error from three independent experiments.

This result was corroborated using two different methods of starch purification as described in Materials and Methods. These data suggest that an active class III or class IV SS is mandatory to allow the synthesis of transitory starch in *Arabidopsis* leaves. This requirement did not lead to the loss of any other activity of the starch biosynthesis pathway. As can be seen in Figure 2A, the decrease of SS activities observed in the *ssI*, *ssII* and *ssIII* single mutant plants are slightly potentiated in the *ssIV* mutant background, but SSI and SSII are active in the double *ssIII-ssIV* mutant, accounting for approximately 65% of the SS activity of WT plants (Figure 2, Supplemental Figure 1). The activity of other starch metabolism enzymes, such as phosphoglucomutase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch branching, remained unaffected in the different double mutants (Table 1, Supplemental Figures 1 and 2). The SS activity bound to the starch granule decreased slightly in *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV* mutants (Figure 2B), whereas an increase in α -glucan phosphorylase activity, which was especially significant in the *ssIII-ssIV* mutants (more than 8-fold the activity in WT plants), was detected in all the double mutants (Figure 3). An increase in β -amylase activity was also observed in the *ssIII-ssIV* mutant plants (Table 1); this is a common feature of other starch-less mutants affected in other steps of the starch biosynthetic pathway (Caspar et al., 1989).

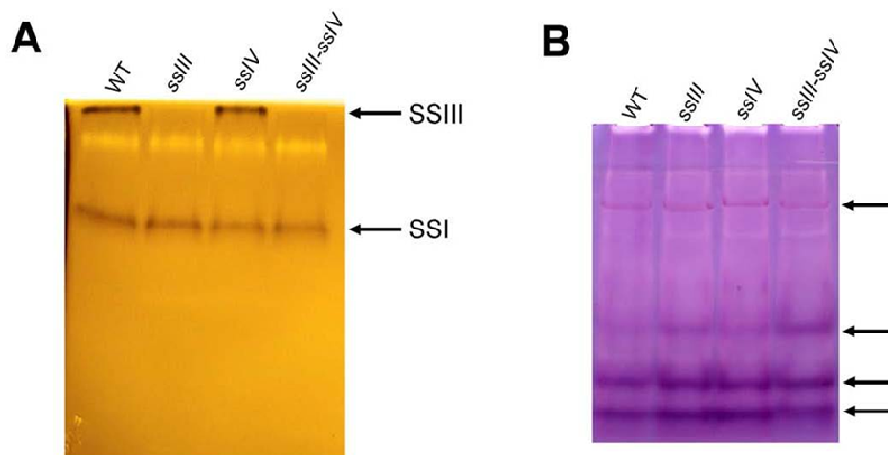
Table 1. Activity of starch-related enzymes in wild-type and *ssIII-ssIV* double mutant

Enzyme	Wild type	<i>ssIII-ssIV</i>
AGPase (biosynthetic assay) ^a	44.95±7.3	47.88±5.4
Starch branching enzyme ^b	168±14.6	173±10.7
α -amylase ^c	0.218±0.05	0.247±0.03
β -amylase ^d	0.90±0.001	2.65±0.02

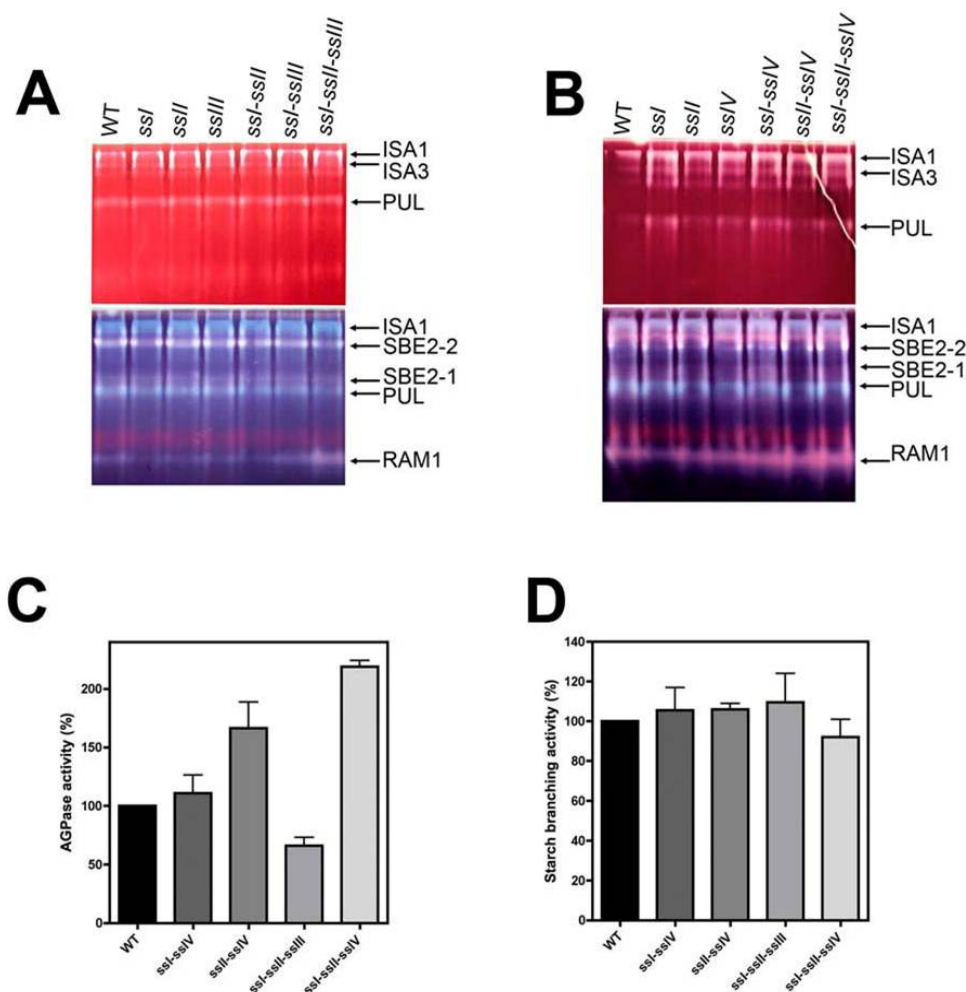
^a Activity defined as nmol of ADP-glucose formed.min⁻¹.mg protein⁻¹. ^b Activity is measured as the stimulation of the incorporation of carbon-14 from ¹⁴C-glucose 1- phosphate into glucan by phosphorylase and is given in nmol.min⁻¹.mg protein⁻¹. ^c Ceralpha units. ^d Betamyl units. Values are the mean±standard error of three independent determinations.

Photosynthetically fixed carbon was not diverted to the synthesis of a soluble glucan in the *ssIII-ssIV* mutant, as no increase in water-soluble polysaccharides (WSP) was observed in this plant (Figure 4). The starch-less phenotype of this mutant plant might be the consequence of an increased starch turnover, however this idea is not supported by the levels of maltose detected in the *ssIII-ssIV* double mutant, which were not significantly different from those found in WT plants (Figure 4).

Finally, a clear increase in the intracellular levels of sucrose (1.5 times) and, in particular, glucose (3.5 times) and fructose (7 times) was found (Figure 4), which is characteristic of starch synthesis impairment (Caspar et al., 1985).



Supplemental Figure 1. Starch synthase and phosphoglucomutase activity of *ssIII-ssIV* double mutant using native PAGE. Leaves from wild-type, and *ssIII*, *ssIV*, and *ssIII-ssIV* mutant plants were used to prepare crude extracts as described in the Materials and Methods section: 150 µg of total protein was loaded in each lane. **A)** Detection of starch synthase isoforms in glycogen-containing gels. After electrophoresis, the gel was incubated overnight in a medium containing 2 mM ADP-glucose and then stained with iodine solution to reveal dark bands where starch synthase had elongated linear chains. Only bands corresponding to SSI and SSIII activities are visible with this technique. **B)** Detection of phosphoglucomutase activity. After migration the gel was incubated at room temperature in the following buffer: Tris/HCl 200 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, MgCl₂ 50 mM, glucose-1-phosphate 15 mM, NAD 0.5 mM, NADP 0.25 mM, glucose-1,6-diphosphate 0.05 mM, 17 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT), 1 mM, 5-methyl-phenazinium methyl sulfate (PMS) 0.5 mM. The reaction was stopped after incubation for 1h at room temperature. The arrows indicate bands corresponding to the activity of the different phosphoglucomutase isoforms.



Supplemental Figure 2. Analysis of the activities of starch metabolism enzymes in different *ss* mutant plants. Leaves from three-week-old wild type and *ss* mutant plants were harvested at midday and disrupted using a tissue homogenizer in the presence of 50 mM Hepes, pH 7.6 and proteases inhibitor cocktail. The crude extract was centrifuged for 15 min at 13.000 x g and 4°C and the supernatant was used to determine the activity of starch metabolism enzymes using *in vitro* or zymograms assays. **A)** Starch modifying activities (hydrolases, branching enzymes) using native PAGE. 100 µg of proteins from crude leaf extracts was loaded onto native PAGE (7.5% acrylamide) containing soluble potato starch (0.3% final concentration). After migration (under native conditions for 3h at 56 4°C at 15V.cm⁻¹), the gel was incubated overnight at room temperature in the following buffer: Tris/HCl 100 mM pH 7.0, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, DTT 1 mM. Starch modifying activities were revealed by iodine staining. **B)** Starch debranching activities visualized using native PAGE zymograms. Debranching enzymes were tested on glucan-containing gels as follows: 100 µg of leaf extract proteins was loaded onto a native PAGE (7.5% acrylamide) containing soluble potato starch (Sigma) at 0.3% final concentration and separated for 3 h at 4°C and 15 V.cm⁻¹. The gels were incubated overnight at room temperature in the following buffer: 50 mM sodium citrate pH 6.0, 5 mM DTT, 50 mM Na₂HPO₄. The activities were revealed by soaking the gel in iodine solution (I₂ 0.2% w/v and KI 2% w/v). **C)** ADP-glucose pyrophosphorylase activities of wild-type and different *ss* mutant plants. Activity was determined in the synthesis direction as described in the Materials and Methods section. **D)** Starch branching activities of wild type and different *ss* mutant plants. Values are expressed as percentage of the respective activity determined for wild-type plants and represent the mean of three independent experiments. Vertical bars: standard error.

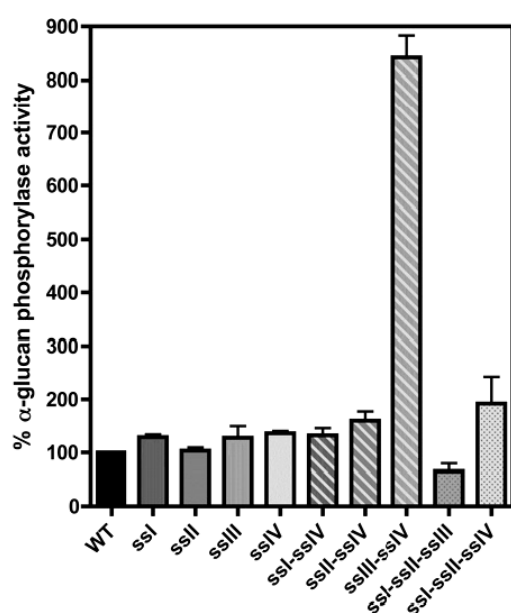


Figure 3. α -Glucan phosphorylase activity of the different double and triple *ss* mutants. Leaves from three-week-old plants were collected at midday. The material was disrupted using a tissue homogenizer in the presence of 50 mM Hepes, pH 7.6 and a proteases inhibitor cocktail. The crude extract was centrifuged for 15 min at $13.000 \times g$ and 4°C and the total α -glucan phosphorylase activity was determined as described in the Materials and Methods section. Data are presented as percentage of activity found in wild-type plants. Each point is the mean $\pm$ standard error from three independent experiments.

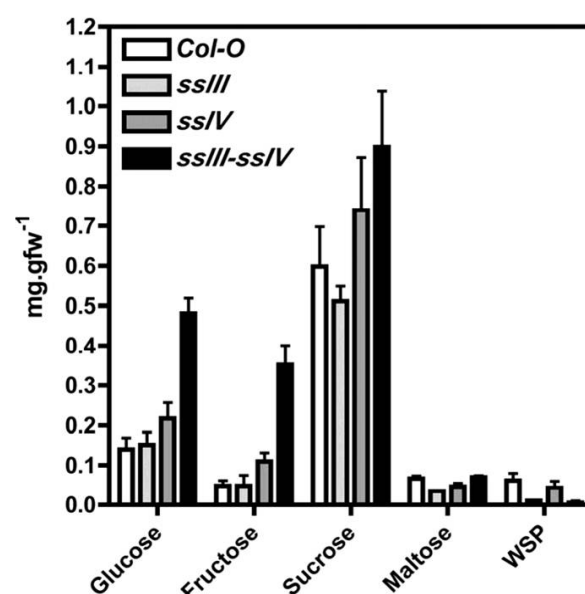


Figure 4. Sugar content in leaves of *ssIII-ssIV* double mutant, its parental lines and wild-type plants. Leaves from plants cultured under a 16h light/8 h dark photoperiod were collected at midday and their of sucrose, glucose, fructose, maltose and water soluble polysaccharides (WSP) contents determined as described in the Materials and Methods section. Each point is the mean $\pm$ standard error from four independent experiments.

Structural analysis of starch in double mutants

Light and transmission electron microscopy (TEM) analyses of leaves sections from the different double mutants corroborate the data shown in Figure 1, as no starch granules could be observed in the *ssIII-ssIV* mutant (Figure 5 J-L). In both *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV* mutants, a single large starch granule was found in most of the chloroplasts (Figure 5 D-I) in a similar way to that described for single *ssIV* mutants (Roldán et al., 2007). Moreover, and somewhat surprisingly, some chloroplasts seemed to lack starch granules as could be observed by periodic acid- Schiff's (PAS) carbohydrate-specific staining of sections of leaf samples harvested at the end of the photoperiod (Figure 5 E, H).

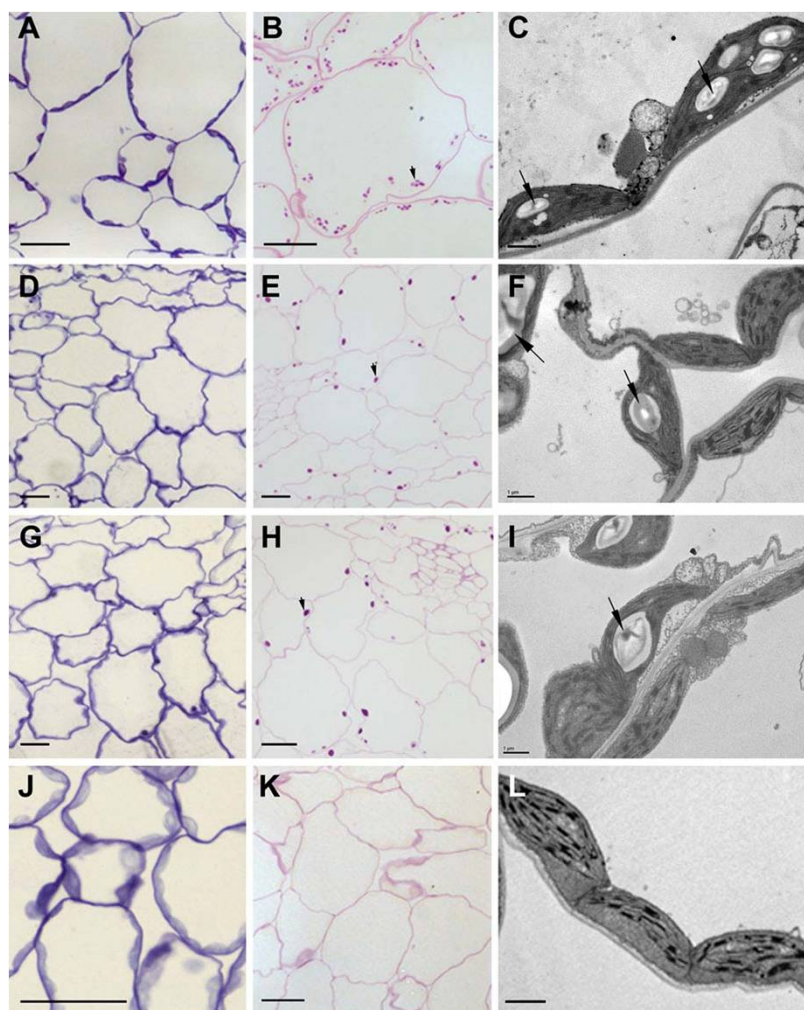


Figure 5. Microscopy analysis of sections of leaves from wt (A-B) and *ssIssIV* (D-F), *ssII-ssIV* (G-I), *ssIII-ssIV* (J-L) mutant plants. Light micrographs show tissue stained with toluidine-blue (A, D, G, J) and with the PAS reaction for carbohydrates (B, E, H, K). Transmission electron microscopy images (C, F, I, L) show the differences in the starch granule sizes of the plants. Samples were processed for microscopy and stained as described in the Materials and Methods section. Arrows indicate starch granule. Scale bars in A, B, D, E, G, H and J: 20 μ m; scale bars in C, F, L and I: 1 μ m.

Analyses of chain-length (CL) distribution for the amylopectin isolated from *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV* mutants showed that the alteration observed in the amylopectin structure was the sum of the alterations caused by the respective single mutations (Figure 6). These modifications were mainly due to the *ssI* and *ssII* mutations, as mutations in *SSIV* gene induce only marginal changes in CL distribution of amylopectin-forming glucans (Roldán et al., 2007). Our data indicate the absence of any synergy between the activity of SSIV and both SSI and SSII as regards the determination of amylopectin structure. This result strengthens the hypothesis that SSIV has no precise role in the determination of amylopectin structure (i.e. in the synthesis of glucan subpopulation of this polymer).

Synthesis of starch in *ssI-ssII-ssIII* and *ssI-ssII-ssIV* triple mutants.

The data obtained from double mutant analyses indicated that starch synthesis requires the presence of an active form of SSIII or SSIV. To investigate whether these enzymes were sufficient to

allow the synthesis of starch, we obtained the triple mutants *ssI-ssII-ssIII*, and *ssI-ssII-ssIV* by crossing the double mutants *ssI-ssII* x *ssI-ssIII* and *ssI-ssII* x *ssI-ssIV*, respectively. The soluble SS activity in *ssI-ssII-ssIV* mutant plants was $32 \pm 3\%$ of the activity determined in WT plants, whereas no soluble SS activity could be detected in *ssI-ssII-ssIII* mutant plants (Figure 2A) despite using different assay conditions were tested: glycogen, amylopectin or maltotriose as primer, presence or absence of citrate (an activator for some starch synthase enzymes, (Boyer and Preiss, 1979) or reducing agents such as dithiotreitol. Western blot analysis indicated that the absence of any measurable SS activity in the *ssI-ssII-ssIII* triple mutants was not the consequence of SSIV gene repression as the levels of SSIV protein were unaffected in this mutant (Supplemental Figure 3). Figure 7 shows that both triple mutants were still able to accumulate starch during the day and to mobilize it during the dark period, although the leaf starch content was strongly reduced in comparison to WT at the end of the illuminated period (19% and 30% for *ssI-ssII-ssIII* and *ssI-ssII-ssIV*, respectively).

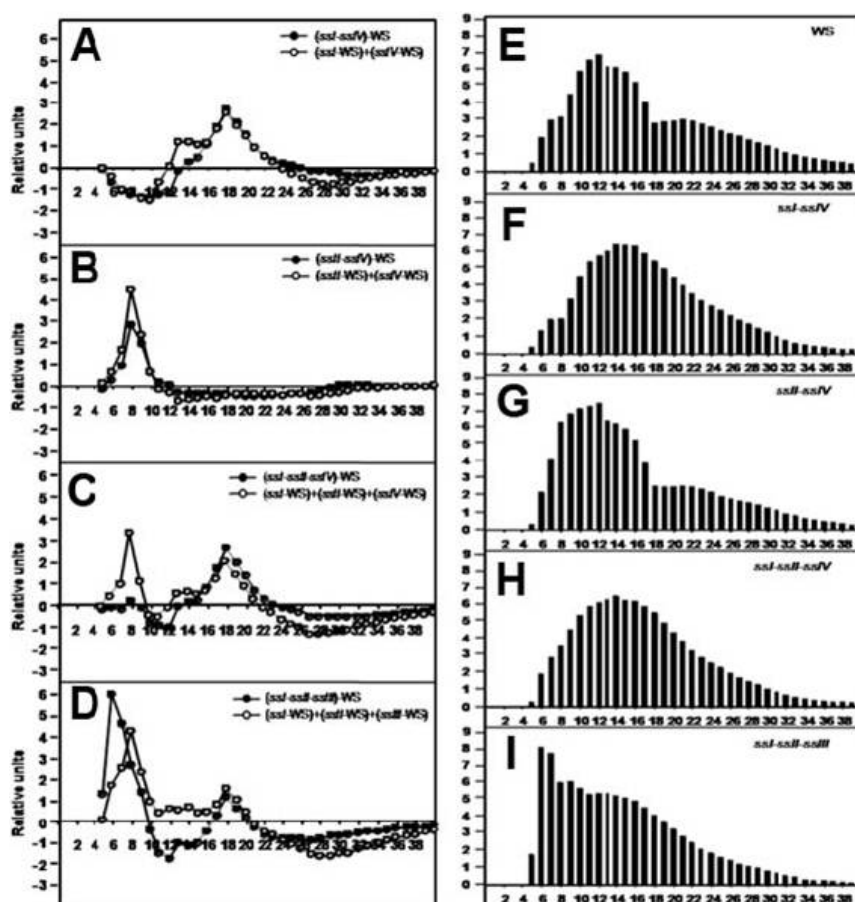


Figure 6. Amylopectin chain-length (CL) distribution profiles for *ss* mutants. Amylopectin was purified on a CL-2B column and subsequently debranched with a mix of isoamylase and pullulanase. The resulting linear glucans were analyzed by HPAEC-PAD. Panels A, B, C and D: the y-axes represent molar % difference: for each mutant the relative proportion for each glucan in the total population, expressed as a percentage of the total number of chains, was calculated and subtracted from the corresponding percentage of that glucan in wild-type amylopectin. The x-axes represent the degree of polymerization (DP) of the chains. The black circles correspond to observed values for each mutant plants and the open circles correspond to the predicted values resulting from the addition of the subtraction of the amylopectin CL distribution from their respective single mutant parental lines and wild type. Panels E, F, G, H and I: the y-axes represent the relative proportions for each glucan in the total population expressed as a percentage of the total number of chains. The values are the average of three independent experiments. The standard deviation was less than $\pm 15\%$ of the 29 average values. WS: wild-type plants ecotype WS.

Granule-bound starch synthase activity could be detected in starch granules of both mutants although at lower levels than those determined in WT starch granules (Figure 2B). An increase in the activity of α -glucan phosphorylase and ADPglucose pyrophosphorylase was detected in the *ssl-sslII-sslIV* mutant (Figure 3 and Supplemental Figure 2, respectively), whereas the level of α -glucan phosphorylase activity in *ssl-sslII-sslIII* mutant plants was lower than in the WT. Other starch-metabolizing activities were unaltered in these mutants (Supplemental Figure 2).

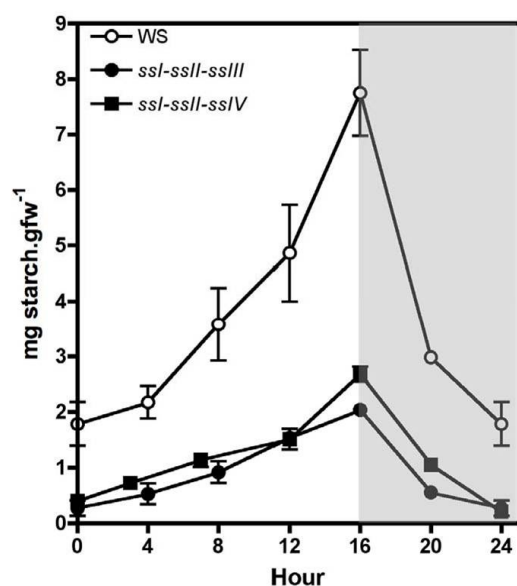
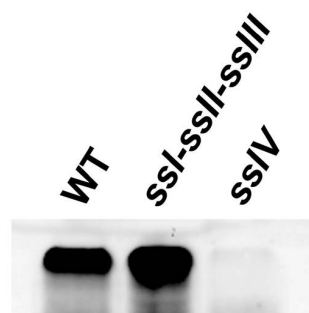


Figure 7. Starch accumulation in leaves of *ssl-sslII-sslIII* and *ssl-sslII-sslIV* triple mutants, and wild type plants during a day/night cycle. Plants were cultured under a 16h light/8 h dark photoperiod during 21 days and then one leaf was collected from three plants for each line at the indicated time. The starch content in the leaves was determined by enzymatic assay as described in the Materials and Methods section. The values are the average of three independent experiments. Vertical bars: standard error. The open and gray areas in the graph correspond to day and night respectively.



WT, *sslIV* and *ssl-sslII-sslIII* plants using antibody against SSIV protein. Western blot analysis of crude leaves extracts from WT, *sslIV* and *ssl-sslII-sslIII* mutant plants. Proteins (25 μ g) were separated by SDS-PAGE electrophoresis, transferred to nitrocellulose filters and immunolabelled with rabbit antiserum raised against a 178-amino-acid fragment of the N-terminal region of SSIV protein.

Starch structure in *SS* triple mutants

Microscopic analyses of leaves sections from *ssl-sslII-sslIV* mutant plants showed the presence of a single, large starch granule per chloroplast similar to that described for *ssl-sslIV* and *sslII-sslIV* mutants, (Figure 8 A-C), and that some chloroplasts lack visible starch granules, as confirmed by serial sections analyses (Supplemental Figures 4 and 5). In contrast, the chloroplasts of triple mutant

*ssI**ssII*-*ssIII* leaves displayed the normal number of starch granules observed in WT plants, although they were considerably smaller (Figure 8 D-E).

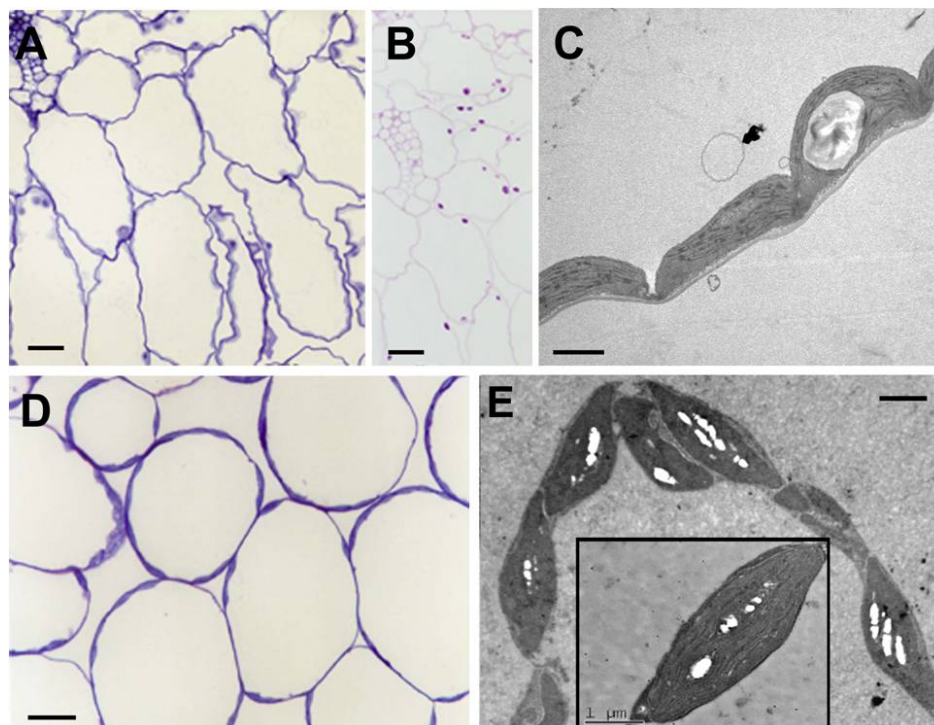
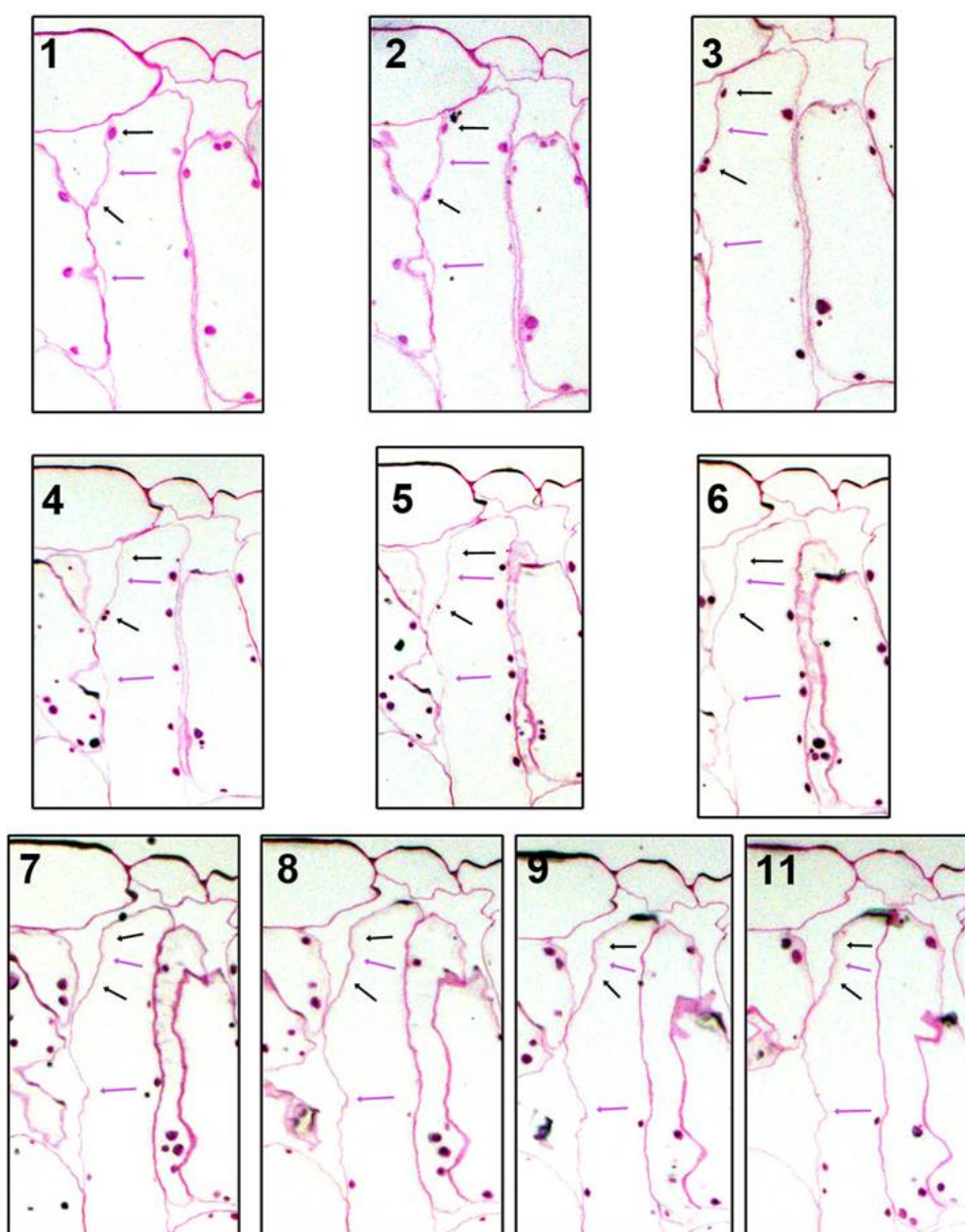
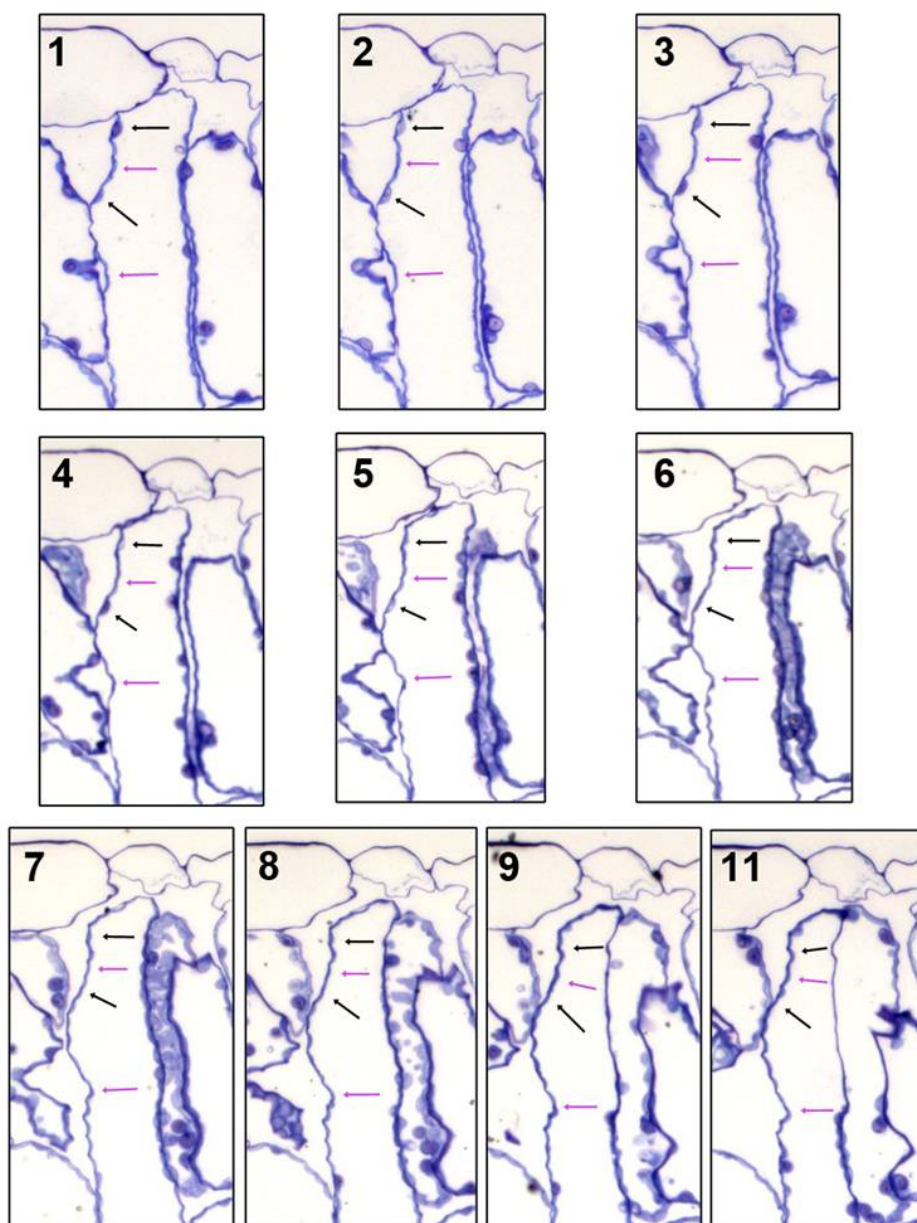


Figure 8. Microscopy analysis of sections of leaves from *ssI*-*ssII*-*ssIV* (A-C) and *ssI*-*ssII*-*ssIII* mutant plants (D-E). The light micrographs show tissue stained with toluidine-blue (A, D) and with the PAS reaction for carbohydrates (B). The transmission electron microscopy images (C, E) show the differences in the starch granule sizes of the chloroplasts. Scale bars in A, B and D: 20 μm; scale bars in C and E: 2 μm.

Starch from the *ssI*-*ssII*-*ssIV* and *ssI*-*ssII*-*ssIII* lines contained a high proportion of amylose (42% and 41% respectively), and the chain-length distribution analysis of the amylopectin-forming glucans showed a strong enrichment of glucans with a degree of polymerization (dp) of 5-9, with a maximum at dp 6, for the *ssI*-*ssII*-*ssIII* mutant (Figure 6D, I). A similar strong increase has been described for *ssII* and in *ssII*-*ssIII* *Arabidopsis* mutants (Zhang et al., 2008) and seems to be a general characteristic of the lack of class II starch synthase (Morell et al., 2003; Zhang et al., 2004) which is amplified when SSI or SSIII, or both, are also absent (although the increase at dp 6 is less pronounced in the latter case than in the double mutant). Conversely an overall depletion of the proportion of dp 11-35 glucans was observed in *ssI*-*ssII*-*ssIII*, except for dp 17-20 glucans, which showed a slight enrichment in this triple mutant (this seems to be a general feature of the lacks of SSI). This profile looks similar to that calculated from the profile of the corresponding single mutants although it is not identical (Figure 6D). This may point towards some overlapping functions between isoforms for the synthesis of amylopectin.



Supplemental Figure 4. Serial sections of *ssI-ssII-ssIV* triple mutant leaves stained with the periodic acid-Schiff's (PAS) reaction for carbohydrate. Leaves from three-week-old plant were collected at midday and fixed and embedded as described in the Materials and Methods section. Semi-thin (1 μ m) serial sections were stained with the PAS reaction for carbohydrates. The numbers in the panels indicate the order in the sections. The black arrows show starch granules completely dissected along the serial sections, whereas the pink arrows show areas containing chloroplasts without visible starch granules (see **Supplemental Figure 5**).



Supplemental Figure 5. Serial sections of *ssI-ssII-ssIV* triple mutant leaves stained with the PAS reaction for carbohydrates and toluidine blue. The same sections described in Supplemental Figure 4 were subsequently stained with toluidine blue in order to show the chloroplasts. The black arrows show starch granules completely dissected along the serial sections, whereas the pink arrows show areas containing chloroplasts without visible starch granules. *Arabidopsis* chloroplasts are lens-shaped, 5-10 μm in diameter and 4 μm thick (Mullet, 1988).

In the case of the *ssI-ssII-ssIV* triple mutants, the abundance of dp 10-13 and dp 16-21 amylopectin-forming glucans was lower and higher respectively, than for WT amylopectin. Glucans longer than dp 25 were less abundant in the triple mutant (Figure 6C, H). Again this profile is closely related to that calculated by the addition of the profiles from the respective single mutants with the

notable exception of the very short glucans (dp 5-9), whose abundance was unmodified in the triple mutant even though they were predicted to be more abundant than in WT (Figure 6C). Indeed, the *ssI-ssII-ssIV* mutant displays the same profile as the *ssI-ssII* double mutant (N. Szydlowski, unpublished results), thus again suggesting here again that SSIV is of low importance for the building of the amylopectin structure. The unmodified number of dp 5-9 glucans in both *ssI-ssII* and *ssI-ssII-ssIV* amylopectins is likely to be a consequence of the opposite effects observed in both *ssI* and *ssII* mutant amylopectins (Delvallé et al., 2005; Zhang et al., 2008), which cancel each other out. However these effects do not cancel each other in the absence of SSIII, thereby leading to a strong increase in the number of these very short glucans in the *ssI-ssII-ssIII* mutant, as is also the case in the *ssII-ssIII* double mutant (Zhang et al., 2008). This behaviour may be related to the collapse of a large protein complex (Hennen-Bierwagen et al., 2008), in which SSIII may be an essential component.

Enzymatic characterization of SSIV

The data shown above indicate that SSIV and SSIII have unique features that differentiate them from other SSs. In order to identify those features, we proceeded to characterize the enzymatic parameters of expressed and purified mature (without the chloroplast transit peptide) His6-tagged recombinant SSIII and SSIV proteins. To avoid interference by contaminating endogenous bacterial GS we employed *Escherichia coli* Δ glgCAP deletion mutants completely lacking a large part of the glycogen biosynthetic machinery (Morán-Zorzano et al., 2007). Recombinant SSIII and SSIV displayed activities of 58 ± 2.3 and 31 ± 3.4 nmol.min⁻¹.mg protein⁻¹ respectively using glycogen as primer and ADP-glucose as glucosyl donor. As shown in Table 2, the His-tagged recombinant SSIV protein could utilize both glycogen and amylopectin as acceptors of glucose residues, with K_m values for ADP-glucose as glucosyl donor of 0.47 mM (amylopectin as primer) or 0.96 mM (glycogen as primer). These values fall within the range of values determined for other SSs (<http://www.brenda-enzyme.info/>). As shown in Table 2, SSIV is specific for ADP-glucose as glucosyl donor and, unlike glycogen synthases from mammals or fungi, shows no activity when using UDP-glucose as substrate. The glucan-elongating activity of SSIV could also be visualized by native PAGE assay. As shown in Figure 9A, *E. coli*-expressed SSIV originated an activity band at the same position as that originated by SSIII, although no band corresponding to SSIV activity could be detected in crude leaves extracts using this zymogram assay (see Supplemental Figure 1).

Table 2. Values of activity and affinity for ADP-glucose of SSIV expressed in *Escherichia coli*.

Substrate	Activity	Km for ADP-glucose (mM)
Rabbit liver glycogen	31.4±3.4	0.96
Potato amylopectin	25.0±7.5	0.47
Rabbit liver glycogen + UDP-glucose	n.d.	n.a.

Activity is defined as the nmoles of glucose incorporated into α -glucan. min⁻¹. mg protein⁻¹. Values are the mean±standard error of three independent determinations. n.d. not detected. n.a. not applicable.

It is noteworthy that SSIII was able to synthesize linear glucans using ADP-glucose as substrate in the absence of any added primer, whereas SSIV could not, under the assay conditions tested (Figure 9A). Figure 9B shows that SSIV had high activity when using maltotriose as primer, displaying more than 90% of the activity observed with amylopectin with this maltooligosaccharide (MOS). SSIV could use other MOSs as primers, but with a much lower efficiency (around 15% and 20% of amylopectin-dependent activity for dp5 and dp7 respectively). SSIII also displayed a higher activity when maltotriose was employed as the MOS in the assay, but to a much lower extent than that observed for SSIV (around 3% of the activity detected using amylopectin as primer). The activity of SSIII using other MOSs as substrate was almost negligible (Figure 9B).

We could not detect any activity of SSIV protein in plant (mutant *ssI-ssII-ssIII*), even though this protein displays starch synthase activity *in vitro* and can lead the synthesis of glycogen in *E. coli*, as illustrated by the transformation of Δ *glgAP* *E. coli* strain (Supplemental Figure 6). These cells have normal ADP-glucose pyrophosphorylase activity, but lack both GlgA and glycogen phosphorylase (GlgP) activities (Morán-Zorzano et al., 2007). As expected, Δ *glgAP* cells displayed a glycogen-less phenotype (Supplemental Figure 6), which was complemented by *glgA* expression. SSIV expression partially complemented the glycogen-less phenotype of Δ *glgAP* cells, as confirmed by both qualitative and quantitative glycogen content analyses. SSIII also complemented the phenotype but to a lower extent (Supplemental Figure 6). SSIV-expressing Δ *glgAP* Δ *galU* cells (which lack the main producer of UDP-glucose in *E. coli*), accumulated as much glycogen as SSIV expressing Δ *glgAP* cells, thus corroborating the observation shown in Table 2 that SSIV uses ADP-glucose specifically as glucosyl donor.

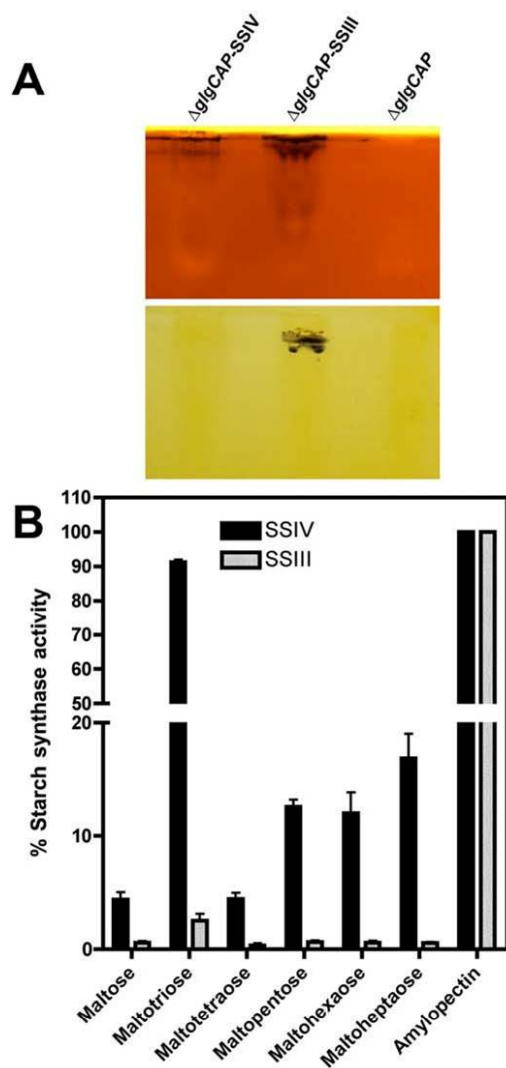
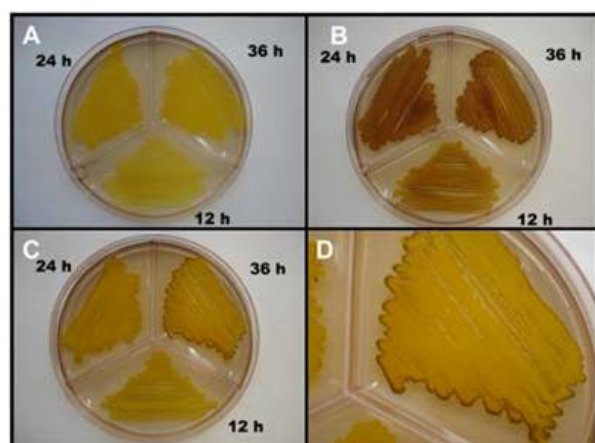
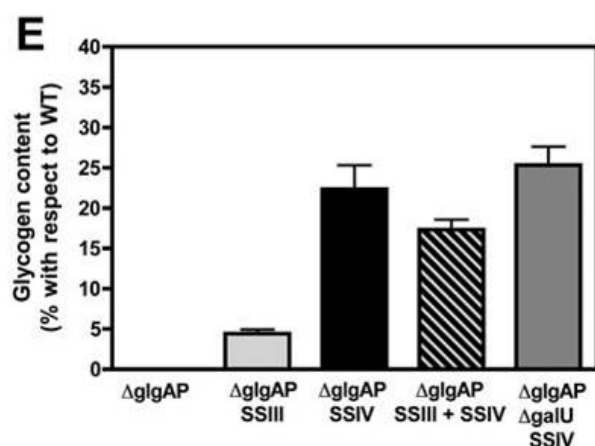


Figure 9. Activities of SSIII and SSIV with different glucans as primers. Purified fractions of *E. coli*-expressed SSIII and SSIV proteins were used to determine the activity of these proteins with different substrates and assay conditions. **A)** Detection of SSIII and SSIV activities in native PAGE containing glycogen (upper gel) or without glycogen (bottom gel). After electrophoresis, gels were incubated overnight in a medium containing 2 mM ADP-glucose and then stained with iodine solution to reveal dark bands where starch synthase had elongated linear chains. **B)** *In vitro* assays of SSIII and SSIV with different MOS and potato amylopectin as substrates. Values are expressed as a percentage of the activity determined using amylopectin as primer and are the mean±standard error of three independent experiments.

Complementation of the glycogen-less phenotype of Δ*glgAP* cells by SSIV or SSIII raises the question whether these proteins display self-glucosylating activity in a similar way to that described for bacterial glycogen synthase (Ugalde et al., 2003). Purified fractions of *E. coli* expressed SSIV and SSIII proteins were incubated with 50 μM ADP-[U-14C]Glucose (9.81 GBq/mmol) following the procedure described by Lomako et al. (1988). The incorporation of radioactive glucose into the SSs proteins was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. No radioactive band corresponding to SSIII nor SSIV proteins was detected, thereby indicating that these proteins do not display ADP-glucose dependent self-glucosylating activity under these experimental conditions.

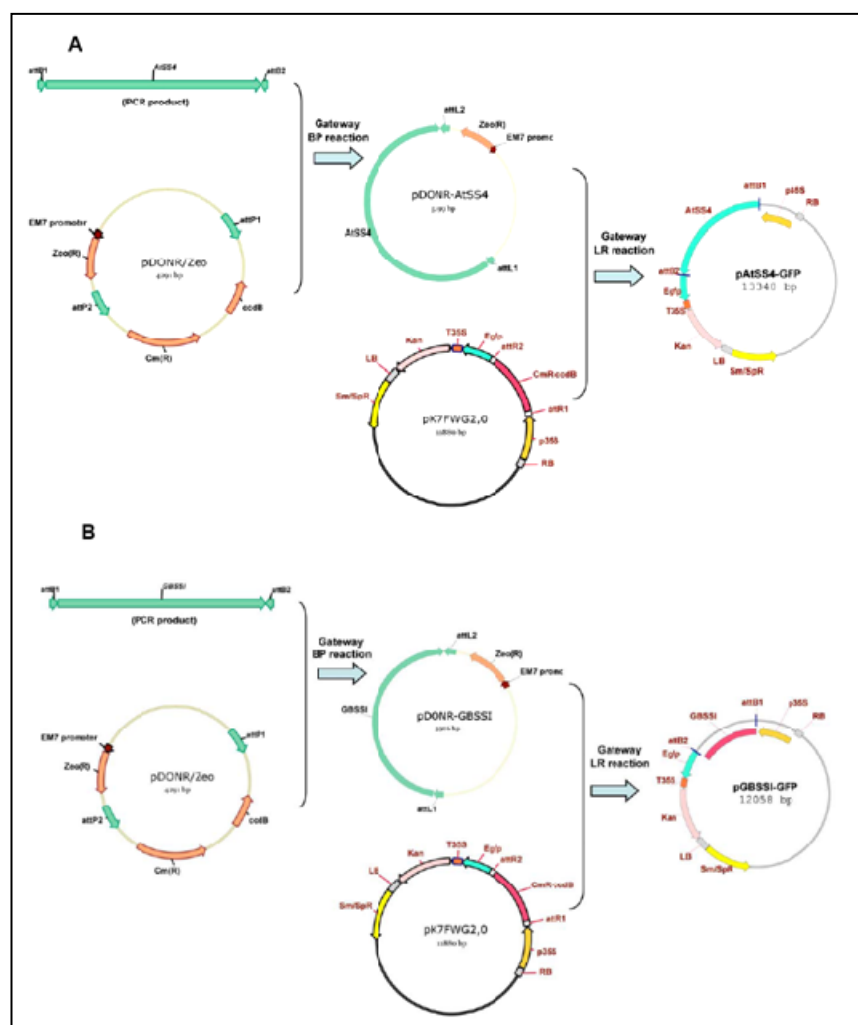


Supplemental Figure 6. SSIII and SSIV expression complement the glycogenless phenotype of $\Delta glgAP$ *E. coli* cells. Iodine staining of (A) $\Delta glgAP$ cells, (B) *glgA* expressing $\Delta glgAP$ *E. coli* cells and (C,D) SSIV-expressing $\Delta glgAP$ *E. coli* cells after incubation for 12h, 24 h and 36 h of incubation in solid Kornberg medium supplemented with 50 mM glucose. (E) Quantitative measurement of glycogen content in double $\Delta glgAP$ $\Delta galU$ *E. coli* cells, $\Delta glgAP$ *E. coli* cells and $\Delta glgAP$ *E. coli* cells expressing SSIII and/or SSIV.



SSIV localizes in specific areas associated with the starch granule

The data shown above indicate that SSIV is required to determine the correct number of starch granules found in chloroplasts of *Arabidopsis* leaves. In order to establish whether this feature correlates with a specific localization of SSIV in the chloroplast, we carried out confocal fluorescence microscopy analyses of *Arabidopsis* plants expressing full-length SSIV protein (including its predicted chloroplast transit peptide) fused with green fluorescent protein (GFP). These plants constitutively express the translationally fused SSIV-GFP encoding gene under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (Supplemental Figure 7).



Supplemental Figure 7. Stages required to construct the pSSIV-GFP (A) and pGBSSI-GFP (B) plasmids necessary to produce plants expressing SSIV and GBSSI fused with GFP, respectively.

Plants constitutively expressing potato adenosine diphosphate sugar pyrophosphatase fused with GFP (StASPP-GFP) (Muñoz et al., 2008), and plants expressing *Arabidopsis* GBSSI (full-length protein including its predicted chloroplast transit peptide) fused with GFP (GBSSI-GFP) (Supplemental Figure 7) were used as controls for stromal and starch granule localizations, respectively.

As shown in Figure 10F, the stromal marker StASPP-GFP was present among the grana in the central part of the chloroplast, as well as in the grana-free peripheral part of the chloroplast. In addition, GFP fluorescence labeled long stroma-filled tubular extensions corresponding to plastid stromules. Analyses of SSIV-GFP expressing plants revealed that SSIV-GFP has a plastidial localization (Figure 10 A).

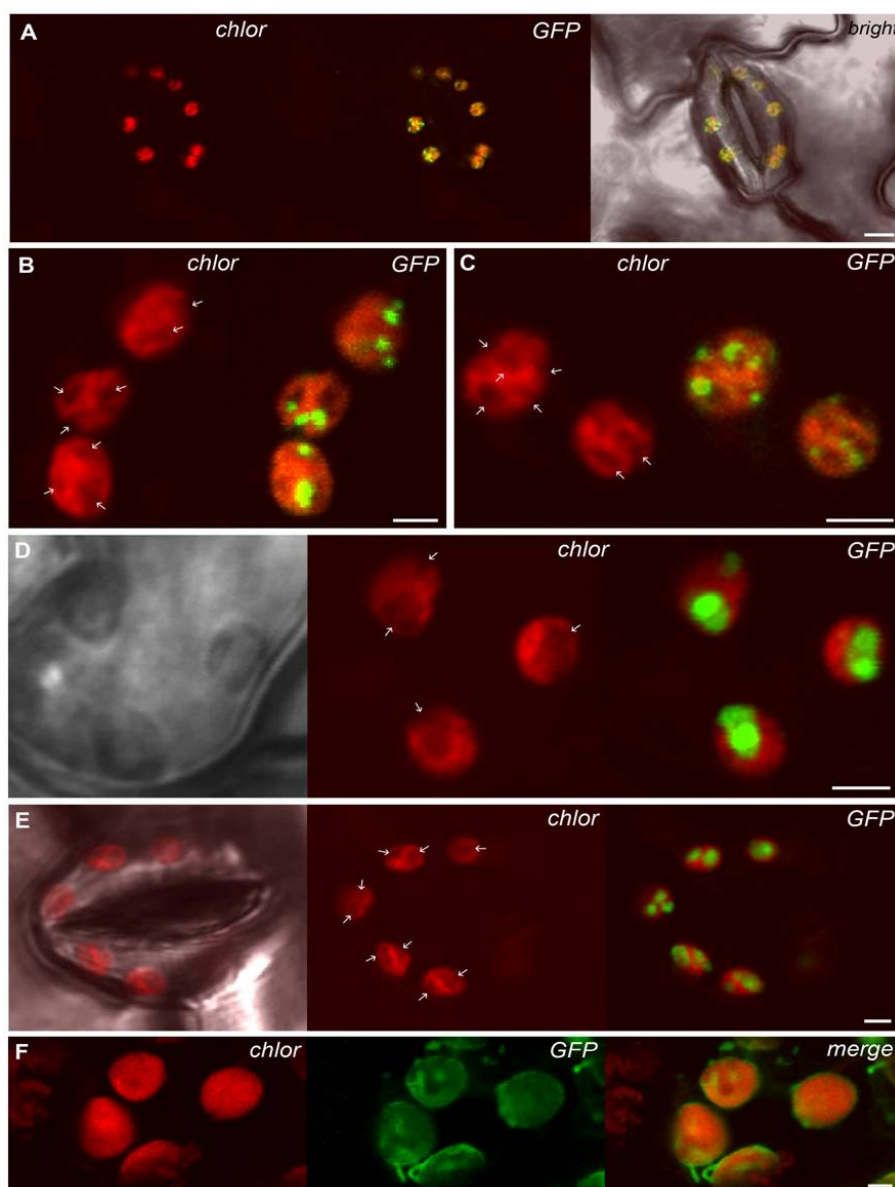
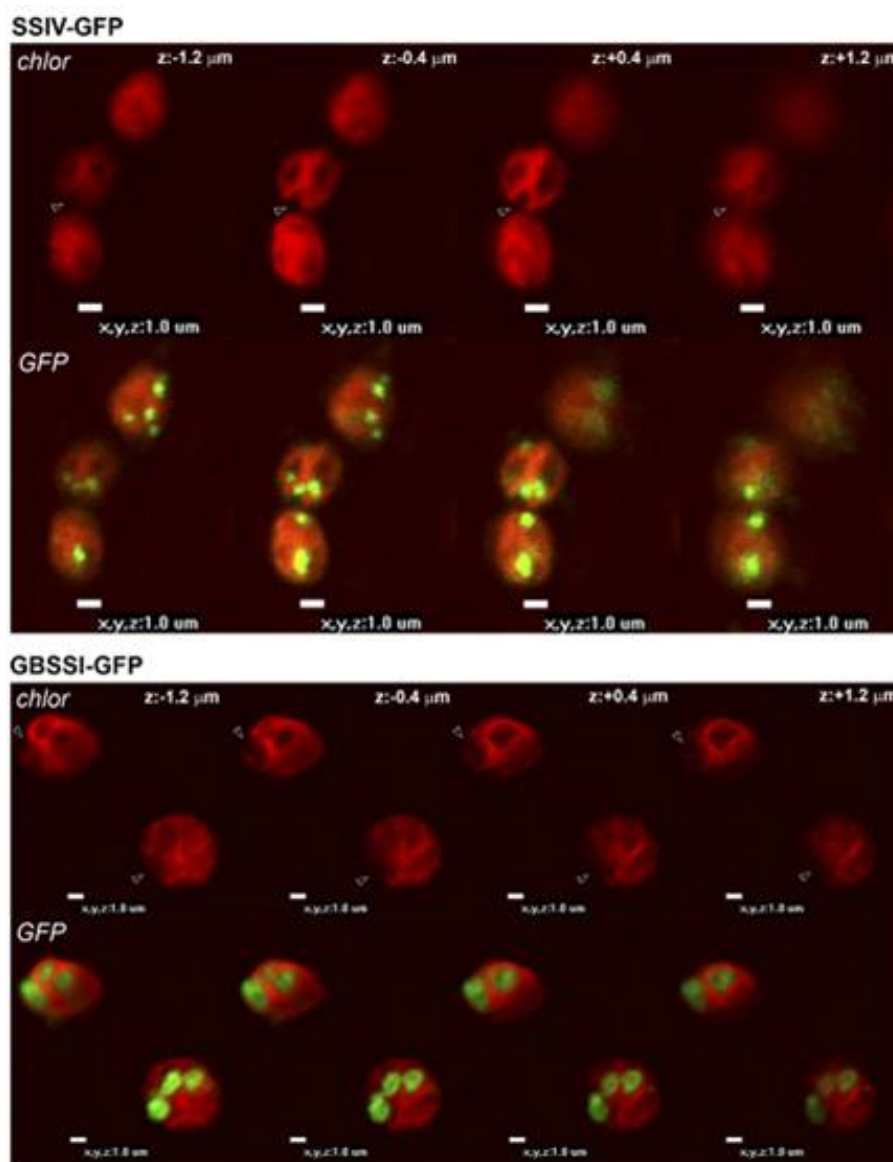


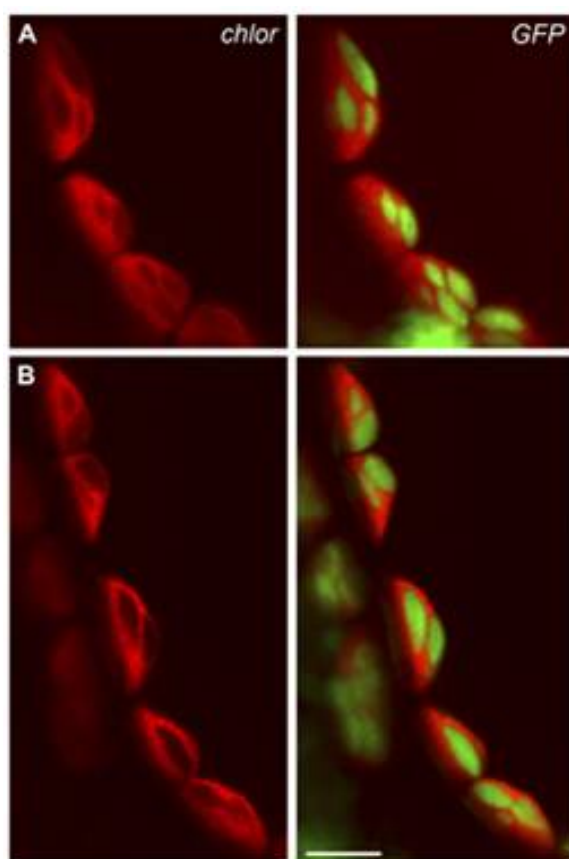
Figure 10. Localization of SSIV-GFP in *Arabidopsis* chloroplasts. (A) Localization of SSIV-GFP in leaf stomata guard cells. Confocal laser scanning microscopy revealed a dot-like pattern of SSIV-GFP distribution in chloroplasts. (B-C) GFP-positive dots were associated with oval structures (indicated by arrows), detected in chloroplast autofluorescence images (chlor), which were confirmed to be starch granules when using GBSSI-GFP expressing plants (D-E) (Supplemental Figures 8 and 9). (F) Stromal localization of StASPP-GFP construct. Scale bars: 5 μ m (A); 2 μ m (B, C, D and E).

However, in contrast to StASPP-GFP plants, the fluorescence in SSIV-GFP-expressing cells was not uniformly distributed within the stroma, but was mainly located in specific regions at the boundary of oval structures that were similar in size, number, and distribution to starch granules (Figure 10B, C and Supplemental Figure 8). Conspicuous analyses of GBSSI-GFP-expressing plants showing uniform GFP fluorescence of these structures confirmed that they were indeed starch granules (Figure 10D, E and Supplemental Figures 8 and 9). We must emphasize, however, that in contrast to other starch metabolizing enzymes, such as isoamylases, which uniformly localizes to the periphery of the starch granule (Delatte et al., 2006), the GFP fluorescence of SSIV-GFP-expressing plants seemed to be predominantly located in specific areas associated with the edges of the starch granules (Figure 10B, C and Supplemental Figure 8). This association seems to be weak as the SSIV

protein was found in the soluble fraction of leaves crude extracts, and no signal was detected by Western blot analyses of purified starch granules using anti-SSIV under the experimental conditions followed to obtain crude extracts.



Supplemental Figure 8. Serial analyses of 0.8- μ m optical sections of the z-axis capturing SSIV-GFP and GBSSI-GFP fluorescence in *Arabidopsis* chloroplasts. These sections clearly show that GFP fluorescence is mainly associated with the poles of starch granules in SSIV-GFP expressing plants, whereas GFP fluorescence is uniformly distributed within the whole starch granule in GBSSI-GFP expressing plants.



Supplemental Figure 9. Localization of GBSSI-GFP in *Arabidopsis* chloroplasts. Note that GFP fluorescence is uniformly distributed within the oval structures (starch granules) detected in the autofluorescence images (chlor).

Discussion

SSIII or SSIV are necessary for the synthesis of starch in Arabidopsis leaves

In this study we have identified SSIII as the element responsible for the synthesis of one or two starch granules per chloroplasts observed in single *ssIV* mutant plants (Roldán et al., 2007). Double mutant *ssIII-ssIV* plants do not accumulate starch or any other soluble or insoluble α -linked glucans, thereby indicating that the synthesis of such polymers requires the participation of an active form of either a class III or class IV SS. This redundancy of the functions of SSIV and SSIII does not occur with other SSs. The phenotypes of both *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV* double mutants have been found to be the addition of the phenotypes of their respective parental lines, as illustrated by the accumulation of starch along the diurnal cycle (**Figure 1**) and the length distribution of the amylopectin-forming glucans (**Figure 6**). However, both double mutants display a more severe phenotype with respect to the number of starch granules per chloroplasts than that observed in the parental lines. Thus, whereas single *ssI* and *ssII* mutants do not show any alteration in the number of starch granules per

chloroplast (Delvallé et al., 2005; Zhang et al., 2008) and *ssIV* contains only one (sometimes two) granule per chloroplast (Roldán et al., 2007), the double mutants *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV* have two types of chloroplasts, one of which contains a huge single starch granule whereas the other has no starch granule or similar structure visible by electron microscopy analysis (**Figure 5**). No correlation between the distribution of chloroplasts with or without starch and the different types of leaf tissues is observed, thus ruling out the possibility that the presence of starch is related to the metabolic characteristics of the cell. There is an increasing body of evidence to illustrate the interaction between proteins of the starch biosynthetic pathway, including SSI, SSII, and SSIII (Hennen-Bierwagen et al., 2008; Tetlow et al., 2008). A possible explanation for those results is therefore that the priming of starch granule synthesis controlled by SSIII in the absence of SSIV is enhanced by the presence of the other soluble SSs, SSI and SSII in a large protein complex. The subsequent elimination of one or both of these (in addition to SSIV) would decrease the starch granule initiating activity of SSIII and lead to some granule free chloroplasts.

SSIII and SSIV are sufficient to promote the synthesis of starch

The analyses of *ssI-ssII-ssIII* and *ssI-ssII-ssIV* triple mutant plants indicate that either SSIII or SSIV is sufficient to promote the synthesis of starch granules in the absence of the other soluble SSs. We must emphasize, however, that GBSSI is still present in these mutants (**Figure 2B**) and may well be responsible for the high amylose content of the starch found in these plants; indeed, the low residual levels of soluble starch synthase activity found in these mutants may lead to an increase of the intraplastidial concentration of ADP-glucose and thereby an increase in the activity of GBSSI, which shows a lower affinity for ADP-glucose than the soluble SSs. However, the redundancy in the function of these two proteins is not complete, and the presence of an active form of SSIV appears to be mandatory for the synthesis of the normal number of starch granules found in WT or other *ss* mutants. As in the case of *ssI-ssIV* and *ssII-ssIV*, some starch-free chloroplasts could be found in *ssI-ssII-ssIV* plants (**Figure 7, Supplemental Figures 4 and 5**), which supports the idea that SSIII alone can promote the initiation of starch granule synthesis although, as already discussed above, this capability is greatly reduced when other SSs are absent. The presence of several small granules in the *ssI-ssII-ssIII* plants shows that the granule-initiation mechanism is not altered in this mutant even though the granule enlargement capacities are strongly impaired in the absence of SSI, SSII and SSIII.

Distinct roles of SSIII and SSIV in the initiation of the starch granule

An understanding of the mechanisms underlying the initiation of the starch granule has remained elusive to date. It has been suggested recently that α -glucan phosphorylase could be involved in this process in rice endosperm (Sato et al., 2008). We have previously shown the induction of the two genes encoding for both cytosolic and chloroplastic α -glucan phosphorylases in an *ssIV* single mutant (Roldán et al., 2007), probably as a result of the nutritional starvation experienced by the plant (Zeeman et al., 2004). Herein we have shown an increment of α -glucan phosphorylase activity in all mutants lacking the SSIV protein. This increment is especially dramatic in the case of *ssIII-ssIV* double mutant, which displays up to a nine-fold higher α -glucan phosphorylase activity than that detected in WT plants. In addition, the growth rate of this mutant is severely arrested, thus indicating an intense nutritional starvation. Despite the elevated levels of phosphorylase activity in the *ssIII-ssIV* double mutant, however, this plant cannot synthesize starch, thus suggesting distinct roles for α -glucan phosphorylases in photosynthetic and long-term storage organs.

The genetic analyses of the *ss* mutant plants presented in this work indicate that SSIII and SSIV are directly involved in starch granule initiation process although these enzymes play different roles in this mechanism. Phylogenetic analyses have provided evidence that SSIII and SSIV are closely related, whereas SSI, SSII and GBSSI clustered together (Ball and Morell, 2003; Patron and Keeling, 2005). These data could explain the partially overlapping function of SSIII and SSIV described in our work. Nevertheless, both proteins display distinct features, which suggest that they play unique roles in the synthesis of the starch granule. Thus, the N-terminal half of SSIII contains three repeated starch-binding domains that modulate the affinity of the protein for the amylopectin (Valdez et al., 2008). These domains are relevant for the activity of SSIII as their elimination increases the affinity of the enzyme for ADP-glucose 18-fold (Valdez et al., 2008). These changes could explain why a truncated version of SSIII containing just the C-terminal part of the protein, homologous to the GS, can fully complement the glycogen-less phenotype of a *glgA- Agrobacterium* strain (Busi et al., 2008), whereas the glycogen-less *E. coli* strain transformed with the full-length mature SSIII protein only accumulated around 5% of the glycogen detected in the glycogen-accumulating parental line (**Supplemental Figure 6**). These starch-binding domains are absent in the N-terminal part of SSIV, which contains two long coiled-coil domains, extending from amino acids 194 to 407 and from amino acids 438 to 465 in the *Arabidopsis* amino acids sequence of SSIV (Rose et al., 2004). Long coiled-coil structural motifs, such as those located in SSIV, are found in a number of functionally distinct proteins, and are often involved in attaching functional protein complexes to larger cellular

structures and, in general, as anchors for the regulation of protein positioning in the cell (Rose et al., 2004). These motifs are highly conserved in SSIV proteins from other sources, such as *Vigna unguiculata* (accession number AJ006752), *Oryza sativa* (accession numbers AY373257 and AY373258) or *Triticum aestivum* (accession number AY044844), thereby suggesting that they play a role in the function of this class of SS.

Analysis of the activity levels and substrate specificity of SSIII and SSIV also indicates that both enzymes may play different roles *in vivo*. Thus, SSIV displays a greater affinity for ADP-glucose ($K_m = 0.96$ mM; **Table 2**) than SSIII ($K_m = 4.28$ mM) (Valdez et al., 2008) and shows a specifically high activity and affinity for maltotriose that is not observed for other SSs (**Figure 9**) and whose physiological meaning is still not clear. **Figure 9** illustrates another feature that differentiates both enzymes, namely that SSIII can synthesize linear glucans (long enough to be stained by iodine) in the absence of a primer in a gel activity assay, whereas *E. coli* expressed SSIV seems to lack this capability. Analysis of the SS activity levels in the different mutants also indicates a difference between these two proteins. Thus, the decrease of SS activity in the *ssIII* single mutant and the activity detected in the *ssI-ssII-ssIV* triple mutant indicate that SSIII accounts for 15–30% of the total soluble SS activity in *Arabidopsis* leaves. In contrast, we could not detect any SS activity in the triple *ssI-ssII-ssIII* mutant or a decrease in SS activity in the *ssIV* mutant (**Figure 2**). This could indicate either that the *in vivo* activity of SSIV is below the detection limit of the enzymatic assay used or that SSIV is inactive in the plant because of post-translational modifications or physical interaction with other proteins yet to be determined. Further studies will be necessary to clarify this point. The different function of SSIII and SSIV could also be the consequence of distinct patterns of gene-expression at both temporal and spatial levels, rather than of different specificities of these enzymes. The expression of SSIII and SSIV genes seems not to be controlled by the circadian clock in *Arabidopsis* leaves (Smith et al., 2004) as opposed to the GBSSI gene (Tenorio et al., 2003). Analogously, the expression of SSIV-1 and SSIV-2 genes has been shown to be relatively constant during the rice grain filling (Hirose and Terao, 2004). The activity of SSIII and SSIV could, however, be regulated during the diurnal cycle, in the case of transitory starch, or during the starch-accumulation process in long-term storage organs such as cereals endosperm or tubers, and could therefore account for some of the different functions of SSIII and SSIV proteins.

SSIII can synthesize a glucan long enough to be stained by iodine in the absence of primer and using ADP-glucose as substrate (**Figure 9A**). However, if the early synthesis of small α -glucans were sufficient to prime starch synthesis by itself, then the activity of SSIII alone would be enough to

prime the synthesis of the correct number of starch granules in the plastid despite the absence of SSIV. The role of SSIV in the process of starch initiation is therefore probably not limited to the synthesis of the primer molecule itself. It also appears to be required for the seeding of the starch granule, i.e. the formation of a centre of nucleation required to allow the correct 3D expansion of the granule. This idea is supported by the subchloroplastic localisation of SSIV, which is not uniformly distributed in the stroma or associated throughout the surface of the granule, as would be expected for an enzyme involved in the elongation of the amylopectin-forming glucans. In contrast, SSIV localization is restricted to some specific areas associated with the edges of starch granules (**Figure 10 A-C** and **Supplemental Figure 8**). The architecture of SSIV, probably the coiled-coils domains located in its long and unique N-terminal extension, could be required to adopt (alone or in combination with other as yet unidentified proteins) a quaternary structure that would account for the spatial localisation of SSIV observed in **Figure 10**. This complex would allow the formation of a specific glucan, which would serve as this nucleation centre. Glycogen-like structures are known to facilitate the priming of insoluble starch-like molecules (Putaux et al., 2006). The presence of SSIV may facilitate the synthesis and/or the preservation of such glycogen-like molecule and thus the seeding of a starch granule. This may explain why starch granules in the *ssIV* mutants display anomalous organization in their hilum as reported by Roldán et al (2007).

SSIII may be unable to allow the formation of such a nucleation centre or it could form at such a low rate (at random frequency) that, on average, only one starch granule can be synthesized when SSIV is missing. The initiating capacities of SSIII would be further reduced in the absence of other classes of soluble starch synthases, thus leading to some starch-free chloroplasts in the *ssI-ssIV*, *ssII-ssIV* and *ssI-ssII-ssIV* mutants. Indeed, the initial conditions that would lead to the formation of a starch granule are probably not very common, even in the WT genetic background, since only a few starch granules are generally found in plastids. In this respect, it is worth noting that a reduction in isoamylase activity leads to the accumulation of large numbers of tiny starch granules in transgenic potato tubers and mutant barley seeds (Burton et al., 2002; Bustos et al., 2004). We cannot therefore rule out the possibility that the number of nucleation centres that would originate a new starch granule results from balanced counteracting activities of formation (SSIV, SSIII and possibly other yet unidentified elements) and elimination (such as isoamylases). Further investigations will be required to decipher the precise mechanism of starch granule seeding and to definitely determine which factors are involved in this process.

Materials and methods

Plant Material and Growth Conditions

Mutant lines of *Arabidopsis thaliana* were obtained from the T-DNA mutant collections generated at INRA, Versailles (Bechtold et al., 1993; Bouchez et al., 1993), Syngenta (Sessions et al., 2002), the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL), and the GABI-KAT mutant Collection (Rosso et al., 2003). Transgenic *Arabidopsis* plant expressing SSIV-GFP and GBSSI-GFP fused proteins were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of Col-0 WT plants using the floral dip method described by Clough and Bent (1998). WT ecotypes (Wassilewskija, WS and Columbia, Col-0) and mutant lines were grown in growth cabinets under a 16 h light/8 h dark photoregime at 23 °C (day)/20 °C (night), 70% humidity and a light intensity at the plant levels of $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ supplied by white fluorescent lamps. Seeds were sown in soil and irrigated with 0.5X MS medium (Murashige and Skoog, 1962).

Bacterial strains, plasmids and culture media

The bacterial strains and plasmids used in this work and their characteristics are summarized in **Supplemental Table 2**. *E. coli* BL21(DE3) cells were used to produce *glgCAP*, *glgAP* and double *glgAP galU* deletion mutants (ΔglgCAP , ΔglgAP and $\Delta\text{glgAP } \Delta\text{galU}$, respectively), as well as for *glgA*, *SSIII* and *SSIV* expression experiments. Cells simultaneously expressing SSIII and SSIV were transformed with the two compatible pACYCDuet-SS3 and pET45-SS4 plasmids. DNA manipulations were conducted following the procedures indicated by Ausubel et al. (2001). For glycogen measurement experiments, cells were grown with rapid gyratory shaking at 37°C in Kornberg liquid medium (1.1% K₂HPO₄, 0.85% KH₂PO₄, 0.6% yeast extract from Duchefa, Haarlem, The Netherlands) liquid media supplemented with 50 mM glucose, and the appropriate selection antibiotic. Cells from cultures entering the stationary phase were centrifuged at 4,400 g for 15 min, rinsed with fresh Kornberg medium, resuspended in 40 mM Tris/HCl (pH 7.5), and disrupted by sonication. Solid Kornberg medium was prepared by addition of 1.5% bacteriological agar to the liquid medium.

glgCAP, glgAP and galU disruptions

ΔglgCAP , ΔglgAP and $\Delta\text{glgAP } \Delta\text{galU}$ cells were produced essentially as described by Datsenko and Wanner (2000). A selectable antibiotic resistance gene was generated by PCR from a freshly isolated colony of *E. coli* MC4100, using 80 nucleotide-long primer pairs that included 60-

nucleotides homology extensions for the targeted locus and 20-nucleotides priming sequences for the resistance gene (**Supplemental Table 3**). Mutants were confirmed by both Southern hybridization and PCR using specific primers.

Extraction and determination of starch and glycogen

For analysis of the structure and composition of starch, *Arabidopsis* leaves were harvested at the end of the light period. Approximately 10 g of fresh material was homogenized using a Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA) in 30 ml of the following buffer: 100 mM 3-(N-morpholino) propanesulphonic acid (MOPS), pH 7.2, 5 mM EDTA, 10% (v/v) ethanediol. The homogenate was filtered through two layers of Miracloth and centrifuged for 15 min at 4 °C and 4,000 g. The pellet was resuspended in 30 ml Percoll 90% (v/v) and centrifuged for 40 min at 4 °C and 10,000 g. The starch pellet was washed six times with sterile distilled water (10 min at 4 °C and 10,000 g between each wash). Starch was finally stored at 4 °C in 20% ethanol. This method was scaled down for the analysis of starch content in leaves along the diurnal cycle, and three leaves (approximately 300 mg) from three different plants were used at each point. The material was frozen with liquid nitrogen, homogenized with a mortar and pestle and resuspended in 1 ml of 50 mM HEPES pH 7.6, 1% Triton X-100 buffer. The homogenate was filtered through one layer of 100 µm Nylon mesh and centrifuged for 15 min at 4 °C and 4,000 g. The pellet was resuspended in 1 ml Percoll 90% (v/v) and centrifuged for 40 min at 4 °C and 10,000 g. The pellet obtained was washed three times with 1 ml 80% ethanol and finally air-dried. The pellet was resuspended in 1 ml of 0.2 N KOH, boiled for 30 min, and centrifuged for 10 min at 14,000 g at 4°C. Finally, the supernatant was adjusted to pH 5.5 with 1N acetic acid.

An alternative starch isolation method, which omits the Nylon mesh filtering and the Percoll centrifugation, was employed to confirm the levels of starch determined in the different mutants. This method is based in the method described by Lin et al (1988) with some modifications: leaves (300-500 mg) were cut into strips and extracted three times with 10 ml 80% ethanol in a boiling water bath for 5 min. The leaves were then resuspended in 2 ml of 0.2 N KOH, ground with a mortar and pestle, and heated at 100 °C for 30 min. After cooling, the mixture was centrifuged at 17,000 g for 10 min and the supernatant was adjusted to pH 5.5 with 1 N acetic acid. In both cases an aliquot of 200 µl of the pH 5.5 starch solution was used to determine the starch amount using the enzymatic method described by Lin et al (1988). For bacterial glycogen measurement experiments, cells were grown with rapid gyratory shaking at 37°C in Kornberg liquid medium supplemented with 50 mM

glucose and the appropriate selection antibiotic. Cells from cultures entering the stationary phase were centrifuged at 4,400 g for 15 min, rinsed with fresh Kornberg medium, resuspended in 40 mM Tris/HCl (pH 7.5), and disrupted by sonication. Glycogen content was then determined as described by Morán-Zorzano et al. (2007) using an amyloglucosidase/hexokinase/glucose-6P dehydrogenase-based test kit from Sigma.

Extraction and determination of sugars

Leaf tissue (0.5 g approx.) was harvested and frozen in liquid N₂. The material was powdered and extracted with 1.5 ml of 0.7 M perchloric acid as described by Critchley et al. (2001). The fructose, glucose and sucrose content in the buffered extract was determined by enzymatic analysis as described by Stitt et al. (1989). Maltose levels were determined by enzymatic analysis as described by Shirokane et al. (2000).

Determination of WSP contents

Water-soluble glucan contents in leaves were determined as described by Zeeman et al. (1998).

Separation of starch polysaccharides by size-exclusion chromatography

Starch (1.5–2.0 mg) was dissolved in 200 µl of 100% DMSO and boiled for 10 min in a water bath. After the addition of 800 µl of 100% ethanol, the glucans were precipitated overnight at -20°C. After centrifugation for 10 min at 5,000 g and 4°C, the glucan pellet was dissolved in 500 µl of 10 mM NaOH and subsequently applied to a Sepharose CL-2B column (0.5 cm i.d. x 65 cm), which was equilibrated and eluted with 10 mM NaOH. Fractions of 300 µl were collected at a rate of one fraction per 1.5 min. The glucans in these fractions were detected by their reaction with iodine and the levels of amylopectin and amylose were determined by amyloglucosidase assays (after pooling of the corresponding fractions).

Amylopectin chain-length distribution

Amylopectin CL distribution was established by HPAEC-PAD (Dionex, Sunnyvale, CA) equipped with a CarboPac PA200 column (4 mm i.d. x 250 mm length), after complete enzymatic debranching as follows: after purification on a Sepharose CL2B column, 500 µg of amylopectin was dialyzed against distilled water and subsequently lyophilized. The amylopectin pellet was solubilized in 500 µL of 55 mM sodium acetate, pH 3.5, and incubated overnight at 42 °C with 20 U of

isoamylase (Megazyme International, Ireland). Prior to injection, salts were removed by running the sample through an “Extract clean” Carboglyph column (Alltech, Deerfield, IL, USA).

Zymograms techniques

A complete description of these techniques can be found in Delvallé et al. (2005).

In vitro assays of starch synthesis enzymes

ADP-glucose pyrophosphorylase was assayed in the synthesis direction according to the procedure described by Crevillén et al. (2003). Soluble starch synthase activity was assayed using amylopectin, glycogen or different maltooligosaccharides as primers. Samples were incubated at 30°C for 30 min in 100 µl of the following buffer: tricine pH 8.0, 100 mM; potassium acetate 25mM; EDTA 5 mM; sodium citrate 0.5 M; BSA 0.5 mg/ml; ADP-[U-¹⁴C]Glucose (3.7 GBq/mol) 1 mM. 10 mg/ml of MOS (DP2 to DP7) glycogen or potato amylopectin were added to the buffer depending on the tested substrate. The reaction was stopped by boiling for 10 min and the glucans were elongated by incubation overnight at 30°C with 7.5 U of phosphorylase “a” from rabbit muscle (Sigma) in the presence of 50 mM of Glc-1-P (final concentration). The reaction was stopped by addition of 3.5 ml of 75% methanol, 1% KCl solution and the samples were further treated as described previously (Delvallé et al., 2005) before counting. Elongation with phosphorylase was omitted when amylopectin was used as primer. Granule-bound starch synthase activity was determined as described by Tenorio et al. (2003). α -Glucan phosphorylase and branching enzymes activities were determined according to the procedure described by Zeeman et al. (1998).

Production of cDNAs coding for mature SSIII and SIV

Total RNA was isolated as described by Prescott and Martin (1986). First-strand cDNA was synthesized from 10 µg of total RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and oligo(dT)12–18 primer, according to the manufacturer’s instructions (GE Healthcare). The reaction mixture was incubated at 37 °C for 2 h and stopped by adding 1 ml of nuclease-free MilliQwater. cDNA fragments encoding for the mature (without the chloroplast transient peptides) SSIII and SSIV proteins were obtained by PCR amplification using high-fidelity *iProof* Polymerase (BIORAD), first-strand cDNA previously synthesized as template, and specific oligonucleotides for both genes: SS3F: 5’-*ctgcag*GGAAGTGCTCAGA AAAGAACTCAGA-3’, PstI site in italics) and SS3R: 5’-*ctgcag*TTACTTGCGTG CAGAGTGATA-3’, XhoI site in italics) for the *SSIII* gene, and SS4F: 5’-

*ggatcc*GTGA AGATGCGACAACAACGT-3', BamHI site in italics) and SS4R: 5'- *ctcgag*TCACG TGCGATTAGGAACAGC-3', XhoI site in italics) for the *SSIV* gene. Amplified fragments were cloned in the pGEM-T Easy Vector (PROMEGA) and sequenced.

Heterologous expression and purification of SSIII and SSIV

cDNAs coding for the complete mature SSIII and SSIV proteins were inserted as a translational fusion into the pET45b prokaryote expression vector (NOVAGEN) at the BamHI-XhoI (*SSIV*) and PstI-XhoI (*SSIII*) sites. Recombinant clones were transformed into Δ *glgCAP* BL21 (DE3) *E. coli* cells lacking the whole glycogen biosynthetic machinery (Morán-Zorzano et al., 2007). Expression of SS polypeptides was induced by the addition of IPTG to the culture medium and cells were harvested by centrifugation, resuspended in Buffer A (20 mM sodium phosphate pH 7.0, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole) and disrupted using French Press at 1200 psi in the presence of 1mM PMSF and protease inhibitor cocktail (SIGMA). Extracts were centrifuged for 30 min at 20,000 g and 4°C and the supernatant constituted the crude extracts. For the purification of both SSIV and SSIII proteins, the crude extract was applied onto a 5 ml HisTrap HP column (GE Healthcare), which was washed with 100 ml Buffer A and SSIV or SSIII proteins were eluted using a 0.02-0.5 M imidazole linear gradient in Buffer A. Samples with SS activity were analyzed by SDS-PAGE and by activity in native polyacrylamide gel and selected for further studies.

Light and transmission electron microscopy

Fully expanded leaves from plants cultured under a 16 h light/8 h dark photoregime and materials were collected at the midpoint of the light period. Small pieces (2 mm²) of leaves were immediately fixed by submersion in a solution of 3% glutaraldehyde (v/v) in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4 (3 h at 4 °C, under vacuum). After fixing, the specimens were washed in a cacodylate buffer (0.05 M sodium cacodylate, 1% sucrose), three times for 30 min each at 4 °C, and postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide in the same cacodylate buffer (overnight, 4 °C). After two washes, 30 min each, at 4 °C with the same cacodylate buffer, the samples were dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol in water (30%, 50%, and 70%) for 10 min each, at the same temperature. Dehydration was continued at 4 °C with 1% uranyl acetate in 70% ethanol for 16 h, 90% ethanol for 10 min, 96% ethanol for 30 min, and 100% ethanol for 2 h with one change after the first hour. Infiltration in London Resin White and polymerization at 60 °C was carried out as described by González-Melendi et al. (2008). Semi- (1 µm) and ultrathin (70–90

nm) sections were stained and observed as described previously by Roldán et al. (2007). Alternatively, the periodic acidSchiff's (PAS) reaction (Jensen, 1962) for carbohydrate staining was carried out by placing the slices with semithin sections in a 0.5% periodic acid solution in distilled water (30 min at room temperature) and in Schiff's reagent for 40 minutes.

Confocal microscopy

Subcellular localization of GFP-tagged proteins was performed using a D-Eclipse C1 confocal microscope (NIKON, Japan) equipped with standard Ar 488 laser excitation, a BA515/30 filter for green emission, a BA650LP filter for red emission and transmitted light detector for bright field images.

Analytical procedures

Bacterial growth was followed spectrophotometrically by measuring the absorbance at 600 nm. Protein content was measured by the Bradford method using a Bio-Rad prepared reagent. Iodine staining of colonies on solid Kornberg medium was performed following the method of Eydallin et al. (2007) according to which, in the presence of iodine vapours, "glycogen-excess" clones stain darker than their brownish parent cells, whereas "glycogen-deficient" clones stain yellow.

Acknowledgments

We are grateful to Pr Steven G. Ball for fruitful scientific discussions. This work was supported financially by the Ministerio de Ciencia e Innovacion and the European Union-FEDER (grant BIO2006-00359 to AM), Junta de Andalucía (grant P07-CVI- 02795 to AM) ANR Génoplate (grant GPLA0611G to CD'H and NS), the European Union-FEDER and the Région Nord Pas de Calais (grant ARCir PlantTEQ to CD'H and NS), the Ministerio de Ciencia e Innovacion and the European Union-FEDER (grant BIO2007-63915 to JP-R) and by Iden Biotechnology S.L. We would like to thank Fernando Pinto, César N. Morcillo, Susana Fajardo and Emilie Perrin for their technical assistance in the microscopy analysis and to Maria Teresa Morán-Zorzano for expert technical support.

References

- Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *Faseb J.* **9**, 1126-1137.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.G., and Struhl, K. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology* 2. (New York: Wiley Interscience).
- Ball, S., and Morell, M. (2003). From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Ann. Rev. Plant Biol.* **54**, 207- 233.
- Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- Bouchez, D., Camilleri, C., and Caboche, M. (1993). A binary vector based on BASTA resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1188-1193.
- Boyer, C.D., and Preiss, J. (1979). Properties of citrate-stimulated starch synthesis catalyzed by starch synthase I of developing maize kernels. *Plant Physiol.* **64**, 1039-1042.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 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. *Plant J.* **31**, 97-112.
- Busi, M.V., Palopoli, N., Valdez, H.A., Fornasari, M.S., Wayllace, N.Z., Gomez- Casati, D.F., Parisi, G., and Ugalde, R.A. (2008). Functional and structural characterization of the catalytic domain of the starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins* **70**, 31-40.
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2215-2220.
- Cao, Y., Steinrauf, L.K., and Roach, P.J. (1995). Mechanism of glycogenin selfglucosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 293-298.
- 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 Physiol.* **79**, 11-17.
- Caspar, T., Lin, T.P., Monroe, J., Bernhard, W., Spilatro, S., Preiss, J., and Somerville, C. (1989). Altered regulation of beta-amylase activity in mutants of *Arabidopsis* with lesions in starch metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5830-5833.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., and Smith, A.M. (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* **10**, 413-426.
- Crevillén, P., Ballicora, M.A., Mérida, A., Preiss, J., and Romero, J.M. (2003). The different large subunit isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-Glucose pyrophosphorylase confer distinct kinetic and regulatory properties to the heterotetrameric enzyme. *J. Biol. Chem.* **278**, 28508-28515.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., and Smith, S.M. (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**, 89-100.

- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640-6645.
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M.L., and Zeeman, S.C.** (2005). *Arabidopsis* mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* **41**, 815-830.
- Delatte, T., Umhang, M., Trevisan, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, S.M., and Zeeman, S.C.** (2006). Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J. Biol. Chem.* **281**, 12050-12059.
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, Á., and D'Hulst, C.** (2005). Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* **43**, 398-412.
- Eydallin, G., Viale, A.M., Morán-Zorzano, M.T., Muñoz, F.J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., and Pozueta-Romero, J.** (2007). Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **581**, 2947-2953.
- González-Melendi, P., Uyttewaal, M., Morcillo, C.N., Hernández Mora, J.R., Fajardo, S., Budar, F., and Lucas, M.M.** (2008). A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*). *J. Exp. Bot.* **59**, 827-838.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Liu, F., Marsh, R.S., Kim, S., Gan, Q., Tetlow, I.J., Emes, M.J., James, M.G., and Myers, A.M.** (2008). Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiol.* **146**, 1892-1908.
- Hirose, T., and Terao, T.** (2004). A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* **220**, 9 - 16.
- Jensen, W.A.** (1962). *Botanical Histochemistry. Principles and Practice.* (Freeman WH and Company, USA).
- Lin, T.P., Caspar, T., Somerville, C., and Preiss, J.** (1988). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh lacking ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **86**, 1131- 1135.
- Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J.** (1988). A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* **2**, 3097-3103.
- Manners, D.J.** (1991). Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydr. Polym.* **16**, 37-82.
- Morán-Zorzano, M.T., Alonso-Casajus, N., Muñoz, F.J., Viale, A.M., Baroja- Fernández, E., Eydallin, G., and Pozueta-Romero, J.** (2007). Occurrence of more than one important source of ADPglucose linked to glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *FEBS Lett.* **581**, 4423- 4429.
- Morell, M.K., Kosar-Hashemi, B., Cmiel, M., Samuel, M.S., Chandler, P., Rahman, S., Buleon, A., Batey, I.L., and Li, Z.** (2003). Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J.* **34**, 173-185.
- Mullet, J.E.** (1988). Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 475-502.
- Muñoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Ovecka, M., Li, J., Mitsui, T., Sesma, M.T., Montero, M., Bahaji, A., Ezquer, I., and Pozueta-Romero, J.** (2008). Plastidial localization of a potato "Nudix" hydrolase of ADPglucose linked to starch biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1734-1746.
- Murashige, T., and Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **15**, 473-497.
- Patron, N.J., and Keeling, P.** (2005). Common evolutionary origin of starch biosynthetic enzymes in green and red algae. *J. Phycol.* **41**, 1131-1141.

- Prescott, A., and Martin, C.** (1986). A rapid method for the quantitative assessment of levels of specific mRNAs in plants. *Plant Mol. Biol. Report* **4**, 219-224.
- Putaux, J.L., Potocki-Veronese, G., Remaud-Simeon, M., and Buleon, A.** (2006). Alpha-D-glucan-based dendritic nanoparticles prepared by *in vitro* enzymatic chain extension of glycogen. *Biomacromolecules* **7**, 1720-1728.
- Roldán, I., Wattebled, F., Mercedes Lucas, M., Delvalle, D., Planchot, V., Jimenez, S., Perez, 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. *Plant J.* **49**, 492-504.
- Rose, A., Manikantan, S., Schraegle, S.J., Maloy, M.A., Stahlberg, E.A., and Meier, I.** (2004). Genome-wide identification of *Arabidopsis* coiled-coil proteins and establishment of the ARABI-COIL database. *Plant Physiol.* **134**, 927-939.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B.** (2003). *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol.* **53**, 247-259.
- 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. *Plant Cell* **20**, 1833-1849.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., and Goff, S.A.** (2002). A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* **14**, 2985-2994.
- Shirokane, Y., Ichikawa, K., and Suzuki, M.** (2000). A novel enzymic determination of maltose. *Carbohydr. Res.* **329**, 699-702.
- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., and Smith, A.M.** (2004). Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **136**, 2687-2699.
- Stitt, M., McC. Lilley, R., Gerhardt, R., and Heldt, H.W.** (1989). Determination of metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plants leaves. *Methods Enzymol.* **174**, 518-552.
- 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**, 3448-3466.
- Tenorio, G., Orea, A., Romero, J.M., and Mérida, A.** (2003). Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle. *Plant Mol. Biol.* **51**, 949-958.
- Tetlow, I.J., Beisel, K.G., Cameron, S., Makhmoudova, A., Liu, F., Bresolin, N.S., Wait, R., Morell, M.K., and Emes, M.J.** (2008). Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol.* **146**, 1878-1891.
- Ugalde, J.E., Parodi, A.J., and Ugalde, R.A.** (2003). De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10659-10663.
- Valdez, H.A., Busi, M.V., Wayllace, N.Z., Parisi, G., Ugalde, R.A., and Gomez- Casati, D.F.** (2008). Role of the N-terminal starch-binding domains in the kinetic properties of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **47**, 3026-3032.
- Wattebled, F., Planchot, V., Dong, Y., Szydlowski, N., Pontoire, B., Devin, A., Ball, S., and 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**, 1309-1323.

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 phytoglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.* **138**, 184-195.

Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith, A.M., and Ap Rees, T. (1998). A starchaccumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J.* **15**, 357-385.

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

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

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 Physiol.* **138**, 663-674.

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

Zhang, X., Szydlowski, N., Delvalle, 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.

Partie 3 :

Etude de l'impact d'une mutation au locus *GBSS1* sur le phénotype des simples mutants *ss2-*, *ss3-* et *ss4-*

Un gène codant une amidon-synthétase liée au grain d'amidon (ou GBSS pour Granule Bound Starch-Synthase ; locus At1g32900) a été mis en évidence dans le génome d'*A. thaliana*. Après avoir identifié une FST correspondant à ce gène dans les bases de données, nous nous sommes procurés la lignée mutante et avons sélectionné des individus homozygotes pour la mutation. Des croisements ont également été entrepris de manière à produire les doubles mutants *ss1- gbss1-*, *ss2- gbss1-*, *ss3- gbss1-* et *ss4- gbss1-*. L'objectif, à terme, est de produire et d'analyser toutes les combinaisons doubles, triples, voire quadruples mutantes afin de déterminer les interactions potentielles entre la GBSS1 et les amidon-synthétases solubles. L'analyse des lignées quadruples mutantes nous permettra par ailleurs d'étudier la contribution de la GBSS1 dans la biosynthèse de l'amidon résiduel présent dans les lignées triples mutantes *ss1- ss2- ss3-* et *ss1- ss2- ss4-* décrites plus haut. Nous présentons ici, les travaux préliminaires que constitue l'analyse des lignées doubles mutantes *ss2- gbss1-*, *ss3- gbss1-* et *ss4- gbss1-*.

I. Construction des lignées doubles mutantes gbss1- ss2-, gbss1- ss3-, gbss1- ss4- et analyse des phénotypes de croissance.

Les allèles utilisés pour la construction de ces mutants sont *gbss1-1* (FST : 914G01), *Atss2-1* (Zhang et al., 2008) (FST : SALK_065639), *Atss3-1* (Zhang et al., 2005) (FST : SALK_065732) et *Atss4-1* (Roldan et al., 2007) (FST : 290D11). Tous les quatre se trouvent dans le fond génétique Columbia (Col-0), et sont présentés, ainsi que les amorces utilisées pour la sélection par PCR, en annexe. La sélection de la lignée *gbss1-1* homozygote mutante a été réalisée à partir d'un mélange de graines fourni par la collection de GABI produite et maintenue en Allemagne. Quel que soit l'organisme étudié, la perte de l'activité GBSS entraîne l'absence d'amylose, et une coloration différente des plantes quand elles sont mises en contact avec une solution de I_2 / KI. En effet le complexe amidon – iode est bleu foncé alors que le complexe iode - amylopectine est rouge. Sept individus potentiellement homozygotes ont été mis en évidence, de cette manière, parmi 50 plantes analysées. L'analyse de l'ADN génomique de ces individus a confirmé le génotype homozygote mutant. Nous avons croisé la lignée ainsi sélectionnée avec les lignées mutantes *ss2-*, *ss3-* et *ss4-* en vue d'obtenir les doubles mutants correspondants. Les progénitures des lignées doubles hétérozygotes ont été criblées par PCR. La figure 36 résume la structure du gène *GBSS1* et les amorces utilisées pour la vérification de l'allèle mutant.

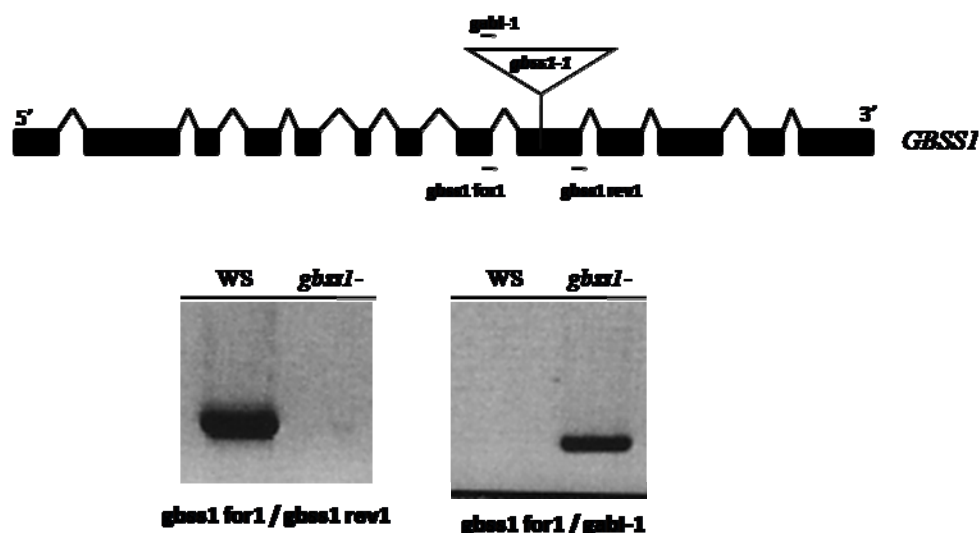


Figure 36 : Structure du gène *GBSSI* et vérification de l'allèle mutant. Les exons sont représentés par des rectangles noirs et les introns par des lignes brisées entre les exons. Les extrémités 5' et 3' sont indiquées, ainsi que la position de l'insertion et les amorces utilisées pour la sélection. Les photos d'électrophorèse en gel d'agarose correspondent à l'analyse des produits d'amplification par PCR (la nature des ADN génomiques testés et les amorces utilisées sont indiquées au dessus et au dessous de chaque photo).

Les trois doubles mutants et le simple mutant *gbss1-* ont été cultivés en serre avec une photopériode de 16 h de jour et 8 h de nuit. Le développement des feuilles, des tiges, des fleurs et des siliques des plantes mutantes a été étudié en comparaison avec la référence sauvage. Le développement du mutant *gbss1-* et des doubles mutants *gbss1- ss2-* et *gbss1- ss3-* est identique au développement du sauvage Col-0. Les plantes *gbss1- ss4-* âgées de trois semaines présentent un phénotype similaire à celui entraîné par la simple mutation *ss4-* décrite par Roldan et al. (2007). Les plantes double mutantes sont approximativement 2 fois plus petites (figure 38A, E), et plus pâles que les plantes sauvages (résultat non montré).

II. Effet des mutations sur les activités du métabolisme de l'amidon.

L'effet des mutations sur les activités amidon-synthétases solubles a été étudié par zymogramme (figure 37A). 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 et récoltées en milieu de phase lumineuse. Ces échantillons ont été déposés sur gel de polyacrylamide contenant 0,33 % de glycogène de foie de lapin. Après migration, en conditions non dénaturantes, les gels ont été incubés une nuit avec de l'ADP-Glc puis colorés par une solution de I_2/KI . Les bandes de teinte marron correspondent aux zones du gel où les chaînes de glycogène ont été allongées par les amidon-synthétases. Dans l'extrait protéique sauvage (Col-0), deux activités SS peuvent être observées. Les

bandes situées en haut et en bas du gel correspondent respectivement aux activités de SS3 et SS1 (Zhang et al., 2005, Delvallé et al., 2005). Aucune autre activité n'est détectable par ce type de zymogramme, soit parce que les niveaux d'expression des autres isoformes sont très faibles, soit parce qu'elles sont incapables d'allonger les glucanes du glycogène. De manière prévisible, l'activité de la SS3 disparaît dans la piste correspondant au mutant *gbss1- ss3-* (figure 37A).

Les autres activités du métabolisme de l'amidon ont elles aussi été analysées par zymogramme (figure 37B). Les enzymes de branchement, la pullulanase, les isoamylases et les β -amylases (RAM1 par exemple) ne paraissent pas modifiées dans les différents mutants. Ces résultats montrent que les phénotypes observés ne sont pas influencés par d'éventuels effets pléiotropiques.

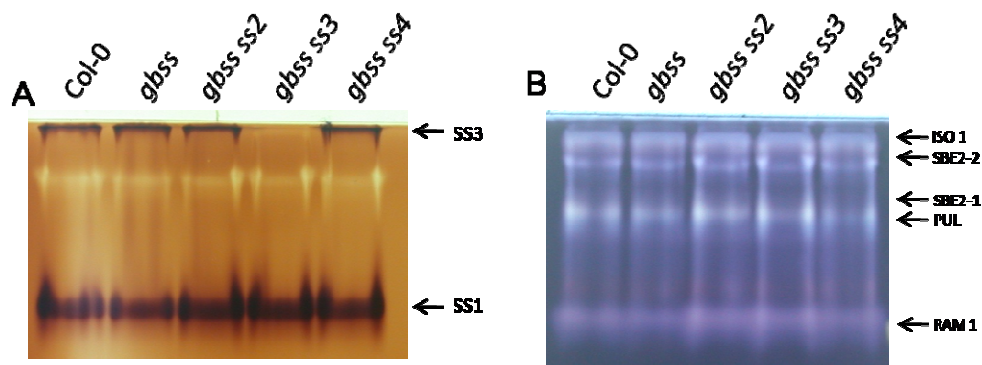


Figure 37 : A : Zymogramme des activités amidon synthétases sur gel de polyacrylamide contenant 0,3 % de glycogène. Le gel est incubé une nuit à température ambiante avec 1mM d'ADP-Glucose. Les activités amidon-synthétases sont révélées en immergeant le gel dans une solution de lugol. **B : Zymogramme des activités modifiant l'amidon** sur un gel de polyacrylamide contenant 0,3 % d'amidon. Après migration et incubation une nuit à température ambiante, les activités enzymatiques sont révélées par coloration à l'iode. Les différentes bandes ont été identifiées par l'analyse de mutants d'*A. thaliana* déficients pour chaque type d'activité (Delvallé et al., 2005).

III. Effet de la présence des deux mutations sur le contenu en amidon

Les impacts des mutations sur les contenus en amidon ont été évalués par coloration à l'iode de plantes âgées de trois semaines (figure 38). Les plantes ont été récoltées en fin de photopériode, décolorées à l'éthanol puis plongées dans une solution de I_2 / KI. La coloration bleu-gris de la plante Col-0 est caractéristique du complexe iode - amidon sauvage (figure 38A). Les plantes mutantes *gbss1-*, *gbss1- ss2-* et *gbss1- ss3-* présentent une teinte rougeâtre liée à l'absence d'amylose (figures 38B, C, D). La couleur du double mutant *gbss1- ss4-* tire également sur le rouge mais les feuilles de la première rosette, situées à la périphérie, paraissent plus grises que celles du mutant *gbss1-* (figure 38E).

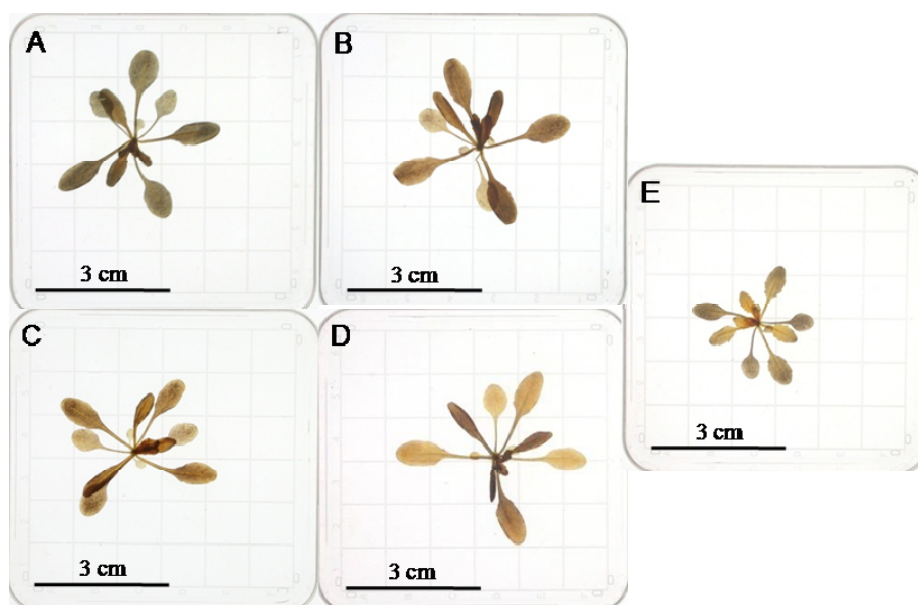


Figure 38 : Evaluation des contenus en amidon par coloration à l'iode. Les plantules, âgées de 3 semaines, ont été collectées après 16 h d'illumination. Après décoloration dans de l'éthanol 80 %, elles ont été colorées par une solution de I_2 / KI, puis décolorées 5 min dans de l'eau. A : Col-0, B: *gbss1*-, C : *gbss1- ss2*-, D : *gbss1- ss3*-, E : *gbss1- ss4*-.

Les quantités d'amylopectine et d'amidon ont été mesurées en fin de photopériode dans les plantes sauvages et mutantes (figure 39 ; un seul dosage). La mutation *gbss1*- entraîne une baisse du contenu de 38 % par rapport au sauvage. Les doubles mutants *gbss1- ss2*-, *gbss1- ss3*- et *gbss1- ss4*- présentent respectivement une baisse de la quantité de polysaccharides de 29, 11 et 62 % par rapport au sauvage.

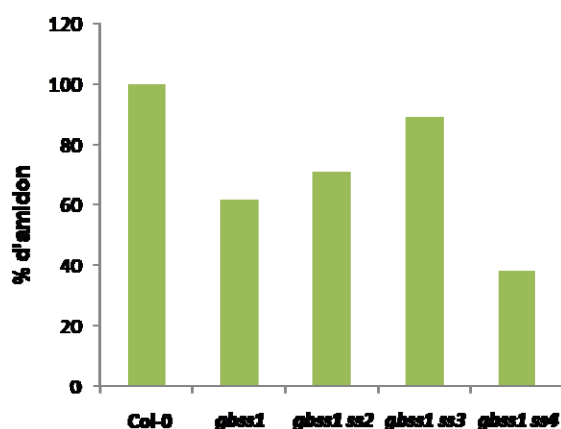


Figure 39 : Contenus en amidon dans Col-0 et les mutants *gbss1*-, *gbss1- ss2*-, *gbss1- ss3*- et *gbss1- ss4*-. Les contenus en amidon ont été déterminés par dosage à l'amyloglucosidase à partir d'échantillons récoltés en fin de photopériode (une seule détermination pour chaque lignée).

IV. Effet des mutations sur la composition et la structure de l'amidon

Après dispersion dans le DMSO, l'amidon des plantes sauvages et mutantes a été analysé par chromatographie d'exclusion stérique (Sepharose CL-2B) (figure 40). De manière prévisible, aucun polymère de glucose n'a pu être détecté chez les mutants dans la zone d'élution habituelle de l'amylose par mesure de l'absorbance après ajout de I_2 / KI (figures 40B, C, D, E) ou par dosage à l'amyloglucosidase. La λ_{max} du complexe iode – polysaccharide indique en outre que la structure des amylopectines *gbss1-ss2-* et *gbss1-ss3-* est modifiée.

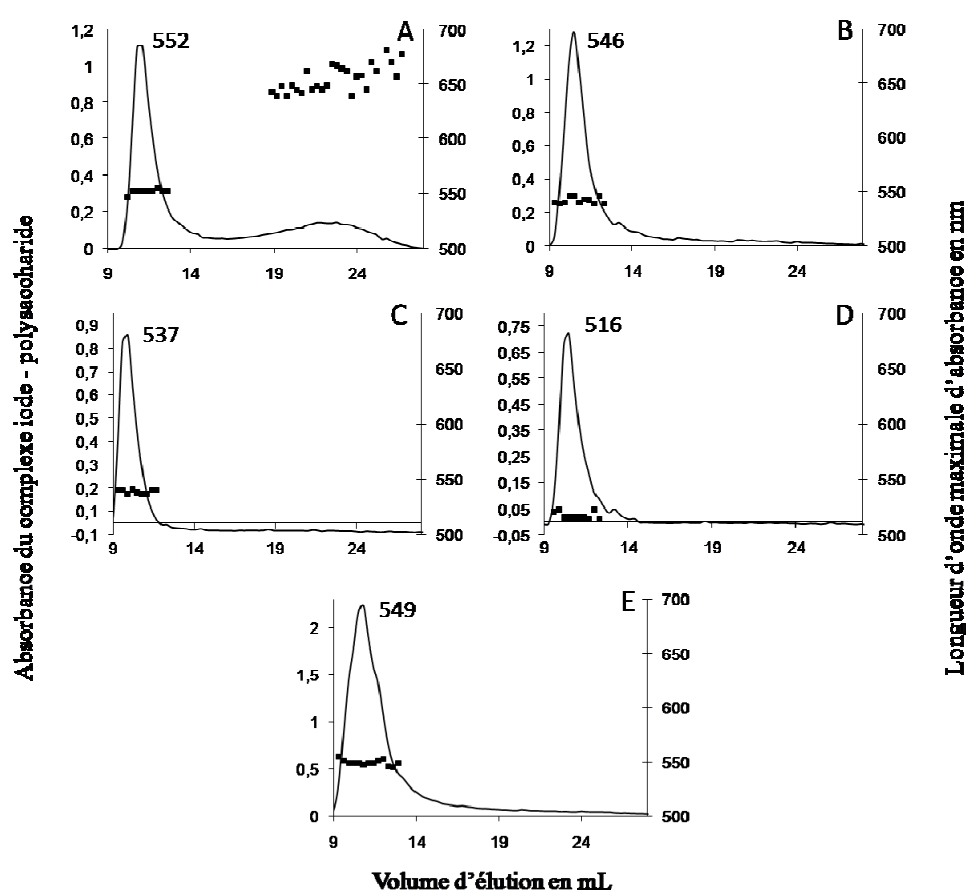


Figure 40 : Profils d'exclusion stérique des polysaccharides contenus dans les amidons Col-0, *gbss1-ss2-*, *gbss1-ss3-* et *gbss1-ss4-*. L'amidon extrait de plantes sauvages et mutantes est dissous par chauffage à 100 °C dans du DMSO. L'amylose et l'amylopectine sont séparés par chromatographie (Sepharose CL-2B). La présence des polysaccharides dans chaque fraction est estimée par mesure de l'absorbance du complexe iode-polysaccharide après ajout d'une solution de I_2 / KI . Pour chaque fraction, le maximum d'absorption du complexe est déterminé (ligne noire continue) et la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe est reportée (points noirs). A : Col-0. B : *gbss1-*. C : *gbss1-ss2-*. D : *gbss1-ss3-*. E : *gbss1-ss4-*.

La distribution de la taille des glucanes des amylopectines des lignées doubles mutantes a été étudiée par HPAEC-PAD, après débranchement par l'isoamylase (figure 41). Dans les doubles mutants *gbss1- ss2-*, *gbss1- ss3-* et *gbss1- ss4-*, la structure de l'amylopectine est identique à celle respectivement des simples mutants *ss2-*, *ss3-* et *ss4-* (Zhang et al., 2005 ; Zhang et al., 2008, Roldan et al, 2007 ; et partie 1 des résultats de ce manuscrit).

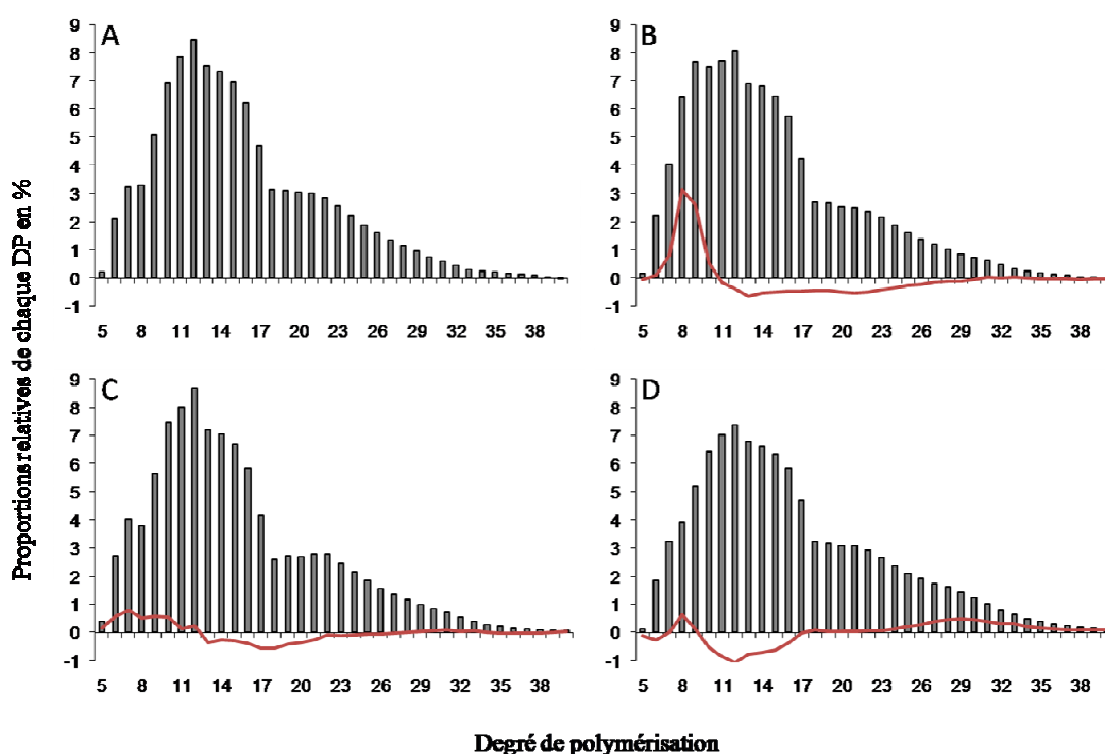


Figure 41 : Distribution de la longueur des glucanes formant l'amylopectine. Après purification, l'amylopectine est débranchée par l'isoamylase. Le produit de la digestion est analysé par HPAEC-PAD. Les proportions relatives de chaque type de glucane au sein de la population totale sont exprimées en %. A : Col-0, B : *gbss1-*, C : *gbss1- ss2-*, D : *gbss1- ss3-*, E : *gbss1- ss4-*. Les courbes rouges représentent les différences entre les profils des mutants et celui du sauvage.

Ces observations indiquent que la mutation *gbss1-* n'a pas d'impact sur la structure de l'amylopectine des mutants *ss2-*, *ss3-* et *ss4-* pour les populations de chaînes détectée par HPAEC-PAD. Toutefois, les variations de distribution de longueur de chaîne observées dans l'amylopectine des doubles mutants *gbss1- ss2-* et *gbss1- ss3-* n'expliquent pas la diminution de $\lambda_{\max}$ du complexe iode – polysaccharides (figures 40A, C, D). Des analyses complémentaires, notamment sur la répartition des longs glucanes de l'amylopectine, sont nécessaires pour identifier la nature des modifications entraînant ces diminutions de $\lambda_{\max}$.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Etude des fonctions, interactions et redondances des amidon-synthétases solubles SS1, SS2 et SS3

1. La SS2 est responsable de la synthèse des glucanes de DP 12 à 28 de l'amylopectine

L'analyse de trois lignées d'*Arabidopsis thaliana* déficientes pour la SS2 nous a permis de préciser sa fonction dans l'élaboration de la structure de l'amylopectine de l'amidon transitoire. Chacune des trois lignées, contenant chaque fois une insertion différente de l'ADN-T, a été générée de manière indépendante. La probabilité statistique qu'une mutation secondaire influence le phénotype devient, de fait, hautement improbable. Les phénotypes observés pour chaque lignée en termes de structure de l'amidon et de contenus en amylose étaient identiques. Par ailleurs, nous n'avons mesuré aucun effet significatif des mutations sur les activités des autres enzymes du métabolisme de l'amidon, excluant ainsi l'existence d'effets pléiotropes qui auraient un impact sur les phénotypes observés.

Nous avons analysé les modifications de structure de l'amylopectine entraînées par la mutation *ss2-*, et en particulier la distribution de la longueur des glucanes formant cette macromolécule. L'inactivation de la SS2 conduit notamment à une diminution de la quantité des glucanes de DP 12 à 28 et une augmentation de ceux de DP 6 à 10. Ces modifications, tout comme la déformation des grains, visible en microscopie électronique, sont identiques à celles observées pour l'amidon de réserve des mutants *ss2-* déjà décrits, pour le pois, l'orge ou le maïs par exemple (Craig et al., 1998 ; Morell et al., 2003 ; Zhang et al., 2004). Il apparaît donc que la fonction de la SS2, pour l'allongement des glucanes de DP 12 à 28 notamment, soit très conservée chez les plantes supérieures, aussi bien dans le métabolisme de l'amidon de réserve, que dans celui de l'amidon transitoire.

L'étude structurale de l'amylopectine mutante après digestion par la β -amylase indique que les modifications que nous venons de décrire concernent essentiellement les glucanes sensibles à la digestion, donc ceux qui sont les plus externes de la grappe d'amylopectine (glucanes des types A et B1). L'augmentation de la proportion des très petits glucanes est très probablement le résultat de l'activité de la SS1. En effet, le rôle de cette isoforme est de synthétiser les très courts glucanes de type A et B1, situés à l'extérieur de la molécule (Delvallé et al., 2005). Ainsi, l'absence de SS2, conduirait la SS1 à être l'isoforme prépondérante pour la synthèse des glucanes A et B1. Les propriétés cinétiques de cette isoforme conduiraient à la formation de glucanes en moyenne plus courts que ceux synthétisés dans le contexte sauvage. Notons que dans le mutant *ss1-* décrit par

Delvallé et al (2005) c'est au contraire une augmentation générale de la taille des glucanes externes de la grappe d'amylopectine qui a été rapportée. Ainsi la formation de la structure externe de la grappe d'amylopectine semble fortement déterminée par les SS1 et SS2 probablement avec une compétition de substrat entre les deux isoformes et/ou une régulation réciproque des activités des deux enzymes au sein d'un même complexe multi-protéique.

Chez la plupart des espèces étudiées, la SS2 est en partie associée de manière non covalente au grain d'amidon (Denyer et al., 1993 ; Lin et al., 2005). La proportion de SS2 sous forme soluble est par ailleurs variable en fonction de l'organe et / ou de l'espèce étudiée. Par exemple, chez le poids, elle représente 70 % de l'activité SS totale dans l'embryon, alors que son activité est quasiment nulle dans la feuille (Tomlinson et al., 1998). Dans notre étude, l'activité de la SS2 n'a pas pu être détectée dans des extraits protéiques solubles de feuilles, que ce soit par zymogramme ou par incubation in vitro avec de l'ADP-Glucose radio-marqué. Plusieurs explications peuvent être avancées (elles ne sont pas mutuellement exclusives) : soit elle est présente en très faible quantité par rapport aux autres SS et son activité globale est totalement masquée (mais nous devrions l'observer par zymogramme à moins que la méthode ne soit pas suffisamment sensible) ; soit les conditions des tests utilisées ne sont pas adaptées à l'activité de cette isoforme (mauvais substrat, tampon ou pH, déstabilisation d'un complexe protéique, absence d'un cofacteur même si aucun n'a été décrit pour les amidon-synthétases jusqu'à présent, etc....).

La quantité d'amidon accumulée en fin de photopériode par le mutant *ss2-*, cultivé avec 16 h de jour / 8 h de nuit, est semblable à celle de la référence sauvage. Toutefois la structure de l'amylopectine est modifiée, et le ratio amylose / amylopectine (Am / Ap) est augmenté. L'augmentation du ratio Am / Ap a déjà été décrite pour les mutants déficients en amidon-synthétase. Mais dans ces derniers cas, celle-ci était la conséquence d'un défaut de synthèse de l'amylopectine. En effet, la réduction du contenu en amylopectine, liée à un défaut de synthèse spécifique de cette sous fraction de l'amidon, conduit à une augmentation automatique du ratio amylose/amylopectine sans que le contenu total en amylose ne soit augmenté. L'analyse phénotypique des mutants *ss2-* montre que la quantité d'amylose, normalisée par rapport à la masse de poids frais, est augmentée indiquant que le taux de synthèse du polymère est plus important chez ces mutants.

Cette augmentation peut être liée à une meilleure « efficacité » de la GBSS1. Ainsi, nous avons évalué les quantités de cette enzyme dans les grains d'amidon sauvages et mutants, par

électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration au nitrate d'argent, ou par Western blot (figure 42). Nos résultats indiquent qu'une augmentation de la quantité de GBSS1 dans le grain n'explique pas le phénotype observé. De même, nos résultats permettent d'exclure l'hypothèse d'une compétition de substrat entre la GBSS1 et la SS2. En effet, la distribution de la taille des glucanes de l'amylopectine du double mutant *gbss1- ss2-* (glucanes d'un DP inférieur à 40 résidus de glucose) est identique à celle du mutant *ss2-*. La GBSS1 utilise les glucanes de l'amylopectine pour synthétiser l'amylose (Ball et al., 1998). Si celle-ci utilisait le même type de glucanes que la SS2, alors l'inactivation de cette dernière pourrait conduire à l'augmentation de la quantité de substrats disponibles pour la GBSS1, et à l'augmentation de la synthèse d'amylose. Le fait que les structures des amylopectines *ss2-* et *gbss1- ss2-* soient identiques (pour les DP<40), indique que ce phénomène n'existe pas et qu'il n'est pas l'explication du phénotype du mutant *ss2-*.

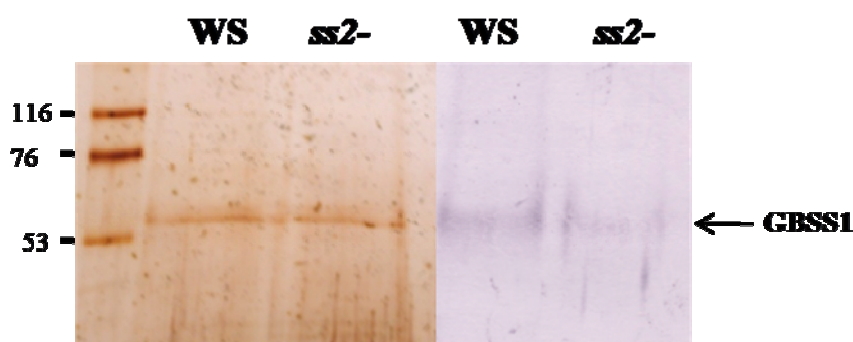


Figure 42 : Evaluation de la quantité de GBSS1 associée aux grains d'amidons sauvage et mutant *ss2-*. Les protéines liées au grain d'amidon sont extraites par chauffage dans un tampon SDS / β -mercaptoéthanol, puis déposées dans les puits d'un gel SDS-PAGE à 10 %. Après migration, le gel est coloré au nitrate d'argent (à gauche), ou les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées avec un anticorps anti GBSS1 (à droite), la détection est réalisée grâce à un kit biotine-streptavidine / phosphatase alcaline. Les masses apparentes sont indiquées en kDa sur le côté gauche de la figure. La flèche indique la bande correspondant à la GBSS1. WS : référence sauvage, *ss2-* : amidon mutant *ss2-*.

Le K_m apparent de la GBSS1 vis-à-vis de l'ADP-Glucose, mesuré directement par incubation de grains purifiés avec le glucosyl-nucléotide radio-marqué est, en outre, diminué dans le mutant *ss2-*. L'interprétation de ce résultat est difficile puisque plusieurs facteurs peuvent influencer la mesure. En effet la nature du substrat accepteur ne peut pas être maîtrisée car cette méthode implique d'utiliser des grains d'amidons natifs, dont la structure est différente selon qu'il s'agisse de grains sauvages ou mutants. De plus, la porosité des grains vis-à-vis du substrat peut être variable entre les amidons sauvage et mutant, dans lesquels les modifications de structure de l'amylopectine peuvent

entraîner une désorganisation macromoléculaire. Ainsi « l'accessibilité » de l'ADP-Glucose pour la GBSS1 pourrait être différente dans les deux types d'amidon.

A la lumière de ces résultats, plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer l'augmentation de la quantité d'amylose dans le mutant *ss2*⁻. La première explication est que la SS2 régule l'activité de la GBSS1 de manière allostérique. En l'absence de SS2, l'activité d'élongation des molécules d'amylose par la GBSS1 serait, dans ce cas, exacerbée. La deuxième hypothèse est que l'amylopectine du mutant *ss2*⁻ est un meilleur substrat que l'amylopectine sauvage pour la GBSS1. Une autre hypothèse est que la déformation des grains liée à la perte de la SS2 implique une modification de l'environnement de la GBSS1, qui conduirait à une meilleure efficacité de celle-ci. Enfin, une dernière possibilité concerne la structure des polymères synthétisés par le mutant *ss2*⁻. La structure de l'amylopectine étant profondément modifiée, on peut envisager qu'une partie de cette sous fraction « bascule » dans le pool d'amylose lors de l'élution sur la matrice de Sepharose CL-2B venant ainsi gonfler le poids de cette fraction de l'amidon. Une analyse détaillée de la structure de l'amylose serait nécessaire afin de vérifier cette hypothèse.

2. La redondance fonctionnelle existe essentiellement entre la SS2 et la SS3, et la biosynthèse normale du squelette de l'amylopectine nécessite la présence d'au moins SS1 et SS2 ou SS1 et SS3

L'étude de trois lignées, au sein desquelles deux isoformes étaient simultanément inactivées, nous ont permis d'étudier les niveaux de redondance et d'interaction entre les isoformes SS1, SS2 et SS3. En théorie, si deux isoformes agissent indépendamment, alors le phénotype résultant de la combinaison des deux mutations doit être similaire à l'addition des phénotypes des simples mutants correspondants.

Ce n'est pas le cas dans le double mutant *ss2*⁻ *ss3*⁻, dont les modifications structurales de l'amylopectine suivent la même tendance que pour le mutant *ss2*⁻, mais avec une amplitude nettement plus importante. Notre étude confirme les observations faites par Lloyd et al. (1999) sur une lignée de pomme de terre dans laquelle les SS2 et SS3 sont inactivées par ARN interférence. Dans cette lignée, la structure de l'amylopectine est modifiée de la même manière que dans le double mutant d'*Arabidopsis* dont nous rapportons l'analyse. La principale conclusion que nous tirons est que les deux isoformes sont partiellement redondantes dans l'allongement des glucanes de DP 12 à 28 de l'amylopectine. Cette caractéristique semble conservée chez les plantes, que ce soit dans le

métabolisme de l'amidon de réserve, ou de l'amidon transitoire. Par ailleurs, la fonction de la SS2 et de la SS3 que nous venons de décrire ne peut pas être compensée par l'activité des autres isoformes d'amidon-synthétases. Néanmoins, la SS3 n'est pas indispensable pour la biosynthèse d'un nombre normal de ce type de glucanes, car les modifications structurales de l'amylopectine, liées à la mutation *ss3-*, sont mineures. Ceci peut s'expliquer par un phénomène de compétition de substrat entre la SS3 et la SS2. Cette dernière compenserait l'absence de la SS3 en synthétisant plus de glucanes, en conséquence d'une meilleure disponibilité de substrat.

A l'inverse du double mutant *ss2- ss3-*, les profils de distribution de la longueur des glucanes de l'amylopectine des doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* sont très proches des profils obtenus par l'addition de ceux des simples mutants correspondants. Ces similitudes concernent essentiellement les glucanes produits par la SS2 et la SS3. Ces résultats montrent que la SS1 ne peut pas assurer la fonction des autres isoformes dans l'élaboration de la structure de l'amylopectine. Delvallé et al. (2005) avaient déjà suggéré qu'il n'existe pas ou très peu de redondance entre la SS1 et les autres isoformes. En effet, le phénotype du mutant *ss1-* corrèle bien avec les propriétés cinétiques décrites pour l'enzyme.

Des différences entre profils calculés et profils observés existent toutefois pour les petits glucanes. Leur proportion dans les profils observés est à chaque fois diminuée par rapport aux profils calculés. Ces résultats confirment que l'augmentation de ces mêmes glucanes dans les simples mutants *ss2-* et *ss3-* est le résultat de l'activité de la SS1.

Nos analyses structurales par β -amylolyse des amylopectines *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-* indiquent que la structure du squelette de la molécule est perturbée. En effet, la répartition de la longueur des glucanes y est significativement modifiée par rapport à l'amylopectine sauvage, indiquant que la synthèse normale du squelette nécessite au moins la présence de deux isoformes, soit SS1 et SS2, soit SS1 et SS3. Toutefois, chaque isoforme semble y être impliquée à des niveaux différents. Dans le simple mutant *ss1-*, le profil suit globalement la même tendance que ceux des mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*, mais avec des modifications de plus faible amplitude. L'explication la plus probable est que la SS1 contribue de manière modérée à l'élaboration du squelette de l'amylopectine, et que les autres isoformes ne sont pas en capacité de compenser cette activité. Ce résultat conforte l'idée que la SS1 agit indépendamment des deux autres isoformes. Les modifications de structure observées sont, en outre, peu marquées car la fonction principale de la SS1 est plutôt de produire les glucanes de type A et B1 qui sont les plus « externes » de la molécule (Delvallé et al., 2005).

Dans les mutants *ss2-* et *ss3-*, aucune modification de la structure du squelette de l'amylopectine ne peut être observée (les profils des amylopectines de ces mutants après β -amylolyse sont les mêmes que ceux de l'amylopectine sauvage). Comme nous l'avons montré, la SS2 et la SS3 ont des fonctions partiellement redondantes. La perte de l'une des deux est compensée imparfaitement par l'activité de l'autre dans l'allongement des glucanes de l'amylopectine (ceux de tailles intermédiaires). Ce phénomène de recouvrement des fonctions disparaît dans les doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*. Ceci pourrait s'expliquer par l'existence de complexes multi-protéiques impliquant plusieurs enzymes du métabolisme de l'amidon incluant les amidon-synthétases, mais aussi les enzymes de branchement (BEs) et les enzymes de débranchement (DBEs). La déstabilisation d'un tel complexe serait alors responsable du phénotype observé spécifiquement dans les doubles mutants et non pas dans les simples mutants. Une fonction de régulation négative a déjà été proposée pour la SS3, via des interactions physiques avec la SS1 au sein de complexes multi-protéiques. L'existence de ce type de complexes a, par ailleurs, été relatée chez le blé ou le maïs (Tetlow et al., 2008 ; Hennen-Bierwagen et al., 2008). Il est probable que la SS1 possède également une fonction de régulation, par l'intermédiaire de ces mêmes complexes. Cette fonction de régulation concernerait les activités de la SS3 et de la SS2 mais aussi celles des autres enzymes impliquées dans la synthèse de l'amylopectine (BEs et DBEs).

La diminution du contenu en amidon dans le double mutant *ss2- ss3-* ne corrèle pas avec le niveau d'activité SS mesuré dans l'extrait cellulaire correspondant. En effet, cette dernière est identique à l'activité mesurée dans la référence sauvage. Ceci peut paraître surprenant car l'activité de la SS1, évaluée grâce à l'analyse du mutant *ss1-*, représente environ 50 % de l'activité totale. De plus, l'élimination de la SS2 ou de la SS3, n'entraîne pas de diminution significative de l'activité SS mesurée *in vitro*. Comme nous venons de le citer, il fut proposé par Zhang et al. (2005), une fonction de régulateur négatif de l'activité de la SS1 à la SS3 via des interactions physiques entre les deux isoformes. L'activité de la SS1 serait donc plus élevée dans le double mutant que chez le sauvage. Ce phénomène a déjà été observé dans l'albumen de maïs et l'albumen du riz (Cao et al., 1999 ; Fujita et al., 2007).

Dans les mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*, l'activité SS résiduelle ne correspond pas non plus à celle attendue, au regard de l'analyse des simples mutants. Dans les doubles mutants, l'activité mesurée est à chaque fois nettement moins importante que l'activité résiduelle du mutant *ss1-*. Or, comme nous venons de l'évoquer, la perte de la SS2 ou de la SS3 n'entraîne pas de modification significative de l'activité SS totale mesurée *in vitro* dans un extrait cellulaire. Ce résultat conforte

l'idée que la SS1 possède un rôle de régulation (probablement positive) sur les deux autres isoformes, tout comme la SS3 régule l'activité de la SS1 de manière négative. Rappelons aussi que les amidon-synthétases ne sont pas les seules enzymes à intervenir dans la biosynthèse de l'amylopectine. L'absence de l'une ou l'autre isoforme voire de deux d'entre-elles peut conduire à une déstabilisation plus ou moins importante des complexes protéiques à l'œuvre. Les contenus en amidon dans les différents mutants décrits dans ce mémoire ne peuvent donc pas être exclusivement corrélés à l'activité d'élongation totale mesurée *in vitro*. Par ailleurs il est impossible actuellement de quantifier précisément le niveau des activités de branchement et de débranchement *in vitro*. Dans ces conditions il est impossible de prédire le contenu en amidon d'une plante sur la simple description des activités déficientes.

3. L'absence conjointe des SS1, SS2 et SS3 conduit à l'accumulation de matériel insoluble

Dans le triple mutant *ss1- ss2- ss3-*, bien que l'activité d'élongation mesurée *in vitro* soit nulle, la plante accumule encore 15 à 20 % du contenu normal d'amidon. Le fractionnement de ce matériel par chromatographie d'exclusion stérique montre qu'il est composé de deux polymères, dont les profils d'élution correspondent à ceux de l'amylose et de l'amylopectine. L'amylopectine résiduelle de ce mutant pourrait résulter de l'action de la SS4, dont la fonction dans l'allongement des glucanes de l'amylopectine reste à déterminer. L'intervention de la GBSS1 dans l'allongement des glucanes n'est cependant pas à exclure car la longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode – polysaccharide est anormalement élevée pour le pic d'amylopectine, indiquant une augmentation générale de la taille moyenne des glucanes dans la molécule. L'obtention d'une lignée quadruple mutante *gbss1- ss1- ss2- ss3-* devrait nous renseigner sur la prépondérance de la SS4 et de la GBSS1 pour la synthèse de cet amidon résiduel.

La distribution de longueur des glucanes de l'amylopectine du triple mutant est drastiquement modifiée, et ressemble à celle du glycogène. La structure du squelette est modifiée de la même manière que dans les doubles mutants *ss1- ss2-* et *ss1- ss3-*, avec une augmentation légèrement plus importante de la proportion des petits glucanes. Ce résultat confirme nos observations concernant les doubles mutants, dont nous venons de discuter les phénotypes. Il montre que, bien que les SS1, SS2 et SS3 soient largement responsables de la biosynthèse de l'amylopectine, le polymère peut toujours être synthétisé en présence de la SS4 et de la GBSS1 uniquement.

Aucune activité SS n'a pu être détectée *in vitro* à partir d'un extrait cellulaire du triple mutant, indiquant que l'activité de la SS4 est soit très instable (protéolyse, désagrégation d'un complexe multiprotéique, etc), soit impossible à détecter dans les conditions utilisées pour le dosage *in vitro* (substrat inadéquat, absence d'un cofacteur, etc).

L'ensemble de ce travail met en évidence que l'activité d'élongation, et en particulier l'activité des amidon-synthétases solubles dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*, n'est pas l'unique facteur qui détermine l'élaboration de la molécule d'amylopectine. Nous avons montré que la redondance entre les isoformes existe surtout entre la SS2 et la SS3 pour l'allongement des glucanes de DP 12 à 28. Par ailleurs, même si la SS1 agit indépendamment, celle-ci semble réguler positivement l'activité des deux autres isoformes. Cette étude fait donc le lien entre l'identification de complexes impliquant les amidon-synthétases solubles, et la fonction des différentes isoformes, en particulier dans l'élaboration des glucanes « internes » de l'amylopectine. L'étude des modifications induites par les absences conjointes des SS2 et SS3 sur le squelette du polymère, nous permettraient de confirmer cette fonction. Ceci représente l'une des perspectives de ce travail, tout comme la volonté de déterminer si ces caractéristiques sont conservées chez l'ensemble des végétaux. La détermination de l'implication des enzymes de branchement (BEs) et de leurs interactions potentielles avec les amidon-synthétases s'avère, elle aussi, particulièrement intéressante. Cette famille d'enzyme a également été détectée au sein des complexes protéiques impliquant les amidon-synthétases, amenant la compréhension du métabolisme à un niveau de complexité supérieur. L'étude de combinaisons de mutations pour les BE et les SS permettrait de confirmer leurs fonctions respectives dans la biosynthèse de l'amylopectine, et surtout de mettre en évidence d'éventuels phénomènes d'interaction fonctionnelle, sur la base de complexes multi-protéiques.

II. Implication de SS3 et SS4 dans l'initiation de la synthèse de l'amidon

1. La SS3 et la SS4 sont indispensables pour initier la synthèse d'amidon

L'analyse d'un double mutant *ss3- ss4-* nous a permis de montrer que la biosynthèse d'un polymère insoluble de type amidon nécessitait au moins la présence de la SS3 ou de la SS4 active. L'absence du polysaccharide de réserve dans la lignée double mutante indique que les autres isoformes ne sont pas en capacité de compenser cette fonction. Ceci est confirmé par les phénotypes de lignées *ss1- ss4-* et *ss2- ss4-*, qui se révèlent être l'addition des phénotypes simples mutants correspondants, en termes d'amidon accumulé ou de distribution de la longueur des glucanes de l'amylopectine.

La présence de la SS3 apparaît donc indispensable à la formation de l'amidon présent dans la lignée *ss4-*, décrite par Roldan et al. (2007). Cette lignée accumule un seul (rarement deux) grand grain d'amidon par chloroplaste. Le résultat décrit plus haut dans ce mémoire montre que la SS3 possède une fonction partiellement redondante de celle de la SS4 pour l'initiation de la synthèse de l'amidon dans la feuille d'*A. thaliana*.

Le phénotype décrit pour le mutant *ss4-* est encore plus marqué dans les lignées *ss1- ss4-* et *ss2- ss4-*. En effet, alors que les simples mutants *ss1-* et *ss2-* accumulent un nombre normal de grains, comparé à la référence sauvage, deux types de chloroplaste ont été identifiés dans les lignées *ss1- ss4-* et *ss2- ss4-*. L'un contient un seul gros grain d'amidon, l'autre est vide et ne contient aucune structure visible sur des coupes ultrafines de feuilles observées par microscopie électronique à transmission. Il n'existe pas de corrélation entre la répartition de chaque type de chloroplaste et la localisation tissulaire des cellules concernées, indiquant que la présence d'amidon n'est pas en relation avec des caractéristiques cellulaires spécifiques. Comme nous l'avons décrit dans la première partie de cette discussion, il existe de nombreuses évidences en faveur de l'existence de complexes impliquant les isoformes SS1, SS2 et SS3. En absence de la SS4, l'initiation de la biosynthèse d'amidon pourrait être contrôlée par la SS3, en interaction avec les SS1 et SS2. La suppression de l'une de ces deux isoformes aurait pour conséquence une diminution de l'activité de la SS3 et pourrait conduire à la présence de chloroplastes dépourvus d'amidon.

2. La présence de la SS4 ou de la SS3 est suffisante pour initier la synthèse d'amidon

L'analyse phénotypique des triples mutants *ss1- ss2- ss3-* et *ss1- ss2- ss4-* nous a permis de mettre en évidence que la SS3 ou la SS4 sont nécessaires et suffisantes pour initier la synthèse d'amidon, même en l'absence des autres isoformes. Néanmoins la redondance n'est pas totale, et la SS4 est nécessaire pour établir le nombre normal de grains par chloroplaste. Comme dans le cas des doubles mutants *ss1- ss4-* et *ss2- ss4-*, le triple mutant *ss1- ss2- ss4-* possède des chloroplastes vides. Ceci conforte l'idée que l'activité d'initiation de la SS3 est réduite quand les isoformes SS1 et SS2 sont absentes. Dans les chloroplastes du triple mutant *ss1- ss2- ss3-*, où seule la SS4 est active, plusieurs petits grains d'amidon sont visibles. Ce résultat montre que, contrairement à la SS3, la SS4 est capable de contrôler correctement le nombre de sites d'initiation, bien que l'absence des autres isoformes conduise ultérieurement à la limitation de la croissance du grain (d'où la présence de grains très petits).

La GBSS1 est toujours présente dans ces triples mutants. Celle-ci est vraisemblablement responsable de l'augmentation de la proportion d'amylose dans les amidons correspondants. En l'absence des autres isoformes, la disponibilité en l'ADP-Glucose pour la GBSS1 augmente rendant celle-ci un peu plus efficace que dans un contexte sauvage.

La fonction de la GBSS1 dans la biosynthèse des glucanes de l'amylose est établie. Dans un contexte où trois des quatre isoformes fonctionnelles d'amidon-synthétases solubles sont inactivées, le métabolisme normal de l'amylopectine est fortement perturbé, et, dans ce cas, l'activité GBSS1 pourrait avoir un impact sur la synthèse des glucanes de l'amylopectine. L'analyse de distribution de longueur des glucanes des doubles mutants *gbss1- ss3-* et *gbss1- ss4-* montre qu'il n'existe pas d'interaction fonctionnelle entre la GBSS1 et la SS3 et entre la GBSS1 et la SS4 pour l'élaboration des glucanes de DP 5 à 40. Néanmoins, dans les triples mutants *ss1- ss2- ss3-* et *ss1- ss2- ss4-*, l'augmentation de la quantité de substrats disponibles pour la GBSS1, qu'ils soient donneurs (ADP-glucose) ou accepteurs (les extrémités non-réductrices des glucanes), pourrait conduire à ce que la GBSS1 allonge la plupart des glucanes, dont une partie se retrouverait dans la molécule d'amylopectine, via les activités de branchement et de débranchement. Ceci semble être le cas dans le mutant *ss1- ss2- ss3-*, en particulier. Dans ce dernier, la $\lambda_{\max}$ du complexe iode – amylopectine est nettement augmentée, indiquant une augmentation de la taille moyenne des glucanes. La synthèse de ceux-ci ne semble pas résulter de l'activité de la SS4 puisque son inactivation n'entraîne pas de modification de la $\lambda_{\max}$ de l'amylopectine. Néanmoins comme nous l'évoquions précédemment, ce point devra être confirmé par la production et l'analyse du quadruple mutant *gbss1- ss1- ss2- ss3-*.

3. Les deux isoformes ont des rôles différents dans l'initiation

Il a récemment été suggéré par Satoh et al. (2008) que l'amidon-phosphorylase pouvait jouer un rôle dans l'initiation de la synthèse d'amidon dans l'albumen du riz. Roldan et al. (2007) avaient montré que l'expression de deux gènes codant des amidon-phosphorylases est augmentée dans le mutant *ss4-* d'*Arabidopsis thaliana*. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation de l'activité phosphorylase dans les extraits cellulaires préparés à partir de feuilles. Nous relatons, de même, une augmentation de cette activité dans l'ensemble des combinaisons impliquant la mutation au locus *SS4*. Cet effet est très marqué dans le double mutant *ss3- ss4-*, puisque que le niveau d'activité correspond à dix fois celui détecté dans une plante sauvage. Malgré ceci, la lignée n'accumule plus du tout d'amidon, montrant, de fait, que les amidon-phosphorylases possèdent un autre rôle que celui d'initier la biosynthèse du polymère. Néanmoins nos résultats n'excluent pas totalement l'idée d'une

fonction des amidon-phosphorylases dans les toutes premières étapes de la formation/synthèse du grain d'amidon.

Nos résultats indiquent clairement que la SS3 et la SS4 sont responsables de l'initiation de la synthèse d'amidon, bien que possédant deux fonctions distinctes. Ces deux isoformes sont phylogénétiquement reliées, puisque qu'elles appartiennent au même sous-groupe d'amidon-synthétases (Dechamps et al., 2008). De plus, elles possèdent la même particularité structurale au sein du motif K-X-G-G-L, impliqué dans l'activité catalytique des amidon-synthétases, où l'acide aminé variable (X) est de nature apolaire (Leterrier et al., 2008). Ces éléments peuvent expliquer la redondance partielle qui existe entre ces deux isoformes.

Néanmoins, les deux protéines possèdent des particularités, qui suggèrent qu'elles présentent également des spécificités fonctionnelles. La partie N-terminale de la SS3 contient trois domaines de liaison à l'amidon, ou « starch binding domains », qui modulent son affinité pour l'amylopectine. L'élimination de ces domaines entraîne une diminution du K_m de l'enzyme de 18 fois vis-à-vis de l'ADP-Glucose (Valdez et al., 2008). Ces variations peuvent expliquer pourquoi le domaine catalytique de la SS3 peut compléter le phénotype d'une lignée *glgA*- d'*Agrobacterium* (Busi et al., 2008). Dans cette lignée exempte de glycogène, l'expression hétérologue de la partie C terminale de la SS3 restaure l'accumulation normale de glycogène, alors que l'expression de la forme complète dans une lignée d'*E. coli* exempte de glycogène ne restaure la synthèse qu'à hauteur de 5 %. Les domaines de liaison à l'amidon sont absents des séquences de SS4 identifiées chez les plantes. Celles-ci contiennent, par ailleurs, deux domaines hélicoïdaux appelés « coiled-coil domain » (Rose et al., 2004). Ce type de motifs structuraux est retrouvé chez des protéines dont la fonction est, notamment, de faire le lien entre des complexes protéiques et des structures cellulaires macromoléculaires. Par ailleurs, la conservation de ces motifs suggère qu'ils doivent avoir une fonction bien particulière dans cette classe d'amidon-synthétases.

La caractérisation enzymatique des SS3 et SS4 recombinantes indique également que les deux isoformes ont des fonctions différentes *in vivo*. En effet la SS4 possède une affinité plus importante que la SS3 pour l'ADP-Glucose, et utilise préférentiellement le maltotriose, ce qui n'est pas le cas des autres isoformes. Une autre différence entre l'activité des deux enzymes, visible sur zymogramme en absence d'amorce, est que la SS3 synthétise des glucanes linéaires suffisamment longs pour être colorés à l'iode, alors que la SS4 en est incapable ; L'analyse de l'activité SS dans les différents mutants indique également des différences entre les deux isoformes. En effet, la

diminution d'activité dans le simple mutant *ss3-* et l'activité résiduelle dans le triple mutant *ss1- ss2- ss4-*, montre que l'activité de la SS3 correspond à 15 à 30 % de l'activité totale. Dans le mutant *ss1- ss2- ss3-*, aucune activité SS résiduelle n'a pu être détectée, tout comme aucune diminution n'a pu être mesurée dans le mutant *ss4-*. Ces résultats indiquent que l'activité de la SS4, *in vivo*, n'est pas détectée par la méthode utilisée, ou que cette isoforme est inactive en raison de modifications post-traductionnelles ou d'interactions avec d'autres molécules.

La SS3 est capable d'initier la synthèse de glucanes assez longs pour être colorés à l'iode. Toutefois, si cette capacité était suffisante pour initier la synthèse d'amidon, alors l'unique activité de la SS3 serait suffisante pour synthétiser un nombre correct de grains par chloroplaste. La fonction de la SS4 ne semble donc pas se limiter à l'amorçage des glucanes, mais aussi concerner le processus de nucléation du grain d'amidon. Ce rôle de la SS4 est conforté par nos résultats d'analyses de la localisation spatiale de l'enzyme. Celle-ci n'est pas uniformément répartie à la surface du grain d'amidon, comme on pourrait l'attendre d'une amidon-synthétase dont le rôle est d'allonger les glucanes de l'amylopectine. L'enzyme n'est présente que sur de petites zones, sur le côté des grains. La structure de la SS4, en particulier les domaines hélicoïdaux, que nous avons décrit plus haut, pourraient être impliqués (seuls ou en association avec d'autres protéines) dans la formation de structures quaternaires responsables de cette localisation spatiale. Ce type de complexe pourrait être responsables de la synthèse de glucanes composant le centre de nucléation et, plus tard, le hile du grain d'amidon. Cette capacité expliquerait pourquoi les grains d'amidon *ss4-* sont désorganisés en leur centre, au niveau du hile (Roldan et al., 2007).

La SS3 serait incapable de former le centre de nucléation, ou le faire très difficilement, ce qui conduirait à la biosynthèse d'un seul grain par chloroplaste quand la SS4 est absente. Cette capacité d'initiation de la SS3 serait réduite quand les SS1 et SS2 sont inactivées, ce qui expliquerait le fait que certains chloroplastes soient vides dans les mutants *ss1- ss4-*, *ss2- ss4-* et *ss1- ss2- ss4-*. Il est possible que d'autres facteurs soient impliqués dans la détermination du nombre d'événements d'initiation par chloroplaste. En effet la déficience en isoamylase conduit à l'accumulation d'un plus grand nombre de grains d'amidon, de taille réduite, chez la pomme de terre et l'orge (Burton et al., 2002 ; Bustos et al., 2004). Nous ne pouvons exclure que le nombre d'événements de nucléation résulte d'un équilibre entre les activités d'initiation, portée par la SS4 et la SS3, et de dégradation, portée par exemple par les isoamylases. Des études complémentaires, comme l'analyse de combinaisons mutantes pour les SS3 et SS4, et les isoamylases, nous permettraient d'identifier un mécanisme de cette nature.

BIBLIOGRAPHIE

- Abel, G. J. W., F. Springer, et al. (1996). "Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.)." The Plant Journal **10**(6): 981-991.
- Baba, T., M. Nishihara, et al. (1993). "Identification, cDNA Cloning, and Gene Expression of Soluble Starch Synthase in Rice (*Oryza sativa* L.) Immature Seeds." Plant Physiol. **103**(2): 565-573.
- Baba T, Yoshii M, Kainuma K (1987). "Acceptor molecule for granule bound starch synthase from sweet potato roots." Starch-Stärke **39**: 52-56
- Baker, A. A., M. J. Miles, et al. (2001). "Internal structure of the starch granule revealed by AFM." Carbohydr Res **330**(2): 249-56.
- Ball, S., H.-P. Guan, et al. (1996). "From Glycogen to Amylopectin: A Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule." Cell **86**(3): 349-352.
- Ball, S., T. Marianne, et al. (1991). "A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase." Planta **185**(1): 17-26.
- Ball, S. G. and M. K. Morell (2003). "FROM BACTERIAL GLYCOGEN TO STARCH: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule." Annual Review of Plant Biology **54**(1): 207-233.
- Ball, S. G., M. H. B. J. van de Wal, et al. (1998). "Progress in understanding the biosynthesis of amylose." Trends in Plant Science **3**(12): 462-467.
- Ballicora, M. A., J. B. Frueauf, et al. (2000). "Activation of the Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase by Thioredoxin." J. Biol. Chem. **275**(2): 1315-1320.
- Baunsgaard, L., H. Lütken, et al. (2005). "A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated α -glucans and is involved in starch degradation in Arabidopsis." The Plant Journal **41**(4): 595-605.
- Blumenfeld, M. L., W. J. Whelan, et al. (1983). "The initiation of glycogen biosynthesis in rat heart." Eur J Biochem **135**(1): 175-9.
- Boyer, C. D. and J. Preiss (1979). "Properties of Citrate-stimulated Starch Synthesis Catalyzed by Starch Synthase I of Developing Maize Kernels." Plant Physiol **64**(6): 1039-1042.
- Buléon, A., P. Colonna, et al. (1998). "Starch granules: structure and biosynthesis." International Journal of Biological Macromolecules **23**(2): 85-112.
- Buleon, A., D. J. Gallant, et al. (1997). "Starches from A to C (*Chlamydomonas reinhardtii* as a Model Microbial System to Investigate the Biosynthesis of the Plant Amylopectin Crystal)." Plant Physiol. **115**(3): 949-957.
- Buleon, A., C. Gerard, et al. (1998). "Details of the Crystalline Ultrastructure of C-Starch Granules Revealed by Synchrotron Microfocus Mapping." Macromolecules **31**(19): 6605-6610.

- Burton, R. A., H. Jenner, et al. (2002). "Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity." The Plant Journal **31**(1): 97-112.
- Buschiazzo, A., J. E. Ugalde, et al. (2004). "Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation." EMBO J **23**(16): 3196-205.
- Busi, M. V., N. Palopoli, et al. (2008). "Functional and structural characterization of the catalytic domain of the starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **70**(1): 31-40.
- Bustos, R., B. Fahy, et al. (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.
- Cao, H., J. Imparl-Radosevich, et al. (1999). "Identification of the Soluble Starch Synthase Activities of Maize Endosperm." Plant Physiol. **120**(1): 205-216.
- Cheng, C., J. Mu, et al. (1995). "Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol. Cell. Biol. **15**(12): 6632-6640.
- Chia, T., D. Thorneycroft, et al. (2004). "A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night." The Plant Journal **37**(6): 853-863.
- Colleoni, C., D. Dauvillee, et al. (1999). "Genetic and Biochemical Evidence for the Involvement of alpha -1,4 Glucanotransferases in Amylopectin Synthesis." Plant Physiol. **120**(4): 993-1004.
- Colleoni, C., D. Dauvillee, et al. (1999). "Biochemical Characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* alpha -1,4 Glucanotransferase Supports a Direct Function in Amylopectin Biosynthesis." Plant Physiol. **120**(4): 1005-1014.
- Commuri, P. D. and P. L. Keeling (2001). "Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties." The Plant Journal **25**(5): 475-486.
- Copeland, L. and J. Preiss (1981). "Purification of Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase." Plant Physiol **68**(5): 996-1001.
- Coutinho, P. M., E. Deleury, et al. (2003). "An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases." J Mol Biol **328**(2): 307-17.
- Craig, J., J. R. Lloyd, et al. (1998). "Mutations in the Gene Encoding Starch Synthase II Profoundly Alter Amylopectin Structure in Pea Embr yos." Plant Cell **10**(3): 413-426.
- Critchley, J. H., S. C. Zeeman, et al. (2001). "A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*." Plant J **26**(1): 89-100.
- Dauvillée, D., V. Chochois, et al. (2006). "Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*." The Plant Journal **48**(2): 274-285.

- Dauvillée, D., C. Colleoni, et al. (2001). "Biochemical Characterization of Wild-Type and Mutant Isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* Supports a Function of the Multimeric Enzyme Organization in Amylopectin Maturation." Plant Physiol. **125**(4): 1723-1731.
- Delatte, T., M. Trevisan, et al. (2005). "Arabidopsis mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis." The Plant Journal **41**(6): 815-830.
- Delvallé, D., S. Dumez, et al. (2005). "Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves." The Plant Journal **43**(3): 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., B. Clarke, et al. (1996). "The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules." The Plant Journal **10**(6): 1135-1143.
- Denyer, K., C. Sidebottom, et al. (1993). "Soluble isoforms of starch synthase and starch-branching enzyme also occur within starch granules in developing pea embryos." The Plant Journal **4**(1): 191-198.
- Denyer, K., D. Waite, et al. (1999). "Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively." Biochem. J. **340**(1): 183-191.
- Deschamps, P., I. Haferkamp, et al. (2006). "Nature of the Periplastidial Pathway of Starch Synthesis in the Cryptophyte *Guillardia theta*." Eukaryotic Cell **5**(6): 954-963.
- Deschamps, P., H. Moreau, et al. (2008). "Early Gene Duplication Within Chloroplastida and Its Correspondence With Relocation of Starch Metabolism to Chloroplasts." Genetics **178**(4): 2373-2387.
- Dian, W., H. Jiang, et al. (2003). "Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm." Planta **218**(2): 261-268.
- Dian, W., H. Jiang, et al. (2005). "Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice." J. Exp. Bot. **56**(412): 623-632.
- Dinges, J. R., C. Colleoni, et al. (2003). "Mutational Analysis of the Pullulanase-Type Debranching Enzyme of Maize Indicates Multiple Functions in Starch Metabolism." Plant Cell **15**(3): 666-680.
- Dry, I., A. Smith, et al. (1992). "Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato." Plant J **2**(2): 193-202.

- Dumez, S., F. Wattebled, et al. (2006). "Mutants of Arabidopsis Lacking Starch Branching Enzyme II Substitute Plastidial Starch Synthesis by Cytoplasmic Maltose Accumulation." Plant Cell **18**(10): 2694-2709.
- Edwards, A., D. C. Fulton, et al. (1999). "A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers." The Plant Journal **17**(3): 251-261.
- Edwards, A., J. Marshall, et al. (1995). "Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers." The Plant Journal **8**(2): 283-294.
- Fettke, J., N. Eckermann, et al. (2004). "The glycan substrate of the cytosolic (Pho 2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization." Plant J **39**(6): 933-46.
- Fettke, J., N. Eckermann, et al. (2005). "Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast." Plant J **43**(4): 568-85.
- Fontaine, T., C. D'Hulst, et al. (1993). "Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin." J. Biol. Chem. **268**(22): 16223-16230.
- French D, Smith EE, Whelan WJ (1972). "The structural analysis and enzymic synthesis of a pentasaccharide alpha-limit dextrin formed from amylopectin by *Bacillus subtilis* alpha-amylase." Carbohydr Res. Apr;**22**(1):123-34.
- Fulton, D. C., M. Stettler, et al. (2008). "beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in *Arabidopsis* chloroplasts." Plant Cell **20**(4): 1040-1058.
- Furukawa, K., M. Tagaya, et al. (1990). "Identification of lysine 15 at the active site in *Escherichia coli* glycogen synthase. Conservation of Lys-X-Gly-Gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes." J Biol Chem **265**(4): 2086-90.
- Furukawa, K., M. Tagaya, et al. (1993). "Role of the conserved Lys-X-Gly-Gly sequence at the ADP-glucose-binding site in *Escherichia coli* glycogen synthase." J Biol Chem **268**(32): 23837-42.
- Furukawa, K., M. Tagaya, et al. (1994). "Identification of Lys277 at the active site of *Escherichia coli* glycogen synthase. Application of affinity labeling combined with site-directed mutagenesis." J. Biol. Chem. **269**(2): 868-871.
- Gallant, D. J., B. Bouchet, et al. (1997). "Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization." Carbohydrate Polymers **32**(3-4): 177-191.
- Gao, M., J. Wanat, et al. (1998). "Characterization of *dull1*, a Maize Gene Coding for a Novel Starch Synthase." Plant Cell **10**(3): 399-412.

- Ghosh, H. P. and J. Preiss (1966). "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts." J Biol Chem **241**(19): 4491-504.
- Godet, M. C., V. Tran, et al. (1995). "Inclusion/exclusion of fatty acids in amylose complexes as a function of the fatty acid chain length." Int J Biol Macromol **17**(6): 405-8.
- Guan, H., P. Li, et al. (1997). "Comparing the Properties of *Escherichia coli* Branching Enzyme and Maize Branching Enzyme." Archives of Biochemistry and Biophysics **342**(1): 92-98.
- Guan, H. P. and J. Preiss (1993). "Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*)." Plant Physiol. **102**(4): 1269-1273.
- Harn, C., M. Knight, et al. (1998). "Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm." Plant Molecular Biology **37**(4): 639-649.
- Harrison, H., Wang, (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**(6): 753-762.
- Hennen-Bierwagen, T. A., F. Liu, et al. (2008). "Starch Biosynthetic Enzymes from Developing Maize Endosperm Associate in Multisubunit Complexes." Plant Physiol. **146**(4): 1892-1908.
- Hirose, T. and T. Terao (2004). "A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.)." Planta **220**(1): 9-16.
- Hizukuri, S. (1986). "Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance." Carbohydrate Research **147**: 342-347.
- Hizukuri S., Y. Takeda, et al. (1997). "Starch: Structure and Functionality." London Royal Society of Chemistry 1997:121.
- Hussain, H., A. Mant, et al. (2003). "Three Isoforms of Isoamylase Contribute Different Catalytic Properties for the Debranching of Potato Glucans." Plant Cell **15**(1): 133-149.
- Hwang, S. K., S. Hamada, et al. (2006). "ATP binding site in the plant ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit." FEBS Lett **580**(28-29): 6741-8.
- Imberty, A., H. Chanzy, et al. (1988). "The double-helical nature of the crystalline part of A-starch." J Mol Biol **201**(2): 365-78.
- Imparl-Radosevich, J. M., P. Li, et al. (1998). "Purification and Characterization of Maize Starch Synthase I and Its Truncated Forms." Archives of Biochemistry and Biophysics **353**(1): 64-72.
- Imparl-Radosevich, J. M., D. J. Nichols, et al. (1999). "Analysis of Purified Maize Starch Synthases IIa and IIb: SS Isoforms Can Be Distinguished Based on Their Kinetic Properties." Archives of Biochemistry and Biophysics **362**(1): 131-138.

- James, M. G., D. S. Robertson, et al. (1995). "Characterization of the Maize Gene *sugary1*, a Determinant of Starch Composition in Kernels." Plant Cell **7**(4): 417-429.
- Jenkins, P. J. and A. M. Donald (1995). "The influence of amylose on starch granule structure." International Journal of Biological Macromolecules **17**(6): 315-321.
- Jiang, H., W. Dian, et al. (2004). "Molecular cloning and expression analysis of three genes encoding starch synthase II in rice." Planta **218**(6): 1062-1070.
- Knight, M. E., C. Harn, et al. (1998). "Molecular cloning of starch synthase I from maize (W64) endosperm and expression in *Escherichia coli*." The Plant Journal **14**(5): 613-622.
- Kossmann, J., G. J. W. Abel, et al. (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**(4): 503-511.
- Lao, N. T., O. Schoneveld, et al. (1999). "An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted β -amylase." The Plant Journal **20**(5): 519-527.
- Leterrier, M., L. Holappa, et al. (2008). "Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications." BMC Plant Biology **8**(1): 98.
- Li, Z., Rahman, S., Kosar-Hashemi, B., Mouille, G., Appels, R., and Morell, M. K., (1999). "Cloning and characterization of gene encoding wheat starch synthase I." Theoretical and Applied Genetics, **98**: 1208-1216.
- Li, Z., X. Chu, et al. (1999). "The Localization and Expression of the Class II Starch Synthases of Wheat." Plant Physiol. **120**(4): 1147-1156.
- Lin, A., J. Mu, et al. (1999). "Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction." Arch Biochem Biophys **363**(1): 163-70.
- Lin, D. G. and C. L. Jeang (2005). "Cloning, expression, and characterization of soluble starch synthase I cDNA from taro (*Colocasia esculenta* Var. *esculenta*)." J Agric Food Chem **53**(20): 7985-90.
- Lin, T. P., T. Caspar, et al. (1988). "A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme." Plant Physiol **88**(4): 1175-1181.
- Lloyd, J. R., V. Landschütz, et al. (1999). "Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin." Biochem. J. **338**(2): 515-521.
- Lomako, J., W. M. Lomako, et al. (2004). "Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis." Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects **1673**(1-2): 45-55.
- Lorberth, R., G. Ritte, et al. (1998). "Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening." Nat Biotechnol **16**(5): 473-7.

- Machovic, M. and S. Janecek (2006). "The evolution of putative starch-binding domains." FEBS Lett **580**(27): 6349-56.
- Marshall, J., C. Sidebottom, et al. (1996). "Identification of the Major Starch Synthase in the Soluble Fraction of Potato Tubers." Plant Cell **8**(7): 1121-1135.
- Melendez, R., E. Melendez-Hevia, et al. (1998). "Physical Constraints in the Synthesis of Glycogen That Influence Its Structural Homogeneity: A Two-Dimensional Approach." Biophys. J. **75**(1): 106-114.
- Mikkelsen R, Mutenda KE, Mant A, Schurmann P, Blennow A (2005). "Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5):1785-90.
- Morell, M. K., B. Kosar-Hashemi, et al. (2003). "Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties." The Plant Journal **34**(2): 173-185.
- Mouille, G., M. L. Maddelein, et al. (1996). "Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants." Plant Cell **8**(8): 1353-1366.
- Mu, C., Harn, C., Ko, Y-T., Singletary, G. W., Keeling, P. L., and Wasserman, B. P., (1994). "Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm." The Plant Journal, **6**(2): 151-159.
- Munoz, F. J., E. Baroja-Fernandez, et al. (2005). "Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves." Plant Cell Physiol **46**(8): 1366-76.
- Nakamura, Y., T. Umemoto, et al. (1996). "Starch debranching enzyme (R-enzyme or pullulanase) from developing rice endosperm: purification, cDNA and chromosomal localization of the gene." Planta **199**(2): 209-18.
- Nichols, D. J., P. L. Keeling, et al. (2000). "Involvement of Conserved Aspartate and Glutamate Residues in the Catalysis and Substrate Binding of Maize Starch Synthase." Biochemistry **39**(26): 7820-7825.
- Nielsen, T. H., B. Wischmann, et al. (1994). "Starch Phosphorylation in Potato Tubers Proceeds Concurrently with de Novo Biosynthesis of Starch." Plant Physiol **105**(1): 111-117.
- Niittyla, T., G. Messerli, et al. (2004). "A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves." Science **303**(5654): 87-89.
- Palopoli, N., M. V. Busi, et al. (2006). "Starch-synthase III family encodes a tandem of three starch-binding domains." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **65**(1): 27-31.
- Pan, D. D. and J. I. Jane (2000). "Internal structure of normal maize starch granules revealed by chemical surface gelatinization." Biomacromolecules **1**(1): 126-32.

- 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.
- Ral, J.-P., E. Derelle, et al. (2004). "Starch Division and Partitioning. A Mechanism for Granule Propagation and Maintenance in the Picophytoplanktonic Green Alga *Ostreococcus tauri*." Plant Physiol. **136**(2): 3333-3340.
- Ridout, M. J., M. L. Parker, et al. (2003). "Atomic force microscopy of pea starch granules: granule architecture of wild-type parent, r and rb single mutants, and the rrb double mutant." Carbohydr Res **338**(20): 2135-47.
- Ritte, G., M. Heydenreich, et al. (2006). "Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases." FEBS Letters **580**(20): 4872-4876.
- Ritte, G., R. Lorberth, et al. (2000). "Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules." The Plant Journal **21**(4): 387-391.
- Ritte, G., A. Scharf, et al. (2004). "Phosphorylation of Transitory Starch Is Increased during Degradation." Plant Physiol. **135**(4): 2068-2077.
- 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., F. Wattebled, et al. (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.
- Rose, A., S. Manikantan, et al. (2004). "Genome-Wide Identification of *Arabidopsis* Coiled-Coil Proteins and Establishment of the ARABI-COIL Database." Plant Physiol. **134**: 927-939.
- Scheidig, A., A. Fröhlich, et al. (2002). "Downregulation of a chloroplast-targeted α -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves." The Plant Journal **30**(5): 581-591.
- Schulman, A. H., S. Tomooka, et al. (1995). "Structural analysis of starch from normal and shx (shrunken endosperm) barley (*Hordeum vulgare* L.)." Carbohydrate Research **275**(2): 361-369.
- Schwall, G. P., R. Safford, et al. (2000). "Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B." Nat Biotechnol **18**(5): 551-4.
- Senoura, T., A. Asao, et al. (2007). "Enzymatic characterization of starch synthase III from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.)." FEBS Journal **274**(17): 4550-4560.
- Sissons M.J. and A.W. MacGregor (1994). "Hydrolysis of barley starch granules by α -glucosidases from malt." J. Cereal Sci. **19**: 161-169.
- Sonnenwald, U., A. Basner, et al. (1995). "A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis." Plant Mol Biol **27**(3): 567-76.

- Steup, M. (1981). "Purification of chloroplast alpha-1,4-glucan phosphorylase from spinach leaves by chromatography on Sepharose-bound starch." Biochim Biophys Acta **659**(1): 123-31.
- Streb, S., T. Delatte, et al. (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): 3448-3466.
- Takeda Y. and S. Hizukuri (1987). "Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules." Carbohydrate Research **165**: 139-145.
- Tauberger, E., A. R. Fernie, et al. (2000). "Antisense inhibition of plastidial phosphoglucomutase provides compelling evidence that potato tuber amyloplasts import carbon from the cytosol in the form of glucose-6-phosphate." The Plant Journal **23**(1): 43-53.
- Tetlow, I. J., K. G. Beisel, et al. (2008). "Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes." Plant Physiol **146**(4): 1878-91.
- Tetlow, I. J., R. Wait, et al. (2004). "Protein Phosphorylation in Amyloplasts Regulates Starch Branching Enzyme Activity and Protein-Protein Interactions." Plant Cell **16**(3): 694-708.
- Tiessen, A., J. H. Hendriks et al. (2002). "Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-Glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply." The Plant Cell **14**: 2191-2213.
- Tomlinson, K. L., J. R. Lloyd, et al. (1997). « Importance of isoforms of starch-branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves." The Plant Journal, **11**(1): 31-43.
- Tyynelä, J., Stitt, M., Lönneborg, A., Smeekens, S., and Schulman, A. H., (1995). "Metabolism of starch synthesis in developing grains of the *shx* shrunken mutant of barley (*Hordeum vulgare*)." Physiologia Plantarum, **93**: 77-84.
- Tsai, C. Y. and O. E. Nelson (1966). "Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity." Science **151**(708): 341-3.
- Ugalde, J. E., A. J. Parodi, et al. (2003). "De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(19): 10659-10663.
- Umemoto, T., M. Yano, et al. (2002). "Mapping of a gene responsible for the difference in amylopectin structure between japonica -type and indica -type rice varieties." TAG Theoretical and Applied Genetics **104**(1): 1-8.
- Utsumi, Y. and Y. Nakamura (2006). "Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm." Planta **225**(1): 75-87.

- Valdez, H. A., M. V. Busi, et al. (2008). "Role of the N-Terminal Starch-Binding Domains in the Kinetic Properties of Starch Synthase III from *Arabidopsis thaliana*." Biochemistry **47**(9): 3026-3032.
- Ventriglia, T., M. A. Ballicora, et al. (2007). "Regulatory Properties of Potato-Arabidopsis Hybrid ADP-Glucose Pyrophosphorylase." Plant Cell Physiol. **48**(6): 875-880.
- Waigh, T.A., I. Hopkinson, et al. (1997). "Analysis of the native structure of starch granules with X-ray microfocus diffraction." Macromolecules **30**: 3813-3820.
- Walker, G. J., and Whelan, W. J., (1957). "The mechanism of carbohydrase action. 4. The mechanism of D-enzyme action." Biochemical Journal, **67**: 548-551.
- Wattebled, F., A. Buléon, et al. (2002). "Granule-bound starch synthase I. A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules." European Journal of Biochemistry **269**(15): 3810-3820.
- Wattebled, F., Y. Dong, et al. (2005). "Mutants of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogen and an Abnormal Form of Amylopectin." Plant Physiol. **138**(1): 184-195.
- Wattebled, F., V. Planchot, et al. (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): 1309-1323.
- Wattebled, F., J.-P. Ral, et al. (2003). "STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* Locus Required for Normal Starch Granule Biogenesis, Encodes Disproportionating Enzyme. Further Evidence for a Function of α -1,4 Glucanotransferases during Starch Granule Biosynthesis in Green Algae." Plant Physiol. **132**(1): 137-145.
- Weiner H., M. Stitt et al. (1987). "Compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves." Biochim Biophys Acta **893**:13-21.
- Weise, S. E., K. S. Kim, et al. (2005). "beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation." Plant Physiol **137**(2): 756-61.
- Weise, S. E., S. M. Schrader, et al. (2006). "Carbon Balance and Circadian Regulation of Hydrolytic and Phosphorolytic Breakdown of Transitory Starch." Plant Physiol. **141**(3): 879-886.
- Yamaguchi, M., K. Kainuma, et al. (1979). "Electron microscopic observations of waxy maize starch." J Ultrastruct Res **69**(2): 249-61.
- Yang, Y. and M. Steup (1990). "Polysaccharide Fraction from Higher Plants which Strongly Interacts with the Cytosolic Phosphorylase Isozyme : I. Isolation and Characterization." Plant Physiol **94**(3): 960-969.
- Yep, A., M. A. Ballicora, et al. (2004). "The active site of the *Escherichia coli* glycogen synthase is similar to the active site of retaining GT-B glycosyltransferases." Biochem Biophys Res Commun **316**(3): 960-6.

- Yep, A., M. A. Ballicora, et al. (2006). "The ADP-glucose binding site of the Escherichia coli glycogen synthase." Arch Biochem Biophys **453**(2): 188-96.
- Yu, T.-S., H. Kofler, et al. (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): 1907-1918.
- Zabawinski, C., N. Van Den Koornhuyse, et al. (2001). "Starchless Mutants of Chlamydomonas reinhardtii Lack the Small Subunit of a Heterotetrameric ADP-Glucose Pyrophosphorylase." J. Bacteriol. **183**(3): 1069-1077.
- Zeeman, S. C., F. Northrop, et al. (1998). "A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme." The Plant Journal **15**(3): 357-365.
- Zeeman, S. C., S. M. Smith, et al. (2002). "The Priming of Amylose Synthesis in Arabidopsis Leaves." Plant Physiol. **128**(3): 1069-1076.
- Zeeman, S. C., D. Thorneycroft, et al. (2004). "Plastidial α -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in Arabidopsis Leaves But Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress." Plant Physiol. **135**(2): 849-858.
- Zhang, X., C. Colleoni, et al. (2004). "Molecular characterization demonstrates that the Zea mays gene *sugary2* codes for the starch synthase isoform SSIIa." Plant Molecular Biology **54**(6): 865-879.
- Zhang, X., A. M. Myers, et al. (2005). "Mutations Affecting Starch Synthase III in Arabidopsis Alter Leaf Starch Structure and Increase the Rate of Starch Synthesis." Plant Physiol. **138**(2): 663-674.
- Ziegler, G. R., J. A. Creek, et al. (2005). "Spherulitic Crystallization in Starch as a Model for Starch Granule Initiation." Biomacromolecules **6**(3): 1547-1554.

ANNEXES

Informations sur les lignées mutantes utilisées dans ce travail :

Classe	Allèles mutants	n° de FST	Provenance	Ecotype	Amorces		Références
					Couple sensage	Couple ADN-T	
GBSSI	<i>Atgbss1-1</i>	914G01	Gabi	Col-0	gbss1For1 / gbss1Rev1	gbss1For1 / Gabi1	
SS1	<i>Atss1-1</i>	203C08	URGV	WS	ss1For1 / ss1Rev1	ss1Rev1 / Tag5	Devaillé et al., 2005
SS2	<i>Atss2-1</i>	SALK_065639	SALK	Col-0	ss265639For / ss265639Rev	ss265639For / Lba1	Zhang et al., 2008
	<i>Atss2-3</i>	549A11	URGV	WS	ss2For2 / ss2Rev2	ss2Rev2 / Tag5	
SS3	<i>Atss3-1</i>	SALK_065735	SALK	Col-0	SA325 / SA350	SA325 / Lba1	Zhang et al., 2005
	<i>Atss3-3</i>	117H05	URGV	WS	ss3For1 / ss3Rev1	ss3Rev1 / Tag5	Devaillé D (thèse de doctorat, 2005)
SS4	<i>Atss4-1</i>	290D11	Gabi	Col-0	SA397 / SA298	SA397 / Gabi1	Roldan et al., 2007
	<i>Atss4-2</i>	559H08	URGV	WS	ss4For5 / ss4Rev5	ss4For5 / Tag5	

Amorces utilisées :

gbss1For1 : ATTCCCTTCTCAACTTGCCCATCA

gbss1Rev1 : AACCTTCTGCTCCTCCAATCTCC

ss1For1 : TTTCCGTCCGATCGCCAGTCTC

ss1Rev1 : TACGCCAAAGTCAGCCATTACAA

ss265639For : CACACCTGACTTGGATGATGC

ss265639Rev : CTTGCCAGGTTCTGTTAGTTTC

ss2For2 : GGGGACCGGTAGATGATTTC

ss2Rev2 : CGGTCGCCCTGTGCCTAAC

SA325 : CATCACATCCTCTCCTTTCTG

SA350 : TCTTGCTCCATCACCGTCTT

ss3For1 : GTTCCTTTATTTGCTGTGCGTATT

ss3Rev1 : CTTGAGCTTGTGCCCTTTCTTTAT

SA397 : GTTGTTCAATACCTTCAAATTCCC

SA398 : CATTGTAACAACCGTGTCCCC

ss4For5 : TGTCGATTCTGTGTTGGGGTTTG

ss4Rev5 : AATCTGCTCGCCTTCACTTTTG

Tag5 : CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC

Gabi1 : CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC

Lba1 : TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG