

Université de Lille 1 - Sciences et Technologies  
Ecole doctorale Biologie Santé

# THESE de DOCTORAT

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Maud FACON**

Contribution à la compréhension des mécanismes  
d'initiation et de synthèse de l'amidon

Présentée le 08 Décembre 2014 devant la commission d'examen composée de :

S. Ball, Professeur, Université Lille 1	<b>Président</b>
C. Raynaud, CR CNRS Université Paris Sud	<b>Rapporteur</b>
P. Lerouge, Professeur, Université de Rouen	<b>Rapporteur</b>
D. Falconet, CR CNRS, Université de Grenoble	<b>Examineur</b>
F. Wattebled, CR CNRS, Université Lille1	<b>Examineur</b>
C. D'Hulst, Professeur, Université Lille1	<b>Directeur de thèse</b>

## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Cécile Raynaud et le Pr Patrice Lerouge de m'avoir suivi tout au long de ma thèse, lors des CST et d'avoir accepté d'être membres de mon jury en qualité de rapporteur et pour tout le travail que cela implique.

Je remercie également le Dr Denis Falconet pour sa présence au sein de cette commission en tant qu'examineur.

Un grand merci au Pr Steven Ball qui a accepté de présider mon jury de thèse et qui m'a conseillé durant ces quatre dernières années.

Je remercie de tout cœur mon directeur de thèse le Pr Christophe D'Hulst, de m'avoir accueilli dans son équipe dès le master puis durant ces trois années de thèse. Merci pour tes conseils, ton encadrement, ton soutien et tes blagues que je ne comprends pas toujours.

Un énorme MERCI au Dr Fabrice Wattebled qui a veillé sur moi du master à la fin de thèse, merci pour ton formidable encadrement, pour tes conseils, pour le temps que tu m'as accordé et pour m'avoir expliqué les blagues de Christophe.

Je remercie également le Dr Xavier Roussel pour ses conseils de biochimiste et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir. Merci au Dr David Dauvillé, pour ses conseils et son humour.

Je tiens également à remercier l'équipe de « Ginettes » du labo : Adeline qui a toujours le bon conseil au bon moment, Laura pour ton soutien et surtout Hadloub qui débute sa thèse et à qui je souhaite beaucoup de réussites. Je remercie également Monika dernière arrivée dans l'équipe.

Je tiens également à remercier l'équipe du 002/005 qui a toujours été présente pour m'apporter son aide, merci au Dr Christophe Colleoni, au Dr Maria-Cecilia Arias, au Dr Ugo Cenci, au Dr Hande Tunçay mais aussi à Justin, Mathieu et Dérifa mes compagnons de paillasse.

Un énorme merci à tout le personnel de l'UGSF qui a toujours tout fait pour que je ne manque de rien, qui a répondu présent à chaque fois. Et je remercie en particulier la formidable équipe administrative. Un « *grazie* » aux voisins italiens toujours présents pour dépanner et apporter joie et bonne humeur dans les couloirs du sous sol.

Je remercie également nos collaborateurs : Le Dr Jean-Luc Putaux et Christine Lancelon Pin pour les photos de microscopie et pour les nombreux conseils, le Pr Alan Myers et le Dr Tracie Hennen-Bierwagen avec qui j'ai pris plaisir à collaborer. Merci au Dr Nicolas Szydlowski de m'avoir accueilli, encadré et conseillé durant ma dernière année de thèse.

Je tiens également à remercier mes amis de longue date Aurélie et Sandra pour votre soutien au cours de mes longues études. Merci à mon frangin d'adoption Aurélien d'apporter un grain de folie dans ma vie. Merci également à Cath, Ananas et Sophie, aux Biotec' girls, aux métalleux, aux copains lillois, aux thésards de mon entourage et à mon binôme! Je n'oublie pas non plus tous les enseignants que j'ai eu au cours de ma scolarité, qui m'ont donné le goût de la recherche et m'ont permis d'avancer, P. Michaux, D. Devred, N. Favet, Pr. Steven Ball, Pr. S Hawkins et bien d'autres.

Enfin je remercie ma famille pour leur soutien moral et financier, merci à mes parents, à ma petite sœur Lucie et à mes grands parents qui ont toujours cru en moi et sans qui rien ne serait possible. Enfin, un énorme merci à mon chéri, Rémi, ma plus belle rencontre durant la thèse. Merci pour ton soutien, ton amour et ta présence.

## Liste des Abréviations

At : *Arabidopsis thaliana*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADN-T : ADN de Transfert

ADP-Glc : Adénosine Diphospho-Glucose

AGPase : ADP-Glc Pyrophosphorylase

AMY :  $\alpha$ -Amylase

ARC : Accumulation and Replication of Chloroplast

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine TriPhosphate

BAM :  $\beta$ -Amylase

BE : Branching Enzyme

CaMV : Cauliflower Mozaïc Virus

CAZy : Carbohydrate Active enZyme

CFP : Cyan Fluorescent Protein

Col : Columbia

CTAB : CetylTrimethylAmmonium Bromide

Cter : partie Carboxy-terminale

Da : Dalton

DIC : Differential Interference Contrast

DMSO : DiMethyl SulfOxide

dNTP : désoxyriboNucléotide TriPhosphate

DO : Densité Optique

DP : Degré de Polymérisation

DPE : DisProportionating Enzyme

DTT : DiThioTréitol

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétate

FtsH : Filamentous temperature sensitive H

FtsZ : Filamentous temperature sensitive Z

GBSS : Granule Bound Starch Synthase

GFP : Green Fluorescent Protein

Glc1P : Glucose 1 Phosphate

GWD : Glucan Water Dikinase

HCl : acide chlorhydrique

HPAEC-PAD : High pH Anion Exchange Chromatography – Pulsed Amperometric Detection

ISA : Isoamylase

IPTG : IsoPropyl Thio  $\beta$  D Galactoside

LB : Luria-Bertani (ou Lysogeny Broth)

M : Molaire

MEX : Maltose EXporter

Min : Minicells

NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

Nter : partie Amino-terminale

PCR : Polymerization Chain Reaction

PHS : Phosphorylase

P : Phosphate

PAGE : PolyAcrylamid Gel Electrophoresis

PU : Pullulanase

p/v : poid à volume

PWD : Phosphoglucan Water Dikinase

SBD : Starch Binding Domain

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SS : Starch Synthase

TEMED : N,N,N',N'-4-tétraméthylènediamine

Tris : 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

UDP-Glc : Uridine Diphospho Glucose

UV : Ultra Violet

v/v : volume à volume

WS : Wassilewskia

WT : Wild Type

WSP : Water Soluble Polysaccharide

Zm : *Zea mays*

35S : Promoteur 35S

## Résumé

La synthèse du glycogène comme celle de l'amidon fait intervenir de multiples enzymes dont les synthases, qui allongent les chaînes de glucanes par formation de liaisons O-glucosidiques de type  $\alpha$ -(1→4), et les enzymes de branchement qui permettent de lier ces chaînes les unes aux autres par création de liaisons  $\alpha$ -(1→6) encore appelées points de branchement. La synthèse de l'amidon requiert une étape supplémentaire faisant intervenir des enzymes de débranchement qui clivent certaines liaisons  $\alpha$ -(1→6), confinant ainsi leur localisation à certaines zones de la molécule ce qui donne au polysaccharide en formation une structure en forme de grappe dense et insoluble. Chez *Arabidopsis*, cette activité est strictement dépendante de la présence des protéines ISA1 et ISA2 qui s'assemblent au sein d'un complexe hétéromultimérique. Cependant, chez le maïs, ISA1 peut également fonctionner sous forme d'homomultimères et la synthèse d'amidon est maintenue dans l'albumen même en absence d'ISA2. La première partie de mon travail de thèse a consisté à entreprendre une analyse comparative des isoamylases de maïs et d'*Arabidopsis thaliana*. Une étude des caractéristiques de fonctionnement de ces protéines a ainsi été réalisée en reconstituant *in vitro* des complexes homo et hétéromultimériques. Par ailleurs, nous avons montré qu'il était possible de restaurer la synthèse d'amidon dans des lignées d'*Arabidopsis* dépourvues d'ISA1 et ISA2 en y exprimant uniquement ISA1 de maïs. Enfin, en collaboration avec l'équipe du Pr A. Myers (Iowa State University, Etats-Unis), nous avons effectué une étude comparative des activités isoamylasiques des feuilles et de l'albumen de maïs. Ces différents travaux ont fait l'objet de deux publications scientifiques et nous ont permis de conclure que la capacité d'ISA1 de maïs à fonctionner en absence d'ISA2 constitue une caractéristique évolutive probablement acquise lors de la divergence entre monocotylédones et dicotylédones.

Dans un second temps je me suis intéressée à l'étude d'une étape cruciale du métabolisme de l'amidon : l'initiation de la synthèse de nouveaux grains. Des travaux antérieurs avaient mis en évidence le rôle essentiel de l'amidon synthase 4 (SS4) dans ce processus. En effet, les mutants *ss4-* d'*A. thaliana* accumulent un seul gros grain d'amidon par plaste contre 5 à 7 pour une plante sauvage. Cependant le mécanisme d'action de cette enzyme restait à déterminer. L'analyse *in silico* de la séquence de la protéine révèle qu'elle est composée d'un domaine C-terminal similaire aux autres amidon-synthases et d'une longue extension N-terminale qui lui est spécifique. Cette extension possède un motif faisceaux d'hélices, connu pour être impliqués dans les interactions protéines/protéines et similaire à un motif de la protéine procaryote EzrA, un régulateur négatif de la division bactérienne. Or, les protéines de la division des plastides des végétaux sont très similaires à celles de la division bactérienne. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse de l'existence d'un dialogue moléculaire entre division du plaste et métabolisme de l'amidon. L'étude phénotypique de plantes altérées pour la division des plastides et dépourvues de SS4 révèle que le nombre d'évènements d'initiation de la synthèse d'amidon dépend de la présence de SS4 mais également du volume des chloroplastes. Pour aller plus loin dans la compréhension du rôle de SS4, nous avons initié différents travaux (*in vitro* et *in vivo*) visant à identifier les fonctions des parties Cter et Nter de la protéine dans le processus d'initiation. Enfin, la recherche de partenaires potentiels de l'enzyme et l'étude de certains candidats nous ont permis d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche quant à une régulation possible de l'activité de SS4.

## Abstract

Glycogen and starch synthesis require multiple enzymes such as synthases that elongate glucans by creation of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) O-glycosidic linkages, and branching enzymes that create  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) bonds (also called branch points) to link linear glucans together. Starch metabolism also needs a debranching enzyme that will cleave some of the  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) bonds to restrict their location to specific areas of the molecule. This distribution of branch points allows the formation of a dense and insoluble cluster-like structure. In Arabidopsis, this activity is strictly dependent on the presence of both ISA1 and ISA2 proteins that assemble into active hetero-oligomers. However, in maize, ISA1 is able to form active homo-oligomers and starch synthesis is maintained in the endosperm even when ISA2 is missing. In a first part of my thesis, I undertook a comparative analysis of maize and Arabidopsis isoamylases. First, the maize, the Arabidopsis or the chimeric complexes were characterized by *in vitro* reconstitution of homo and hetero-oligomers after expression and purification in *E. coli*. Then we showed that the phenotype of Arabidopsis lines lacking both ISA1 and ISA2 proteins can be rescued after expression of maize ISA1 only. Finally, in collaboration with Pr. A. Myers (Iowa State University, USA) we achieved a comparative analysis of maize leaf and endosperm isoamylase activities. This work led to the publication of two scientific papers and allowed us to conclude that the ability of maize ISA1 to function without ISA2 represents a characteristic acquired during evolution probably at the time of divergence between monocots and dicots.

In a second part of my thesis work, I focused my research on a crucial step of starch metabolism: the initiation of new starch granules. Previous work already demonstrated the essential role of starch synthase 4 (SS4) in this process. Indeed, Arabidopsis *ss4*- mutants accumulate only one big starch granule per chloroplast instead of the 5 to 7 granules found in wild type plants. However the mode of action of this enzyme was still unknown. *In silico* protein sequence analysis revealed that SS4 is composed of a C-terminal moiety similar to all other starch synthases but also contains a specific long N-terminal extension. This N-terminal moiety contains a coiled-coil domain, known to be involved in protein/protein interactions, that is similar to a motif present in the bacterial protein EzrA, a negative regulator of bacterial division. Since plastids arise from a bacterial endosymbiosis event, proteins involved in plastid division are very similar to those found in bacteria. These observations led us to hypothesize the existence of a molecular dialogue, involving SS4, linking plastid division to starch metabolism. Phenotypic studies of plants impaired in plastid division and also devoid of SS4 indicate that the number of starch granules depends on the presence of SS4 but also on chloroplast volume. To go deeper in our understanding of SS4 activity and regulation, we initiated *in vitro* and *in vivo* analysis with the objective to identify the role of SS4 C-terminal or N-terminal moiety. Finally, the search for potential interacting partners of the enzyme and study of some candidates allowed us to identify a potential new regulation process of SS4.

## Généralités

I. Les plastes	1
1- Origine des plastes	3
2- Division des plastes	6
a- Les protéines FtsZ	6
b- Une famille de protéines impliquées dans la division des plastes : les « ARC »	7
c- Autres protéines impliquées dans la division plastidiale	9
d- Les protéines externes aux plastes	10
e- Dynamique de division des plastes	11
II. L'amidon	12
1- Présentation de quelques chiffres clés sur la production d'amidon en France	12
2- Structure de l'amidon	14
a- Structure de l'amylose	15
b- Structure moléculaire de l'amylopectine	15
c- Etude de la structure de l'amylopectine	18
3- Synthèse de l'amidon	23
4- Initiation de la synthèse du polysaccharide de réserve	25
5- Enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon	27
a- Les amidon-synthases	27
1) Les différentes amidon-synthases	28
2) Redondances fonctionnelles des amidon-synthases	31
b- Les enzymes de branchement	32
c- Maturation de la structure de l'amylopectine	34
1) La pullulanase	35
2) Les isoamylases	36
6- Dégradation de l'amidon	40
a- La phosphorylation de l'amidon	40
b- Les enzymes de la dégradation	41
c- Les voies secondaires de dégradation de l'amidon	42
d- Devenir des produits de la dégradation d'amidon	44

---

III. <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
1- Historique	45
2- Caractéristiques qui font de cette plante un modèle d'étude	46
<b>Objectifs de la thèse</b>	<b>47</b>
I. Etude comparative des isoamylases d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et de <i>Zea mays</i>	47
II. Etude de SS4 : une enzyme impliquée dans l'initiation de la synthèse d'amidon	48
<b>Matériel et Méthodes</b>	<b>50</b>
I. Le Matériel	50
1- Matériel végétal utilisé	50
. Lignées d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
. Autres plantes	50
2- Souches bactériennes	51
. Souches d' <i>Escherichia coli</i>	51
. Souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
3- Les vecteurs	51
. Les vecteurs de clonage	51
. Les vecteurs d'expression chez <i>E. coli</i>	52
. Les vecteurs de transformation du matériel végétal	52
4- Les outils informatiques	52
II. Les Méthodes	53
1- Conditions de culture	53
2- Les croisements chez <i>A. thaliana</i>	53
3- Génotypage des plantes	54
. Extraction d'ADN à partir de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	54
. PCR de génotypage	54
4- PCR de clonage	55
5- Clonage des séquences d'intérêts	55

6- Particularité de certains clonages	56
7- Production de protéines recombinantes dans <i>E. coli</i>	57
8- Gels de polyacrylamides utilisés pour ce travail	58
. SDS PAGE	58
. Zymogramme	58
. Western Blot	59
9- Observations de l'amidon	60
. Coloration des feuilles au lugol	60
. Observations par microscopie optique	60
. Observations par microscopie électronique	60
10- Extraction, purification et étude de l'amidon	63
. Extraction de l'amidon	63
. Dosage de l'amidon	63
. Etude de la structure de l'amidon par <b>HPAEC-PAD</b>	64
11- Transformation des plantes	65
12- Expression de protéines de fusion	66
. Agroinfiltration de feuilles de tabac	66
. Transfection de protoplastes d' <i>A. thaliana</i>	67
<b>Résultats</b>	
<b>Résultat I : Contribution à l'étude du fonctionnement des isoamylases lors de la synthèse de l'amidon</b>	<b>68</b>
I. de l'activité isoamylase lors de la synthèse de l'amylopectine chez <i>Arabidopsis thaliana</i> et le maïs ( <i>Zea mays</i> )	69
Publication « Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves »	
II. Etude du fonctionnement des isoamylases dans la feuille de maïs	105
Publication « Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the <i>Zea mays</i> leaf »	

<b>Résultat II : Etude du dialogue moléculaire entre le métabolisme de l'amidon et la physiologie des plastes chez <i>A. thaliana</i></b>	<b>133</b>
I. Etude de l'implication des différents domaines de SS4 dans l'initiation de la synthèse d'amidon	134
1- Production de SS4 recombinante chez <i>Escherichia coli</i>	135
2- Transformation de mutants d' <i>Arabidopsis</i> dépourvus de SS4	141
II. Identification de partenaires d'interaction potentiels de SS4	143
1- Tests d'interactions avec des protéines de la division plastidiale <i>in vivo</i>	143
2- Localisation de SS4	145
3- Criblage double hybride	152
III. Etude du couplage des mutations <i>ss4-</i> et <i>ftsZ-</i> chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	155

## **Discussion et Perspectives**

I. Contribution à l'étude du fonctionnement des isoamylases lors de la synthèse d'amidon	165
II. Etude de l'implication de SS4 dans l'initiation de la division des plastes	167

<b>Bibliographie</b>	<b>173</b>
----------------------	------------

## **Annexes**

# *Généralités*

## **A- Les plastes**

C'est au XIX<sup>ème</sup> siècle que sont observés et dessinés pour la première fois des chloroplastes, appelés « vésicules », par deux microscopistes français J.B.A Gris et A.L Trécul (Gris, 1857 ; Trécul, 1858). Le mot « plaste » est utilisé pour la première fois dans une publication scientifique en 1883 par A.F.W Schimper (Schimper, 1883). Ce botaniste allemand accompagné par d'autres scientifiques a également émis l'hypothèse de « continuité des plastes » c'est-à-dire le fait que ceux-ci soient issus de la division de plastes préexistants et non pas synthétisés *de novo* au sein de la cellule (Schimper, 1883 ; Meyer, 1883 *and* Schimper, 1885).

Les plastes sont des structures intracellulaires ou « organites » présents dans presque toutes les cellules des organismes photosynthétiques.

Il existe différentes catégories de plastes selon la plante et le tissu considéré (Figure 1) :

- . Les **proplastés** sont des plastes non différenciés que l'on trouve majoritairement dans les cellules méristématiques (non différenciées et en division active).

- . Les **chloroplastes** sont des organites présents principalement dans les feuilles des végétaux. Ils sont capables de réaliser la photosynthèse et peuvent stocker carbone et énergie sous forme d'amidon transitoire en présence de lumière.

- . Les **étioplastes** sont des chloroplastes étiolés (décolorés) présents dans les cellules d'une plante qui se serait développée en absence de lumière. Cet état est réversible.

- . Les **chromoplastes** sont quant à eux en partie responsables de la couleur des pétales de fleurs ou des fruits. Ils accumulent des pigments tels que les carotènes ou les lycopènes. Ils jouent un rôle particulièrement important dans la co-évolution plantes / insectes en raison de leur capacité à attirer les pollinisateurs.

- . Les **leucoplastes** sont des plastes capables de stocker des molécules de réserve. Ils sont localisés dans les cellules non photosynthétiques, telles que les cellules racinaires ou les tubercules. On en distingue trois types :

- . Les oléoplastes accumulant des lipides. Les monoterpènes par exemple sont des composés volatils qui peuvent donner une odeur particulière à la plante.

- . Les protéinoplastes accumulant des protéines

- . Les amyloplastes accumulent quant à eux de l'amidon de réserve.

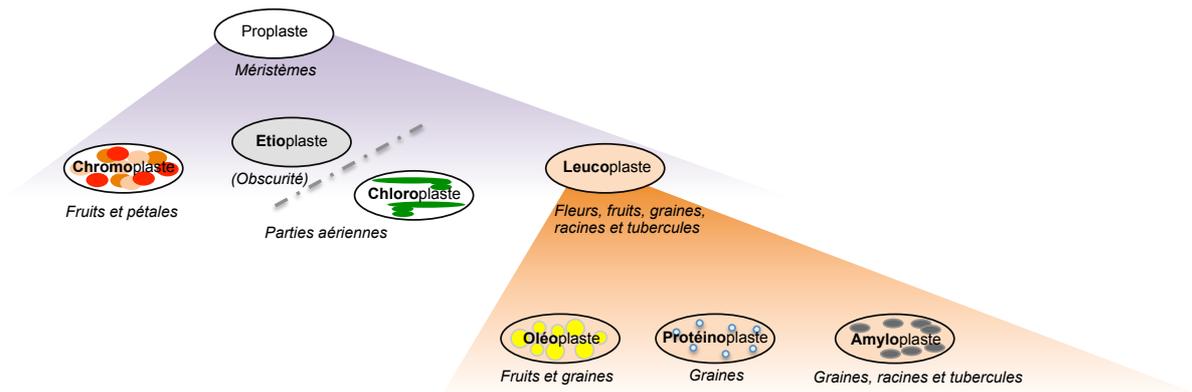


Figure 1 : Représentation schématique des différents types de plastides ainsi que de leurs localisations *in planta*.

Les chloroplastes sont les plastides les plus étudiés. D'une taille de 4 à 10  $\mu\text{m}$ , ils sont d'une importance cruciale pour le métabolisme cellulaire végétal, car ils sont le siège de la photosynthèse, de l'assimilation des carbohydrates, des acides aminés ou encore des acides gras. Les chloroplastes sont constitués d'une enveloppe formée de deux membranes séparées par un espace intermembranaire. Ils contiennent le stroma (liquide intrachloroplastique) dans lequel baignent les thylacoïdes et les *grana* (sacs de thylacoïdes empilés). C'est au niveau de la membrane de ces derniers que se déroule la photosynthèse. Le stroma contient également le génome chloroplastique, des protéines, des gouttelettes lipidiques ainsi que des grains d'amidon qualifiés de transitoires (ils s'accumulent la journée et sont dégradés la nuit).

En tant qu'organe semi-autonome, le plastide est capable de transcrire et de traduire de l'information de son propre ADN. Mais, du fait de son intégration dans la cellule eucaryote, il est aussi extrêmement dépendant du noyau de la cellule végétale considéré.

## 1- Origine des plastes

Il est maintenant acquis que l'apparition des cellules eucaryotes photosynthétiques résulte de l'endosymbiose d'une cyanobactérie ancestrale (organisme photosynthétique) par une cellule eucaryote il y a plus de 1,6 milliard d'années (Bogorad *et al.*, 2008).

C'est Mereschkowsky, un botaniste russe, qui propose l'explication la plus complète de l'origine endosymbiotique des plastes (Mereschkowsky, 1905 ; Martin *and* Kowallik, 1999). Il appuie sa démonstration sur trois grands points :

- L'endosymbiose est un principe reconnu, et la notion de « cohabitation stable » entre deux organismes différents est un concept précédemment décrit par le botaniste suisse Schwendener (Schwendener, 1867). Le terme « endosymbiose » est utilisé pour la première fois par le botaniste allemand H.A De Bary en 1878 (De Bary, 1878).

- Les observations microscopiques ont permis de montrer que les chloroplastes ne sont pas produits *de novo* par la cellule, mais prolifèrent au travers de divisions successives (C.W von Nägeli, 1846 ; F.Schmitz, 1883 ; A.F.W Schimper, 1883, 1885).

- Son troisième argument repose sur la comparaison entre les chloroplastes et les cyanobactéries. Il évoque par exemple la proximité morphologique, la répartition du « pigment vert », l'absence de noyau, et les proximités fonctionnelles (photosynthèse).

Malgré les arguments apportés en faveur de l'origine endosymbiotique des plastes, cette idée a, dans un premier temps, du mal à s'imposer comme en témoigne l'accueil réservé au livre intitulé « Les symbiotes » publié en 1918 par le biologiste français P. Portier. En effet, ce livre fut vivement critiqué et ne resta pas publié longtemps, les éditeurs préférant le remplacer par « Le Mythe des symbiotes » de A. Lumière dès 1919.

Ce n'est finalement qu'en 1967, grâce au développement des techniques de microscopies, que la théorie endosymbiotique fut remise au goût du jour (Sagan, 1967) et il est maintenant admis que les plastes ont une origine endosymbiotique (Dyall, 2004). Quelques années plus tard, des analyses phylogénétiques ont permis d'estimer ce phénomène d'endosymbiose à approximativement 1,6 milliard d'années (Yoon *et al.*, 2004).

Les études phylogénétiques permettent également de conforter l'origine endosymbiotique du plaste. En effet, on retrouve chez les organismes photosynthétiques des gènes d'origine cyanobactérienne mais aussi des gènes issus de l'ancêtre eucaryote (Deschamps *et al.*, 2008). D'autres études ont permis par la suite de mettre en évidence un troisième signal de type procaryote (Tyra *et al.*, 2007 ; Gogarten 2007 ; Moustafa *et al.*,

2008). Ces gènes sont issus d'un ancêtre des Chlamydiales. Ces bactéries, parasites intracellulaires, semblent avoir été présentes au moment de l'internalisation de la cyanobactérie ancestrale dans l'hôte eucaryote et auraient participé à la mise en place de l'endosymbiose (Huang *and* Gogarten 2007 ; Moustafa *et al.*, 2008 ; Ball *et al.*, 2011). L'importance de la présence des *chlamydiae* dans la mise en place de l'endosymbiose primaire se base sur l'étude du métabolisme des polysaccharides de réserve (amidon ou glycogène) qui implique la nécessité de maintenir une source d'énergie importante (fournie par la cyanobactérie photosynthétique) pour sustenter la cellule hôte et son parasite.

L'endosymbiose a conduit à la naissance d'un organisme qui a évolué pour donner les *Archaeplastidae* constitués de trois lignées que l'on distingue par la couleur de leurs pigments :

- Les Glaucophytes
- Les Rhodophytes
- La lignée verte qui inclut les algues vertes et toutes les plantes terrestres. (Delwiche, 1999 ; Moreira *et al.*, 2000 ; Palmer, 2003 ; Bhattacharya *et al.*, 2004 ; Dyall *et al.*, 2004 ; Martin *et al.*, 2002 ; McFadden *and* van Dooren, 2004)

Durant le phénomène évolutif suivant cet événement la plupart des gènes codés par l'ancêtre bactérien ont été transférés vers le génome nucléaire de la cellule hôte. Il a été montré, chez *Arabidopsis thaliana*, que sur ses 25 000 gènes nucléaires, 1 550 à 4 500 sont d'origine cyanobactérienne (Abdallah *et al.*, 2000 ; Martin *et al.*, 2002) soit environ 12%. Dans les plastes, seulement une centaine de protéines est codée par le génome de l'organite alors que plus de 2 000 sont codées par le génome nucléaire puis adressées aux plastes (Abdallah *et al.*, 2000; Richly *and* Leister, 2004 ; Jarvis, 2008).

Ce transfert de gène implique la mise en place d'une série de signaux de communication entre le plaste en développement et le noyau. Il devient alors impératif d'importer les protéines codées par le génome nucléaire vers le stroma plastidial. La mise en place de l'endosymbiose a donc nécessité la création d'un système d'adressage et d'import des protéines codées par le noyau de la cellule vers l'organite.

L'import des protéines aux plastes se fait par l'intermédiaire d'un système multiprotéique dénommé TOC-TIC (*Translocon at the Outer envelope membrane of Chloroplast*, *Translocon at the Inner envelope membrane of Chloroplast*) qui est ancré dans les deux membranes plastidiales (Figure 2).

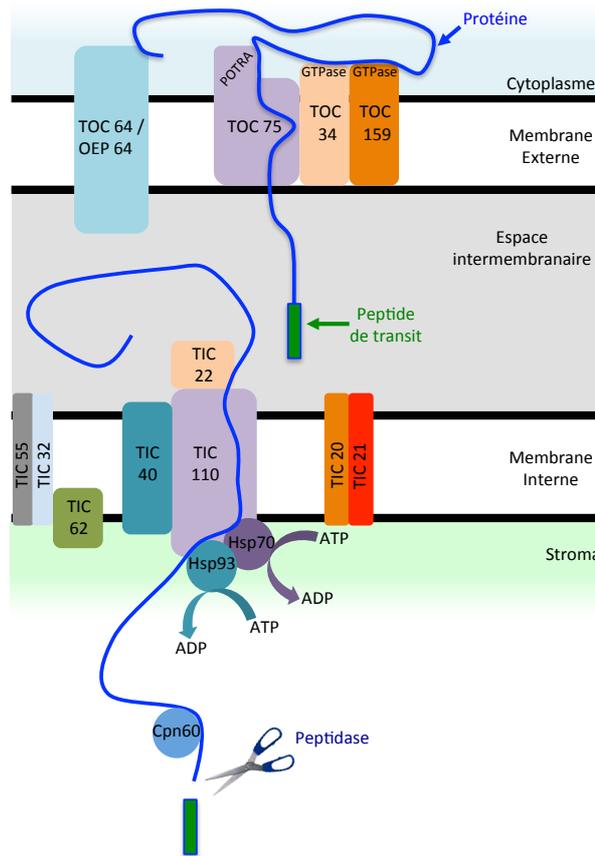


Figure 2 : Représentation schématique du système TOC-TIC d'import des protéines au plaste. Adapté de la revue *Shi and Theg, 2013*. Les protéines cytoplasmiques impliquées dans l'import ne sont pas représentées. TOC 75, TOC 159 et TOC 34 sont toutes trois ancrées dans la membrane externe du plaste. TOC 75 possède un domaine « POTRA » d'origine bactérienne important pour la translocation de la protéine. Cette protéine, particulièrement bien conservée au cours de l'évolution, possède un domaine transmembranaire formé de tonneaux  $\beta$  permettant le passage de la protéine. TOC 159 et TOC 34 possèdent une activité GTPase d'origine eucaryote et sont également ancrées dans la membrane externe. TOC 64 / OEP 64 n'est pas essentielle au transport des protéines à travers cette membrane externe. Au moment du transfert, la protéine déstructurée dans l'espace intermembranaire, est recrutée par TIC 22 puis TIC 110. TIC 20 et TIC 21 se chargent de la faire passer vers le stroma du plaste. Les chaperonnes du stroma Hsp 70 et Hsp 93 attirent la protéine en consommant de l'ATP. TIC 55, TIC 62 et TIC 32 sont probablement des régulateurs de ce transfert. Le peptide de transit est ensuite clivé par une peptidase du stroma et la protéine est restructurée pour devenir fonctionnelle dans le plaste.

Outre l'import dans les plastides de protéines codées par des gènes nucléaires, un autre exemple confortant l'origine endosymbiotique des plastides est l'observation de la division de ceux-ci. En effet, ils se divisent par scissiparité, comme les bactéries.

## 2- Division des Plastes

Les plastes sont absolument nécessaires pour la viabilité cellulaire des végétaux (Mullet, 1988). Afin de maintenir un nombre important de plastes lors des divisions cellulaires, et garantir un niveau d'activité photosynthétique satisfaisant, ils doivent se multiplier.

Une étude mettant en évidence une division normale des plastes dans un mutant de l'orge déficient en ribosomes plastidiaux permet d'affirmer que les protéines impliquées dans la division de ces organites ne sont pas codées par l'ADN plastidial mais bien par l'ADN nucléaire (Hashimoto *and* Possingham, 1989).

### a- Les protéines FtsZ (*Filamentous temperature sensitive Z*)

Il est déjà établi, depuis les années 80, que le plaste se divise par fission binaire via un mécanisme de constriction des membranes de l'enveloppe (Leech, 1981 ; Possingham *et al.*, 1988 ; Whatley, 1988). Ce mode de multiplication rappelle fortement ce qui est observé chez les bactéries, et c'est par analogie avec ce qui était connu du processus de division bactérien que les premiers gènes impliqués dans la division du chloroplaste ont pu être identifiés.

C'est l'équipe de K. Osteryoung qui identifia, chez *Arabidopsis thaliana*, le premier gène impliqué dans la division des plastes en 1995 (Osteryoung *and* Vierling, 1995). Il s'agit du gène nucléaire codant la protéine FtsZ1 adressée au chloroplaste et particulièrement importante pour la mise en place de l'anneau de division accompagnant la fission d'un plaste père en deux plastes fils. A cette époque, on ne parle encore que d'un « anneau dense aux électrons » qui ressemble à l'anneau FtsZ ou « Z-Ring » des bactéries en division (Osteryoung *and* Vierling, 1995). Très vite, l'équipe du Professeur Osteryoung approfondit ses recherches sur les protéines impliquées et les mécanismes intervenant dans la division plastidiale. Ils identifient en 1998 deux autres protéines FtsZ2.1 et FtsZ2.2 qui interviennent également lors de la division des plastes. D'abord supposées cytoplasmiques, les protéines FtsZ2 finissent par être identifiées comme adressées au stroma et interagissant avec FtsZ1 (Vitha *et al.*, 2001 ; MacAndrew *et al.*, 2001). Les familles FtsZ1 et FtsZ2 ont un seul gène ancestral commun d'origine procaryote que l'on retrouve impliqué dans la division des bactéries. Ces deux familles de gènes sont présentes chez toutes les espèces de la lignée verte (Osteryoung *et al.*, 2003), leur divergence datant d'avant l'apparition des plantes terrestres (Stokes *and* Osteryoung, 2003). Les raisons d'une telle duplication dans la lignée verte restent inconnues, cependant il semblerait que FtsZ1 et FtsZ2 ne puissent se substituer l'une à l'autre *in vivo* (Schmitz *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter qu'il est

possible de compléter le phénotype filamenteux d'un mutant d'*Escherichia coli ftsZ*- par expression de FtsZ1 de pois (Gaikwad *et al.*, 2000).

L'équipe du Pr Osteryoung a mis en évidence l'importance de ces protéines dans la division des plastes en étudiant des lignées d'*Arabidopsis thaliana* qui en sont dépourvues (générées par ARN interférence). L'absence des protéines FtsZ1 ou FtsZ2.1 bloque totalement la division des plastes on observe alors la présence d'un unique chloroplaste géant par cellule (Figure 3)

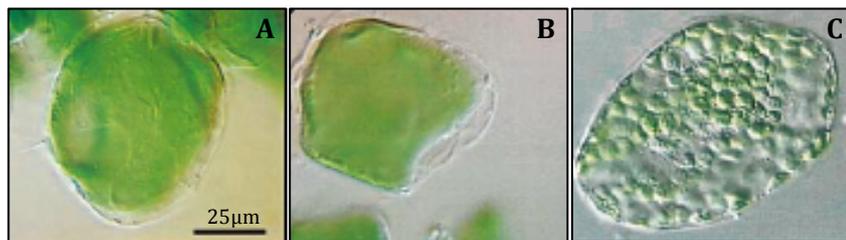


Figure 3 : Photo (microscopie optique) de cellules de mésophyle des lignées dépourvues de FtsZ1 (A), de FtsZ2 (B) comparés à une cellule de lignée sauvage (C).

La protéine bactérienne FtsZ est capable de polymériser en filaments en consommant du GTP. Ce mécanisme présente de nombreux points communs avec l'assemblage des fibres de tubulines (de Boer *et al.*, 1992 ; Lowe and Amos, 1998 ; Nogales *et al.*, 1998). Les FtsZ1 et 2 végétales possèdent les résidus requis pour la liaison et l'hydrolyse du GTP (Osteryoung and McAndrew, 2001) et sont également capables de polymériser (Lohse *et al.*, 2006 ; El-Kafafi *et al.*, 2005). Même si ces protéines semblent capables de former des filaments indépendamment les unes des autres, mélanger les deux stimulerait fortement l'autoassemblage de protofilaments (Yang *et al.*, 2008).

L'assemblage se fait sous la forme d'un anneau interne appelé « Z-Ring » par analogie au « Z-Ring » bactérien. C'est cet anneau qui amorce la division cellulaire procaryote (Bi and Lutkenhaus, 1991). Il permet aussi le recrutement d'autres protéines associées au processus de division et la mise en place d'une force contractile permettant la constriction de la membrane (Goehring and Beckwith, 2005 ; Ghosh and Sain, 2008 ; Lan *et al.*, 2009 ; Osawa *et al.*, 2008).

b- Une famille de protéines impliquées dans la division des plastes : les « ARC »

Les mutants « ARC » pour « **A**ccumulation and **R**eplication of **C**hloroplasts » ont été identifiés à la suite d'un crible massif de mutants d'*Arabidopsis thaliana* générés par mutagenèse chimique au méthanesulfonate d'éthyle (EMS) ou par insertion d'un ADN de

Transfert (T-DNA) (Pyke *and* Leech, 1991). Une douzaine de mutants indépendants présentant un phénotype « ARC » a ainsi été identifiée (Figure 4).

Les effets de ces mutations sont plus ou moins marqués avec des cellules accumulant des plastes plus petits et en plus grand nombre que le sauvage ou à l'inverse beaucoup plus gros et moins nombreux (Figure 4). Certains de ces mutants ont été caractérisés et le rôle des protéines ARC déterminé (Pyke, 1999).

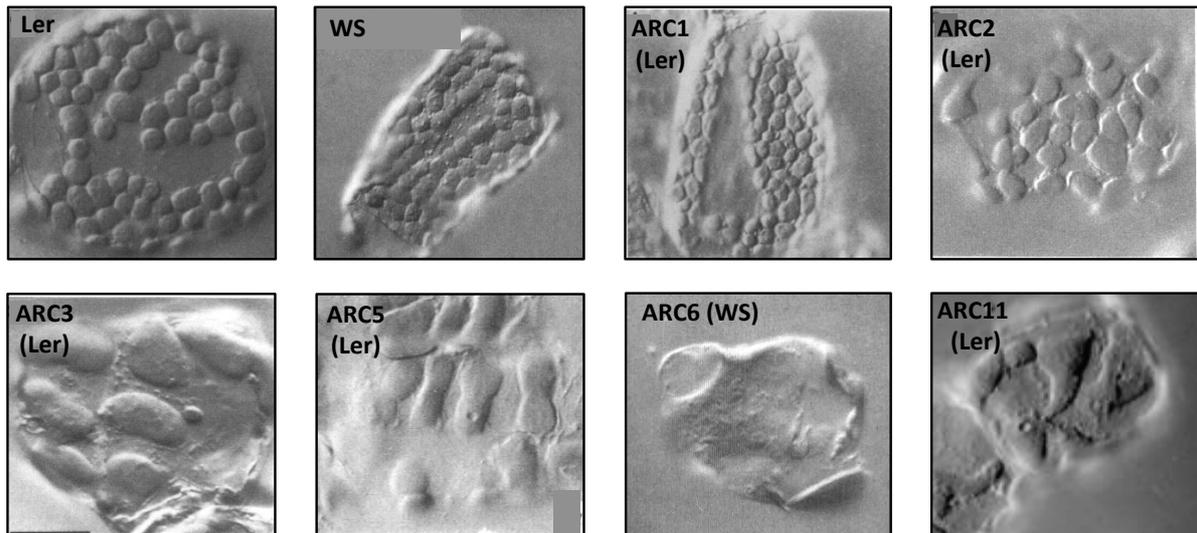


Figure 4 : Exemple de phénotypes observés chez les mutants *ARC-* d'*Arabidopsis thaliana*. Les photos ont été prises au microscope optique sur des cellules de mésophylles. On peut ainsi observer le nombre variable de plastes par cellules en fonctions des différentes mutations *ARC-*. Ler : écotype Landsberg, WS : écotype Wassilewskja.

Le mutant *arc1-* d'*A. thaliana* accumule de nombreux petits plastes (Figure 5). Plusieurs études suggèrent que cette protéine serait impliquée dans la régulation temporelle de la division plastidiale et non pas directement dans le processus de division. La division des plastes serait alors accélérée chez ce mutant (Pyke *and* Leech, 1992, 1994). *ARC1* est une métalloprotéase de la famille FtsH. Cette famille intervient dans le contrôle qualité des protéines en initiant la dégradation de celles qui présentent des défauts (pour revue : Wagner *et al.*, 2011). *ARC1* correspond à FtsHi1, une FtsH catalytiquement inactive. Elle est ancrée dans la membrane des thylacoïdes. Il a été montré qu'elle participe également à un couplage entre le développement et à la division des plastes (Kardirjan-Kalbach *et al.*, 2012).

*ARC3* contrôle l'expansion des chloroplastes (Pyke *and* Leech 1992) en interagissant avec les protéines FtsZ afin de placer correctement le « Z-Ring » (Glynn *et al.*, 2007 ; Maple *et al.*, 2007). *ARC5* agit plus tardivement et permet la séparation des plastes en division en

deux plastes fils (Robertson *et al.*, 1996), son rôle sera décrit plus en détail dans la suite de ce manuscrit.

Chez *A. thaliana*, les mutants *arc6-*, certainement les plus étudiés à ce jour, présentent un à deux chloroplastes géants dans les cellules de mésophiles (Figure 5). ARC6 est une protéine d'ancrage insérée dans la membrane interne du plaste et permettant le recrutement et la stabilisation des FtsZ (Vitha *et al.*, 2003). Le rôle de la protéine ARC6 semble équivalent à celui de ZipA chez les bactéries (Hale *et al.*, 2000), et, même si son absence n'empêche pas la polymérisation des protéines FtsZ, les petits filaments formés restent éparpillés dans le stroma sans pouvoir s'organiser en un anneau de constriction (Vitha *et al.*, 2003). ARC6, comme son homologue cyanobactérien présente un domaine J en partie amino-terminale (domaine d'interaction avec les chaperonnes Hsp70) côté stroma et son domaine carboxy-terminal est ancré dans la membrane interne du chloroplaste. Alors que ARC6 semble promouvoir la formation des filaments FtsZ, la protéine Min D (voir ci-dessous) inhibe celle-ci (Vitha *et al.*, 2003).

Enfin, ARC11 semble intervenir dans le positionnement de l'anneau de division puisque les mutants *arc11-* d'*Arabidopsis thaliana* présentent une division plastidiale asymétrique (Marrison *et al.*, 1999).

### c- Autres protéines impliquées dans la division plastidiale

Les protéines Min (pour *Minicells*) sont des régulateurs de la division du plaste. Ces acteurs majeurs interviennent dans le positionnement correct de l'anneau de division. En effet, il est absolument indispensable que le « Z-ring » soit situé au milieu du plaste avant d'entamer le processus de division afin de permettre une répartition équitable du stroma et de tout ce qu'il contient (protéines, thylacoïdes, plastoglobules, etc...).

Les protéines Min ont initialement été étudiées dans le système de division bactérien, et plus particulièrement chez *Escherichia coli*. Chez les bactéries, l'anneau de division FtsZ est maintenu au milieu de la cellule par l'influence de Min C, Min D et Min E (Margolin, 2001 ; Addinall *and* Holland, 2002 ; Lutkenhaus, 2002). Min C et Min D fonctionnent ensemble pour limiter la formation de cet anneau de constriction alors que Min E est un régulateur négatif de Min C et Min D. (Zhao *et al.*, 1995 ; Raskin *and* de Boer, 1997 ; Fu *et al.*, 2001 ; Shih *et al.*, 2002). Deux autres protéines sont requises pour la division cellulaire de la bactérie et semblent impliquées dans la régulation du positionnement du « Z-Ring » : ZipA et FtsA (Pichoff *and* Lutkenhaus, 2002). ZapA est également important pour initier le processus de division (Gueiros-Filho *and* Losick, 2002).

Bien que certains homologues des protéines Min bactériennes aient été retrouvés chez les végétaux, les connaissances de la division plastidiales sont bien moins complètes que pour la division bactérienne. De manière équivalente à leurs homologues bactériens, les protéines végétales Min D et Min E sont impliquées dans le positionnement de l'anneau de division plastidial (Wakasugi *et al.*, 1997 ; Colletti *et al.*, 2000 ; Kanamaru *et al.*, 2000 ; Dinkins *et al.*, 2001 ; Reddy *et al.*, 2002). Cependant, l'identification de protéines de division des plastes par analogie avec leurs homologues bactériens a ses limites. En effet, aucun homologue de Min C n'a encore été identifié chez les eucaryotes alors que la surexpression de Min C d' *E. coli* dans *A. thaliana* perturbe la division des chloroplastes (Tavva *et al.*, 2006).

#### d- Les protéines externes aux plastes

Malgré de nombreux points communs, le processus de division bactérien et celui des plastes présentent des différences majeures :

- Les protéines impliquées dans la division des plastes ne sont pas codées par le génome de l'organite mais par le génome nucléaire et sont ensuite adressées aux plastes.
- Un anneau de constriction cytoplasmique, donc externe au plaste, faisant intervenir plusieurs protéines est impliqué dans la division des plastes.

C'est en 2001 que l'hypothèse d'un appareil de division externe au plaste voit le jour suite à plusieurs observations en microscopie électronique (Miyagishima *et al.*, 2001). Celui-ci est constitué de protéines ARC5, de la famille des dynamines, qui s'associent en un anneau externe au plaste parallèlement au « Z-Ring » (Figure 5). Ce second anneau permet la mise en place d'une nouvelle force contractile externe qui entraîne la fission d'un plaste en deux plastes fils (Gao *et al.*, 2003 ; Miyagishima *et al.*, 2003). Il est associé à la membrane externe des plastes par les protéines PDV1 et PDV2 (*Plastid DiVision protein*) (Miyagishima *et al.*, 2006).

#### e- Dynamique de division des plastes

La régulation temporelle de la division des plastes chez les plantes reste peu étudiée. Un des principaux problèmes concerne la difficulté de suivre dans le temps et *in vivo* un tel processus. Actuellement, il est impossible de dire si les plastes se divisent à un moment précis durant une phase de la division cellulaire par exemple. Cependant, plusieurs résultats indiquent l'existence d'une communication entre le cycle cellulaire et le cycle de division des

plastes. En effet, le mutant CRUMPLED LEAF (CLR) d'*Arabidopsis* présente des anomalies de la division cellulaire et de celle des plastes (Asano *et al.*, 2004). Un autre exemple provient de l'étude de la protéine CDT1. La surexpression de cette protéine, une cycline-dépendante-kinase, induit une augmentation des réplifications au niveau nucléaire ainsi qu'une diminution du nombre de plastes par cellule. De plus, CDT1 est capable d'interagir avec ARC6 *in planta* (Raynaud *et al.*, 2005). Ces deux protéines, CLR et CDT1, pourraient avoir une importance cruciale dans la communication cellule – plastes.

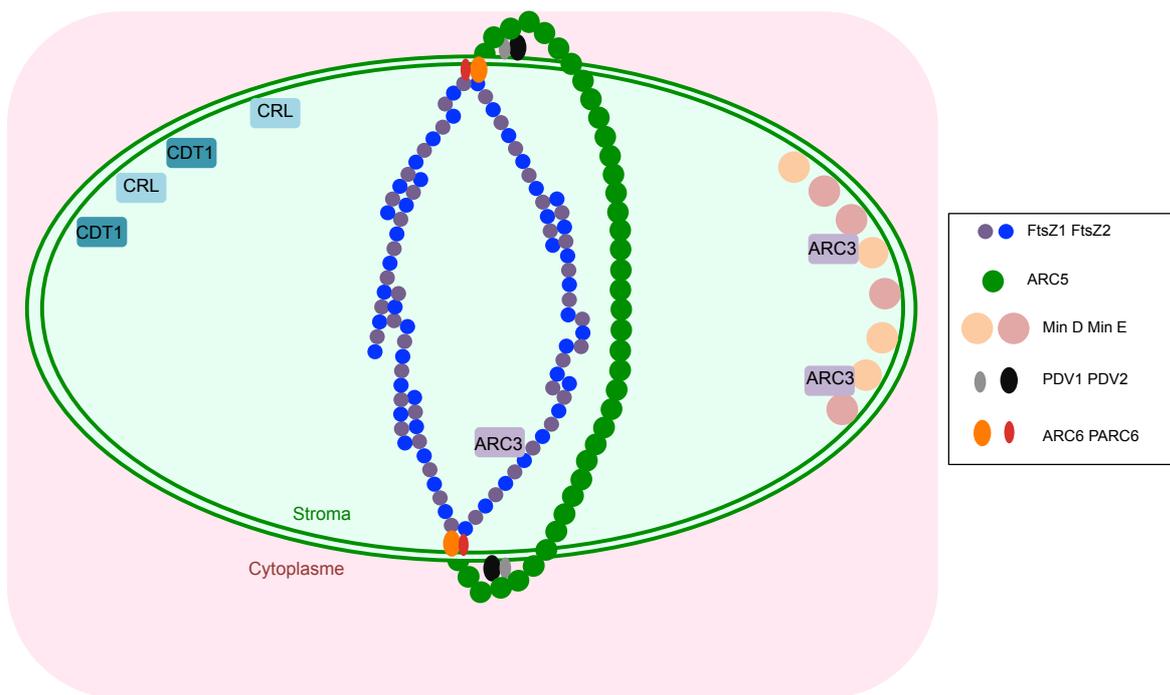


Figure 5 : Représentation schématique de la machinerie de division des plastes. Le processus de division débute par le recrutement des protéines FtsZ1 et FtsZ2 qui polymérisent en consommant du GTP. Ces FtsZ forment le « Z-ring » situé exactement au centre du plaste en division et accolé à la membrane interne. Les protéines d'ancrage du « Z-ring » sont ARC6 et PARC6 (pour *Paralog of ARC6*). L'anneau de division externe, formé des dynamines ARC5 est ancré par PDV1 et PDV2. Ce schéma fait également apparaître différents régulateurs plastidiaux de la division comme ARC3, CRL, CDT1 ou les protéines Min.

## **B- L'amidon**

L'amidon s'accumule chez les algues vertes et les plantes terrestres sous la forme de grains denses et insolubles dans l'eau. Il constitue la principale source de carbone et d'énergie de ces organismes. Le métabolisme de l'amidon est conservé et garde la même complexité qu'il s'agisse d'une microalgue comme *Ostreococcus tauri* ou de végétaux

beaucoup plus évolués comme le riz ou le maïs (Ral *et al.*, 2004 ; Derelle *et al.*, 2006 ; Deschamps *et al.*, 2008).

La civilisation humaine utilise l'amidon principalement comme source de calories. Un nombre limité d'espèces sont cultivées à grande échelle mais la plupart sont destinées à la production d'amidon ou directement à la consommation humaine et animale. Aujourd'hui l'amidon est au cœur des préoccupations alimentaire et économique pour différentes raisons. D'une part, l'augmentation de la population humaine oblige à produire de plus en plus de ressources calorifiques, et d'autre part l'homme a développé de nombreuses utilisations de l'amidon et de ses dérivés qu'il convient d'améliorer, d'optimiser.

Les plantes les plus utilisées pour la production d'amidon sont le maïs, le blé et la pomme de terre. Dans l'industrie agroalimentaire, ce polysaccharide est utilisé pour ses propriétés épaississantes, structurantes, liantes, etc. De plus, le fait qu'il soit aisément modifiable, physiquement ou chimiquement, permet son utilisation dans de nombreux domaines non alimentaires comme en industrie textile, pharmaceutique, cosmétique, en papèterie, ou dans l'industrie du bâtiment. D'un point de vue écologique et environnemental, l'amidon présente un grand intérêt également. Il pourrait être une alternative à l'utilisation du pétrole par exemple. L'amidon est utilisé pour la production de bioéthanol et entre également dans la composition de matériaux plastiques biodégradables.

#### **1- Présentation de quelques chiffres clés sur la production d'amidon en France :**

En France, plus de 700 000 hectares sont destinés à la production d'amidon ce qui représente un chiffre d'affaire annuel supérieur à deux milliards d'euros selon l'USIPA (*L'Union des Syndicats des Industries des Produits Amylacés et de leurs dérivés*). Les principales sources végétales utilisées pour produire l'amidon sont le maïs et le blé (Figure 6).

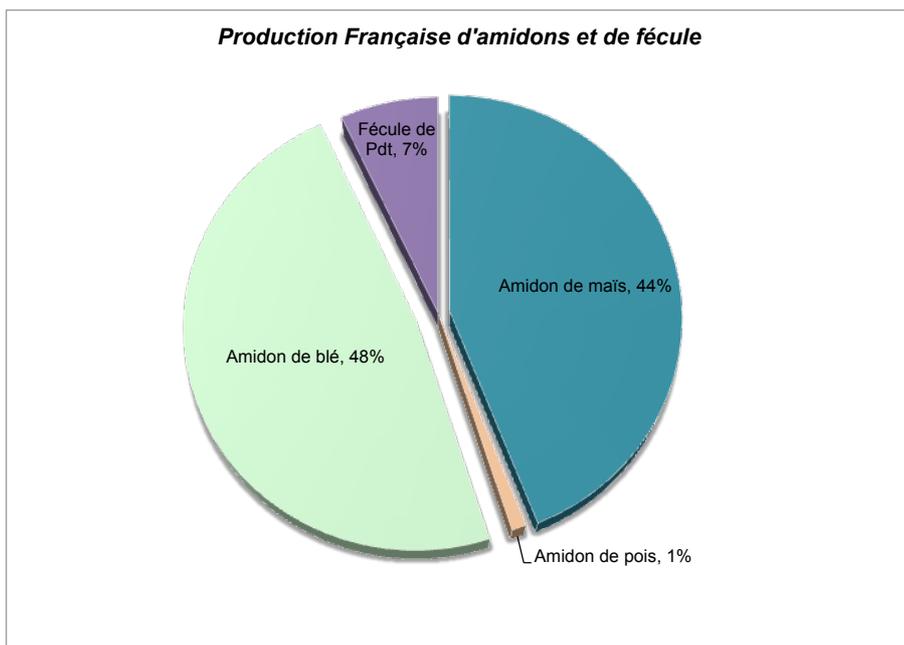


Figure 6 : Répartition des sources végétales utilisées en France pour la production d'amidon (en pourcentage). Données mises à jour en 2013 par l'USIPA.

L'amidon est utilisé pour 52% en non alimentaire et 48% en alimentaire. Les Figures 7 et 8 représentent la répartition des utilisations de l'amidon en France en 2011/2012 (selon l'USIPA, 2013).

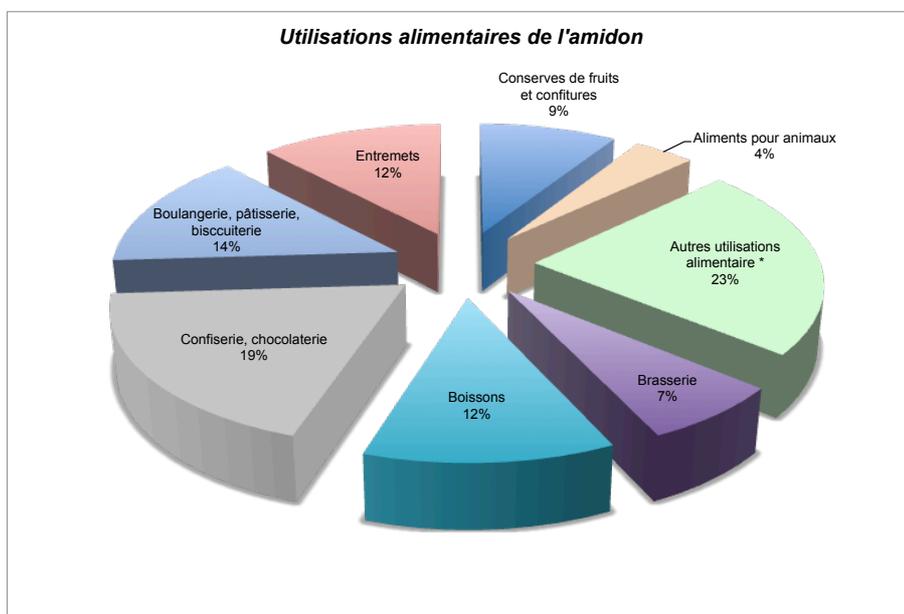


Figure 7 : Utilisations alimentaires de l'amidon en France en 2011/2012. Autres : Conserves de légumes ou de viandes, potages et charcuteries

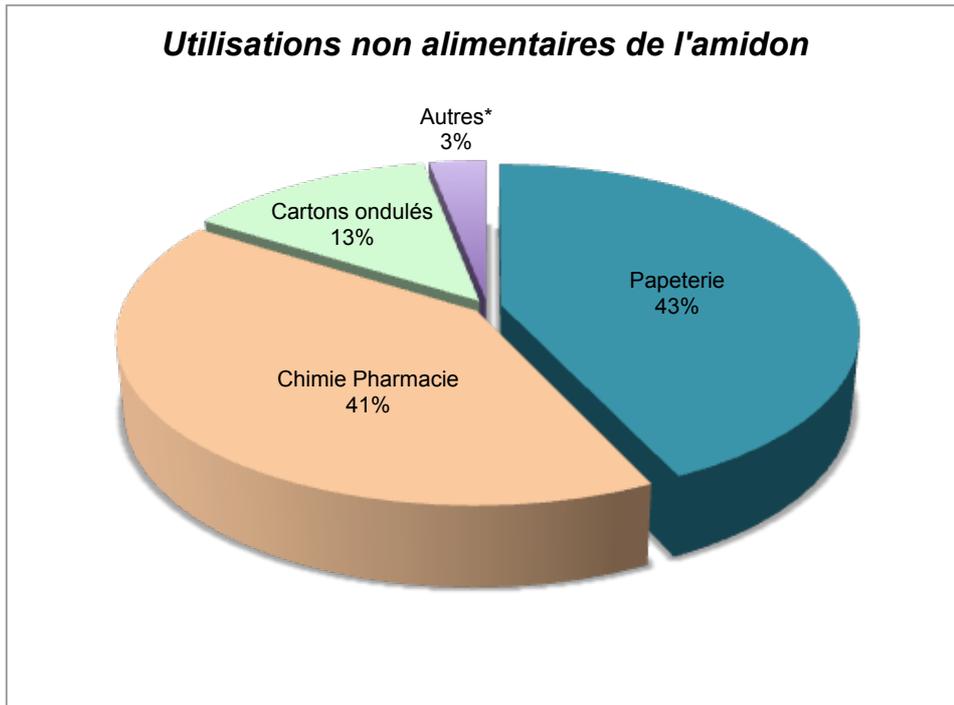


Figure 8 : Utilisations non alimentaires de l'amidon en France en 2011/2012.

Autres : Cosmétiques, textiles adhésifs et matériaux de construction

## 2- Structure de l'amidon

L'amidon se présente sous la forme de grains denses et insolubles dans l'eau allant de 1 à 100  $\mu\text{m}$  selon l'origine végétale. La composition moléculaire de l'amidon est relativement simple, il s'agit de résidus de D-glucose liés par des liaisons O-glucosidiques de type  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6. Malgré cette apparente simplicité, ce polysaccharide présente une organisation structurale complexe. Les composants majoritaires du grain d'amidon sont deux macromolécules :

- l'amylose qui représente 20 à 30% du poids sec du grain
- l'amylopectine, qui est le composant majoritaire (70 à 80% du poids sec)

Il existe également quelques composants minoritaires qui sont principalement des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'amidon et qui restent liées au grain (Han *and* Hamaker, 2002) ainsi que des lipides en particulier dans l'amidon des céréales (Morrison *et al.*, 1984). Il y a aussi quelques sels minéraux tels que  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  ou encore  $\text{Ca}^+$  (Blennow *et al.*, 2005) et des phosphates en particulier dans l'amidon de pomme de terre (Blennow *et al.*, 1998). Les structures fines de l'amylose et de l'amylopectine seront décrites dans la prochaine partie de ce manuscrit.

#### a- Structure de l'amylose :

Cette molécule est essentiellement linéaire. Elle contient moins de 1% de points de branchement (liaisons en  $\alpha$ -1,6). De nombreux mutants dépourvus d'amylose ont été caractérisés et tous sont déficients en une amidon-synthase liée au grain : la GBSS (pour **Granule Bound Starch Synthase**). Ces mutants présentent un nombre normal de grains d'amidon composés d'amylopectine dont l'organisation semble quasi identique à celle des grains sauvages. Il est donc généralement admis que la présence d'amylose n'est pas indispensable à la synthèse des grains d'amidon (Buléon *et al.*, 1997). Récemment, une étude a remis en cause cette généralisation montrant qu'un mutant de l'orge était en mesure de former des grains composés uniquement d'amylose (Carciofi *et al.*, 2012) mais cet exemple reste un cas isolé.

#### b- Structure moléculaire de l'amylopectine :

L'amylopectine présente un taux de branchement de 5 à 6 % et possède une particularité structurale qui fait d'elle l'acteur majoritaire de l'organisation du grain d'amidon. En effet, sa structure « en grappe », due à une répartition non-homogène des points de branchement, confère à l'amylopectine et plus généralement à l'ensemble du grain un caractère insoluble dans l'eau et semi-cristallin.

Afin d'appréhender l'importance de la distribution des points de branchement au sein de ce polysaccharide, il est intéressant de réaliser une comparaison de la structure de l'amylopectine avec celle du glycogène.

Le glycogène, polysaccharide de réserve des bactéries, des champignons ou encore des animaux, possède une composition similaire à celle de l'amidon. Il est, lui aussi, composé de résidus de D-glucose liés en  $\alpha$ -1,4 et branchés en  $\alpha$ -1,6. Le glycogène, contrairement à l'amylopectine, présente une distribution homogène des points de branchement. Ceci a deux conséquences : (i) le glycogène possède une taille maximale, déterminée par l'encombrement stérique des chaînes externes, et (ii) est un polysaccharide hydrosoluble (Buléon *et al.*, 1998). A l'inverse, l'amylopectine présente une répartition inhomogène de ses points de branchement. Il en découle la formation d'une structure en grappe et la formation de doubles hélices cristallines issues de l'interaction par des ponts hydrogène de chaînes glucaniques voisines (Hizukuri *et al.*, 1986) chassant les molécules d'eau. C'est ainsi que l'amylopectine acquiert une structure semi-cristalline et insoluble dans l'eau et que le grain d'amidon possède une taille en théorie illimitée. (Détail dans la Figure 9).

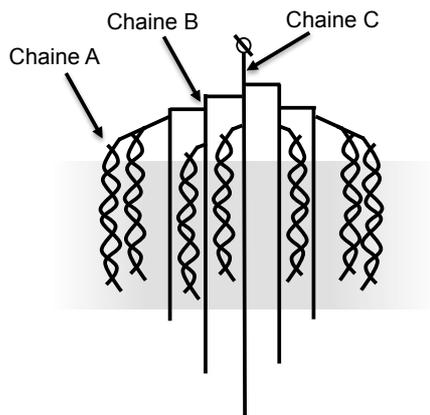


Figure 9 : Représentation schématique de la structure de l'amylopectine. Les chaînes A sont les plus externes, les chaînes B portent d'autres chaînes B ou des chaînes A et la chaîne C possède l'unique extrémité réductrice de la molécule. On peut visualiser l'assemblage de chaînes glucaniques voisines sous forme de doubles hélices.

La principale différence entre l'amidon et le glycogène est donc le caractère soluble et amorphe de l'un (le glycogène) et insoluble et partiellement cristallin de l'autre (l'amidon). Cette différence s'explique par des organisations structurales bien distinctes liées à la différence de répartition des points de branchement.

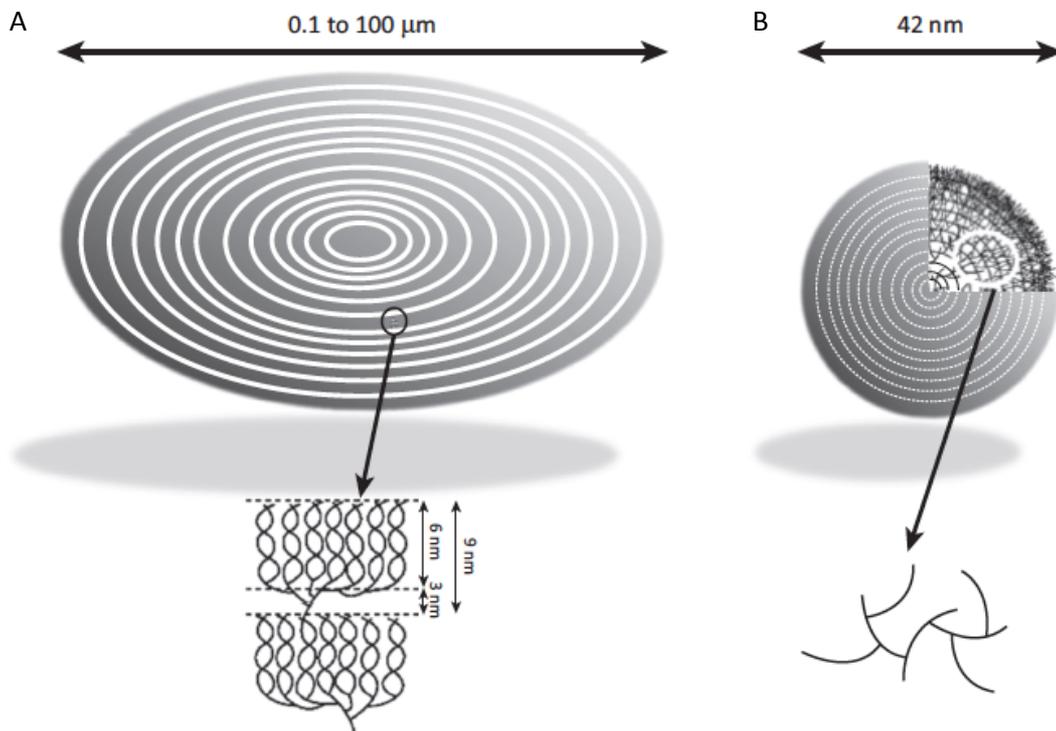


Figure 10 : Comparaison de la répartition des points de branchement de l'amidon (A) et du glycogène (B). Les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amidon sont réparties dans des zones bien définies alors qu'elles sont distribuées de manière homogène dans le glycogène.

En raison de leur nature chimiquement identique, il est très difficile de différencier les glucanes de l'amylopectine. En 1952, Peat et coll. distinguent trois classes de chaînes de l'amylopectine:

- Les chaînes A, les plus externes et qui ne portent pas d'autres chaînes.
- Les chaînes B qui portent des chaînes A ou d'autres chaînes B
- L'unique chaîne C qui possède la seule extrémité réductrice de l'amylopectine.

(Figure 9)

Il existe plusieurs classifications des chaînes A, B et C. Hanashino et coll. remarquent une certaine périodicité de la répartition de la longueur des chaînes d'environ 12 résidus glucose. Il suggère alors de les classer en chaînes A de 6 à 12 résidus, chaînes B1 de 13 à 24 résidus, chaînes B2 de 25 à 36 résidus et chaînes B3 avec un degré de polymérisation (DP) supérieur à 36 (Hanashino *et al.*, 1996). Cette classification est la plus utilisée actuellement. Il est important de noter que chez certaines espèces, comme le riz *Indica*, certaines chaînes dépassent 1000 résidus de glucose (Takeda *et al.*, 1987). La synthèse de ces chaînes extrêmement longues est due à l'activité de la GBSS, l'enzyme responsable de la synthèse d'amylose. (Hanashiro *et al.*, 2008). La chaîne C, pouvant être marquée à l'aide d'un composé fluorescent du côté réducteur puis isolée par chromatographie d'exclusion stérique, montre une taille de 10 à 130 DP (Hanashiro *et al.*, 2002).

Deux modèles de structure de l'amylopectine sont actuellement proposés. Le modèle de Hizukuri ou des grappes de glucanes se succèdent de manière linéaire et sont liés par de plus longs glucanes (Figure 11A) (Hizukuri *et al.*, 1986) et le modèle de Bertoft, plus récent, où les grappes sont liées, côte à côte, sur une longue chaîne linéaire (Figure 11B) (Bertoft *et al.*, 2004).

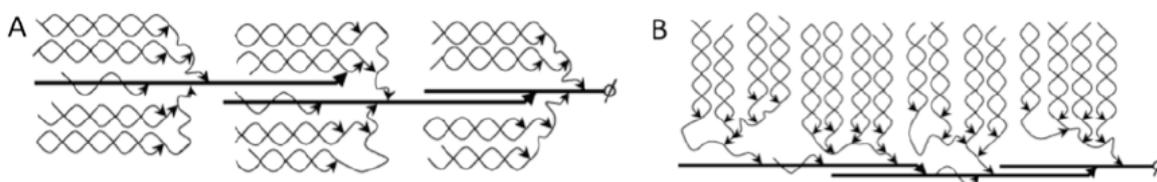


Figure 11 : Modèles d'Hizukuri (A) et de Bertoft (B) proposé pour l'organisation de l'amylopectine. Les flèches représentent le point de branchement, ou liaisons  $\alpha$ -1,6. Les glucanes s'organisent en hélices.

L'extrémité réductrice est représentée par ce symbole :  $\phi$  (Hizukuri *et al.*, 1986 ; Bertoft *et al.*, 2004).

### c- Etude de la structure de l'amylopectine :

Un premier niveau d'organisation de la molécule a pu être mis en évidence en observant des grains d'amidon sous lumière polarisée. Sous cette lumière, chaque grain d'amidon, quelle que soit son origine botanique, présentera une croix de malte indiquant la

biréfringence de la lumière polarisée (Figure 12). Cela suggère une organisation d'ordre radiale de l'amylose et de l'amylopectine dans le grain (Pérez *and* Bertoft, 2010).

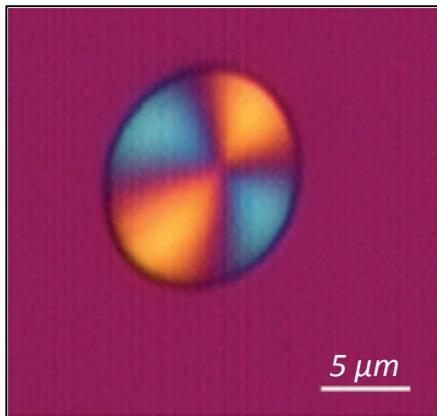


Figure 12 : Observation d'un grain d'amidon de pomme de terre sous lumière polarisée (Zeeman *et al.*, 2002)

Outre la structuration de l'amylopectine, il existe un autre niveau d'organisation au niveau granulaire cette fois. Le concept de « blocklets » fut décrit par Gallant *et coll.* en 1997. Il se base sur des observations effectuées grâce à différentes techniques de microscopie (dont la microscopie de force atomique) qui font apparaître des protubérances à la surface des grains d'amidon de blé et de pomme de terre (Gallant *et al.*, 1997). Ces conclusions ont été récemment confirmées par de nouvelles observations effectuées à partir d'amidon de pomme de terre (Park *et al.*, 2011). Il existerait ainsi une organisation spécifique de l'amidon en blocs de taille très variable avec deux sous populations : les petits blocklets sensibles aux hydrolyses et les plus grands moins sensibles (Baker *et al.*, 2001) (Figure 13)

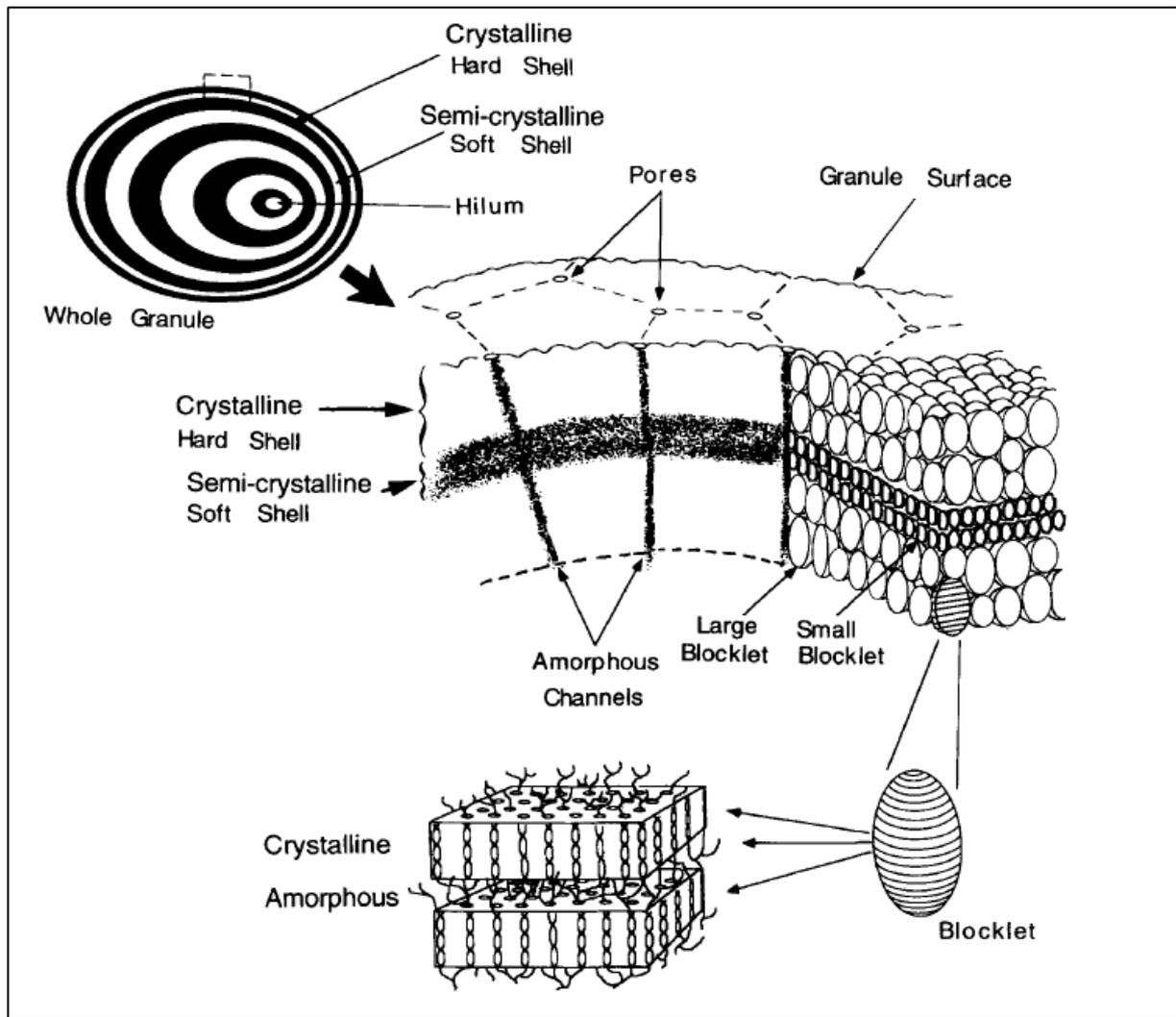


Figure 13 : Organisation des « blocklets » selon Gallant *et al.*, 1997. Leur taille varie de 20 à 500 nm. Les plus grands se trouvent dans les zones cristallines (qui résistent à l'hydrolyse ménagée) alors que les plus petits se situent dans les zones semi-cristallines du grain.

L'amidon possède une structure semi-cristalline qui peut, selon l'origine botanique, présenter des variations du taux (15 à 45%) et du type de cristallinité (A, B ou C).

Le type A concerne l'amidon de l'albumen des céréales ou encore celui de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*. Les chaînes glucaniques forment des hélices capables de piéger huit molécules d'eau.

Le type B est retrouvé pour l'amidon transitoire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et dans celui des tubercules. L'organisation des hélices y est plus lâche et 36 molécules d'eau peuvent y être insérées (Imberty *et al.*, 1988).

Le type C est une combinaison des types A et B (Buléon *et al.*, 1998) (Figure 14).

Pour étudier la structure de l'amidon, on peut le soumettre à une hydrolyse ménagée (acide ou enzymatique) et suivi d'une observation au microscope électronique. On observe alors une alternance de zones plus ou moins denses aux électrons qualifiées « anneaux de croissance » puisque ces zones suivent une alternance concentrique autour du hile (le centre du grain) (Yamaguchi *et al.*, 1979). On trouve dans les régions semi-cristallines, des molécules d'amylopectine présentant, elles-mêmes, une alternance de lamelles amorphes et cristallines. Les lamelles amorphes sont des zones désorganisées, riches en points de branchement alors que les lamelles cristallines en possèdent peu (Figure 14).

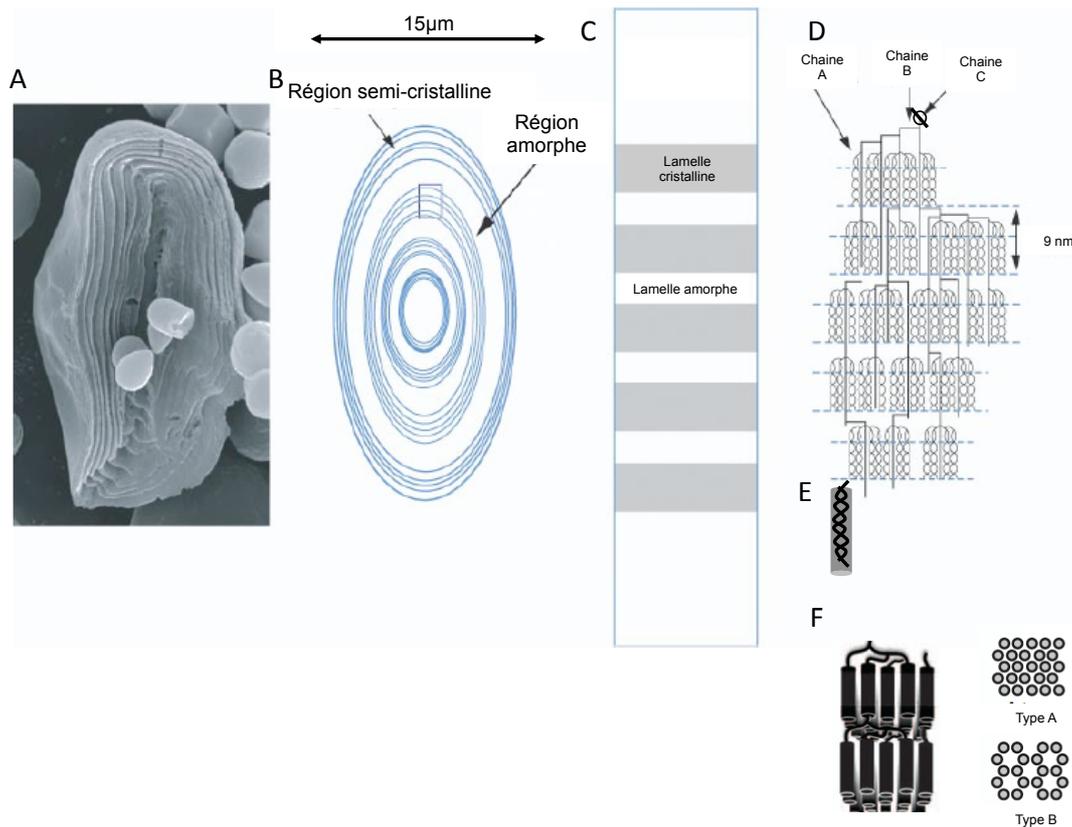


Figure 14 : (A) Photo de microscopie électronique à balayage d'un grain d'amidon de blé ayant subi une hydrolyse ménagée. Les anneaux de croissances sont visibles. (B) Représentation schématique de l'alternance entre régions amorphes et régions semi-cristallines. (C) Représentation d'une région semi-cristalline avec les lamelles amorphes et les lamelles cristallines. (D) Représentation de la molécule d'amylopectine faisant apparaître la répartition des chaînes A, B ou C,  $\text{O}$  représentant l'extrémité réductrice. Les grappes d'amylopectine mesurent en moyenne 9 nm et on retrouve cette alternance de lamelles amorphes, très riches en points de branchement et lamelles cristallines où les chaînes glucaniques s'associent en hélices. (E) Représentation d'une association de deux chaînes en hélice. (F) Organisation spatiale de ces hélices, vue du dessus, permettant de définir la cristallinité de l'amylopectine : De type A, B ou de type C quand il s'agit d'une alternance de type A et B. (Adaptée de Ball *and* Morell, 2003 et Zeeman *et al.*, 2010).

L'étude de la distribution en longueur de chaîne des glucanes composant la molécule d'amylopectine nous donne des informations importantes sur sa structure. Il est possible de séparer les chaînes par clivage des liaisons  $\alpha$ -1,6 à l'aide d'enzymes de débranchement. Ces enzymes seront décrites plus en détail dans la suite de ce manuscrit. Les chaînes débranchées sont ensuite séparées par chromatographie d'exclusion stérique (Fredriksson *et al.*, 1998 ; Hizukuri, 1985), par chromatographie d'échange d'anions (Hanashiro *et al.*, 1996 ; Koizumi *et al.*, 1991) ou par électrophorèse capillaire (Morell *et al.*, 1998). (Figure 15)

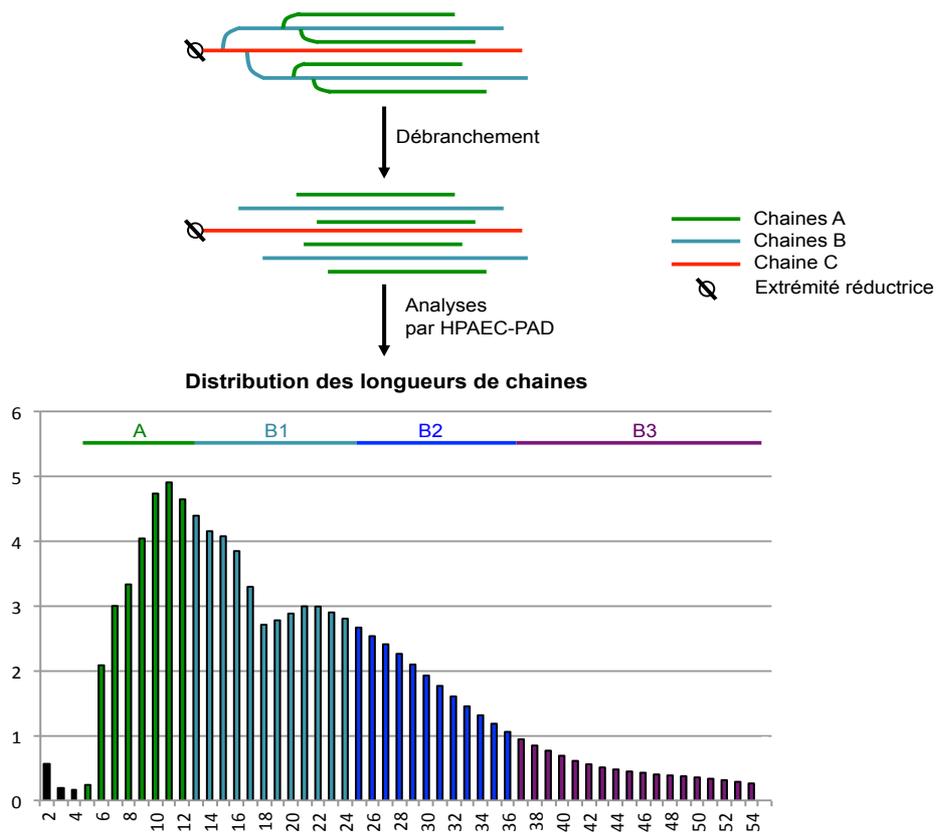


Figure 15 : Représentation schématique de l'analyse des chaînes de l'amylopectine. Après débranchement de l'amylopectine à l'aide d'enzymes de débranchement (isoamylases et pullulanases) les chaînes sont ensuite séparées, par exemple, par HPAEC-PAD (Chromatographie d'échange d'anions à haut pH couplée à une détection ampérométrique pulsée). Il est alors possible d'obtenir un graphique de la répartition de la longueur des chaînes c'est à dire le pourcentage de chaque chaînes en fonction de leur degré de polymérisation (DP). Ici il s'agit d'une distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia-0 avec des DP compris entre 2 et 54.

### 3- Synthèse de l'amidon :

L'amidon n'est composé que d'unités de glucose reliées entre elles par deux types de liaisons, ce qui en fait un polymère chimiquement simple. Cependant l'amylopectine, présente une organisation structurale complexe que nous avons précédemment décrite. Dans la suite de cette introduction, nous aborderons la synthèse de l'amidon en évoquant les multiples enzymes impliquées dans ces processus complexes.

La production de l'amidon chez la plante, qu'il soit transitoire (dans les feuilles) ou de réserve (dans les graines ou tubercules) reste basée sur le même schéma et commence par la synthèse d'un précurseur. La voie de biosynthèse de l'amidon fait intervenir plus d'une quarantaine de gènes. Cette complexité s'explique en partie par la présence de nombreuses isoformes enzymatiques qui catalysent les différentes étapes de la synthèse du polysaccharide de réserve.

Selon les espèces végétales, on trouve l'amidon en quantité très variable stocké dans les graines, les tubercules, les racines ou encore de manière transitoire dans les feuilles. Il sert de réserve de carbone et d'énergie pour la plante. L'amidon des graines sera utilisé lors de la germination, l'amidon des racines semble avoir un rôle dans le gravitropisme, l'amidon des tubercules est une forme de réserve et l'amidon foliaire est un amidon transitoire accumulé dans les chloroplastes le jour et dégradé la nuit suivant ainsi un cycle journalier de synthèse/dégradation (Figure 16).

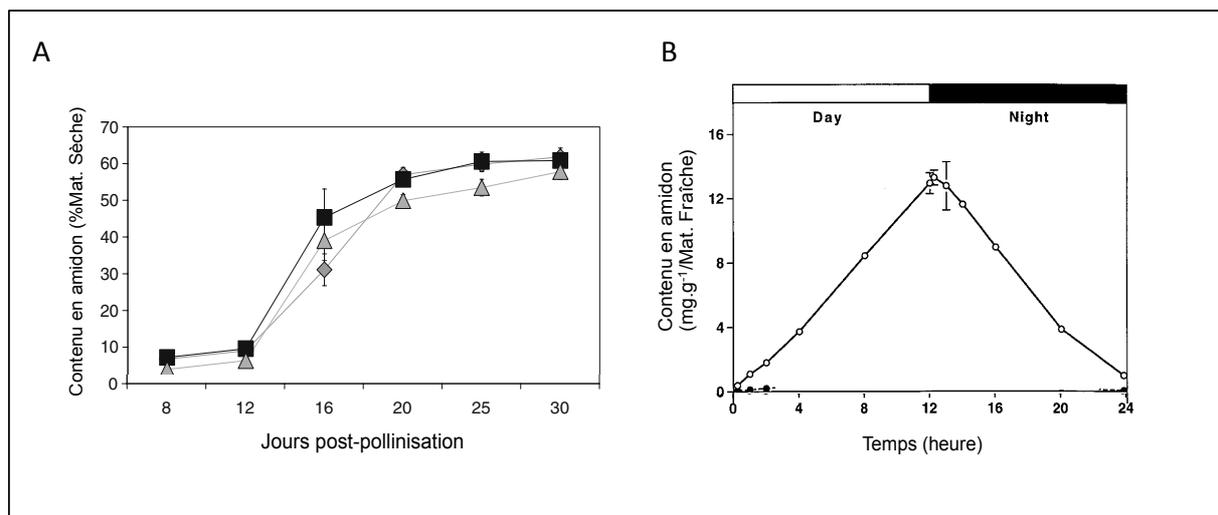


Figure 16 : (A) Exemple de cinétique d'accumulation d'un amidon de réserve dans la graine de maïs. Quantité d'amidon exprimée en pourcentage de matière sèche et pour trois génotypes en fonction du nombre de jours post-pollinisation (Romisch-Margl *et al.*, 2010). (B) Evolution de la quantité d'amidon transitoire (en mg/g de matière fraîche) dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* sur 24h (adapté de Zeeman *et al.*, 1998).

L'unique précurseur de la synthèse d'amidon est un glycosyl-nucléotide: l'ADP-glucose. Il est synthétisé par l'ADP-glucose pyrophosphorylase à partir de Glucose-1-Phosphate et d'ATP. Les étapes conduisant à la synthèse du précurseur sont décrites Figure 18.

L'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) (EC 2.7.4.27) est composée de deux petites sous unités portant l'activité catalytique et de deux grandes sous unités régulatrices (Copeland *and* Preiss, 1981). Cette enzyme est à l'origine de tout le processus de synthèse de l'amidon. L'absence de cette activité conduit, quelle que soit l'espèce étudiée, à l'arrêt de la synthèse de l'amidon. De même, la diminution de son activité entraîne une réduction de l'accumulation du polysaccharide de réserve (Lin *et al.*, 1988 ; Müller-Rober, 1992 ; Tsai *and* Nelson, 1966 ). A l'inverse, l'augmentation de celle-ci induit une suraccumulation d'amidon dans les organes de réserves (Stark *et al.*, 1992 ; Smidansky *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2011).

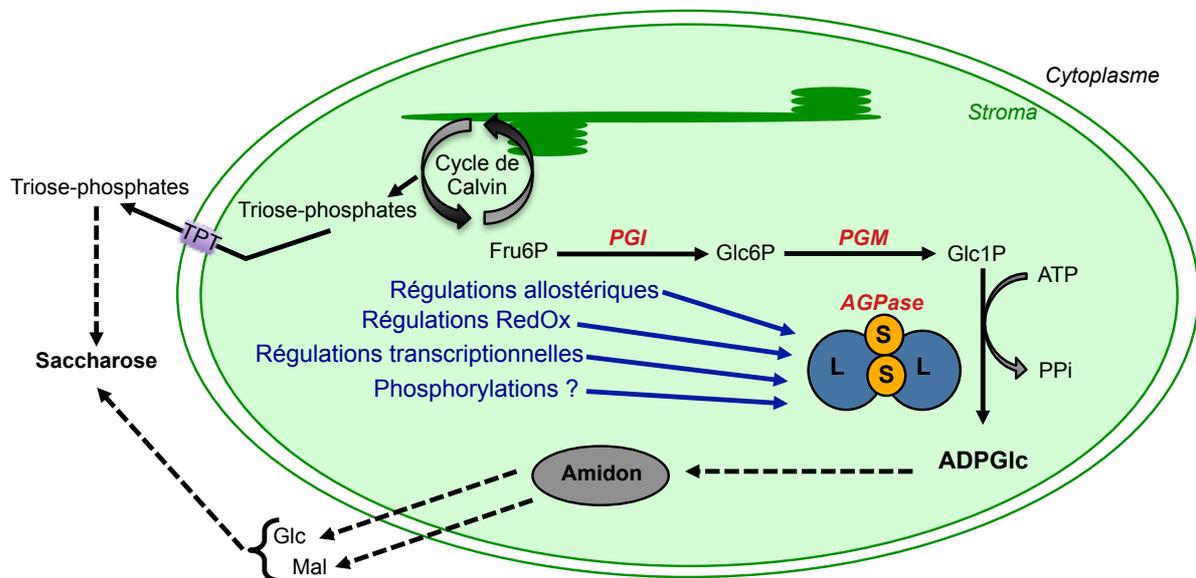


Figure 17 : Schématisation de la synthèse du précurseur : l'ADP glucose (ADPGlc). Le cycle de Calvin permet la production de Fructose 6 phosphate (Fru6P), converti en Glucose 6 phosphate (Glc6P) par la Phosphoglucoisomérase (PGI). La Phosphoglucomutase (PGM) permet ensuite de convertir le Glc6P en Glucose 1 Phosphate (Glc1P). L'ADP pyrophosphorylase (AGPase) utilise ensuite l'ATP et le Glc1P pour synthétiser l'ADP-Glucose. L'AGPase est composée de deux grandes sous unités (L) et de deux petites portant l'activité catalytique (S).

L'activité de l'AGPase est régulée à différents niveaux : régulations allostériques, transcriptionnelles, ou encore post-traductionnelles (redox et phosphorylations) (Geigenberger, 2011).

#### 4- L'initiation de la synthèse du polysaccharide de réserve

Chez les animaux ou les champignons, c'est la glycogénine qui est responsable de l'initiation. C'est une enzyme capable de s'auto-glucosyler afin de créer l'amorce nécessaire à l'initiation de la synthèse de glycogène. Il en existe deux formes génétiquement indépendantes. Chez la levure, la combinaison de mutations pour les deux isoformes de glycogénines interrompt totalement la synthèse du glycogène (Cheng *et al.*, 1995). Chez les mammifères, il existe une forme de glycogénine retrouvée dans diverses espèces étudiées alors que la seconde isoforme n'a été retrouvée que chez les primates et de manière organe-spécifique (Lomako *et al.*, 2004). Lors de la synthèse du glycogène, les glycogène-synthases fongiques et animales utilisent l'UDP-glucose afin d'allonger l'amorce produite par les glycogénines.

Les bactéries, qui ne possèdent pas de glycogénine, initient la synthèse du glycogène par un processus différent. C'est la glycogène-synthase procaryote qui possède la capacité de s'autoglucosyler et initie ainsi la synthèse de glycogène (Figure 18). Les enzymes bactériennes utilisent ensuite l'ADP-glucose pour allonger les chaînes du glycogène.

Ces deux processus restent relativement proches. En effet, il a été montré que l'absence de glycogénines dans des cellules eucaryotes pouvait être compensée par une hyperactivité de la glycogène-synthase (Torija *et al.*, 2005).

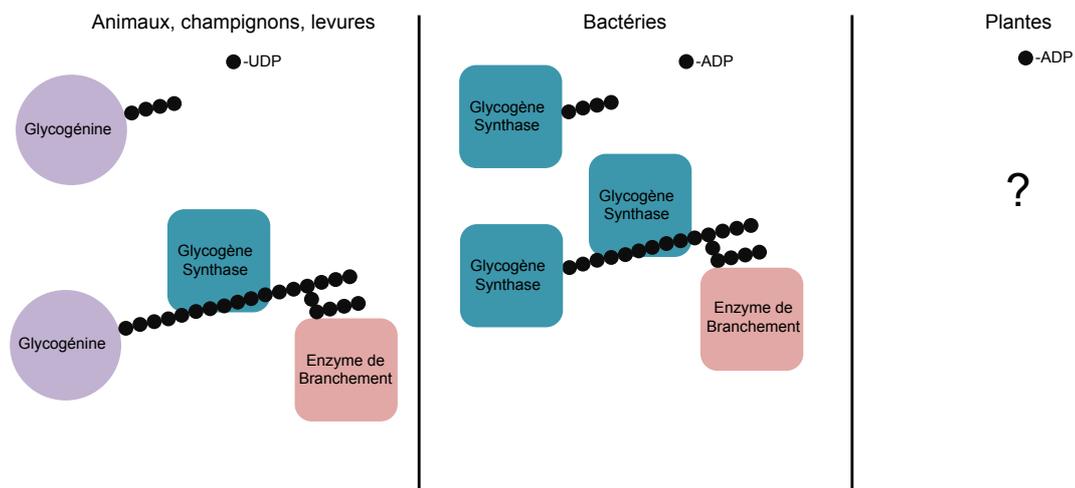


Figure 18 : Représentation schématique de l'état des connaissances concernant l'étape d'initiation de la synthèse des polysaccharides de réserve. Chez les animaux, les champignons et les levures, la glycogénine initie la synthèse du polysaccharide de réserve par auto-glucosylation et formation d'un court glucane initiateur. Chez les bactéries c'est la glycogène-synthase qui en est capable. Chez les plantes, l'initiation de la synthèse d'amidon reste encore un sujet d'étude.

Chez les végétaux, la compréhension des mécanismes de l'initiation de la synthèse d'amidon reste non résolue à ce jour. Des glycogénines ont été identifiées par homologies de séquences chez *Arabidopsis thaliana* (Chatterjee *et al.*, 2005), mais elles interviennent dans la synthèse d'autres polysaccharides situés dans la paroi des cellules végétales et ne semblent pas impliquées dans la synthèse d'amidon. Aucune glycogénine n'a été identifiée dans les algues unicellulaires comme *Chlamydomonas reinhardtii* ou *Ostreococcus tauri* alors que celles-ci possèdent toutes les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon (Ral *et al.*, 2004).

Une seconde hypothèse a été envisagée pour expliquer l'initiation de la synthèse d'amidon chez les végétaux. Les isoamylases, des enzymes de débranchement qui clivent les liaisons  $\alpha$ -1,6, pourraient intervenir dans ce processus d'initiation. Les mutants déficients pour l'activité isoamylase accumulent des grains d'amidon plus petits que le sauvage et en plus grande quantité (Burton *et al.*, 2002 ; Bustos *et al.*, 2004 ; Wattebled *et al.*, 2005). Il y aurait donc, chez ces mutants, une augmentation du nombre d'événements d'initiation. Le rôle des isoamylases pourrait être de libérer des glucanes ou de dégrader des amorces solubles afin de limiter le nombre d'événements d'initiation (Bustos *et al.*, 2004). Aucune étude n'a permis de conforter cette hypothèse jusqu'à présent.

La troisième hypothèse se base sur l'origine endosymbiotique des plastes. En effet, nous avons évoqué, dans la première partie de ce manuscrit, le maintien des mécanismes de la division plastidiale au cours de l'évolution. Il est tout à fait envisageable que, de la même manière, les mécanismes d'initiation de la synthèse du polysaccharide de réserve soient conservés depuis la cyanobactérie internalisée jusqu'à la plante terrestre la plus évoluée. Dans ce cas, une amidon-synthase pourrait initier la synthèse de l'amidon au même titre qu'une glycogène-synthase initie la synthèse de glycogène.

Récemment, l'analyse de mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients pour SS4 (une des quatre isoformes d'amidon-synthases solubles impliquées dans la synthèse de l'amylopectine) a montré un défaut d'initiation de la synthèse. En effet, les mutants *ss4*-synthétisent un unique gros grain d'amidon par plaste alors que le sauvage accumule 5 à 7 grains de plus petite taille (Roldan *et al.*, 2007 ; Szydlowski *et al.*, 2009). Ces modifications de la taille et du nombre de grains suggèrent une altération du mécanisme d'initiation de la synthèse d'amidon.

## 5- Enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon

### a- Les amidon-synthases

Les amidon-synthases sont responsables de l'élongation des chaînes de glucose. Elles ajoutent des résidus de glucose à partir de l'ADP-glucose à un glucane préexistant via la formation d'une liaison O-glucosidique  $\alpha$ -1,4 (Figure 20). Il existe cinq amidon-synthases :

- La GBSS (pour **Granule Bound Starch Synthase**) qui est liée au grain d'amidon et qui participe à la synthèse de l'amylose.
- Les SS (pour **Starch Synthase**) qui sont solubles. Elles sont au nombre de quatre (SS1 à SS4) leur rôle sera décrit en détail dans la suite de ce manuscrit.

Les analyses phylogénétiques récemment menées indiquent que ces différentes amidon-synthases ont des origines évolutives différentes. Ainsi, SS1 et SS2 semblent être d'origine cyanobactérienne alors que SS3 et SS4 auraient une origine chlamydiale ce qui conforte l'hypothèse de l'endosymbiose tripartite évoquée au début de ce manuscrit (Ball *et al.*, 2013).

Les amidon-synthases font partie de la famille des Glycosyl-transférases de type 5 (GT5) de la classification CAZy (**Carbohydrate Active enZyme**) (Coutinho *et al.*, 2003). Elles possèdent une partie Carboxy-terminale très conservée et proche des glycogène-synthases. C'est cette région qui porte l'activité catalytique. On trouve, dans cette partie C-terminale, huit domaines conservés ainsi que deux motifs K-X-G-G-L et X-X-G-G-L de part et d'autre des régions catalytiques (Figure 19) (Cao *et al.*, 1999).

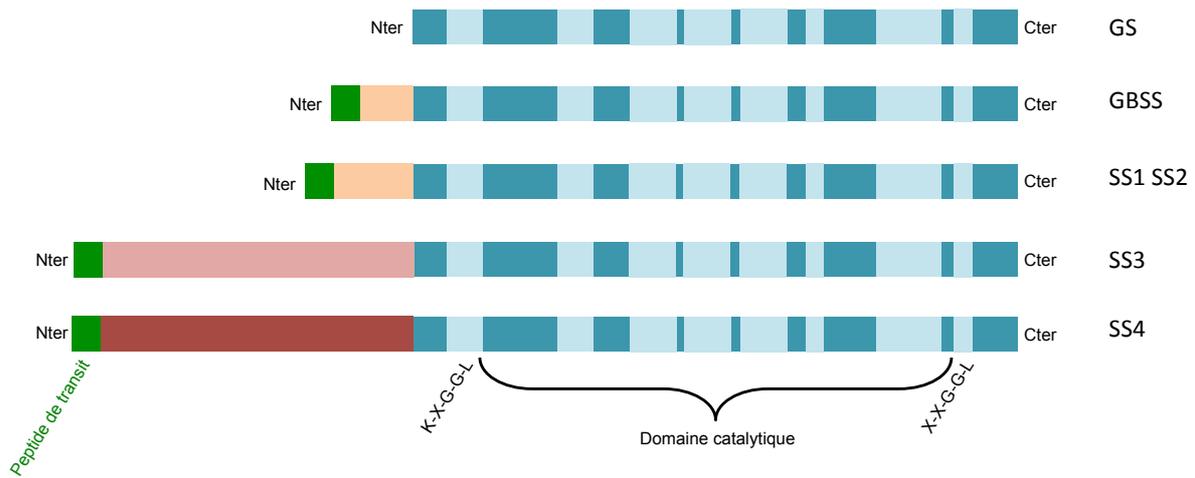


Figure 19 : Représentation de différentes amidon-synthases et de leurs domaines. La Glycogène-Synthase (GS) possède les 8 domaines conservés de la famille des GT5. L'amidon-synthase liée au grain (GBSS) possède, comme toutes les autres amidon-synthases, un peptide de transit permettant l'adressage de la protéine au chloroplaste. Les SS1 et 2 ont des séquences primaires très comparables. Les SS3 et 4 possèdent une longue extension N-terminale. On retrouve le domaine portant l'activité catalytique de ces enzymes dans la partie C-terminale (Adapté de Szydłowski *et al.*, 2009).

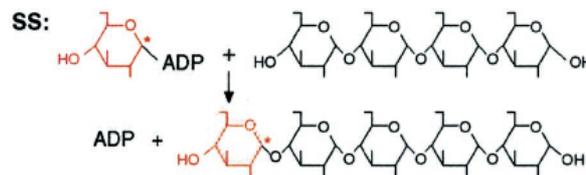


Figure 20 : Exemple d'allongement d'un glucane par action d'élongation d'une amidon-synthase. Le résidu de glucose de l'ADP-glucose (en rouge) est ajouté à la chaîne existante via la formation d'une liaison  $\alpha$ -1,4. (d'après Myers *et al.*, 2000)

## 1) Les différentes amidon-synthases

### GBSS

Il s'agit de l'amidon-synthase liée au grain. Elle représente la majorité des protéines liées au grain d'amidon (95%) (Vos Schepkerkeuter *et al.*, 1986). Les mutants dépourvus de la GBSS sont incapables de synthétiser de l'amylose et accumulent des grains d'amidon uniquement composés d'amylopectine (Nelson *and* Rines, 1962). Le premier mutant, découvert chez le maïs, fut nommé *waxy* en raison de l'aspect cireux des grains (Tsaï *et al.*,

1974). Des mutants de diverses espèces possédant ce phénotype sont également appelés *waxy*, comme chez le riz, le blé, l'orge. Le mutant de pomme de terre est aussi appelé « *amylose free* » (Hovenkamp-Hermelink *et al.*, 1987 ; Denyer *et al.*, 1995 ; Nakamura *et al.*, 1995). Les grains d'amidon se trouvent en nombre habituel, ont une cristallinité inchangée et gardent une apparence normale ce qui suggère que l'absence d'amylose n'a pas d'effet direct sur la structuration d'un grain d'amidon (Buléon *et al.*, 1997). La GBSS, associée de manière non covalente au grain utilise l'ADP-glucose pour allonger les glucanes. Elle agit préférentiellement pour l'élongation de l'amylose mais aussi sur les chaînes externes de l'amylopectine destinées à former l'amylose (Leloir *et al.*, 1961 ; Maddelein *et al.*, 1994 ; van de Wal *et al.*, 1998).

## SS1 et SS2

Les mutations, chez ces deux enzymes, ont d'abord été étudiées chez des plantes de grandes cultures.

SS1 a d'abord été étudiée chez le maïs puis identifiée chez le riz, le blé ou encore la pomme de terre (Boyer *and* Preiss, 1979 ; Baba *et al.*, 1993 ; Mu *et al.*, 1994 ; Kossmann *et al.*, 1999). L'expression d'un ARN antisens de SS1 chez la pomme de terre ne modifie pas le contenu en amidon du tubercule (Kossmann *et al.*, 1999). L'expression de la SS1 de maïs chez *Echerischia coli* a permis de mettre en évidence une perte d'activité de celle-ci en fonction de la longueur des glucanes lui servant de substrat. Elle allonge spécifiquement les chaînes courtes (Commuri *and* Keeling, 2001). En 2002, une revue de Nakamura évoque la modification de la structure de l'amylopectine dans l'albumen chez un mutant *ss1-* du riz (Nakamura, 2002). La description du mutant *ss1-* d'*Arabidopsis thaliana* permet de confirmer que SS1 est bien responsable de la synthèse de chaînes courtes de l'amylopectine (Delvallé *et al.*, 2005).

SS2 a d'abord été décrite chez le pois, la pomme de terre, et le blé (Dry *et al.*, 1992 ; Denyer *et al.*, 1995 ; Edwards *et al.*, 1995). Chez le pois, la mutation *ss2-* induit une chute de la quantité d'amidon accumulé et une modification de la structure de l'amylopectine. Cette dernière contient moins de chaînes de tailles intermédiaires (DP 15 à DP 45) et plus de chaînes courtes et de chaînes longues. Il existe deux isoformes de SS2 chez le maïs (SS2a et SS2b) et trois chez le riz (SS2-1 SS2-2 SS2-3). Il a été démontré que ces isoformes sont exprimées de manière organe-spécifique et en fonction du stade de développement de la plante. Par exemple chez le maïs SS2a est exprimée dans l'albumen de la graine et SS2b dans les feuilles (Harn *et al.*, 1998). Chez le riz SS2-2 est exprimée plus précocement que

SS2-3. En général, une seule isoforme de chaque classe s'exprime à la fois (Ohdan *et al.*, 2005). Comme pour le mutant du pois, on observe, chez tous ces mutants *ss2-*, une forte diminution de la quantité d'amidon accumulé, ainsi qu'une modification de la répartition de la longueur des chaînes de l'amylopectine. En effet, on constate, chez plusieurs espèces, une diminution du nombre de chaînes comprises entre DP 12 et 30 et une augmentation des chaînes d'un DP inférieur à 12 (Craig *et al.*, 1998 ; Morell *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004). SS2 semble donc responsable de la synthèse des chaînes de taille intermédiaire. Les mutants *ss2-* présentent également une forte modification de la morphologie des grains (Figure 23) (Szydlowski *et al.*, 2011).

### SS3

De nombreux mutants dépourvus de SS3 ont été identifiés et analysés. D'abord chez la pomme de terre, puis le blé, le riz et le maïs (Abel *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1999 ; Gao *et al.*, 1998 ; Dian *et al.*, 2005). Chez le riz, il existe différentes isoformes de SS3 exprimées de manière spécifique dans certains organes et à certains stades de développement de la plante, comme c'est le cas pour d'autres amidon-synthases. Chez ces différentes plantes, comme chez *Chlamydomonas reinhardtii*, on observe une diminution de la synthèse d'amidon ainsi qu'une modification de la distribution des chaînes de l'amylopectine. Cette modification se traduit par un enrichissement en chaînes courtes (DP<10) et très longues (DP>40) et d'une diminution des glucanes de tailles intermédiaires (10 < DP < 40) (Fontaine *et al.*, 1993 ; Gao *et al.*, 1998). La morphologie des grains est également modifiée et, chez *C. reinhardtii*, on observe une modification du type de cristallinité des grains (ils passent du type A au type B). Il semble donc que ce soit majoritairement la synthèse d'amylopectine qui est affectée chez les mutants *ss3-*. La proportion d'amylose n'étant pas affectée, le ratio amylose / amylopectine est alors augmenté (Fontaine *et al.*, 1993 ; Szydlowski *et al.*, 2011).

Une autre fonction de SS3, proposée par Zhang et coll en 2005 serait de réguler la synthèse d'amidon transitoire dans les feuilles d'*A. thaliana*. Chez le mutant *ss3-* qu'ils étudient, l'activité mesurée des autres SS est supérieure à celle du sauvage. La quantité d'amidon des feuilles est plus élevée que chez le sauvage. Les auteurs émettent donc l'hypothèse d'une régulation négative de SS3 sur la synthèse d'amidon transitoire. Il est important de noter que des domaines de liaison à l'amidon ont été identifiés dans la partie N-terminale de SS3. Ces domaines sont importants pour la modulation de l'activité de SS3 (Zhang *et al.*, 2005 ; Valdez *et al.*, 2008 ; Wayllace *et al.*, 2010).

Dans le mutant *ss4-* d'*Arabidopsis thaliana*, il n'y a pas de modification de la structure de l'amidon produit. Ce phénotype suggère, comme nous l'avons vu précédemment, un rôle dans le processus d'initiation de la synthèse et le contrôle du nombre de grains par plaste.

## 2) Redondances fonctionnelles des amidon-synthases.

La conservation de plusieurs isoformes d'amidon-synthases au cours de l'évolution suggère que chacune d'entre elles possède une fonction propre non compensable par les autres isoformes. Cependant la présence d'autant d'isoformes laisse aussi suggérer une certaine redondance fonctionnelle. La combinaison de mutations chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* a permis de faire le point sur ces redondances fonctionnelles.

Chez le mutant *ss1-* d'*A. thaliana*, SS3 est capable de synthétiser en parti les chaînes courtes de DP8 à DP11 (Szydlowski *et al.*, 2011). De même, chez le mutant SS2 d'*A. thaliana*, SS3 est capable de synthétiser des chaînes de DP 12 à 28 (Zhang *et al.*, 2008). Enfin, SS3 semble capable de maintenir un certain niveau d'initiation de la synthèse d'amidon chez les mutants *ss4-*. En effet, comme nous l'avons vu la mutation *ss4-* induit une réduction importante du nombre d'événements d'initiation dans les plastes (un seul grain produit au lieu de 5 à 7 dans les plastes d'une lignée sauvage). L'analyse de mutants combinant des mutations pour les différentes amidon-synthases indique que la synthèse du grain résiduel est dépendante de la présence de SS3. Alors que la simple mutation *ss3-* n'a aucun effet sur le nombre de grains produits par plaste, le double mutant *ss3- ss4-* ne produit pratiquement plus d'amidon.

Ceci suggère que SS3 aurait un rôle dans l'initiation en absence de SS4 (Roldan *et al.*, 2007 ; Szydlowski *et al.*, 2011).

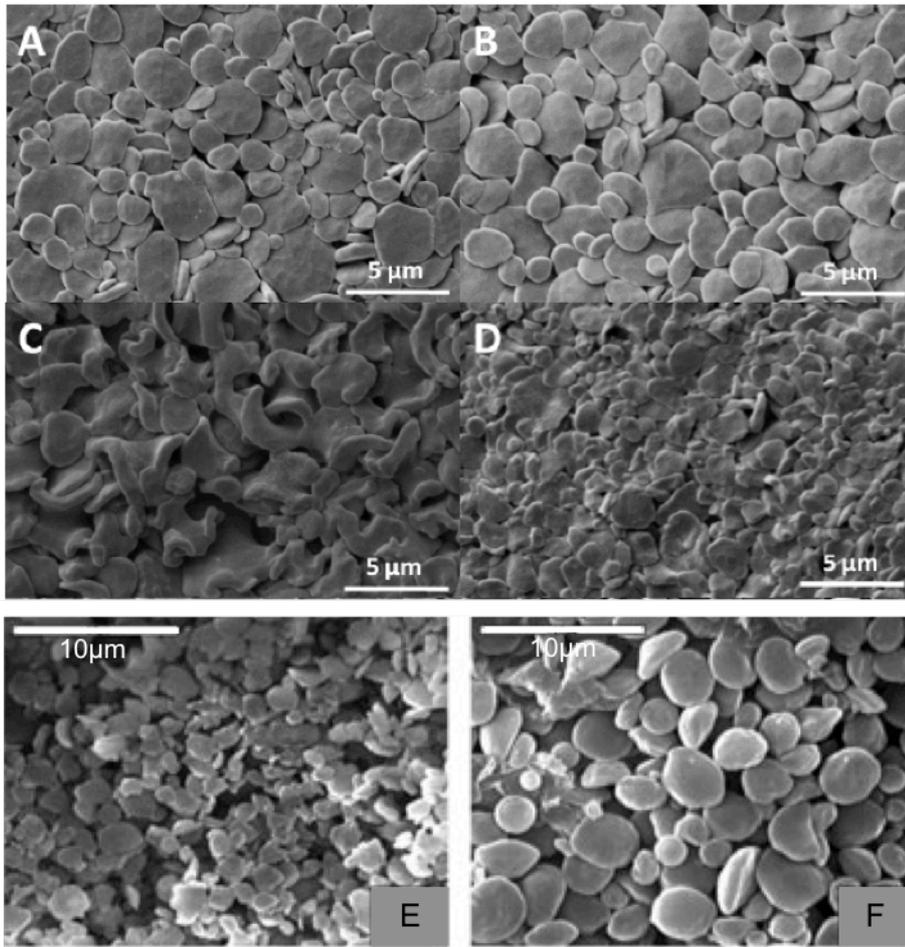


Figure 21 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage de grains d'amidon purifiés à partir de feuilles d'*A. thaliana* prélevées en fin de jour. A : la plante sauvage (écotype Wassilewskija ), B : Le mutant *ss1-*, C : le mutant *ss2-*, D le mutant *ss3-* (Szydłowski, 2011). En E et F les grains sont extrait à partir d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia) E : Sauvage ou F : Mutant *ss4-* (Roldan *et al.*, 2007).

## b- Les enzymes de branchement

Les enzymes de branchement (BE pour **B**ranching **E**nzyme) (EC 2.4.1.1.18) appartiennent à la famille GH13 (GH pour **G**lycoside **H**ydrolases) de la classification CAZy (Coutinho *et al.*, 2003). Elles sont responsables de la création des points de branchements principalement lors de la synthèse de l'amylopectine. Elles clivent une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un glucane et transfèrent la partie clivée sur une chaîne adjacente ou sur la même chaîne formant ainsi une liaison  $\alpha$ -1,6 (Borovsky *et al.*, 1976) (Figure 22).

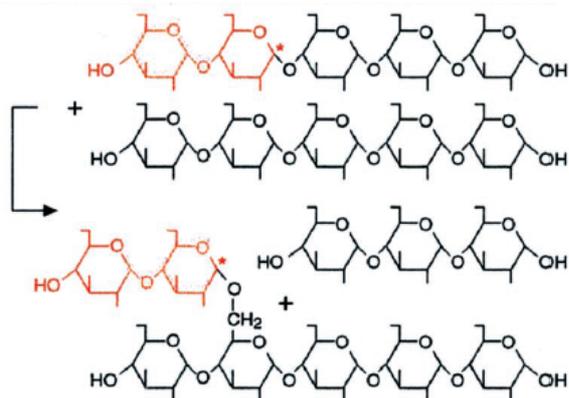


Figure 22 : Représentation schématique du mode de fonctionnement des enzymes de branchement (d'après Myers *et al.*, 2000). Les résidus de glucose transférés sont représentés en rouge.

Il existe deux familles d'enzymes de branchement :

- Les BE1 (ou **famille B**) qui transfèrent préférentiellement des chaînes longues (DP > 10) et possèdent une affinité plus forte pour l'amylose que pour l'amylopectine. Ces résultats ont tout d'abord été montrés par l'analyse de mutants du maïs (Blauth *et al.*, 2002) puis confirmés par des études effectuées chez le riz (Satoh *et al.*, 2003). Chez les différents végétaux étudiés, il n'a été trouvé qu'une seule BE1, à l'exception de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* qui n'en possède pas.

- Les BE2 (ou **famille A**) transfèrent des chaînes plus courtes (5 à 6 DP) et sont plus actives sur un substrat tel que l'amylopectine plutôt que sur l'amylose (Guan *and* Preiss, 1993 ; Guan *et al.*, 1994 ; Guan *et al.*, 1997).

Les protéines de ces deux familles se distinguent aussi par leurs séquences primaires. Les BE2 possèdent un domaine N-terminal spécifique absent chez les BE1 (Guan *et al.*, 1997 ; Burton *et al.*, 1995).

Chez les dicotylédones comme la pomme de terre ou encore le pois, il existe une seule BE2 alors que chez les monocotylédones, comme le maïs ou le riz, il y a deux isoformes BE2a et BE2b (Figure 23). Il semblerait que, comme pour certaines amidon-synthases, ces différentes isoformes soient exprimées de manière organe spécifique. Par exemple BE2b est exprimée dans l'albumen alors que BE2a, comme BE1, est exprimée dans les feuilles et l'albumen (Gao *et al.*, 1996 et 1997 ; Sun *et al.*, 1998). Nakamura propose une action successive des deux classes de BE chez le riz. Les produits de BE2 serviraient alors de substrats pour l'activité BE1 (Nakamura *et al.*, 2002).

Organisme	Famille B	Famille A	
	Mono et dicotylédones	Monocotylédones	Dicotylédones
<i>Zea mays</i> (Maïs)	SBE1	SBE2a	SBE2b
<i>Triticum aestivum</i> (Blé)	SBE1	SBE2a	SBE2b
<i>Hordeum vulgare</i> (Orge)	SBE1	SBE2a	SBE2b
<i>Oryza sativa</i> (Riz)	SBE1 (RBE1)	SBE2a (RBE4 ou QE2a)	SBE2b (RBE3 ou QE2b)
<i>Pisum sativum</i> (Pois)	SBEA		SBEB (SBE1)
<i>Solanum tuberosum</i> (Pomme de Terre)	SBE1 (SBEA)		SBE2 (SBEB)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	aucune		SBE2.1   SBE2.2

Figure 23 : Dénominations des différentes enzymes de branchement chez les principales espèces étudiées. Les familles A et B sont séparées, on distingue également les monocotylédones des dicotylédones pour la dénomination des SBE2.

La plante *A. thaliana* fait figure d'exception car, non seulement elle ne possède pas de BE1, mais en plus, elle est la seule dicotylédone étudiée possédant deux BE2 (Dumez *et al.*, 2006). Chez cette plante, l'absence de l'une ou l'autre des BE2 n'a qu'un impact limité sur le phénotype d'accumulation d'amidon. En revanche, l'absence des deux enzymes de branchement conduit à l'arrêt total de la synthèse d'amidon dans la plante et à l'accumulation de maltose essentiellement cytosolique provenant de la dégradation de glucanes linéaires (puisque'ils ne peuvent pas être branchés) par des amylases produisant le maltose exporté vers le cytosol (Dumez *et al.*, 2006).

### c- Maturation de la structure de l'amylopectine

Les enzymes de débranchement, comme leur nom l'indique, sont capables de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,6 ou « points de branchement » (Figure 24). Elles font partie de la famille GH13 de la classification CAZy et se classent en deux sous-groupes : Les pullulanases (EC 3.2.1.41) et les isoamylases (EC 3.2.1.68)

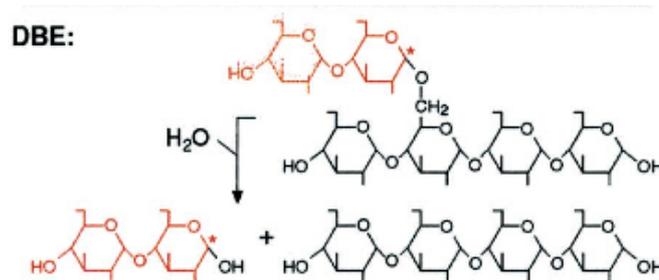


Figure 24 : Représentation de l'activité de débranchement. La liaison  $\alpha$ -1,6 est clivée par les enzymes de débranchement (d'après Myers *et al.*, 2000).

## 1) Les pullulanases

Les pullulanases clivent les liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amylopectine et du pullulan, un polymère d'origine bactérienne formé d'une succession de groupements maltotriosyles branchés. Par contre, ces enzymes sont pratiquement inactives sur le glycogène. Il n'en existe généralement qu'une seule chez les végétaux.

Chez les mutants d'*A. thaliana* et du maïs déficients en pullulanase aucune modification significative de la quantité ou de la structure de l'amidon n'a été observée (Wattebled *et al.*, 2005 ; Dinges *et al.*, 2003). Il semble donc qu'à elle seule, cette activité soit peu déterminante dans le métabolisme de l'amidon et son implication précise dans ce métabolisme ou dans d'autres processus cellulaires reste à déterminer. En revanche la combinaison de la déficience de la pullulanase avec celles pour d'autres enzymes de débranchement végétales (les isoamylases) conduit à une amplification des phénotypes observés qu'il s'agisse d'un phénotype lié à la synthèse ou à la dégradation de l'amidon (Wattebled *et al.*, 2005 ; Delatte *et al.*, 2006 ; Wattebled *et al.*, 2008). Cela suggère une probable redondance fonctionnelle.

## 2) Les isoamylases

Les isoamylases sont les acteurs principaux de la maturation de la structure de l'amylopectine.

### . Historique

C'est en 1951 que Kobayashi et ses collaborateurs utilisent pour la première fois le terme d'isoamylase pour décrire une enzyme extraite de la levure de boulangerie qui clive spécifiquement les liaisons  $\alpha$ -1,6 du glycogène et de l'amidon. En 1969, Manners et Rowe mentionnent la présence d'une isoamylase chez le maïs (Manners *and* Rowe, 1969).

Il existe un maïs doux (*sugary*) dont les grains contiennent plus de saccharose et moins d'amylopectine que le maïs sauvage. Il est cultivé en France depuis 1973 et est exclusivement dédié à la consommation humaine. James et ses collaborateurs montrent que la mutation *sugary-1* du maïs doux affecte le gène de structure d'une isoamylase (James *et al.*, 1995). Les orthologues de ce gène ont ensuite été identifiés chez le riz (Fujita *et al.*, 1999), l'orge (Sun *et al.*, 1999) et le blé (Genschel *et al.*, 2002).

### . Caractéristiques des isoamylases

Selon la classification d'Henrissat (1991), les isoamylases appartiennent à la famille des  $\alpha$ -amylases composée de glycoside-hydrolases et transférases. Toutes les  $\alpha$ -amylases présentent des similarités structurales et mécanistiques. En effet, les acides aminés catalytiques sont nécessairement un acide glutamique et deux acides aspartiques. Dans cette famille, on retrouve les  $\alpha$ -amylases, les isoamylases, les pullulanases et les enzymes de branchement (MacGregor *et al.*, 2001). Comme les pullulanases, les isoamylases coupent les liaisons  $\alpha$ -1,6, mais elles ne sont actives que sur l'amylopectine et le glycogène et sont inactives sur le pullulan. Il en existe trois formes génétiquement indépendantes chez les végétaux dénommées ISA1, ISA2 et ISA3. Nous allons détailler les fonctions des ISA1 et ISA2. Des travaux montrent que la fonction d'ISA3 est très partiellement redondante de celles des autres isoamylases dans le processus de synthèse de l'amylopectine (Wattebled *et al.*, 2008). Cependant, ISA3 est principalement impliquée dans la dégradation de l'amidon.

### . ISA1 et ISA2, des enzymes essentielles à la synthèse de l'amidon

Les isoamylases sont des acteurs majeurs de la synthèse de l'amidon chez les végétaux. Elles sont directement impliquées dans le processus de formation de la structure de l'amylopectine (Figure 25). L'activité portée par ISA1 et ISA2 consiste à éliminer les

points de branchement surnuméraires lors de la synthèse de l'amylopectine. Cette étape permet d'avoir une localisation délimitée des points de branchement permettant ainsi la mise en place d'une structure « en grappe » de l'amylopectine (Ball *et al.*, 1996).

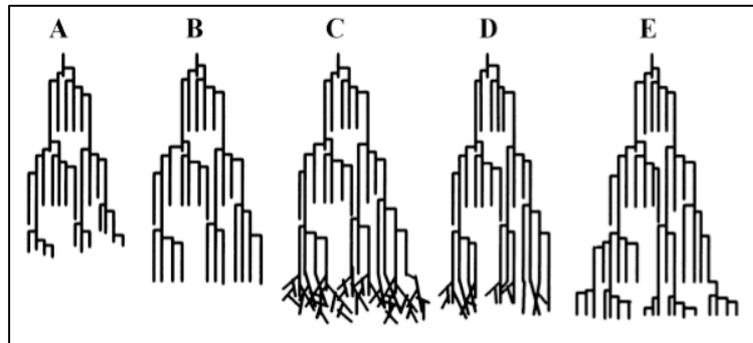
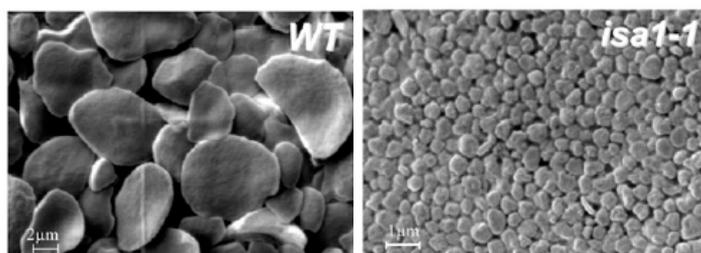


Figure 25 : Modèle de la synthèse discontinue de l'amylopectine proposée par Ball et coll. en 1996. La synthèse de ce polymère passe par l'élongation des chaînes de glucanes (A et B). Lorsque les glucanes ont atteint une longueur idéale pour le fonctionnement des enzymes de branchement (B) celles-ci interviennent et permettent la formation de nombreuses liaisons  $\alpha$ -1,6, (C). Les enzymes de débranchement interviennent alors pour cliver certaines de ces liaisons  $\alpha$ -1,6 et les organiser au niveau des lamelles amorphes (D). Un nouveau cycle de synthèse peut alors avoir lieu, E.

Chez le mutant *isa1-* de *C. reinhardtii*, il y a absence totale d'amidon (Mouille *et al.*, 1996). Ce phénotype s'accompagne d'une altération de la structure de l'amylopectine. A l'inverse, chez la pomme de terre, la réduction de la quantité d'amidon dans le tubercule chez le mutant *isa1-* est relativement limitée (Bustos *et al.*, 2004). L'analyse de la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine chez les mutants *isa1-* révèle un enrichissement en chaînes courtes (DP 5 à 9 chez *Arabidopsis* ; DP 5 à 11 chez le maïs et le riz et DP 10 à 13 chez le blé) (Wattebled *et al.*, 2005 ; Dinges *et al.*, 2001 ; Wong *et al.*, 2003 ; Burton *et al.*, 2002). Un autre phénotype associé à la mutation *isa1-* concerne l'accumulation massive d'un  $\alpha$ -glucane hydrosoluble dont la structure s'apparente à celle du glycogène (et par conséquent dénommé « phytoglycogène »). Chez *Arabidopsis thaliana*, par exemple, la mutation *isa1-* entraîne une réduction drastique de la quantité d'amidon accumulé dans les feuilles en fin de jour (80% de moins que le sauvage) ainsi que l'accumulation d'une quantité équivalente de phytoglycogène (Wattebled *et al.*, 2005).

En plus de la réduction de la quantité d'amidon accumulée et de la production de phytoglycogène, les grains d'amidon résiduel de ces mutants présentent une taille fortement réduite par rapport au sauvage, indiquant une réelle difficulté à maintenir un processus correct de synthèse (Figure 26)

Figure 26 : Photographies obtenues par microscopie électronique à balayage de grains d'amidon purifiés d'*A.*



*thaliana*. A gauche l'amidon du sauvage avec une barre d'échelle de 2 µm, à droite l'amidon du mutant *isa1-1* avec une barre d'échelle de 1 µm. Les amidons ont été extraits de feuilles récoltées en fin de jour et purifiés.

ISA1 et ISA2 fonctionnent en complexes hétéromultimériques. ISA1 est la seule sous-unité catalytiquement active du complexe. En effet, cette protéine présente les acides aminés impliqués dans la catalyse alors que ISA2 ne possède pas ces résidus (Figure 27).

		Région 1	Région 2	Région 3	Région 4	Région 5
<i>A. thaliana</i>	ISA1	DVVLNH	GFRFDLASI	EAWD	FICAHD	VNFWGYS
	ISA2	EVVFTH	GFCFINASS	DCWD	YISRNS	****PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EAWD	FVIAHD	VNTWGYS
<i>Zea mays</i>	ISA1	DVVFNH	GFRFDLASI	EAWD	FVCAHD	MNFWGYS
	ISA2	EVVFTH	GFCFINAPF	DPWS	YVSRNS	****PYF
	ISA3	DVVYNH	GFRFDLASV	EPWD	FVIAHD	VNTWGYS

Figure 27 : Comparaison des régions conservées chez les isoamylases d'*A. thaliana* et du maïs. Les acides aminés catalytiques sont représentés en rouge.

Le fait que seule ISA1 soit active explique que la perte de cette enzyme entraîne des phénotypes marqués. Dans certains cas, comme chez *Arabidopsis*, l'absence d'ISA2 entraîne le même phénotype que l'absence d'ISA1. Chez cette plante, ISA1 et ISA2 semblent donc fonctionner sous la forme d'un hétérodimère uniquement (Wattebled *et al.*, 2005 ; Delatte *et al.*, 2005 ; Zeeman *et al.*, 1998). Ce n'est pas le cas pour toutes les espèces. En effet, chez les céréales, comme le maïs ou le riz, les mutants *isa2-* semblent tout à fait capables de maintenir un niveau d'activité isoamylase suffisant pour permettre la synthèse d'un amidon de structure comparable à une lignée sauvage sans accumuler de phytoglycogène (Utsumi *and* Nakamura, 2006 ; Kubo *et al.*, 2010). Dans ce cas, ISA1 est capable d'agir sous la forme d'homomultimères fonctionnels. Il a été montré, chez le riz, la présence d'hétéromultimères fonctionnels composés de cinq sous-unités ISA1 et d'une seule sous-unité ISA2 mais également d'homomultimères composés de cinq monomères d'ISA1 (Utsumi *and* Nakamura, 2006). Il est à noter que ces deux formes sont présentes naturellement dans l'albumen de riz.

De même chez le maïs, ISA1 garde une activité de débranchement en absence d'ISA2. Les études de l'activité isoamylase de l'albumen de maïs ont permis de mettre en évidence trois bandes d'activité sur zymogramme. Deux de ces bandes correspondent à des hétéromultimères et la troisième à un homomultimère uniquement composé d'ISA1 (Kubo *et al.*, 2010).

La majeure partie de mon travail de thèse porte sur l'étude de ces complexes isoamylases homo ou hétéro-multimériques actifs lors de la synthèse d'amidon.

## 6- Dégradation de l'amidon :

Chez la plupart des plantes étudiées, on considère qu'il existe deux voies principales de dégradation de l'amidon: une voie hydrolytique et une voie phosphorolytique. La dégradation de l'amidon a pour but de fournir une grande quantité de carbone et d'énergie que ce soit au niveau de la graine lors de la germination ou pour alimenter l'organisme durant la nuit alors que la photosynthèse n'est pas fonctionnelle. La dégradation est initiée par la phosphorylation des certains résidus de glucose de l'amidon. Il est important de noter que l'amylopectine est phosphorylée continuellement, de jour comme de nuit (Nielsen *et al.*, 1994), néanmoins le taux de phosphate est plus conséquent la nuit (Ritte *et al.*, 2004).

### a. La phosphorylation de l'amidon

La **Glucan Water Dikinase** (GWD) est la première enzyme responsable de la phosphorylation de certains résidus de glucose de l'amidon. Elle a été mise en évidence chez la pomme de terre (Lorberth *et al.*, 1998) et chez *Arabidopsis thaliana* (Yu *et al.*, 2001). Dans les deux cas, les mutants dépourvus de cette activité kinase sont des suraccumulateurs d'amidon. Cette enzyme transfère un groupement phosphate de l'ATP sur le carbone C6 d'un résidu glucose de l'amylopectine (Ritte *et al.*, 2006). Elle subit une régulation redox, la forme oxydée étant inactive (Mikkelsen *et al.*, 2005). La GWD est liée à l'amidon dans la feuille de pomme de terre spécifiquement la nuit. Sa localisation, variable la journée, pourra ainsi influencer sur son activité (Ritte *et al.*, 2000). Il a été montré très récemment que le phosphate en position  $\gamma$  de l'ATP permet l'autophosphorylation de GWD sur un résidu inconnu puis c'est le phosphate  $\beta$  qui est transféré sur un résidu d'histidine très conservé. C'est ce groupement phosphate  $\beta$  qui sera transféré sur un  $\alpha$ -glucane (Hejazi *et al.*, 2012).

Une seconde enzyme, la **Phosphoglucan Water Dikinase** (PWD), capable elle aussi de phosphoryler les résidus de glucose de l'amidon a ensuite été identifiée. Elle ajoute un groupement phosphate en position C3 d'un résidu de glucose (Baunsgaard *et al.*, 2005 ; Kötting *et al.*, 2005). Néanmoins son action est dépendante de l'activité GWD, puisqu'en absence de GWD, l'amidon n'est pas phosphorylé (Baunsgaard *et al.*, 2005). PWD ne phosphoryle l'amylopectine que si GWD a préalablement phosphorylé le polysaccharide.

L'introduction des groupements phosphate sur les glucanes composant l'amylopectine induit la déstructuration des doubles hélices de glucanes permettant alors aux

enzymes de dégradation d'avoir une meilleure accessibilité aux extrémités des chaînes (Hejazi *et al.*, 2008).

b. Les enzymes de la dégradation

Les premiers acteurs de la dégradation de l'amidon sont les  **$\beta$  amylases**, des  $\alpha$ -1,4 glucan-malto-hydrolases (EC 3.2.1.2). Elles hydrolysent les glucanes depuis leurs extrémités non-réductrices et libèrent du  $\beta$  maltose. Il existe 9 gènes codant des  $\beta$  amylases dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Elles sont notées de BAM 1 à BAM 9 mais seules les quatre premières sont adressées aux chloroplastes (Fulton *et al.* 2008). Le mutant *bam1-* d'*A. thaliana* suraccumule de l'amidon et produit moins de maltose que le sauvage la nuit. Le mutant *bam3-* présente ce même phénotype mais de manière plus marquée et la combinaison des deux mutations induit un phénotype exacerbé par comparaison aux simples mutants. BAM 1 et BAM 3 semblent donc jouer un rôle particulièrement important dans la dégradation de l'amidon et la libération de maltose durant la nuit. Des analyses complémentaires sur des BAM 1 et BAM 3 recombinantes exprimées dans *E. coli* confirment leurs fortes activités amylasiques. En revanche, le rôle de BAM 2 reste à déterminer. Bien qu'elle soit présente dans le chloroplaste, son activité reste relativement faible (Fulton *et al.*, 2008). BAM 4 ne possède pas les acides aminés catalytiques nécessaires à l'activité enzymatique et ne semble donc pas posséder d'activité de dégradation. La protéine recombinante ne semble d'ailleurs pas posséder d'activité. Cependant, une lignée mutante d'*Arabidopsis* dépourvue de cette enzyme suraccumule de l'amidon. Une hypothèse serait qu'elle interviendrait plutôt comme un régulateur de la dégradation de l'amidon suivant un mécanisme qu'il reste à déterminer (Fulton *et al.*, 2008).

Les points de branchement de l'amylopectine ne peuvent pas être clivés par les  $\beta$  amylases, la dégradation va donc nécessiter l'activité d'enzymes de débranchement. L'implication de l'isoforme ISA3 dans le processus de dégradation de l'amidon a été montrée chez *A. thaliana* (Wattebled *et al.*, 2005 ; Delatte *et al.*, 2006). L'absence de cette enzyme suite à une mutation dans son gène de structure conduit à une suraccumulation d'amidon en fin de jour mais surtout en fin de nuit (alors que le contenu en amidon est proche de zéro en fin de nuit dans les lignées sauvages). Par ailleurs, la structure de l'amidon et en particulier celle de l'amylopectine n'est pas modifiée dans ce mutant. On y observe qu'une légère augmentation du nombre de très courts glucanes ( $3 \leq DP \leq 5$ ) qui représentent les substrats préférentiels de cette enzyme lors de la dégradation de l'amidon. Dans le contexte sauvage, les glucanes plus longs sont rognés par les amylases qui hydrolysent uniquement les

liaisons  $\alpha$ -1,4 puis sont ensuite débranchés par ISA3 afin de compléter le processus de dégradation.

La dégradation de l'amidon entraîne une accumulation de maltose et d'autres courts glucanes, dans les chloroplastes. Il est important de noter que les  $\beta$  amylases sont incapables d'agir sur des glucanes de moins de 4 résidus de glucose. Les glucanes très courts (DP<4) qui ne peuvent plus être dégradés par les  $\beta$  amylases sont pris en charge par l'enzyme disproportionnante (ou enzyme D) qui transfère deux ou trois résidus de glucose d'un maltotriose sur une chaîne de glucane plus longue. Cette chaîne de glucane sera ensuite dégradée par les  $\beta$  amylases. Cette réaction libère du glucose qui sera exporté vers le cytoplasme cellulaire (Critchley *et al.*, 2001).

SEX4 (pour *Starch Excess 4*) a été identifiée comme étant une phosphoglucan-phosphatase. Elle élimine des groupements phosphates à la surface des grains d'amidon et a un rôle dans la régulation de la dégradation de l'amidon. Le mutant *sex4-* d'*A. thaliana* est un suraccumulateur d'amidon et de phosphoglucanes au cours de la dégradation (Niittylä *et al.*, 2006). Cette enzyme appartient à la famille des Laforines, des phosphoprotéines phosphatases impliquées, entre autre, dans la régulation du catabolisme du glycogène (Liu *et al.*, 2008). Son rôle serait donc de travailler en collaboration avec les kinases et les hydrolases afin de réguler la dégradation de l'amidon (Kötting *et al.*, 2009). Il existe deux autres enzymes récemment identifiées par homologie de séquence avec SEX4 : LSF1 et LSF2 (pour *Like Sex Four*). Les premières études montrent un phénotype de suraccumulation de l'amidon chez les mutants d'*A. thaliana*. Et elles semblent fonctionner de la même manière que SEX4 (Comparot-Moss *et al.*, 2010 ; Santelia *et al.*, 2011).

### c. Les voies secondaires de dégradation de l'amidon

Il existe des voies alternatives de dégradation comme cela a pu être mis en évidence chez le riz, où une  $\alpha$  **amylase** semble impliquée dans ce processus. En effet, le mutant surexprimant le gène AMY1 du riz accumule moins d'amidon que le sauvage et à l'inverse, la suppression de cette enzyme entraîne une suraccumulation d'amidon (Asatsuma *et al.*, 2005). Les  $\alpha$  amylases jouent un rôle particulièrement important dans la dégradation de l'amidon de réserve lors de la germination chez les céréales (Zeeman *et al.*, 2010).

Chez *Arabidopsis*, on retrouve trois gènes codant des  $\alpha$  amylases mais seule une, appelée AMY3, est adressée aux plastes. L'absence d'expression de AMY3, comme l'absence d'expression des trois  $\alpha$  amylases n'engendre pas de phénotype particulier (Yu *et*

*al.*, 2005). Cela suggère que l'activité des  $\alpha$  amylases, chez *Arabidopsis*, n'est pas nécessaire au catabolisme de l'amidon.

Il existe une troisième voie de dégradation possible faisant intervenir des  $\alpha$  glucanes-phosphorylases (EC 2.4.1.1). Leur rôle dans le catabolisme de l'amidon fait encore débat au sein de la communauté scientifique. Cette enzyme catalyse la phosphorylation des  $\alpha$ -1,4 glucanes en présence de phosphate inorganique la réaction étant réversible. Une lignée d'*A. thaliana* dépourvue de l'isoforme cytosolique PHS1 ne présente pas de phénotype particulier concernant la quantité ou la structure de l'amidon ce qui suggère que cette enzyme n'est pas impliquée dans le métabolisme du polysaccharide de réserve (Zeeman *et al.*, 2004). Cependant, des résultats préliminaires menés dans notre laboratoire sur le double mutant *ss4- phs1-* d'*Arabidopsis* montrent que celui-ci accumule trois fois plus d'amidon et produit des grains plus volumineux que dans plante sauvage. De plus, la cinétique de dégradation du polysaccharide montre clairement une baisse de la vitesse de dégradation ce qui suggère une défaillance du catabolisme du polysaccharide (Devin, 2010).

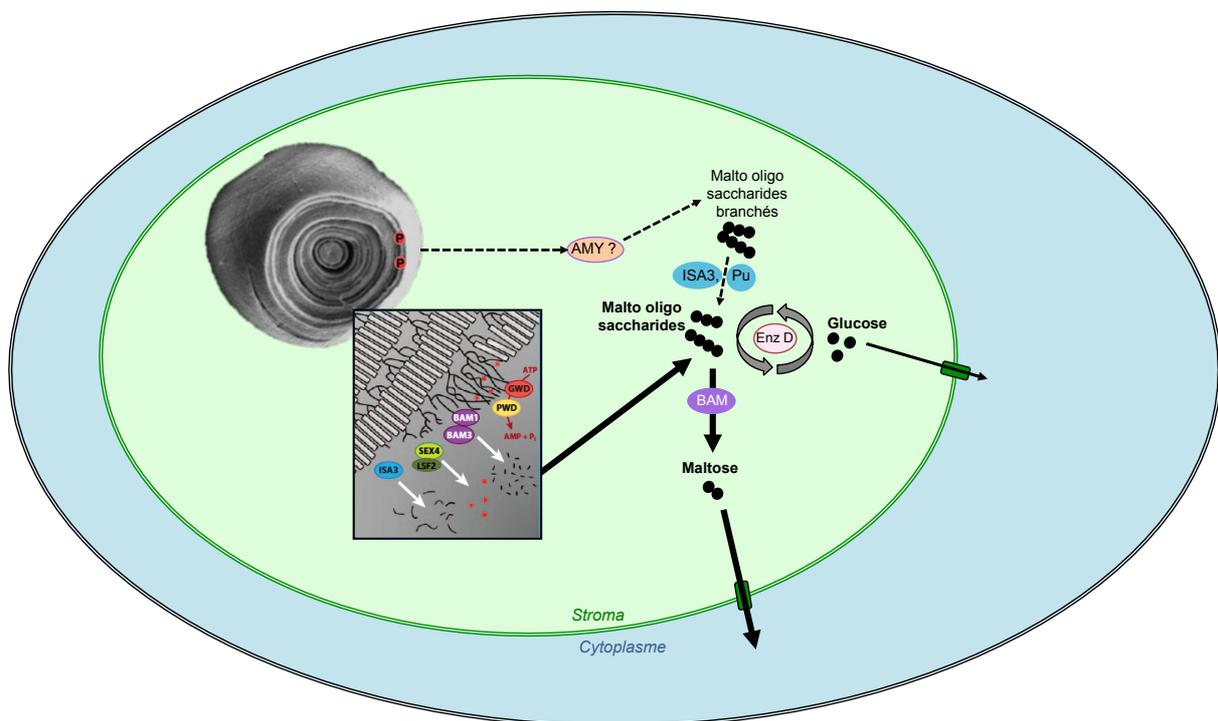


Figure 28 : Schéma de la dégradation de l'amidon dans les chloroplastes (adapté de Zeeman *et al.*, 2010). La voie majoritaire est représentée en encadré. Les *Glucan Water Dikinases* (GWD) et *Phosphoglucan Water Dikinases* (PWD) phosphorylent les chaînes d'amylopectine (bâtonnets gris) afin de les déstructurer (les phosphates sont représentés par des points rouges). Les enzymes de régulation SEX4 et LSF2 interviennent pour déphosphoryler les glucanes. Les  $\beta$  amylases (BAM) hydrolysent les glucanes à partir de leurs extrémités non-réductrices. ISA3

hydrolyse les liaisons  $\alpha$ -1,6. La voie de dégradation minoritaire et hypothétique faisant intervenir des  $\alpha$  amylases est représentée en pointillé hors du cadre. Un cercle noir représente une unité glucose. L'enzyme disproportionnante (Enz D) et les  $\beta$  amylases convertissent les malto oligosaccharides accumulés en maltose et glucose qui seront exportés vers le cytoplasme.

#### d. Devenir des produits de la dégradation d'amidon

Le glucose et le maltose issus de la dégradation de l'amidon sont exportés vers le cytoplasme à l'aide de transporteurs membranaires spécifiques : MEX1 (*maltose excess 1*) pour le maltose et pGlcT (*plastidic glucose translocator*) pour le glucose.

Chez Arabidopsis le mutant *mex1-*, présente un phénotype de suraccumulation plastidiale de maltose (Niittyala *et al.*, 2004). Le mutant *pglct-*, dépourvu du transporteur de glucose, présente un phénotype moins fort cependant le cumul des deux mutations entraîne un phénotype nettement plus sévère que celui de la simple mutation *mex-* ce qui suggère l'importance du transporteur de glucose (Cho *et al.*, 2011).

L'enzyme disproportionnante cytosolique, appelée DPE2 chez Arabidopsis, permet ensuite le clivage du maltose et le transfert d'un glucose qui en découle sur un hétéroglycane soluble. Chez Arabidopsis, l'analyse du mutant *dpe2-* permet d'observer une modification de la composition des hétéroglycans solubles. Ceux-ci comportent nettement moins de résidus glucose que chez la plante sauvage ce qui suggère qu'il s'agit du principal accepteur de glucose venant de DPE2 (Fettke *et al.*, 2006). Le glucose cytosolique peut également être phosphorylé puis entrer dans un processus de synthèse de saccharose qui sera ensuite exporté vers d'autres cellules.

## C- *Arabidopsis thaliana*

### 1- Historique

*Arabidopsis thaliana*, a été identifiée au 16<sup>ème</sup> siècle par Johannes Thal (d'où le nom *thaliana*), un physicien botaniste allemand, dans les montagnes de Harz. Aussi appelée « L'arabette des dames », elle fut citée pour la première fois en 1873 dans les travaux de Alexander Braun, un botaniste Allemand qui venait d'identifier dans un champ à proximité de Berlin, un mutant de la floraison. Ce fût le premier mutant d'*Arabidopsis thaliana* publié (Braun, 1873).

C'est au cours d'un séminaire, en 1943, que Frederich Laibach proposa *Arabidopsis thaliana* comme plante modèle en génétique. Ses travaux ont permis la création de la toute première collection d'individus d'*Arabidopsis* mutés par les rayons X. La première conférence internationale sur ce modèle d'étude a eu lieu en 1965 en l'honneur du 80<sup>ème</sup> anniversaire de F. Laibach, à Göttingen en Allemagne (Koornneef *and* Meinke, 2010). Depuis, *A. thaliana* est l'un des modèles d'étude les plus utilisés en biologie.

*A. thaliana* est une dicotylédone de la famille des *Brassicaceae* (comme le chou, le navet ou la moutarde). Elle forme une rosette de feuilles au raz du sol en trois semaines environ, puis développe une hampe florale pouvant atteindre 30 à 40 cm de haut qui supportera les feuilles caulines, les fleurs puis les siliques (Figure 29).



Figure 29: *Arabidopsis thaliana*, espèce modèle. Photo prise 40 jours après germination

## 2- Caractéristiques qui font de cette plante un modèle d'étude

*Arabidopsis thaliana* possède un cycle de vie qualifié de court puisqu'il faut en général moins de deux mois pour qu'une graine semée produise une plante mature. C'est par ailleurs une plante autogame qui conduit chaque individu à produire plusieurs milliers de graines à chaque génération. Peu exigeante en surface et en conditions environnementales, sa culture est aisée en serre ou dans des enceintes de culture contrôlée (phytotron). Son petit génome nucléaire (environ 125 millions de paires de bases) a été entièrement séquencé et annoté (depuis 2001) ce qui permet l'utilisation de la génétique inverse. Par ailleurs, *A. thaliana* accumule, dans ses feuilles, des grains d'amidon tout à fait comparables à ceux produits par des plantes d'intérêt agronomique. L'absence d'intérêts économiques basés sur la culture de cette plante est un atout majeur pour la transmission des connaissances scientifiques et les échanges entre laboratoires. La conservation des processus métaboliques conduisant à la production ou la dégradation de l'amidon permet néanmoins la transposition des résultats obtenus chez *A. thaliana* à d'autres espèces à fort impact industriel.

Une autre raison qui fait de cette plante un véritable modèle d'étude est sa sensibilité à *Agrobacterium tumefaciens*. En effet, cette bactérie phytopathogène tellurique, responsable de la galle du collet chez les dicotylédones est intéressante en raison de sa capacité à transférer une portion d'ADN (l'ADN-T) de son plasmide naturel Ti vers le génome végétal. Cette faculté permet à la bactérie d'utiliser la plante comme producteur de ses propres nutriments, elle détourne ainsi les voies métaboliques végétales dans le but de produire des opines : condensation d'un sucre et d'un acide aminé. Les connaissances dans le domaine du génie génétique et l'universalité du code génétique permettent aujourd'hui de modifier l'ADN transféré par la bactérie et d'y inclure un ou plusieurs gènes d'intérêts. On parle alors de transformation par agroinfection. L'ADN-T va s'insérer dans le génome de la plante de manière aléatoire en une ou plusieurs copies. L'insertion permettra soit d'interrompre un gène et de créer une mutation, soit d'insérer une séquence codante de manière à produire une protéine d'intérêt *in planta*. Cette première stratégie a été utilisée pour créer des milliers de lignées mutantes, obtenues par l'insertion aléatoire d'ADN-T. Le lieu de l'insertion peut ensuite être identifié par séquençage des régions flanquant l'insert (zones à proximité de l'ADN-T, identifiables et localisables puisque la séquence complète du génome d'*A. thaliana* est disponible). Plus de 400 000 mutants d'insertion sont actuellement disponibles auprès des différents centres de stockage.

## *Objectifs de la thèse*

## I. Etude comparative des isoamylases d'*Arabidopsis thaliana* et de *Zea mays*

En introduction, nous avons évoqué l'importance de l'activité isoamylase lors de la synthèse d'amidon et en particulier lors de la maturation de la structure de l'amylopectine. Le premier objectif de ma thèse concerne l'étude du mode de fonctionnement de l'isoamylase 1 (ISA1) d'une plante monocotylédone (le maïs) et d'une plante dicotylédone (*Arabidopsis thaliana*). Il est intéressant de remarquer que les ISA1 de maïs et d'*Arabidopsis* semblent fonctionner de manière différente, la première étant capable de former des homomultimères fonctionnels alors que la seconde ne fonctionne que sous forme d'hétéromultimères, en association avec l'isoamylase 2 (ISA2) (Figure 30)

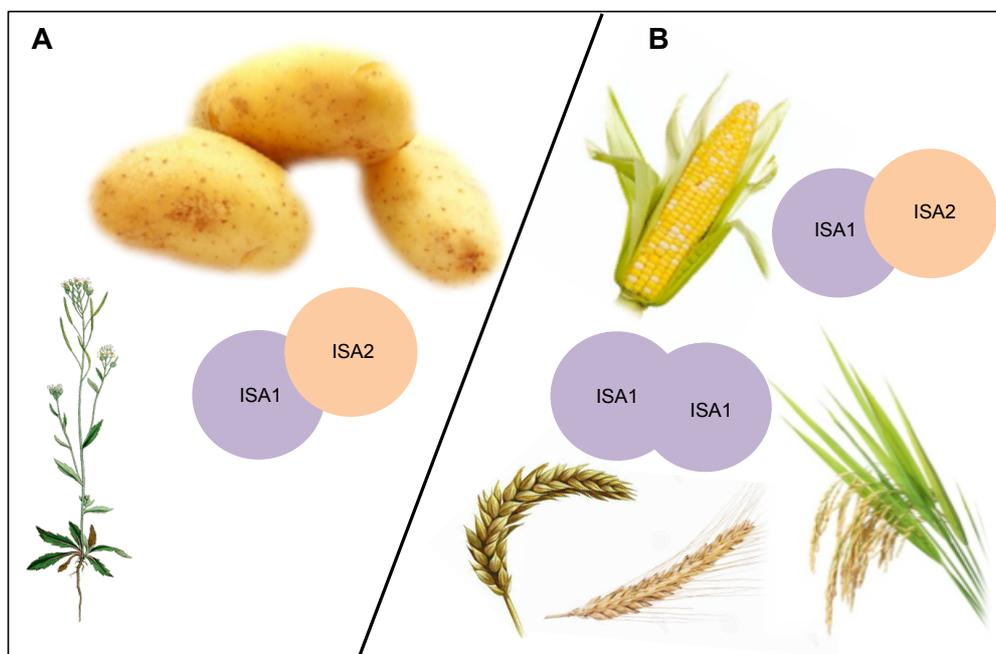


Figure 30 : Représentation schématique des complexes protéiques nécessaires à l'activité isoamylase lors de la synthèse d'amidon : **A** dans les feuilles ou les tubercules de plantes dicotylédones (avec l'exemple d'*Arabidopsis thaliana* ou de la pomme de terre) **B** Dans l'albumen de monocotylédones (comme chez le riz, le maïs, le blé ou l'orge).

Nous avons ainsi tenté de déterminer si cette différence de fonctionnement des ISA1 est dépendante de l'organe dans lequel elles sont exprimées (albumen de maïs ou feuilles d'*Arabidopsis*) ou s'il s'agit d'une acquisition évolutive. Pour apporter des éléments de réponse à ces interrogations, j'ai mené une étude comparative des ISA1 de maïs et d'*Arabidopsis* en étudiant d'abord les caractéristiques fonctionnelles *in vitro* de ces enzymes puis en exprimant ISA1 de maïs chez *Arabidopsis thaliana*. J'ai également participé à une étude du fonctionnement des isoamylases dans la feuille de maïs.

Ces travaux, présentés dans la première partie des résultats de ce manuscrit, ont donné lieu à deux publications dans les journaux d'audience internationale *Plant Physiology* (1<sup>er</sup> auteur) et *New Phytologist* (2<sup>e</sup> auteur).

## II. Etude de SS4: une enzyme impliquée dans l'initiation de la synthèse d'amidon

L'importance de SS4 lors de l'initiation de la synthèse d'amidon a été mise en évidence au travers de l'analyse de mutant *ss4-* d'*Arabidopsis thaliana* qui accumulent un unique gros grain d'amidon par chloroplaste au lieu des 5 à 7 grains produits dans une plante sauvage (Roldán *et al.*, 2007). Ce phénotype peut s'expliquer par une réduction du nombre d'événements d'initiation ce qui entraîne une relocalisation du flux de carbone vers un seul grain en formation par plaste expliquant ainsi l'augmentation de son volume.

Par ailleurs, nos propres résultats et d'autres travaux suggèrent l'existence d'un dialogue entre la division du plaste et le métabolisme de l'amidon :

1) Chez *Ostreococcus tauri*, une microalgue verte unicellulaire, l'unique grain d'amidon (qui occupe un volume important du plaste) se scinde en deux en suivant l'axe de division du plaste (Ral *et al.*, 2004). Cette association spatio-temporelle suggère une co-régulation entre synthèse d'amidon et division du plaste.

2) Des mutants du riz déficients pour les protéines de la machinerie de division du plaste, comme FtsZ ou ARC5, présentent une altération de la structure de l'amidon (Yun & Kawagoe, 2009 ; Yun & Kawagoe, 2010). De même, une augmentation significative de la taille des grains a été observée lorsque la protéine FtsZ1 est surexprimée dans la pomme de terre (de Pater *et al.*, 2006).

3) Chez *Arabidopsis*, les gènes codant les protéines homologues aux FtsZ bactériennes (FtsZ1, FtsZ2-1 et FtsZ2-2) sont indispensables à la division du plaste (Osteryoung *et al.*, 1998). Or des études préliminaires menées dans notre équipe montrent que les lignées d'*A. thaliana* surexprimant FtsZ1 produisent des grains d'amidon de taille plus grande que chez le sauvage. Au contraire, les mutants FtsZ1 KO, qui n'expriment pas cette protéine, accumulent des grains plus petits. Ces observations impliquent l'existence d'une relation entre la morphologie du grain et la division du plaste.

4) Enfin, de récents travaux révèlent que la combinaison de la mutation *ss4* à des mutations de type *ARC-* (affectant le volume du plaste) conduit à une augmentation du nombre de grains d'amidon par plaste par comparaison au simple mutant *ss4-* (Crumpton-Taylor *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien unissant volume des plastes et implication de la SS4 dans le processus d'initiation.

Nous soupçonnons que SS4, en contrôlant le processus d'initiation de la synthèse de l'amidon, pourrait être un des acteurs essentiels de ce dialogue. En effet, l'analyse *in silico* de la séquence de SS4 révèle la présence, dans sa région amino-terminale, d'un motif de type « faisceau d'hélices » (coiled-coil) connu pour intervenir dans les interactions protéine/protéine. Dans cette partie se trouve également une zone présentant une homologie avec un motif que l'on trouve dans la protéine bactérienne EzrA (D'Hulst & Merida, 2010). EzrA est une protéine qui agit négativement sur la formation de l'anneau de division bactérien en s'associant aux protéines FtsZ qui forment l'anneau de constriction (Singh *et al.*, 2007). Or, chez les plantes, les protéines impliquées dans la machinerie de division du plaste sont des homologues des protéines FtsZ bactériennes.

Un des objectifs de ma thèse consiste à déterminer la nature du dialogue moléculaire qui s'établit entre la division du plaste et le métabolisme de l'amidon. Les résultats obtenus sur cette thématique font l'objet de la deuxième partie de ce manuscrit.

# *Matériels et Méthodes*

## I. Le Matériel

### 1) Matériel végétal :

- Lignées d'*Arabidopsis thaliana*

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées pour ce travail sont de l'écotype Columbia (Col-0). Les mutants utilisés sont des mutants d'insertion. Leurs caractéristiques et leurs provenances sont listées dans le tableau suivant :

#### A

Nom de la lignée	Numéro de la lignée	Numéro du gène	lieu d'insertion de l'ADN-T	Provenance de l'ADN-T	Provenance de la lignée
Col 0	-	-	-	-	SALK
<i>isa1</i> -	42704	At2g39930	Exon 13	pROK2	SALK
<i>isa2</i> -	29442	At1g03310	Exon 1	pROK2	SALK
<i>ss4</i> -	290D11	At4g18240	Intron 11	pAC161	GABI-KAT
<i>ftsZ1</i> -	73878	At5g55280	Exon 6	pROK2	SALK
<i>ftsZ2.1</i> -	CS65897	At2g36250	Exon 1	pAC161	GABI-KAT
<i>ftsZ2.2</i> -	50397	At3g52750	Exon 5	pROK2	SALK
<i>ftsZ1-ftsZ2.1</i> -	CS655901	-	-	-	SALK
<i>ftsZ1-ftsZ2.2</i> -	CS655900	-	-	-	SALK
<i>ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -	CS65898	-	-	-	SALK
<i>ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -	CS65899	-	-	-	SALK

#### B

	<i>isa2</i> -	<i>ftsZ1</i> -	<i>ftsZ2.1</i> -	<i>ftsZ2.2</i> -	<i>ftsZ1-ftsZ2.1</i> -	<i>ftsZ1-ftsZ2.2</i> -	<i>ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -	<i>ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -
<i>isa1</i> -	X							
<i>ss4</i> -		X	X	X	X	X	X	X

Tableau 1 : Liste des lignées utilisées pour ce travail de thèse. Il s'agit de mutants d'insertion, les numéros de gènes sont indiqués ainsi que l'origine de l'ADN-T utilisé pour l'insertion. Les lignées commandées (tableau A) sont croisées pour permettre la création de nouvelles lignées (tableau B).

- Autres plantes

Les tabacs *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana benthamiana* ont été utilisés pour des expériences de **BiFluorescence Complementation** (BiFC).

Le maïs (*Zea mays*) sauvage W64A a également été utilisé pour ce travail. Ses lignées congéniques mutées dans les allèles *isa1* ou *isa2* sont :

- Les lignées *sugary 1* mutées dans l'allèle codant ISA1 : *su1-4582* et *su1-Ref*
- La lignée *isa2-339* mutée dans l'allèle codant ISA2.

(James *et al.*, 1995 ; Dinges *et al.*, 2001).

## 2) Souches bactériennes

- Souches d'*Escherichia coli*

Les souches utilisées pour les différents clonages sont les **TOP10** (F-mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG ) et les **Match1** (F<sup>-</sup>  $\phi$ 80(lacZ) $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 hsdR(r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>)  $\Delta$ recA1398 endA1 tonA ).

Pour la propagation et la conservation des vecteurs porteurs d'un gène suicide ccdB, la souche utilisée est **DB3.1** (F- gyrA462 endA1  $\Delta$ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5  $\lambda$ - leu mtl1 ).

Pour l'expression de protéines recombinantes, les souches **BL21 (DE3)** (F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm (DE3)) ou **BL21-AI™** (F- ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA) ont été utilisées. La première est adaptée à l'expression de protéine par induction à l'*Isopropyl  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside* (IPTG à 1 mM en concentration finale) et la seconde pour l'expression de protéines induite par le L-Arabinose.

Toutes ces souches proviennent de Invitrogen (Life Technologies).

- Souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

La bactérie *Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la transformation des plants de tabac ou d'Arabidopsis est **GV3101** possédant le vecteur pMP90. Elle présente une résistance à la rifampicine d'origine génomique et son plasmide lui confère la résistance à la gentamicine.

## 3) Les vecteurs

- Les vecteurs de clonage :

- Le pENTR D-TOPO® (Invitrogen) a été utilisé pour les clonages avec la méthode de TOPO cloning® proposée par le fournisseur.
- Le pUC57 (GenScript) a également été utilisé comme vecteur d'entrée

- Les vecteurs d'expression chez *E. coli* :
  - Le pDest17 (Invitrogen) qui est compatible au système Gateway<sup>®</sup>, ajoute une étiquette 6 x Histidine en partie Amino-terminale de la protéine.
  - Le pBE1343 (Fourni par l'équipe du Pr A. Myers *Iowa State University*) utilisable en clonage classique, permet l'ajout d'une étiquette 8 x Histidine en partie Carboxy-terminale de la protéine.
- Les vecteurs de transformation du matériel végétal :

Il s'agit de vecteurs possédant les « Bord gauche » et « Bord droit » nécessaires à l'intégration d'un fragment d'ADN (ou ADN de Transfert) dans le génome végétal d'une cellule agrobiotisée. Ce processus, naturel chez l'agrobactérie, a été utilisé pour insérer une séquence codante (ADNc) d'intérêt lors des transformations réalisées au cours de ce travail de thèse.

- Le pMDC32 qui permet l'insertion d'une séquence codante dans le génome hôte.
- Les pEarley Gate 101, 102 et 103 qui permettent l'insertion de protéines de fusion (avec respectivement : **Yellow Fluorescent Protein**, **Cyan Fluorescent Protein** ou **Green Fluorescent Protein**)
- Les pBIFP1, 2, 3 et 4 qui permettent de greffer à l'insert des séquences tronquées de *YFP* ont servi pour les expériences de BiFC.

Les cartes de tous les vecteurs utilisés se trouvent en annexe.

#### 4) Les Outils informatiques

- Pour le traitement de données : Serial-cloner, Image-J
- Pour l'information scientifique :

Le **National Center for Biotechnology Information** (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), le site des mutants du **SALK-institute** (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). La base de données consacrée à *Arabidopsis thaliana* : **TAIR** (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>).

Comme outil protéomique : **EXPASY** (<http://us.expasy.org/tools/>)

Et enfin, les logiciels de prédiction d'adressage aux organelles :

**TargetP** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)

et **ChloroP** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)

## II. Les Méthodes

### 1) Conditions de culture

Les plants d'*Arabidopsis thaliana* ont été cultivés en serre de type « S2 ». Les graines sont stratifiées au minimum 48 h à 4 °C dans l'obscurité dans une solution de Phytigel 1 % (p/v). Les graines stratifiées sont semées sur un terreau « FloraFleur » (TREF®) préalablement traité au Trigard (Syngenta®) selon les recommandations du fournisseur. Ce larvicide est spécifique des œufs et larves des diptères. Les plants d'*A. thaliana* sont cultivés en jours longs (16 h de jour, 8 h de nuit) et à une température variant de 20 °C le jour à 18 °C la nuit.

Les plantes peuvent également être cultivées en conditions stériles dans des enceintes contrôlées (Phytotrons). Dans ce cas, les graines sont aseptisées (2 minutes dans de l'éthanol 70 %, 10 minutes dans l'hypochlorite de sodium 10 mM, 4 rinçages à l'eau stérile) puis semées sur un milieu *Murashige and Skoog* 1 % agar (*Murashige and Skoog*, 1962). Les conditions de croissances en phytotrons sont en jours longs comme décrit ci-dessus avec au minimum 75 % d'humidité.

### 2) Les croisements chez *A. thaliana*

*Arabidopsis thaliana* est une plante autogame, il est donc nécessaire d'intervenir si l'on souhaite croiser deux plantes entre elles. Les croisements s'effectuent sous loupe binoculaire à l'aide de fines pinces. Les plantes à croiser doivent être âgées de 3 à 4 semaines et avoir une hampe florale développée. Une fleur, encore fermée est choisie pour être le parent femelle. Les autres fleurs de la plante sont retirées afin d'éviter une autopollinisation. La fleur choisie est ouverte à l'aide d'une pince, les sépales, les pétales et les étamines sont arrachés : Le pistil est ainsi mis à nu. Il est ensuite mis en contact avec le pollen mature d'un parent mâle. Le pistil ainsi fécondé donnera une silique 15 à 20 jours après la fécondation. Une fois la silique sèche, les graines peuvent être récoltées, semées, puis testées pour leur génotype.

### 3) Génotypage des plantes

Le génotypage des plantes nécessite une étape d'extraction d'ADN génomique puis deux réactions de polymérisation en chaîne (PCR, **Polymerase Chain Reaction**) afin de déterminer si la plante testée possède bien l'insert dans le gène d'intérêt et définir si la mutation se trouve à l'état homozygote ou hétérozygote.

- Extraction d'ADN à partir de feuilles d'*A. thaliana*

Deux feuilles sont congelées dans de l'azote liquide puis broyées en microtube à l'aide d'un pilon. La poudre ainsi obtenue est remise en suspension dans 400 µl d'un tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2 %, β-mercaptoethanol 0,064 %). Il s'en suit une incubation de 30 minutes à 60 °C. Un volume (400 µl) de mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1 v/v) est ensuite ajouté afin de séparer les protéines des acides nucléiques. Après une agitation au vortex, une centrifugation de 15 minutes à 10 000g permet de récupérer la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. L'ajout de 230 µl d'isopropanol permet de précipiter l'ADN génomique et une centrifugation de 30 minutes à 10 000g à 4 °C de le culoter. Après rinçage avec de l'éthanol 70 %, l'ADN est resuspendu dans de l'eau stérile.

- PCR de génotypage

Une PCR avec des amorces spécifiques du gène sauvage ou de l'ADN-T présent dans les mutants d'insertion est ensuite réalisée (Figure 1) (95 °C 5min, 98 °C 20 sec, 72 °C 20 sec, 72 °C 2 min 30 sec 36 cycles au total, 72 °C 5 min, 4°C).

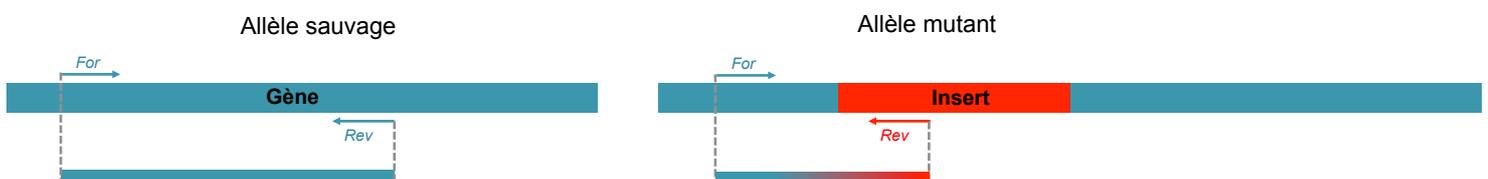


Figure 1 : Schéma représentant le positionnement des amorces (Forward (*For*) et Reverse (*Rev*)) lors des PCR de génotypage. Les produits d'amplification par PCR des allèles sauvage ou mutant donnent des amplicons de tailles différentes séparables sur un gel d'agarose.

Les produits PCR sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1 % contenant du GelRed™. Le tampon de charge est composé de Bleu de Bromophénol 0,25 %, EDTA 10

mM et glycérol 50 %. La migration s'effectue en moyenne à 110 Volt pendant 1h30 dans un tampon de migration Tris 40 mM, Acetate 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,5. Une fois la migration effectuée, la position des amplicons est révélée sous lampe Ultra-Violet et leur taille estimée en comparaison au marqueur de taille « Smart Ladder » (Eurogentec).

#### 4) PCR de clonage

L'amplification PCR des séquences à cloner se fait avec le kit *KaPa HiFi* suivant le protocole du fournisseur (CliniSciences). Les amorces utilisées sont listées en annexe. La Taq polymérase de ce kit est de « Haute Fidélité » ce qui réduit le risque d'erreur lors de l'étape d'élongation de la matrice à amplifier. Chaque amorce Forward est précédée d'une séquence CACC permettant l'insertion orientée dans le vecteur d'entrée pENTR-D-TOPO (voir la partie sur le clonage).

#### 5) Clonage des séquences d'intérêts

Les séquences amplifiées par PCR sont ensuite déposées sur un gel d'agarose afin de vérifier la taille de l'amplicon. Ils sont extraits du gel à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » de Macherey-Nagel et insérés dans le vecteur pENTR-D-TOPO au moyen de la topoisomérase associée à ce vecteur (TOPO clonage®; Invitrogen) en suivant les recommandations du fabricant. Les vecteurs sont ensuite intégrés dans *E. coli*. Les souches utilisées dans le clonage sont les TOP10 thermocompétentes (Invitrogen).

La transformation d' *E. coli* s'effectue en mettant en contact 20 à 50 ng de plasmide avec 50 µl de bactéries thermocompétentes. Un choc thermique est appliqué à 42 °C pendant 40 secondes. Les bactéries sont ensuite mises en suspension dans 1 ml de milieu *Luria-Bertani* (Tryptone 10 g.l<sup>-1</sup>, Extrait de levure 5 g.l<sup>-1</sup>, NaCl 10 g.l<sup>-1</sup>) « **LB** » sans antibiotique. La culture est placée sous agitation pendant une heure à 37 °C avant d'être étalée sur un milieu sélectif. Le choix de l'antibiotique dépend de la résistance conférée par le vecteur contenu dans les clones que l'on souhaite sélectionner (voir la carte des vecteurs en annexe).

Les clones ainsi obtenus sont mis en préculture (dans 4 ml de LB + antibiotique) pour en extraire l'ADN plasmidique (kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel). Les vecteurs purifiés sont dosés par méthode spectrophotométrique aux UV puis vérifiés par restriction enzymatique. Les enzymes de restriction (Biolabs), dont le choix est adapté en fonction de la séquence théorique du vecteur, sont sélectionnées à l'aide du logiciel Serial Cloner. Les

digestions enzymatiques se font au minimum pendant une heure à 37 °C. Les fragments digérés sont ensuite séparés sur gel d'agarose et leurs tailles estimées en comparaison au marqueur de taille Smart Ladder d'Eurogentec.

Si les clones possèdent un vecteur qui présente un profil de restriction attendu, les séquences des inserts sont vérifiées par séquençage (entreprise GATC). Les clones contenant la construction souhaitée sont conservés au congélateur à -80 °C dans un mélange de milieu LB et de glycérol 15 % (concentration finale).

Pour le clonage des isoamylases présentées dans la première partie des résultats de ce manuscrit, l'insert est extrait du vecteur d'entrée par des enzymes de restriction adaptées, et sa taille est vérifiée sur gel d'agarose. L'ADN est extrait à partir de ce gel puis le fragment est lié à l'aide de la T4 DNA ligase (Biolabs®) (400 U d'enzyme pour 20 ng de vecteur et 40 ng d'insert) dans un vecteur de destination, pendant une nuit à 16 °C.

Dans les cas des autres clonages, la méthode de recombinaison faisant appel à la technique Gateway® (Invitrogen) a été utilisée. Une simple réaction de recombinaison suffit alors à transférer l'ADNc d'intérêt dans le vecteur de destination. Le kit « Gateway LR Clonase II Enzyme mix » de Invitrogen a été utilisé pour cette étape. Les bactéries thermocompétentes TOP10 sont transformées avec le produit de la LR-réaction puis sélectionnées sur milieu LB contenant l'antibiotique adéquat. Enfin, les clones sélectionnés sont testés par restriction enzymatique après extraction d'ADN plasmidique. En cas de doute, un nouveau séquençage peut être effectué.

## 6) Particularité de certains clonages

Lors des clonages des Isoamylases 1 de maïs et d'Arabidopsis, dans le but de les exprimer *in planta*, il a été nécessaire d'accoler à l'ADNc de ces deux gènes une séquence chimérique contenant une partie codant un peptide de transit (permettant l'adressage des protéines aux plastes). La séquence d'ADNc codant la protéine mature de ISA1 de maïs (dépourvue de son peptide de transit) a été associée à la séquence codant le peptide de transit d'ISA1 d'Arabidopsis (séquence prédite grâce au logiciel ChloroP). Le principe de cette construction est décrit dans la figure 2.

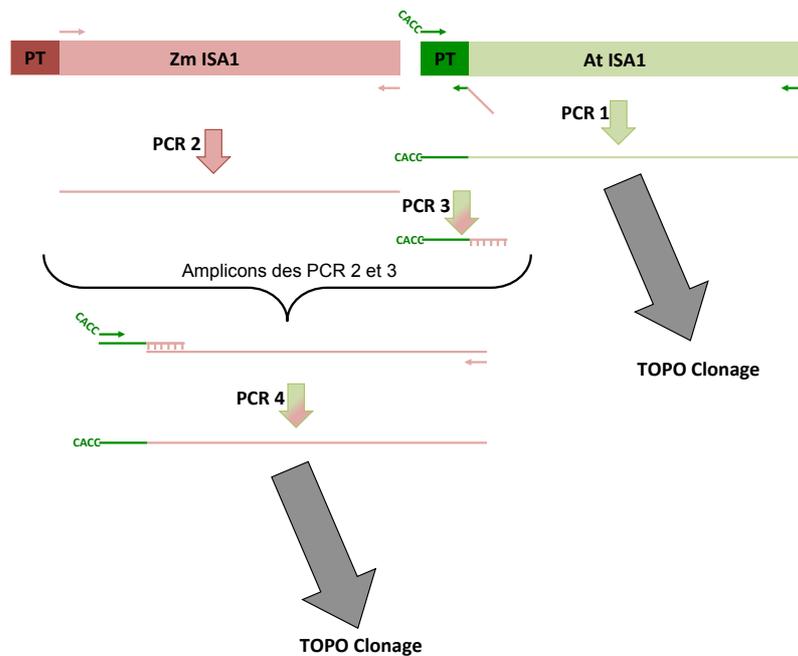


Figure 2 : Représentation schématique de la première étape de clonage des ISA1 de maïs (ZmISA1) et d'Arabidopsis (AtISA1). Les amorces utilisées et les conditions de PCR sont en annexe. La séquence codant le peptide de transit de AtISA1 (TP) a été greffée par PCR à l'ADNc de ZmISA1. Les flèches représentent les amorces spécifiques à l'ADNc de maïs (en rose) ou à celui d'Arabidopsis (en vert). La séquence CACC ajoutée en amont du peptide de transit permet l'insertion orientée dans les vecteurs D-TOPO lors de l'étape de clonage (« TOPO Clonage<sup>®</sup> ») faisant appel à la topoisomérase (Invitrogen).

Les clonages de différentes séquences codant l'enzyme SS4 d'Arabidopsis ont nécessité de nombreuses manipulations et seront décrits dans la partie Résultats de ce manuscrit.

## 7) Production de protéines recombinantes dans *E. coli*

Les bactéries transformées avec le vecteur d'expression sont mises en culture dans un milieu LB contenant l'antibiotique de sélection. La culture, en erlenmeyer, dans un volume de 200 ml se fait à 37 °C sous agitation rotative jusqu'à atteindre une Densité Optique à 600 nm de 0,5. Une fois cette valeur atteinte, débute la phase d'induction (à l'IPTG 1 mM ou au L-arabinose 0,2 % selon la souche bactérienne utilisée) pendant 4 h à 25 °C ou une nuit à 20 °C. Après induction, les cellules sont culotées par centrifugation à 5000 g à 4 °C, resuspendues dans un tampon Tris 50 mM, pH 7 et lysées par sonication par pulse pendant 2 fois 10 secondes. Les protéines récupérées dans le surnageant de lyse sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) puis 100 µg de protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide.

## 8) Gels de polyacrylamides utilisés pour ce travail

Différents types de gels à base de polyacrylamide ont été utilisés avec le système « Miniprotean II » de BioRad®

- Les gels **SDS-PAGE** (pour *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis*)

Les gels de concentration sont composés de polyacrylamide 4 % et tamponnés par Tris-HCl 125 mM, SDS 0,5 %, pH 6,8. Les gels de séparations (polyacrylamide 10 %) contenant 0,1 % de SDS sont tamponnés à pH 8,8 (Tris-HCl 375 mM). Le tampon de migration est composé de Tris (25 mM) Glycine (192 mM) DTT (0,15 g/l) et SDS (0,1 %). Le marqueur de taille utilisé comme référence est le *Page Ruler Protein Ladder* de Biorad. La migration, en condition dénaturante, s'effectue à 15 mA par gel pendant une heure. La révélation des protéines se fait par un bain de bleu de Coomassie 5 minutes puis une décoloration à l'eau une nuit à température ambiante.

- Les **zymogrammes** (ou gels d'activités)

Ce sont des gels de polyacrylamides (gel de concentration à 4 % tamponnés comme décrit précédemment) avec un gel de séparation de 7,5 % sans agent dénaturant mais contenant un substrat approprié de manière à visualiser une activité enzymatique. Ici les protéines migrent en fonction de leur taille, de leur encombrement stérique mais également en fonction de leur affinité au substrat c'est pourquoi l'utilisation d'un marqueur de taille s'avère inutile. La migration s'effectue en condition native à 15 mA par gel à 4 °C pendant au minimum 3h. Le tampon de migration contient du Tris-Glycine DTT comme décrit précédemment mais sans SDS. Le gel est placé, après migration, dans un tampon d'incubation à température ambiante, sous agitation pendant une nuit afin de permettre aux activités enzymatiques d'agir sur le substrat. Selon les activités que l'on souhaite révéler avec le zymogramme (activités de débranchement ou de synthèse), on choisira le substrat le plus adapté et le tampon d'incubation adéquat (Tableau 2).

Activité à révéler	Activité de débranchement	Activité synthase
Substrat dans le gel de séparation	$\beta$ -Limit-Dextrines 0,1%	Glycogène 0,3%
Tampon permettant l'activité enzymatique	Tris 50mM pH7 1 mM de DTT	Glycyl-glycine/NaOH 50mM pH 9, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100mM, $\beta$ -mercaptoéthanol 5mM, MgCl <sub>2</sub> 5mM et ADP-Glucose 1mM
Couleur des bandes d'activités observées	rosées	noires

Tableau 2 : Détail des substrats et des tampons d'incubation utilisés pour deux types de zymogramme. Les activités de débranchement peuvent être révélées sur différents substrats comme l'amidon ou les  $\beta$ -Limit Dextrines mais c'est ce dernier qui a été le plus largement utilisé pour ce travail. Les  $\beta$ -Limit Dextrine (Megazyme<sup>®</sup>) sont des polymères fortement branchés issus de l'hydrolyse d'une partie des liaisons  $\alpha$ ,1-4 de l'amidon par une  $\beta$ -amylase. Pour révéler les activités amidon-synthases, le substrat utilisé est le glycogène de foie de lapin (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). L'activité synthase nécessite un apport en ADP-Glucose, le précurseur nécessaire à l'allongement des chaînes glucaniques.

Les activités enzymatiques qui se traduisent par une modification du substrat sont révélées le lendemain par un bain dans une solution de lugol (1 g/l de diiode, 10 g/l d'iode de potassium). L'iode colore les chaînes en fonction de leur longueur et de leurs ramifications (Figure 3)

#### Couleur du complexe iode/polysaccharide

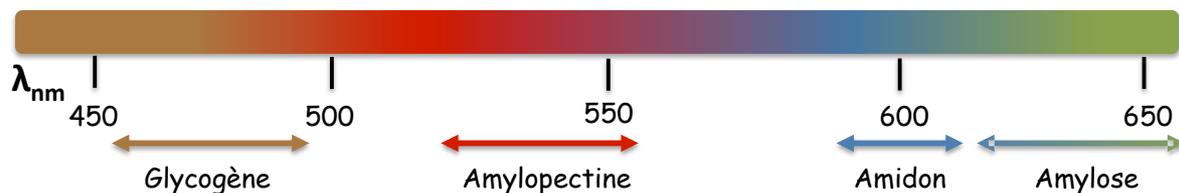


Figure 3 : Représentation des nuances de coloration à l'iode visibles en fonction du polysaccharide considéré. Plus les chaînes seront ramifiées, plus elles tireront sur le brun, plus elles seront linéaires et longues, plus elles iront vers le vert.

- **Les Western Blot**

Ils permettent de visualiser spécifiquement les protéines d'intérêt. Les extraits protéiques migrent sur un gel SDS puis sont transférées sur une membrane de nitrocellulose préalablement activée 30 secondes dans du méthanol (100 %). Le transfert s'effectue soit une nuit à 4 °C dans un tampon de transfert (Méthanol 50 %, Tris 0,12 M, Glycine 0,1 M, SDS 3 mM) soit de manière plus rapide en une heure à l'aide du « Semi Dry Electrobloetter » (Ancos) une heure à 350 mA. La membrane est colorée au Rouge Ponceau pour vérifier le transfert de protéine puis décolorée à l'eau. Après deux bains (10 minutes) dans un tampon TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) la membrane est bloquée dans un tampon de blocage TBS avec 5 % p/v de lait écrémé une heure à température ambiante et sous

agitation. Après 2 x 10 minutes de lavage en tampon TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween20 0,05 %) et 2 x 10 minutes de lavage en tampon TBS, la membrane est incubée une nuit à 4 °C sous agitation avec l'anticorps primaire (dilué au 1 : 1000<sup>ème</sup> dans le tampon de blocage). Le lendemain, après deux lavages de 10 minutes dans du TTBS puis un lavage de 10 minutes dans du TBS, la membrane est incubée une heure, à température ambiante et sous agitation, avec l'anticorps secondaire dilué au 1 : 10000<sup>ème</sup> dans le tampon de blocage. Après 4 lavages de 10 minutes au TTBS, la révélation s'effectue à l'aide du système d'**ElectroChimio Luminescence** (ECL) de GE Healthcare.

#### 9) Observations de l'amidon

- **Coloration des feuilles au lugol**

Pour estimer d'une manière rapide et simple si un mutant d'*Arabidopsis* accumule de l'amidon en fin de journée dans les feuilles, il est possible de dépigmenter la feuille dans un bain d'éthanol 80 % à 70 °C, de la rincer puis de la recolorer dans une solution de lugol.

- **Observations par microscopie optique**

Les grains d'amidon contenu dans les plastes des cellules sont également observables avec un microscope optique. Une plantule ou une feuille mature coupée en fines lamelles est fixée dans une solution de paraformaldehyde 3,7 % 1 heure sous vide à température ambiante. Le matériel végétal ainsi fixé sera laissé une nuit dans un tampon EDTA 0,1 M pH 9. L'observation des fragments tissulaires se fait entre lame et lamelle, avec une coloration au lugol et après avoir écrasé la matière de manière à séparer les cellules.

- **Observations par microscopie électronique**

Les préparations des échantillons ainsi que l'observation en microscopie électronique ont été réalisées au CERMAV (Grenoble) par l'équipe du Dr. Jean-Luc Putaux.

#### Microscopie électronique en transmission (MET)

L'observation des chloroplastes par microscopie électronique en transmission permet d'obtenir des informations concernant la taille, la morphologie et le nombre des grains d'amidon qu'ils contiennent. Les feuilles sont prélevées en fin de journée, coupées en lamelles carrées d'environ 4 mm avec une lame de rasoir, puis immédiatement fixées dans

un mélange tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,2), paraformaldéhyde (2 %) et glutaraldéhyde (2 %), et placées sous vide d'air durant 30 min. Ces morceaux de feuilles sont coupés en fines lanières rectangulaires, rincées dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,2) et maintenues durant 1 nuit au réfrigérateur dans ce même tampon. A partir de cette étape, les coupes de feuilles sont envoyées au CERMAV (Grenoble) et analysées par l'équipe du Dr Jean-Luc Putaux. Les échantillons sont post-fixés 4 h avec du tétroxyde d'osmium ( $\text{OsO}_4$ ) à 1 %, à basse température (dans un bain de glace et à l'abri de la lumière), puis déshydratés dans des bains successifs eau/éthanol en augmentant progressivement la concentration en éthanol.

Selon le type d'échantillon, deux résines époxy ont été utilisées pour l'inclusion. Les feuilles de maïs ont été incluses dans du Spurr et les feuilles d'Arabidopsis dans de l'Epon. La résine Spurr est laissée à polymériser pendant 1 nuit à 70 °C et l'Epon pendant 3 j à 60 °C.

Des sections ultrafines de 50-70 nm d'épaisseur ont été obtenues en coupant les blocs au moyen d'un ultramicrotome Leica UC6. Deux protocoles de renforcement du contraste et de marquage spécifique ont ensuite été utilisés selon le type d'échantillon. Les coupes de chloroplastes de maïs ont été traitées par l'acétate d'uranyle puis citrate de plomb tandis que les coupes de feuilles d'Arabidopsis ont été traitées en suivant le protocole PATAg (acide périodique – thiosemicarbazide – argent) qui permet de marquer positivement les polysaccharides présents dans les plastes (Gallant, 1969). Les coupes sont placées dans des bains successifs de différents réactifs et rincées, puis déposées sur les grilles de cuivre de 200 à 400 mesh.

Les coupes de feuilles de maïs ont été observées avec un microscope Jeol 2100 à l'*Iowa state University* (Etats Unis) fonctionnant à une tension de 200 kV et les images enregistrées au moyen d'une caméra numérique. Les coupes de feuilles d'Arabidopsis ont été observées au CERMAV au moyen d'un microscope Philips CM200 fonctionnant à 80 ou 120 kV. Les images ont été enregistrées sur des plans-films Kodak SO163 et les négatifs scannés hors-ligne.

#### Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie à balayage a été utilisée pour observer deux types d'échantillons : Les blocs d'inclusion surfacés au préalable au couteau diamant dans l'ultramicrotome ont été observés dans un microscope Quanta-FEG 250 de FEI. La résine étant non-conductrice, les observations ont été réalisées sous vide partiel d'air, à une pression de 100 Pa. Les images ont été enregistrées en mode électrons rétrodiffusés, sensibles à la présence des atomes d'osmium distribués dans la coupe. Les structures osmiées apparaissent donc en clair sur un

fond sombre. Afin d'avoir des images dont le contraste est comparable à celui des images de MET (les structures sont sombres sur un fond clair), nous avons passé les clichés de MEB en négatif. Nous avons utilisé ces images de MEB pour compter les nombres de grains d'amidon par plastes. L'avantage de cette méthode d'observation est que les images montrent une large surface du fragment de feuille inclus et coupé, sans être gêné par les barreaux de la grille de MET et en évitant les difficultés inhérentes à l'ultramicrotomie. Cette méthode est donc plus rapide pour échantillonner un grand nombre de spécimens mais la résolution des images est inférieure à celle des micrographies de MET qui seront à privilégier pour distinguer les détails fins de l'ultrastructure (Figure 4).

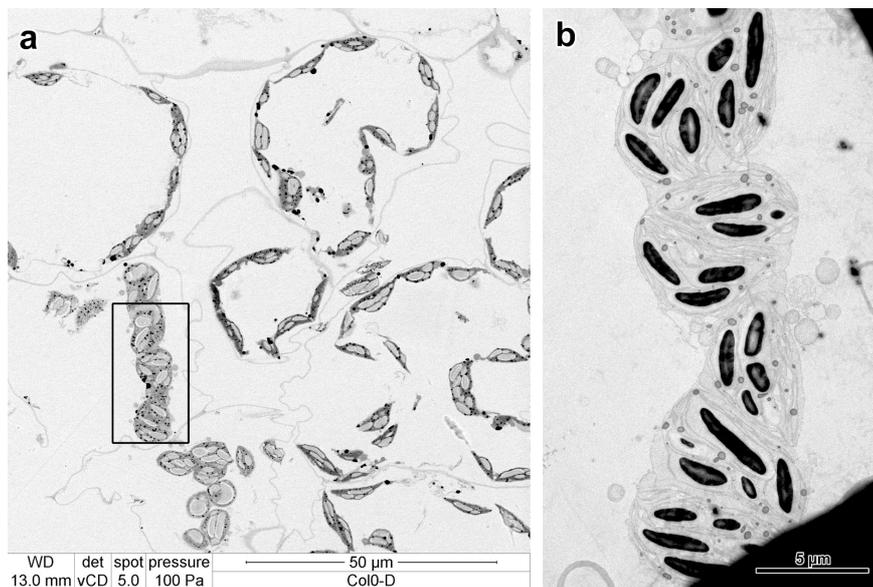


Figure 4 : Comparaison des images d'un fragment de feuille d'*Arabidopsis Col0* obtenues par a) MEB en électrons rétrodiffusés du bloc d'inclusion osmié (image en négatif) et b) MET d'une section ultrafine du même bloc colorée au PATAg. La zone observée en (b) correspond à l'encadré en (a).

Des gouttes de suspensions diluées de grains d'amidon purifiés des chloroplastes de maïs et d'*Arabidopsis* ont été déposées sur des supports de mica fraîchement clivés et laissées à sécher à l'air. Les échantillons ont été métallisés avec Au/Pd puis observés au CERMAV en mode électrons secondaires (sensibles à la topographie) au moyen d'un microscope Jeol JSM-6300, à une tension de 8 kV. Les images numériques ont été enregistrées grâce au système ADDA II de SIS. Des histogrammes de distribution de taille des grains ont été déterminés en mesurant le diamètre de 600 grains à partir des images de MEB, au moyen du logiciel ImageJ.

## 10) Extraction, purification et étude de l'amidon

- Extraction de l'amidon

L'amidon est extrait avec une méthode utilisant l'acide perchlorique. Les feuilles, récoltées en fin de journées ont été immédiatement congelées à l'azote liquide. Environ 0,1 g de feuilles sont broyées dans 5,5 ml d'acide perchlorique 0,7 M dans la glace. Une centrifugation à 4000 g pendant 15 minutes à 4 °C permet de séparer le culot contenant l'amidon insoluble et le surnageant qui contient les polysaccharides solubles. Le culot est rincé deux fois avec 7 ml d'eau stérile (centrifugations à 10000 g 15 minutes à 4 °C) puis repris dans 1 ml d'eau stérile. Le surnageant est neutralisé avec 2 ml de tampon de neutralisation (KOH 2 M, MES 0,4 M, KCl 0,4 M). L'échantillon est ensuite centrifugé à 10000 g pendant 25 minutes afin d'éliminer le précipité de perchlorate de potassium.

- Dosage de l'amidon

L'amidon peut alors être dosé à l'aide du kit Enzytec™ Starch (r-Biopharm). 30 µl d'échantillon (dilué ou non) sont solubilisés à 100 °C pendant au moins 10 minutes. 60 µl de tampon citrate contenant de l'amyloglucosidase sont ajoutés puis le tube est incubé à 58 °C pendant au minimum 30 minutes. L'amyloglucosidase clive toutes les liaisons de l'amidon. Après une courte centrifugation, 30 µl d'échantillon sont dilués dans 100 µl d'eau et 100 µl de « Solution 1 » (tampon triéthanolamine pH 7,6, contenant 80 mg de NADP, environ 190 mg d'ATP et du sulfate de magnésium). La DO initiale à 340 nm est mesurée. 2 µl de « solution 2 » sont ajoutés (200 U d'hexokinase et 100 U de Glucose 6 phosphate deshydrogénase). La DO finale à 340 nm est mesurée. Les réactions enzymatiques de ce dosage ainsi que le calcul sont représentés Figure 5. Le dosage des polysaccharides solubles s'effectue par la même méthode en partant du surnageant obtenu lors de l'extraction (paragraphe précédent).

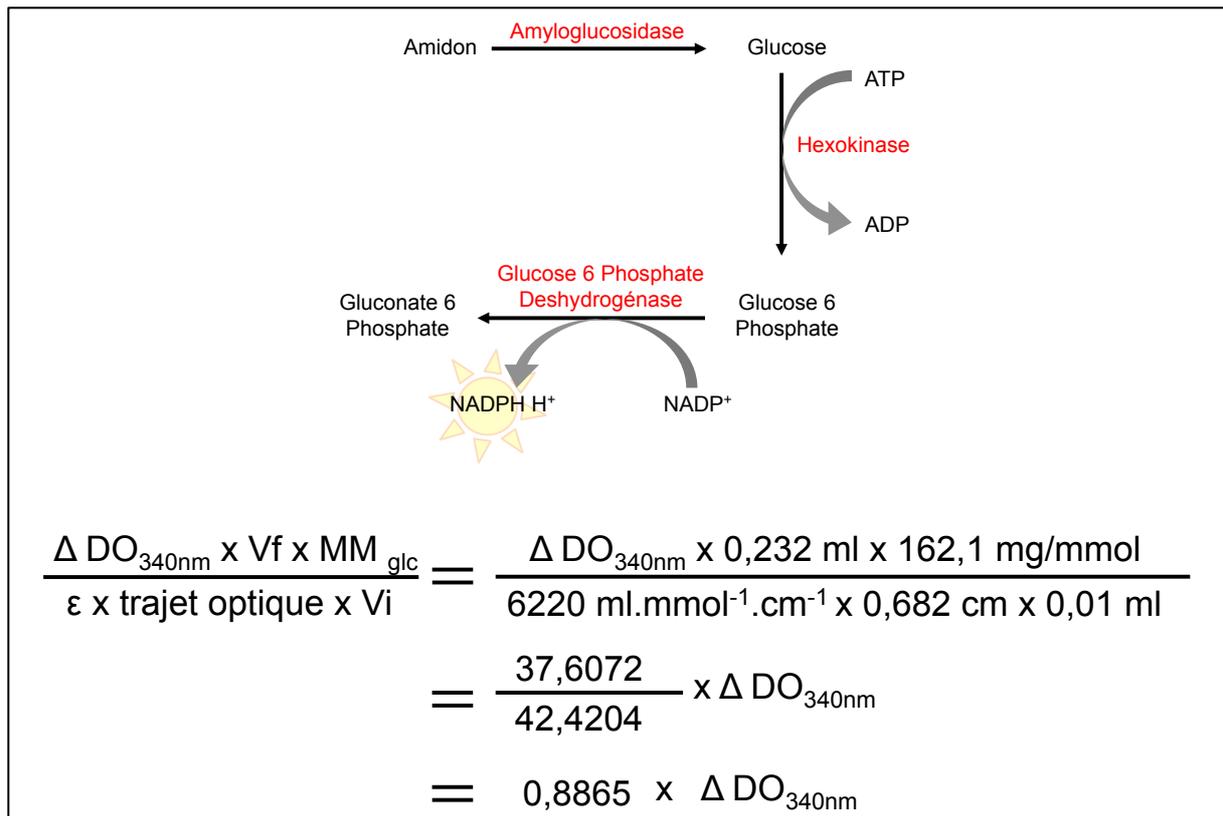


Figure 5 : Représentation schématique du dosage de polysaccharide à l'aide du kit Enzytec™ Starch (r-Biopharm). Le NADPH possède une absorbance à 340 nm il est donc possible de suivre l'augmentation de l'absorbance, de DO initiale à DO finale jusqu'à un plateau. La différence de ces deux absorbances à 340 nm est appelée  $\Delta DO_{340\text{nm}}$ . Les volumes d'échantillons sont également pris en compte dans ce calcul :  $V_i$  pour volume initial et  $V_f$  pour volume final. La Masse Moléculaire du glucose ( $MM_{\text{glc}}$ ) est de 162,1 g/mol. Enfin  $\epsilon$  représente le coefficient d'extinction molaire.

Une fois dosé, l'amidon est purifié à l'aide d'une centrifugation avec un gradient au Percoll® 90 %. La centrifugation se fait à 15700g à 4 °C pendant un moins une heure et rincé au moins deux fois avec de l'eau. L'amidon, une fois purifié, peut être envoyé pour des observations en microscopie électronique à balayage. Dans ce cas, il est rincé et laissé dans de l'éthanol 20 % puis préparé et observé comme décrit précédemment.

- Etude de la structure de l'amidon par **HPAEC-PAD**

0,5 mg d'amidon purifié sont solubilisés dans 250  $\mu\text{l}$  à 100 °C pendant au moins 10 minutes. On ajoute ensuite un volume équivalent de tampon acétate de sodium 55 mM pH 3,5. L'échantillon est débranché par 4 U d'isoamylase (isolée de *Pseudomonas sp*) et 2 U de pullulanase (isolée de *Klebsiella sp*) une nuit à 42 °C. La réaction est stoppée par incubation 2 minutes à 100 °C puis l'échantillon, entièrement débranché, est dessalé sur une colonne Carbohydrate « extract clean » (Alltech) et lyophilisé. Les échantillons sont alors resuspendus

dans 300 µl d'eau stérile et analysés sur une chromatographie échangeuse d'anions à haut pH couplée à une détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD).

### 11) Transformation des plantes

Pour toutes les transformations effectuées au cours de ce travail nous utilisons l'agrobactérie GV3101. Cette souche est rendue thermocompétente puis transformée avec 1 µg d'ADN plasmidique par choc thermique (Azote liquide puis décongélation à 37 °C). La sélection des agrobactéries transformées se fait lors d'une incubation de deux jours à 30 °C de boîtes de pétri contenant du milieu LB agar 1,2 % avec Rifampicine (50 µg/ml), Gentamicine (50 µg/ml) et l'antibiotique permettant la sélection du vecteur utilisé (pour pMDC32 ou les pEarleyGate : la kanamycine à 50 µg/ml). La présence des vecteurs de transformation est vérifiée par PCR sur colonies avec des amorces s'hybridant à l'ADNc cloné.

La transformation des plants d'*A. thaliana* s'effectue par une adaptation de la méthode « Floral Dip ». Pour la préculture, les agrobactéries sont incubées dans 10 ml de LB contenant de la kanamycine (50 µg/ml) et de la gentamycine (50 µg/ml) pendant une nuit à 30 °C et sous agitation rotative (200 tours/min). La culture est ensuite réalisée dans 100 ml du même milieu contenant les mêmes antibiotiques. Après 4 à 5 h de culture, lorsque la DO<sub>600</sub> dépasse 2 unités (phase stationnaire), la culture est centrifugée à 6000 g 5 minutes puis le culot est resuspendu dans 40 ml de milieu d'infiltration (MS 0,5X ; 5 % saccharose ; 0,05 %, Silwett L-77). Le Silwett L-77 est un agent mouillant de faible tension superficielle. La suspension d'agrobactéries est directement déposée (à la pipette) sur les boutons floraux d'une plante âgée d'une quarantaine de jours. 10 secondes suffisent comme temps de contact entre les bactéries et les boutons floraux. Les plantes sont ensuite recouvertes une nuit de manière à maintenir une forte humidité. Puis les conditions de croissance optimale d'*A. thaliana* sont maintenues jusqu'au séchage des siliques. Les siliques sèches sont récoltées environ trois semaines après la transformation puis les graines sont récupérées par passage à travers un tamis (0,5 mm).

- Après une aseptisation, les graines issues de la transformation à partir du vecteur pMDC32 seront semées sur un milieu Murashigue et Skoog 1 % agar contenant 20 µg/ml d'Hygromycine B (Sigma-Aldrich®). Après une stratification de 48 h à 4 °C et à l'obscurité, leur croissance sera contrôlée en phytotron suivant la méthode décrite par Harrison et ses collaborateurs (2006) avec une température constante de 22 °C et un taux d'humidité relatif de 80 %.

- Les transformations à partir des vecteurs pEarleyGate permettent une sélection directement sur terreau. Les graines transformées sont résistantes au Glufosinate d'ammonium. Les semis se font sur un terreau préalablement traité avec la solution de sélection (60 mg/l de glufosinate ammonium et une goutte de Tween20). Cette solution s'applique sous forme de spray tous les deux jours après semis jusqu'à différencier les plantes non transformées, sensibles à l'herbicide, des plantes transformées qui survivent. Les conditions de cultures en serre S2 sont identiques à celles décrites dans la partie II.1).

## 12) Expression de protéines de fusion

- Agroinfiltration de feuilles de tabac

Des manipulations d'expression de protéines de fusion ont été réalisées durant ce travail. Tout d'abord par l'expression de protéines flanquées d'une séquence codant la moitié de la **Yellow Fluorescent Protein** (YFP) selon la technique BiFC, de manière transitoire chez le tabac. Les plants de tabac sont mis en culture sur terreau en serre S2 (16 h de jours, 8 h de nuit). Les agrobactéries contenant les constructions d'intérêt sont mises en culture dans 5 ml de milieu LB avec les antibiotiques adaptés pendant une nuit à 30 °C sous agitation rotative. Après une centrifugation 15 minutes à 3000 g, les bactéries sont resuspendues dans un milieu AS (MgCl<sub>2</sub> 0,01 mM, MES-KOH pH 5,6, 0,1 M, Acetosyringone 0,15 mM) pour ajuster la DO<sub>600</sub> à 0,6. Les souches d'agrobactéries contenant les vecteurs pour lesquels on souhaite tester une interaction protéine/protéine sont mélangées à volume égal et avec une souche d'agrobactérie anti-silencing (Hcpro) (1 :1 :1). Les mélanges restent 2 à 4 heures à température ambiante avant d'être injectés dans les feuilles de jeunes tabacs (possédant 4 à 5 feuilles). Les plantes sont laissées 2 jours à température ambiante avant d'être observées sous microscope à fluorescence.

- Transfection de protoplastes d'*A. thaliana*

Des expressions transitoires de protéines de fusion ont été réalisées dans des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*. Les vecteurs d'expressions nécessitent d'être très concentrées (2 mg/ml) et purifiées, pour cela nous utilisons le kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel). Les plastes sont obtenus à partir de plantules d'*A. thaliana* de 2 semaines ayant poussées sur milieu MS + agar en phytotron (jours longs). Les parties aériennes des plantules sont hachées finement dans 10 ml de mannitol 0,5 M. Les cellules sont ensuite mises en contact avec 12 ml de solution d'enzyme (mannitol 400 mM, MES 5

mM, CaCl<sub>2</sub> 1 M, Cellulase Onozuka R-10 1 % p/v, Macerozyme R-10 0,25 % p/v, pH 5,6) pendant une nuit sans agitation. Les boîtes sont ensuite agitées lentement puis les débris cellulaires filtrés par deux couches de Miracloth. Après une centrifugation 5 minutes à 50 g les protoplastes sont resuspendus dans une solution « W5 » (NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 125 mM, KCl 5 mM, Glucose 5 mM, MES 1,5 mM pH 5,6). Ils sont ensuite purifiés sur lit de saccharose (21 %) et remis en suspension dans le tampon W5. Les protoplastes sont ensuite resuspendus dans un tampon MaMg et mis en contact avec 50 µg d'ADN plasmidique, 50 µg d'ADN de sperme de saumon dénaturé et une solution de Polyéthylène glycol (PEG<sub>4000</sub> 40 % p/v, 0,4 M mannitol, 0,1 M Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, pH 7). Les protoplastes ainsi transfectés sont remis en suspension dans la solution W5 et laissés 24 à 48 h à l'obscurité avant d'être observés. Les observations des protéines de fusion dans les protoplastes se font sur un microscope optique équipé pour visualiser la fluorescence mais aussi en microscopie confocale (Leica TCS SP5).

# *Résultats*

*Contribution à l'étude du  
fonctionnement des Isoamylases lors de  
la synthèse de l'amidon*

## I. Etude comparative de l'activité isoamylase lors de la synthèse de l'amylopectine chez *Arabidopsis thaliana* et le maïs (*Zea mays*)

Dans cette partie nous présentons une analyse fonctionnelle des isoamylases 1 et 2 d'*Arabidopsis thaliana* et de *Zea mays*. Cette étude se compose de deux chapitres, le premier concernant la caractérisation des activités isoamylasiques *in vitro* et le second étant une complémentation fonctionnelle des mutations isoamylases chez *Arabidopsis thaliana*.

Ma participation à ce travail a commencé par la production des quatre protéines recombinantes AtISA1, AtISA2, ZmISA1 et ZmISA2 (At pour *Arabidopsis thaliana* et Zm pour *Zea mays*) dans *Escherichia coli* et l'étude de leurs activités. Les complexes entre ISA1 et ISA2 ont été reconstitués par le mélange d'extraits protéiques et les activités ont été visualisées par zymogramme (Figures 2 et 3). Les travaux sur protéines purifiées par chromatographie d'affinité ou faisant appel à l'utilisation d'anticorps ont été effectués à l'*Iowa State University* (Etat Unis) par l'équipe du Pr Alan Myers.

J'ai réalisé les transformations conduisant à l'expression des différentes isoamylases dans des mutants d'*Arabidopsis thaliana* déficients en activité isoamylase. J'ai effectué l'intégralité des caractérisations phénotypiques des plantes obtenues à l'exception des observations microscopiques qui ont été réalisées au CERMAV de Grenoble. L'étude des plantes sélectionnées a permis de mettre en évidence des phénotypes de complémentation. Afin d'étudier ces phénotypes, les activités de débranchement, à partir d'extraits de feuilles, sont visualisées par zymogramme (Figure 4). Les phénotypes de restauration de la synthèse d'amidon ont été repérés grâce à un crible simple de coloration des feuilles au lugol (Figure 5). Le mutant *isa1- isa2- d'A. thaliana*, accumulent seulement 20 % de la quantité d'amidon du sauvage et produit des grains de très petite taille. De plus, ce mutant accumule du phytoglycogène, un polysaccharide dont la structure est proche de celle du glycogène. L'extraction, le dosage et l'analyse de la structure fine de l'amidon et des polysaccharides solubles des plantes transformées m'ont permis d'évaluer les niveaux de complémentation des transformants (Figure 6 ; Figure supplémentaire 4). La morphologie des grains et le nombre de grains par chloroplastes ont été déterminés par observation au microscope électronique au CERMAV (Grenoble) par l'équipe du Dr Jean-Luc Putaux (Figures 7 et 8). J'ai ensuite pu estimer la distribution de taille des grains à l'aide du logiciel *Image J*.

## Résumé

Les enzymes de débranchement de type isoamylase sont essentielles à la synthèse de l'amidon chez les organismes photosynthétiques. Ces enzymes sont très conservées au cours de l'évolution. ISA1 est la forme active et ISA2 son homologue non-catalytique. Des divergences fonctionnelles existent entre différentes espèces, certains tissus végétaux nécessitent la présence d'ISA1 et d'ISA2 alors que dans l'albumen des monocotylédones ISA1 est capable de maintenir une synthèse d'amidon en absence d'ISA2. L'étude présentée ici fait appel à des approches *in vitro* et *in vivo* pour déterminer si cette différence de fonctionnement des ISA1 dépend de l'organisme et du tissu considéré ou est la conséquence d'une divergence évolutive qui serait intervenue lors de l'émergence des monocotylédones et dicotylédones. ISA1 de maïs a été exprimée dans des mutants d'*Arabidopsis* dépourvu d'ISA1 ou dans des doubles mutants dépourvus d'ISA1 et ISA2. La protéine de maïs est exprimée et active dans les feuilles d'*Arabidopsis* et permet la restauration de la synthèse d'amidon même en absence des deux isoamylases endogènes. L'analyse des enzymes recombinantes nous montre que AtISA1 requiert AtISA2 pour fonctionner alors que ZmISA1 est active par elle-même. Les différences de mobilités électrophorétiques en conditions natives suggèrent des modifications post-traductionnelles *in vivo*. L'analyse des courbes de sédimentation produites par ultracentrifugation nous indique que ZmISA1 fonctionne sous la forme d'un homodimère. L'ensemble de ces données démontre que c'est une divergence évolutive entre monocotylédones et dicotylédones qui est responsable de la différence de fonctionnement d'ISA1.

## **Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves <sup>1</sup>**

**Maud Facon, Qiaohui Lin, Abdelhamid M. Azzaz, Tracie A. Hennen-Bierwagen, Alan M. Myers, Jean-Luc Putaux, Christophe D'Hulst, and Fabrice Wattebled**

Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 du CNRS - Université Lille 1, Sciences and Technologies, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France (M.F., C.D., F.W.); Roy J. Carver Department of Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, Iowa 50011 (Q.L., A.M.A., T.A.H.-B., A.M.M.); CERMAV-CNRS, affiliated with Université Joseph Fourier, and member of Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble and Institut Carnot PolyNat Domaine Universitaire de Grenoble – Saint Martin d'Hères, 38041 Grenoble, France (J.-L.P.)

<sup>1</sup>This work was supported by:

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Agence Nationale de la Recherche (“Glycoballs” and “CaSta DivA” grants, ANR-09-CP2D-07-01 and ANR-11-BSV6-003-02 respectively) the Université de Lille 1, Sciences & Technologies. M.F. was supported by the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

\*Corresponding author e-mail: [fabrice.wattebled@univ-lille1.fr](mailto:fabrice.wattebled@univ-lille1.fr)

**ABSTRACT**

Isoamylase-type starch debranching enzymes (ISA) play important roles in starch biosynthesis in chloroplast-containing organisms as shown by strict conservation of both catalytically active ISA1 and the non-catalytic homolog ISA2. Functional distinctions exist between species, although they are not understood yet. Numerous plant tissues require both ISA1 and ISA2 for normal starch biosynthesis, whereas monocot endosperm and leaf exhibit near-normal starch metabolism without ISA2. This study took *in vivo* and *in vitro* approaches to determine whether organism-specific physiology or evolutionary divergence between monocots and dicots is responsible for distinctions in ISA function. Maize ISA1 was expressed in *Arabidopsis* lacking endogenous ISA1, or lacking both native ISA1 and ISA2. The maize protein functioned in *Arabidopsis* leaves to support near normal starch metabolism, in the absence of any native ISA1 or ISA2. Analysis of recombinant enzymes showed that *Arabidopsis* ISA1 requires ISA2 as a partner for enzymatic function whereas maize ISA1 was active by itself. Electrophoretic mobility of recombinant and native maize ISAs differed, suggestive of post-translational modifications *in vivo*. Sedimentation equilibrium measurements showed recombinant maize ISA1 to be a dimer, in contrast to previous gel permeation data that estimated the molecular mass as a tetramer. The data demonstrate that evolutionary divergence between monocots and dicots is responsible for distinctions in ISA1 function.

## INTRODUCTION

Semi-crystalline starch enables photosynthetic eukaryotes to store large quantities of glucose over extended time periods, compared to other species in which the soluble polymer glycogen functions to store carbohydrate reserves (Ball and Morell, 2003). Eukaryotes gained the capacity to photosynthesize after the capture of a cyanobacterial endosymbiont by a glycogen-metabolizing host cell. In the lineage that evolved subsequently, known as the Archaeplastida, select glucan-storage enzymes encoded within the host nucleus, the endosymbiont, and potentially a prokaryotic parasite located within the host cell, developed so as to generate the branched glucan polymer amylopectin (Ball et al., 2011; Ball et al., 2013). Such molecules are highly similar to glycogen in terms of chemical structure, but the molecular architecture of amylopectin enables formation of semi-crystalline structures (Buleon et al., 1998). These latter then assemble into higher order structures leading to starch granule formation. The advent of starch granules is likely to have been critical for the evolution of chloroplast-containing organisms, including the spread of land plants on the Earth's surface, because they enable storage of photosynthetically-generated glucose for many hours in tissues such as leaves during diurnal cycles, or for months to years in seeds.

An important aspect of the evolutionary change from glycogen to starch is the use of particular  $\alpha(1\rightarrow6)$ -glucosidases, referred to as isoamylase-type starch debranching enzymes (ISA), in the production of amylopectin (Ball et al., 1996; Myers et al., 2000; Hennen-Bierwagen et al., 2012). A suite of genes encoding the enzymes that accomplish starch biosynthesis was established early in the evolution of chloroplast-containing organisms, i.e., the Chloroplastida, prior to the divergence of distantly related groups including green algae and land plants. Included in this gene set are three paralogs that encode the proteins ISA1, ISA2, and ISA3, each of which is highly conserved in chloroplast-containing species. ISA1 of vascular plants and bryophytes, for example, are approximately 70% identical over more than 600 residues, and between land plants and prasinophyte algae this value is about 60%. ISA1 or ISA2 deficiencies in potato tuber, *Arabidopsis* leaf, *Chlamydomonas* cells, or cereal endosperms result in reduced starch content, altered amylopectin structure, and appearance of soluble, branched glucans similar to native glycogen (James et al., 1995; Mouille et al., 1996; Nakamura et al., 1996; Bustos et al., 2004; Delatte et al., 2005; Wattedled et al., 2005). Such soluble polymers, referred to as phytoglycogen, have not been observed in wild type plants. Thus, ISA1 and ISA2 functions are important determinants of whether storage glucans are semi-crystalline or soluble. ISA3, in contrast, functions primarily in starch catabolism (Wattedled et al., 2005; Delatte et al., 2006).

ISA1 and ISA2 appear to function together in *Arabidopsis* leaf as a single entity because essentially identical phenotypes are observed in single mutants lacking either protein or

double mutants lacking both of them (Zeeman et al., 1998; Delatte et al., 2005; Wattedled et al., 2005). Biochemical analysis of native and recombinant proteins has shown directly that ISA1 and ISA2 function together in a complex. ISA activity was first purified from potato tuber and found to contain two distinct polypeptides identified as ISA1 and ISA2 (Ishizaki et al., 1983; Hussain et al., 2003). Heteromultimers containing these two proteins were also purified from rice and maize endosperm (Utsumi and Nakamura, 2006; Kubo et al., 2010). Finally, mixture of native and recombinant rice proteins demonstrated directly that specific enzymatic activities are provided by ISA1 and ISA2 functioning together in a heteromultimeric complex (Utsumi and Nakamura, 2006). ISA1 is the catalytic subunit within this complex whereas ISA2 is non-catalytic owing to amino acid substitutions at residues that are essentially invariant in the GH13 family of glycoside hydrolases, i.e., the  $\alpha$ -amylase superfamily, several of which participate in the catalytic mechanism (Hussain et al., 2003; Utsumi and Nakamura, 2006). Despite lacking catalytic activity, ISA2 proteins are conserved in all chloroplast-containing species that have been examined, which rules out recently evolved mutations and to the contrary infers a functional selective advantage.

The necessity for the ISA1/ISA2 heteromultimer is not obvious in light of the fact that in some instances ISA1 by itself can condition normal levels of starch and suppression of phytoglycogen accumulation. *Cyanidioschyzon merolae*, a species within the Rhodophyta lineage of the Archaeplastida family, contains semi-crystalline starch and amylopectin with physical characteristics similar to that of Chloroplastida species (Hirabaru et al., 2010). The *C. merolae* genome contains elements that encode ISA1 and ISA3, yet lacks a homolog encoding ISA2 (Coppin et al., 2005). Thus, in some instances starch can be generated, and phytoglycogen accumulation suppressed, without an ISA2 protein. Cereal endosperms provide additional evidence that ISA2 is not strictly required for normal starch levels and suppression of phytoglycogen accumulation. Mutants or transgenic lines lacking ISA2 are known in rice (Utsumi et al., 2011) and maize (Kubo et al., 2010). Endosperm from these plants exhibits normal starch levels with amylopectin structure essentially the same as wild type, and lacks phytoglycogen. ISA activity presumably is provided in endosperm of these mutants by a homomultimeric enzyme containing only ISA1.

The reason why ISA2 is strictly conserved in the Chloroplastida is not understood yet, because in some instances, this isoform is not required for normal starch metabolism. Two explanations can be considered. One possibility is that the inherent structure of ISA1 in cereals, resulting from mutations accumulated specifically in this evolutionary lineage, allows it to act without ISA2. Another possibility is that metabolic differences in specific tissues, e.g., leaf versus endosperm, require specialized enzymatic properties of ISA1/ISA2 heteromer that ISA1 by itself does not provide. To test these hypotheses, this study combined maize and *Arabidopsis* ISA1 and ISA2 isoforms both *in vitro* and *in vivo*. Maize ISA1 was found to

be active without any ISA2 protein, either *in vitro* or in *Arabidopsis* leaves, whereas *Arabidopsis* ISA1 required an ISA2 partner in all instances. Thus, ISA1 appears to have evolved in the cereal lineage so that it no longer requires ISA2 for enzymatic activity or metabolic function in generation of starch and suppression of phytylglycogen accumulation. Presence of ISA2, however, influenced the size of the granules generated using maize ISA1, suggesting the possibility that modulation of the higher order structures of starch contributes to the selective advantage of the non-catalytic isoform.

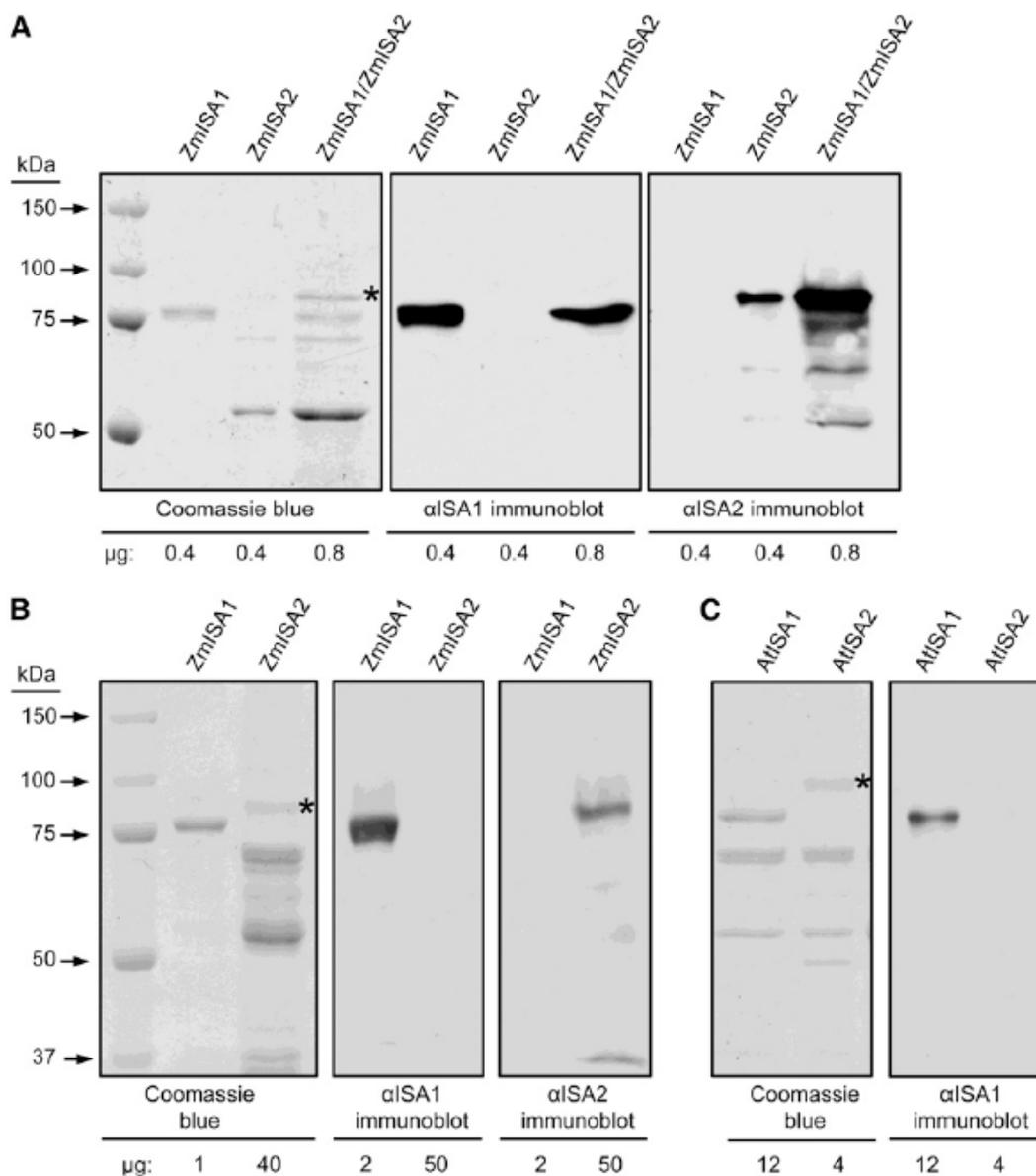
## RESULTS

### Expression and Purification of Recombinant *Arabidopsis* and Maize ISA1 and ISA2

Recombinant ISAs from *Arabidopsis* or maize were generated to enable subsequent comparison of their biochemical properties. The coding sequences of the *ISA1* and *ISA2* cDNAs from both species were synthesized with codon usage optimized for *E. coli*, and cloned into an expression vector containing the phage T7 promoter for control of transcription and eight histidine codons at the 3' end of the open reading. The amino terminal codons in the synthetic genes were selected using the ChloroP algorithm to predict the extent of the plastid transit peptide (Emanuelsson et al., 1999). Four plasmids encode individual plant proteins referred to as AtISA1, AtISA2, ZmISA1, or ZmISA2 to indicate *Arabidopsis* or maize sequences, respectively, all of which possess C-terminal 8X His-tags. Two additional plasmids contain synthetic operons with both ISA1 and ISA2 open reading frames separated by a ribosome-binding site. In these instances the co-expressed proteins are referred to as AtISA1/AtISA2 or ZmISA1/ZmISA2, and the 8X His-tag is present only on ISA2. Expression plasmid details, including the particular codons present in each synthetic gene, are shown in Supplemental Figure S1.

Recombinant ISAs were expressed singly in *E. coli*, or co-expressed, and collected from soluble extracts by affinity to Ni<sup>2+</sup>-NTA agarose. The purity of the fractions was assessed by separation in SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining or immunoblot analysis using affinity-purified rabbit IgG from sera raised against peptide fragments of maize ISA1 or ISA2 (Kubo et al., 2010). ZmISA1 was obtained essentially pure, whereas ZmISA2 co-eluted from the affinity matrix with several other proteins and was present in the purified fraction in low abundance to the extent that it could be detected only by immunoblot or by loading large amounts for SDS-PAGE (Figure 1A, B). When ZmISA2 was co-expressed together with ZmISA1, however, the two proteins were present in apparently equal abundance (Figure 1A). ZmISA1 and ZmISA2 must co-purify in a complex because the affinity tag is present only on the latter. These data indicate that ZmISA1 and ZmISA2 assemble into a complex in a 1:1

ratio and also that ZmISA2 is unstable in *E. coli* extracts unless it is present in that complex. AtISA1 and AtISA2 behaved differently than the maize proteins during purification from *E. coli*. Singly expressed AtISA1 and AtISA2 co-purified with the same set of contaminant proteins, and were present in approximately the same abundance in the affinity-purified fraction (Figure 1B).



**Figure 1.** Purified ISA proteins. A, ZmISA1 and ZmISA2 expressed singly or co-expressed. ZmISA1 and ZmISA2 were expressed singly as 8X His-tagged proteins, or co-expressed from an operon with the 8X His-tag only on ZmISA2. The indicated amounts of purified proteins were separated by SDS-PAGE and duplicate lanes were either stained with Coomassie blue or probed in immunoblot analysis with the indicated IgG fraction. The asterisk indicates ZmISA2. B, Maize and *Arabidopsis* ISA1 and ISA2 expressed singly as 8X His-tagged proteins. Analysis as in panel A. Asterisks indicate ISA2 proteins.

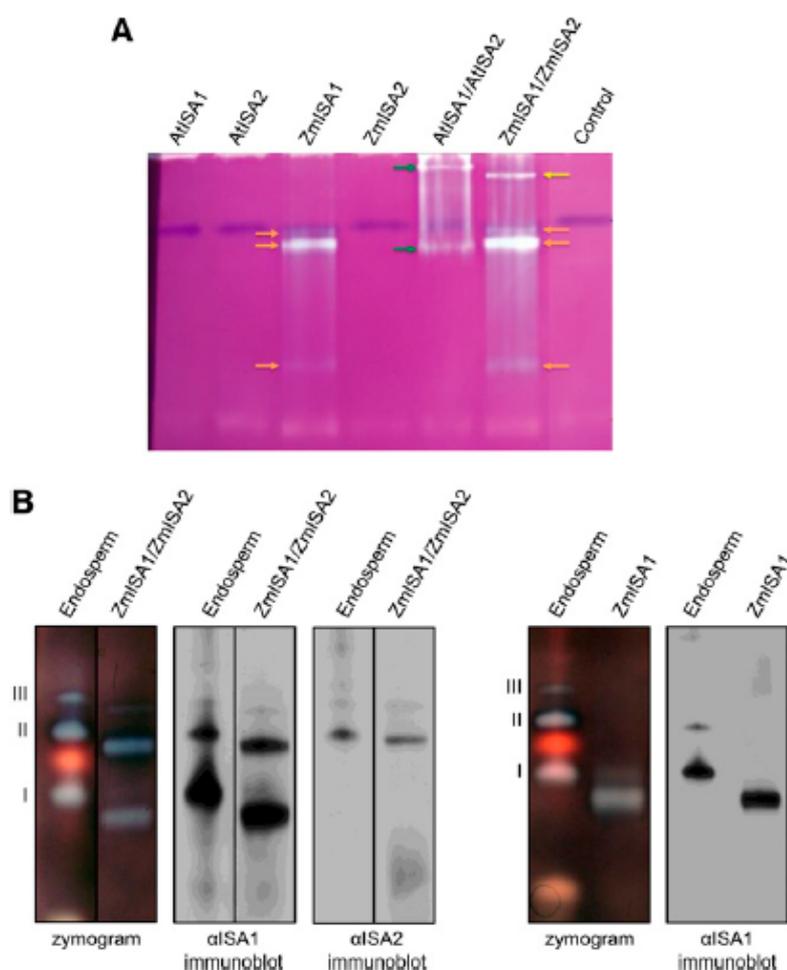
## Enzymatic Activities of Recombinant ISAs

The activities of recombinant ISAs were compared in zymograms, initially using total soluble *E. coli* extracts. Constant amounts of total protein were separated by native-PAGE in a gel impregnated with 0.3%  $\beta$ -limit dextrin (final concentration). After incubation in physiological buffer the gel was stained with iodine-potassium iodide solution ( $I_2/KI$ ) so that changes in color of the glucan-iodine complex revealed the presence of ISA and other  $\beta$ -limit dextrin-modifying enzymes (Figure 2A). No exogenous activity was observed in extracts containing AtISA2 or ZmISA2 expressed singly, as expected considering that ISA2 proteins lack conserved catalytic residues. Singly expressed AtISA1 and ZmISA1 behaved differently in this assay. Whereas no exogenous activity was found in the AtISA1 lysate, at least three bands of  $\beta$ -limit dextrin-modifying activity were observed with the ZmISA1 lysate. Co-expression of AtISA1/AtISA2, in contrast, yielded two clearly discernable activity bands. In the ZmISA1/ZmISA2 lysate, the three activity bands detected in the ZmISA1 lysate were again observed, and in addition a fourth band dependent on the presence of both proteins was detected. The data indicate that ZmISA1 and AtISA1 act differently in the regard that the maize protein can provide enzyme activity on its own whereas the *Arabidopsis* protein cannot.

Purified recombinant maize ISAs were further characterized in zymograms involving native-PAGE in the absence of substrate and subsequent electrophoretic transfer to starch-containing gels. ZmISA1 and co-expressed ZmISA1/ZmISA2 were compared to native ISAs in maize endosperm extracts. Previous analyses identified three forms of *in vivo* ISA activity, specifically form I homomultimer containing only ISA1 and forms II and III heteromultimers containing ISA1 and ISA2 (Kubo et al., 2010). Recombinant ZmISA1 migrated near but slightly faster than *in vivo* form I (Figure 2B). Recombinant ZmISA1/ZmISA2 generated three activity bands, similar in mobility to the three *in vivo* forms but in each instance running slightly faster in native-PAGE. The identities of the three bands from ZmISA1/ZmISA2 as one homomeric and two heteromeric forms were revealed by immunoblot analysis, confirming correspondence with *in vivo* forms I, II, and III (Figure 2B). The increased mobility of all three ISA activities from recombinant proteins relative to the endosperm forms was reproducible in multiple biological replicates (data not shown).

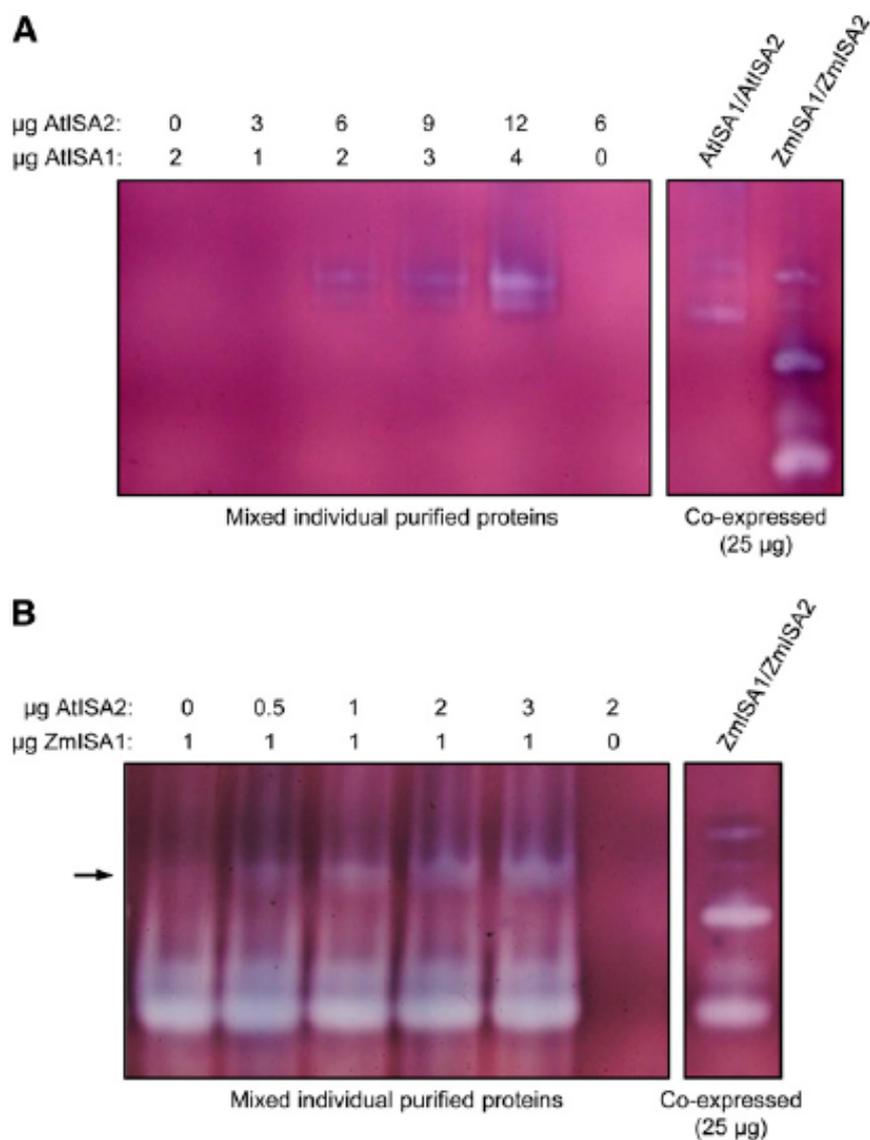
Singly expressed recombinant proteins were mixed to seek to reconstitute enzymatic activity. As noted, AtISA1 by itself does not possess enzymatic activity. Mixture of affinity purified AtISA2 with purified AtISA1 in increasing concentration generated an enzymatically active complex observed by zymogram (Figure 3A), consistent with the comparison of singly expressed and co-expressed proteins in total soluble *E. coli* extracts (Figure 2A). Two heteromeric activities were generated from the recombinant proteins, as had also been observed for ZmISA1/ZmISA2 (Figure 2B). A monocot-dicot cross species mixture was also

tested with affinity purified proteins, specifically titration of a constant amount of ZmISA1 with increasing AtISA2. In this instance a new mobility form of ISA activity was obtained in addition to the ZmISA1 homomer (Figure 3B). Thus, AtISA2 can constitute a single functional heteromeric form with ZmISA1. These preliminary experiments engendered the following *in vivo* experiments involving transgenic *Arabidopsis* lines in which the endogenous ISA1 was replaced with ISA1 from maize.



**Figure 2.** Zymogram analysis of recombinant ISA activities. A, Total soluble *E. coli* extracts. Soluble fractions from *E. coli* cells expressing the indicated single protein, or co-expressing ISA1 and ISA2 from *Arabidopsis* or maize, were separated by native-PAGE in a gel containing 0.3%  $\beta$ -limit dextrin, and then the gel was stained with  $I_2/KI$  solution. “Control” indicates extract from the *E. coli* host strain lacking a plasmid. Orange arrows indicate activities dependent on expression of ZmISA1 alone, the yellow arrow indicates an activity dependent on co-expression of ZmISA1 and ZmISA2, and green arrows indicate activities dependent on co-expression of AtISA1 and AtISA2. B, Purified maize proteins. The indicated amounts of affinity-purified proteins were separated by native-PAGE and then transferred to a gel impregnated with 0.3% starch. ISA activities were identified by  $I_2/KI$  staining. Duplicate native-PAGE lanes were analyzed by immunoblot using IgG specific for ZmISA1 or ZmISA2.

Total soluble endosperm extract from wild type maize (50 µg of proteins) was used as a control. Native ISA activities I, II, and III are labeled for reference to the text.



**Figure 3.** A, Reconstitution of *Arabidopsis* ISA. The indicated amounts of purified AtISA1 and AtISA2 were mixed, incubated at 0°C overnight, and then subjected to native-PAGE zymogram with transfer to the substrate gel. Purified, co-expressed ZmISA1/ZmISA2 and AtISA1/AtISA2 were included on the same gel as controls. B, Reconstituted ISA activity from ZmISA1 and AtISA2. Analysis as in panel A except that ZmISA1 was mixed with AtISA2. The arrow indicates reconstituted ZmISA1/AtISA2 activity.

## Molecular Mass of ZmISA1

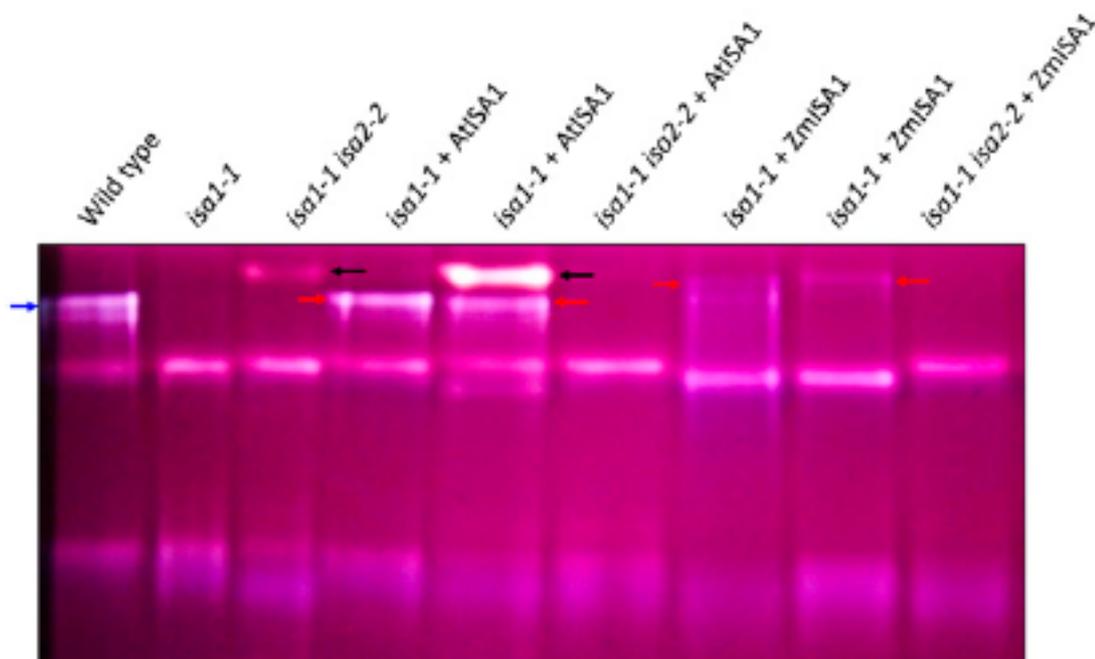
Availability of essentially pure, enzymatically active ZmISA1 afforded the opportunity to measure the molecular mass of the complex by sedimentation equilibrium. Activity and purity of freshly isolated ZmISA1 was confirmed by zymogram and SDS-PAGE (data not shown). Purified enzyme at three concentrations was centrifuged at three different speeds in a Beckman XL-A analytical ultracentrifuge.  $A_{280}$  was measured as function of the radius, and repeated scans over a three hour time period without any change confirmed the samples were at equilibrium. Ultrascan Analysis software (Demeler, 2005) was used to plot equilibrium protein distribution as a function of the square of the scanned radius, and the observed curves were compared to those predicted for various molecular association models (Supplemental Figure S2). The model with the lowest statistical variance from the observed data was that of a single component sedimenting with a molecular mass of 158 kDa, and the observed variance from the prediction for a 170 kDa single component was also a good fit (Supplemental Table S1). Considering that the monomer molecular mass of ZmISA1 is 85.0 kDa, the results indicate that the homomeric complex purified from *E. coli* is a dimer. No other molecular association models fit the observed data, e.g., monomer or tetramer. Full enzyme activity measured by zymogram was recovered at the end of the longest centrifugation (data not shown), indicating intactness of the complex throughout the analysis. The entire procedure was repeated twice from separate *E. coli* cell pellets with essentially identical results.

## Expression of Maize ISA1 in *Arabidopsis* Leaves

Binary plasmids were constructed to express either ZmISA1, or AtISA1 as a positive control, in transgenic plants (Supplemental Figure S3). Both transgenes contained the first 43 codons of the *Arabidopsis ISA1* cDNA, which are predicted by the ChloroP algorithm to encode a chloroplast transit peptide. In one instance, the transit peptide coding sequence is followed by codons 50 to 789 of the ZmISA1 cDNA, which constitute the mature protein after the maize transit peptide is removed. The hybrid cDNA was cloned into the entry vector pENTR D-TOPO and then sequenced to ensure integrity. Transfer to the destination vector pMDC32 generated plasmid pZmISA1, which included the 2X 35S promoter and NOS terminator for transcriptional controls as well as a selectable marker gene conferring hygromycin B resistance and T-DNA elements that direct integration into the plant genome (Curtis and Grossniklaus, 2003). The second binary plasmid, pAtISA1 is the same except that it contains the full-length AtISA1 cDNA sequence in place of the ZmISA1 cDNA.

Each plasmid was used for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis* carrying the null mutation *isa1-1* or double mutant carrying both *isa1-1* and a second null mutation, *isa2-2* (Wattebled et al., 2005; Wattebled et al., 2008). A total of 276 transformed plants were generated from seeds selected on MS medium containing hygromycin B, and presence of the transgene was confirmed on a subset of 40 individuals by PCR amplification from genomic DNA of a portion of the hygromycin B resistance gene. The transgenes in each of these plants represents an independent integration event.

Expression of ISA1 from the transgenes was demonstrated by observation in zymograms of enzyme activities not present in the parental lines. Total soluble leaf extracts were analyzed by zymograms with  $\beta$ -limit dextrin in the separation gel as described for *E. coli* cell extracts (Figure 4). As expected, the major band of ISA activity was absent in extracts of either *isa1-1* single mutants or *isa1-1 isa2-2* double mutants. An ISA activity band was recovered when AtISA1 was expressed from a transgene in the *isa1-1* single mutant host, but not when the host was the *isa1-1 isa2-2* double mutant. These results were expected from the fact that *isa2-* single mutants lack ISA activity (Zeeman et al., 1998). The ZmISA1 transgene was functional in *Arabidopsis* because an ISA activity band was recovered in the *isa1-1* single mutant host. ISA activity was not detected in total soluble extracts of *isa1-1 isa2-2* double mutants containing the ZmISA1 transgene, however, genetic function was indicated by the starch phenotype in such transformants as shown in the following section.

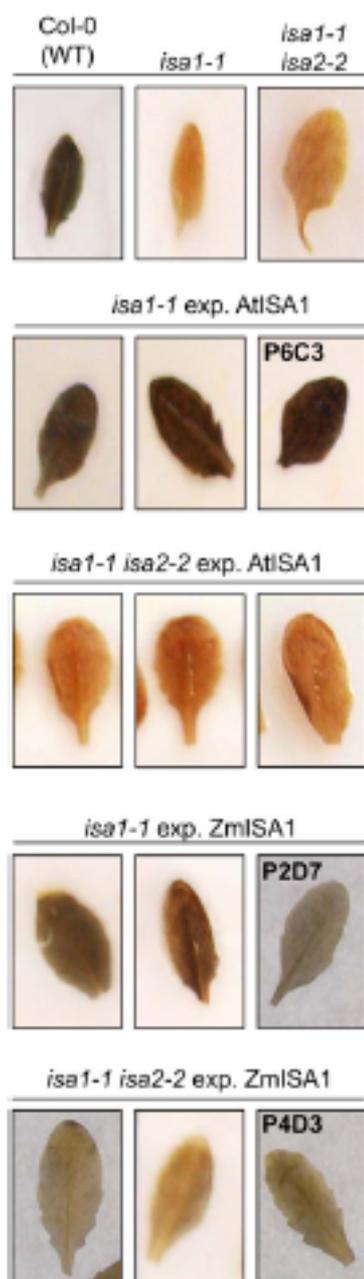


**Figure 4.**  $\beta$ -limit dextrin modifying activities in total soluble leaf extracts. Analysis was as in Figure 2A. *Arabidopsis isa1-1* single mutants or *isa1-1 isa2-2* double mutants were transformed with either full length AtISA1 or the hybrid protein ZmISA1 fused to the *Arabidopsis* ISA1 transit peptide. The blue arrow indicates native ISA activity in wild type and red arrows indicate ISA activities dependent on

presence of a transgene. The black arrow indicates a  $\beta$ -limit dextrin modifying activity that is variably present in leaf extracts including wild type lines.

### **Leaf Starch- and Water Soluble Polysaccharide Content**

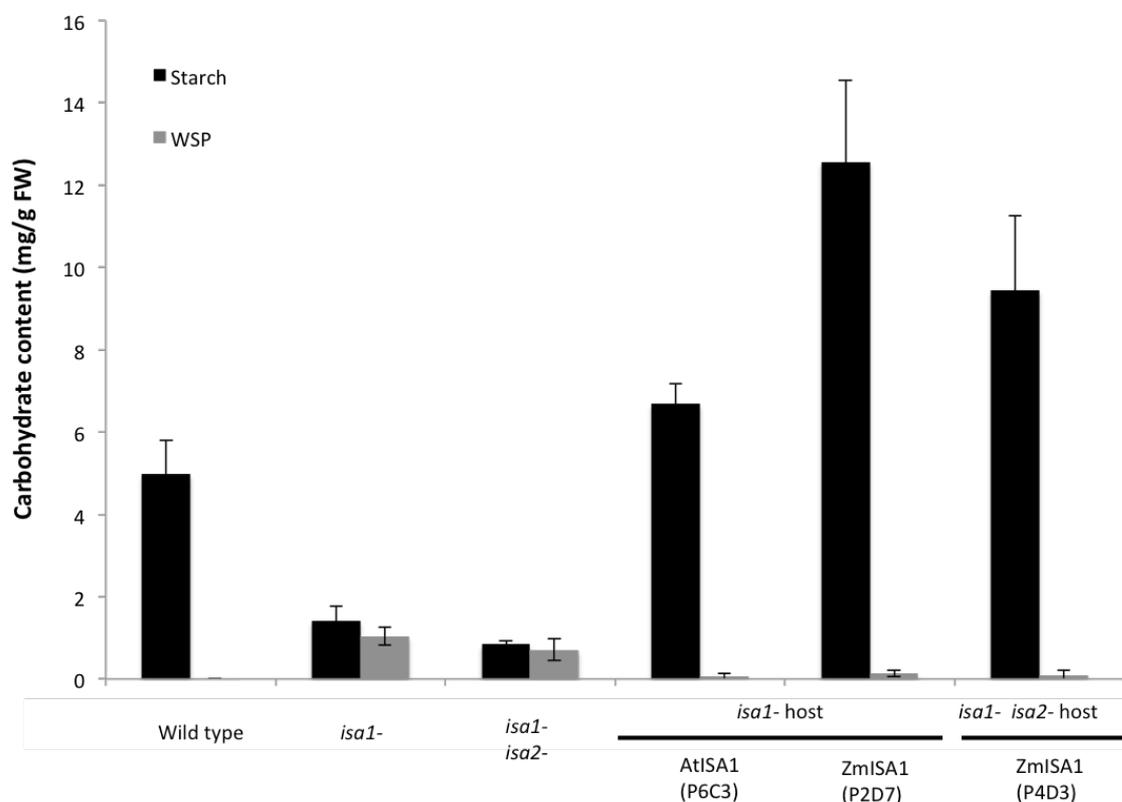
The starch accumulation phenotype of the transformants was first investigated by iodine staining of leaves harvested at the end of the illuminated period (Figure 5). Wild type leaves stain dark brown in this assay, whereas both *isa1-1* and *isa1-1 isa2-2* mutant leaves stain yellow/orange indicating low starch content. Leaves of hygromycin-resistant plants stained dark brown when AtISA1 was transgenically expressed in the *isa1-1* host, indicating the expected restoration of starch accumulation. The yellow/orange iodine-staining phenotype of *isa1- isa2-* double mutant leaves was unchanged by the AtISA1 transgene donated from pAtISA1 in any of 84 hygromycin-resistant plants tested, in agreement with previous data indicating requirement for ISA2. Presence of the ZmISA1 transgene from pZmISA1 in *isa1-* the mutant host resulted in a range of iodine-staining phenotypes, with leaves of some plants staining dark brown, others yellow/orange, and most displaying an intermediate phenotype. The ZmISA1 transgene expressed in *isa1- isa2-* double mutants resulted in some plants with an intermediate iodine-staining phenotype.



**Figure 5.** Indication of glucan phenotypes by iodine stains of decolorized leaves. Freshly harvested leaves were decolorized by incubation in 70% ethanol, and then stained with  $I_2/KI$  solution. Host genotypes and transgenes are indicated.

The quantity of leaf starch and water-soluble polysaccharide (WSP) normalized to fresh weight was determined in selected transformant lines (Figure 6). Soluble and granular glucans were extracted from mature leaves harvested at the end of a 16 h-illuminated period. Consistent with previous analyses, *isa1-1* and *isa1-1 isa2-2* mutants accumulated less starch than wild type and also contained WSP at levels approximately equal to those of the granular glucans. WSP was not detected at appreciable levels in wild type leaves. Starch accumulation was fully restored in an *isa1-1* host expressing AtISA1, line P6C3, and WSP accumulation was repressed to the residual level typical of wild type. Starch accumulation was also restored in the *isa1-1* host expressing ZmISA1 as seen in line P2D7. In that

instance the starch level was significantly higher than normal whereas the WSP content was negligible in this transformant line.



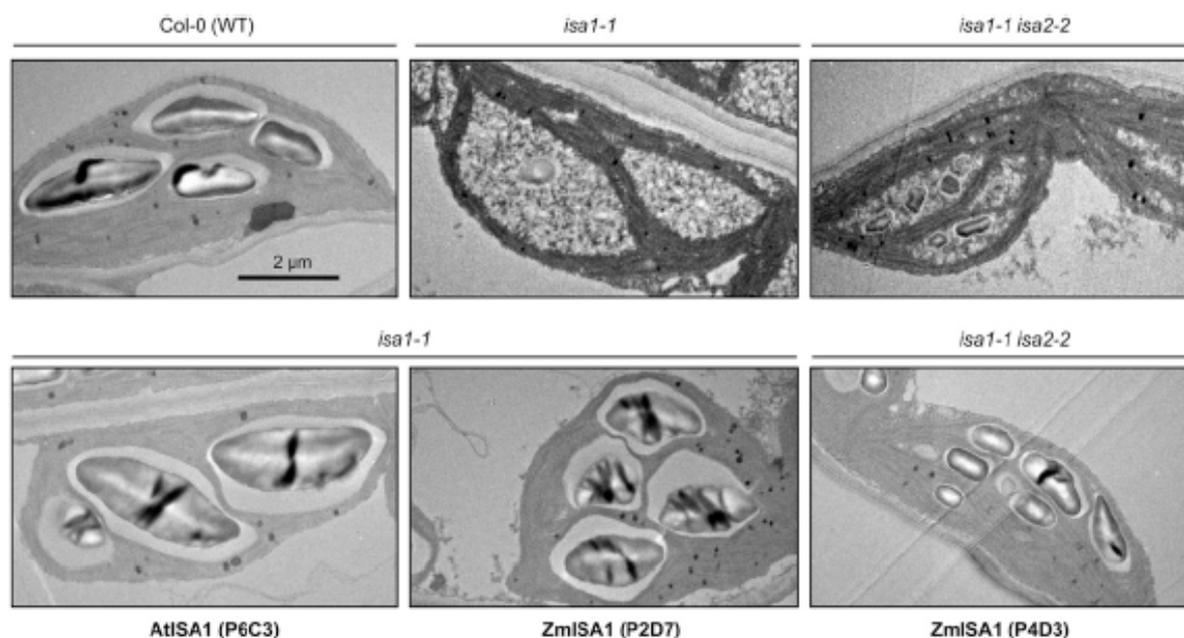
**Figure 6.** Starch and WSP contents determined in host and transgenic lines (as indicated in the figure). Contents are expressed in mg of carbohydrate per g of fresh weight (FW) and are the means of three independent biological replicates. Black and grey vertical bars indicate starch and WSP content respectively. Vertical lines on bars stand for standard error. Typically no or very low amount of WSP were detected for WT and transgenic lines expressing AtISA1 or ZmISA1 protein.

ZmISA1 supported granular starch accumulation to greater level than wild type when expressed in the *isa1-1 isa2-2* double mutant host, as seen in transformant line P4D3 (Figure 6). This is in contrast to the double mutant host expressing AtISA1, which never exhibited starch accumulation as judged by iodine staining. The WSP content was insignificant in line P4D3, indicating full complementation of the *isa1-1 isa2-2* double mutant phenotype by exogenous expression of ZmISA1 alone.

## Amylopectin Structure and Starch Granule Morphology

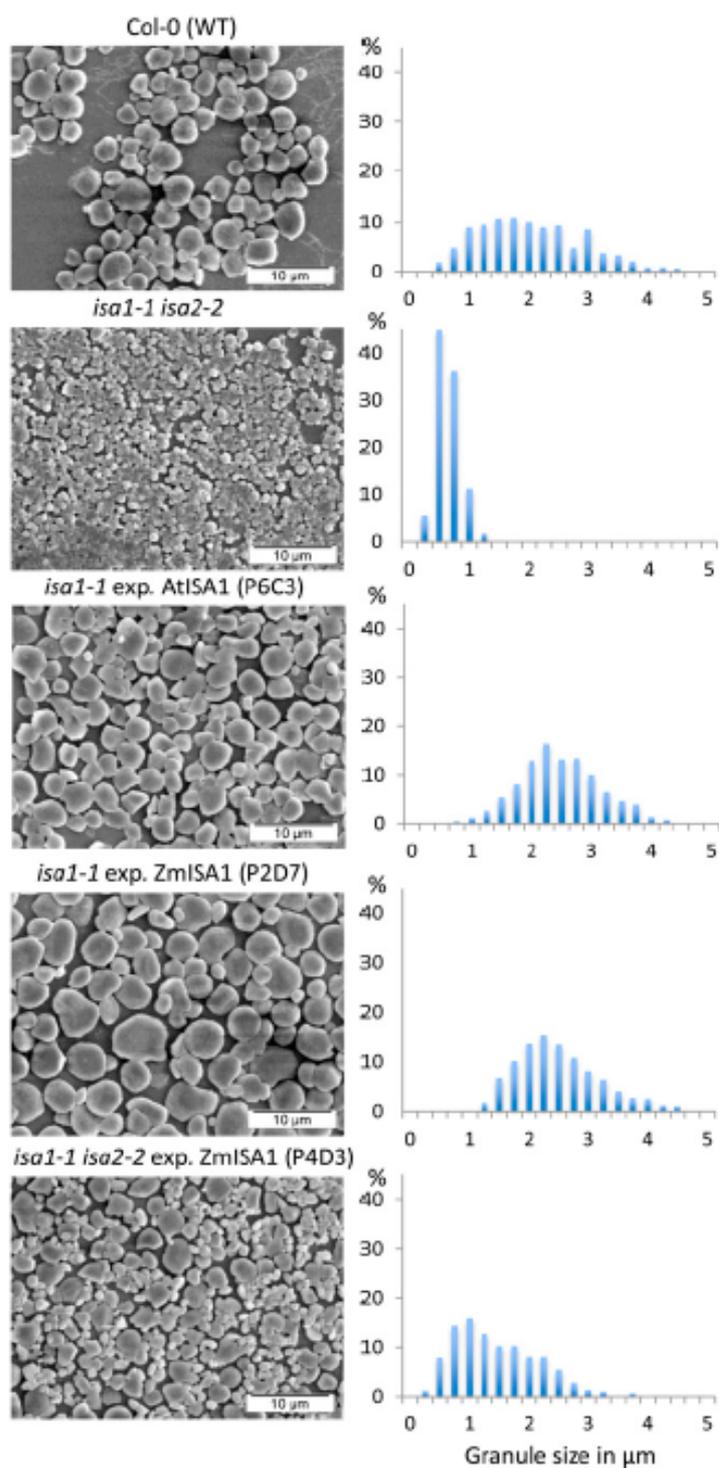
The linear chain length distributions (CLD) of leaf starch from the parental and transformant lines were determined. Polymers within purified granules were solubilized and completely debranched with commercial  $\alpha(1\rightarrow6)$ -glucosidases, then linear chains were separated by high-performance anion exchange chromatography at high pH and quantified by pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). The CLD profiles of starch from all transformants shown in Figure 6 were identical within technical limits to that of the wild type line (Supplemental Figure S4). Thus, the increased short chain frequency characteristic of *isa1*- single mutants and *isa1- isa2*- double mutants (Delatte et al., 2005; Wattedled et al., 2005) was not observed in any of the complementing lines.

Starch granule morphology, size, and quantity per chloroplast were characterized *in situ* by transmission electron microscopy (TEM) performed on ultrathin sections of *Arabidopsis* leaves harvested at the end of the illuminated period (Figure 7). The wild-type phenotype regarding granule size and shape within palisade mesophyll chloroplasts was restored when AtISA1 was expressed in the *isa1-1* host (line P6C3). This phenotype is obviously different from that of the *isa1-1* and *isa1-1 isa2-2* host lines that exhibited only small starch granules less than 1  $\mu\text{m}$  in diameter within stroma filled with WSP and surrounded by thylakoid structures. Accumulation of larger starch granules was also restored when ZmISA1 was expressed in the *isa1-1* mutant (line P2D7). Granule size and morphology were different from the wild type, however, when ZmISA1 was expressed in the *isa1-1 isa2-2* double mutant background (line P4D3). In this instance granules were smaller than in the wild type line but bigger than those found in the *isa1-1 isa2-2* double mutant. The number of starch granules per plastid was also increased in that transformant (mean:  $9.1 \pm 2.6$  granules per plastid) compared to the wild type line (mean:  $3.2 \pm 1.2$  granules per plastid).



**Figure 7.** Transmission electron microscopy observations. Leaves were harvested at the end of the illuminated period and fixed immediately. Images are show chloroplasts located within palisade mesophyll cells. The scale bar applies equally to all images. The host genotype and transgenically expressed ISA protein are indicated, as are line names for reference to the text.

Starch granule size distributions were more accurately determined by scanning electron microscopy (SEM) of purified particles. Granules in *isa1-1* host lines expressing ZmISA1 (line P2D7) were not only much larger than those of the *isa1-1* mutant but also bigger than those of the wild type line (Figure 8). Some granules in these transformant lines are 4.5 µm or more in diameter, which typically does not occur in wild type plants. In agreement with the TEM data, ZmISA1 transformants of the *isa1-1 isa2-2* host contained a heterogeneous granule size population including a majority of small, rounded, irregular granules with a diameter of 1 µm or less and some larger particles with an average diameter close to that of the wild type.



**Figure 8.** Scanning electron microscopy images of purified starch granules (host and transgenic lines are indicated) and corresponding size distribution histograms. The starch samples were prepared from Arabidopsis leaves harvested at the end of the illuminated period. The histograms were determined by measuring the apparent diameter of 600 particles per sample using the ImageJ program. Bar = 10µm.

## DISCUSSION

### Inherent Properties of Maize and *Arabidopsis* ISA1

Taken together the *in vivo* and *in vitro* data presented here support the conclusion that the gene encoding ISA1 has evolved in the Poaceae branch of monocotyledonous plants so that it possesses biochemical activity without participation of an ISA2 partner. This enzymatic activity provides metabolic functions within endosperm or leaf tissue to support the accumulation of starch granules.

ZmISA1 was obtained in essentially pure form after it was generated in *E. coli*, so that no other maize protein was present nor were there any post-translational modifications that potentially could occur in maize plants. The results are consistent with observation of enzymatically active protein complexes in rice and maize endosperm extracts that possess only ISA1, and extend those observations by proving that activity is inherent to the polypeptide itself. Recombinant AtISA1 was capable of enzymatic activity if mixed with recombinant AtISA2 but did not display such function on its own. Thus, the ZmISA1 polypeptide possesses inherent  $\alpha(1\rightarrow6)$  glucosidase activity, whereas AtISA1 does not.

The maize ISA1 protein, when expressed in *Arabidopsis* leaves lacking both endogenous ISA1 and ISA2, was able to support accumulation of starch to near wild type levels. The grossly modified morphology and number per plastid of these granules as seen by TEM and SEM was distinct from wild type, however, so ZmISA1 did not function identically to the native leaf enzyme. Such modified morphology of the starch granules may explain the puzzling iodine staining phenotype observed in line P4D3. Indeed, despite the WT level of starch accumulation measured in this *isa1-1 isa2-2* mutant expressing ZmISA1, the iodine staining gave an intermediate phenotype between those of the wild type (which is dark grey) and the double mutant *isa1-1 isa2-1* (which is yellow-orange). We have no obvious explanation for that issue, but morphological alteration of the starch granules (size and shape) may impact the interaction between the glucans and iodine molecules thus modifying the color of the complex and the staining phenotype of leaves. The CLD in the transformant was identical to wild type, so the differences in granule morphology could result from altered branch placement or from higher order assemblies of primary crystallization units. Maize ISA1 also suppressed accumulation of phytyglycogen in *Arabidopsis* leaves. The results indicate that homomeric ISA functions to support near normal starch accumulation in the context of leaf metabolism in which the native enzyme is heteromeric. These observations are again consistent with the conclusion that evolutionary divergence in the line including maize and rice has altered ISA1 so that it has gained enzymatic and biological function without participation of ISA2. This result excludes the hypothesis of the

existence of a molecular factor specifically present in maize or rice endosperm that control ISA1 activity even in the absence of ISA2.

The particular combination of ISA proteins present in *Arabidopsis* leaves affected granule size and morphology and number per plastid. This is evident from comparison of wild type granules generated using the AtISA1/AtISA2 heteromeric enzyme to the starch present in transformant lines containing ZmISA1 and AtISA2. Also, as noted, granule size differed when only ZmISA1 was present in the *isa1- isa2-* double mutant host. This effect is likely not due to the transgenic nature of the ISA1 gene, because when the *isa1-* host was transformed to express AtISA1 the granule morphology was essentially wild type. Thus, it appears that ISA2 functions physiologically to affect granule size and/or morphology. Analogous results were obtained in maize endosperm lacking ISA2, where a population of granules with reduced size was observed (Kubo et al., 2010). The mechanism by which ISA activity affects granule size remains to be determined. This could relate to the frequency of granule initiation (that could be affected by more or less abundant phytoglycogen molecules; Burton et al., 2002), or to structural differences in amylopectin architecture that affect the organization of primary crystallites into higher order suprastructures. Such architectural differences are not evident with regard to CLD, but branch linkage placement might be altered (without affecting the general length distribution of the amylopectin-forming glucan). For example, the distance (i.e. the number of glucose residues) between  $\alpha(1\rightarrow6)$  linkages within the amorphous lamella of an amylopectin cluster might be affected by the subunit constitution of the ISA enzyme, and this in turn could affect how the glucans (at the macromolecular level) assemble into granules.

### Structure of Recombinant Enzymes

Previous characterization of ISA enzymes from rice or maize endosperm identified two ISA1/ISA2 heteromeric enzyme complexes that separate in native-PAGE, in addition to a single ISA1 homomultimer (Utsumi and Nakamura, 2006; Kubo et al., 2010). Two heteromeric enzymes were also observed in the current study when recombinant ISA1 and ISA2 proteins produced from either maize or *Arabidopsis* cDNA sequences were combined. This observation implies that the two activity bands identified from native-PAGE are not explained by different post-translational modification states in the plant. The two heteromeric ISA activity bands may have different quaternary structure, i.e., they each possess a different assortment of ISA1 and ISA2 subunits. The relative abundance of the two heteromer mobility forms produced in *E. coli* was similar to the native enzymes, consistent with different assembly states that exist owing to association constants inherent to the folded polypeptides. Another potential explanation is that ISA2 can fold stably into different conformations (i.e.

subunit number) in complexes with ISA1 so that alternative charge to mass ratios could exist. This is not typical, however, a pullulanase-type starch debranching enzyme, which is a distantly related homolog of ISA, is known to exhibit such folding behavior (Henker et al., 1998; Renz et al., 1998).

Distinctions were noted between the native maize ISA complexes and the recombinant forms of these enzymes purified from *E. coli*. Specifically, the electrophoretic mobility of all three recombinant ISA complexes was greater than that of the corresponding assembly state from endosperm. A possible explanation for these properties is that the enzymes are post-translationally modified *in vivo* and this affects their mobility in native-PAGE by changing their charge to molecular mass ratios. Such alterations would apply equally to all three ISA complexes, and as noted would not be responsible for the existence of any particular activity band.

Analysis of the recombinant enzymes also indicates that heteromeric ISA is in equilibrium between associated and dissociated states, such that ISA1 homomer can assemble from subunits released from ISA1/ISA2 heteromer. This conclusion follows from the fact that only heteromeric forms are obtained initially when ZmISA1/ZmISA2 is purified owing to the affinity-tag specifically on ZmISA2. Thus, recovery of active ZmISA1 homomer requires dissociation of the heteromeric complex and re-association into a homomeric enzyme. These data suggest a dynamic equilibrium between the assembly states of ISA1 and ISA2.

The determination that recombinant ZmISA1 is a homodimer provides evidence that the enzyme complex exhibits an elongated structure. Homomeric ISA1 from rice was estimated based on GPC data to have a molecular mass of 420-480 kDa (Utsumi and Nakamura, 2006), and the maize endosperm ISA1 homomer had an apparent mass of approximately 300 kDa also judged by GPC (Kubo et al., 2010). This is contrast to the 160 kDa molecular mass demonstrated directly for recombinant ZmISA1 homomer by sedimentation equilibrium. Such determinations from GPC data are approximate, however, because this method separates molecules based on hydrodynamic volume and so rod-shaped or otherwise elongated molecules will appear to have artifactually large molecular masses when compared to spherical standards. From these considerations the data shown here indicate ZmISA1 homomer to be an elongated structure containing two oblong-shaped monomers connected end to end. The oblong shape of each monomer subunit is presumed based on the known structure of *Pseudomonas* isoamylase, which is approximately 40% identical to both ISA1 and ISA2. The conclusion is supported by observing an apparent molecular mass greater than 400 kDa when recombinant ZmISA1 was analyzed by GPC (data not shown), and by crystallographic data showing an elongated dimeric structure for recombinant ISA1 encoded by a *Chlamydomonas* cDNA (personal communication).

The shape of an active ISA complex as shown here could contribute to acquisition of a starch biosynthetic function from a primordial catabolic enzyme. ISAs present in the progenitor of the Archaeplastida presumably were degradative and acted as a monomer with a single active site as do current ISA3 enzymes and prokaryotic isoamylase relatives. Formation of a dimer or other multimeric structure, with an end to end arrangement of oblong shaped subunits, may have spaced the hydrolytic active sites a fixed distance from each other. Action of such an enzyme on a glycogen-like molecule potentially could contribute to the generation of products that are capable of crystallization, by generating a regular spacing of densely branched and infrequently branched regions of the molecule according to the model reviewed elsewhere (Hennen-Bierwagen et al., 2012).

Data regarding recombinant ZmISA1 homodimer do not imply that heteromeric forms of ISA are necessarily dimers as well. These enzymes from rice or maize endosperm consistently elute later than homomultimeric ISA1 on GPC columns, so they likely have a different subunit structure. Inclusion of a non-catalytic subunit, i.e., ISA2, in a multimeric structure potentially could allow alternatives for the spacing of the active sites, and thus provide variability in the fine structures that could be generated from a precursor glucan prior to crystallization and assumption of subsequent higher order structures. Such variability in the architecture of molecules generated as the result of ISA complex activity may in turn explain evolutionary selection for ISA2.

## **CONCLUSION**

Maize and *Arabidopsis* ISA1 polypeptides have evolved separately so that the monocot protein possesses enzymatic activity by itself whereas the dicot protein requires an ISA2 partner. Recombinant maize ISA1 assembles into a homodimer with an elongated shape.

## MATERIALS AND METHODS

### Expression and Purification of Recombinant ISA Proteins

Two operon sequences that specify AtISA1 and AtISA2 or ZmISA1 and ZmISA2 were synthesized chemically (GenScript, Piscataway, USA) (Supplemental Figure S1). The order of the elements in the synthetic operons starting from the 5' end is as follows: 1) *Bgl*II restriction site, 2) ATG codon, 3) ISA1 coding region beginning at the predicted N terminus, 4) *Hind*III site, 5) stop codon, 6) ribosome binding site (i.e., the Shine-Dalgarno sequence), 7) *Bam*HI site, 8) ATG codon, 9) ISA2 coding region beginning at the predicted N terminus, 10) *Xho*I site. ISA1 genes were excised from the synthetic operons as *Bgl*II/*Hind*III fragments and cloned into the unique *Bgl*II/*Hind*III sites of pBE1343 immediately downstream of the ribosome binding site sequence of the expression vector. In these constructs the ISA1 coding regions are followed by 15 codons derived from pBE1343 that specify the sequence KLAAALEHHHHHHHH, then a stop codon. ISA2 genes were excised from the synthetic operons as *Bam*HI/*Xho*I fragments and cloned into the unique *Bgl*II/*Xho*I sites of pBE1343. In these instances the C terminal nucleotides from the vector specify the sequence LEHHHHHHHH. For co-expression, the ISA1/ISA2 sequences, separated by a ribosome binding site, were cloned as *Bgl*II/*Xho*I fragments into pBE1343, so that the ISA1 protein is not tagged and the ISA2 protein contains an 8X His-tag.

For analysis of ISA activities in total *E. coli* extracts, expression plasmids were introduced into thermocompetent *E. coli* BL21 DE3 cells (Invitrogen, Saint Aubin, France). Cultures containing 10 mL of LB medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin were seeded with 1 mL of overnight preculture and grown at 37°C with shaking to OD<sub>600</sub> ≈ 0.5. Expression from the T7 promoter of pBE1343 was induced by addition of 1 mM IPTG and cultures were grown for 4 h at 30°C. Cells were recovered by centrifugation (2,000 g, 10 min, 4°C) and the pellet was suspended in 500 µL of buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.0). Cells were lysed by pulse sonication (two times for 20 s each, on ice) and the lysate was centrifuged at 25,000 g for 2 min at 4°C. Protein concentration in the supernatant was assayed by the Bradford method (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) (Bradford, 1976) prior to zymogram analysis.

For protein purification, the same plasmids were introduced into *E. coli* host strain Rosetta BL21(DE3)pLysS (EMD Biosciences) and fresh single colonies were inoculated into 10 mL cultures of LB medium supplemented with 50 mg/mL kanamycin and 34 mg/mL chloramphenicol. After growth at 37°C overnight the entire pre-growth culture was added to a 1 L culture of the same medium, which was grown at 37°C with shaking at 200 rpm for about 4 h until the A<sub>600</sub> ≈ 0.8. Cultures were then cooled to 16°C, IPTG was added to a final

concentration of 0.1 mM, and growth was continued at 16°C overnight. Cells were collected by centrifugation at 5,000 rpm for 10 min at 4°C, suspended in 20 mL sonication buffer (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 1 mg/mL lysozyme, 1X protease inhibitor cocktail [Sigma catalog no. P-2714]) and stored -80°C in approximately 10 mL portions until further use.

Cell pellets were thawed and sonicated 10 times for 30 s each, cooling on ice between treatments. Crude lysates were centrifuged at 16,000 rpm for 30 min at 4°C, then the supernatant was passed through a 0.2 µm syringe filter and loaded onto a 1 mL bed volume HisTrap FF column (GE Healthcare catalog no. 17-5319-01) pre-equilibrated in Buffer A (20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.5 M NaCl). In this and subsequent chromatography steps the flow rate was 1 mL/min. The column was washed successively with 20 mL Buffer A containing 20 mM imidazole, then 20 mL of Buffer A containing 50 mM imidazole, then 5 mL of Buffer A containing 90 mM imidazole. Proteins were eluted in 5 mL of elution buffer (Buffer A containing 300 mM imidazole), concentrated to 0.5 mL by centrifugal filtration, and used immediately for further analysis or stored at -20°C in elution buffer adjusted to 1 mM DTT and 10% glycerol. ZmlSA1 retained activity for up to 1 week in this storage condition, however, co-expressed ZmlSA1/ZmlSA2 was not stable upon freezing.

### Zymogram Assays

Zymograms were performed either with substrate in the running gel or with electrophoretic transfer to a gel impregnated with substrate. Proteins (100 µg) were loaded on a native 7.5% polyacrylamide gel containing 0.3% of β-limit dextrin (Megazyme, Wicklow, Ireland) at final concentration. After migration in an electric field of 15 V.cm<sup>-1</sup> for 3 h at 4°C in separation buffer (25 mM Tris, 200 mM glycine, 1 mM DTT) the gel was incubated overnight at room temperature in fresh separation buffer. Glucan-modifying activities were revealed by soaking the gel in fresh I<sub>2</sub>/KI solution. *E. coli* extracts for these assays were prepared as described in the previous section. *Arabidopsis* extracts for zymogram analyses were prepared from two to three leaves harvested at midday. Leaves were homogenized in 50 µL of ice-cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.0. The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 5 min at 4°C and proteins in the supernatant were quantified by Bradford assay. Zymogram analysis of recombinant proteins purified from *E. coli* was performed as described previously using transfer to substrate gels containing 0.3% solubilized starch (Kubo et al., 2010).

### ***Arabidopsis thaliana* lines, growth conditions and media**

*Arabidopsis thaliana* lines of the Columbia ecotype were used in this study. The wild type line was indicated as Col-0. The single mutant lines *isa1-1* and *isa2-2* were engendered by T-DNA insertion mutagenesis (Alonso et al., 2003; Wattedled et al., 2005) and were provided by the Nottingham Arabidopsis Stock Centre. The *isa1-1*, *isa2-2* double mutant line was obtained by a cross between the two corresponding single mutants and screening of the progeny by PCR amplification of genomic DNA using a T-DNA end primer and gene-specific primers.

Seeds were stratified for 48 hours in the dark at 4°C in Phytigel solution 0.1% (p/v) and were sown subsequently on loam « FloraFleur » (TREF<sup>®</sup>) pre-treated with Trigard (Syngenta<sup>®</sup>). Plants were grown in greenhouse with a photoperiod of 16 h light/8 h dark at 20°C during the illuminated period and 18°C during the night.

### **Construction of Binary Vectors for Protein Expression in *Arabidopsis thaliana***

A chimeric DNA construction comprising the coding sequence of the AtISA1 transit peptide and the mature ZmISA1 protein was created by PCR. The first 43 codons of the AtISA1 cDNA were used as the transit peptide according to the ChloroP algorithm prediction (Emanuelsson et al., 1999).

Primers 2For (CACCATGGATGCAATCAAATGCAGTTCCAGTTTC) and 4Rev (CCGCCTGCACCGCCTCGGCCACGGAAATCGAAATCGGACGGAAG) were used to amplify this sequence from an AtISA1 cDNA clone and to add a 3' sequence overlapping the 5' end of the ZmISA1 coding sequence. Conditions for this PCR reaction were: 94°C 5 min, [94°C 45 sec, 59°C 45 sec, 72°C 45 sec] x 35, 72°C 5 min. The amplified fragment was mixed with a DNA fragment including the ZmISA1 cDNA sequence (10 ng each) and subjected to one cycle of extension by DNA polymerase by incubation at 94°C for 5 min, 59°C for 45 sec, 72°C for 5 min. The chimeric fragment was then amplified by PCR using primers 2For and 6Rev (TCAGACATCAGGGCGCAATACAAGGATG) carried out in the following conditions: 94°C 5 min, [94°C 45 sec, 59°C 45 sec, 72°C 3 min 20 sec] x 35, 72°C 5 min. PCR reactions were carried out with Kappa HiFi polymerase (CliniSciences, Nanterre, France) following supplier's instructions. The same PCR protocol was used to amplify the full-length sequence coding AtISA1, including the transit peptide, from a cDNA clone using primers 2For and 5Rev (TCAGGGGTCTTTAATTGGTGAAAGAAGGA).

After the final PCR amplification, the fragments of interest, i.e., the full length coding sequence of AtISA1 or the mature sequence of ZmISA1 with the transit peptide of AtISA1, were purified with the NucleoSpin ExtractII kit (Marcherey-Nagel EURL, Hoerd, France) and

ligated into the pENTR-D-TOPO vector by the TOPO cloning method (Invitrogen, Saint Aubin, France). Recombinant plasmids were selected, amplified and stored in the *E. coli* TOP10 strain. The constructions were verified by restriction enzyme mapping and DNA sequencing. The ISA coding regions were then transferred from the pENTR-D-TOPO vector to the pMDC32 destination vector (Curtis and Grossniklaus, 2003) using LR Clonase II following supplier's instructions (Invitrogen, Saint Aubin, France). These final vectors were stored at -80°C in *E. coli* TOP10 cells.

### **Arabidopsis Transformation**

Prior Arabidopsis transformation, the pMDC32 vectors were introduced in *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 by a freeze and thaw method as described in Jyothishwaran et al. (2007). An adaptation of the Floral-Dip method was used to transform *isa1-1* and *isa1-1, isa2-2* mutants of *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al., 2006; Martinez-Trujillo et al., 2004). Harvested seeds were then analysed for the presence of the construction. Seeds were sown on Murashigue and Skoog 1% medium (1% agar) containing 20µg.mL<sup>-1</sup> of Hygromycin B (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and germinated in growth cabinets (22°C, 80% of humidity and a specific photoperiod according to Harrison et al. (2006). The plants harbouring the hygromycin B resistant phenotype were then transferred to soil in greenhouse (16h light/ 8h night). The presence of the transgene in the selected hygromycin resistant individuals was verified by PCR amplification of a region of the hygromycin B resistance gene using primers HygrRFor (GATGTAGGAGGGCGTGGATA) and HygrRRev (GATGTTGGCGACCTCGTATT) with the following reaction conditions: 94°C 5 min, [94°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 60 sec] x 36, 72°C 5 min.

### **Iodine Staining of Leaves**

Leaves harvested at the end of the light period were immediately immersed in 70% ethanol and heated at 70°C for 30 min with regular shaking to remove pigments. This operation was repeated until bleaching was complete. Leaves were then rinsed with water, immersed in 1% KI, 0.1% I<sub>2</sub> (I<sub>2</sub>/KI) until homogenous staining, rinsed again in water, and photographed.

### **Extraction and Quantification of Starch and WSP**

Arabidopsis leaves were harvested at the end of the day, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before extraction. Starch and WSP were extracted by the

perchloric acid method (Delatte *et al.*, 2005) adapted as follows: about 1 g of leaves was homogenized with a polytron blender in 5.5 mL of 0.7 M perchloric acid. The crude lysate was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C to separate the pellet, which contains starch, and the supernatant that contains WSP. The pellet was rinsed three times with sterile deionized water. An aliquot was collected for glucan assay (described hereafter) and the rest of the sample was treated to further purify the starch. To this end, the pellet was resuspended in sterile deionized water and filtered through two layers of Miracloth (Calbiochem, Darmstadt, Germany). The starch pellet was further purified by isopicnic centrifugation in Percoll (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) at 10,000 g for 1 h at 4°C. The pellet was rinsed twice with sterile deionized water and stored in 20% ethanol at 4°C until use.

The supernatant obtained from the crude lysate was neutralized with 2 M KOH, 0.4 M MES, 0.4 M KCl. The potassium perchlorate precipitate was removed by centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was stored at -20°C until use.

Insoluble (starch) and soluble (WSP) polysaccharides were assayed, as describe by Wattebled *et al.* (2005), by the spectrophotometric method after complete digestion of the polysaccharides by amyloglucosidase following supplier's instructions (R-Biopharm, Saint Didier au Mont d'Or, France).

### **Starch Chain Length Distribution**

Debranching reactions and starch CLD determination by HPAEC-PAD using a PA200 CarboPac column (Dionex, Courtaboeuf, France) were performed according to the procedure described previously (Roussel *et al.*, 2013).

### **Transmission and Scanning Electron Microscopy**

Arabidopsis or maize leaves harvested at the end of the light period of the diurnal cycle were cut with a fresh razor blade into small pieces a few millimetres on edge and immediately immersed in fixative (0.1 M cacodylate, pH 7.2, 2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde). Vacuum was applied for 30 min. Leaf samples were embedded in Spurr's resin, then postfixed with 1% osmium tetroxide, sectioned to a thickness of 80 nm, affixed to grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Transmission electron microscopy (TEM) observation was performed with a Jeol 2100 microscope operating at 200 kV.

Scanning electron microscopy (SEM) was performed as follows: droplets of starch granule suspensions were allowed to dry on freshly cleaved mica. After coating with Au/Pd, they were observed in secondary electron mode using a Jeol JSM6300 microscope

operating at 8 kV. Size-distribution histograms were determined by measuring the apparent diameter of 600 particles per sample from the SEM images, using the ImageJ software.

### Sedimentation Equilibrium

ZmlSA1 was expressed in *E. coli* and purified as described by Ni<sup>2+</sup>-affinity chromatography. Proteins were diluted in the affinity column elution buffer at concentrations of 3.76 µM, 6.47 µM, or 8.47 µM and loaded into a 6-channel cell in the XL-A ultracentrifuge. The samples were centrifuged at 8,500 rpm for 38.25 h until equilibrium was attained as shown by A<sub>280</sub> scans performed over a 3 h time period. Speed was then increased to 10,200 rpm for an additional 18.25 h until a new equilibrium was attained. A third equilibrium distribution was then recorded after increasing the speed to 12,000 rpm and centrifuging for an additional 10.75 h. Equilibrium scans of A<sub>280</sub> across the radius of the centrifuge cell were compared using UltraScan Analysis software (Demeler, 2005) to the distributions predicted for single or multiple component systems of given molecular mass components.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Christine Lancelon-Pin (CERMAV) for the SEM observation of purified starch granules.

### LITERATURE CITED

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadriab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003)** Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Ball S, Colleoni C, Cenci U, Raj JN, Tirtiaux C (2011)** The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J Exp Bot* **62**: 1775-1801
- Ball S, Guan H-P, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buleon A, Colonna P, Preiss J (1996)** From glycogen to amylopectin: a model for the biosynthesis of the plant starch granule. *Cell* **86**: 349-352
- Ball SG, Morell MK (2003)** From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 207-233

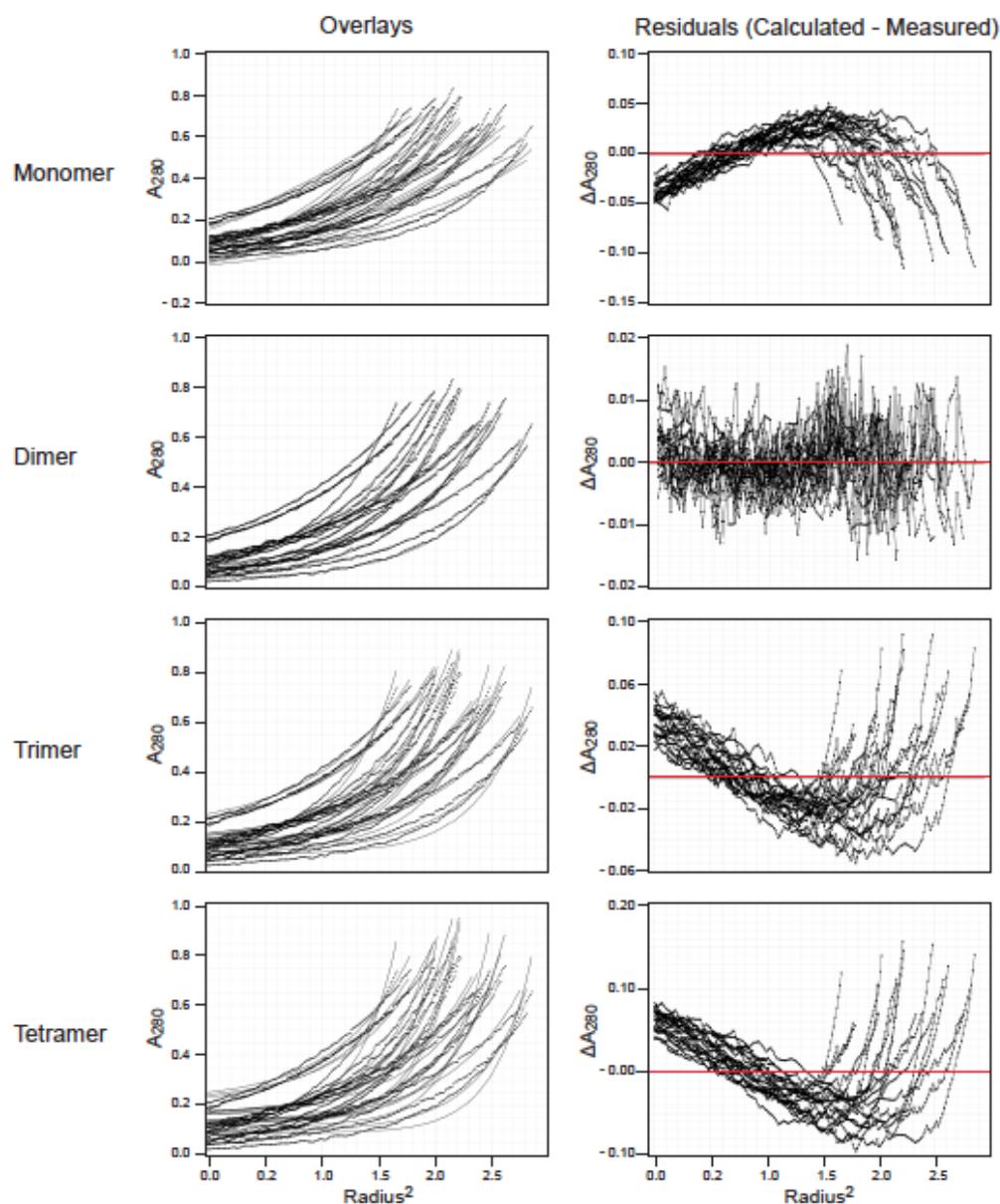
- Ball SG, Subtil A, Bhattacharya D, Moustafa A, Weber APM, Gehre L, Colleoni C, Arias MC, Cenci U, Dauvillee D** (2013) Metabolic effectors secreted by bacterial pathogens: Essential facilitators of plastid endosymbiosis? *The Plant Cell* **25**: 1-15
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254
- Buleon A, Colonna P, Planchot V, Ball S** (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* **23**: 85-112
- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, Laurie DA, Parker M, Waite D, van Wegen S, Verhoeven T, Denyer K** (2002) Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *The Plant Journal* **31**: 97-112
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM** (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2215-2220
- Coppin A, Varre JS, Lienard L, Dauvillee D, Guerardel Y, Soyer-Gobillard MO, Buleon A, Ball S, Tomavo S** (2005) Evolution of plant-like crystalline storage polysaccharide in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* argues for a red alga ancestry. *J Mol Evol* **60**: 257-267
- Curtis MD, Grossniklaus U** (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**: 462-469
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC** (2005) *Arabidopsis* mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J* **41**: 815-830
- Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM, Zeeman SC** (2006) Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J Biol Chem* **281**: 12050-12059
- Demeler B** (2005) A comprehensive data analysis software package for analytical ultracentrifugation experiments. In DJ Scott, SE Harding, AJ Rowe, eds, *Modern Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*. Royal Society of Chemistry, UK, pp 210-230
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* **8**: 978-984
- Harrison S, Mott E, Parsley K, Aspinall S, Gray J, Cottage A** (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* **2**: 19
- Henker A, Schindler I, Renz A, Beck E** (1998) Protein heterogeneity of spinach pullulanase results from the coexistence of interconvertible isomeric forms of the monomeric enzyme. *Biochem. J.* **331**: 929-935
- Hennen-Bierwagen TA, James MG, Myers AM** (2012) Involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis. In IJ Tetlow, ed, *Essential Reviews In Experimental Biology, Volume 5. The Synthesis and Breakdown of Starch, Vol 5*. Society For Experimental Biology
- Hirabaru C, Izumo A, Fujiwara S, Tadokoro Y, Shimonaga T, Konishi M, Yoshida M, Fujita N, Nakamura Y, Yoshida M, Kuroiwa T, Tsuzuki M** (2010) The primitive rhodophyte

- Cyanidioschyzon merolae contains a semiamylopectin-type, but not an amylose-type, alpha-glucan. *Plant and Cell Physiology* **51**: 682-693
- Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman S, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R** (2003) Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* **15**: 133-149
- Ishizaki Y, Taniguchi H, Maruyama Y, Nakamura M** (1983) Debranching enzymes of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). I. Purification and some properties of potato isoamylase. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**: 771-779
- James MG, Robertson DS, Myers AM** (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**: 417-429
- Jyothishwaran G, Kotresha D, Selvarj T, Srideshikan SH, Rajvanshi PK, Jayabaskaran C** (2007) A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science* **93**: 770-772
- Kubo A, Colleoni C, Dinges JR, Lin Q, Lappe RR, Rivenbark JG, Meyer AJ, Ball SG, James MG, Hennen-Bierwagen TA, Myers AM** (2010) Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch debranching enzymes in developing maize endosperm. *Plant Physiol* **153**: 956-969
- Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce J, Herrera-Estrella L** (2004) Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter* **22**: 63-70
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S** (1996) Preamylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**: 1353-1366
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG** (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **122**: 989-997
- Nakamura Y, Umemoto T, Takahata T, Komae K, Amano E, Satoh H** (1996) Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm: Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **97**: 491-498
- Renz A, Schikora S, Schmid R, Kossmann J, Beck E** (1998) cDNA sequence and heterologous expression of monomeric spinach pullulanase: multiple isomeric forms arise from the same polypeptide. *Biochem. J.* **331**: 937-945
- Roussel X, Lancelon-Pin C, Viksø-Nielsen A, Rolland-Sabaté A, Grimaud F, Potocki-Véronèse G, Buléon A, Putaux J-L, D'Hulst C** (2013) Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**: 2167-2177
- Utsumi Y, Nakamura Y** (2006) Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homooligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm. *Planta* **225**: 75-87

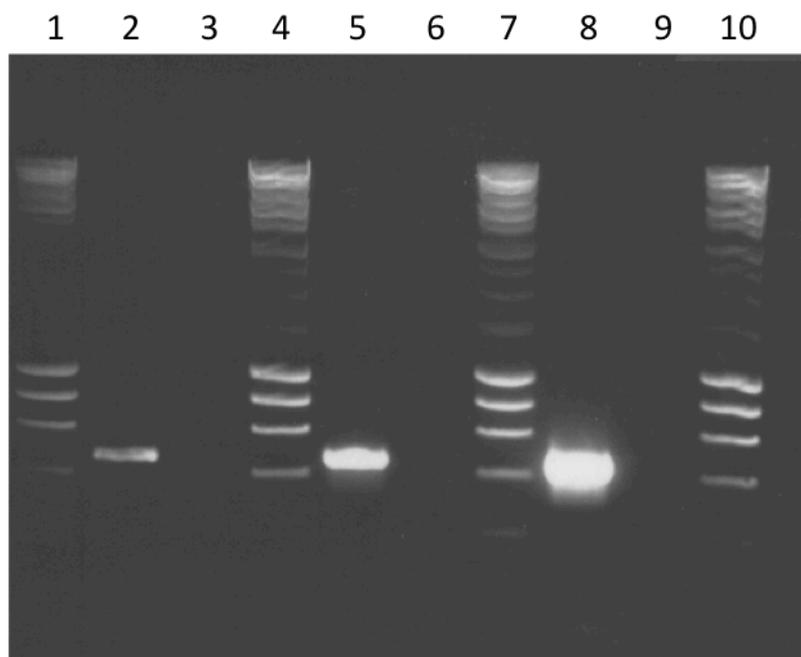
- Utsumi Y, Utsumi C, Sawada T, Fujita N, Nakamura Y** (2011) Functional diversity of isoamylase oligomers: The ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiol* **156**: 61-77
- Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvalle D, Planchot V, Berbezy P, Vyas D, Colonna P, Chatterjee M, Ball S, D'Hulst C** (2005) Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol* **138**: 184-195
- Wattebled F, Planchot V, Dong Y, Szydlowski N, Pontoire B, Devin A, Ball S, D'Hulst C** (2008) Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* **148**: 1309-1323
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue W-L, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J** (1998) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1711
- Zhang X, Henriques R, Lin S-S, Niu Q-W, Chua N-H** (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Protocols* **1**: 641-646

**Figures supplémentaires:**

Les Figures supplémentaires 1 et 3 qui décrivent les séquences des inserts et les vecteurs utilisés dans ce travail sont disponibles à la fin de ce manuscrit.

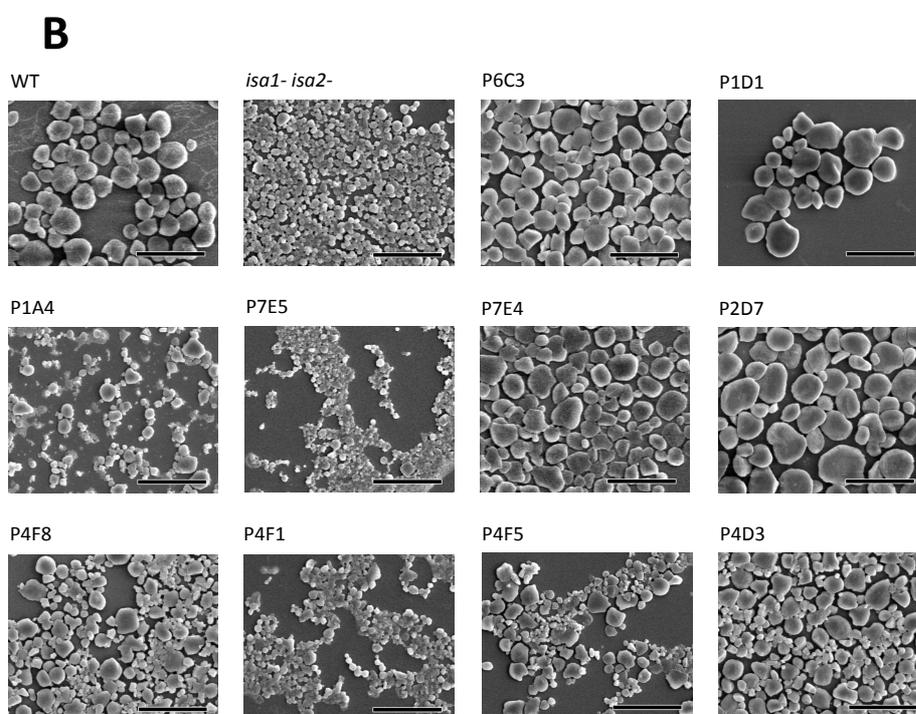
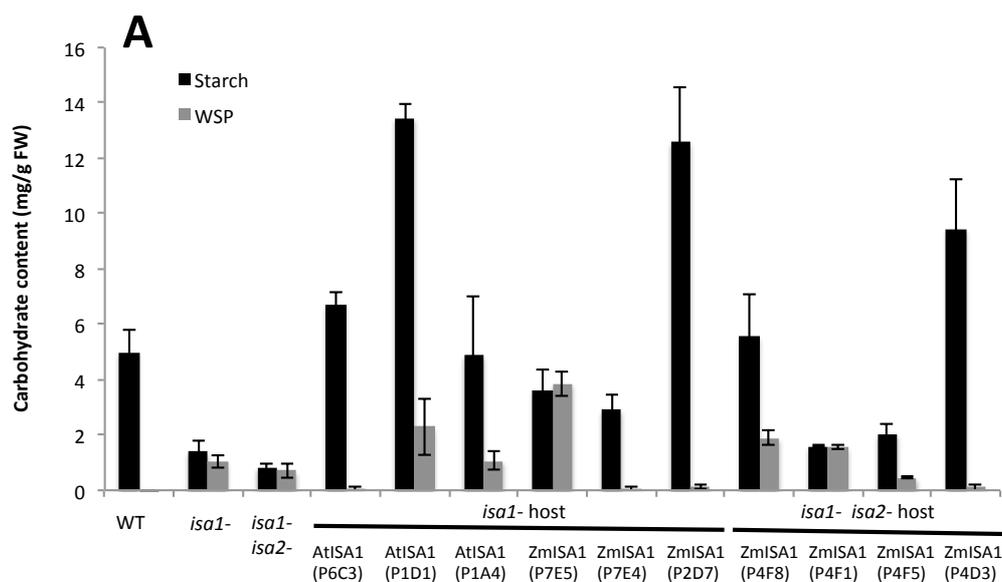


Supplemental Figure S2: Sedimentation equilibrium curve fitting. Overlays show the calculated protein concentration for a single sedimenting species as a function of the square of the centrifuge cell radius (solid line) and the measurement of  $A_{280}$  at that position (points). Models are based on a monomer molecular weight of 85 kDa as known from the mature ISA1 amino acid sequence. Residuals show the difference between the calculated and measured protein concentration at each position in the cell. Note that the scale varies between the Residuals plots. Each panel shows data for three different protein concentrations brought to equilibrium at three different centrifugation speeds.



Supplemental Figure S4: Expression of the *ZmISA1* transgene in the *Arabidopsis isal isa2-* mutant host line. Leaf cell RNAs were extracted from the *isal- isa2-* host strain expressing *ZmISA1* using the plant RNeasy kit from Qiagen (Courtaboeuf, France). The RT-PCR amplification was performed using the OneStep RT-PCR kit from Qiagen (Courtaboeuf, France). Different amounts of the amplicons were loaded on a 1,5% agarose gel (lanes 2, 5 and 8: 2 $\mu$ l, 5 $\mu$ l and 20 $\mu$ l respectively). The amplicons were then sequenced.

To control that the amplification with the same protocol, except that we avoid the reverse transcription step. Again, different amount of amplicons were loaded on a 1,5% agarose gel (lane 3, 6 and 9: 2 $\mu$ l, 5 $\mu$ l and 20 $\mu$ l respectively). A molecular size marker was loaded on lanes 1,4 7 and 10 (Smart Ladder MW-1700-10 from Eurogentec, Seraing, Belgium).



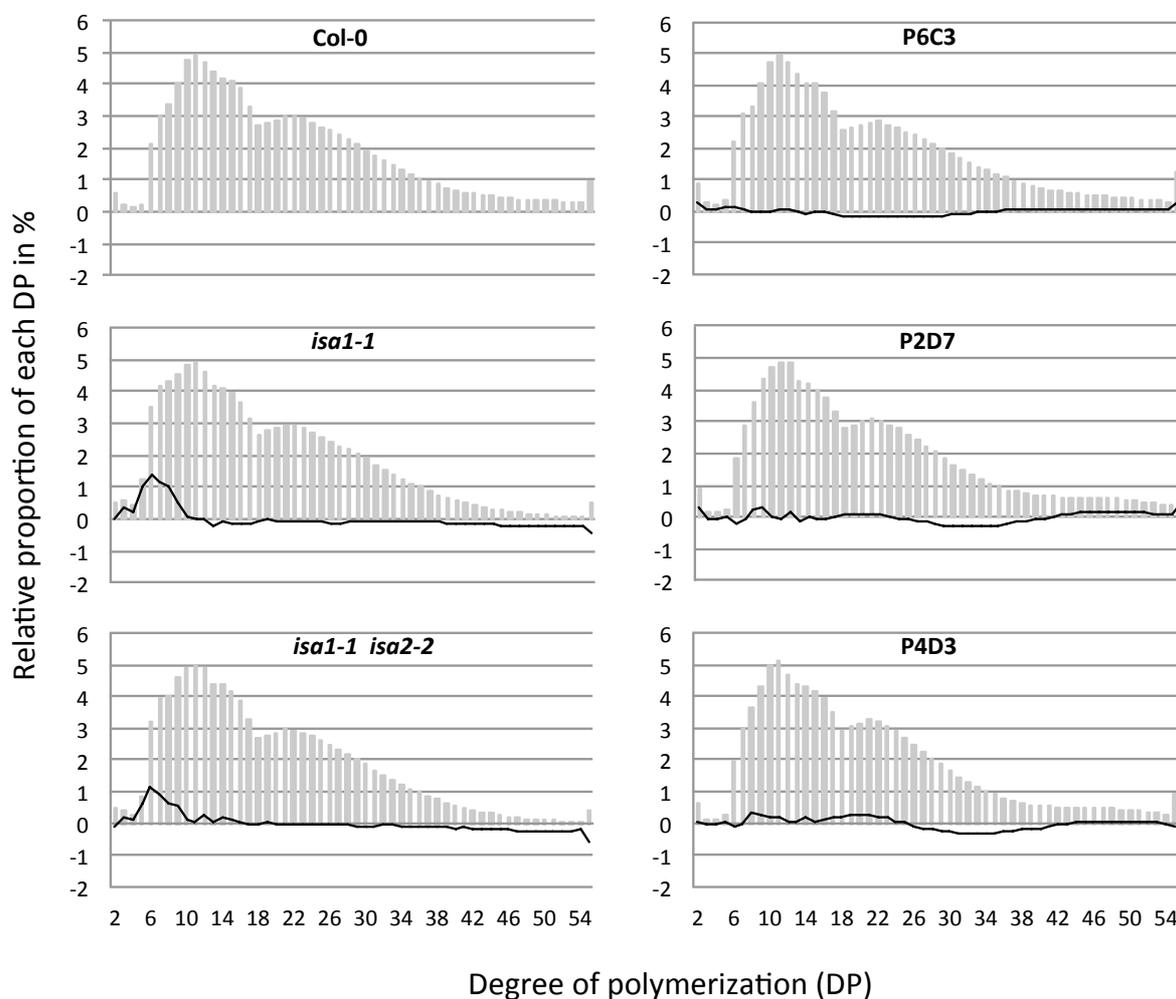
Scale bars = 10  $\mu$ m

Supplemental figure S5:

Panel A: Starch and WSP contents determined in host and transgenic lines (as indicated in the figure). Contents are expressed in mg of carbohydrate per g of fresh weight (FW) and are the means of three independent biological replicates. Black and grey vertical bars indicate starch and WSP content respectively. Vertical lines on bars stand for WT (Wild Type) and transgenic lines expressing AtISA1 or ZmISA1 protein.

Panel B: Scanning electron microscopy images of purified starch granules (host and transgenic lines are indicated). The starch samples were prepared from Arabidopsis leaves harvested at the end of the illuminated period (16h light / 8j dark). Scale bars = 10  $\mu$ m.

Note that some transformants were not complementing although they were hygromycine resistant: P7E5 (*isa1*-exp. *ZmISA1*) and P4F1 (*isa1*- *isa2*- exp. *ZmISA1*). Rearrangement of the transgene may have occurred during integration into the nuclear genome of the plant leading to an alteration of the *ZmISA1* open reading frame and consequently of its expression.



Supplemental Figure S6 : Chain length distribution of amylopectin-forming glucans. After 10 min boiling in water, starch was debranched with a mix of isoamylase from *Pseudomonas sp.* and pullulanase from *K. pneumoniae*. Digestion products were separated according to their degree of polymerization and quantified by HPAEC-PAD. The relative amount (bars) of each glucan DP (x-axis) is expressed as a percentage of the total number of chains presented in the figure (From DP2 to DP54 ; the last bar represent the percentage of glucans with a degree of polymerization above 54 glucose residues). A black line, superposed on each mutant profile, displays the difference between the mutant and wild-type profiles.

Col-0 : wild type line. *isa1-1* and *isa1-1 isa2-2* host expressing *ZmISA1*) : transformed lines.

## II. Etude du fonctionnement des isoamylases dans les feuilles de maïs

Cette étude est complémentaire de la première et vise à déterminer pourquoi la sous-unité non catalytique ISA2 est conservée chez toutes les plantes étudiées alors qu'ISA1 est capable, dans certains cas, de fonctionner seule.

En effet, dans certains tissus, comme la feuille d'*Arabidopsis* ou le tubercule de pomme de terre, ISA1 nécessite la présence d'ISA2 pour obtenir un oligomère actif, tandis que dans l'albumen de maïs ou de riz ISA1 peut fonctionner sous la forme d'un homomultimère qui suffit à la production quasi normale d'amidon.

Afin d'apporter des éléments de réponse, j'ai participé à l'étude du fonctionnement des isoamylases 1 et 2 dans les feuilles de maïs.

Dans cette étude, les niveaux de transcrits et de protéines chez les mutants *isa1-* et *isa2-* du maïs ont été déterminés (Figure 1). Les activités des complexes protéiques ISA1/ISA2 de la feuille de maïs ont été visualisées sur zymogramme et comparées aux activités des complexes de l'albumen de maïs (Figure 2). Après co-purification et révélation des protéines par immunoblot, la composition des complexes isoamylasiques est identifiée (Figure 3). Ces étapes de culture du maïs et l'analyse des activités enzymatiques ont été réalisées par l'équipe du Pr Alan Myers à l'*Iowa State University*.

Les phénotypes d'accumulation d'amidon transitoire dans les feuilles de maïs ont été étudiés chez les mutants *isa1-* et *isa2-*. La morphologie des grains d'amidon et leur taille ont pu être estimées grâce à des observations par microscopie électronique (Figure 4 et 5).

Mon implication dans ce travail a consisté à extraire, doser et purifier l'amidon des feuilles de maïs (Figure 6). J'ai également conduit l'analyse de la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine (Figure 7), et participé activement à l'interprétation des différents résultats obtenus et à la rédaction du manuscrit.

## Résumé

Les isoamylases ISA1 et ISA2, protéines de séquence très conservée chez les végétaux, ont une fonction déterminante dans la synthèse de l'amidon. Dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana* ISA1 et ISA2 sont requises pour obtenir une activité de débranchement alors que dans l'albumen de maïs ISA1 est capable de fonctionner en absence d'ISA2. Dans cette étude, les activités isoamylasiques ont été caractérisées dans les feuilles de maïs et comparées à celles de l'albumen. Les mutants de maïs dépourvus d'ISA1 ou d'ISA2 ont été utilisés afin de déterminer le niveau des activités isoamylasiques ainsi que le contenu en amidon, la morphologie des grains et la structure fine de l'amylopectine produite. Trois complexes à activité isoamylasique ont été observés dans les feuilles de plants de maïs sauvages, deux sont des hétéro-oligomères composés d'ISA1 et d'ISA2 et le troisième est une forme homo-oligomérique composée uniquement de protéines ISA1. Cette dernière est retrouvée chez les mutants dépourvus d'ISA2. Chez ces mutants, l'accumulation d'amidon, la morphologie des grains et la structure de l'amylopectine diffèrent du sauvage, mais également du double mutant. Ces données suggèrent que les hétéromères et les homomères sont tous deux actifs dans les feuilles de maïs. La divergence évolutive ayant conduit à une différence de comportement de ISA1 selon l'espèce considérée est confirmée de par la présence d'un homomère actif dans les feuilles de maïs alors que l'hétéromère représente la seule forme active dans les feuilles d'autres espèces.

## **Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in *Zea mays* leaf**

**Qiaohui Lin<sup>1</sup>, Maud Facon<sup>2</sup>, Jean-Luc Putaux<sup>3</sup>, Jason R. Dinges<sup>1</sup>, Fabrice Wattebled<sup>2</sup>, Christophe D'Hulst<sup>2</sup>, Tracie A. Hennen-Bierwagen<sup>1</sup> and Alan M. Myers<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Roy J. Carver Department of Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA; <sup>2</sup> Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR8576 CNRS/Université Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France; <sup>3</sup> Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV-CNRS), BP 53, F-38041 Grenoble, Cedex 9, France

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [tabier@iastate.edu](mailto:tabier@iastate.edu)

**Summary**

- Conserved isoamylase-type starch debranching enzymes (ISA) including the catalytic ISA1 and non-catalytic ISA2 are major starch biosynthesis determinants. *Arabidopsis thaliana* leaves require ISA1 and ISA2 for physiological function, whereas endosperm starch is near normal with only ISA1. ISA functions were characterized in maize (*Zea mays* L.) leaves to determine whether species-specific distinctions in ISA1 primary structure, or metabolic differences in tissues, are responsible for the differing ISA2 requirement.
- Genetic methods provided lines lacking ISA1 or ISA2. Biochemical analyses characterized ISA activities in mutant tissues. Starch content, granule morphology, and amylopectin fine structure were determined.
- Three ISA activity forms were observed in leaves, two ISA1/ISA2 heteromultimers and one ISA1 homomultimer. ISA1 homomultimer activity exists in mutants lacking ISA2. Mutants without ISA2 differed in leaf starch content, granule morphology, and amylopectin structure compared to non-mutants or lines lacking both ISA1 and ISA2. The data imply that both ISA1 homomultimer and ISA1/ISA2 heteromultimer function in maize leaf.
- ISA1 homomultimer is present and functions in maize leaf. Evolutionary divergence between monocots and dicots likely explains the ability of ISA1 to function as a homomultimer in maize leaves, in contrast to other species where ISA1/ISA2 heteromultimer is the only active form.

**Key words:** *Zea mays*, leaf starch biosynthesis, isoamylase-type starch debranching enzyme, starch metabolism, starch structure

## Introduction

Isoamylase-type starch debranching enzymes (ISA) provide functions in starch biosynthesis that are subject to evolutionary conservation, as indicated by their high degree of primary sequence identity in chloroplast-containing organisms (i.e., the Chloroplastida) (for recent reviews see Hennen-Bierwagen *et al.*, 2012; Streb & Zeeman, 2012). ISAs catalyze hydrolysis of  $\alpha(1\rightarrow6)$  glycoside bonds in branched glucose homopolymers, and are thought to be involved in determining a clustered arrangement of branched linkages in precursor glucans. This structure is proposed to favor crystallization of unbranched regions of  $\alpha(1\rightarrow4)$ -linked linear chains and subsequent assembly into higher order structures culminating in insoluble starch granules. Analyses of mutations in genes encoding certain ISA proteins support this hypothesis, from the general finding that they cause decreased starch content and accumulation of water-soluble polysaccharides (WSP) that are not present in non-mutant plants. Such changes have been observed in endosperm of several monocots, in dicot leaf and tuber, and the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In all instances a gene encoding an ISA protein was mutated, and this distinctive phenotype has not been observed in the absence of altered ISA function.

Three separate genes encoding ISA proteins are conserved in the genomes of all Chloroplastida species characterized to date (Deschamps *et al.*, 2008). ISA3 functions primarily in starch catabolism (Wattebled *et al.*, 2005; Delatte *et al.*, 2006; Wattebled *et al.*, 2008), whereas ISA1 and ISA2 are involved in starch biosynthesis. ISA1 provides the catalytic activity for glucan debranching, and in all species tested is required for normal levels of crystalline starch and to repress accumulation of WSP, termed phytoglycogen, that is similar in structure to animal glycogen. ISA2 is a non-catalytic protein owing to conserved substitutions in amino acid residues required for activity throughout the well-characterized  $\alpha$ -amylase superfamily (CAZY family GH13) (Hussain *et al.*, 2003; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2012). In dicot tissues, specifically *Arabidopsis thaliana* leaf and potato tuber (*Solanum tuberosum*), ISA1 and ISA2 are involved at the same step in starch metabolism and both proteins are needed to execute that function (Zeeman *et al.*, 1998; Bustos *et al.*, 2004; Delatte *et al.*, 2005; Wattebled *et al.*, 2005). In rice (*Oryza sativa*) or maize (*Zea mays*) endosperm, in contrast, loss of ISA2 is tolerated without significant reduction in starch content or the appearance of phytoglycogen (Kubo *et al.*, 2010; Utsumi *et al.*, 2011). *C. reinhardtii* is intermediate in this regard, with loss of either ISA1 or ISA2 causing starch decrease and phytoglycogen accumulation but with less severe effects in the latter instance (Mouille *et al.*, 1996; Dauvillee *et al.*, 2001). These observations raise the question of why non-catalytic ISA2 would be strictly

conserved in all chloroplast-containing species even though in some plant tissues the biosynthetic ISA function(s) can be provided by ISA1 alone.

To address this question, this study characterized the roles of ISA1 and ISA2 in starch metabolism in maize leaves. ISA function in leaf has been characterized genetically only in *A. thaliana*, where essentially identical metabolic and biochemical phenotypes result from loss of ISA1, ISA2, or both together (Zeeman *et al.*, 1998; Delatte *et al.*, 2005; Wattedled *et al.*, 2005). Leaf starch content is reduced in either single or double mutants by about 80%, structure of the amylopectin component of starch is characteristically altered, and phytoglycogen accumulates to a level equivalent to approximately 40-50% of the starch present in wild type. A single ISA activity is detected by in-gel enzyme assays (i.e., zymograms) of leaf soluble extracts, and this is absent in null mutants lacking ISA1, or ISA2, or double mutants. From these data ISA1 and ISA2 appear to function together in *A. thaliana* leaf in a heteromultimeric enzyme complex, and both proteins are necessary for activity and physiological function.

Loss of ISA1 in cereal endosperm causes a phenotype similar to that seen in *A. thaliana* leaf, specifically reduced starch content by 80% or more, accumulation of high levels of phytoglycogen, and altered amylopectin structure (James *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1996; Dinges *et al.*, 2001; Burton *et al.*, 2002). Genetic alterations that cause loss of ISA2 are known in rice and maize (Kubo *et al.*, 2010; Utsumi *et al.*, 2011). In contrast to *A. thaliana* leaf, these did not cause substantial reduction in endosperm starch or accumulation of phytoglycogen. Endosperm tissues from rice and maize were shown by biochemical purification to possess a heteromultimeric enzyme comprising both ISA1 and ISA2, (Utsumi & Nakamura, 2006; Kubo *et al.*, 2010), consistent with the genetic data from *A. thaliana*. These tissues also possess a homomultimeric enzyme that contains only ISA1, which was not observed in *A. thaliana* leaf.

Two potential explanations can be suggested for the differences between ISA function, i.e., whether or not ISA2 is required for normal starch metabolism, in dicot tissues and monocot endosperm. One possible explanation is distinctions in carbohydrate metabolism between tissues. In particular, accumulation of transitory starch in leaf might require ISA1/ISA2 heteromultimeric enzyme whereas ISA1 alone might be sufficient for storage starch in endosperm, which is not degraded during the diurnal cycle. Thus, mutations that affect ISA2 would affect leaf starch metabolism but not affect endosperm. Alternatively, evolutionary divergence between dicots and some or all cereal species may have resulted in different ISA1 primary structures. The ISA1 sequence in cereals may possess the intrinsic ability to function as a homomultimer, whereas the protein from dicots may be functional only in heteromultimeric complexes

that contain ISA2. According to this hypothesis, mutation of ISA2 should have species-specific rather than tissue-specific effects.

Characterization of the effects of mutations eliminating ISA1 or ISA2 on starch metabolism in leaves of a monocot species will help distinguish these possibilities. The results presented here show that ISA functions differently in maize leaves than in *A. thaliana* leaves. In contrast to *A. thaliana* leaves, the effects of eliminating either ISA1 or ISA2 are distinct from each other in maize. The data are consistent with the hypothesis that evolutionary divergence has resulted in an ISA1 protein in monocots that is enzymatically competent in the absence of ISA2. This enzyme does not entirely supply the physiological role of ISA in leaf starch biosynthesis, however, because ISA2 mutations had discernable effects on starch content and granule size.

## Materials and Methods

### Plant materials

Maize lines used in this study were essentially congenic in the W64A inbred genetic background owing to a minimum of five backcrosses to the non-mutant standard. Molecular characterization was described previously for mutations of the gene *sugary1* (*su1*) that encodes ISA1, specifically *su1-4582* and *su1-Ref* (James *et al.*, 1995; Dinges *et al.*, 2001), or the *isa2-339* allele of the *isa2* locus that encodes ISA2 (Kubo *et al.*, 2010). Seedlings were grown in the greenhouse until emergence of the fourth leaf. Late in the light phase of the diurnal cycle the outer half of the third leaves were harvested and used fresh for enzyme activity gels or immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for carbohydrate analyses. Seedlings for analysis of gene expression in leaves were grown in a growth chamber under a diurnal cycle with alternating periods of 8 h darkness at 25°C and 16 h light at 28°C with approximately 280  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of mixed fluorescent and incandescent light. Tissues were harvested at various times throughout the diurnal cycle, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

### Carbohydrate analyses

Leaf starch was isolated and quantified as previously described (Yandeau-Nelson *et al.*, 2011) after lysis of approximately 200 mg of tissue in 0.7% ice cold perchloric acid, with biological replicate analyses performed on individual plants of the same genotype. WSP was collected from the soluble phase of the same extracts, and quantified after neutralization to approximately pH 7 by dropwise addition of 2 M KOH, .4 M 2-(N-

morpholino) ethanesulfonic acid, 0.4 M KCl. Both starch and WSP were quantified after conversion to free glucose by treatment with thermostable  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase using commercial reagents (Megazyme catalog no. K-TSTA). Amylopectin linear chain length distribution was determined by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) using a Beckman P/ACE instrument to separate glucans (O'Shea *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2011). Glucans for amylopectin chain length distribution analysis were extracted from the insoluble leaf fraction by boiling in DMSO prior to FACE analysis. The frequency of chains of each degree of polymerization (DP) was calculated as the percentage of the total chains within a given DP range. Glucans from a minimum of three biological replicates were analyzed, and the frequency values for each chain length were averaged among individuals of the same genotype. Difference plots were calculated by subtracting the wild type average value from the mutant average value of the same DP.

### qPCR

Relative abundance of *ISA1* and *ISA2* mRNAs standardized to the 18S rRNA level was measured using quantitative real-time PCR amplification of leaf cDNA. Methods for mRNA isolation, cDNA preparation, and qPCR analysis of these two transcripts were described previously (Kubo *et al.*, 2010).

### Immunoblot and zymogram analyses of total soluble extracts

Fresh leaf tissue (approximately 1 g) was ground to a powder under liquid nitrogen in a mortar and pestle. The powder was ground further in 4 mL of ice-cold extraction buffer (50 mM Tris-acetate, pH 7.5, 10 mM DTT, and 1X protease inhibitor cocktail [Sigma P-2714]), then the lysate was transferred to a 15 mL polypropylene tube and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m syringe filter (Corning 431220) and then concentrated by centrifugal filtration to approximately 0.3 mL (EMD Millipore UFC801024). Protein concentration in the total soluble lysate was determined by the Bradford method (Bio-Rad 500-0006). For immunoblot analysis, 180  $\mu$ g of extract was fractionated by SDS-PAGE and probed with affinity purified IgG fractions specific for maize *ISA1* or *ISA2*, as previously described (Kubo *et al.*, 2010). For zymogram analysis of total leaf extracts, 100-400  $\mu$ g of soluble extract was fractionated by native-PAGE using precast 7.5% acrylamide gels (Bio-Rad 345-0010). Conditions for electrophoresis and processing for detection of in-gel *ISA* activity were described previously (Kubo *et al.*, 2010). Endosperm extracts used as controls in the

zymograms were prepared as described from kernels harvested 20 days after pollination (DAP) (Kubo *et al.*, 2010).

### **Fractionation of ISA activities**

Leaf extracts were prepared as described in the previous section except that 5 g of leaf tissue was extracted in 12 mL of buffer. The lysate was clarified by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, and the supernatant was passed twice through 0.45 µm syringe filters. Eight milliliters of lysate were passed through a 1 mL bed volume Hi-Trap Q HP anion exchange column (AEC) (GE Healthcare 17-1153-01). Proteins were eluted in a linear gradient of 0 to 1 M NaCl in 50 mM Tris-acetate, pH 7.5, with 10 mM DTT added immediately prior to use, and 1 mL fractions were collected. ISA1 and ISA2 were identified by immunoblot analyses, and both proteins were found to elute in the same three fractions (data not shown). These fractions were pooled and concentrated to approximately 1 mL by centrifugal filtration and DTT was added to a final concentration of 20 mM. The pooled AEC fractions (500 µL) were applied to a Superdex 10/300 GL gel permeation column (GPC) and eluted in 50 mM Tris-acetate, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, while collecting 1 mL fractions. Samples of each fraction were tested by SDS-PAGE and immunoblot analysis for the presence of ISA1 and ISA2. Fractions containing those proteins (25 µL) were applied to native-PAGE gels and subjected to zymogram analysis. Duplicate native-PAGE gels were analyzed for ISA1 and ISA2 proteins by immunoblot analysis. Endosperm extracts were analyzed similarly, beginning with 5 g of tissue from kernels harvested 20 DAP.

### **Transmission electron microscopy and scanning electron microscopy**

The outermost regions of maize leaves from greenhouse-grown seedlings were harvested at the end of the light period of the diurnal cycle. Tissue was cut with a fresh razor blade into small pieces, then immersed in fixative 0.1 M cacodylate, pH 7.2, 2% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde. Vacuum was applied for 30 min. Leaf samples were embedded in Spurr's resin, then postfixed with 1% osmium tetroxide, sectioned to a thickness of 80 nm, affixed to grids and stained with uranyl acetate and lead citrate. Transmission electron microscopy (TEM) observation was performed with a Jeol 2100 microscope operating at 200 kV.

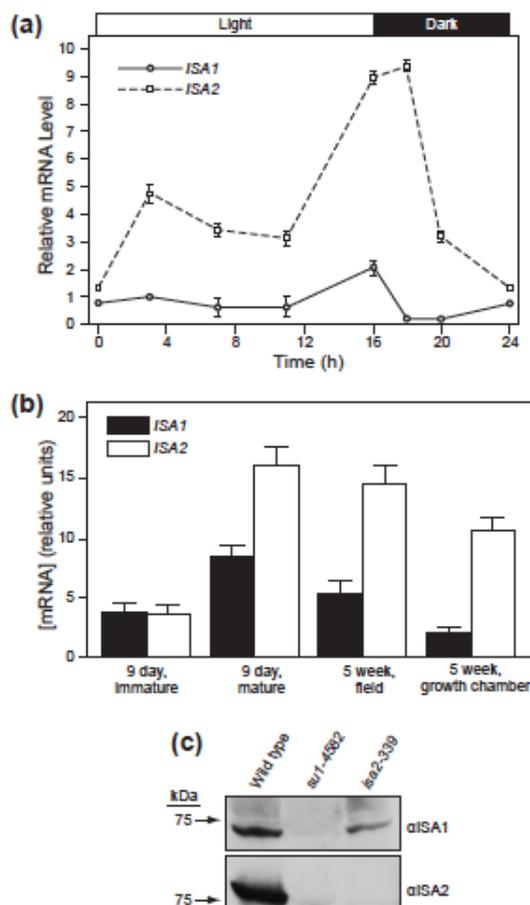
Starch granules to be analyzed by scanning electron microscopy (SEM) were purified from insoluble leaf material as previously described (Yandeau-Nelson *et al.*, 2011). The pellet from the leaf crude lysate was resuspended in sterile deionized water and filtered through two layers of Miracloth (Calbiochem, Darmstadt, Germany). The

starch pellet was further purified by isopycnic centrifugation in Percoll (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) at 10,000 g for 1 h at 4°C. The pellet was rinsed twice with sterile deionized water and stored in 20% ethanol at 4°C until use. Droplets of starch granule suspensions were allowed to dry on freshly cleaved mica. After coating with Au/Pd, they were observed in secondary electron mode using a Jeol JSM6300 microscope operating at 8 kV. Size-distribution histograms were determined by measuring the apparent diameter of at least 300 particles per sample from the SEM images.

## Results

### Transcript and protein abundance

The relative steady-state levels of *ISA1* and *ISA2* mRNAs in seedling leaves over the course of a 16 h light/8 h dark diurnal cycle were measured by qPCR. The levels of these transcripts were reported previously for developing endosperm tissue, where *ISA1* was approximately 2.5-fold more abundant than *ISA2* (Kubo *et al.*, 2010). In seedlings leaves the relative levels of *ISA1* and *ISA2* mRNAs were approximately equal at the end of the night. *ISA2* mRNA abundance was elevated within the first three hours of the light phase to approximately 5-fold higher than *ISA1* mRNA, and remained more abundant by about the same factor throughout the day (Fig. 1a). The qPCR results are in agreement with publicly-available whole transcriptome sequencing data (RNAseq) showing *ISA2* to be two to three fold more abundant than *ISA1* in leaf tissue harvested during the day (Fig. 1b). Thus, the relative levels of *ISA1* and *ISA2* transcripts are reversed in maize endosperm and leaf, with *ISA1* more abundant in the non-photosynthetic tissue and *ISA2* present at higher levels in leaves throughout the light phase of the diurnal cycle.



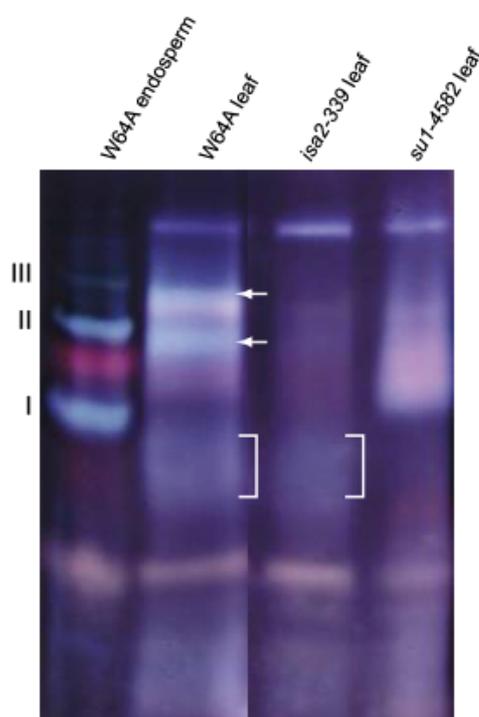
**Fig. 1** mRNA and protein levels in *Zea mays* leaves. (a) qPCR. Relative transcript levels were quantified in wild type leaves harvested during a 16 h light, 8 h dark diurnal cycle. Results shown are the mean  $\pm$  SE of three biological replicates. When absent, the error bars are smaller than the symbols. (b) RNASeq. Data are available at [www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org), from Li *et al.* (2010) (9 day seedlings) and Davidson *et al.* (2011) (5 week plants). Immature 9 d old seedling tissue was from the leaf base where C4 metabolism has not yet initiated. (c) Immunoblot detection of ISA1 and ISA2 in seedling leaves. The same amount of protein in total soluble extracts from wild type or mutant leaves (180  $\mu$ g) was separated by SDS-PAGE and probed with the indicated IgG fractions.

ISA1 and ISA2 proteins were both detected by immunoblot analysis in soluble extracts of seedling leaves harvested during the day (Fig. 1c). The specificity of the IgG fractions used for this analysis was demonstrated using leaf extracts from plants homozygous for the null mutations *su1-4582*, in the gene *sugary1* (*su1*) that codes for ISA1 (James *et al.*, 1995), or *isa2-339*, in the gene that codes for ISA2 (Kubo *et al.*, 2010). Leaves homozygous for *su1-4582* and thus lacking ISA1 also are completely deficient for ISA2 as a secondary effect (Fig. 1c), as has been observed previously in endosperm (Kubo *et al.*, 2010). This result is consistent with the conclusion that ISA1 is required for stability of ISA2. In contrast, ISA1 continued to accumulate in *isa2-339* mutant leaves lacking ISA2, although at a reduced level compared to non-mutant tissue

(Fig. 1c). An analogous secondary effect of an *isa2*- null mutation was seen in *A. thaliana* leaves (Delatte *et al.*, 2005), however, in the dicot only a trace amount of ISA1 remained whereas in maize substantial amounts of ISA1 accumulate in the absence of ISA2.

### Leaf ISA activity

The ISA enzymes in maize leaves were first characterized by zymogram analyses of total soluble extracts. Proteins were separated by native-PAGE, then electrophoretically transferred to a gel impregnated with 0.3% solubilized potato starch. The starch gel was stained with iodine-potassium iodide solution ( $I_2/KI$ ) so that starch-modifying enzymes could be detected by changes in color. In such analyses ISAs are known to generate light blue bands whereas starch branching enzymes generate red or pink bands and amylases produce white bands (Colleoni *et al.*, 2003). Endosperm tissue subjected to such analyses revealed three forms of ISA activity, including a faster-migrating form of ISA1 homomultimer (form I) and two slower-migrating forms of ISA1/ISA2 heteromultimeric enzyme (forms II and III) (Kubo *et al.*, 2010). Leaf extracts generated two bands of ISA activity, which migrated slightly faster in native-PAGE than the two heteromultimeric forms from endosperm (Fig. 2).

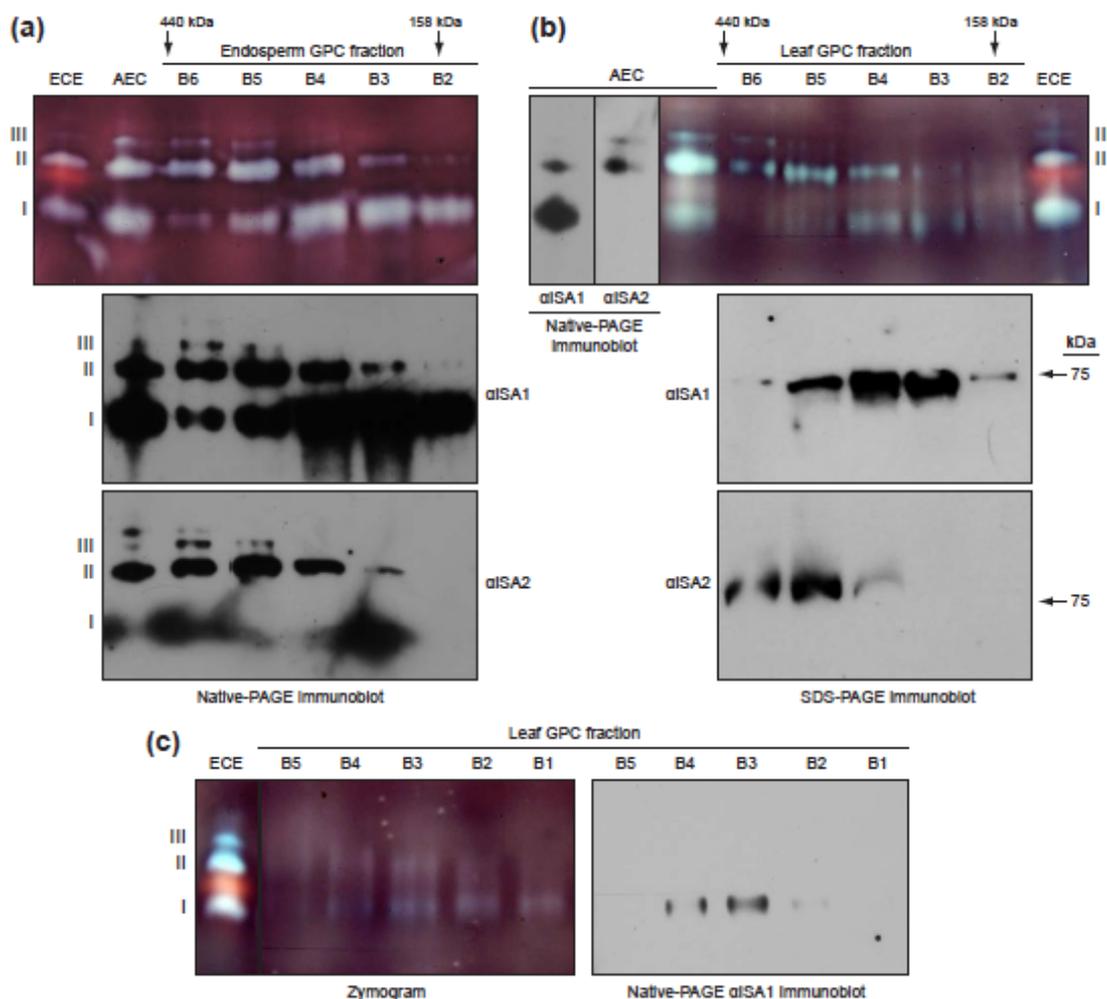


**Fig. 2** ISA activities in *Zea mays* leaf extracts. Proteins in leaf or endosperm extracts of the indicated lines were analyzed by zymogram. Roman numerals indicate homomultimeric (form I) and heteromultimeric ISA activities (forms II and III) previously characterized in maize endosperm (Kubo *et al.*, 2010). White arrows and lines indicate the positions of potential ISA activities from leaf. Unmarked starch-modifying activities are starch branching enzymes or amylases. Protein loads were 50 µg for endosperm extract and 400 µg for leaf extracts.

Both of these activities were missing in *isa2-339* or *su1-4582* leaves, consistent with their identification as ISA1/ISA2 heteromultimeric enzyme. A third activity band

corresponding to form I was not obvious in leaf extracts, although a diffuse, faster-migrating light-staining area was present near the position of endosperm ISA1 homomultimer. This diffuse activity was missing in extracts deficient for ISA1 but was not affected by loss of ISA2 (Fig. 2).

To better resolve ISA activities, enzymes from leaf and endosperm crude extracts were partially purified by anion-exchange chromatography (AEC) on HiTrapQ HP columns, concentrated, then separated by gel permeation chromatography (GPC) on a Superdex 10/300 GL column. Fractions were then analyzed by zymogram and also by immunoblot of duplicate lanes to determine whether ISA1 and/or ISA2 protein co-eluted in GPC and co-migrated in native-PAGE with specific ISA activities. Endosperm extracts provided standards for the presence of ISA1 homomultimer and ISA1/ISA2 heteromultimers in specific GPC fractions (Fig. 3a). As seen previously (Kubo *et al.*, 2010), both ISA1 and ISA2 co-migrated with enzyme forms II and III, whereas ISA1 co-migrated with form I but ISA2 clearly was not present in that activity band (Fig. 3a).



**Fig. 3** ISA activities in GPC fractions. (a) Non-mutant *Zea mays* endosperm. ISA activities were partially purified by AEC, concentrated, and separated by GPC. Fractions were analyzed by native-PAGE zymograms as in Fig. 2. Duplicate native-PAGE gels, run simultaneously in a dual apparatus, were analyzed by immunoblot using the indicated IgG fractions so that co-migration of ISA1 and/or ISA2 with specific ISA mobility forms could be determined. Vertical arrows indicate the peak of the elution volumes of protein standards with known molecular mass. “AEC” indicates the pooled AEC fractions that were loaded onto the GPC column and “ECE” indicates endosperm crude extract. (b) Non-mutant *Zea mays* leaf extracts analyzed as in panel (a). Samples of the GPC fractions were also analyzed by SDS-PAGE immunoblots. (c) *isa2-339* leaf extracts analyzed as in panel (a).

GPC fractions from leaf also contained three forms of ISA. These activities eluted in the same fractions as ISA forms I, II and III from endosperm, and co-migrated with those enzymes in native-PAGE (Fig. 3b). ISA form I in the pooled AEC fractions from non-mutant leaves co-migrated in native-PAGE with ISA1 but did not contain any ISA2 (Fig. 3b). SDS-PAGE immunoblots revealed that ISA2 protein in leaf extracts co-eluted in GPC fractions B6 to B4 with activity forms II and III, but was not detected in fraction B3

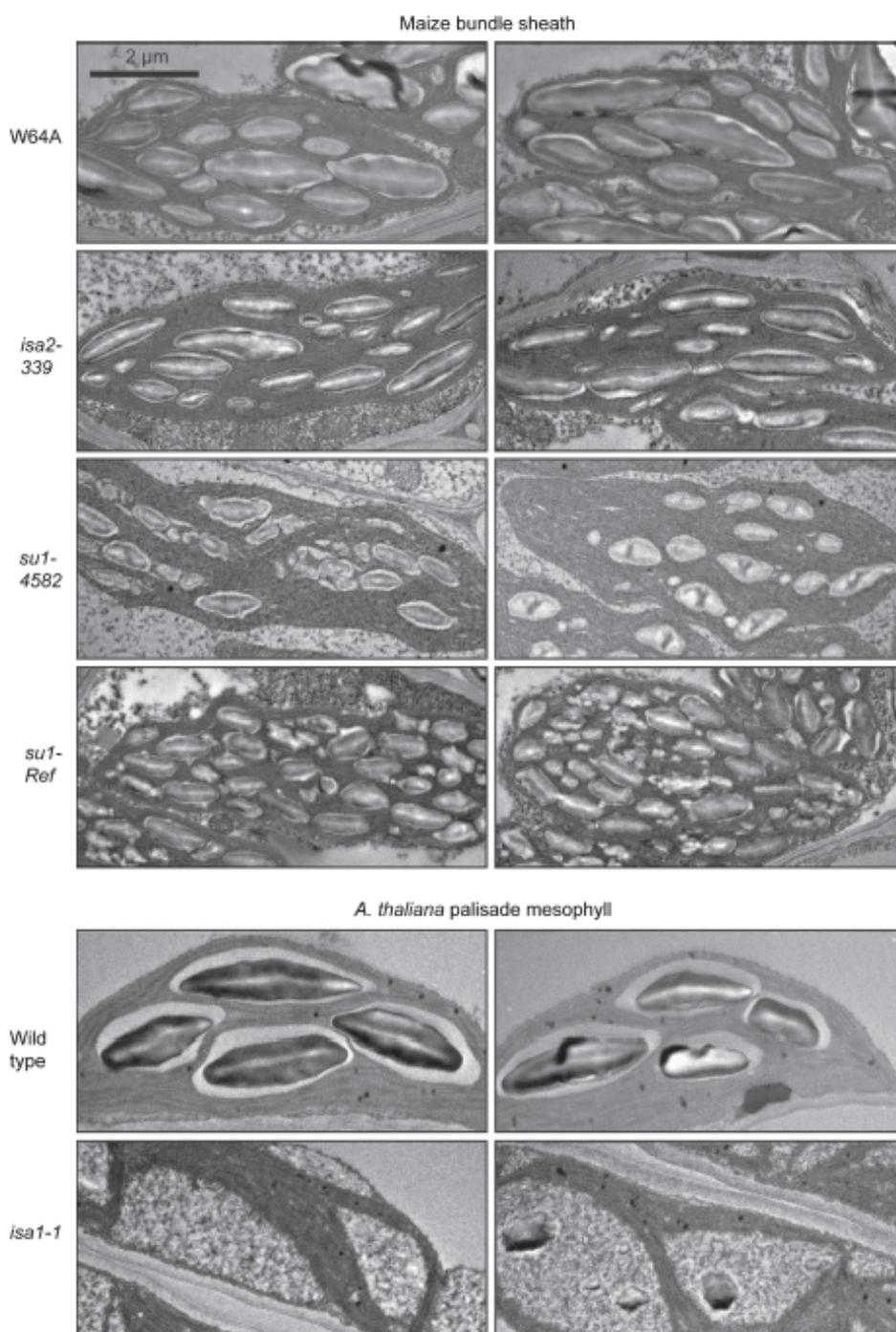
that was enriched for enzyme form I (Fig. 3b). These data indicate presence of ISA1 homomultimeric enzyme in maize leaf. ISA form II in the pooled AEC fractions from leaf co-migrated with both ISA1 and ISA2, indicating presence of an ISA1/ISA2 heteromultimer in that tissue. ISA form III in the leaf AEC pool co-migrated with ISA2. The fact that ISA1 was not detected in leaf form III likely is due to low sensitivity of the native-PAGE immunoblots and the relatively low abundance of that form of the enzyme. ISA1 is expected to be present in that band because form III is absent from whole cell extracts of either endosperm or leaf from *su1-4582* mutants. Taken together the data indicate that both ISA1 homomeric enzyme and ISA1/ISA2 heteromultimer exist in non-mutant maize leaves. Leaf differs from endosperm, however, in the relative proportions of the different ISA activities as far as can be judged from these semi-quantitative assays. ISA1 homomultimer appears as the most prevalent activity in endosperm extracts, whereas there is proportionally less of this form of the enzyme in leaf extracts compared to the heteromultimeric form II (Fig. 3 a,b).

ISA activity was also partially purified from leaves of an *isa2-339* mutant. In this instance a single ISA activity band was present, indicated by its blue color, that co-migrated in native-PAGE with the homomeric enzyme from endosperm, i.e., form I (Fig. 3c). This is in contrast to the extracts from non-mutant leaves that exhibited three blue bands of ISA activity (Fig. 3b). Immunoblot analysis of duplicate fractions showed ISA1 co-eluted with the activity band in GPC and co-migrated with that enzyme in native-PAGE. These data confirm that an ISA activity exists in maize leaves that does not utilize ISA2, because this protein is entirely lacking in *isa2-339* mutants (Fig. 1c).

### **Granule morphology in leaves lacking ISA1 or ISA2**

The appearance of starch granules in seedling leaf chloroplasts was compared between wild type and mutant lines homozygous for a defect in the gene encoding ISA1 or ISA2. Leaf samples were collected from greenhouse-grown seedlings at the end of the light period of the diurnal cycle and immediately fixed for transmission electron microscopy (TEM). Genotypes analyzed were the wild type inbred W64A, and congenic mutants homozygous for *isa2-339*, *su1-4582*, or *su1-Ref*. The *su1-Ref* allele is a missense mutation that results in an enzymatically inactive form of ISA1 present at low level compared to wild type (Kubo *et al.*, 2010), whereas *isa2-339* and *su1-4582* are null alleles that result in complete loss of ISA2 or ISA1, respectively. Bundle sheath chloroplasts were examined because these are the site of starch granule accumulation in mature maize leaf as the result of C4 metabolism. As a control, palisade mesophyll cells from wild type and homozygous *isa1-1 A. thaliana* leaves were analyzed similarly. The A.

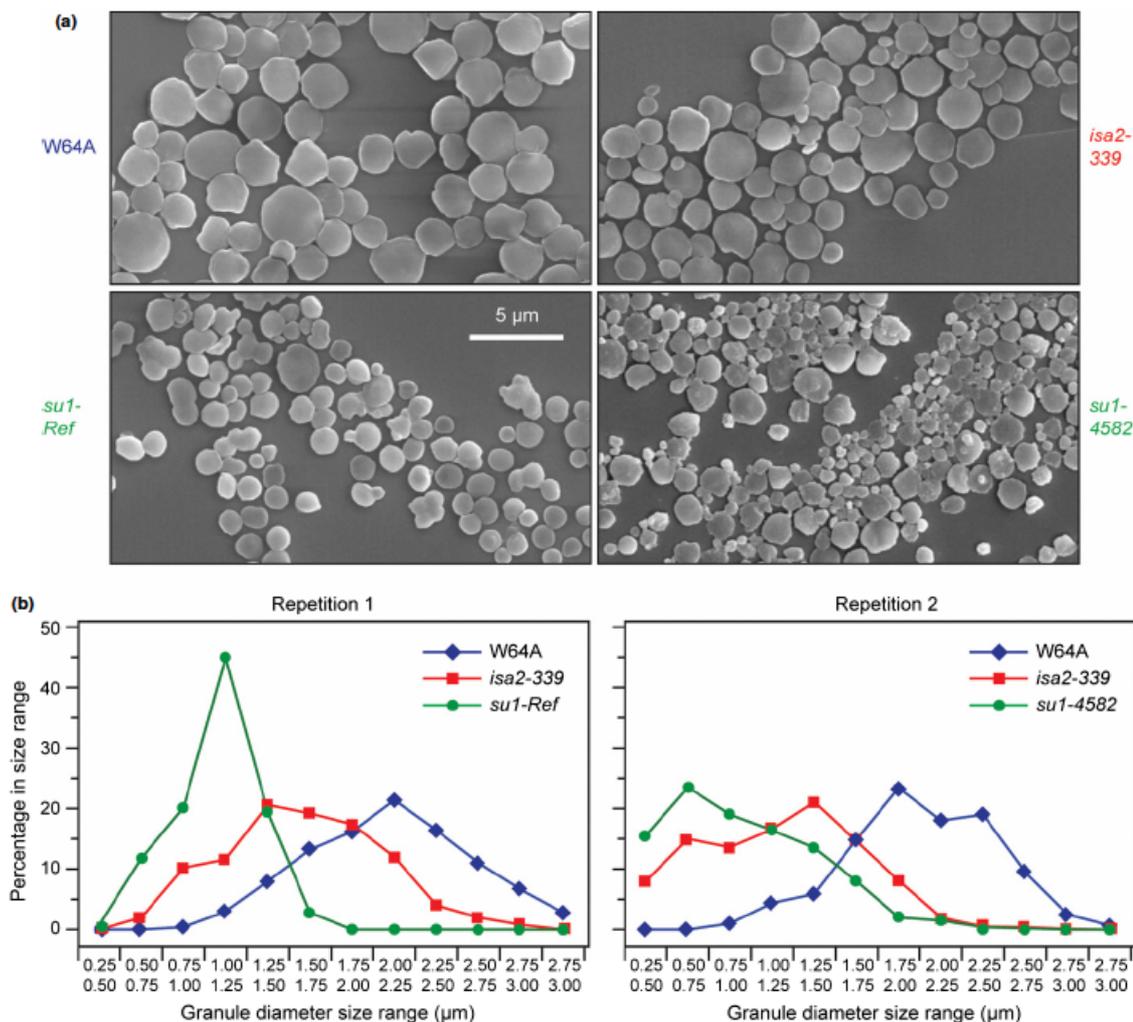
*thaliana* mutant plastids exhibited loss or reduced number of starch granules, and distended stromal volume apparently resulting from phytylglycogen accumulation, as previously published (Fig. 4) (Delatte *et al.*, 2005).



**Fig. 4** Plastids imaged by TEM. *Zea mays* seedling leaf tissue was harvested and fixed at the end of the light phase of the diurnal cycle. Two images are shown for each genotype. All images are at the same magnification.

Plastids from maize leaves lacking ISA2 exhibited a nearly normal appearance with the exception that starch granules appeared to be slightly smaller than wild type (Fig. 4). This is in contrast to *isa2-1* mutants of *A. thaliana*, in which mesophyll or bundle sheath chloroplasts typically lack recognizable starch granules and contain amorphous glucan particles with a range of structures (Zeeman *et al.*, 1998; Delatte *et al.*, 2005). Such abnormal glucan particles were never observed in maize *isa2-339* mutants. Maize bundle sheath chloroplasts from either *su1-4582* or *su1-Ref* mutants contained starch granules that were noticeably smaller and more irregularly shaped than wild type, although distended organelles and apparent phytoglycogen accumulation were not obvious (Fig. 4). The granule morphology within bundle sheath plastids was distinctly different between leaves mutated for either ISA1 or ISA2.

The size ranges of seedling leaf starch granules were quantified by scanning electron microscopy (SEM). Granules were extracted from W64A, *isa2-339*, or *su1-Ref* seedlings at the end of the light phase and imaged by SEM (Fig. 5a), then individual particle diameters were measured. The distributions of granule diameters were distinct between all genotypes (Fig. 5b), and the average diameters differed between any two lines with a high degree of statistical significance ( $p$  value < 0.0001). The results demonstrated that starch granules from *su1-Ref* mutant leaves were smaller than those from non-mutants, and that granules generated in the absence of ISA2 were intermediate in diameter between the particles from non-mutant and ISA1-defective leaves. As a biological replication the experiment was repeated with W64A, *isa2-339*, and *su1-4582* seedlings from a separate planting. The diameter distributions again were distinct between genotypes (Fig. 5b) and the average values were significantly different ( $p$  value < 0.0001). The replicate analyses were consistent in the regard that starch granules lacking functional ISA1 were smaller than those present in either non-mutant leaves or mutants lacking only ISA2. These data confirm the results of the TEM analysis of granule morphology within chloroplasts, and indicate that in maize, unlike *A. thaliana*, the effects of ISA2 mutation on starch granule morphology are different than those resulting from loss of ISA1 function.

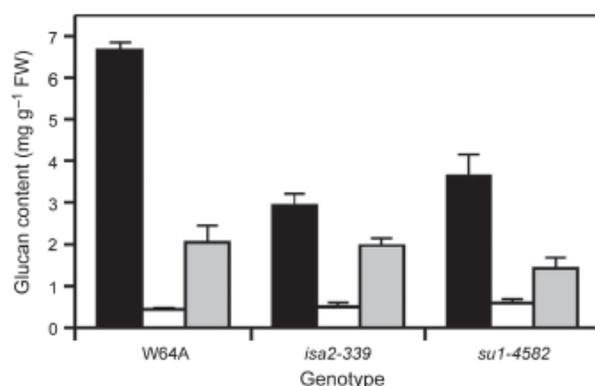


**Fig. 5** Starch granule size distribution. (a) SEM. Starch granules were isolated from *Zea mays* leaves of the indicated genotype harvested at the end of the light phase of the diurnal cycle. All images are at the same magnification. (b) Distribution of granule diameters. Measurements were taken from micrographs such as those shown in panel (a). Approximately 500 granules were measured for each genotype. Seedlings analyzed in repetitions 1 and 2 were from separate plantings.

### Storage glucan content and structure in leaves lacking ISA1 or ISA2

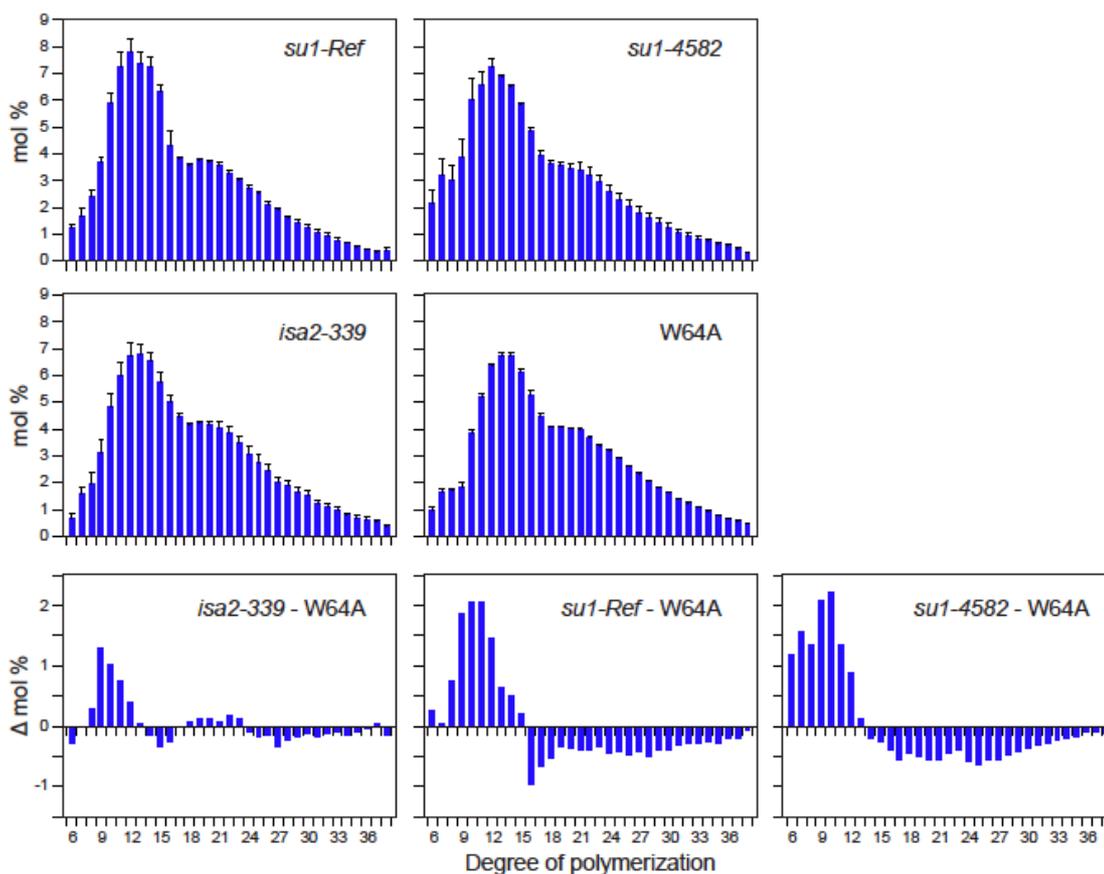
Starch, WSP, and free glucose were quantified in greenhouse-grown seedling leaves of wild type, *su1-4582*, and *isa2-339* maize plants harvested at the end of the light phase. Loss of either ISA1 or ISA2 caused reduced starch content to approximately 36-46% of the wild type level (Fig. 6). Despite this defect there is no obvious difference in plant growth as judged by appearance of *su1-4582* or *isa2-339* mutants compared to the non-mutant standard over the course of the plant life cycle (data not shown). Differences between the mutant and wild type starch contents were statistically significant ( $p$  value <

0.002), whereas the two mutant lines were not significantly different from each other ( $p$  value = 0.36). WSP, i.e., glucose units generated by exhaustive  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase treatment, was not detected above the non-mutant background in either *su1-4582* or *isa2-339* leaves (Fig. 6). This is in contrast to *A. thaliana*, where WSP levels increase significantly in the absence of either ISA1 or ISA2 (Zeeman *et al.*, 1998; Delatte *et al.*, 2005; Wattedled *et al.*, 2005). Free glucose content was not significantly different between either of the mutants and the non-mutant standard ( $p$  value  $\geq 0.19$ ), nor between the two mutant ( $p$  value = 0.07).



**Fig. 6** Leaf glucan content. Greenhouse grown *Zea mays* seedling leaves were harvested at the end of the light phase of the diurnal cycle. Values indicated are averages  $\pm$  SE from four biological replicates of each mutant and three non-mutant replicates.

Amylopectin linear chain length distribution was compared between mutants affected in either ISA1 or ISA2 and the non-mutant standard line. Leaf starch was completely debranched with commercial isoamylase, then the linear chains were derivatized at the reducing end with a fluorescent functional group, separated by capillary electrophoresis, and quantified. Chains of DP 5 or less were not detected. The frequency of chains in the DP range 6 - 38 was calculated as a percentage of the total, and for each DP the value in non-mutant starch was subtracted from the mutant value to reveal structural differences (Fig. 7). Mutants affected in ISA1 owing to either the *su1-Ref* or *su1-4582* allele exhibited an increased frequency of short chains in the range of DP 6-12 compared to normal. The effect was stronger for the null allele than the point mutation for the shortest chains of DP 6-8. This structural pattern is similar to amylopectin from other plant sources carrying mutations of ISA1 including *A. thaliana* leaf (Delatte *et al.*, 2005; Wattedled *et al.*, 2005) and maize endosperm (Dinges *et al.*, 2001). As noted, in *A. thaliana* leaf the changes observed in *isa2*-mutants were essentially identical to those of *isa1*-mutants (Delatte *et al.*, 2005; Wattedled *et al.*,



2005). In maize leaf starch the effects of *isa2*- mutations were similar but not identical to those of the *isa1*- mutants. The magnitude of the changes was quantitatively less severe and the range of chain lengths affected was narrower in *isa2*- leaf starch compared to the *isa1*- chain length profiles (Fig. 7).

**Fig. 7** Linear chain length distributions in *Zea mays* leaf starch amylopectin. For each genotype the frequency distribution  $\pm$  SE is shown as an average of at least three biological replicates. Difference plots are shown in which the frequency value for each DP in the non-mutant line W64A was subtracted from that of the indicated mutant line.

### Distinctions in ISA1 primary structure conserved in monocots and dicots

Multiple amino acid sequence alignments of ISA1 from five monocot species and six dicots were obtained using the program ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). In general the alignment between monocot and dicot ISA1 extends throughout the proteins with a high degree of sequence identity. Amino acids that are identical in all the monocots but vary by presence of non-conserved residues at those positions in the dicots were noted (Supporting Information Fig. S1). Two extended blocks of such monocot/dicot divergence were identified (Fig. 8). A span of residues that differs entirely between monocots and dicots, beginning at residue 287 of full-length maize ISA1, is intercalated

between regions of extremely high sequence conservation in both the N- and C-terminal directions (Fig. 8). All of the dicots have five additional amino acids in this region compared to the monocots. The monocot sequences contain three successive Ser residues, or in one instance a Cys and two Ser residues, none of which are present in the dicots. The dicots possess a different sequence of 10 residues, six of which are identical or essentially conserved in all six species examined.

Prediction of the maize ISA1 three dimensional structure based on comparison to the known structure of isoamylase from *Pseudomonas amyloclavata* (Katsuya *et al.*, 1998) suggests this region of the protein is accessible on the surface (Supporting Information Fig. S2).



**Fig. 8** Alignment of ISA1 primary sequences from monocots and dicots. Genbank references are as follows: Maize (*Zea mays*), ACG43008; Rice (*Oryza sativa*), ACY56095; Wheat (*Triticum aestivum*), CAC82925; Barley (*Hordeum vulgare*), AAM46866; *Brachypodium distachyon*, XP\_003572394; *Arabidopsis*, AEC09752; Poplar (*Populus trichocarpa*), EEF03224; *Phaseolus vulgaris*, BAF52941; Grape (*Vitis vinifera*), XP\_002265964; Potato, AAN15317; Pea (*Pisum sativum*), AAZ81835; Sweet Potato (*Ipomoea batatas*), AAY84833. The position of the first amino acid in each block in the full-length maize sequence is indicated. Asterisks indicate conservation in all 12 species and colons indicate conservative substitutions. The first block begins at the known mature N terminus or the terminus predicted by the ChloroP algorithm.

The second structural feature divergent between monocot and dicot ISA1 is located close to the N terminus (Fig. 8) of the mature proteins. All five monocot proteins analyzed contain a contiguous sequence close to their mature amino terminus of 8-10 residues that are entirely Asp or Glu acidic groups or contain a single neutral residue within the span of acidic amino acids. None of the dicot ISA1 proteins possess such a sequence. Furthermore, adjacent to the acid-rich sequence is a span of 14 residues in which ten amino acids are identical in all the monocots and divergent in all the dicots. Thus, the amino termini of ISA1 from monocots and dicots diverge greatly in character, whereas the remainder of the proteins are highly conserved (Supporting Information Fig. S1).

## Discussion

### ISA1 homomultimer function in maize leaf

Biochemical characterization and genetic analysis both demonstrated that ISA1 functions as a homomeric enzyme, in the absence of ISA2, in maize leaves. ISA enzymatic activity was detected by zymogram in *isa2-339* null mutant leaves. This enzyme eluted as a multimeric complex in GPC analysis, at approximately the same volume as ISA1 homomultimer from endosperm. ISA1 protein detected by immunoblot analysis co-eluted in GPC and co-migrated in native-PAGE with this ISA activity. An ISA activity with the same purification properties was present in non-mutant leaves and did not contain any ISA2 as shown by immunoblot. Function of the ISA1 homomultimer was implied by the finding that leaf starch granules generated in the presence of ISA1 alone, i.e., in *isa2-339* mutants, differed in size and morphology from *su1-* mutants lacking ISA1 activity. Also the amylopectin chain length distribution was different in starches generated in the presence of ISA1 alone compared to *su1-* mutants. Taken together the data provide strong evidence that ISA1 functions enzymatically and physiologically in maize leaf, in the absence of ISA2.

ISA1 homomer, however, does not provide the full physiological function of ISA activity in maize leaves. This is in contrast to endosperm, where loss of ISA2, and thus the ISA1/ISA2 heteromeric enzyme, can be tolerated without major defects in starch content or structure (Kubo *et al.*, 2010; Utsumi *et al.*, 2011). The need for ISA2 in leaves is evident from the fact that starch content is reduced, starch structure is altered, and granules are smaller on average in mutants lacking the protein compared to non-mutants. Thus, ISA1 homomultimer cannot support starch metabolism that is normal in all of these aspects. Taken together the data indicate that both homomeric and heteromeric ISA are capable of function in maize leaf starch biogenesis, raising the possibility that they each

play specific roles necessary for normal metabolism. ISA1/ISA2 heteromultimer appears to affect granule growth because the starch particles were smaller in the mutant lacking ISA2 than in non-mutant standard.

The fact that ISA1 homomultimer functions in maize leaf but not *A. thaliana* is most simply explained by inherent differences in protein structure between the two species. *A. thaliana* leaf possesses only a single electrophoretic mobility form of ISA activity, whereas one ISA1 homomultimer and two ISA1/ISA2 heteromeric forms are present in maize leaf as they are in endosperm. Specific structural differences between ISA1 clearly exist that are monocot- or dicot-specific, within the context of very close sequence homology throughout the protein in all vascular plants examined. The positions of the localized regions of sequence divergence between monocot and dicot, based on structure of *Pseudomonas amyloclavata* isoamylase (Katsuya *et al.*, 1998), are consistent with this suggestion. The Ser-rich sequence specific to monocots aligns with a loop on the external surface of the isoamylase protein (Supporting Information Fig. S2). This region could thus influence interactions with other subunits in the quaternary structure of the plant enzyme and allow monocot ISA1 to function without ISA2. The acid-rich region at the N terminus of monocot ISA1 is not represented in the *P. amyloclavata* protein so its position within the three-dimensional structure cannot be predicted. The high degree of conservation specifically amongst the monocots, however, suggests this region is functionally significant.

Contrary to this view, however, is the fact that ISA1 homomultimer was not detected in leaves of rice, another monocot species (Utsumi *et al.*, 2011). From this observation the possibility must be considered that particular aspects of leaf metabolism determine whether or not ISA1 homomultimer forms and/or functions physiologically, and that these aspects differ in maize compared to both rice and *A. thaliana*. For example, *A. thaliana* and rice are C3 plants that fix CO<sub>2</sub> directly using RUBISCO, whereas maize is a C4 plant that initially fixes CO<sub>2</sub> using pyruvate as the acceptor. Transferring maize ISA1 to *A. thaliana* plants lacking both endogenous ISA1 and ISA2, however, showed that the C4 monocot enzyme could support starch biosynthesis in the C3 dicot (M. Facon & F. Watted, unpublished). This result supports the interpretation that maize ISA1 structure inherently provides the ability for homomultimer function in the absence of ISA2. The reason that ISA1 homomultimer was not detected in rice leaves, despite its conserved primary structure compared to maize, is not obvious. The different results could relate to stability of the enzyme, variation in relative abundance of ISA1 and ISA2 in leaves of the two species, and/or regulation of the enzymes by post-translational mechanisms.

### Physiological aspects of the mutant phenotypes

Allele-specific distinctions were observed in the effects of *su1-Ref* and *su1-4582* on leaf starch, although qualitatively the two mutations caused similar changes. For example, although both mutations resulted in granules that were smaller than those present in non-mutant or *isa2-339* mutant leaves, *su1-4582* seemed to have more severe effects than *su1-Ref* (Fig. 5). Quantitatively different effects of the two alleles on amylopectin chain length distribution were also observed (Fig. 7), and the appearance of granules visualized by TEM also differed slightly (Fig. 4). As noted, *su1-Ref* mutants contain reduced levels of an inactive form of ISA1, whereas *su1-4582* plants completely lack ISA1. Furthermore, ISA2 accumulates to normal levels in *su1-Ref* endosperm whereas it is completely missing from either leaf or endosperm of *su1-4582* mutants (Fig. 1) (Kubo *et al.*, 2010). Thus the allele-specific effects on leaf starch potentially could result from the differences in ISA1 or ISA2 protein abundance in the different mutants, even though enzymatic activity is missing in both instances. Alternatively, the differences could result from the growth environments of the two biological replicates, which utilized seedlings grown in the greenhouse at different times of the year. The latter explanation is supported for the granule-size phenotype by the fact that the average diameters of all three genotypes were smaller in the second biological replication of the experiment (Fig. 5).

A clear difference between maize and *A. thaliana* leaf was the absence of phytoglycogen in the monocot when ISA1 or ISA2 was missing. This result is unusual in comparison to other genetic analyses of ISA function, where in general phytoglycogen accumulation is a hallmark of the mutant phenotype (Hennen-Bierwagen *et al.*, 2012). Tissue specificity is part of the explanation, because ISA1 mutants of maize exhibit high levels of phytoglycogen in endosperm. The requirement for ISA function in *A. thaliana* leaf varies by cell type, as shown by presence of starch granules in some cells and their apparent replacement by phytoglycogen in others (Delatte *et al.*, 2005). Bundle sheath and epidermal cell chloroplasts, for example, contain abnormally shaped starch granules in *isa1*- or *isa2*- mutants, whereas adjacent palisade- or spongy mesophyll cells lack granules. Thus, ISA activity is not entirely responsible for whether or not glucans assemble into granules, but rather it appears to be a contributing factor that influences the equilibrium between crystallization and solubility. Other enzymes are known to affect the distribution between soluble and insoluble glucans, as shown by multiple mutant combinations when ISA is compromised, for example SSIII in maize endosperm (Lin *et al.*, 2011) and the  $\alpha$ -amylase AMY3 in *A. thaliana* (Streb *et al.*, 2008). Mesophyll chloroplasts in mature maize leaves do not accumulate starch granules during normal vegetative growth because the Calvin cycle is not operating in those cells as a

consequence of C4 metabolism (Majeran *et al.*, 2010). Starch in maize leaves accumulates for the most part in bundle sheath cells where RUBISCO and subsequent photosynthetic carbon metabolism reactions occur. Potentially the metabolic nature of maize bundle sheath cells allows crystallization of precursor glucans into starch granules in the absence of ISA1, as it does in certain cell types in *A. thaliana* leaves, and this could explain why phytoglycogen was not observed in *su1*- or *isa2*- mutant maize leaves. Despite the absence of phytoglycogen, the formation of starch in maize leaf in the absence of ISA1 or ISA2 is abnormal. This was shown by reduced levels of total granular material, abnormal granule size and shape, and changes in amylopectin fine structure. Another consideration regarding the lack of measurable WSP in mutant maize leaves is the fact that in *A. thaliana* phytoglycogen is degraded to some extent during the day as shown by accumulation of the breakdown product maltose (Delatte *et al.*, 2005; Streb *et al.*, 2008). Whether or not such degradation occurs in maize *su1*- or *isa2*- mutant leaves and contributes to the lack of observed WSP and the reduced total glucan levels remains to be determined.

The decrease in total glucan polymer in the maize *su1*- or *isa2*- mutants had no obvious effect on plant health or growth rate, consistent with the fact that *su1-Ref* and other alleles are widely grown as commercial sweetcorn varieties (Tracy *et al.*, 2006). This might be explained by the fact that the amount of starch that accumulates in the mutants, approximately 36-46% of normal, is sufficient to meet the physiological demands of the plant during the dark phase of the diurnal cycle. Some amount of leaf starch is required for normal maize growth, as shown by analysis of a near-starchless mutant affected in leaf ADPglucose pyrophosphorylase (Schlosser *et al.*, 2012). In these mutants grown in field conditions slight effects were observed on plant height, flowering time, and seed yield, however, plant health was not severely compromised. Thus there appears to be some degree of physiological plasticity regarding how maize plants utilize photosynthate and transitory starch.

In summary, homomeric ISA1 was detected in maize leaves and shown to partially supply the *in vivo* requirement for ISA activity in starch biosynthesis. This is the first demonstration that homomeric ISA1 functions in leaf tissue. ISA1/ISA2 heteromultimer was also shown to function in maize leaf, although whether or not this form by itself could supply full physiological activity remains to be determined. The functional differences between maize and *A. thaliana* leaf, where ISA1 alone apparently is not active, are most likely explained by structural differences that arose by evolutionary divergence in the monocot lineage.

## Acknowledgements

The authors acknowledge Tracey Pepper and the Iowa State University Microscopy and Nanolmaging Facility for performing the TEM analyses and Christine Lancelon-Pin (CERMAV) for the SEM observation of purified starch granules.

## References

- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, Laurie DA, Parker M, Waite D, van Wegen S, Verhoeven T, Denyer K. 2002.** Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *The Plant Journal* **31**: 97-112.
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM. 2004.** Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**: 2215-2220.
- Colleoni C, Myers AM, James MG. 2003.** One- and two-dimensional native PAGE activity gel analyses of maize endosperm proteins reveal functional interactions between specific starch metabolizing enzymes. *Journal of Applied Glycoscience* **50**: 207-212.
- Dauvillee D, Colleoni C, Mouille G, Buleon A, Gallant DJ, Bouchet B, Morell MK, d'Hulst C, Myers AM, Ball SG. 2001.** Two loci control phytyloglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **125**: 1710-1722.
- Davidson RM, Hansey CN, Gowda M, Childs KL, Lin H, Vaillancourt B, Sekhon RS, de Leon N, Kaepler SM, Jiang N, Buell CR. 2011.** Utility of RNA sequencing for analysis of maize reproductive transcriptomes. *Plant Genome* **4**: 191-203.
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC. 2005.** *Arabidopsis* mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *The Plant Journal* **41**: 815-830.
- Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM, Zeeman SC. 2006.** Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 12050-12059.
- Deschamps P, Moreau H, Worden AZ, Dauvillee D, Ball SG. 2008.** Early gene duplication within chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts. *Genetics* **178**: 2373-2387.
- Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, James MG. 2001.** Molecular structure of three mutations at the maize *sugary1* locus and their allele-specific phenotypic effects. *Plant Physiology* **125**: 1406-1418.

**Hennen-Bierwagen TA, James MG, Myers AM 2012.** Involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis. In: Tetlow IJ ed. *Essential Reviews In Experimental Biology, Volume 5. The Synthesis and Breakdown of Starch*: Society For Experimental Biology.

**Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman S, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R. 2003.** Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *The Plant Cell* **15**: 133-149.

**James MG, Robertson DS, Myers AM. 1995.** Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition in kernels. *The Plant Cell* **7**: 417-429.

**Katsuya Y, Mezaki Y, Kubota M, Matsuura Y. 1998.** Three-dimensional structure of Pseudomonas isoamylase at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **281**: 885-897.

**Kubo A, Colleoni C, Dinges JR, Lin Q, Lappe RR, Rivenbark JG, Meyer AJ, Ball SG, James MG, Hennen-Bierwagen TA, Myers AM. 2010.** Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch debranching enzymes in developing maize endosperm. *Plant Physiology* **153**: 956-969.

**Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta SL, Kebrom TH, Provar N, Patel R, Myers CR, Reidel EJ, Turgeon R, Liu P, Sun Q, Nelson T, Brutnell TP. 2010.** The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome. *Nature Genetics* **42**: 1060-1067.

**Lin Q, Huang B, Zhang M, Rivenbark JG, Zhang X, James MG, Myers AM, Hennen-Bierwagen TA. 2011.** Functional interactions between starch synthase III and isoamylase-type starch debranching enzyme in maize endosperm. *Plant Physiology* **158**: 679-692.

**Majeran W, Friso G, Ponnala L, Connolly B, Huang M, Reidel E, Zhang C, Asakura Y, Bhuiyan NH, Sun Q, Turgeon R, van Wijk KJ. 2010.** Structural and metabolic transitions of C4 leaf development and differentiation defined by microscopy and quantitative proteomics in maize. *The Plant Cell* **22**: 3509-3542.

**Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S. 1996.** Preamylopectin processing: A mandatory step for starch biosynthesis in plants. *The Plant Cell* **8**: 1353-1366.

**Nakamura Y, Umemoto T, Takahata T, Komae K, Amano E, Satoh H. 1996.** Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm: Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **97**: 491-498.

**O'Shea MG, Samuel MS, Konik CM, Morell MK. 1998.** Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides: efficiency of labelling and high-resolution separation. *Carbohydrate Research* **307**: 1-12.

**Schlosser AJ, Martin JM, Hannah LC, Giroux MJ. 2012.** The maize leaf starch mutation has diminished field growth and productivity. *Crop Science* **52**: 700-706.

**Streb S, Delatte T, Umhang M, Eicke S, Schorderet M, Reinhardt D, Zeeman SC. 2008.** Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. *The Plant Cell* **20**: 3448-3466.

**Streb S, Zeeman S. 2012.** Starch metabolism in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book* **10**.

**Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.

**Tracy WF, Whitt SR, Buckler ES. 2006.** Recurrent mutation in genomic evolution: Example of *Sugary1* and the origin of sweet maize. *Crop Science* **46**: S49-S54.

**Utsumi Y, Nakamura Y. 2006.** Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm. *Planta* **225**: 75-87.

**Utsumi Y, Utsumi C, Sawada T, Fujita N, Nakamura Y. 2011.** Functional diversity of isoamylase oligomers: The ISA1 homo-oligomer is essential for amylopectin biosynthesis in rice endosperm. *Plant Physiology* **156**: 61-77.

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

**Wattebled F, Planchot V, Dong Y, Szydlowski N, Pontoire B, Devin A, Ball S, D'Hulst C. 2008.** Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **148**: 1309-1323.

**Yandeau-Nelson MD, Laurens L, Shi Z, Xia H, Smith AM, Guiltinan MJ. 2011.** Starch-branching enzyme IIa is required for proper diurnal cycling of starch in leaves of maize. *Plant Physiology* **156**: 479-490.

**Zeeman SC, Umemoto T, Lue W-L, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J. 1998.** A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytyloglycogen. *The Plant Cell* **10**: 1699-1711.

### **Les figures supplémentaires se trouvent en annexe.**

Figure supplémentaire S1 : Alignement de séquences primaires d'ISA de monocotylédones et dicotylédones.

Figure supplémentaire S2 : Structure de l'isoamylase de *Pseudomonas* sp.

*Etude du dialogue moléculaire entre le  
métabolisme de l'amidon et la physiologie  
des plastes chez A. thaliana*

## I. Etude de l'implication des différents domaines de SS4 dans l'initiation de la synthèse d'amidon

Chez *Arabidopsis thaliana*, le gène codant SS4 est situé sur le chromosome 4 au locus At4g18240 (Figure 1). Ce locus se compose de 5095 nucléotides dont 3123 correspondent aux exons permettant la production d'une protéine de 1040 acides aminés. L'analyse *in silico* de cette séquence protéique, effectuée à l'aide du logiciel ChloroP, a permis d'identifier une région de 126 paires de bases correspondant au peptide de transit responsable de l'adressage chloroplastique de SS4.

Chromosome 4  
At4G18240 (SS4)



Figure 1 : Représentation schématique de la séquence d'ADN génomique de SS4. La partie verte représente la région identifiée comme codant le peptide de transit. Les bandes bleues représentent les différents exons, au nombre de 16, reliés entre eux par les séquences non codantes (lignes bleues).

L'analyse fine de la séquence de SS4 permet d'identifier deux régions distinctes (Figure 2). La partie carboxy-terminale (Cter) présente une forte homologie de séquence avec les autres amidon-synthases et comporte les régions identifiées comme étant nécessaires à l'activité glycosyl-transférase (Figure 2). La partie amino-terminale (Nter) de SS4 ne présente aucune homologie avec les autres amidon-synthases ni aucune autre protéine identifiée chez les plantes ou les autres organismes vivants. La fonction de cette longue extension Nter est inconnue. Il est intéressant de remarquer qu'on y trouve deux domaines de type faisceaux d'hélices (ou *coiled-coil*), entre les acides aminés 190 et 465, qui sont connus pour intervenir dans les interactions protéine/protéine ou encore protéine/lipides (Mason *and* Arndt, 2004 ; Rabe *et al.*, 2014).

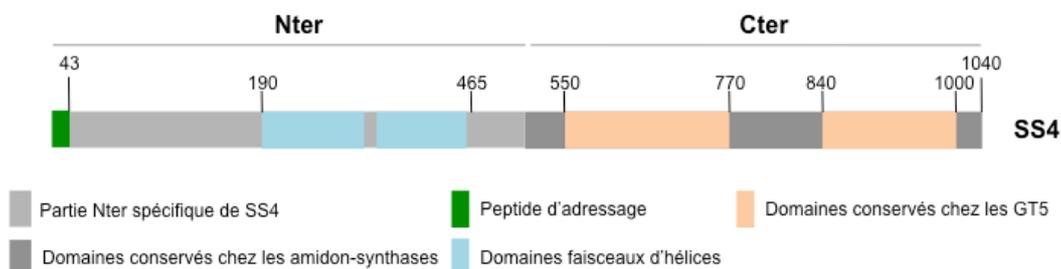


Figure 2 : Représentation des différents domaines de SS4. La légende des couleurs est intégrée à la figure. On retrouve, dans la partie Nter, les domaines faisceaux d'hélices et dans la partie Cter les domaines conservés des glycosyl-transférases de type 5 (GT5 selon la classification CAZy).

## 1. Production de SS4 recombinante chez *Escherichia coli*

Afin d'évaluer l'importance des régions N-ter et C-ter de SS4 dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon *in planta*, nous avons commencé par étudier l'effet de l'expression hétérologue de différentes constructions chez *E. coli*.

L'ADNc utilisé pour les clonages a été obtenu auprès du centre de ressource Riken (Japon). A partir de cette séquence, quatre constructions distinctes ont été réalisées permettant d'exprimer :

- SS4 entière
- Partie N-ter de SS4 (acides aminés 43 à 500)
- Partie C-ter de SS4 (acides aminés 501 à 1040)
- SS4 présentant une substitution d'un acide aminé que l'on suppose essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme. L'acide glutamique en position 929 est remplacé par une glutamine. Ce site a été identifié comme indispensable à l'activité  $\alpha$ -1,4 glycosyl transférase des amidon-synthases chez le maïs (Nichols *et al.*, 2000). Nous espérons, à partir de cette simple mutation, produire une SS4 entière mais catalytiquement inactive.

Ces différentes séquences, représentées schématiquement sur la figure 3, sont dépourvues de la partie permettant la synthèse du peptide de transit (acides aminés 1 à 42) afin de produire un polypeptide dont la séquence s'apparente à celle de l'enzyme mature.



Figure 3 : Représentation schématique des différentes séquences clonées. En gris clair la partie Nter, en gris foncé la partie Cter de SS4, en rouge le codon STOP. La croix représente la mutation introduite par mutagenèse dirigée dans la partie Cter de la protéine. Toutes ces séquences ont été introduites dans un vecteur d'entrée (pENTR D-TOPO) (Invitrogen).

Les différentes séquences d'intérêt ont été clonées dans un vecteur dit « d'entrée » compatible avec la technologie de recombinaison Gateway<sup>®</sup>, puis transférées dans un vecteur dit « de destination » permettant leur expression sous contrôle d'un promoteur inductible dans *E. coli* (voir matériels et méthodes).

Une fois dans le vecteur d'expression (pDest17), les différentes protéines ont été produites dans la souche *E. coli* BL21 AI, extraient puis leurs activités ont été testées par zymogramme (Figure 4).

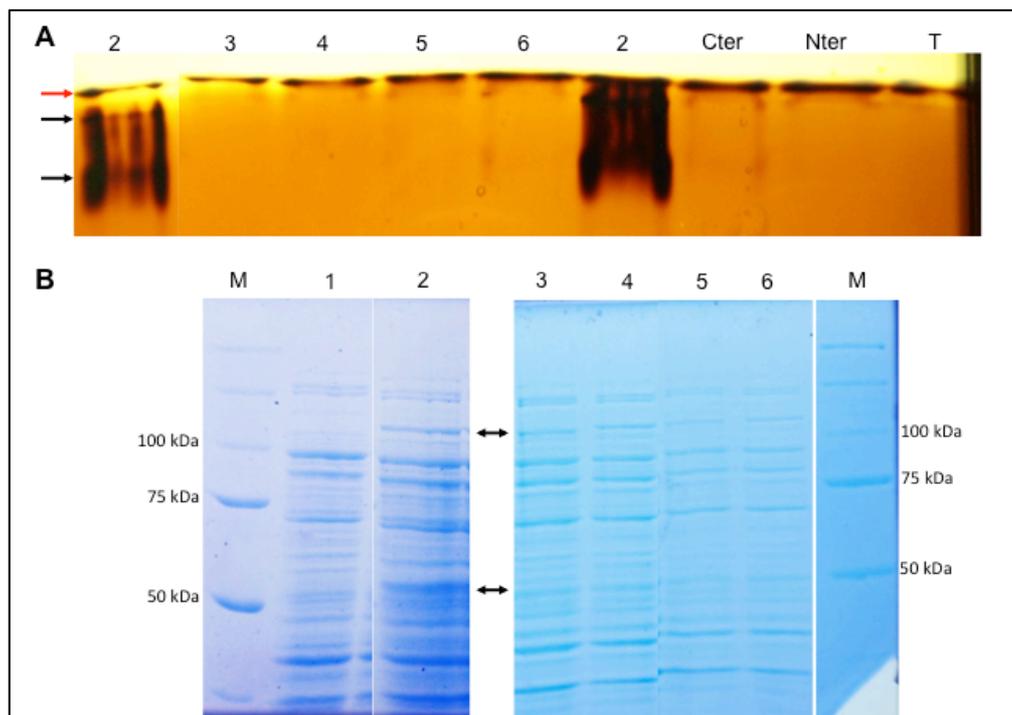


Figure 4 : A, Photographie d'un zymogramme révélant les activités amidon-synthases, contenant du glycogène (0,3 %) et coloré avec une solution de Lugol. 100 µg d'extrait protéique des cultures d'*E. coli* ont été déposés par puits. Les puits « 2 » correspondent à des extraits produisant SS4 sous sa forme mature et non modifiée. Les puits de 3 à 6 sont des extraits contenant des SS4 mutées. Les parties Cter et Nter de SS4 ont également été exprimées dans *E. coli*. Le dernier puits correspond à un extrait protéique de la souche *E. coli* non transformée qui nous sert de témoin (T). En A, la flèche rouge pointe l'activité glycogène synthase d'*E. coli* et les flèches noires indiquent les activités dues à l'expression de SS4. En B : photos de gels « SDS-PAGE » correspondants aux extraits bruts d'*E. coli* (50µg / puits) avant induction de l'expression (1), ayant produit SS4 entière et active (2) ou les quatre constructions exprimant SS4 mutée E929Q (3 à 6). Les doubles flèches pointent les SS4 produites (à 110kDa) et une bande supplémentaire observée à chaque production (à 55kDa)

Il est important de noter qu'il n'a jamais été possible d'observer l'activité de SS4 par zymogramme à partir d'un extrait de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*. Cela s'explique, soit par sa faible expression *in planta* soit par une méthode d'extraction qui ne permet pas de récupérer SS4 dans l'extrait, soit encore parce que cette enzyme serait uniquement produite

à un (des) moment(s) précis du développement de la plante. Ici, SS4 recombinante, produite dans *E. coli* sous sa forme mature, présente une activité synthase très visible sur zymogramme contenant du glycogène comme substrat. On visualise clairement deux bandes d'activité (Figure 4 A). La présence de deux bandes peut s'expliquer par la formation de complexes contenant un nombre variable de monomères SS4, une interaction avec un partenaire protéique bactérien ou encore par une modification de type phosphorylation qui pourrait entraîner une différence d'affinité avec le substrat. L'activité de la glycogène-synthase (GS) de la souche d'*E. coli* est également visible sur ce gel (flèche rouge Figure 4 A). Cette enzyme, identifiée par sa présence dans l'extrait témoin, est tellement affine pour le substrat que sa mobilité dans le gel est quasi nulle. Les SS4 mutées, visibles sur SDS-PAGE (Figure 4 B à 110 KDa) sont inactives comme le montre le zymogramme (Figure 4 A). Les parties Nter et Cter de SS4 ont également été exprimées dans *E. coli* mais ne possèdent pas non plus d'activité amidon-synthase visible sur zymogramme. L'absence d'activité lors de l'expression la partie Nter n'est pas surprenante puisqu'elle ne contient pas de site catalytique ni de domaine homologue aux autres glycosyltransférases. A l'inverse, on pourrait s'attendre à observer une activité synthase pour la partie Cter de SS4 qui possède tous les acides aminés nécessaires à l'activité catalytique. Deux hypothèses peuvent expliquer l'absence d'activité du domaine Cter : soit son activité est dépendante de la présence de l'extension Nter, ou du moins d'une partie supplémentaire de cette séquence dont la longueur resterait à déterminer ; soit elle nécessite un repliement particulier qui n'a pas été possible dans la bactérie. Enfin, il est possible que la partie Cter de SS4 ne soit pas présente en quantité suffisante pour visualiser son activité sur ce type de gel, elle pourrait être plus sensible à une dégradation protéolytique par exemple. Il est nécessaire de vérifier, à l'aide d'anticorps spécifiques l'expression des différentes protéines dans *E. coli*. Un anticorps dirigé contre des épitopes de la partie Nter et Cter de SS4 a été récemment obtenu. Cependant sa spécificité reste problématique. Il est prévu, à court terme d'améliorer le signal de détection en particulier, par la purification de cet anticorps à partir du sérum de lapin de manière à pouvoir l'utiliser en routine pour la détection de SS4 entière ou de ses parties Nter et Cter.

Par ailleurs, nous avons remarqué un retard de croissance des souches d'*E. coli* exprimant certaines constructions de la protéine. Afin d'étudier les causes de ce retard, nous avons réalisé des suivis de croissance d'abord sur boîtes de pétri avec ou sans induction de l'expression des constructions (Figure 5) puis de manière plus précise en suivant l'évolution de la densité optique (DO) à 600 nm des bactéries cultivées en milieu liquide (Figure 6).

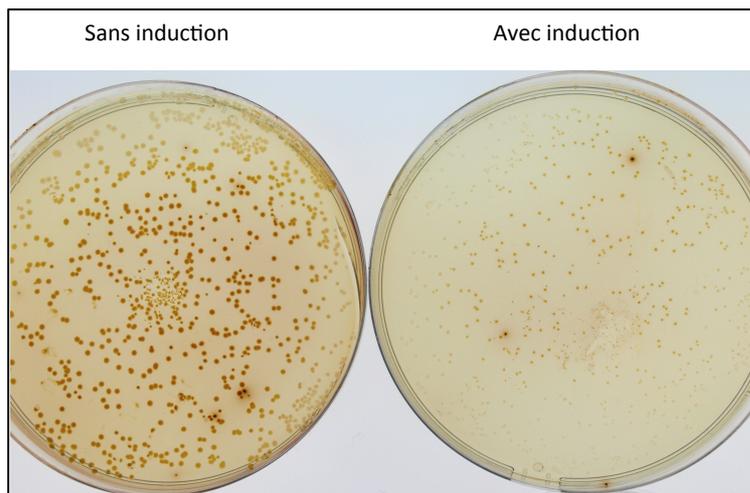


Figure 5 : Photographies de colonies d'*E. coli* exprimant SS4 mature. Le vecteur utilisé est pDest17 dans la souche BL21 AI. Les boîtes contiennent du milieu LB + agar (1%) et ampicilline 100 µg/mL. Les boîtes avec l'inducteur contiennent 0,2 % de L-arabinose. Elles sont incubées une nuit à 37°C puis colorées par des vapeurs d'iode pendant 5 minutes.

Les colonies sont plus petites lorsque l'expression de SS4 est induite par le L-arabinose comme le montre la Figure 5. Ceci pourrait s'expliquer par une remobilisation énergétique de la bactérie pour la production de SS4. Cependant, l'expression induite d'autres protéines (avec le même vecteur, la même souche et le même système d'induction) est moindre. Une autre explication serait que l'activité synthase modifie le glycogène ou que la protéine s'associe avec le glycogène et/ou des protéines endogènes entraînant une gêne pour l'organisme en division. Afin de tester ces différentes hypothèses, j'ai réalisé un suivi de la croissance de *E. coli* BL21 AI après induction (à  $DO_{600} = 0,5$ ) de la production de: SS4, SS4 Mutée (E929Q), la partie Cter de SS4, la partie Ner de SS4 (voir Figure 3) et une enzyme de branchement qui nous servira de témoin (Figure 6).

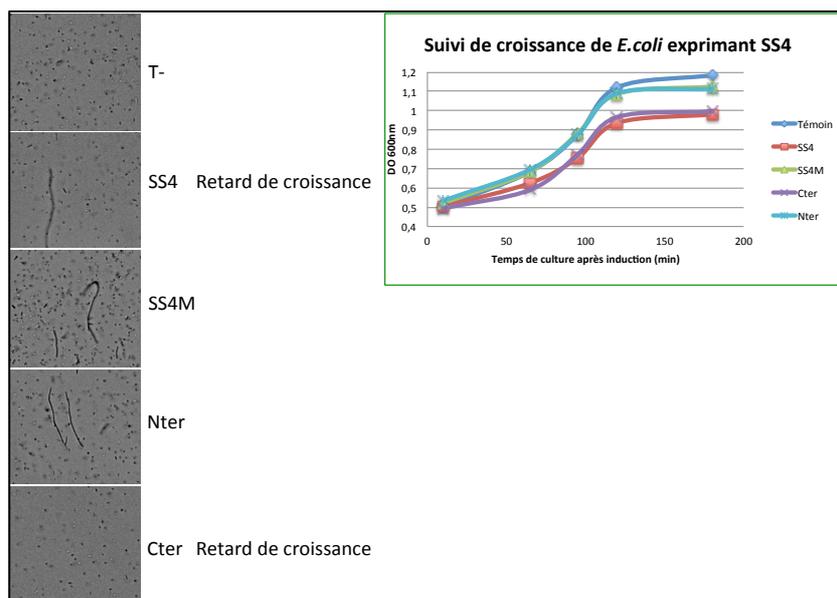


Figure 6 : Suivi de croissance en milieu liquide (culture de 200 mL en erlenmeyer dans un milieu LB + ampicilline). L'induction avec 0,2 % de L-arabinose a été appliquée lorsque la culture a atteint une DO<sub>600</sub> de 0,5. En parallèle les cultures sont observées au microscope optique environ 100 minutes après induction. Les souches expriment la SS4 sous sa forme mature (SS4), la SS4 avec la mutation ponctuelle (SS4M), les parties Nter et Cter de la SS4 ainsi qu'une construction témoin exprimant une enzyme de branchement de l'amidon (T-).

Un léger retard de croissance est observé pour les souches exprimant SS4 entière ou uniquement la partie C-terminale de celle-ci. Ces deux constructions possèdent le domaine C-terminal non modifié et porteur de l'activité enzymatique de SS4. Il est donc tout à fait plausible d'imaginer que ce domaine Cter perturbe le métabolisme du glycogène et compromet la croissance bactérienne. De manière surprenante, on observe une accumulation de bactéries filamenteuses très longues lorsqu'elles expriment au moins la partie Nter de SS4. Ce phénotype n'a jamais été observé lorsque seule la partie Cter est exprimée. D'après ces résultats, nous pouvons supposer que la modification morphologique observée est uniquement due à l'expression de la partie Nter de SS4. La corrélation entre la présence dans cette partie de la protéine de motifs de type faisceaux d'hélices (*coiled-coil*) connus pour être impliqués dans les interactions protéine/protéine et le phénotype observé suggère une possible interaction entre SS4 et une ou plusieurs protéines bactériennes intervenant dans la division cellulaire. Le fait que le processus de division du chloroplaste soit en partie hérité du mécanisme de division bactérien et que la production de SS4 semble perturber la division d'*E. coli* constitue un élément à prendre en compte pour la suite de ce travail.

SS4 recombinante exprimée dans *E. coli* possède une étiquette de six résidus d'histidine couplés à son extrémité Nter. Cette étiquette nous permet de purifier la protéine par chromatographie d'affinité sur une matrice contenant du nickel immobilisé. Le but ici, est d'obtenir l'enzyme sous la forme la plus pure possible de manière à pouvoir déterminer ses paramètres de fonctionnement *in vitro*. La purification de SS4 a permis jusqu'à présent la production en quantité limitée de la protéine entière. En effet, l'expression de SS4 recombinante s'accompagne de la production de deux polypeptides d'environ 55 KDa (soit la moitié de la taille de la protéine mature). Ces deux fragments sont systématiquement visualisés lors de l'analyse des lysats de production par SDS-PAGE (Figure 7). Ces deux polypeptides ont été identifiés par spectrométrie de masse (LTQ- Orbitrap) comme étant les parties Nter et Cter de SS4 (identification effectuée en collaboration avec le Dr AS. Vercoutter-Edouart de l'UGSF). La présence de ces deux fragments peut s'expliquer par un clivage de SS4 par une protéase bactérienne lors de la production de la protéine. Cette coupure aurait lieu au sein de la bactérie puisque le tampon d'extraction utilisé contient des inhibiteurs de protéases et de l'EDTA.

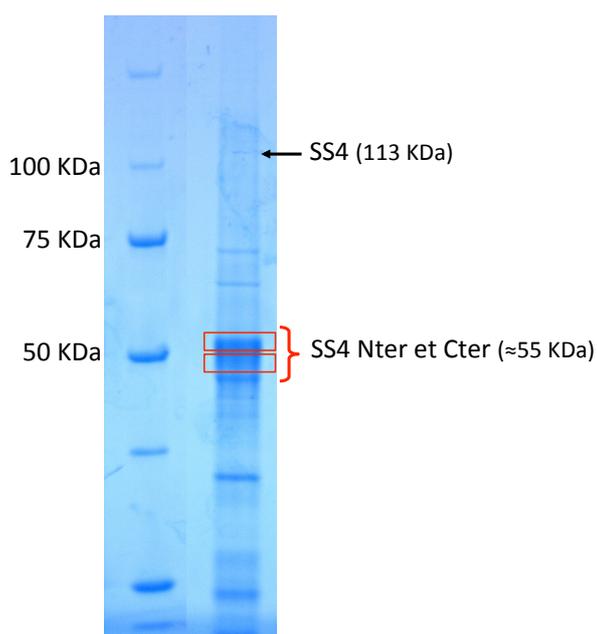


Figure 7 : SDS-PAGE des protéines après purification par chromatographie d'affinité. Les extraits bruts solubles d'*E. coli* sont purifiés sur colonne d'affinité et sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide. La migration s'effectue pendant une heure à 150 V et les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie. SS4, sous sa forme mature, est attendue à environ 110 KDa. Les deux bandes présentes à 55 kDa ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse.

Une autre hypothèse serait que la SS4 nécessite un clivage pour fonctionner. En effet, la partie Cter de SS4 présente de nombreuses similitudes avec les autres amidon-synthases alors que la partie Nter est totalement différente. Il est alors envisageable qu'un clivage similaire ait lieu *in planta* permettant de réguler la fonction de l'enzyme. Les parties Nter et Cter pourraient alors avoir des rôles différents dans la plante.

## 2. Transformation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* dépourvus de SS4

Afin de tester l'hypothèse d'un clivage fonctionnel *in planta*, le mutant *ss4-* (GK-290D11) d'*Arabidopsis thaliana* a été transformé avec les constructions permettant d'exprimer SS4 entière, SS4 entière mais inactive (E929Q), et les parties Nter et Cter possédant toutes la séquence codant le peptide d'adressage au chloroplaste (Figure 8). Le but de ces transformations est d'étudier les phénotypes de complémentation de la mutation *ss4-* lors de l'expression des différents fragments de SS4. Rappelons que chez *Arabidopsis* la mutation *ss4-* conduit à un retard de croissance et à l'accumulation d'un seul grain d'amidon par plaste au lieu des 5 à 7 grains accumulés dans les plastes d'une plante sauvage (Figure 9).



Figure 8 : Représentation schématique des différentes constructions intégrées dans les mutants *ss4-* d'*A. thaliana*. En vert la séquence codant le peptide d'adressage au chloroplaste (PT), en gris clair l'extension Nter de SS4 en gris foncé le domaine Cter de SS4 et en rouge le codon stop. La croix jaune représente la mutation ponctuelle dans le site catalytique (E929Q).

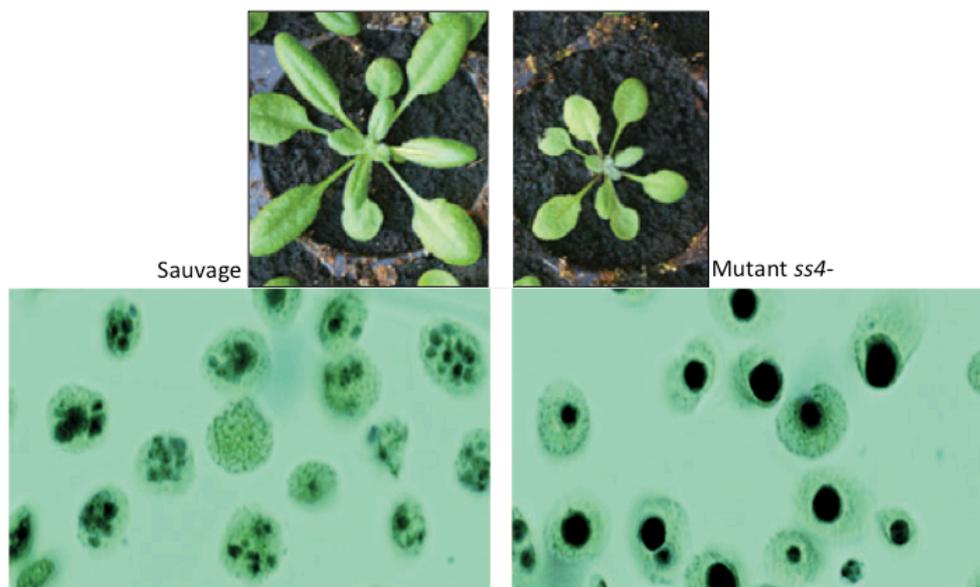


Figure 9 : A ; Photographies de plantes âgées d'une vingtaine de jours (*A. thaliana*). A gauche la plante sauvage (écotype Col 0) à droite le mutant *ss4-* dans le même fond génétique. B ; Photographies obtenues par microscopie optique de chloroplastes d'*Arabidopsis thaliana* purifiés et colorés avec une solution de lugol.

Des lignées résistantes au glufosinate d'ammonium (marqueur de sélection) ayant donc intégré l'ADN-T ont été obtenues pour chacune des transformations effectuées. Un premier criblage basé sur le retard de croissance des lignées *ss4-* a été entrepris (Figure 9) mais n'a pas permis d'identifier d'individu présentant une complémentarité de ce phénotype. Il n'a pas non plus été possible d'observer l'expression de SS4 complète et active dans les transformants criblés. Nous ne connaissons pour l'instant pas les raisons de cette absence de complémentarité de la mutation *ss4-* par l'expression des ADNc. Ce défaut pourrait-il être causé par l'utilisation d'un promoteur fort (35S) pour l'expression des séquences d'intérêt dans la plante ? Les 612 transformants non encore criblés le seront dans un futur proche. Un ou plusieurs d'entre eux montreront un phénotype complémenté. Cependant nous sommes assez pessimistes dans la mesure où aucune complémentarité du phénotype de croissance de la plante n'a été observé pour les 700 transformants obtenus. S'il s'avère qu'aucun ne complémenté, il conviendra alors de procéder à la construction de nouveaux vecteurs de transformation associant les différentes formes SS4 à son promoteur endogène.

## II. Identification de partenaires d'interaction potentiels de SS4

Lorsque nous avons débuté ce travail de thèse, aucun partenaire de SS4 n'avait été identifié. Or, comme évoqué précédemment, SS4 présente une longue extension Nter possédant un domaine coiled-coil potentiellement impliquée dans les interactions protéine-protéine. Nous avons donc choisi deux approches dans le but d'identifier des partenaires possibles d'interaction de SS4.

- La première basée sur une approche avec *a priori* consiste à tester les interactions entre SS4 et des protéines identifiées comme intervenant dans la division plastidiale. Nous avons réalisé de la **BiFluorescence Complementation** (BiFC) chez le tabac mais également de l'expression et de la co-expression de SS4 et des protéines impliquées dans la division plastidiale dans des protoplastes d'*A. thaliana*. Le but de ces expressions transitoires était de visualiser SS4, de la localiser dans les plastes et de tester s'il y avait co-localisation avec les partenaires testés.
- La seconde méthode est un criblage sans *a priori* qui repose sur la technique de double hybride à grande échelle chez la levure.

### 1. Tests d'interactions avec des protéines de la division plastidiale *in vivo*

Afin de tester l'interaction entre SS4 et certaines protéines impliquées dans la division plastidiale, nous avons réalisé des expériences de BiFC. Cette technique présente l'avantage de donner une information sur la proximité des protéines et sur leur localisation intra cellulaire. Les constructions réalisées sont les suivantes : FtsZ1 et FtsZ2.1 et ARC6 (Figure 10). Ces trois protéines sont indispensables à la division plastidiale. Elles sont localisées dans les chloroplastes. Il est important de mentionner qu'il a été trouvé, par analyse *in silico*, que SS4 possède dans sa partie Nter un domaine homologue à la protéine bactérienne EzrA. EzrA est une protéine connue pour interagir avec FtsZ et réguler la formation de l'anneau de division chez les bactéries (Haeusser *et al.*, 2004). Les FtsZ de plantes sont homologues aux FtsZ bactériennes et il est raisonnable d'envisager l'existence d'une interaction entre SS4 et les protéines FtsZ. SS4 agirait alors comme un régulateur de la formation de l'anneau de division permettant ainsi de limiter la division des plastes lorsqu'il y a initiation de la synthèse de grains d'amidon. On peut aussi imaginer l'hypothèse inverse : A la suite d'une division plastidiale il est nécessaire de réinitier la formation de grains de manière à maintenir un nombre constant de grains par plastes (5 à 7 chez la plante sauvage). La fin de la division induirait alors l'activation de SS4 afin d'initier la formation des nouveaux grains d'amidon.

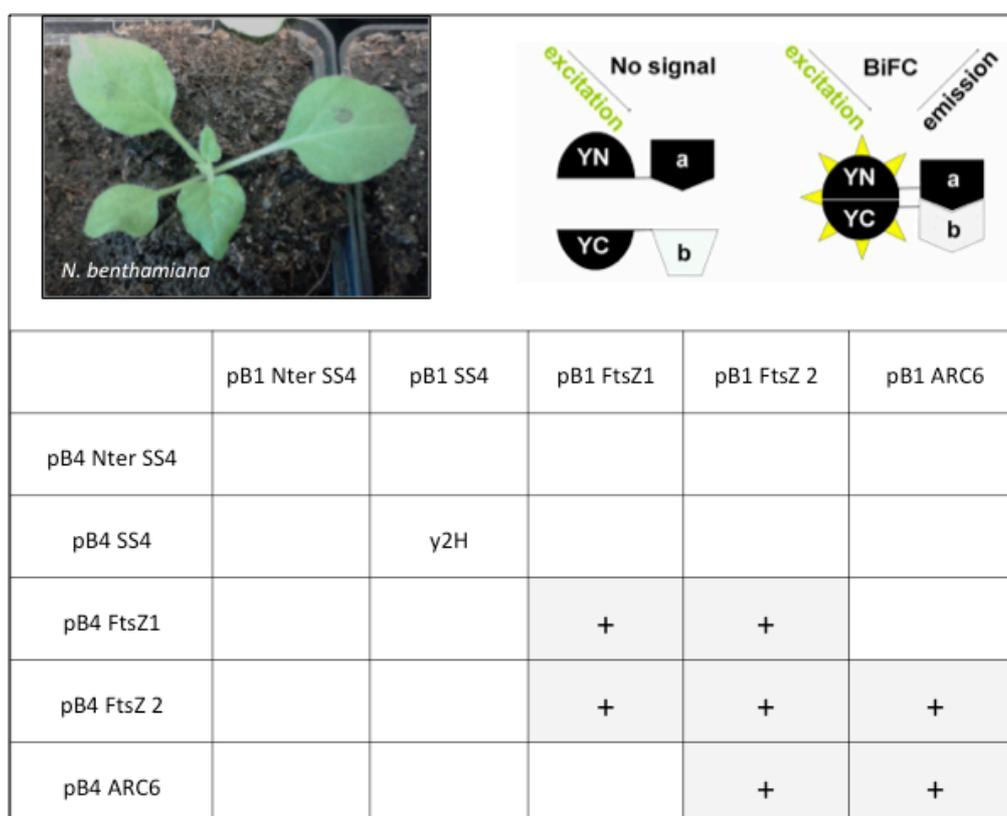


Figure 10 : Expérience de BiFC menée chez le tabac *N. benthamiana*. Le tableau rassemble toutes les interactions testées. Le premier vecteur appelé « pB1 » et le second « pB4 ». Les « + » représentent les interactions connues et publiées (Maple *et al.*, 2005 ; Maple *et al.*, 2007) et « y2h » le couplage SS4/SS4 qui a été observé lors d'un criblage double hybride chez la levure détaillé dans la suite de ce manuscrit.

L'expression transitoire des protéines de fusion pour l'expérience de BiFC s'effectue dans la feuille de tabac (*N. benthamiana*) par agroinfiltration. Une protéine de type **Yellow Fluorescent Protein** (YFP) adressée au chloroplaste est utilisée comme témoin de fluorescence. Les associations FtsZ1/FtsZ1 et FtsZ1/FtsZ2.1 sont utilisées comme témoin positif d'interaction (Figure 11).

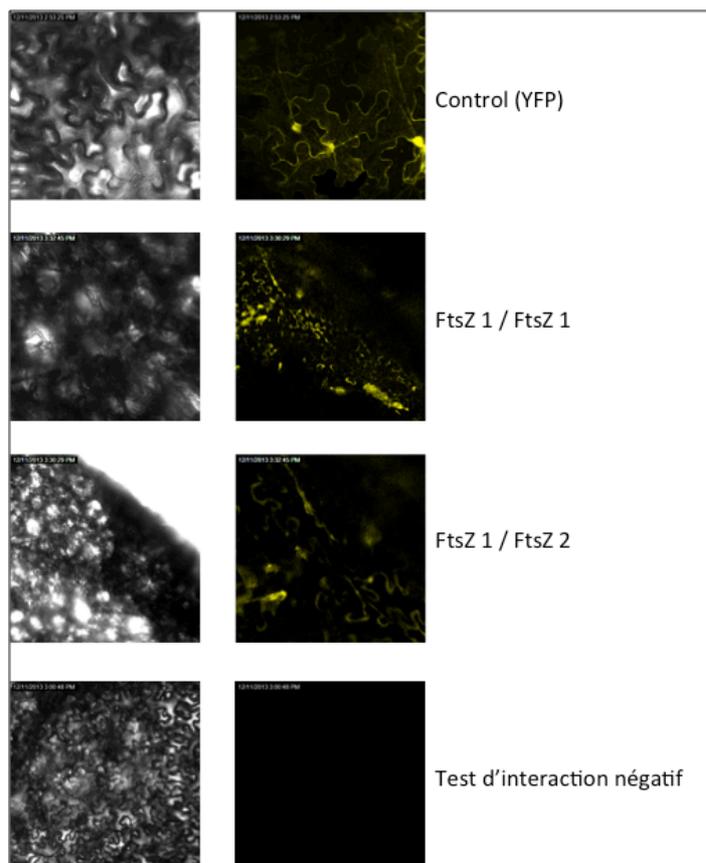


Figure 11 : Expérience de BiFC. Les plants de tabac, âgés de trois semaines environ, sont agroinfectés avec les vecteurs pB1 et pB4 contenant les constructions à tester (Figure 10). Les témoins positifs présentent une fluorescence jaune au niveau des cellules de l'épiderme. Aucune fluorescence n'a été observée pour les autres interactions testées.

Aucun des partenaires testés n'a permis d'observer une fluorescence. Il n'est donc pas possible de confirmer l'interaction de SS4 avec elle-même ni même de supposer une proximité entre SS4 et les protéines testées impliquées dans la division du plaste. SS4 n'interagit peut-être pas directement avec ces protéines. Il serait intéressant de tester d'autres partenaires potentiels comme la protéine FtsZ2.2 par exemple et de modifier l'emplacement des demi-protéines de fusion qui pourrait gêner l'interaction.

## 2. Localisation de SS4

Afin de localiser SS4 au sein même des chloroplastes, nous avons réalisé une série de transformations de protoplastes d'*Arabidopsis* avec des protéines de fusion permettant de coupler l'étiquette YFP à SS4 entière ou sa partie Nter (qui possède le domaine coiled-coil). Ce travail a été réalisé à l'Université de Genève dans le laboratoire du Pr Tereza Fitzpatrick. L'université dispose d'un microscope confocal Leica SP5 utilisé pour produire l'ensemble des photos présentées dans cette partie.

La localisation de protéines impliquées dans la division plastidiale (FtsZ1, FtsZ2.1 ou ARC6) a été réalisée avec des constructions permettant la fusion de ces protéines à une GFP. Le but de cette manipulation est de localiser SS4 et de tester si elle colocalise avec une de ces protéines de division plastidiale.

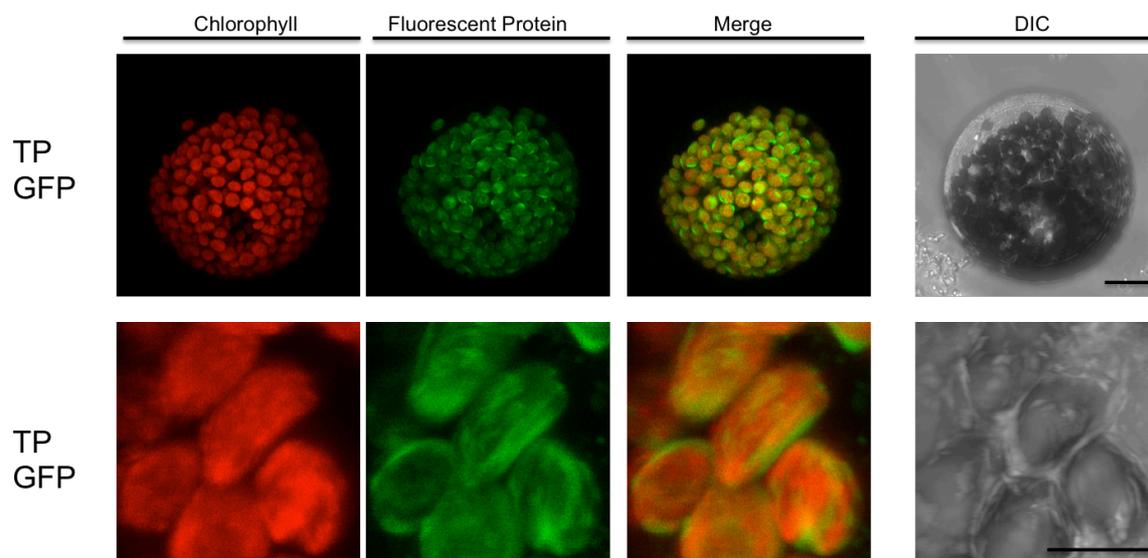


Figure 12 : Photographies obtenues par microscopie confocale (Leica SP5) de protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* (Col 0) 48 h après transfection. Ils expriment de manière transitoire l'étiquette GFP (*Green Fluorescent Protein*) adressée au plaste (TP GFP). Les photos représentent la fluorescence naturelle de la chlorophylle (en rouge), la fluorescence de GFP, la superposition des deux images (Merge) et une photo en lumière blanche (DIC). La première ligne représente un protoplaste entier, la seconde une vue focalisée sur les chloroplastes. Echelle 5 $\mu$ m.

La localisation de la GFP couplée à un peptide de transit nous a permis de valider l'expression de la protéine et son adressage aux chloroplastes (Figure 12).

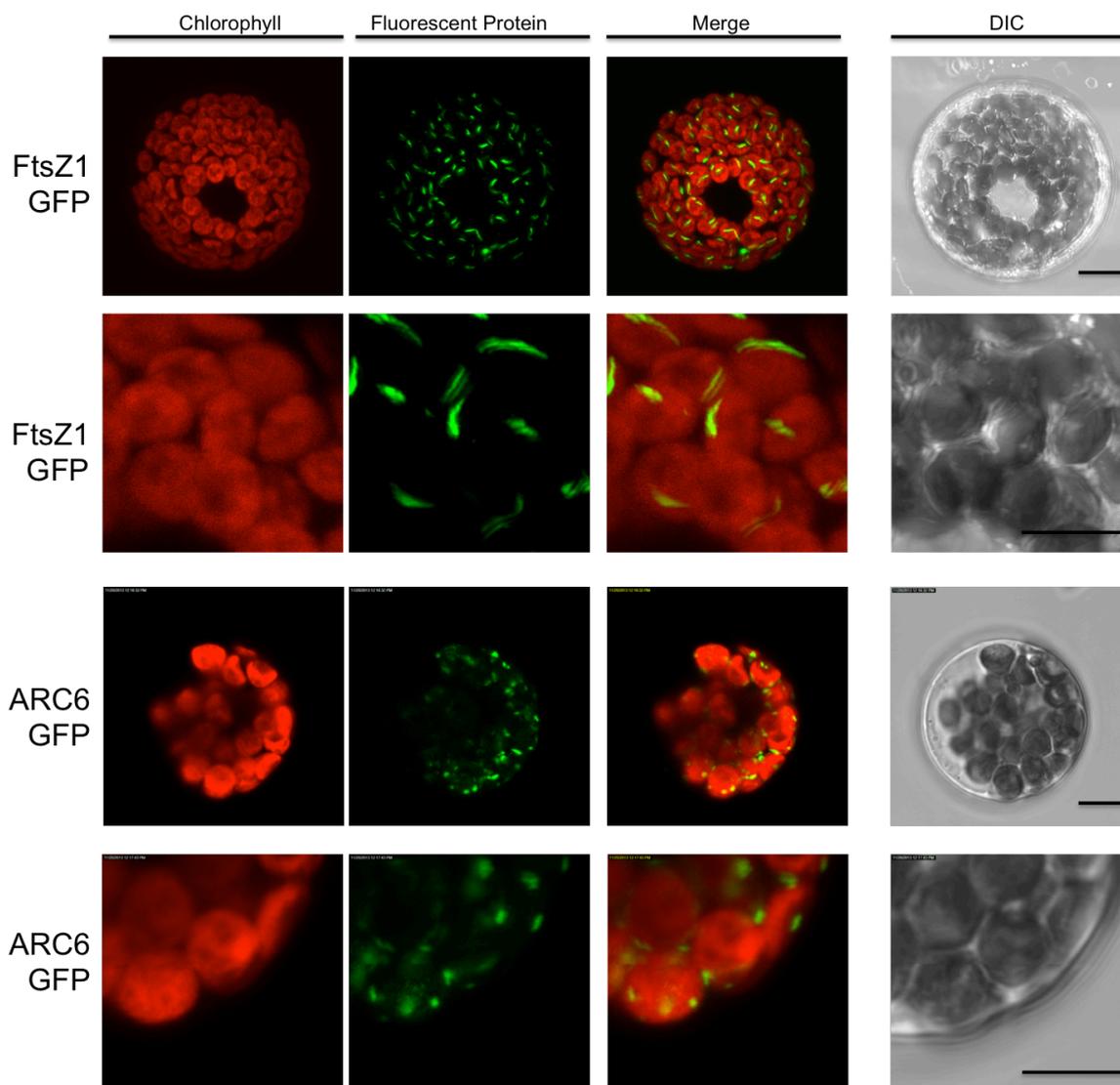


Figure 13 : Expression des protéines de fusion FtsZ1-GFP et ARC6-GFP dans des protoplastes d'*A. thaliana*. Les photos représentent la fluorescence naturelle de la chlorophylle (en rouge), la fluorescence de GFP (vert), la superposition des deux images (Merge) et une photo en lumière blanche (DIC). Echelle 5µm.

48h après la transfection, les protéines FtsZ1 se trouvent localisées sous la forme de filaments dans les plastes (Figure 13). Nous remarquons que la localisation de FtsZ-GFP a évolué au cours du temps. En effet, à 24 h les filaments observés représentent moins d'1/3 du diamètre d'un plaste alors qu'après 48 h les filaments de FtsZ1 représentent environ 2/3 du diamètre (Figure 14). La protéine ARC6 quant à elle est accolée de manière ponctuelle à l'enveloppe plastidiale comme cela est décrit dans la littérature (Figure 13) (Maple *et al.*, 2005).

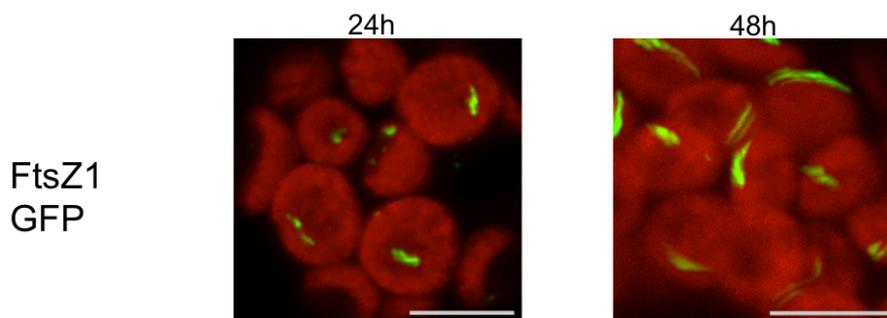


Figure 14 : Evolution de la localisation de FtsZ1 GFP au cours du temps. 24 h après transformation, la protéine est localisée sous la forme de courts filaments alors que 48 h après les filaments sont plus allongés. Echelle 5µm.

Les observations effectuées et présentées sur les figures 13 et 14 laissent penser que les chloroplastes des protoplastes sont en cours de division. C'est potentiellement intéressant puisque la localisation des protéines du métabolisme de l'amidon pourrait être étudiée de manière dynamique lors de la division plastidiale.

L'expression de protéines de fusion dans des protoplastes est une technique couramment utilisée pour la localisation intracellulaire de protéines. Cependant nous ne savions pas si dans les conditions de la manipulation, les protoplastes d'*Arabidopsis* étaient capables d'accumuler de l'amidon. L'observation de taches sombres, visibles par contraste avec la fluorescence de la chlorophylle, nous laisse à penser qu'il y a bien un matériel dense qui pourrait être de l'amidon au sein des chloroplastes. Afin de vérifier la présence d'amidon ainsi que sa localisation, j'ai réalisé des constructions permettant l'expression de la GBSS couplée à la *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) (Figure 15). Cette protéine, impliquée dans la synthèse d'amylose, est connue pour être liée uniformément aux grains d'amidon (Szydłowski *et al.*, 2009 ; Gamez-Ajona *et al.*, 2011).

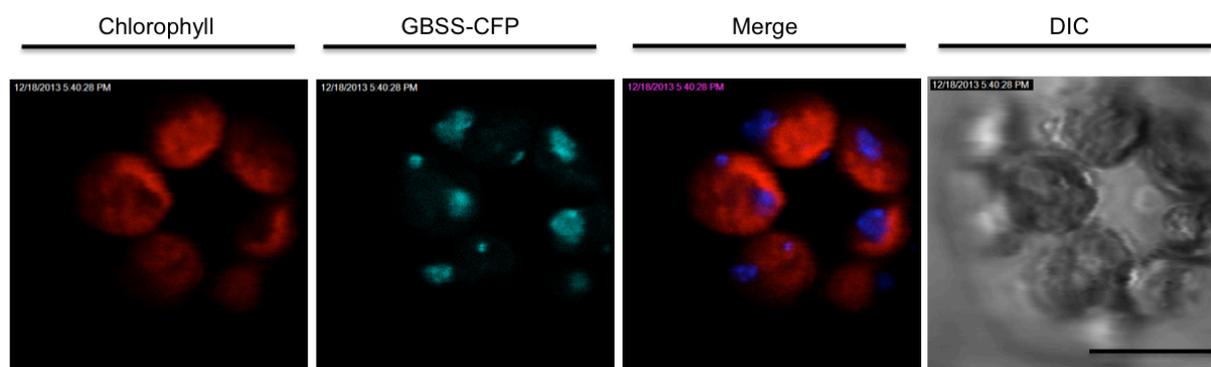


Figure 15 : Expression de la fusion GBSS-CFP dans des protoplastes d'*Arabidopsis*. L'expression transitoire de GBSS-CFP nous permet de localiser les grains d'amidon dans les protoplastes d'*Arabidopsis*. La méthode utilisée est la même que décrite précédemment. On visualise la fluorescence des chloroplastes en rouge, la

GBSS-CFP en bleu et l'assemblage des deux (Merge) ainsi qu'une photo des protoplastes en lumière blanche. Echelle 5µm.

Les taches sombres observées par contraste sur la fluorescence de la chlorophylle colocalisent avec la fluorescence de la fusion GBSS-CFP ce qui indique la présence de grains d'amidon dans les protoplastes d'*Arabidopsis* (Figure 15).

La localisation de SS4-YFP a été testée avec deux vecteurs d'expression : l'un possédant un promoteur à expression forte et constitutive (35S) et le second un promoteur conduisant à une expression plus faible de la protéine (promoteur ubiquitine). Néanmoins, aucune de ces deux constructions n'a permis de visualiser l'expression de SS4 dans les protoplastes. L'absence de signal de fluorescence pourrait être due à une inhibition de l'expression de la séquence codant SS4 ou à la mort des protoplastes transfectés. Une autre explication pourrait être que la longueur importante de la séquence codant SS4 conduise à une efficacité de transfection plus faible que pour les autres constructions.

La partie Nter de SS4 contient le domaine « faisceau d'hélices » que nous soupçonnons intervenir dans l'interaction de cette enzyme avec un partenaire et également dans sa localisation. C'est pourquoi nous avons également réalisé une construction exprimant uniquement la partie Nter de SS4 (acides aminés 1 à 500). Nter de SS4 s'exprime correctement et a pu être localisée par expression transitoire dans des protoplastes d'*Arabidopsis* (Figure 16). Cette localisation ne semble pas correspondre à celle des grains d'amidon (Figure 15) et la protéine se concentre sous la forme d'amas très localisés dans les chloroplastes.

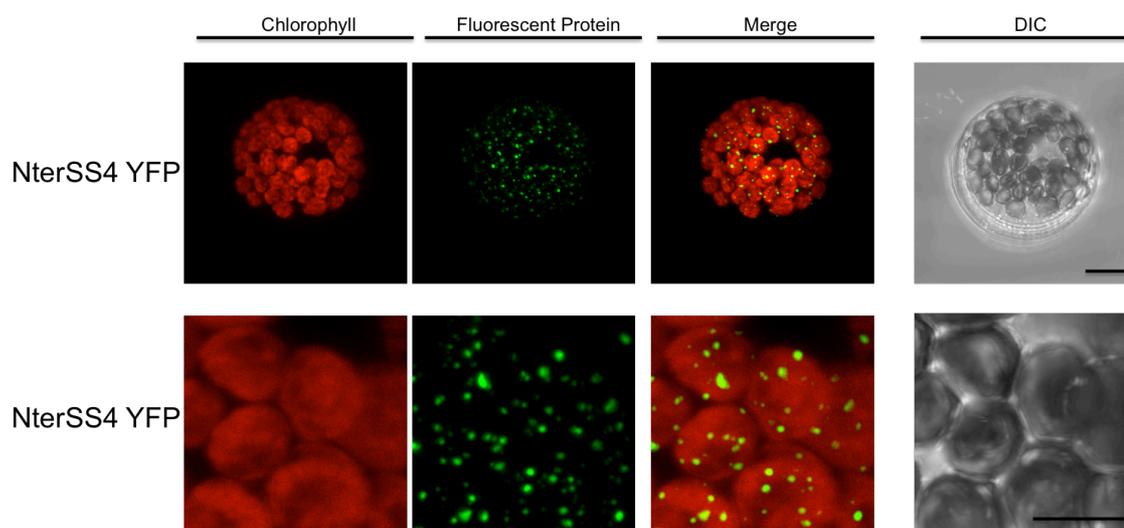


Figure 16 : Localisation de la partie Nter de SS4 exprimée de manière transitoire dans les protoplastes d'*Arabidopsis* et gréffée à une YFP. Echelle 5µm.

Cette différence de localisation entre GBSS et Nter SS4 a été vérifiée par co-transfection de protoplastes avec GBSS-CFP et NterSS4-YFP (Figure 17).

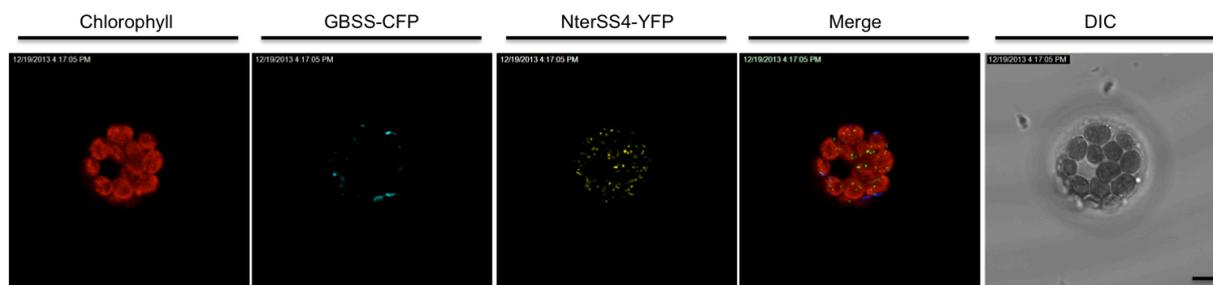


Figure 17 : Co-expression de GBSS-CFP et Nter SS4-YFP dans les protoplastes d'*Arabidopsis* selon la même technique que celle précédemment décrite. Echelle 5 $\mu$ m.

Comme le montre la figure 17, la localisation de la partie Nter de SS4 est indépendante de la localisation des grains d'amidon dans les protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*. Cette localisation (Figure 16 et Figure 18 A) semble extrêmement proche de ce qui a été présenté dans la thèse du Dr Jacopo Martinis en 2013 (soutenue à l'université de Neuchâtel). Il y présente la localisation d'une protéine plastoglobulaire : la fibrilline 1a fusionnée à une YFP (Figure 18 B).

## NterSS4 YFP

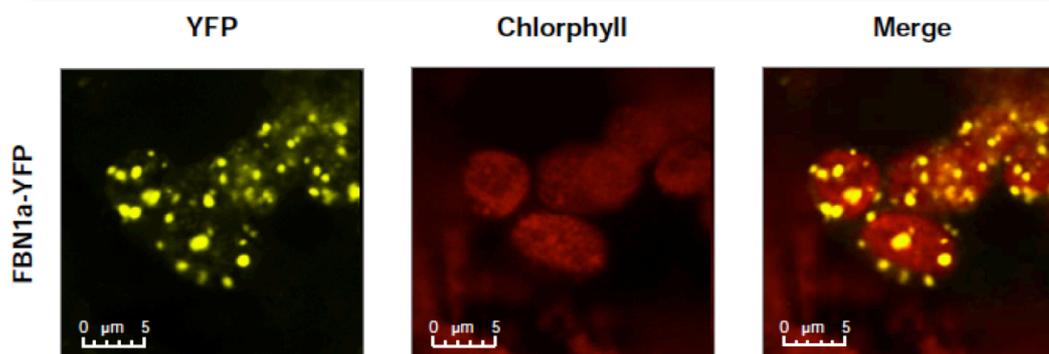
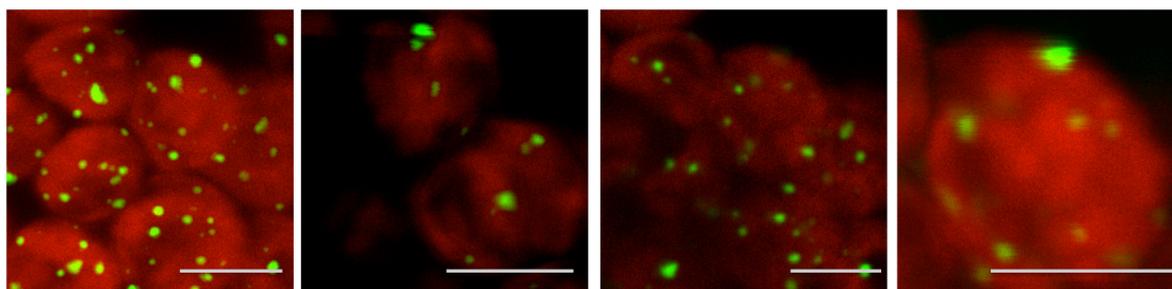


Figure 18 : Comparaison de la localisation de la partie Nter de SS4 (A) avec une observation de la localisation de la fibrilline 1a-YFP présentée dans la thèse du Dr J Martinis (2013). Echelle 5 $\mu$ m.

La fibrilline 1a est une protéine plastoglobulaire. Les plastoglobules sont des gouttelettes lipidiques associées aux thylacoïdes dans les plastes. Ils ont longtemps été considérés comme des structures subcellulaires avec un rôle passif de stockage de lipides ou comme accumulateurs de caroténoïdes dans les chromoplastes. Des études protéomiques ont démontré que les plastoglobules pouvaient également contenir des enzymes actives et ainsi intervenir dans différentes voies métaboliques du plaste (Lundquist *et al.*, 2012 ; Nacir *and* Bréhélin, 2013).

Des travaux très récents réalisés par une équipe espagnole localisent également la SS4 entière ou uniquement sa partie N-terminale comme associées aux plastoglobules et interagissant avec les fibrillines 1a et 1b (Gamez-Arjona *et al.*, 2014) chez *A. thaliana*. Les localisations de SS4 et de sa partie Nter sont identiques ce qui démontre que c'est bien cette partie Nter qui est responsable de la localisation de la protéine au niveau des plastoglobules. Cependant, l'étude de lignées mutantes dépourvues des fibrillines 1a et 1b n'a pas permis de mettre en évidence de phénotype particulier concernant la synthèse d'amidon. La pertinence de l'interaction SS4 fibrilline reste donc sans réponse claire à ce stade.

### 3. Criblage double hybride

Afin d'identifier des partenaires potentiels interagissant physiquement avec SS4, un criblage à grande échelle selon la technique du double hybride a été effectué chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (prestation de service par Hybrigenics, Paris, France). La SS4 est utilisée comme appât contre une banque exprimant les protéines représentatives des gènes exprimées chez de jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana* âgées d'une semaine. Cette banque semble tout a fait adaptée à l'identification des partenaires de SS4 puisque cette protéine est impliquée dans l'initiation de la synthèse d'amidon, mécanisme nécessaire dès les stades précoces du développement de la plante. Ce criblage a permis de mettre en évidence une soixantaine de partenaires d'interaction potentiels.

Nous avons dans un premier temps éliminé les interactions jugées improbables, car impliquant des protéines localisées à l'extérieur du plaste. Après cette première étape de tri, seule une liste de 6 partenaires potentiels subsiste (Figure 19).

Protéine	N° gene	classe	N° lignée	Référence de la lignée	Ecotype
inconnu	At1g21060	D	NASC	N594518-Salk_094518	Col 0
inconnu	At1g21060	D	NASC	N65638-Salk_063669	Col 0
inconnu	At1g21060	D	NASC	N65683-Salk094518	Col 0
inconnu	At1g21060	D	NASC	N563669-Salk_063669	Col 0
Rubisco Activase	At2g39730	B	NASC	N503204-Salk_003204	Col 0
Rubisco Activase	At2g39730	B	NASC	N618831-Salk_118831	Col 0
type myosine	At4g32190	C	NASC	N622445-Salk_122445	Col 0
type myosine	At4g32190	C	NASC	N679037-Salk_122445C	Col 0
prot membranaire	At5g23890	D	NASC	N527266-Salk_027266	Col 0
prot membranaire	At5g23890	D	NASC	N536064-Salk_036064	Col 0
prot membranaire	At5g23890	D	NASC	N678289-Salk_027266C	Col 0
VAR1 (FtsH)	At5g42270	D	NASC	N524637-Salk_024637	Col 0
VAR1 ( FtsH)	At5g42270	D	NASC	N678255-Salk_024637C	Col 0
Zincinlike-metalloprotease	At5g65620	D	NASC	N561339-Salk_061339	Col 0
Zincinlike-metalloprotease	At5g65620	D	NASC	N675340-Salk_058439C	Col 0
Zincinlike-metalloprotease	At5g65620	D	NASC	N558439-SALK058439	Col 0
AtSS4	At4g18240	B	GABI	GK-290D11	Col 0

Figure 19 : Liste des protéines identifiées comme capables d'interagir avec SS4 avec une probabilité extrêmement forte (B), élevée (C) ou avec une confiance modérée (D). Les lignées mutées dans les gènes codant ces protéines sont référencées dans ce tableau.

On y trouve SS4, qui serait donc capable de s'associer sous forme multimérique, une protéine à la fonction inconnue codée par le locus At1g21060, la rubisco activase (At2g39730) et une protéine de type myosine (At4g32190). Cette dernière possède un motif faisceaux d'hélices dans sa partie Cter et est prédite comme liée aux membranes dans les organelles (selon le programme BLAST du site ncbi). Une autre protéine (At5g65620) est identifiée comme étant une métalloprotéase liant le zinc.

Dans cette liste de probables partenaires de SS4, une protéine a particulièrement retenu notre attention. Il s'agit de VAR1 (At5g42270). C'est une protéine membranaire possédant une activité de métalloprotéase. Elle appartient à la famille des FtsH. Les membres de cette famille sont impliqués dans divers processus cellulaires (Wagner *et al.*, 2012). Dans le plaste, elles sont ancrées dans la membrane des thylacoïdes, associées en multimères et impliquées dans régulation des processus photosynthétiques par leur activité de dégradation de la protéine D1 du photosystème II lorsque celle-ci est endommagée (Kato *et al.*, 2009).

Le fait que la protéine VAR1 soit une protéase ancrée dans la membrane des thylacoïdes est particulièrement intéressant. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, SS4 qui est également localisée au niveau des thylacoïdes (Gamez-Arjona *et al.*, 2014) pourrait nécessiter un clivage *in planta* pour fonctionner (hypothèse suggérée par les résultats obtenus lors de la production de SS4 recombinante chez *E. coli*). VAR1 pourrait alors être la protéase responsable de ce clivage.

Les FtsH sont connues pour cliver les protéines cibles dans des zones préférentiellement hydrophobes (Shotland *et al.*, 2000). Or la protéine SS4 possède une telle séquence dans la région supposée de protéolyse (acides aminés 531 à 571 situés au centre de la protéine).

Le clivage de SS4 lors de l'expression dans *E. coli*, l'identification par double hybride d'une métalloprotéase plastidiale, VAR1, comme interagissant potentiel nous permettent d'envisager qu'un clivage de SS4 est possible et, peut être, nécessaire dans la plante.

J'ai ainsi identifié et récupéré plusieurs lignées mutantes comportant une insertion de l'ADN-T au niveau de la séquence génomique codant VAR1. L'analyse d'un mutant (SALK\_024637.30.35.) révèle un phénotype d'accumulation en amidon en fin de journée qui est s'approche de celui du mutant *ss4-*. Il se traduit par un nombre réduit de grains par plaste avec taille supérieure au sauvage (Figure 20).

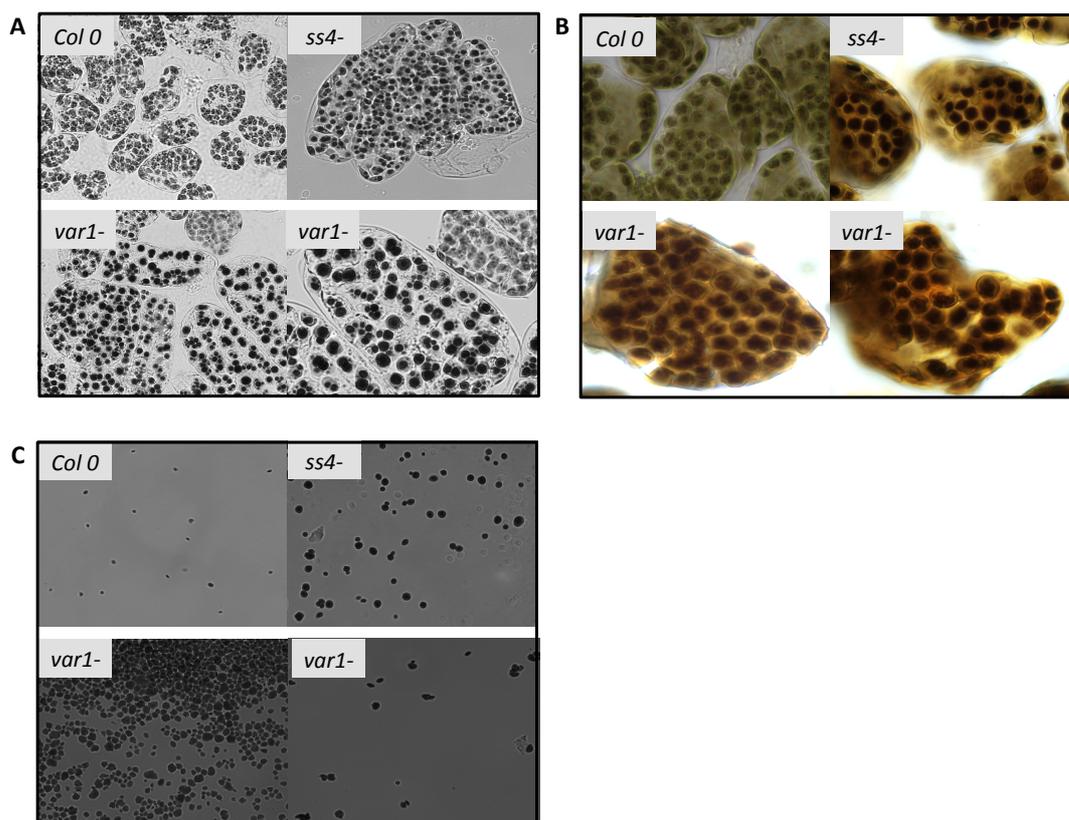


Figure 20 : Observation par microscopie photonique de l'amidon des mutants *var1-* d'*A. thaliana* en fin de jour dans des plantules. Ces derniers sont fixés dans une solution de paraformaldehyde 3 % sous vide d'air puis laissés une nuit dans un tampon d'EDTA. Ils sont ensuite colorés par le lugol et écrasés entre lame et lamelle pour l'observation des grains d'amidon dans les cellules. En (A) les observations au microscope optique objectif 63x (réalisées à l'UGSF). (B) Observation au microscope optique d'autres plantes à l'objectif 100x (Université de Genève). (C) Observation d'un extrait d'amidon purifié et coloré au lugol à l'objectif 100x.

### III. Etude du couplage des mutations *ss4-* et *ftsZ-* chez *Arabidopsis thaliana*

L'analyse *in silico* de la séquence protéique de SS4 nous a permis d'identifier dans la partie Nter de la protéine, un domaine similaire à une protéine bactérienne (EzrA) impliquée dans la régulation de la division de la cellule procaryote par interaction avec les protéines FtsZ. Cette découverte nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une interaction directe entre SS4 et les protéines FtsZ chloroplastiques. Cependant, cette interaction n'a pas pu être identifiée lors du criblage double hybride, ni par BifC, ni par co-localisation dans les protoplastes d'*Arabidopsis*. Notre hypothèse est maintenant que l'interaction n'est pas directe mais que la SS4 garde un rôle prépondérant dans le dialogue entre l'initiation de la synthèse d'amidon et la division plastidiale. La réalisation de croisements entre les mutants *ss4-* et *ftsZ-* nous permet de déterminer le nombre et la morphologie des grains dans les chloroplastes d'*Arabidopsis* et d'identifier si l'altération du processus de division plastidiale entraîne une modification du nombre d'événements d'initiation.

La visualisation de la morphologie et du nombre de grains d'amidon accumulé par chloroplastes en fin de journée se fait par l'observation de coupes ultrafines de sections de feuille au microscope électronique à transmission (Figure 21).

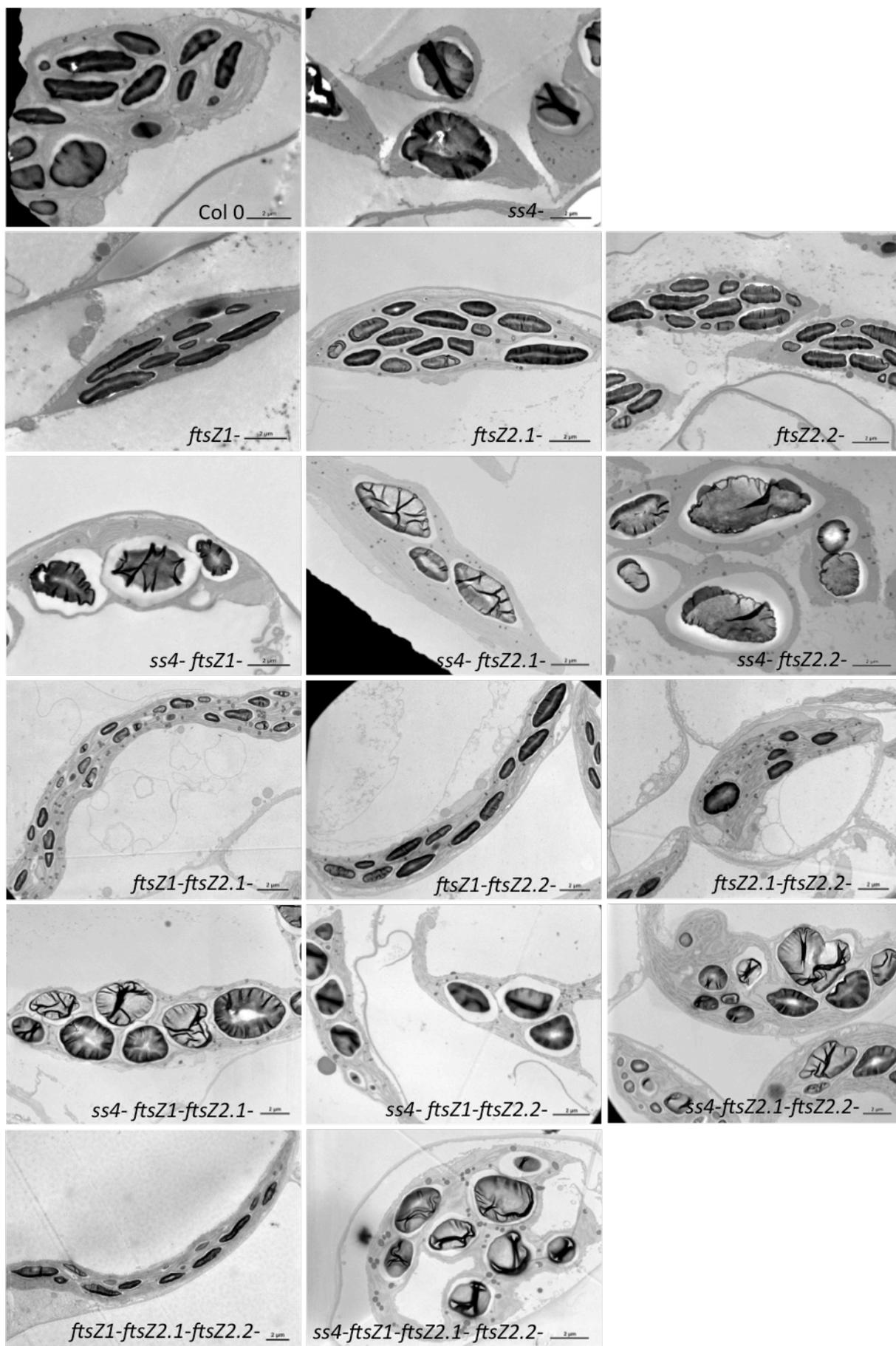


Figure 21 : Photographies de cellules de feuille d'*A. thaliana* obtenues par microscopie électronique à transmission (MET) des coupes de feuilles de différents génotypes simples, doubles, triples voire quadruples mutants *ss4-* et *ftsZ-* chez *Arabidopsis*. Les coupes ultrafines sont réalisées sur des sections de feuille prélevées en fin de journée et immédiatement fixées dans un tampon cacodylate (0,1 M pH 7,2), glutaraldéhyde (2 %), paraformaldéhyde (2 %) avant d'être préparées puis observées par microscopie électronique à transmission (MET). Dans cette figure les photographies des coupes de feuille issues de plantes sauvages (Col0) des lignées simples mutants (*ss4-* ; *ftsZ1-* ; *ftsZ2.1-* et *ftsZ2.2-*) , des doubles mutants (*ftsZ1-ftsZ2.1-* ; *ftsZ1-ftsZ2.2-* ; *ftsZ2.1-ftsZ2.2-* ; *ss4-ftsZ1-* ; *ss4-ftsZ2.1-* ; *ss4-ftsZ2.2-*), des triples mutants (*ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2-* ; *ss4-ftsZ1-ftsZ2.1-* ; *ss4-ftsZ1-ftsZ2.2-* ; *ss4-ftsZ2.1-ftsZ2.2-*) ainsi que du quadruple mutant (*ss4-ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2-*) sont présentées. La barre d'échelle est de 2  $\mu$ m.

En accord avec ce qui est décrit dans la littérature, nous avons observé que la plante sauvage accumule en moyenne 5 à 7 grains d'amidon par chloroplaste alors que le mutant *ss4-* n'en possède plus qu'un seul. Ce grain unique est plus gros et de forme plus ronde que ceux présents dans une lignée sauvage (Figure 21 ; Roldan *et al.*, 2007 ; Szydlowski *et al.*, 2009). De même, comme cela était attendu, les mutants *ftsZ1-*, *ftsZ2.1-* et *ftsZ2.2-* présentent des chloroplastes bien plus volumineux que ceux des cellules de la plante sauvage. Ce phénotype est exacerbé dans les lignées combinant plusieurs mutations *ftsZ*, que ce soit parmi les doubles mutants (*ftsZ1-ftsZ2.1-*, *ftsZ1-ftsZ2.2-* et *ftsZ2.1-ftsZ2.2-*) ou dans la lignée *ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2-*.

De manière surprenante, tous les mutants *ftsZ-* présentent un nombre important de grains d'amidon par plastes. On en compte parfois plus d'une trentaine par chloroplastes (Figure 21) contre 7 chez l'individu sauvage. L'augmentation du volume plastidial dû au défaut de division chez les mutants *ftsZ* entraîne une augmentation du nombre de grains par plastes indicatif d'un nombre accru d'événements d'initiation de la synthèse des grains.

L'ajout de la mutation *ss4-* aux mutations *ftsZ-* réduit considérablement le nombre de grains par chloroplaste. Cette observation va dans le sens de la réduction du nombre d'événements d'initiation lors de la synthèse des grains d'amidon chez les simples mutants *ss4-* d'*A. thaliana* (Roldan *et al.*, 2007 ; Szydlowski *et al.*, 2009). Les grains produits dans ce contexte gardent les caractéristiques liées à la mutation *ss4-* et sont donc plus gros et plus ronds que dans une lignée sauvage.

La détermination du nombre de grains par plaste semble donc dépendante de la présence de SS4 (son absence réduisant le nombre de grains produits) ainsi que de la taille des plastes (plus les plastes sont volumineux, plus ils contiennent de grains d'amidon).

Des résultats similaires rapportent une augmentation du nombre d'événements d'initiation en fonction de l'augmentation du volume du plaste. Ces résultats ont été obtenus en combinant la mutation *ss4-* avec les mutations *arc3-* ou *arc6-* affectant la division du plaste (Crumpton-taylor *et al.*, 2013).

Afin d'obtenir des données statistiques concernant le nombre de grains et la surface du plaste qu'ils occupent dans les différentes lignées étudiées, nous avons entrepris une analyse des photographies obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) sur des coupes ultrafines de ces mêmes génotypes. Ces images nous permettent d'avoir une profondeur de champ plus importante qu'avec la MET. A partir de ces images, nous avons déterminé le nombre de grains présent par chloroplaste puis nous avons mesuré la surface moyenne observée des grains d'amidon et des chloroplastes. Ces mesures ont été réalisées à l'aide du logiciel *Image J* comme décrit figure 22. Comme il s'agit de coupes de feuilles, nous ne pouvons pas estimer les volumes des plastes ni des grains d'amidon, mais uniquement les surfaces de ces structures à l'endroit de la coupe. Pour un même chloroplaste, en fonction du lieu de la coupe, les surfaces observées seront donc différentes. De la même manière il est impossible de déterminer le nombre de chloroplastes par cellule puisque nous n'avons pas une vision globale de la cellule lors de cette analyse. Cette méthode introduit un biais de la mesure qui est compensé par le nombre de plastes analysés.

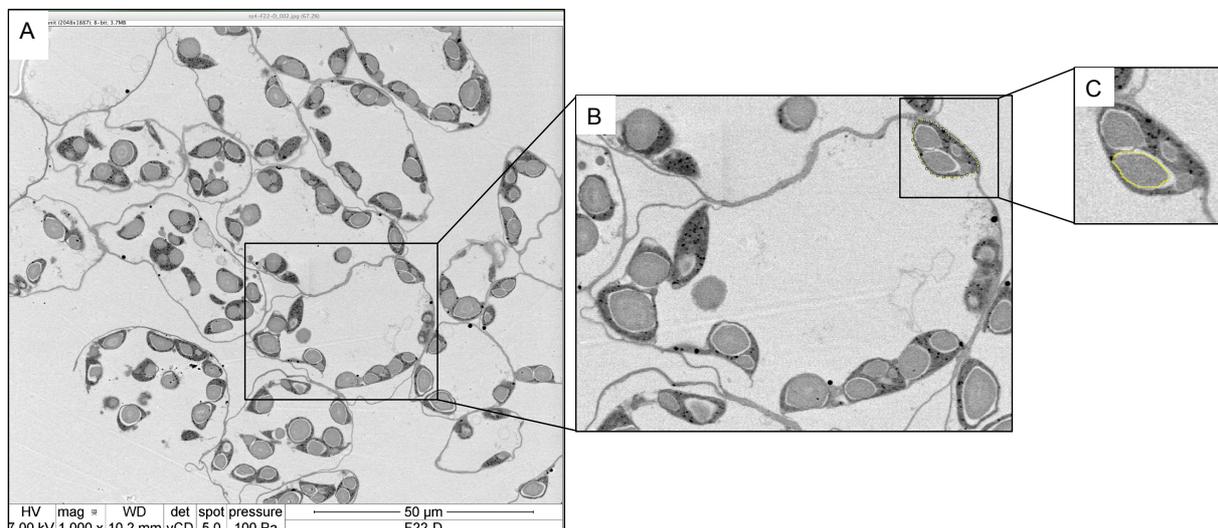


Figure 22 : Exemple de photographies obtenues par observation MEB de coupes ultrafines de feuilles d'*A. thaliana*, et détail de la mesure des surfaces observées via le logiciel *Image J*. En A, une cellule est choisie pour commencer le comptage. En B, le nombre et la surface visible des chloroplastes dans cette cellule sont déterminés ainsi que le nombre de grains observés par chloroplaste. En C, la surface observée des grains est déterminée.

La surface moyenne observée des plastes mesurée chez tous les mutants analysés est supérieure à celle des plastes de la plante sauvage (Figure 23). Les plastes du mutant *ss4-* présentent une moyenne légèrement supérieure à celle déterminée pour la plante sauvage. Dans le cas des doubles mutants *ss4-ftsZ1-* et *ss4-ftsZ2.1-*, la mutation *ss4-* entraîne une faible augmentation de la taille des plastes observés par rapport aux simples mutants *ftsZ1-* et *ftsZ2.1-*. Cet effet cumulatif des mutations sur la taille des plastes n'est pas observé chez le double mutant *ss4-ftsZ2.2-* pour qui les plastes gardent une taille équivalente à celle du simple mutant *ftsZ2.2-*. Chez les triples et le quadruple mutant la taille des plastes est nettement supérieure à celle mesurée chez la plante sauvage. Ces résultats seront à comparer avec les prochaines images de microscopie électronique réalisées à partir des coupes de feuilles des mutants *ftsZ1-ftsZ2.1-*, *ftsZ1-ftsZ2.2-*, *ftsZ2.1-ftsZ2.2-* et *ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2-*.

La mutation *ss4-* semble avoir une faible influence sur la taille des chloroplastes dans les feuilles d'*A. thaliana* prélevées en fin de journée.

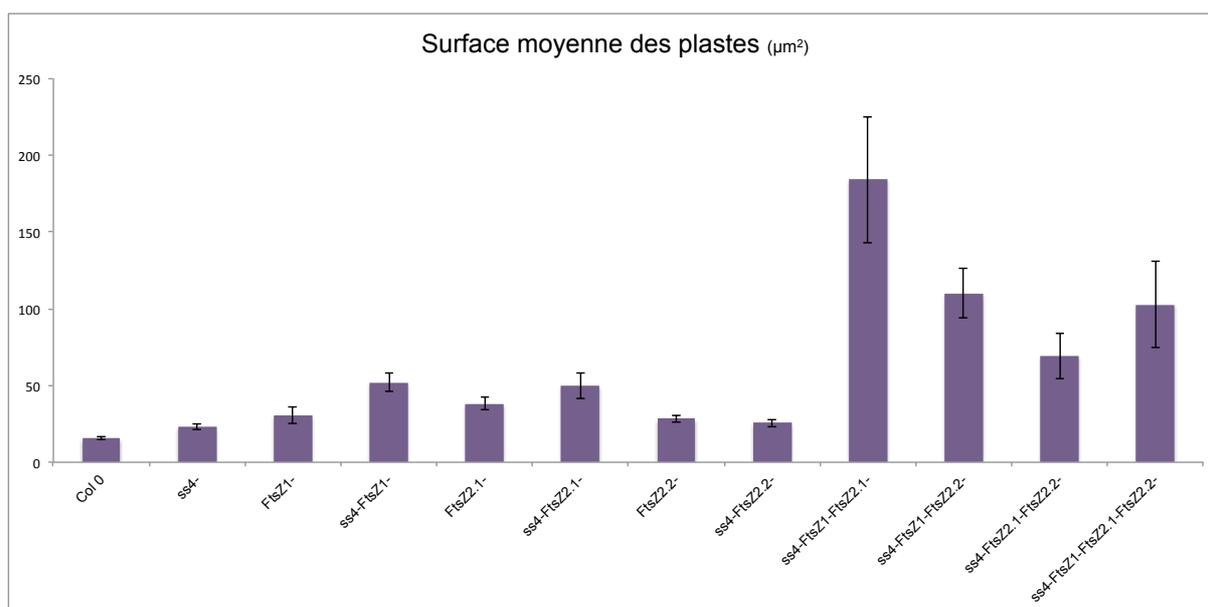


Figure 23 : Mesure de la surface apparente des chloroplastes à partir des photographies obtenues par observation au MEB et analysées à l'aide du logiciel *Image J* (au moins une dizaine de plastes analysés). La surface est exprimée en  $\mu\text{m}^2$ .

Nous avons ensuite déterminé la surface apparente moyenne d'un grain d'amidon pour chacun des génotypes (Figure 24). Il en ressort que les mutations *ftsZ*<sup>-</sup> ne modifient pas la surface moyenne observée des grains d'amidon dont la valeur oscille autour de 2  $\mu\text{m}^2$ . En revanche, la présence de la mutation *ss4*<sup>-</sup>, soit seule soit associée aux mutations *ftsZ*<sup>-</sup>, provoque systématiquement la synthèse de grain d'amidon plus gros dont la surface moyenne observée sur les coupes est estimée à approximativement 6  $\mu\text{m}^2$ .

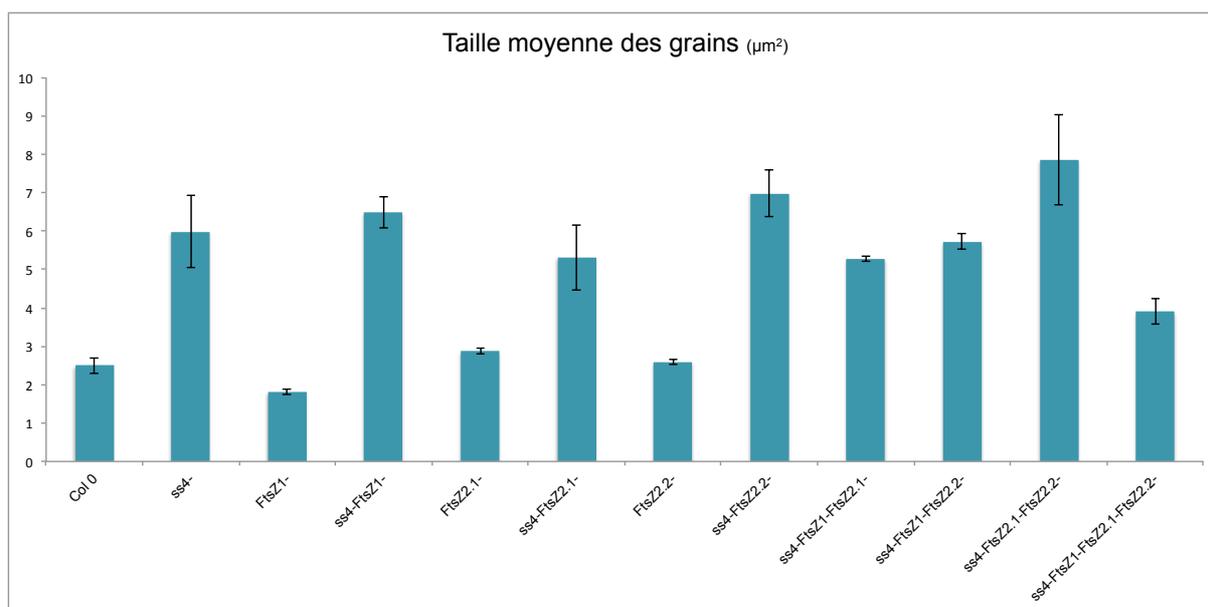


Figure 24 : Détermination de la taille apparente moyenne (en  $\mu\text{m}^2$ ) observée pour les grains d'amidon de chaque génotype disponible à partir des photographies obtenues par observation en MEB et analysées avec le logiciel *Image J*.

Nous avons ensuite compté le nombre moyen de grains d'amidon visibles par chloroplaste (Figure 25). Nous observons de nombreuses variations de ce nombre, afin de déterminer si ces variations sont directement corrélées à la surface des plastes observés, nous avons estimé le ratio correspondant au nombre moyen de grains en fonction de la surface de plaste pour chacun des génotypes disponibles (Figure 26). Pour un plaste donné, le nombre de grains apparent est déterminé puis divisé par la surface observée du plaste.

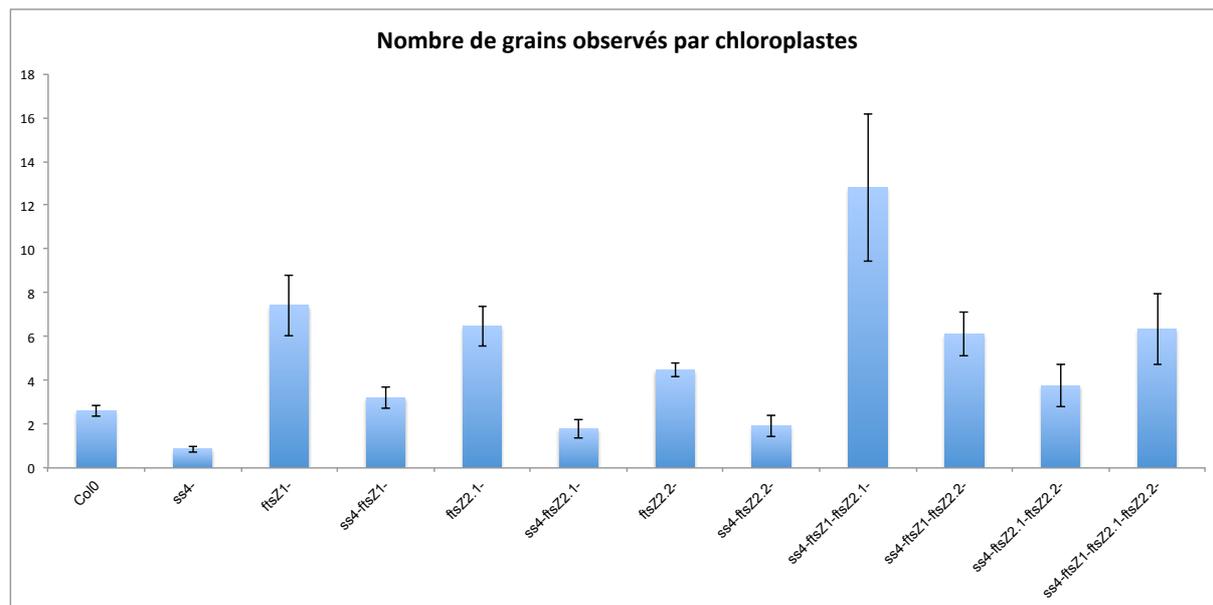


Figure 25 : Détermination du nombre moyen de grains d'amidon par chloroplastes obtenues grâce aux photographies de microscopie électronique et au logiciel *Image J*.

La présence de la mutation *ss4-* entraîne une réduction du ratio calculé (Figure 26) par rapport aux génotypes sauvages ou aux simples mutants *ftsZ-*. Il est intéressant de noter que ce ratio (approximativement 0,08) reste constant en fonction des génotypes dès lors que la mutation *ss4-* est présente.

Il semble donc que l'absence de SS4 ne conduise pas systématiquement à la production d'un seul grain par chloroplaste mais que le nombre de grains produit est fonction du volume du plaste ce qui permet de conserver ce ratio de 0,08.

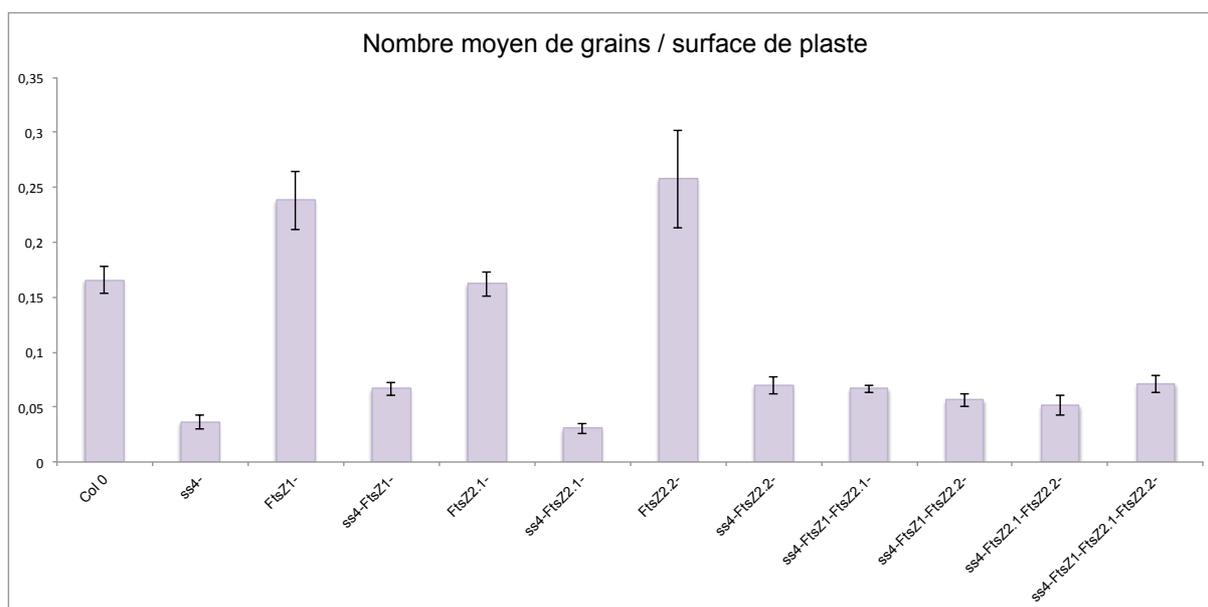


Figure 26 : Ratio du nombre de grains d'amidon comptés par chloroplaste sur la surface apparente du chloroplaste. (en  $\mu\text{m}^2$ ). Ce calcul est effectué pour au moins dix plastes par génotype et la moyenne des résultats est représentée dans cet histogramme.

Si l'on rapporte cette fois-ci la surface totale occupée par les grains à la surface des plastes (Figure 27), on observe peu de différence entre le génotype sauvage et le simple mutant *ss4-*. Autrement dit, les 5 à 7 grains d'amidon présents dans les chloroplastes d'une plante sauvage occupent la même surface apparente que l'unique grain présent dans les chloroplastes des mutants *ss4-*.

De manière générale la présence des mutations *ftsZ-* entraîne une réduction de cette valeur. L'augmentation du volume du plaste induit par la présence de mutations *ftsZ-* ne s'accompagne donc pas systématiquement d'une augmentation de la quantité de polysaccharide produit. Une explication de ces résultats pourrait être qu'à surface égale, l'efficacité photosynthétique d'un grand plaste est inférieure à celle de deux plastes plus petits. Nous pouvons néanmoins souligner l'exception du double mutant *ss4- ftsZ2.2-*. En effet, pour ce génotype en particulier la valeur du ratio obtenu est supérieure à ce qui est observé pour la plante sauvage. Nous avons remarqué que les grains d'amidon chez ce génotype avaient une taille apparente de  $7 \mu\text{m}^2$  en moyenne, soit légèrement supérieure aux moyennes mesurées pour les génotypes *ss4- ftsZ1-* et *ss4- ftsZ2.1-* (figure 24). De plus, le volume des plastes du double mutant *ss4- ftsZ2.2-* est équivalent à celui du simple mutant *ftsZ2.2-*. Le cumul de ces deux légères variations de paramètres conduit à une augmentation importante du ratio surface des grains / surface de plastes. Il serait utile d'analyser d'autres photographies afin de juger de la fiabilité de ces écarts.

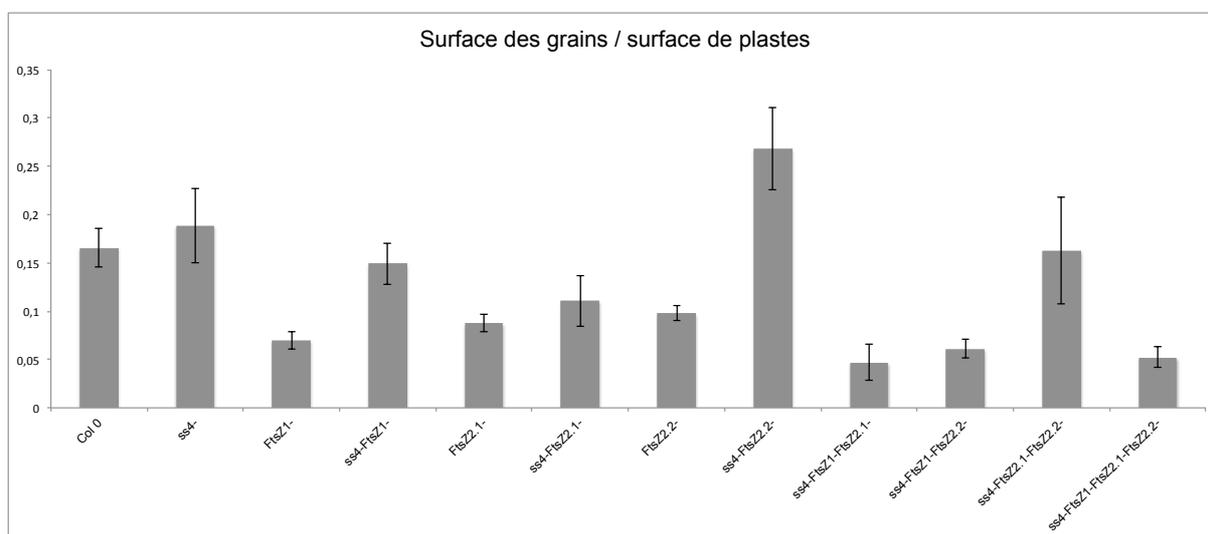


Figure 27 : Sur le même principe que précédemment, la surface apparente totale occupée par les grains d'amidon d'un plaste est déterminée puis divisée par la surface apparente de ce plaste. Une moyenne a donc pu être effectuée sur l'ensemble des plastes d'un génotype considéré.

En résumé, on remarque que plus les plastes sont grands, plus il y a de grains d'amidon. Cependant, le volume des grains ne semble pas dépendre du volume du plaste. Nos analyses indiquent également que l'initiation de plus d'un grain d'amidon par plaste peut éventuellement avoir lieu dans une souche dépourvue de SS4 si le volume des plastes est suffisant. Dans ce cas, les grains produits sont plus gros et plus ronds que dans une souche sauvage.

Ces observations nous permettent d'affirmer que le nombre d'événements d'initiation de la synthèse des grains d'amidon dans les plastes est régulé par la SS4 et par le volume des plastes. La mutation *ss4-* induit également une modification de la morphologie des grains produits (Figure 28).

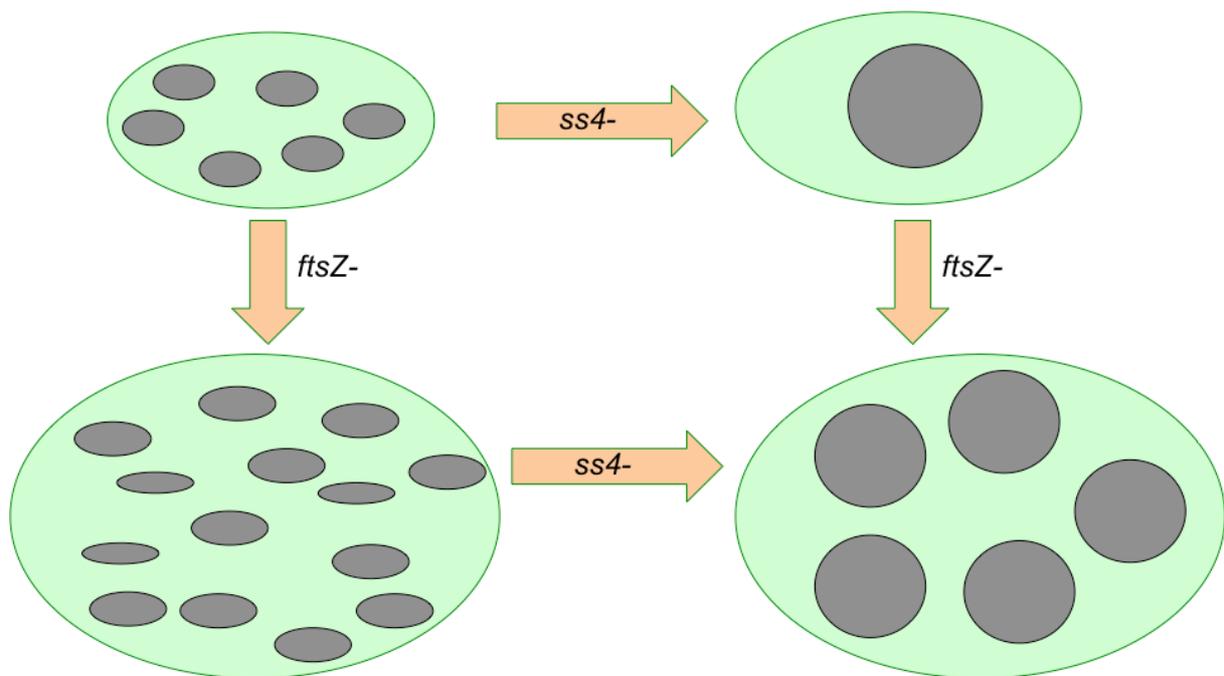


Figure 28: Modèle du couplage des phénotypes des mutants *ss4-* d'*Arabidopsis thaliana* et des mutants affectés dans la division plastidiale (*ftsZ-*). Les mutations *ftsZ-* entraînent une accumulation de nombreux grains d'amidon dans les plastes très volumineux et l'ajout de la mutation *ss4-* conduit inévitablement à la baisse du nombre de grains d'amidon dans les chloroplastes.

## *Discussion et Perspectives*

Mon travail de thèse consistait à étudier l'implication de deux enzymes, d'activité différentes lors de l'initiation et de la synthèse de l'amidon : l'amidon-synthase 4 (SS4) et l'isoamylase 1 (ISA1).

### **A. Contribution à l'étude du fonctionnement des isoamylases lors de la synthèse d'amidon**

Les isoamylases sont particulièrement importantes lors de la synthèse d'amidon et sont responsables de son organisation semi-cristalline et de son insolubilité dans l'eau. Des différences importantes dans le fonctionnement de ces enzymes ont pu être mises en évidence. Alors que ISA1 d'*Arabidopsis* n'est catalytiquement active que sous forme d'un complexe avec ISA2, l'enzyme de maïs présente la particularité de pouvoir fonctionner sous forme d'homo-oligomères dans l'albumen. Lors de mon travail de thèse, nous avons cherché à comprendre les bases des différences de fonctionnement des enzymes d'*Arabidopsis* et de maïs. En particulier, nous avons voulu déterminer si la capacité d'ISA1 de maïs à fonctionner sous la forme d'un homo-oligomère était due à l'environnement particulier présent dans l'albumen de la céréale. En effet, les différences physiologiques entre les tissus considérés (albumen de maïs et feuilles d'*Arabidopsis*) pourraient expliquer les différences de fonctionnement entre les enzymes étudiées (Lin *et al.*, 2013).

Les données obtenues avec des lignées de maïs dépourvues d'ISA1 ou d'ISA2 révèlent que l'homo-oligomère, uniquement formé de protéine ISA1, est présent et actif dans les feuilles de maïs. L'analyse de lignées dépourvues d'ISA2 indique que l'activité due à la seule présence d'ISA1 suffit à prévenir la formation de phytoglycogène dans les feuilles comme dans l'albumen. Cependant, ce complexe uniquement constitué de sous-unités ISA1 est capable de compenser en partie seulement l'absence d'ISA2. En effet, contrairement à ce qui est observé dans l'albumen, la perte d'ISA2 a des conséquences marquées dans les feuilles de maïs. Ces lignées *isa2-* accumulent moins d'amidon en fin de jour, la structure du polysaccharide produit est modifiée et les grains sont plus petits que chez la plante non mutée. Le rôle joué par l'hétéro-complexe formé des protéines ISA1 et ISA2 semble donc plus important dans la feuille de maïs que dans l'organe de réserve. Cette particularité a été retrouvée chez le riz et pourrait être liée à une différence de stabilité des complexes vis-à-vis de la température (Utsumi *et al.*, 2011).

Après avoir démontré que l'homo-oligomère composé uniquement d'ISA1 était actif dans différents environnements physiologiques du maïs (une monocotylédone), nous avons voulu déterminer si ce complexe pouvait se former dans un environnement génétique différent (chez une dicotylédone). L'objectif était de déterminer si la capacité d'ISA1 de maïs

à être active sous forme d'homo-oligomères est due à une divergence évolutive entre les plantes mono- et dicotylédones. Pour cela, nous avons transformé des plants d'*Arabidopsis* dépourvus des isoamylases ISA1 et ISA2 avec une séquence permettant l'expression d'ISA de maïs (Facon *et al.*, 2013).

Nos résultats indiquent, entre autres, que l'enzyme de maïs peut à elle seule former des complexes homo-multimériques fonctionnels dans la feuille d'*Arabidopsis*, conduisant ainsi à la restauration de la synthèse d'amidon. Cette activité semble néanmoins relativement instable puisqu'elle n'a pas pu être visualisée par zymogramme. Les grains produits dans ces lignées présentent néanmoins une taille intermédiaire entre celle de l'amidon sauvage et du mutant *isa1- isa2-*. Ce phénotype rappelle fortement ce qui est observé dans les feuilles de plants de maïs *isa2-* où seul l'homomère composé d'ISA1 est actif.

ISA1 de maïs fonctionne donc de manière identique dans les feuilles de maïs ou d'*Arabidopsis*.

Dans une étude parue récemment, ISA1 de riz (*Oryza sativa*, monocotylédone) a été exprimée dans le mutant *isa1- isa2-* d'*A. thaliana* (Streb & Zeeman, 2014). Les résultats sont très similaires aux nôtres et ont abouti à la restauration de la synthèse d'amidon dans le mutant d'*Arabidopsis*. Ces travaux permettent de conclure que les différences de comportement des ISA1 du maïs et d'*Arabidopsis* ne sont pas dépendantes du contexte biologique des monocotylédones.

L'ensemble des résultats obtenus indique qu'une acquisition évolutive, remontant à la séparation entre di- et monocotylédones, se trouve à l'origine de la capacité d'ISA1 de monocotylédone à fonctionner sans ISA2. Cette idée est confortée par l'analyse de séquences d'ISA1 de différents organismes. L'alignement de ces séquences a permis d'identifier une zone riche en résidus de sérine spécifique des monocotylédones. La modélisation de la structure de ces protéines indique que la présence de ces acides aminés entraîne la formation d'une boucle externe à la protéine pouvant être impliquée dans l'interaction entre monomères d'ISA1. Il existe également une zone riche en acides aminés acides à l'extrémité Nter des protéines conservée uniquement chez les monocotylédones. Il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle de cette séquence particulière et son implication dans l'homomérisation des ISA1. L'expression de protéines chimériques combinant la séquence d'acides aminés acides ou riche en résidus de sérine du maïs à ISA1 d'*Arabidopsis* ou, à l'inverse, les constructions de ZmISA1 dépourvue de ces domaines conservés pourra être utilisée pour étudier la reconstitution de complexes *in vitro*. L'étude des activités enzymatiques reconstituées, sur zymogramme, permettra d'évaluer

l'importance de ces séquences dans la capacité d'homomérisation des ISA1 quelles que soient leurs origines.

## B. Etude de l'implication de SS4 dans l'initiation de la division des plastes

Bien que les mécanismes de synthèse de l'amidon soient relativement bien décrits, l'initiation de la synthèse du polysaccharide reste non-résolue à ce jour.

J'ai entrepris l'étude de l'amidon-synthase 4 (SS4) dont l'implication dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon a déjà été montrée (Roldan *et al.*, 2007 ; Szydłowski *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que chez le double mutant *ss3- ss4-* il n'y a plus de grains d'amidon dans les plastes ce qui n'est pas le cas des autres combinaisons de mutations pour SS4 et les amidon-synthases autre que SS3. Cette dernière semble donc capable de maintenir la synthèse *a minima* d'un grain par plaste en absence de SS4 (Szydłowski *et al.*, 2009).

L'analyse *in silico* de la séquence protéique de SS4 permet de distinguer deux parties, le coté carboxy-terminal (Cter), centre catalytique particulièrement bien conservée chez les amidon-synthases, et une extension coté amino-terminal (Nter) qui lui est unique. Cette séquence, d'environ 500 acides aminés, représente la moitié de la protéine et sa fonction reste à déterminer. Deux éléments structuraux présents dans la partie Nter de SS4 ont retenu notre attention :

- On retrouve deux domaines « faisceaux d'hélices » entre les acides aminés 190 et 465. Ces domaines sont connus pour intervenir dans des interactions protéine/protéine, protéine/acides nucléiques mais aussi protéine/lipides (Mason & Arndt, 2004)
- Dans cette zone contenant les faisceaux d'hélices, une région présente des homologies de séquence avec la protéine bactérienne EzrA (un régulateur de la division bactérienne)

Ces observations nous ont conduits à émettre l'hypothèse que SS4 pourrait s'associer à une protéine impliquée dans la division des plastes telle que l'une des trois isoformes de FtsZ d'*A. thaliana*. Cette interaction interviendrait dans la mise en place d'un dialogue moléculaire de manière à contrôler l'initiation de la synthèse d'amidon en fonction des divisions plastidiales et des besoins de la plante. Ceci serait particulièrement régulé dans la feuille, dans la mesure où l'amidon est soumis à des cycles récurrents de synthèse

et de dégradation liés à l'alternance du jour et de la nuit. La plante doit alors s'accommoder de ces cycles afin de réguler la fourniture en carbone et en énergie quel qu'en soit le moment. Cela suppose l'existence d'un mécanisme très précis et finement régulé qui permet à la plante de s'adapter rapidement aux conditions environnantes. Contrôler l'initiation de la synthèse des grains d'amidon conduit donc à en contrôler le nombre et la taille dans les plastides et de fait la disponibilité en carbone.

Lors de l'expression de différentes constructions de SS4 recombinante chez *E. coli* nous avons pu observer une modification de la morphologie des bactéries due à l'expression de la partie Nter de SS4. La présence de bactéries filamenteuses dans ce cas, suggère que la partie Nter de SS4 pourrait perturber le mécanisme de division d'*E. coli* probablement par interaction avec les facteurs de division bactériens qui sont homologues à ceux du plaste. SS4 pourrait donc représenter, au travers de son activité d'initiation, un facteur essentiel dans le dialogue moléculaire impliquant la synthèse de l'amidon et la physiologie du plaste.

Les parties Nter et Cter telles que nous les avons définies ne possèdent pas d'activité visible sur zymogramme, alors que la SS4 complète recombinante présente deux bandes d'activité de mobilités électrophorétiques différentes. Cette différence de mobilité pourrait s'expliquer par un nombre variable de monomères impliqués dans un complexe homomultérique, une modification post-traductionnelle de type phosphorylation, induisant une différence d'affinité au substrat ou encore par une association sous forme d'hétéro-complexes avec des protéines bactériennes.

Afin d'étudier plus en détail l'activité de SS4 entière, nous avons purifié la protéine par affinité à l'aide d'une étiquette Histidine et d'inhibiteur de protéases. Deux fragments d'environ la même masse (55 kDa) correspondant à SS4 ont été identifiés par spectrométrie de masse. Ils correspondent aux régions Cter et Nter de l'enzyme. Ce clivage de la protéine chez *E. coli* pourrait refléter un contrôle nécessaire pour le fonctionnement de l'enzyme existant *in planta*. Afin de tester cette hypothèse, nous avons procédé à la transformation de plants d'*A. thaliana* déficients en SS4 avec les différentes constructions disponibles (SS4 complète et mature, SS4 mutée (E929Q), les domaines Nter et Cter). Nous n'avons cependant pas observé de complémentation phénotypique de la mutation *ss4-* quelle que soit la construction utilisée.

Plusieurs explications peuvent expliquer ce défaut de complémentation :

- Il est possible que le promoteur choisi (35S CaMV) ne conduise pas à une expression correcte de SS4. Afin de tester cette hypothèse et essayer d'obtenir des niveaux d'expression proches de ceux d'une plante sauvage, nous créerons

de nouvelles constructions utilisant le promoteur endogène de SS4 pour l'expression des différentes constructions choisies.

- Le fait que la partie Cter recombinante ne possède pas d'activité visible sur zymogramme et n'entraîne pas de complémentation *in planta* est peut être dû au choix de la zone de coupure que nous avons déterminée à partir d'alignements de séquences et en fonction des tailles de fragments obtenus après protéolyse lors de l'expression de SS4 chez *E. coli*. En effet, nous avons choisi de couper la protéine en son milieu de manière à séparer la partie Cter homologue aux autres amidon-synthases de la partie spécifique de SS4 en Nter. Il est possible que la partie C-terminale seule soit peu stable et rapidement dégradée lors de son expression *in planta*.
- Une autre hypothèse de l'absence d'activité liée à l'expression de la partie C-terminale pourrait être liée au processus de protéolyse. En effet, la recherche de partenaires potentiels de SS4 menée lors de tests d'interaction en double hybride chez la levure nous indique que VAR1, une métalloprotéase de la famille FtsH, pourrait être l'enzyme responsable de la protéolyse de SS4. Or cette famille d'enzymes possède également une fonction de type chaperonne. Il est donc possible que la protéolyse de SS4 par VAR1 soit nécessaire pour permettre à la partie C-terminale de SS4 d'acquies une conformation compatible avec son activité catalytique.

La partie Nter de SS4 (acides aminés 1 à 500) comporte le motif faisceaux d'hélices que nous soupçonnons d'intervenir dans les interactions SS4-partenaire(s) et/ou dans la localisation de SS4. L'expression transitoire de SS4 entière ou de fragments couplés à un marqueur fluorescent (YFP) nous a permis de mettre en évidence que le profil de localisation suborganellaire de SS4 rappelle celui des plastoglobules et que cet adressage était dépendant de la partie Nter de la protéine. Cette localisation a récemment été décrite par l'équipe du Pr. Angel Merida qui montre la localisation plastoglobulaire de SS4 et son interaction directe avec les fibrillines du groupe 1 spécifiques de ces compartiments lipidiques du plaste (Gamez-Arjona *et al.*, 2014). Ce partenaire d'interaction est surprenant et la signification biologique d'un tel rapprochement reste indéterminée pour l'instant. Il pourrait s'agir d'un moyen de piéger SS4 afin de limiter la synthèse d'amidon lorsque celle-ci n'est pas requise. Cette localisation plastoglobulaire de SS4 nous conforte dans l'hypothèse d'un rôle important de VAR1 dans le processus de régulation de SS4, puisque les plastoglobules sont des prolongements des membranes des thylacoïdes dans lesquelles se trouvent les protéines VAR1.

De plus, les études préliminaires menées avec un mutant d'*A. thaliana* pour le gène codant VAR1 révèlent l'accumulation en fin de journée de grains d'amidon plus gros et moins nombreux que chez la plante sauvage. Ce phénotype, proche de celui observé pour le mutant *ss4-*, laisse à penser que l'absence de VAR1 perturbe l'activité d'initiation de SS4.

Notre hypothèse actuelle est donc que SS4 pourrait être piégée au niveau des plastoglobules par sa partie Nter lorsque l'initiation de la synthèse d'amidon n'est pas requise. Cette rétention de SS4 se fait très probablement via ses domaines *coiled coil* qui interagissent soit directement avec les lipides des plastoglobules soit par l'intermédiaire d'une interaction avec les fibrillines. Lorsque l'initiation de nouveaux grains d'amidon est nécessaire, après division des chloroplastes par exemple, VAR1 cliverait SS4 et permettrait le repliement actif de la partie Cter catalytique de l'enzyme favorisant ainsi l'initiation de la synthèse de l'amidon au moment voulu (Figure 28).

Le mode de fonctionnement de la partie Cter lors de l'initiation de la synthèse reste à déterminer. Contrairement à la partie Nter localisée au niveau plastoglobulaire, la localisation de la partie Cter fusionnée à une protéine fluorescente reste à déterminer. Cependant Gamez-Arjona et collaborateurs suggèrent que la partie Cter se retrouve sous la forme d'agrégats (Gamez-Arjona *et al.*, 2014), ce qui corrobore nos premières observations de la production de cette partie chez *E. coli*, celle-ci étant localisée dans la fraction insoluble après la lyse des bactéries. Différents modes de fonctionnement sont envisageables : La partie Cter de SS4 pourrait s'autoglycosyler comme le ferait une glycogène-synthase bactérienne afin d'initier la formation d'un court glucane d'amorçage qui est ensuite allongé par les enzymes d'élongation. Des expériences visant à montrer une autoglycosylation de SS4 ont déjà été effectuées et les résultats obtenus se sont révélés négatifs. Cependant ceux-ci concernaient la protéine entière (Szydłowski *et al.*, 2009). Il serait intéressant de poursuivre ces expérimentations sur la partie Cter de SS4 obtenue par un clivage naturel par FtsH bactérien ou par VAR1 d'*Arabidopsis*. Elle pourrait également s'associer à un partenaire, qu'il reste à déterminer, afin d'initier la synthèse d'amidon.

Nous nous sommes également intéressé à l'effet de la variation de volume des plastes sur l'initiation de la synthèse d'amidon. Si l'absence de SS4 conduit à une baisse drastique du nombre d'événements d'initiation, il est apparu au cours de nos études que le volume du plaste était également déterminant pour le nombre de grains présent dans l'organite.

En effet, l'augmentation du volume plastidial entraîne systématiquement une augmentation du nombre de grains accumulés par plaste et donc du nombre d'événements

d'initiation. Si on calcule le ratio entre le nombre de grains et la surface observée des plastes, on remarque qu'il reste constant chez tous les porteurs de la mutation *ss4-*. Ces observations nous conduisent à la conclusion suivante : la mutation *ss4-* réduit le nombre de grains accumulés par plaste mais ne le limite pas à un seul. Le nombre de grains dépend également du volume de plaste. Il pourrait alors y avoir une molécule « senseur », autre que SS4, influant sur le nombre d'événements d'initiation.

En conclusion, ces observations nous permettent d'affirmer que le nombre d'événements d'initiation de la synthèse des grains d'amidon dans les plastes est régulé par la SS4 et par le volume des plastes.

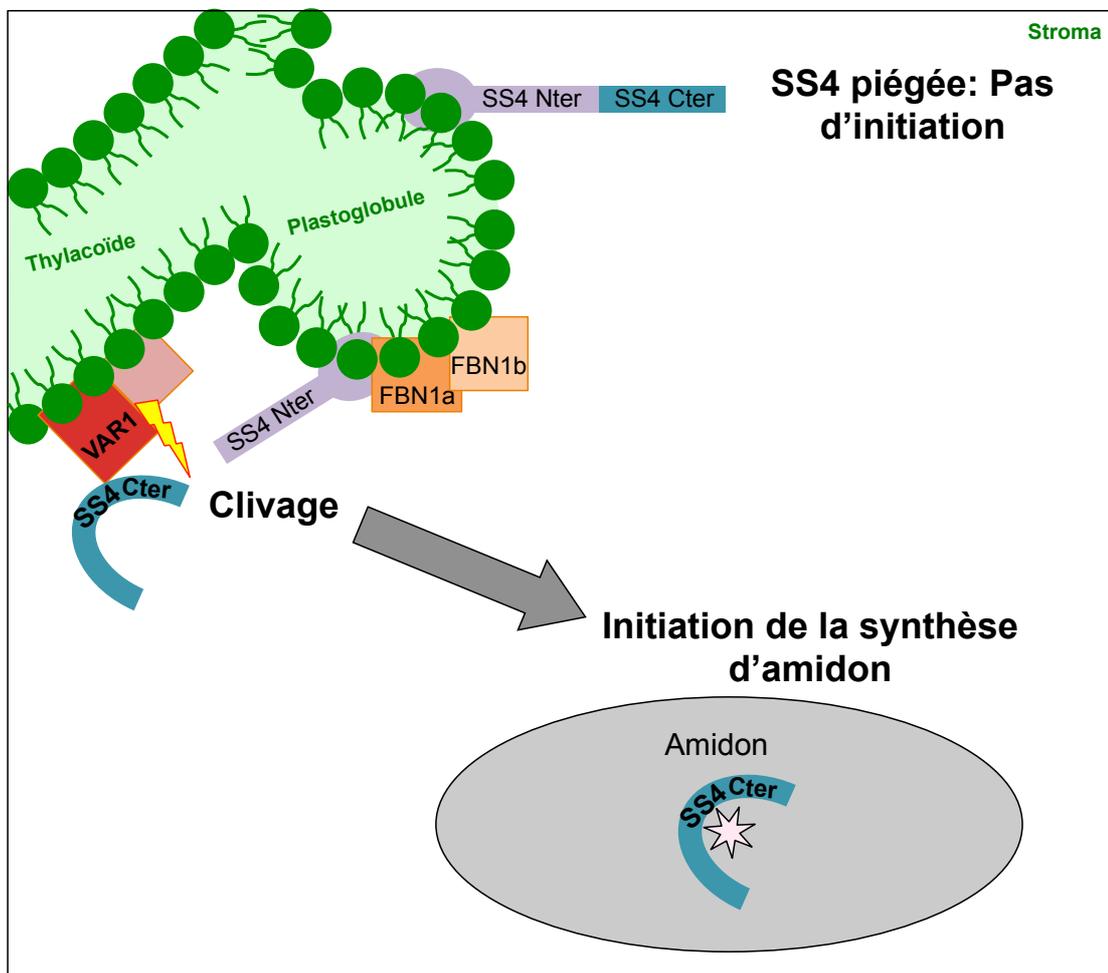


Figure 28 : Représentation schématique du modèle proposé pour le fonctionnement de SS4 dans le stroma des chloroplastes. SS4 se localise au niveau des plastoglobules, liée par sa partie Nter (Gamez-Arjona *et al.*, 2014) et en interaction avec les Fibrillines 1a et 1b (FBN1a, FBN1b). Lorsque SS4 est piégée au niveau des plastoglobules, il n'y a pas d'initiation de la synthèse d'amidon. Lorsque SS4 est clivée et mise en conformation par VAR1 (VAR1, liée à des partenaires protéiques, se situe dans la membrane des thylacoïdes), l'initiation est possible. Ce modèle suggère donc l'existence d'un signal déclencheur du clivage fonctionnel de SS4.

A court terme, les projets poursuivis consistent à étudier en détail le phénotype d'accumulation en amidon de différentes plantes mutées dans le gène codant VAR1. Ces plantes, disponibles dans le même fond génétique que le mutant *ss4-*, pourront être croisées avec ce dernier afin d'étudier les répercussions de la combinaison de mutations sur le phénotype de la plante. La production de SS4 dans une souche d'*E. coli fstH-* est également en cours. FtsH (HflB) étant l'homologue bactérien de VAR1, nous la soupçonnons de cliver SS4 recombinante lors de sa production. Il serait intéressant d'identifier si l'absence de cette protéine permet d'empêcher le clivage de SS4 chez *E. coli*. L'étude des mutants *fstH-* récemment décrit chez *C. reinhardtii* est également prévue (Malnoë *et al.*, 2014). L'impact sur le métabolisme de l'amidon dans ce mutant *fstH-* de *Chlamydomonas* sera analysé.

# *Bibliographie*

## A

- Abdallah F, Salamini F, Leister D (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **5**: 141-2
- Abel GJ, Springer F, Willmitzer L, Kossmann J (1996) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* **10**: 981-991
- Addinall SG, Holland B (2002) The tubulin ancestor FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* **318**: 219-36
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseeuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Archibald JM (2009) The Puzzle of Plastid Evolution. *Current Biology* **19**: R81-R88
- Asano T, Yoshioka Y, Kurei S, Sakamoto W and Machida Y (2004) A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in Arabidopsis. *Plant J.* **38**: 448-459
- Asatsuma S, Sawada C, Itoh K, Okito M, Kitajima A, Mitsui T (2005) Involvement of  $\alpha$ -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts. *The Plant Cell Physiol* **46**: 858-869
- Azimzadeh J, Nacry P, Christodoulidou A, Drevensek S, Camilleri C, Amieur N, Parcy F, Pastuglia M, Bouchez D (2008) Arabidopsis Tonnau1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* **20**: 2146-59

## B

- Baba T, Nishihara M, Mizuno K, Kawasaki T, Shimada H, Kobayashi E, Ohnishi S, Tanaka K and Arai Y (1993) Identification, cDNA cloning, and gene expression of soluble starch synthase in rice (*Oryza sativa* L.) immature seeds. *Plant Physiol.* **103**: 565-573
- Baba T, Yoshii M, Kainuma K (1987) Acceptor Molecule of Granular-bound Starch Synthase from Sweet-potato Roots. *Starch - Stärke* **39**: 52-56
- Baker AA, Miles MJ, Helbert W (2001) Internal structure of the starch granule revealed by AFM. *Carbohydrate research.* **330**: 249-256
- Ball S, Colleoni C, Cenci U, Nirmal-Raj J, Tirtiaux (2011) The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *Journal of experimental Botany* **62**: 1775-1801

- Ball S, Guan HP, James M, Myers A, Keeling P, Mouille G, Buléon A, Colonna P, Preiss J (1996) From Glycogen to Amylopectin: A Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Cell* **86**: 349-352
- Ball S, Marianne T, Dirick L, Fresnoy M, Delrue B, Decq A (1991) A *Chlamydomonas reinhardtii* low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* **185**: 17-26
- Ball S, Morell MK (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 207-33
- Ball S, Subtil A, Bhattacharya D, Moustafa A, Weber APM, Gehre L, Colleoni C, Arias MC, Cenci U, Dauvillé D (2013) Metabolic Effectors secreted by bacterial pathogens: essential facilitators of plastid endosymbiosis? *The Plant Cell* **25**: 7-21
- Ballicora MA, Frueauf JB, Fu Y, Schurmann P, Preiss J (2000) Activation of the Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase by Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **275**: 1315-1320
- Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, Glaring MA, Pharm TT, Blennow A (2005) A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in arabidopsis. *Plant Journal* **41**: 595-605
- Beckles DM, Smith AM, ap Rees T (2001) A Cytosolic ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is a Feature of Gramineous Endosperms, But Not of Other Starch-Storing Organs. *Plant Physiology* **125**: 818-827
- Bertoff E (2004) On the nature of categories of chains in amylopectin and their connection to the super helix model. *Carbohydrate Polymers* **57**: 211-224
- Bhattacharya D, Yoon HS and Hackett JD (2004) Photosynthetic eukaryotes unite: endosymbiosis connects the dots. *Bioessays* **26**: 50-60
- Bi E, Lutkenhaus J (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164
- Blauth SL, Kim K-N, Klucinec J, Shannon JC, Thompson D, Guiltinan M (2002) Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. *Plant Molecular Biology* **48**: 287-297
- Blennow A, Sjöland A.K, Andersson R, Kristiansson P (2005) The distribution of elements in the native starch granule as studied by particle-induced X-ray emission and complementary methods. *Anal. Biochem.* **347**: 327-9
- Blennow A, Vikso-Nielsen A, Morell MK (1998) Alpha-glucan binding of potato-tuber starch-branching enzyme I as determined by tryptophan fluorescence quenching, affinity electrophoresis and steady-state kinetics. *Eur. J. Biochem* **252**: 331-8
- Block MA, Douce R, Joyard J, Rolland N (2007) Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynth. Res.* **92**: 225-44
- Bogorad L (2008) Evolution of early eukaryotic cells: genomes, proteomes, and compartments. *Photosynth. Res.* **95**: 11-21.
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem J.* **382**: 769-781

- Borem A, Mather DE, Rasmusson DC, Fulcher RG, Hayes PM (1999) Mapping Quantitative Trait Loci for Starch Granule Traits in Barley. *Journal of Cereal Science* **29**: 153-160
- Borovsky D, Smith E, Whelan J (2008) On the mechanism of amylose branching by potato Q-enzyme. *European journal of biochemistry* **62**: 307-312
- Boyer CD, Preiss J (1979) Properties of Citrate-stimulated Starch Synthesis Catalyzed by Starch Synthase I of Developing Maize Kernels. *Plant Physiology* **64**: 1039-1042
- Boyer CD, Preiss J (1981) Evidence for Independent Genetic Control of the Multiple Forms of Maize Endosperm Branching Enzymes and Starch Synthases. *Plant Physiology* **67**: 1141-1145
- Bradford, MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bramhill D, Thompson CM (1994) GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 5813-5817
- Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **23**: 85-112
- Buléon A, Gallant D.J, Bouchet B, Mouille G, D'Hulst C, Kossmann J, Ball S (1997) Starches from A to C. *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol* **115**: 949-57
- Buléon A, Gerard C, Riekkel C, Vuong R, Chanzy H (1998) Details of the Crystalline Ultrastructure of C-Starch Granules Revealed by Synchrotron Microfocus Mapping. *Macromolecules* **31**: 6605-6610
- Burrell MM (2003) Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *J Exp Bot* **54**: 451-456
- Burton RA, Bewley JD, Smith AM, Bhattacharyya MK, Tatge H, Ring S, Bull V, Hamilton WDO, Martin C (1995) Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *The Plant Journal* **7**: 3-15
- Burton RA, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher GB, Hylton C, Laurie DA, Parker M, Waite D, van Wegen S, Verhoeven T, Denyer K (2002a) Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *The Plant Journal* **31**: 97-112
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Nebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2215-2220
- Butardo VM, Fitzgerald MA, Bird AR, Gidley MJ, Flanagan BM, Larroque O, Resurreccion AP, Laidlaw HKC, Jobling SA, Morell MK, Rahman S (2011) Impact of down-regulation of starch branching enzyme IIb in rice by artificial microRNA- and hairpin RNA-mediated RNA silencing. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4927-4941



- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**: 233-238
- Cao Y, Skurat AV, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1993) Initiation of glycogen synthesis. Control of glycogenin by glycogen phosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 21717-21721
- Cao YJ, Steinrauf LK, Roach PJ (1995) Mechanism of Glycogenin Self-Glucosylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **319**: 293-298
- Cao H, Imparl-Radosevich J, Guan H, Keeling PL, James MG, Myers AM (1999) Identification of the Soluble Starch Synthase Activities of Maize Endosperm. *Plant Physiology* **120**: 205-216
- Caspar T, Huber SC, Somerville C (1985) Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucomutase Activity. *Plant Physiology* **79**: 11-17
- Cavalier-Smith T (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science* **5**: 174-182
- Carciofi M, Blennow A, Jensen S.L, Shaik S.S, Henriksen A, Buléon A, Holm PB, Hebelstrup KH (2012) Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. *BCM Plant biology* **12**: 223-239
- Chaly N, Possingham JV (1981) Structure of constricted proplastids in meristematic plant-tissues. *Biol Cell* **41**: 203-210
- Chatterjee M, Berbezy P, Vyas D, Coates S, Barsby T (2005) Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in Arabidopsis leaves. *Plant Science* **168**: 501-509
- Chen Z, Schols HA, Voragen AGJ (2003) Starch Granule Size Strongly Determines Starch Noodle Processing and Noodle Quality. *Journal of Food Science* **68**: 1584-1589
- Cheng C, Mu J, Farkas I, Huang D, Goebel MG and Roach PJ (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Bio.* **15**: 6632-6640
- Cho M-H, Lim H, Shin DH, Jeon J-S, Bhoo SH, Park Y-I, Hahn T-R (2011) Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **190**: 101-112
- Čížová A, Sroková I, Sasinková V, Malovíková A, Ebringerová A (2008) Carboxymethyl Starch Octenylsuccinate: Microwave- and Ultrasound-assisted Synthesis and Properties. *Starch - Stärke* **60**: 389-397
- Colletti KS, Tattersall EA, Pyke KA, Froelich JE, Stokes KD, Osteryoung KW (2000) A homologue of the bacterial cell division site-determining factor MinD mediates placement of the chloroplast division apparatus. *Current Biology* **10**: 507-516

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

Comparot-Moss S, Denyer K (2009) The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *Journal of Experimental Botany* **60**: 2481-2492

Comparot-Moss S, Kotting O, Stettler M, Edner C, Graf A, Weise SE, Streb S, Lue W-L, MacLean D, Mahlow S, Ritte G, Steup M, Chen J, Zeeman SC, Smith AM (2010) A Putative Phosphatase, LSF1, Is Required for Normal Starch Turnover in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiol* **152**: 685-697

Copeland L, Preiss J. (1981) Purification of Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* **68**: 996-1001

Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B (2003) An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology* **328**: 307-317

Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM (1998) Mutations in the Gene Encoding Starch Synthase II Profoundly Alter Amylopectin Structure in Pea Embryos. *The Plant Cell* **10**: 413-426

Creech RG (1965) Genetic control of carbohydrate synthesis in maize endosperm. *Genetics* **52**: 1175-1186

Critchley JH, Zeeman SC, Takaha T, Smith AM, Smith SM (2001) A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in Arabidopsis. *The Plant Journal* **26**: 89-100

Crumpton-Taylor M, Grandison S, Png KMY, Bushby AJ, Smith AM (2012) Control of Starch Granule Numbers in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Physiology* **158**: 905-916

Crumpton-Taylor M, Pike M, Lu KJ, Hylton CM, Feil R, Eicke S, Lunn JE, Zeeman SC, Smith A.M (2013) Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during Arabidopsis leaf expansion. *New Phytol.* **200**: 1064-75



Dauvillée D, Chochois V, Steup M, Haebel S, Eckermann N, Ritte G, Ral JP, Colleoni C, Hicks G, Wattedled F, Deschamps P, d'Hulst C, Liénard L, Cournac L, Putaux JL, Dupeyre D, Ball SG (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* **48**: 274-285

Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, Morell MK, d'Hulst C, Wattedled F, Lienard L, Delvalle D, Ral J-P, Myers AM, Ball SG (2001) Biochemical Characterization of Wild-Type and Mutant Isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* Supports a Function of the Multimeric Enzyme Organization in Amylopectin Maturation. *Plant Physiol* **125**: 1723-1731

De Bary A (1878) *De la symbiose*, *Revue internationale des sciences* **3**: 301-309

De Boer, Crossley R, Rothfiels L (1992) The essential bacterial cell division protein FtsZ is a GTPase. *Nature* **359**: 254-256

- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC (2005) Arabidopsis mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *The Plant Journal* **41**: 815-830
- Delatte T, Umhang M, Trevisan M, Eicke S, Thorneycroft D, Smith SM, Zeeman SC (2006) Evidence for Distinct Mechanisms of Starch Granule Breakdown in Plants. *J Biol Chem* **281**: 12050-12059
- Delrue B, Fontaine T, Routier F, Decq A, Wieruszeski JM, Van Den Koornhuysse N, Maddelein ML, Fournet B, Ball S (1992) Waxy Chlamydomonas reinhardtii: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**: 3612-3620
- Delvallé D, Dumez S, Wattebled F, Roldán I, Planchot V, Berbezy P, Colonna P, Vyas D, Chatterjee M, Ball S, Mérida Á, D'Hulst C (2005) Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *The Plant Journal* **43**: 398-412
- Delwiche CF (1999) Tracing the tread of plastid diversity through the tapestry of life. *The American Naturalist* **154**: 164-177
- Denyer K, Clarke B, Hylton C, Tatge H, Smith AM (1996) The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *The Plant Journal* **10**: 1135-1143
- Denyer K, Hylton CM, Jenner CF, Smith AM (1995) Identification of multiple isoforms of soluble and granule-bound starch synthase in developing wheat endosperm. *Planta* **196**: 256-265
- Denyer K, Smith AM (1992) The purification and characterisation of the two forms of soluble starch synthase from developing pea embryos. *Planta* **186**: 609-617
- Denyer K, Waite D, Motawia S, Moller BL, Smith AM (1999) Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem J* **340**: 183-191
- De Pater S, Caspers M, Kottenhagen M, Meima H, ter Stege R, Vetten N (2006) Manipulation of starch granule size distribution in potato tubers by modulation of plastid division. *Plant Biotechnology Journal* **4**: 123-134
- Derelle E, Ferraz C, Rombauts S, Rouzé P, Worden AZ, Robbens S, Partensky F, Degroeve S, Echeynié S, Cooke R, Saeys Y, Wuyts J, Jabbari K, Bowler C, Panaud O, Piégu B, Ball SG, Ral JP, Bouget FY, Piganeau G, De Baets B, Picard A, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y, Moreau H (2006) Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 11647-52
- Deschamps P, Moreau H, Worden AZ, Dauvillee D, Ball SG (2008) Early Gene Duplication Within Chloroplastida and Its Correspondence With Relocation of Starch Metabolism to Chloroplasts. *Genetics* **178**: 2373-2387
- Devin A (2010) Etablissement de l'implication des  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylases et des  $\alpha$ -glucanes phosphorylases au cours de la dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. *Manuscrit de thèse - Université Lille1*

- D'Hulst C, Mérida Á (2010) The priming of storage glucan synthesis from bacteria to plants: current knowledge and new developments. *New Phytologist* **188**: 13-21
- Dian W, Jiang H, Wu P (2005) Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice *J. Exp. Bot.* **412**: 623-632
- Dinges JR, Colleoni C, James MG, Myers AM (2003) Mutational Analysis of the Pullulanase-Type Debranching Enzyme of Maize Indicates Multiple Functions in Starch Metabolism. *The Plant Cell* **15**: 666-680
- Dinges JR, Colleoni C, Myers AM, James MG (2001) Molecular Structure of Three Mutations at the Maize sugary1 Locus and Their Allele-Specific Phenotypic Effects. *Plant Physiology* **125**: 1406-1418
- Dinkins R, Reddy MS, Leng M, Collins GB (2001) Overexpression of the Arabidopsis thaliana MinD1 gene alters chloroplast size and number in transgenic tobacco plants *Planta*. **214**: 180-8
- Douglas SE, Turner S (1991) Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J Mol Evol.* **33**: 267-73
- Dry I, Smith A, Edwards A, Bhattacharyya M, Dunn P, Martin C (1992) Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase which show differential expression in developing storage organs of pea and potato. *The Plant Journal* **2**: 193-202
- Dumez S, Wattedled F, Dauvillee D, Delvalle D, Planchot V, Ball SG, D'Hulst C (2006) Mutants of Arabidopsis Lacking Starch Branching Enzyme II Substitute Plastidial Starch Synthesis by Cytoplasmic Maltose Accumulation. *The Plant Cell* **18**: 2694-2709
- Dyall SD, Brown MT and Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**: 253-257



- Earley, Keith, Jeremy R. Haag, Olga Pontes, Kristen Opper, Tom Juehne, Keming Song, and Craig S. Pikaard (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant J.* **45**: 616-629.
- Edner C, Li J, Albrecht T, Mahlow S, Hejazi M, Hussain H, Kaplan F, Guy C, Smith SM, Steup M, Ritte G (2007) Glucan, Water Dikinase Activity Stimulates Breakdown of Starch Granules by Plastidial beta-Amylases. *Plant Physiology* **145**: 17-28
- 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 Journal* **8**: 283-294
- El-Kafafi E-S, Mukherjee S, El-Shami M, Putaux JL, Block MA, Pignot-Paintrand I, Lerbs-Mache S, Falconet D (2005) The plastid division proteins, FtsZ1 and FtsZ2, differ in their biochemical properties and sub-plastidial localization. *Biochem J* **387**: 669-676.
- Erickson HP (1995) FtsZ, a prokaryotic homolog of tubulin? *Cell* **80**: 367-370



Facon M, Lin Q, Azzaz AM, Hennen-Bierwagen TA, Myers AM, Putaux JL, Roussel X, D'Hulst C, Wattedled F (2013) Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves. *Plant Physiology* **163**: 1363-1375

Fettke J, Chia T, Eckermann N, Smith A, Steup M (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *The Plant Journal* **46**: 668-684

Fincher GB (1989) Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 305-346

Flipse E, Suurs L, Keetels CJAM, Kossmann J, Jacobsen E, Visser RGF (1996) Introduction of sense and antisense cDNA for branching enzyme in the amylose-free potato mutant leads to physico-chemical changes in the starch. *Planta* **198**: 340-347

Fontaine T, D'Hulst C, Maddelein M, Routier F, Pepin T, Decq A, Wieruszeski J, Delrue B, Van den Koornhuyse N, Bossu J (1993) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 16223-16230

Fu Y, Ballicora MA, Leykam JF, Preiss J (1998) Mechanism of Reductive Activation of Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 25045-25052

Fu X, Shih YL, Zhang Y, Rothfield LI (2001) The MinE ring required for proper placement of the division structure that changes its cellular location during the *Escherichia coli* division cycle *Proc Natl Acad USA*. **98**: 980-5

Fujita N, Kubo A, Francisco PB, Nakakita K, Harada K, Minaka N, Nakamura Y (1999) Purification, characterization, and cDNA structure of isoamylase from developing endosperm of rice. *Planta* **208**: 283-93

Fujita N, Satoh R, Hayashi A, Kodama M, Itoh R, Aihara S, Nakamura Y (2011) Starch biosynthesis in rice endosperm requires the presence of either starch synthase I or IIIa. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4819-4831

Fujita N, Kubo A, Suh DS, Wong KS, Jane JL, Ozawa K, Takaiwa F, Inaba Y, Nakamura Y (2003) Antisense Inhibition of Isoamylase Alters the Structure of Amylopectin and the Physicochemical Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant and Cell Physiology* **44**: 607-618

Fujita N, Toyosawa Y, Utsumi Y, Higuchi T, Hanashiro I, Ikegami A, Akuzawa S, Yoshida M, Mori A, Inomata K, Itoh R, Miyao A, Hirochika H, Satoh H, Nakamura Y (2009) Characterization of pullulanase (PUL)-deficient mutants of rice (*Oryza sativa* L.) and the function of PUL on starch biosynthesis in the developing rice endosperm. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1009-1023

Fulgosi H, Gerdes L, Westphal S, Glockmann C, Soll J (2002) Cell and chloroplast division requires ARTEMIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 11501-6

Fulton DC, Stettler M, Mettler T, Vaughan CK, Li J, Francisco P, Gil D, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith AM, Smith SM, Zeeman SC (2008) beta-AMYLASE4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active beta-amylases in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant Cell* **20**: 1040-1058

Furukawa K, Tagaya M, Inouye M, Preiss J, Fukui T (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. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 2086-2090

Furukawa K, Tagaya M, Tanizawa K, Fukui T (1993) Role of the conserved Lys-X-Gly-Gly sequence at the ADP-glucose-binding site in Escherichia coli glycogen synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 23837-23842



Gaikwad A, Babbarwal V, Mukherjee SK (2000) Pea Chloroplast FtsZ can form multimers and correct the thermosensitive defect of an Escherichia coli ftsZ mutant *Mol Den Genet.* **263**: 213-21

Gallant D.J., Bouchet B and Baldwin P.M. (1997) Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr. polymers* **32**: 177-91

Gallant D.J., Guilbot A. (1969). Etude de l'ultrastructure du grain d'amidon à l'aide de nouvelles méthodes de préparations en microscopie électronique. *Stärke* **6**: 156-163.

Gámez-Arjona FM, de la Concepcion JC, Raynaud S, Mérida A (2014) Arabidopsis thaliana plastoglobule-associated fibrillin 1a interacts with fibrillin 1b *in vivo*. *FEBS Letters* **588**: 2800-2804

Gámez-Arjona FM, Li J, Raynaud S, Baroja-Fernández E, Muñoz FJ, Ovecka M, Ragel P, Bahaji A, Pozueta-Romero J, Mérida Á (2011) Enhancing the expression of starch synthase class IV results in increased levels of both transitory and long-term storage starch. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 1049-1060

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

Gao M, Fisher DK, Kim KN, Shannon JC, Guiltinan MJ (1997) Independent Genetic Control of Maize Starch-Branching Enzymes IIa and IIb (Isolation and Characterization of a Sbe2a cDNA). *Plant Physiology* **114**: 69-78

Gao M, Wanat J, Stinard PS, James MG, Myers AM (1998) Characterization of dull1, a Maize Gene Coding for a Novel Starch Synthase. *The Plant Cell* **10**: 399-412

Gao H, Kadirjan-Kalbach D, Froehlich JE, Osteryoung KW (2003) ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 4328-4333

Geigenberger P (2011) Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. *Plant Physiology* **155**: 1566-1577

Genschel U, Abel G, Lörz H, Lütticke S (2002) The sugary-type isoamylase in wheat: tissue distribution and subcellular localisation. *Planta* **214**: 813-20

Ghosh HP, Preiss J (1966) Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase - a regulatory enzyme in biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry* **241**: 4491-504

Ghosh B, Sain A (2008) Origin of contractile force during cell division of bacteria. *Phys. Rev. Lett.* **101**: 178101

Glynn JM, Miyagishima SY, Yoder DW, Osteryoung KW and Vitha S (2007) Chloroplast division. *Traffic* **8**: 451-461

Glynn JM, Froehlich JE, Osteryoung KW (2008) Arabidopsis ARC6 Coordinates the Division Machineries of the Inner and Outer Chloroplast Membranes through Interaction with PDV2 in the Intermembrane Space. *The Plant Cell* **20**: 2460-2470

Glynn JM, Yang Y, Vitha S, Schmitz AJ, Hemmes M, Miyagishima S-y, Osteryoung KW (2009) PARC6, a novel chloroplast division factor, influences FtsZ assembly and is required for recruitment of PDV1 during chloroplast division in Arabidopsis. *The Plant Journal* **59**: 700-711

Goehring, N. W. and Beckwith, J. (2005) Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr. Biol.* **15**: 514-526

Huang JL and Gogarten JP (2007) Did an ancient chlamydial endosymbiosis facilitate the establishment of primary plastids? *Genome Biol.* **8**: R99

Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid Evolution. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 491-517

Gris JBA (1857) Recherches microscopiques sur la chlorophylle. *Ann Sci Nat Bot Ser* **7**: 179-219

Guan HP, Baba T, Preiss J (1994) Expression of Branching Enzyme I of Maize Endosperm in *Escherichia coli*. *Plant Physiol* **104**: 1449-1453

Guan H, Li P, Imparl-Radosevich J, Preiss J, Keeling P (1997) Comparing the Properties of *Escherichia coli* Branching Enzyme and Maize Branching Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **342**: 92-98

Guan HP, Preiss J (1993) Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol* **102**: 1269-1273

Gueiros-Filho FJ, Losick R (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ *Genes Dev* **16**: 2544-56

Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB (2006) Toc, Tic, Tat *et al.*: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology* **163**: 333-347

*H*

Hale CA, Rhee AC and de Boer PA (2000) ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J. Bacteriol.* **182**: 5153-5166

- Han XZ, Hamaker B.R. 2002. Location of starch granule-associated proteins revealed by confocal laser scanning microscopy (Rapid Communication). *Journal of Cereal Science* **35**: 109-116
- Han Z, Zeng XA, Yu SJ, Zhang BS, Chen XD (2009) Effects of pulsed electric fields (PEF) treatment on physicochemical properties of potato starch. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **10**: 481-485
- Hanashino I, Abe J, Hizukuri S (1996) A periodic distribution of the chain-length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydrate research* **283**: 151-159
- Harn C, Knight M, Ramakrishnan A, Guan H, Keeling P, Wasserman, BP (1998) Isolation and characterization of the zSSIIa and zSSIIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm *Plant Molecular Biology* **37**: 639-649
- Hashimoto H (1986) Double ring structure around the constricting neck of dividing plastids of *Avena sativa*. *Protoplasma* **135**: 166-172
- Hashimoto H, Possingham JV (1989) Division and DNA distribution in ribosome-deficient plastids of the barley mutant "albostrians". *Protoplasma* **149**: 20-23
- Harrison H, Hedley L, Wang TL (1998) Evidence that the *rug3* locus of pea (*Pisum sativum* L.) encodes plastidial phosphoglucomutase confirms that the imported substrate for starch synthesis in pea amyloplasts is glucose-6-phosphate. *The Plant Journal* **13**: 753-762
- Heazlewood JL, Durek P, Hummel J, Selbig J, Weckwerth W, Walther D, Schulze WX (2008) PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in Arabidopsis thaliana and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Research* **36**: D1015-D1021
- Hedley CL, Bogracheva TY, Wang TL (2002) A Genetic Approach to Studying the Morphology, Structure and Function of Starch Granules using Pea as a Model. *Starch - Stärke* **54**: 235-242
- Hejazi M, Fettke J, Haebel S, Edner C, Paris O, Froberg C, Steup M, Ritte G (2008) Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *The Plant Journal* **55**: 323-334
- Hejazi M, Fettke J, Kotting O, Zeeman SC, Steup M (2010) The Laforin-Like Dual-Specificity Phosphatase SEX4 from Arabidopsis Hydrolyzes Both C6- and C3-Phosphate Esters Introduced by Starch-Related Dikinases and Thereby Affects Phase Transition of {alpha}-Glucans. *Plant Physiology* **152**: 711-722
- Hejazi M, Steup M, Fettke J (2012) The plastidial glucan, water dikinase (GWD) catalyses multiple phosphotransfer reactions. *FEBS Journal* **279**: 1953-1966
- Hennen-Bierwagen TA, James MG, Myers A. (2012) Involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis, *Starch: Origin, Structure and Metabolism, essential reviews, I. Tetlow, Ed. Society of Experimental Biology.*
- Hennen-Bierwagen TA, Lin Q, Grimaud F, Planchot V, Keeling PL, James MG, Myers AM (2009) Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic Enzymes in High Molecular Weight Complexes: A Model for Regulation of Carbon Allocation in Maize Amyloplasts. *Plant Physiology* **149**: 1541-1559

- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, Tetlow IJ, Emes MJ, James MG, Myers AM (2008) Starch Biosynthetic Enzymes from Developing Maize Endosperm Associate in Multisubunit Complexes. *Plant Physiology* **146**: 1892-1908
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem.* **280**: 309-16
- Henrissat B (1991) Sequence homology between a beta-galactosidase and some beta-glucosidases. *Protein Seq Data Anal.* **4**: 61-2
- Henrissat B, Coutinho PM, Davies GJ (2001) A census of carbohydrate-active enzymes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **47**: 55-72
- Herdman M, Janvier M, Rippka R, Stanier RY (1979) Genome Size of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* **111**: 73-85
- Hizukuri, S. (1985) Relationship Between the Distribution of the Chain Length of Amylopectin and the Crystallite Structure of Starch Granules. *Carbohydr. Res.* **141**: 295-306.
- Hizukuri S (1986) Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research* **147**: 342-347
- Hizukuri S, Takeda Y, Maruta N, Juliano BO (1989) Molecular structures of rice starch. *Carbohydrate Research* **189**: 227-235
- Hovenkamp-Hermelink JHM, Jacobsen E, Ponstein AS, Visser RGF, Vos-Scheperkeuter GH, Bijmolt EW, Vries JN, Witholt B, Feenstra WJ (1987) Isolation of an amylose-free starch mutant of the potato (*Solanum tuberosum* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **75**: 217-221
- Howe CJ, Barbrook AC, Nisbet RE, Lockhart PJ, Larkum AW (2008) The origin of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **363**: 2675-2685
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell.* **9**: 789-798
- Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman S, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R (2003) Three Isoforms of Isoamylase Contribute Different Catalytic Properties for the Debranching of Potato Glucans. *The Plant Cell* **15**: 133-149
- Hwang SK, Nishi A, Satoh H, Okita TW (2010) Rice endosperm-specific plastidial [alpha]-glucan phosphorylase is important for synthesis of short-chain malto-oligosaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **495**: 82-92

*J*

- Imberty A and Perez S (1988) A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch *Biopolymers* **27**: 1205-1221

Inouchi N, Glover DV, Fuwa H (1987) Chain Length Distribution of Amylopectins of Several Single Mutants and the Normal Counterpart, and Sugary-1 Phytoglycogen in Maize (*Zea mays* L.) *Starch - Stärke* **39**: 259-266

Itoh R, Fujiwara M, Nagata N, Yoshida S (2001) A Chloroplast Protein Homologous to the Eubacterial Topological Specificity Factor MinE Plays a Role in Chloroplast Division. *Plant Physiology* **127**: 1644-1655

## J

James MG, Robertson DS, Myers AM (1995) Characterization of the Maize Gene sugary1, a Determinant of Starch Composition in Kernels. *The Plant Cell* **7**: 417-429

Jane J-L, Kasemsuwan T, Leas S, Zobel H, Robyt JF (1994) Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch - Stärke* **46**: 121-129

Javis (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants *New phytol.* **179**: 257-85

Jenkins PJ, Donald AM (1995) The influence of amylose on starch granule structure. *International Journal of Biological Macromolecules* **17**: 315-321

## K

Kanamaru K, Fujiwara M, Kim M, Nagashima A, Nakazato E, Tanaka K, Takahashi h (2000) Chloroplast targeting, distribution and transcriptional fluctuation of AtMinD1, a Eubacteria-type factor critical for chloroplast division. *Plant Cell Physiol* **41**: 1119-28

Kardirjan-Kalbach DK, Yoder DW, Ruckle ME, Larkin RM, Osteryoung KW (2012) FtsHi1/ARC1 is an essential gene in Arabidopsis that links chloroplast biogenesis and division. *The Plant Journal* **72**: 856-867

Keeling PJ, Archibald JM, Palmer JD (2004) The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* **24**: 306

Kerppola TK (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nature Protocols* **1**: 1278-1286

Khoshnoodi J, Larsson CT, Larsson H, Rask L (1998) Differential accumulation of Arabidopsis thaliana Sbe2.1 and Sbe2.2 transcripts in response to light. *Plant Science* **135**: 183-193

Kleczkowski LA (1999) A phosphoglycerate to inorganic phosphate ratio is the major factor in controlling starch levels in chloroplasts via ADP-glucose pyrophosphorylase regulation. *FEBS Letters* **448**: 153-156

Koizumi K, Fukuda Y, Hizukuri S (1991) Estimation of the distributions of chain-length of amylopectins by high-performance liquid-chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of chromatography* **585**: 233-238

Koornneef M, Meinke D (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* **61**: 909-21

Kossmann J, Gernot JW, Springer F, James RL and Willmitzer L (1999) Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta* **208**: 503-511

Kötting O, Kossmann J, Zeeman SC, Lloyd JR (2010) Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 320-328

Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G (2005) Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase. *Plant Physiology* **137**: 242-252

Kubo A, Rahman S, Utsumi Y, Li Z, Mukai Y, Yamamoto M, Ugaki M, Harada K, Satoh H, Konik-Rose C, Morell M, Nakamura Y (2005) Complementation of sugary-1 Phenotype in Rice Endosperm with the Wheat Isoamylase1 Gene Supports a Direct Role for Isoamylase1 in Amylopectin Biosynthesis. *Plant Physiology* **137**: 43-56

Kötting O, Santelia D, Edner C, Eicke S, Marthaler T, Gentry MS, Comparot-Moss S, Chen J, Smith AM, Steup M, Ritte G, Zeeman SC (2009) STARCH-EXCESS4 Is a Laforin-Like Phosphoglucan Phosphatase Required for Starch Degradation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online* **21**: 334-346

Kubo A, Colleoni C, Dinges JR, Lin Q, Lappe RR, Rivenbark JG, Meyer AJ, Ball SG, James MG, Hennen-Bierwagen TA, Myers AM (2010) Functions of Heteromeric and Homomeric Isoamylase-Type Starch-Debranching Enzymes in Developing Maize Endosperm. *Plant Physiology* **153**: 956-969

## Q

La Cognata U, Willmitzer L, Müller-Röber B (1995) Molecular cloning and characterization of novel isoforms of potato ADP-glucose pyrophosphorylase. *Molecular and General Genetics* **246**: 538-548

Lan G, Daniels BR, Dobrowsky TM, Wirtz D, Sun SX (2009) Condensation of FtsZ filaments can drive bacterial cell division *Proc Natl Acad USA*. **106**: 121-6

Leech RM, Thomson WW, Platt-Aloia KA (1981) Observations on the mechanism of chloroplast division in higher plants. *New Phytologist* **87**: 1-9

Levin PA, Kurtser IG, Grossman AD (1999) Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9642-9647

Li J, Almagro G, Munoz FJ, Baroja-Fernandez E, Bahaji A, Montero M, Hidalgo M, Sanchez-Lopez AMA, Ezquer I, Sesma MaT, Pozueta-Romero J (2012) Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Response to Light is Not a Major Determinant of Fine Regulation of Transitory Starch Accumulation in Arabidopsis Leaves. *Plant and Cell Physiology* **53**: 433-444

Li L, Foster CM, Gan Q, Nettleton D, James MG, Myers AM, Wurtele ES (2009) Identification of the novel protein QQS as a component of the starch metabolic network in Arabidopsis leaves. *The Plant Journal* **58**: 485-498

- Li L, Jiang H, Campbell M, Blanco M, Jane JL (2008) Characterization of maize amylose-extender (ae) mutant starches. Part I: Relationship between resistant starch contents and molecular structures. *Carbohydrate Polymers* **74**: 396-404
- Li N, Zhang S, Zhao Y, Li B, Zhang J (2011) Over-expression of AGPase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize. *Planta* **233**: 241-250
- Li Z, Rahman S, Kosar-Hashemi B, Mouille G, Appels R, Morell MK (1999) Cloning and characterization of a gene encoding wheat starch synthase I. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **98**: 1208-1216
- Li Y, Shoemaker CF, Ma J, Luo C, Zhong F (2009) Effects of Alcalase/Protease N treatments on rice starch isolation and their effects on its properties. *Food Chemistry* **114**: 821-828
- Li Z, Li D, Du X, Wang H, Larroque O, Jenkins CLD, Jobling SA, Morell MK (2011) The barley amo1 locus is tightly linked to the starch synthase IIIa gene and negatively regulates expression of granule-bound starch synthetic genes. *Journal of Experimental Botany* **62**: 5217-5231
- Lim S, Jane JL, Rajagopalan S, Seib PA (1992) Effect of starch granule size on physical properties of starch-filled polyethylene film. *Biotechnology Progress* **8**: 51-57
- Lin Q, Facon M, Putaux JL, Dinges JR, Wattedled F, D'Hulst C, Hennen-Bierwagen T, Myers AM (2013) Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf. *New Phytologist* **200**: 1009-1021
- Lin TP, Caspar T, Somerville CR, Preiss J (1988) A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme. *Plant Physiology* **88**: 1175-1181
- Lindeboom N, Chang PR, Tyler RT (2004) Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. *Starch - Stärke* **56**: 89-99
- Liu F, Makhmoudova A, Lee EA, Wait R, Emes MJ, Tetlow IJ (2009) The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Journal of Experimental Botany* **60**: 4423-4440
- Liu R, Wang L, Chen C, Liu Y, Zhou P, Wang X, Turnbull J, Minassian B.A, Liu Y, Zheng P (2008) Laforin negatively regulates cell cycle progression through glycogen synthase kinase 3 beta-dependent mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **28**: 7236-44
- Lloyd JR, Landschutze V, Kossmann J (1999) Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochemical Journal* **338**: 515-521
- Lohse S, Hause B, Hause G, Fester T (2006) FtsZ characterization and immunolocalization in the two phases of plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1124-1134.
- Lomako J, Lomako W.M, Whelan J (2004) Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta General subjects* **1673**: 45-55

Lorberth R, Ritte G, Willmitzer L, Kossmann J (1998) Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nature Biotechnology* **16**: 473-477

Lowe J, Amos LA (1998) Crystal Structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-6

Lumière A (1919) Le mythe des symbiotes. *Masson & Cie, Paris*

Lundquist PK, Poliakov A, Bhuiyan NH, Zybaylov B, Sun Q, van Wijk KJ (2012) The functional network of the Arabidopsis plastoglobule proteome based on quantitative proteomics and genome-wide coexpression analysis. *Plant Physiology* **158**: 1172-1192

Lutkenhaus J (2002) Dynamic proteins in bacteria *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 548-52

Lutkenhaus J (1993) FtsZ ring in bacterial cytokinesis. *Molecular Microbiology* **9**: 403-409

Lutkenhaus J, Wolf-Watz H, Donachie WD (1980) Organization of genes in the ftsA-envA region of the escherichia coli genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ) *J Bacteriol* **142**: 615-20



Maache-Rezzoug Z, Maugard T, Zarguili I, Bezzine E, El Marzouki MN, Loisel C (2009) Effect of instantaneous controlled pressure drop (DIC) on physicochemical properties of wheat, waxy and standard maize starches. *Journal of Cereal Science* **49**: 346-353

MacAndrew RS, Froehlich JE, Vitha S, Stokes KD, Osteryoung KW (2001) Colocalization of plastid division proteins in the chloroplast stromal compartment establishes a new functional relationship between FtsZ1 and FtsZ2 in higher plants. *Plant Physiol.* **127**: 1656-66

McFadden GI and van Dooren GG (2004) Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr. Biol.* **14**: 514-6

MacGregor E.A, Janecek S, Svensson B (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1546**: 1-20

Maddelein M, Libessart N, Bellanger F, Delrue B, D'Hulst C, Van den Koornhuysse N, Fontaine T, Wieruszkeski J, Decq A, Ball S (1994) Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Determination of granule-bound and soluble starch synthase functions in amylopectin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **269**: 25150-25157

Malnoë A, Wang F, Girard-Bascou J, Wollman FA, de Vitry C (2014) Thylacoïd FtsH protease contributes to photosystem II and cytochrome b6f remodeling in *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *The Plant Cell* **26**: 373-390

Manners DJ, Rowe KL (1969) The Specificity of Barley Limit Dextrinase. *Proc. Biochem. soc.* **1**.

Maple J, Chua NH, Møller SG (2002) The topological specificity factor AtMinE1 is essential for correct plastid division site placement in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **31**: 269-277

- Maple J, Fujiwara MT, Kitahata N, Lawson T, Baker NR, Yoshida S, Moller SG (2004) GIANT CHLOROPLAST 1 Is Essential for Correct Plastid Division in Arabidopsis. *Current Biology* **14**: 776-781
- Maple J, Vojta L, Soll J and Moller SG (2007) ARC3 is a stromal Z-ring accessory protein essential for plastid division. *EMBO Rep* **8**: 293-299
- Maple J, Winge P, Tveitaskog A, Gargano D, Bones A, Møller S (2011) Genome-wide gene expression profiles in response to plastid division perturbations. *Planta* **234**: 1055-1063
- Margolin W (2001) Spatial regulation of cytokinesis in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **4**: 647-52
- Marrison JL, Rutherford SM, Robertson EJ, Lister C, Dean C and Leech RM (1999) The distinctive roles of five different ARC genes in the chloroplast division process in Arabidopsis. *Plant J.* **18**: 651-662
- Martin B, Nowack EC, Melkonian M (2005) A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis *Protist* **156**: 425-32
- Martin W, Kowallik K (1999) Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper , Uber Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *European Journal of Phycology* **34**: 287-295
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa and Penny D (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 12246-12251
- Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M, Kowallik KV (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts *Nature* **393**: 162-5
- Martinis Jacopo (2013) Functional characterization of three ABC1-like kinase found in the plastoglobule proteome. *Manuscrit de thèse - Université de Neuchâtel*
- Mason JM, Arndt KM (2004) Coiled coil domains: Stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem.* **5**: 170-6
- McFadden GI, van Dooren GG (2004) Evolution: Red Algal Genome Affirms a Common Origin of All Plastids. *Current Biology* **14**: R514-R516
- Mereschkowsky C (1905) Uber natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche. *Biol Centralbl* **25**: 593-604
- Meyer A (1883) Das chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. ed A. Felix Leipzig
- Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ, Geigenberger P (2009) NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9908-9913
- Mikkelsen R, Mutenda KE, Mant A, Schürmann 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. USA* **102**: 1785-90

- Mita T, Kanbe T, Tanaka K, Kuroiwa T (1986) A ring structure around the dividing plane of the *Cyanidium caldarium* chloroplast. *Protoplasma* **130**: 211-213
- Miyagishima Sy, Froehlich JE, Osteryoung KW (2006) PDV1 and PDV2 Mediate Recruitment of the Dynamin-Related Protein ARC5 to the Plastid Division Site. *The Plant Cell* **18**: 2517-2530
- Miyagishima S-y, Kabeya Y (2010) Chloroplast division: squeezing the photosynthetic captive. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 738-746
- Miyagishima S-y, Nishida K, Mori T, Matsuzaki M, Higashiyama T, Kuroiwa H, Kuroiwa T (2003) A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* **15**: 655-65
- Miyagishima S-y, Takahara M, Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, Kuroiwa T (2001) Plastid Division Is Driven by a Complex Mechanism That Involves Differential Transition of the Bacterial and Eukaryotic Division Rings. *The Plant Cell Online* **13**: 2257-2268
- Moreira D, Le Guyader H and Philippe H (2000) The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* **405**: 69-72
- Morell MK, Blennow A, Kosar-Hashemi B, Samuel MS (1997) Differential Expression and Properties of Starch Branching Enzyme Isoforms in Developing Wheat Endosperm. *Plant Physiology* **113**: 201-208
- Morell MK, Samuel MS, O'Shea MG (1998) Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis* **19**: 2603-11
- Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, Samuel MS, Chandler P, Rahman S, Buleon A, Batey IL, Li Z (2003) Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *The Plant Journal* **34**: 173-185
- Morris DL, Morris CT (1939) Glycogen in the seed of zea mays (variety golden bantam). *The Journal of Biological Chemistry* **130**: 535-544
- Morrison W.R, Milligen T.P, Azudin M.N (1984) A relationship between the amylose and lipid contents of starches from diploid cereals *Journal of cereal Science* **4**: 257-271
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S (1996) Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *The Plant Cell* **8**: 1353-1366
- Moustafa A, Reyes-Pieto A, Bhattacharya D (2008) Chlamydiae has contributed at least 55 genes to Plantae with predominantly plastid functions. *PLoS ONE* **3**: 2205
- Mu C, Harn C Ko YT, Singletary G, Keeling PL and Wasserman BP (1994) Association of a 76 kDa polypeptide with soluble starch synthase I activity in maize (cv B73) endosperm. *The Plant Journal* **6**: 151-159
- Mullet JE (1988) Chloroplast development and gene expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**: 475-502.

Müller-Röber BT, Koßmann J, Hannah LC, Willmitzer L, Sonnewald U (1990) One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose. *Molecular and General Genetics MGG* **224**: 136-146

Müller-Röber BT, Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Inhibition of the adp-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *Embo J.* **11**: 1229-1238

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.

Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG (2000) Recent Progress toward Understanding Biosynthesis of the Amylopectin Crystal. *Plant Physiol* **122**: 989-998

*N*

Nada A, Soll Jr (2004) Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *Journal of Cell Science* **117**: 3975-3982

Nacir H and Bréhélin C (2013) When proteomics reveals unsuspected roles: the plastoglobule example. *Frontiers in Plant Science* **2013**: 4-114

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

Nakamura Y, Kubo A, Shimamune T, Matsuda T, Harada K, Satoh H (1997) Correlation between activities of starch debranching enzyme and  $\alpha$ -polyglucan structure in endosperms of *sugary-1* mutants of rice. *The Plant Journal* **12**: 143-153

Nakamura Y (2002) Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: rice endosperm as a model tissue. *Plant Cell Physiol* **43**: 718-25

Nakamura Y, Umemoto T, Takahata Y, Komae K, Amano E, Satoh H (1996) Changes in structure of starch and enzyme activities affected by sugary mutations in developing rice endosperm. Possible role of starch debranching enzyme (R-enzyme) in amylopectin biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **97**: 491-498

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

Nelson OE and Rines HW (1962) The enzymatic deficiency in the waxy mutant of maize. *Biochem Biophys Res Commun* **9**: 297-300

Nichols D, Keeling PL, Spalding M, Guan H (2000) Involvement of conserved aspartate and glutamate residues in the catalysis and substrate binding of maize starch synthase. *Biochemistry* **39**: 7820-7825

Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Moller BL (1994) Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with de novo biosynthesis of starch *Plant Physiol.* **105**: 111-117

Niittylä T, Comparot-Moss S, Lue WL, Messerli G, Trevisan M, Seymour MD, Gethouse JA, Villadsen D, Smith SM, Chen J, Zeeman S.C, Smith A.M (2006) Similar protein phosphatases control starch metabolism in plants and glycogen metabolism in mammals *J. Biol.Chem.* **281**: 11815-8

Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC (2004) A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science* **303**: 87-89

Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H (2001) Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-Extender Mutation in Rice Endosperm. *Plant Physiology* **127**: 459-472

Nobile PM, Wattedled F, Quecini V, Girardi CsL, Lormeau M, Laurens Fo (2011) Identification of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase gene associated with mealiness in apple. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4309-4321

Nozaki H, Iseki M, Hasegawa M, Misawa K, Nakada T, Sasaki N, Watanabe M (2007) Phylogeny of Primary Photosynthetic Eukaryotes as Deduced from Slowly Evolving Nuclear Genes. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1592-1595



Ohdan T, Francisco PB, Jr, Sawada T, Hirose T, Terao T, Satoh H, Nakamura Y (2005) Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *Journal of Experimental Botany* **56**: 3229-3244

Osawa M, Anderson DE, Erickson HP (2008) Reconstitution of contractile FtsZ rings in liposomes *Science* **320**: 792-4

Osteryoung KW, McAndrew RS (2001) The plastid division machine. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 315-333.

Osteryoung KW, Nunnari J (2003) The division of endosymbiotic organelles. *Science* **302**: 1698-704

Osteryoung KW, Stokes KD, Rutherford SM, Percival AL, Lee WY (1998) Chloroplast Division in Higher Plants Requires Members of Two Functionally Divergent Gene Families with Homology to Bacterial ftsZ. *The Plant Cell* **10**: 1991-2004

Osteryoung KW, Vierling E (1995) Conserved cell and organelle division. *Nature* **376**: 473-474

Ozbun JL, Hawker JS, Preiss J (1971) Adenosine Diphosphoglucose-Starch Glucosyltransferases from Developing Kernels of Waxy Maize. *Plant Physiology* **48**: 765-769



Palm CJ, Federspiel NA, Davis RW (2000) DAtA: database of *Arabidopsis thaliana* annotation. *Nucleic Acids Research* **28**: 102-103

Palmer JD (2003) The symbiotic birth and spread of plastids: how many times and whodunit?

*J. Phycol.* **39**: 4-11

Palopoli N, Busi MV, Fornasari MS, Gomez-Casati D, Ugalde R, Parisi G (2006) Starch-synthase III family encodes a tandem of three starch-binding domains. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **65**: 27-31

Pan D, Nelson OE (1984) A Debranching Enzyme Deficiency in Endosperms of the Sugary-1 Mutants of Maize. *Plant Physiology* **74**: 324-328

Park H, Xu S, Seetharaman K (2011) A novel in situ atomic force microscopy imaging technique to probe surface morphological feature of starch granules. *Carbohydrate research* **346**: 846-853

Peat S, Whelan WJ, Rees WR (1953) D-Enzyme - A disproportionating enzyme in potato juice. *Nature* **172**: 158-158

Peat S, Whelan WJ, Rees WR (1956) The enzymic synthesis and degradation of starch .20. the disproportionating enzyme (deuterium-enzyme) of the potato. *Journal of the Chemical Society*: 44-53

Pérez S and Bertoff E (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch - Stärke* **62**: 389-420

Pichoff S, Lutkenhaus J (2002) Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21**: 685-93

Pollock C, Preiss J (1980) The citrate-stimulated starch synthase of starchy maize kernels: Purification and properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **204**: 578-588

Ponstein AS, Oosterhaven K, Feenstra WJ, Witholt B (1991) Starch Synthesis in Potato Tubers: Identification of the in vitro and the in vivo Acceptor Molecules of Soluble Starch Synthase Activity. *Starch - Stärke* **43**: 208-220

Portier P (1918) Symbiotes, mitochondries, bactéries. *Masson et Cie, Paris.* 44-98

Possingham JV, Hashimoto H, Oross J (1988) Factors that influence plastid division in higher plants. In SA Boffey, D Lloyd, eds, *press, Cambridge, UK* 1-20

Possingham JV, Saurer W (1969) Changes in chloroplast number per cell during leaf development in spinach. *Planta* **86**: 186-194

Possingham JV and Lawrence ME (1983) controls to plastid division. *Int. Rev. Cytol.* **84**: 1-56

Prioul JL, Jeannette E, Reyss A, Gregory N, Giroux M, Hannah LC, Causse M (1994) Expression of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Maize (*Zea mays* L.) Grain and Source Leaf during Grain Filling. *Plant Physiology* **104**: 179-187

Pyke KA, Leech RM (1992) Chloroplast Division and Expansion Is Radically Altered by Nuclear Mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **99**: 1005-1008

Pyke KA, Leech RM (1991) Rapid Image Analysis Screening Procedure for Identifying Chloroplast Number Mutants in Mesophyll Cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **96**: 1193-1195

Pyke KA Plastid division and development (1999) *Plant Cell* **4**: 549-56

*R*

Rabe M, Schwieger C, Zope H.R, Versluis F, Kros A (2014) Membrane interactions of fusogenic coiled coil peptides: implications for licopeptide mediated vesicle fusion. *Langmuir* **30**: 7724-35

Rahman S, Nakamura Y, Li Z, Clarke B, Fujita N, Mukai Y, Yamamoto M, Regina A, Tan Z, Kawasaki S, Morell M (2003) The sugary-type isoamylase gene from rice and *Aegilops tauschii*: characterization and comparison with maize and *Arabidopsis*. *Genome* **46**: 496-506

Ral J-P, Colleoni C, Wattedled F, Dauvillee D, Nempont C, Deschamps P, Li Z, Morell MK, Chibbar R, Purton S, d'Hulst C, Ball SG (2006) Circadian Clock Regulation of Starch Metabolism Establishes GBSSI as a Major Contributor to Amylopectin Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **142**: 305-317

Ral JP, Derelle E, Ferraz C, Wattedled F, Farinas B, Corellou F, Buleon A, Slomianny MC, Delvalle D, d'Hulst C, Rombauts S, Moreau H, Ball S (2004) Starch Division and Partitioning. A Mechanism for Granule Propagation and Maintenance in the Picophytoplanktonic Green Alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiology* **136**: 3333-3340

Raskin DM, de Boer PA (1997) The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. *Cell* **91**: 685-94

Raynaud C, Perennes C, Reuzeau C, Catrice O, Brown S and Bergounioux C (2005) Cell and plastid division are coordinated through the prereplication factor AtCDT1. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8216-8221

Recondo E, Leloir LF (1961) Adenosine Diphosphate Glucose and starch synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **6**: 85-88

Reddy MS, Dinkins R, Collins GB (2002) Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* MinE1 bacterial division inhibitor homologue gene alters chloroplast size and morphology in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. *Planta* **215**: 167-76

Regina A, Bird A, Topping D, Bowden S, Freeman J, Barsby T, Kosar-Hashemi B, Li Z, Rahman S, Morell M (2006) High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large-bowel health in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3546-3551

Regina A, Kosar-Hashemi B, Ling S, Li Z, Rahman S, Morell M (2010) Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1469-1482

Reinhold H, Soyk Simkova Kr, Hostettler C, Marafino J, Mainiero S, Vaughan CK, Monroe JD, Zeeman SC (2011)  $\beta$ -Amylase-Like Proteins Function as Transcription Factors in *Arabidopsis*, Controlling Shoot Growth and Development. *The Plant Cell Online* **23**: 1391-1403

Reyes-Prieto A, Weber APM, Bhattacharya D (2007) The Origin and Establishment of the Plastid in Algae and Plants. *Annual Review of Genetics* **41**: 147-168

- Richly E, Leister D (2004) NUPTs in sequenced eukaryotes and their genomic organization in relation to NUMTs. *Mol Biol Evol.* **21**: 1972-80
- Richter S, Lamppa GK (1998) A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 7463-7468
- Ritte G, Heydenreich M, Mahlow S, Haebel S, Kötting O, Steup M (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Letters* **580**: 4872-4876
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M (2002) The starch-related R1 protein is an  $\alpha$ -glucan, water dikinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7166-7171
- Ritte G, Lorberth R, Steup M (2000) Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *The Plant Journal* **21**: 387-391
- Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Haebel S, Steup M (2004) Phosphorylation of transitory starch increased during degradation *Plant Physiol.* **135**: 2068-77
- Robertson EJ, Rutherford SM, Leech RM (1996) Characterization of chloroplast division using the Arabidopsis mutant arc5 *Plant Physiol* **112**: 149-59
- Roldán I, Wattedled F, Lucas MM, Delvallé D, Planchot V, Jiménez S, Pérez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida Á (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**: 492-504
- Romisch-Margl L, Spielbauer G, Schützenmeister A, Schawab W, Piepho H.P, Genschel U and Gierl A (2010) Heterotic patterns of sugar and amino acid components in developing maize kernels, *Theor. Appl. Genet.* **120**: 369-381.
- Rose A, Manikantan S, Schraegle SJ, Maloy MA, Stahlberg EA, Meier I (2004) Genome-Wide Identification of Arabidopsis Coiled-Coil Proteins and Establishment of the ARABI-COIL Database. *Plant Physiology* **134**: 927-939
- Rosso MG, Li Y, Strizhov N, Reiss B, Dekker K, Weisshaar B (2003) An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **53**: 247-259
- 
- Sagan LLM (1967) On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* **14**: 225-275
- Santelia D, Kötting O, Seung D, Schubert M, Thalmann M, Bischof S, Meekins DA, Lutz A, Patron N, Gentry MS, Allain FdrH-T, Zeeman SC (2011) The Phosphoglucan Phosphatase Like Sex Four2 Dephosphorylates Starch at the C3-Position in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **23**: 4096-4111
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Tabata S (1999) Complete Structure of the Chloroplast Genome of Arabidopsis thaliana. *DNA Research* **6**: 283-290

- Satoh H, Nishi A, Yamashita K, Takemoto Y, Tanaka Y, Hosaka Y, Sakurai A, Fujita N, Nakamura Y (2003) Starch-Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. *Plant Physiology* **133**: 1111-1121
- Satoh H, Shibahara K, Tokunaga T, Nishi A, Tasaki M, Hwang S-K, Okita TW, Kaneko N, Fujita N, Yoshida M, Hosaka Y, Sato A, Utsumi Y, Ohdan T, Nakamura Y (2008) Mutation of the Plastidial  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Gene in Rice Affects the Synthesis and Structure of Starch in the Endosperm. *The Plant Cell* **20**: 1833-1849
- Schimper AFW (1883) Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot Zeit* **41**: 105-112
- Schimper AFW (1885) Untersuchungen über die chlorophyllkörner und die ihnen homologen gebilde. *Jb Wiss Botan* **16**: 1-247
- Schmitz AJ, Glynn JM, Olson BJSC, Stokes KD, Osteryoung KW (2009) Arabidopsis FtsZ2-1 and FtsZ2-2 Are Functionally Redundant, But FtsZ-Based Plastid Division Is Not Essential for Chloroplast Partitioning or Plant Growth and Development. *Molecular Plant* **2**: 1211-1222
- Schmitz FKJ (1883) Die chromatophoren der algen. *Verh. Naturhist. Ver. preuß. Rheinland und Westfalen* **40**: 1-180
- Schwall GP, Safford R, Westcott RJ, Jeffcoat R, Tayal A, Shi Y-C, Gidley MJ, Jobling SA (2000) Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology* **18**: 551-554
- Schwendener S (1867) *Theorie und Anwendung desselben. Reimprimió BiblioBazaar ISBN. Das Mikroskop* **144**: 41106-8
- Shannon JC, Pien FM, Liu KC (1996) Nucleotides and Nucleotide Sugars in Developing Maize Endosperms (Synthesis of ADP-Glucose in brittle-1). *Plant Physiology* **110**: 835-843
- Shannon JC, Pien F-M, Cao H, Liu K-C (1998) Brittle-1, an Adenylate Translocator, Facilitates Transfer of Extraplasmidial Synthesized ADP-Glucose into Amyloplasts of Maize Endosperms. *Plant Physiology* **117**: 1235-1252
- Shi LX, Theg SM (2013) Energetic cost of protein import across the envelope membrane of chloroplasts *Proc Natl Acad USA*. **110**: 930-5
- Shih YL, Fu X, King GF, Le T, Rothfield L (2002) Division site placement in E.coli: mutations that prevent formation of the MinE ring lead to loss of the normal midcell arrest of growth of polar MinD membrane domains *EMBO J*. **21**: 3347-57
- Shotland Y, Shifrin A, Ziv T, Teff D, Koby S, Kobiler O, Oppenheim A.B (2000) Proteolysis of bacteriophage  $\lambda$  CII by Escherichia coli FtsH (HflB) *Journal of Bacteriology* **182**: 3111
- Shure M, Wessler S, Fedoroff N (1983) Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* **35**: 225-233
- Singh J.K, Makde R.D, Kumar V, Panda D (2007) A membrane protein, EzrA, regulates assembly dynamics of FtsZ by interacting with the C-terminal tail of FtsZ. *Biochemistry* **46**: 11013-22

- Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, Lanning SP, Blake NK, Talbert LE, Giroux MJ (2002) Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1724-1729
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC, Smith AM (2004) Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology* **136**: 2687-2699
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005) STARCH DEGRADATION. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 73-98
- Sogaard M, Svensson B (1990) Expression of cDNAs encoding barley  $\alpha$ -amylase 1 and 2 in yeast and characterization of the secreted proteins. *Gene* **94**: 173-179
- Sokolov LN, Dujardin A, Kleczkowski LA (1998) Sugars and light/dark exposure trigger differential regulation of ADP-glucose pyrophosphorylase genes in *Arabidopsis thaliana* (thale cress). *Biochemical Journal* **336**: 681-687
- Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Kishore GM (1992) Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science* **258**: 287-292
- Stinard PS, Robertson DS, Schnable PS (1993) Genetic Isolation, Cloning, and Analysis of a Mutator-Induced, Dominant Antimorph of the Maize amylose extender1 Locus. *The Plant Cell* **5**: 1555-1566
- Stitt M, Lunn J, Usadel B (2009) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism - more than the icing on the cake *The plant journal* **61**: 1067-1091
- Stokes KD, Osteryoung KW (2003) Early divergence of the FtsZ1 and FtsZ2 plastid division gene families in photosynthetic eukaryotes. *Gene* **320**: 97-108
- Streb S, Delatte T, Umhang M, Eicke S, Schorderet M, Reinhardt D, Zeeman SC (2008) Starch Granule Biosynthesis in Arabidopsis Is Abolished by Removal of All Debranching Enzymes but Restored by the Subsequent Removal of an Endoamylase. *The Plant Cell* **20**: 3448-3466
- Streb S, Egli B, Eicke S, Zeeman SC (2009) The Debate on the Pathway of Starch Synthesis: A Closer Look at Low-Starch Mutants Lacking Plastidial Phosphoglucomutase Supports the Chloroplast-Localized Pathway. *Plant Physiology* **151**: 1769-1772
- Streb S and Zeeman S.C (2014) Replacement of the endogenous starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 of Arabidopsis with the rice orthologs reveals a degree of functional conservation during starch synthesis. *PLoS One* **3**: 92174
- Strugger S (1950) Über den Bau der Proplastiden und Chloroplasten. *Naturwissenschaften* **37**: 166-167
- Sun C, Sathish P, Ahlandsberg S, Jansson C (1999) Analyses of isoamylase gene activity in wild-type barley indicate its involvement in starch synthesis *Plant. mol. biol.* **40**: 431-43
- Sun C, Sathish P, Ahlandsberg S, Jansson C (1998) The Two Genes Encoding Starch-Branching Enzymes IIa and IIb Are Differentially Expressed in Barley. *Plant Physiology* **118**: 37-49

Szydlowski N, Ragel P, Raynaud S, Lucas MM, Roldan I, Montero M, Munoz FJ, Ovecka M, Bahaji A, Planchot V, Pozueta-Romero J, D'Hulst C, Merida A (2009) Starch Granule Initiation in Arabidopsis Requires the Presence of Either Class IV or Class III Starch Synthases. *The Plant Cell* **21**: 2443-2457

Szydlowski N (2009) Contribution à l'étude fonctionnelle des amidonsynthétases dans la feuille d'Arabidopsis thaliana : initiation et élongation du polysaccharide de réserve. *manuscrit de thèse*

Szydlowski N, Ragel P, Hennen-Bierwagen TA, Planchot Vr, Myers AM, Mérida A, d'Hulst C, Wattedled F (2011) Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in Arabidopsis leaf starch. *Journal of Experimental Botany*

Szymonska J, Krok F, Komorowska-Czepirska E, Rebilas K (2003) Modification of granular potato starch by multiple deep-freezing and thawing. *Carbohydrate Polymers* **52**: 1-10



Tavva VS, Collins GB, Dinkins RD (2006) Targeted overexpression of the Escherichia coli MinC in higher plants results in abnormal chloroplasts. *Plant Cell Rep* **25**: 341-8

Tetlow I, Morell M, Emes M (2004) Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2131-2145

Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin NS, Wait R, Morell MK, Emes MJ (2008) Analysis of Protein Complexes in Wheat Amyloplasts Reveals Functional Interactions among Starch Biosynthetic Enzymes. *Plant Physiology* **146**: 1878-1891

Thorbjørnsen T, Villand P, Denyer K, Olsen O-A, Smith AM (1996) Distinct isoforms of ADPglucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm. *The Plant Journal* **10**: 243-250

Tiessen A, Hendriks JHM, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farre EM, Geigenberger P (2002) Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply. *The Plant Cell* **14**: 2191-2213

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

Trécul AAL (1858) Des formations vésiculaires dans les cellules végétales. *Ann. Sci. Nat. Bot.* IV **8**: 20-163, 205-382

Tsai CY, Nelson OE (1966) Starch-deficient maize mutant lacking adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase activity. *Science* **151**: 341-343

Tsai CY (1974) Function of waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical Genetics* **11**: 83-96

Tyra HM, Linka M, Weber AP, Bhattacharya D (2007) Host origin of plastid solute transporters in the first photosynthetic eukaryotes. *Genome Biol* **8**: R212

## U

Ugalde JE, Parodi AJ, Ugalde RA (2003) De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10659-10663

Umemoto T, Terashima K, Nakamura Y, Satoh H (1999) Differences in Amylopectin Structure Between Two Rice Varieties in Relation to the Effects of Temperature During Grain-Filling. *Starch - Stärke* **51**: 58-62

Umemoto T, Yano M, Satoh H, Shomura A, Nakamura Y (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**: 1-8

Utsumi Y, Nakamura Y (2006) Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1–isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm. *Planta* **225**: 75-87

Utsumi Y, Utsumi C, Sawada T, Fujita N, Nakamura Y (2011) Functional Diversity of Isoamylase Oligomers: The ISA1 Homo-Oligomer Is Essential for Amylopectin Biosynthesis in Rice Endosperm. *Plant Physiology* **156**: 61-77

## V

Valdez HA, Busi MV, Wayllace NZ, Parisi G, Ugalde RA, Gomez-Casati DF (2008) Role of the N-Terminal Starch-Binding Domains in the Kinetic Properties of Starch Synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* **47**: 3026-3032

van de Wal M, D'Hulst C, Vincken J-P, Buleon A, Visser R, Ball S (1998) Amylose Is Synthesized in Vitro by Extension of and Cleavage from Amylopectin. *The Journal Biological Chemistry* **273**: 22232-22240

Vilaplana F, Hasjim J, Gilbert RG (2012) Amylose content in starches: Toward optimal definition and validating experimental methods. *Carbohydrate Polymers* **88**: 103-111

Villand P, Olsen O-A, Kilian A, Kleczkowski LA (1992) ADP-Glucose Pyrophosphorylase Large Subunit cDNA from Barley Endosperm. *Plant Physiology* **100**: 1617-1618

Vitha S, McAndrew RS, Osteryoung KW (2001) FtsZ ring formation at the chloroplast division site in plants. *J Cell Biol.* **153**: 111-119

Vitha S, Froehlich JE, Koksharova O, Pyke KA, van Erp H, Osteryoung KW (2003) ARC6 Is a J-Domain Plastid Division Protein and an Evolutionary Descendant of the Cyanobacterial Cell Division Protein Ftn2. *The Plant Cell* **15**: 1918-1933

von Nägeli C (1846) Bläschenförmige gebilde im inhalte der pflanzenzelle. *Z Wiss Bot* **3/4**:

94-128

Vos-Scheperkeuter GH, de Boer W, Visser RGF, Feenstra WJ, Without B (1986) Identification of Granule-Bound Starch Synthase in Potato Tubers. *Plant Physiology* **82**: 411-416

*W*

Wagner R, Aigner H, Funk C FtsH proteases located in the plant chloroplast (2011) *Phys. Plantarum* **145** : 203-214

Wakasugi T, Nagai T, Kapoor M, Sugita M, Ito M, Tsudzuki J, Nakashima K, Tsudzuki Y, Hamada A, Ohta T, Inamura A, Yoshinaga K, Sugiura M (1997) Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*: the existence of genes possibly involved in chloroplast division *Proc Natl Acad Sci USA*. **94**: 5967-72

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

Wattebled F, Ral J-P, Dauvillée D, Myers AM, James MG, Schlichting R, Giersch C, Ball SG, D'Hulst C (2003) STA11, a *Chlamydomonas reinhardtii* Locus Required for Normal Starch Granule Biogenesis, Encodes Disproportionating Enzyme. Further Evidence for a Function of alpha -1,4 Glucanotransferases during Starch Granule Biosynthesis in Green Algae. *Plant Physiology* **132**: 137-145

Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvalle D, Planchot V, Berbezy P, Vyas D, Colonna P, Chatterjee M, Ball S, D'Hulst C (2005) Mutants of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogen and an Abnormal Form of Amylopectin. *Plant Physiology* **138**: 184-195

Wattebled F, Planchot V, Dong Y, Szydlowski N, Pontoire B, Devin A, Ball S, D'Hulst C (2008) Further Evidence for the Mandatory Nature of Polysaccharide Debranching for the Aggregation of Semicrystalline Starch and for Overlapping Functions of Debranching Enzymes in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology* **148**: 1309-1323

Wayllace N, Valdez A, Ugalde R, M. B, Gomez-Casati D (2010) The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Journal* **277**: 428-440

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

Whatley JM (1988) Mechanism and morphology of plastid division. The division and segregation of organelles. *Cambridge University Press, Cambridge*, 63-83

Wong K-S, Kubo A, Jane J-I, Harada K, Satoh H, Nakamura Y (2003) Structures and Properties of Amylopectin and Phytoglycogen in the Endosperm of sugary-1 Mutants of Rice. *Journal of Cereal Science* **37**: 139-149

X

Xing G-X, Zhang S-F, Ju B-Z, Yang J-Z (2006) Microwave-assisted Synthesis of Starch Maleate by Dry Method. *Starch - Stärke* **58**: 464-467

Y

Yamaguchi M., Kainuma K., French D. (1969) Electron microscopic observation of waxy maize starch. *Journal of ultrastructure research*. **69**: 249-261

Yang Y, Glynn JM, Olson B, Schmitz AJ, Osteryoung KW (2008) Plastid division: Across time and space *Curent Opinion in Plant Biology* **11**: 577-584

Yang CZ, Shu XL, Zhang LL, Wang XY, Zhao HJ, Ma CX, Wu DX (2006) Starch Properties of Mutant Rice High in Resistant Starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 523-528

Yang Y, Sage TL, Liu Y, Ahmad TR, Marshall WF, Shiu S-H, Froehlich JE, Imre KM, Osteryoung KW (2011) CLUMPED CHLOROPLASTS 1 is required for plastid separation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 18530-18535

Yeh JY, Garwood DL, Shannon JC (1981) Characterization of Starch from Maize Endosperm Mutants. *Starch - Stärke* **33**: 222-230

Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D (2004) A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **21**: 809-818

Yoshida Y, Kuroiwa H, Misumi O, Yoshida M, Ohnuma M, Fujiwara T, Yagisawa F, Hirooka S, Imoto Y, Matsushita K, Kawano S, Kuroiwa T (2010) Chloroplasts Divide by Contraction of a Bundle of Nanofilaments Consisting of Polyglucan. *Science* **329**: 949-953

Yu T-S, Lue W-L, Wang S-M, Chen J (2000) Mutation of Arabidopsis Plastid Phosphoglucose Isomerase Affects Leaf Starch Synthesis and Floral Initiation. *Plant Physiology* **123**: 319-326

Yu TS, Kofler H, Hausler RE, Hille D, Flugge UI, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue W-L, Chen J, Weber A (2001) The Arabidopsis *sex1* Mutant Is Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and Not in the Chloroplast Hexose Transporter. *The Plant Cell* **13**: 1907-1918

Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue WL, Hegemann B, Tung SY, Umemoto T, Chapple A, Tsai DL, Wang SM, Smith AM, Chen J, Smith SM (2005)  $\alpha$ -Amylase Is Not Required for Breakdown of Transitory Starch in Arabidopsis Leaves. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 9773-9779

Yun MS, Kawagoe Y (2009) Amyloplast Division Progresses Simultaneously at Multiple Sites in the Endosperm of Rice. *Plant And Cell Physiology* **50**: 1617-1626

Yun MS, Kawagoe Y (2010) Septum formation in amyloplasts produces compound granules in the rice endosperm and is regulated by plastid division proteins. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1469-79



Zabawinski C, Van Den Koornhuysen N, D'Hulst C, Schlichting R, Giersch C, Delrue B, Lacroix J-M, Preiss J, Ball S (2001) Starchless Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Lack the Small Subunit of a Heterotetrameric ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *Journal of Bacteriology* **183**: 1069-1077

Zeeman SC, Umemoto T, Lue W-L, Au-Yeung P, Martin C, Smith AM, Chen J (1998) A Mutant of *Arabidopsis* Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulates Both Starch and Phytoglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-1712

Zeeman SC, Smith SM, Smith AM (2002) The Priming of Amylose Synthesis in *Arabidopsis* Leaves. *Plant Physiology* **128**: 1069-1076

Zeeman SC, Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P, Bechtold N, Smith AM, Smith SM (2004) Plastidial  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in *Arabidopsis* Leaves But Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress. *Plant Physiology* **135**: 849-858

Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM (2010) Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 209-234

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

Zhang X, Myers AM, James MG (2005) Mutations Affecting Starch Synthase III in *Arabidopsis* Alter Leaf Starch Structure and Increase the Rate of Starch Synthesis. *Plant Physiology* **138**: 663-674

Zhang X, Szydlowski N, Delvalle D, D'Hulst C, James M, Myers A (2008b) Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **8**: 96

Zhao CR, de Boer PA, Rothfield LI (1995) Proper placement of the *Escherichia coli* division site requires two functions that are associated with different domains of the MinE protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4313-7

<http://www.arabidopsis.org>

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

<http://www.expasy.org>

<http://www.usipa.fr>

# *Annexes*

## I. Annexes en rapport avec la partie Matériel et méthodes:

. Liste des plants d'*A. thaliana* utilisés pour ce travail :

## A

Nom de la lignée	Numéro de la lignée	Numéro du gène	lieu d'insertion de l'ADN-T	Provenance de l'ADN-T	Provenance de la lignée
Col 0	-	-	-	-	SALK
<i>isa1</i> -	42704	At2g39930	Exon 13	pROK2	SALK
<i>isa2</i> -	29442	At1g03310	Exon 1	pROK2	SALK
<i>ss4</i> -	290D11	At4g18240	Intron 11	pAC161	GABI-KAT
<i>ftsZ1</i> -	73878	At5g55280	Exon 6	pROK2	SALK
<i>ftsZ2.1</i> -	CS65897	At2g36250	Exon 1	pAC161	GABI-KAT
<i>ftsZ2.2</i> -	50397	At3g52750	Exon 5	pROK2	SALK
<i>ftsZ1-ftsZ2.1</i> -	CS655901	-	-	-	SALK
<i>ftsZ1-ftsZ2.2</i> -	CS655900	-	-	-	SALK
<i>ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -	CS65898	-	-	-	SALK
<i>ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -	CS65899	-	-	-	SALK

## B

	<i>isa2</i> -	<i>ftsZ1</i> -	<i>ftsZ2.1</i> -	<i>ftsZ2.2</i> -	<i>ftsZ1-ftsZ2.1</i> -	<i>ftsZ1-ftsZ2.2</i> -	<i>ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -	<i>ftsZ1-ftsZ2.1-ftsZ2.2</i> -
<i>isa1</i> -	X							
<i>ss4</i> -		X	X	X	X	X	X	X

En **A**, les informations concernant les lignées d'*Arabidopsis thaliana* utilisées lors de mon travail de thèse. Le nom des lignées, le numéro de la lignée, les numéros de gènes ainsi que le lieu d'insertion et la provenance de l'insert apparaissent dans ce tableau. La provenance de la lignée est également indiquée (SALK-institute ou GABI-KAT). Les informations, pour les plantes issues de croisements, ne sont pas répétées. En **B**, les croisements effectués au laboratoire permettant d'obtenir des doubles, triples ou quadruples mutants.

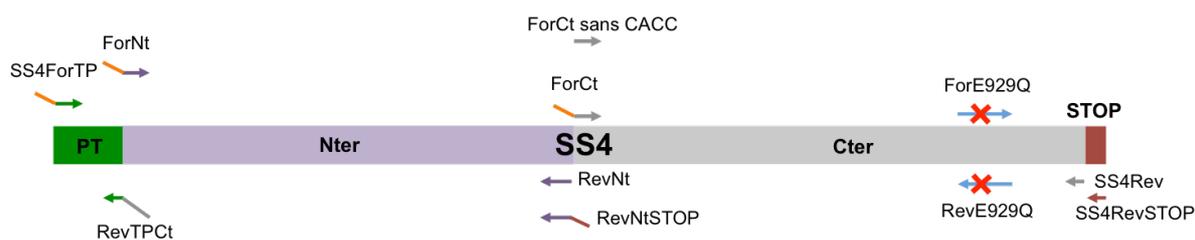
. Liste des amorces utilisées pour le génotypage des mutants d'insertion.

	Nom de l'amorce	Séquence
<i>ss4</i> -	SA397	GTTGTTCAATACCTTCAAATCCC
	SA398	CATTGTAACAACCGTGCCCC
<i>isa1-1</i>	<i>isa1</i> -for1	GTGCTTTTGCTGAATGTCTCTGTG
	<i>isa1</i> -rev1	CTCGCAAAGTCTCCCTCCTG
<i>isa2-2</i>	<i>isa2</i> -for2	CAGGACTCTCGCTTGTTGAC
	<i>isa2</i> -rev1	GTTTCCTTCTCTGACTCTG
<i>ftsZ1</i> -	FtsZ1 For :	GCACTGGAAGCTATTGAAAAGCTCC
	FtsZ1 Rev :	TCTGAGATTCCTTGACTCCTTGGC
<i>ftsZ2-1</i> -	FtsZ2-1 Ex1-D	GAGGTGAAGGGACTAGTACA
	FtsZ2-1 Int3-R	GAAAGAATCAGCACGTTGCA
<i>ftsZ2-2</i> -	FtsZ2-2 Int1-D	GCTGCCTCCATAGATTGACT
	FtsZ2-2 Int2-R	ATGATGGAGCAGATAGAGCC

Origine de l'ADN-T	Nom de l'amorce	Séquence
pROK2	Lba1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG
pROK2	Lbb1	GCGTGACCGCTTGCTGCAACT
pAC161	GABI 1	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC
pAC161	GABI LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC

Le premier tableau rassemble les amorces pour amplifier l'allèle sauvage et le second les amorces s'hybridant à l'insert (selon la provenance de la lignée et par conséquent de l'ADN-T inséré)

## . Amorces utilisées pour le clonage des différentes constructions SS4

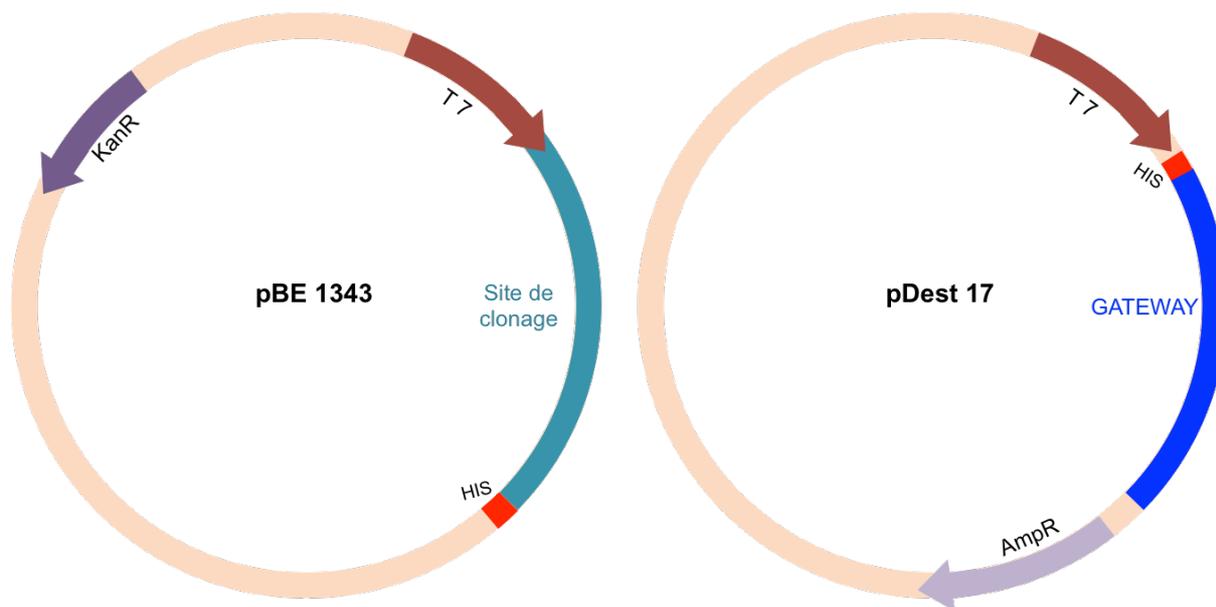


Nom	Séquence
SS4ForTP	CACCATGTGTAAGATGCGACAACAACG
RevTPCt	TCTTCGATCTTTCCTCCATACCATGTCTCTCGAAGTAGAACTAATCGAC
ForNt	CACCATGACGACGAAGCTATCGAG
ForCt sans CACC	AGAGACATGGTATGGAAGAA
ForCt	CACCAGAGACATGGTATGGAAGAA
RevNt	CAGTAAGTCAGCATCGTTGC
RevNtSTOP	TCA CAGTAAGTCAGCATCGTTGC
ForE929Q	CCGTCAATTTTT CAGCCTTGTGGAC
RevE929Q	GTCCACAAGGCTGAAAAATTGACGG
SS4Rev	CGTGCGATTAGGAACAGCTC
SS4RevSTOP	TCA CGTGCGATTAGGAACAG

Figure représentant les zones d'hybridation des amorces utilisées pour les clonages de SS4.

- . Pour le clonage de SS4 entière : SS4ForTP - SS4RevSTOP
- . SS4 sans peptide de transit : ForNter - SS4RevSTOP
- . SS4 sans peptide de transit et sans codon stop : ForNter - RevNter
- . La partie Cter de SS4 : SS4ForTP - RevTPCt + ForCt sans CACC - SS4 Rev STOP suivi d'une troisième réaction PCR avec les amplicons des deux premières et SS4ForTP - SS4RevSTOP
- . La partie Cter sans peptide de transit : ForCt - SS4RevSTOP
- . La partie Cter sans peptide de transit, sans codon stop : ForCt - SS4Rev
- . La partie Nter : SS4ForTP - RevNtSTOP
- . La partie Nter sans peptide de transit : ForNt - RevNtSTOP
- . La partie Nter sans peptide de transit et sans codon stop : ForNt - RevNt
- . Et enfin, la mutagenèse dirigée a été réalisée par amplification PCR des séquences codant ces différentes constructions de SS4 dans leur vecteur d'entrée pENTR-D-TOPO à l'aide des amorces ForE929Q et Rev929Q. Toutes ces manipulations se font à l'aide d'une *Taq* polymérase haute fidélité (Kapa HiFi de KapaBiosystems®) selon les recommandations du fournisseur. L'ajout de CACC en aval de certains amplicons permet l'insertion orientée de celui-ci dans le vecteur d'entrée D-TOPO (Invitrogen).

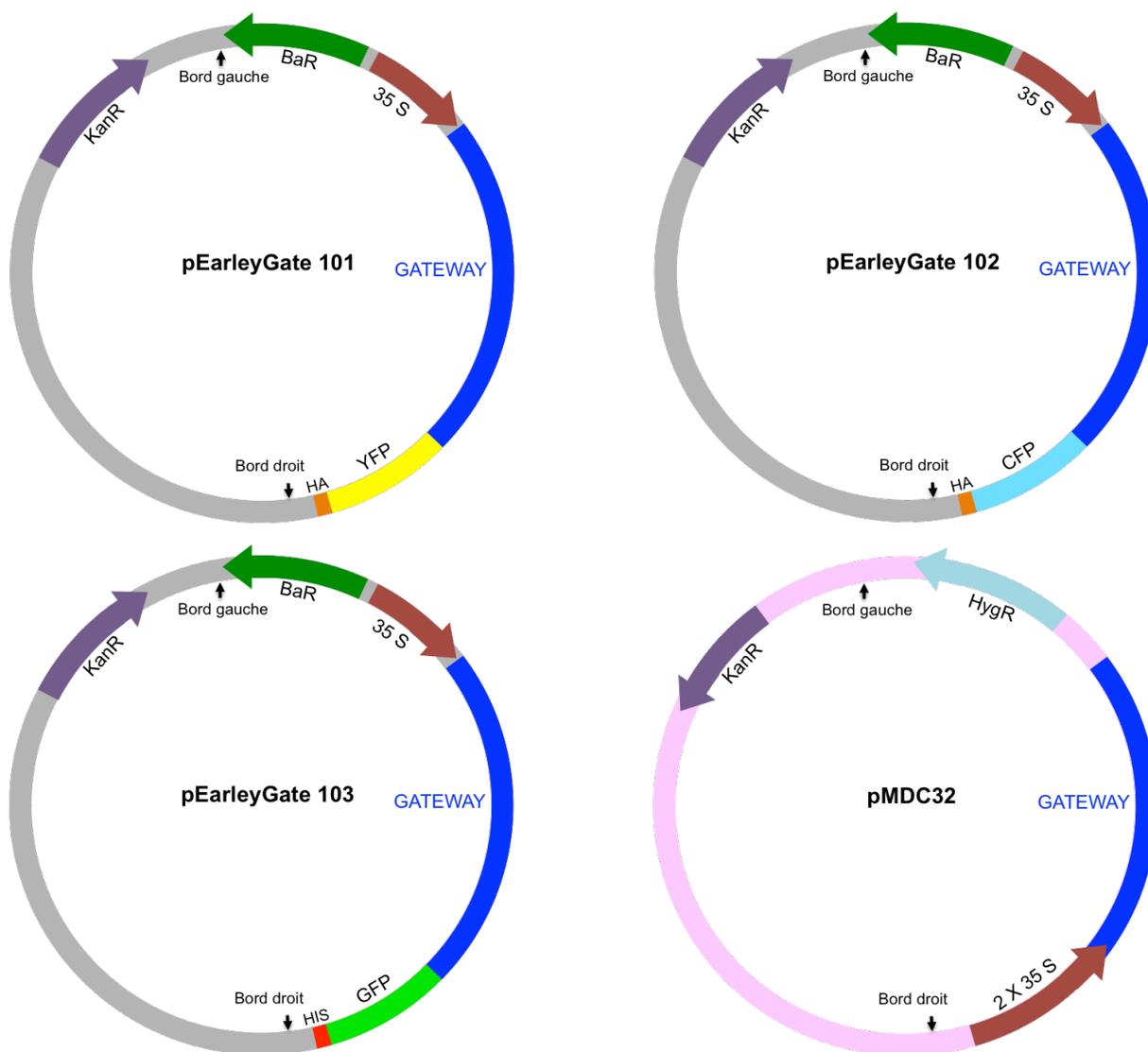
. Cartes des vecteurs utilisés pour la production de protéines dans *Escherichia coli* :



. Le vecteur pBE1343 nous a été fourni par l'équipe du Pr Alan Myers de l'*Iowa State University* (Etat Unis). Il contient un site de clonage classique permettant l'expression de la protéine recombinante sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG (*Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*) et ajoute une étiquette 8 Histidines en partie Carboxy-terminale de la protéine.

. Le vecteur pDest17 (Invitrogen) est compatible à la technique de clonage « Gateway® ». Il permet l'expression de la protéine de manière inductible au L-Arabinose ou à l'IPTG selon la souche d'*E. coli* utilisée. Ce vecteur permet d'ajouter une étiquette de 6 histidines en partie Amino-terminale de la protéine.

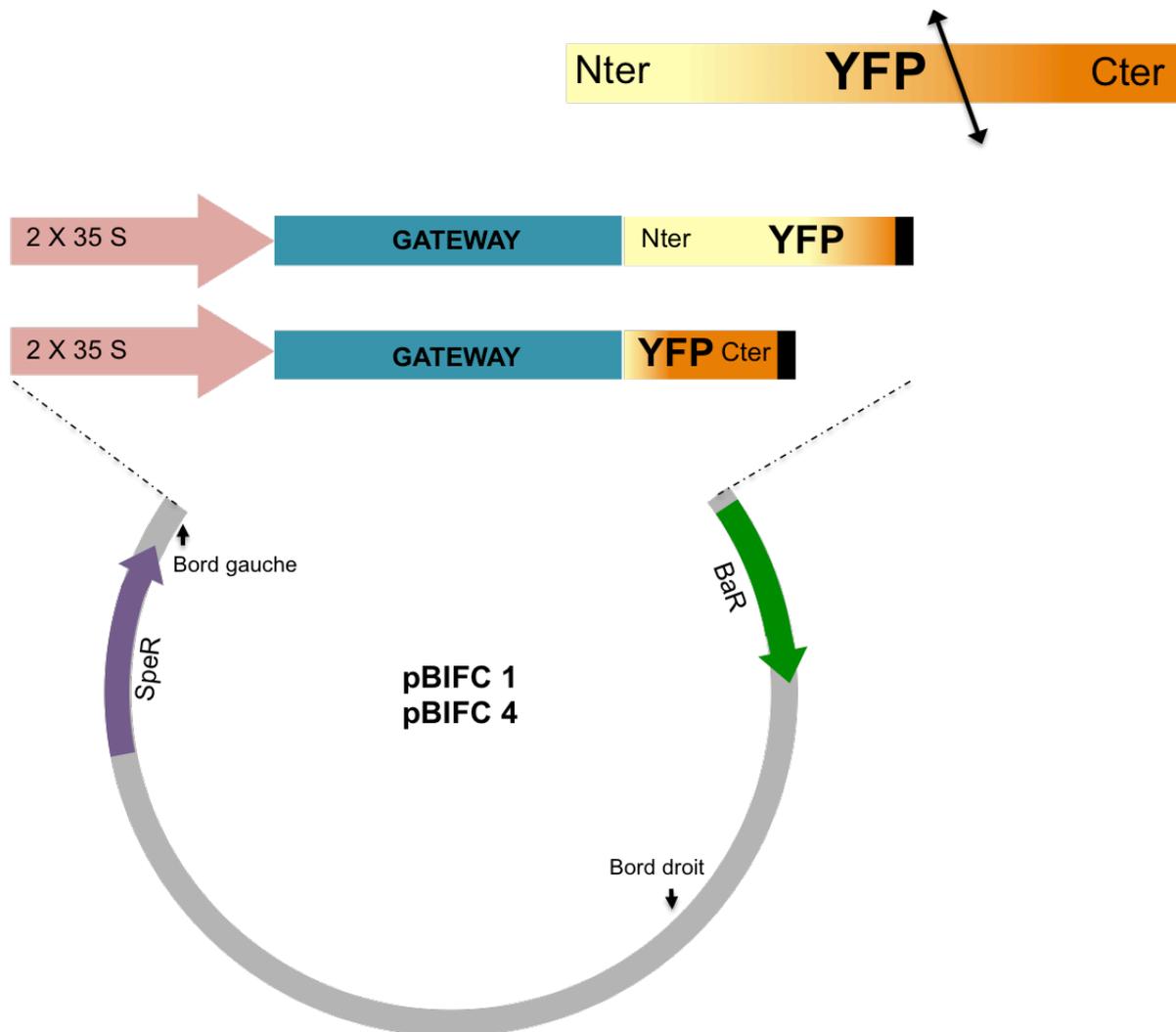
. Cartes des vecteurs utilisés pour l'expression de protéines dans les plantes ou les cellules végétales.



. Les vecteurs **pEarleyGate** (Disponibles via le site « TAIR ») permettent la transformation des plantes de par la présence des bord droit et gauche nécessaire à l'insertion de l'ADN de transfert. Ils permettent l'expression forte et constitutive de protéines sous contrôle d'un promoteur 35 S (Virus de la mosaïque du chou fleur) et l'ajout d'une étiquette YFP-HA (*Yellow Fluorescent Protein – HemAgglutinin*) pour pEG101, CFP-HA (*Cyan Fluorescent Protein – HemAgglutinin*) pour pEG102 et GFP-His (*Green Fluorescent Protein – 6 x Histidin*). Ces vecteurs sont compatibles avec le système « Gateway® » et confèrent la résistance au **Gluphosinate d'ammonium** aux plantes transformées.

. Le vecteur **pMDC32** (Disponibles via le site « TAIR ») permet également la transformation des plantes et l'expression de protéines sous le contrôle d'un promoteur fort (2x35S Virus de la mosaïque du chou fleur). Il confère, aux plantes transformées, la résistance à l'Hygromycine B.

. Vecteurs utilisés pour les expériences de *BiFluorescence Complementation* (BiFC)



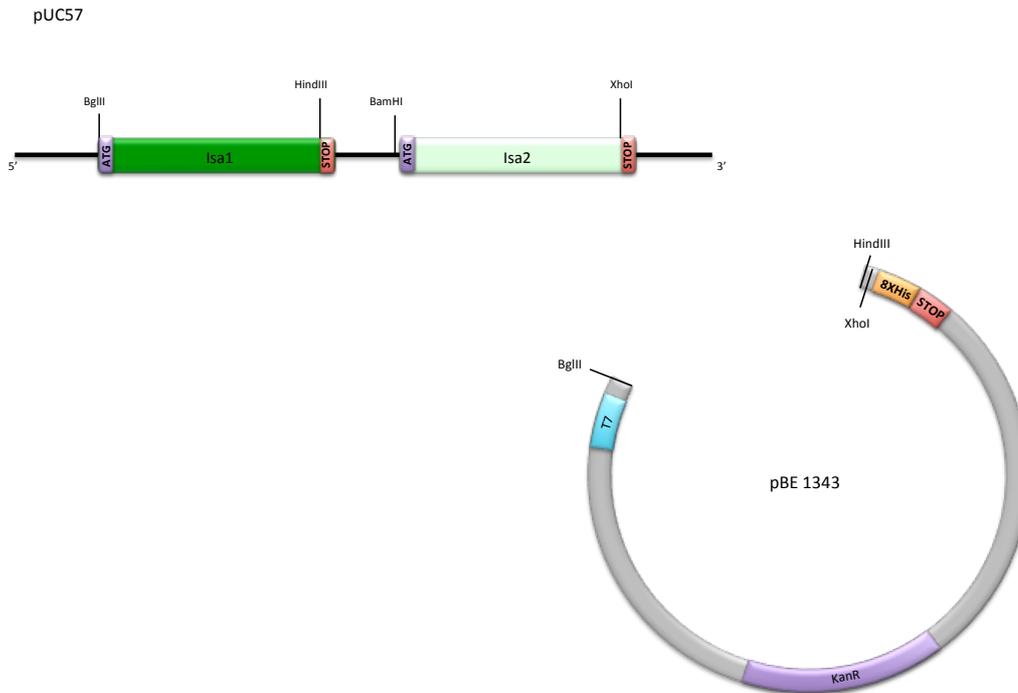
Les vecteurs pBIFC1 et pBIFC4 obtenus à l'Institut de Biologie des Plantes (Orsay-France) permettent le couplage de la protéine avec une partie de la YFP. (Azimzadeh *et al.*, 2008). La révélation de la proximité de deux protéines se fait par BiFC, en reconstituant une YFP fonctionnelle (Hu *et al.*, 2002).

- II. Figures supplémentaires en rapport avec la publication « Distinct functional properties of isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves ».

**Supplemental Table S1.** Curve Fitting to Calculated Sedimentation Equilibrium Distributions

Parameter	Predictions based on 85 kDa monomer				Optimal prediction: single component, 157.9 kDa
	Monomer	Dimer	Trimer	Tetramer	
Variance	$6.30 \times 10^{-4}$	$3.93 \times 10^{-5}$	$8.03 \times 10^{-4}$	$2.22 \times 10^{-3}$	$2.27 \times 10^{-5}$
St. Dev.	$2.51 \times 10^{-2}$	$6.27 \times 10^{-3}$	$2.83 \times 10^{-2}$	$4.71 \times 10^{-2}$	$4.76 \times 10^{-3}$
Quality	Poor	Good	Poor	Poor	Good

Supplemental Table: Sedimentation Equilibrium Correlations. Protein concentrations at equilibrium as a function of the square of the centrifuge cell radius, using assumed molecular masses of a single sedimenting species, were calculated using the Ultrascan Analysis software package (Demeler, 2005) for each of three protein concentrations and three centrifugation speeds. Variance and standard deviations between the calculated and measured protein concentration at each position in the cell were determined using the software. "Quality" indicates the overall fit between the calculated protein distribution for each model and the concentrations measured in the cell.



## AtISA1

ATGGCAAAGATCGTCGACGTAATGAAGCTGAAAATATCGCTGTTGTTGAAAAACCGCTGAAAATCGGACCGCTTCTTTA  
TCTCTGATGGTCTGCCGAGTCCGTTCCGGCCCGACCGTTCTGATGACGGTGTGAATTTTTCTGTTTATAGTACCAACTCT  
GTCAGTGCACGATTTGCTGATCTCCCTGTCAGACCTGCGCCAGAATAAAGTGACCGAAGAAATCAACTGGACCCGAG  
CCGTAACCGCACGGGCCATGTGTGGCAGTTTTTCTGCGTGGTGACTTCAAAGATATGCTGTACGGTTATCGCTTTGATG  
GCAATTCAGTCCGGAAGAAGGCCATTATTACGACAGCTCTAATATCCTGCTGGACCCGATGCAAAAGCTATTATCTCC  
CGTGATGAATTCGGCGTGCTGGGTCCGGATGACAACCTGCTGGCCGAGATGGCGTGTATGGTTCGACCCCGTGAAGAAGA  
ATTTGACTGGGAAGGTGATATGCACCTGAAACTGCCGCAAAAAGACCTGGTTATTACGAAATGCATGTCCGTGGCTTTA  
CCCGCCACGAAAGTTCAAAATCGAATTCCTCCGGGCACGTATCAGGGCGTGGCCGAAAAACTGGATCATCTGAAAGAACTG  
GGTATTAATTGCATCGAACTGATGCCGTGTACGAAATTCACGAACTGGAATACTACAGTTACAACACCATTCTGGGCGA  
TCATCGTGTAACTTTTGGGGTTACTCGACGATTGGCTTTTTTCAGCCCGATGATCCGTTATGCGTCTGCCTCATCGAACA  
ATTTTGCAGGCCGCGTATCAACGAATTCAAAATCCTGGTTAAAGAAGCGCATAAACGTGGTATTGAAAGTCATCATGGAT  
GTGGTCTGAATCACACCGCCGAGGGTAACGAAAAAGCCCGATCTTTTCTTCCGCGGCGTCGATAACAGTGTGTATTA  
CATGCTGGCGCCGAAGGTGAATTTTACAATTATAGCGGCTGCGGTAACACCTTCAATTGTAACCATCCGGTCTGCGTC  
AGTTTATCTGGATTGCCTGCGCTACTGGGTGACGAAATGCACGTTGACGGTTTTTCGTTTTCGATCTGGGCTCCATCATG  
TCACGCAGCTCTAGTCTGTGGGATGCGGCCAATGTCTATGGTGGGACGTTGAAAGCGATCTGCTGACCACGGGTACCC  
GATTAGTTGTCCGCGGTCATTGACATGATCTCCAACGATCCGATTTCTGCGTGGCGTGAAACTGATCGCAGAAGCGTGGG  
ATGCCGGCGGTCTGTACCAAGTGGGCATGTTTCCGATTTGGGGCATTTGGAGCGAATGGAATGGTAAATTTCTGTACGTT  
GTCCGCCAATTCATCAAAGGCACCGATGGTTTTTTCAGCGCGTTCGCCGAATGCCCTGTGTGGTTCGCCGAATCTGTATCA  
GGCGGTTCGCAAACCGTGGCATAGCATTAACTTTTATCTGCGCACACGACGGCTTCACCCTGGCTGATCTGGTACGTACA  
ACAATAAAAAACAATCTGGCAAATGGTGAAGAAAACAATGACGGCGAAAATCACAACCTATAGCTGGAACCTGTGGTGAAGAA  
GGCGATTTTGCTTCGATTAGCGTTAAACGTCTGCGCAAACGTCAGATGCGTAACTTTTCTGTTAGCCTGATGGTCTCTCA  
AGGCGTCCGATGATCTACATGGGTGACGAATATGGCCATACCAAAGCGGTAACAATAACACGTAAGTCCACGATAACT  
ACATGAACTACTTCCGCTGGGACAAAAAAGAAGAAGCGCATAGTGATTTCTTTTCGCTTTTGGCCTATTCTGATCAAATTC  
CGTGACGAATGTGAATCCCTGGGCTGAATGATTTTCCGACCGCGAAACGCTCTGCAGTGGCATGGTCTGGCACCAGGAAAT  
TCCGAACTGGTCCGAAACGAGCCGTTTTGTGGCTTCAGTCTGGTTCGATTCGCTGAAAAAAGAAATCTACGTGGCGTTCA  
ATACCTCCCATCTGGCCACGCTGGTTTTCACTGCCGAACCGTCCGGTTACCGTTGGGAACCGTTTTGTGGATACCTCTAAA  
CCGAGTCCGATGACTGTATTACCCCGGATCTGCCGGAACGTGAACCGGAATGAAACAGTATCGCCACTTTCTGGATGC  
TAATGTTTACCCGATGCTGTATATCTCTCAATTTATCTGCTGCTGTCGCCGATTAAAGATCCGA

## AtISA2

ATGGCACGCTGTTTACC GGCCGCAAAAACAAAATCAAAC TGGGTTTCGGAAACCCTGATGTTTACGCGCAAACGTTTCA  
TGGGTGATCTGGTGACCTCAGCGCTGCAGTCGTACCAATTTAGCAAATTTGCGCGTCCAAAACGTC AACTCGAACTGCGT  
GAAGCCCTGTCGAGCCGTCGCGCAGAAGCTGATGACCTGAAAAAGTTACCTCTTACAGTTTCCGTACGAAAGCGGGCGC  
CCTGGTCAAAGTGAAAGTTGAGAAAAACGTGAAAAATACAGCATTCTGGTCTATGTGTCTAGTCTGGAACGTGCCGGCG  
ATGACAAATCACGCTCTGGTTATGGTCTGGGGTGTGTACCGCTCTGATTCCCTCATGTTTTCTGCCGCTGGACTTCGAAAAAT  
TCGAGCCAGGATAGTCAAACCCATACCACGGAAACCACGTTTCGTTAAATCTAGTCTGTCCGAACTGATGCTGGGTCTGGA  
ATTTGATGGCAAAGAATCGCCGTTTTATCTGAGCTTCCACTGAAACTGGTTAGCGGTGACCCGGATGCCCAGGAA  
TGCTGACCCATCGCGACACGGATTTTTGCATTCGCGTTGGTTTTACC GGCCGTCACCCGCTGCCGCTGGGTCTGTCCCTCA  
GGCCCGGATGACGATTCTGGAATTTTTCTGTTTTTACGCGTTTCGAGCAGCAACGTGGTTCTGTGTCTGTACGACGATTC  
AACCACGGACAAAACCGGCGCTGGAAC TGGATCTGGACCCGATGTGAATCGCACCGGCGATGTTTGGCATGCCCTCAGTCG  
ACAACACGTGGGATTTTTGTTCGTTACGGTTATCGCTGCAAAGAAACCGCACACTCGAAAGAAGACGTGGATGTTGAAGGC  
GAACCGATTGTTCTGGACCCGTACGCTACGGTCGTGGGCAAATCCGTCTCACAGAAATATCTGGGTTCCGCTGAGCAAATC  
TCCGAGTTTTGACTGGGGTGAAGATGTGAGCCGAATATCCCGCTGGA AAAACTGCTGGTGTATCGTCTGAACGTTAAAG  
GTTTACC CAACATCGCTCTAGTAAACTGCCGTGCAATGTGGCAGGCACGTTTAGCGGGCTTGTCTGAAAAAGTCTCTCAC  
CTGAAAACCTGGGTACGAACGCCGTTCTGCTGGAACCGATTTTTAGCTTCTCAGAACAGAAAGGCCCGTACTTTCCGTT  
CCATTTCTTTAGCCGATGGATATCTATGGTCCGTGCAATAGCCTGGAATCTGCAGTCAACAGTATGAAAGTCAATGGTGA  
AAAAACTGCATAGCGAAGGTATTGAAGTTCTGCTGGAAGTTGTCTTTACCCACACGCGAGATTTCTGGTGTCTGCCGTGGC  
ATCGACGATTCCTCATATTACTATAAAAGCCGCGCAAATGACCTGGATTCTAAAAAGTTACCTGAATTGCAACTATCCGGT  
GGTTCAGCAACTGGTGTGGAAGCCTGCCGTTATTGGGTACCCGAATTCATGTGGATGGCTTTTGTTCATTAATGCGA  
GCAGCTGCTGCCGTGGTGTTCATGGTGAACAGCTGTCTGCCCGCCGCTGGTTGAAGCAATTGCTTTTGATCCGCTGCTG  
GCCGAAACCAAAC TGTATCGCCGACTGTTGGGACCCGCTGGAATGATGCCGAAAGAAGTGC GTTTCCCGCATTTGAAACG  
CTGGGCGGAACTGAACACCCGCTACTGCCGTAATGTCCGCAACTTTCTGCGTGGTCTGTTGGTGTGCTGAGCGATCTGGCAA  
CCCGCATTTGTGGCTCTGTGACGTTTTTACGGATGGCCGTGGTCCGGCTTTTAGCTTCAATATATTTCTCGCAACAGT  
GGCCTGTCCCTGGTTGATATCGTCTCCTTTTACGGTCCGGAAC TGGCCTCAGAACTGTCTGGAATTGCCGTGAAGAAG  
CGCGACCAACAAATCTGCCGTGCTGCAGCGTCGCCTGAAACAAATCCGTAATTTTCTGTTCATCCAGTACATCAGTCTGG  
GCGTTCGGCTCTGAACATGGGTGACGAATGTGGCATTCTCCACCCGTTGGTTCACCGCTGCTGGAAGCCGCAACCGTTT  
GATTGGAATCTGCTGGCGTCTGCCCTTCGGCACCCAGATTACGCAATTTATCTCGTTTCATGACACCGGTGCTGCCGCTCG  
CAGCGACTTTTTTACGCGTTCGCGATTTCTGAAACCGGAAATATTGTGTGGTATGCCAACGCAACCAACCGCGAAAT  
GGGAAGATCCGGCATCTAAATTTCTGGCTCTGGAATCAAATCGGAAAGCGAAGAAGAAGAAACCGCGAGTCTGGCCGAA  
CCGAATGAACCGAAATCCAACGACCTGTTTATTGGTTTTCAACGCGTCTGATCATCCGAAAGTGTCTGTGCTGCCGTCCCT  
GCCGGATGGCTCAAATGGCGTGCCTGGTGGATAACCGACTGCCGTTTTCCGGGCTTTTTTACGCGTTGAAGCGCAAACGG  
TTGTGCTGAAGAACCCTGCAGCAACTGGTGGTTTTATGAAATGAAACCGTACTCTTGACCCCTGTTGAAACCATCAAT  
ACCACCGCC

## ZmISA1

ATGGCTGAAGCAGTCCAAGCAGAAGAAGACGATGATGATGATGAAGAAGTGGCTGAAGAACGTTTTGCCCTGGGTG  
GTGCGTGCCGTGTGCTGGCGGGTATGCCGGCACCGCTGGGTGCAACCGCACTGCCGCGGCGGTGTCAACTTCGCTGTGTAT  
AGCTCTGGTGCCTCCGCGGCTCACTGTGTCTGTTTGC CCGGGCGACCTGAAAGCAGATCGTGTACC GAAGAAGTCCC  
GCTGGACCCGCTGCTGAATCGTACCGGTAACGTTTGGCATGCTTTATTACGGCGAC CAGTGCACGGTATCGTGTATG  
GTACCCGTTTTGATGGTGTTCGCCCGGAACGTGCCAAATATACGACGTTAGCAATGTGGTGTGCTGATCGTATGCT  
AAAGCCGTTGTTTTGCGCGGTTGAATATGGTGTTCGGCTCCGGCGGTAGCTGCTGGCCGAGATGGCGGGTATGATCCC  
GCTGCCGTACAACAAATTCGACTGGCAGGGTATCTGCCGCTGGGCTATCATCAAAAAGACCTGGTGATTTACGAAATGC  
ATCTGCCGTGGTTTTACCAAACACAATAGTTCCAAAACCAAACATCCGGGCACGTATATTGGCGCGGTGAGCAAAC TGGAT  
CACCTGAAAGAACTGGGCGTGAATTCATCGAACTGATGCCGTGTCATGAATTCACGAACTGGAATACTTCTCATCGAG  
CTCTAAAATGAACTTTTGGGGTACTCGACCATTAAC TTTTTCAGCCGATGGCAGCTATAGTTCCTCAGGCATTCGTG  
ATAGCGGTTGTGGCGGATCAACGAATTTAAAGCCTTCGTCCGCGAAGCACACAACCTGGCATTGAAGTATCATGGAT  
GTCGTGTTCAATCATACGGCCGAGGGTAACGAAAAAGCCCGATTTCTGTCTGTTTCCGCGGTATCGATAATAGCACCTATTA  
CATGCTGGCACCGAAAGGCGAATTTTATAATTACTCTGGTTGCCGCAACACGTTCAATTTGTAACCAACCCGGTTGTCCGCG  
AATTTATTGTGGATTGCCGTGCCGTTACTGGGTGACCGAAATGCATGTTGATGGTTTTTCGCTTCGACCTGGCGCTATCCTG  
ACGCGTGGCTGTAGTCTGTGGACCCGGTTAACGTCATGGTTCCGCGATGGAAGGCGATGATTACCACCGTACC CC  
GCTGGTTGCCCGCGCTGATTGATATGATCAGTAATGACCCGATTTCTGGGCAACGTGAAACTGATCGCCGAAGCATGGG  
ATGCCGCGGCTGTGATACCAGGTTGGTCAATTC CCGCATTTGGAATGTCTGGAGCGAATGGAACGGCAAATATCGCGACAC  
GTGCGTCAGTTTATCAAGGTTACGGATGGCTTTGCTGGTGCCTTCGCCGAATGCCGTGTGTGGTTCCGCCGAGCTGTATCA  
AGCAGGCGGTCGTAAACCGTGGCACAGCATTAATTTTGT TTTGCCGCCATGACGGCTTCACCC TGGCGGATCTGGTGACGT  
ATAATTCGAAATACAATCTGAGCAACGGTGAAGACAACCGGATGGCGAAAATCACAACCTGTCTTGAATTTGCCGCGAA  
GAAGGTGAATTTGCCCTCTCTGAGTGTGCGTGCCTGCGTAAACGCCAGATGCCGTAAC TTTTTCGTTGTCTGATGGTTAG  
CCAAGGTGTCCCGATGTTCTATATGGGTGACGAATACGGCCATACCAAAGGCGGTAACAATAACCGTACTGTCTATGATC  
ACTATGTGAATTACTTTCCGCTGGGACAAAAAGAAGAACAGTCGAGCGATCTGTATCGCTTTTGGCGTCTGATGACCAAA  
TTCCGCAAGAAGATGTGAATCGCTGGGTCTGGAAGATTTTCCGACGAGCGAACGCTCTGAAATGGCATGGCCACCAACCGGA  
AAAACCGACTGGTCGGAAGCTAGCCGTTTTGTTGCGTTACCATGAAAGATGAAACGAAAGCGAAATTTATGTGGCGT  
TTAACACCTCTCACCTGCCGTTGGTTGTGCGTCTGCCGGAACGAGTGGCTTCCGTTGGGAACCGGTGGTTGATACGGGT  
AAAGAAGCACCGTACGACTTCTGACCGATGGTCTGCCGACCGTGTGTGACCGTTTACCAGTCTCTCATTTCTGAA  
CAGTAACCTGTATCCGATGCTGAGCTACTCTAGTATTATCTGGTCTGCGTCCGGATGTGA

## ZmISA2

```

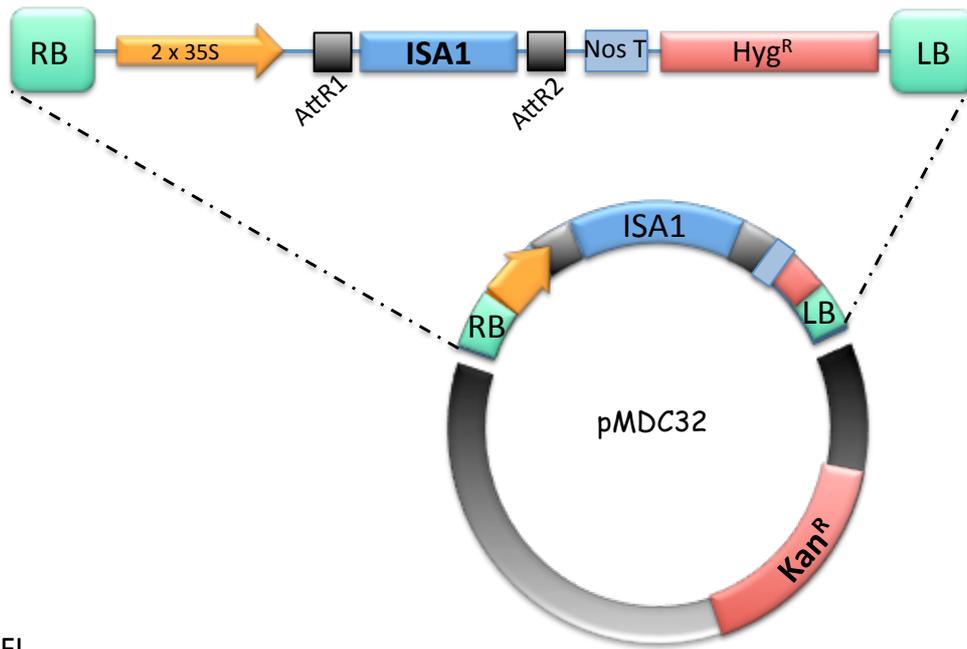
ATGGCAGCTGCGCGCAGTTATCGTTACCGCTTTCGTACCGATGACGATGGCGTCTGGATGTCGCGAGTGGCTGGCAAAG
ACGGTGATGCGGGCTATGTTGTCGCAATTGAAGCTCCGACCCACGGTCAGCGCGGCGGTCTGGTTCTGCGCCCGGCAGGT
TCTGGTGAAGGTGTTCCGCTGGCACCGGCACCGGGCGGTGCGCTGGTCGCCGAACTGTCTTATGACGTGGCGCGTGC
CCCGTTTACGTTTTCATTACCCCTGGCAGATGCTATGGGTGCGGAAATTCGCACCCATCGTGGCACGTCTTTTCGTGTTT
CGGTTGGTGTGGGTGCTGGTTGTCCTGCACCGCTGGGTCTGTCCAGTCAAAGATGGCGCTGCGAATTTTCGCTGTGTAC
AGCAAAATTGCGAAGGTATGTTTCTGTGCTGTTTGGCGGTGGCGGTGGCGATGGTCCGGCACTGGAAATCGAACTGGA
CCCGTATGTTACCGCACCGGTGATGTGTGGCATGTTTCTATGGAAGTGTGGAAGGCTATGCCCGCTACGGTTTCCGTT
CCGGCTGTTTGAATGTTCCGGCATTGATCGTCCGCTGCTGGACCCGATGCTAAAAGTTATCGGTGATTTTGTGCGGGC
GACAGCGTGGACGAAGATGGTCTGGCGGTGCCGTCCATTCGTTGCCCTGGCCTCACTGAAAAATGCACCGAACTACGATTG
GGCCCGGACAAAACATCCGTGTCTGCCGTGCAGAAACTGGTGGTTTATCGTGCAAACGTTGCTCTGTTTACCAAAGACC
GCTCCTCACGCTCTGGCTGATAATGCCCGCAGGCACGTTCTCCGGCATGTGACGCGAAAGTGGAAACATTTTCGCCACCTGGGT
GTCAACGCCGTGCTGCTGGAACCGGTGTTTCCGTTCCACCAAGTTAAAGGCCCGTATTTTCCGTACCATTCTTTAGCCC
GATGAGCCTGTATTCGAGCGAATGCTCTAGTGTGTCGCGATCAAATCAATGAAAGATATGGTTAAAACCATGCACCGCA
ATGGTATCGAAGTCTGCTGGAAGTCGTGTTTACCCATACGGCAGAAAGTGGCGCTGAATGTCAGATGATTAGCCTGCGT
GGTATCGACGGCTCCTCATATTACATTGCCGATGGTATCGCCGGCTGCAAAGCATCGGTCCGTAATTGTAACCAACCCGGT
GACCAAAAACTGATTCTGGATAGCCTGCGCCATTGGGTTCTGGATTTCACGTCGACGGCTTTTGTTCATTAATGCAC
CGTTTCTGGTGGTGGTCCGGGTGGCGAAGTCTGTCTCGTCCGCGTGTGGAAGCCATTGCCTTTGATCCGGTCTG
AGTAAAACCAAAATTCGCGAGACCCGTGGTCCCGCTGGATATCTCAAACGTGCAGTTTCCGTTCCCGATTGAAAACG
TTGGCGGAAATGAATACCCGCTTTTCTATGGATGTTTCGTAATTCCTGAAAGGTGAAGCCCTGATTTCTGACCTGGCAA
CGCGCTGTGTGGTAGTGGCGACCTGTTTACGAGCCGTGGCCCGGCTTTTCTTCAATTACGTGTCTCGCAACAGTGGC
CTGACCCTGGTTGACCTGGTCAGTTTTTCTAGTGTGAACTGGCTCCGAATTCATGGAACATATGGTGAAGAAGCCC
GAGTAAAATAACGCAGTTTTTCCAGACCCGCTGCGTCAAATCCATAATTTTCTGTTTCATCTGTTTCATCTCCCTGGGCA
TCCCGGTGCTGAATATGGGTGACGAATGCCGCAACTCAGCTGCGGGTTCGACCAGCTATAAAGATCGTGGCCTGCTGAAC
TGAAAAGCTCTGAAAACCGGTTTGTGAAAGAAGTTACGGGTTTTATCTCGTTCCTGAGCGCTCTGCGCAGCCGTGCGC
CGATATTTTTCAGCGTTGTGAATTCCTGAAACTGGAATAATCCACTGGTACGGCTCTGACCTGAGTGAACCGGTGCTGGG
AAGATCCGACCTCCAATTTTCTGTGTCTGCATATTAACGCGGAACTGGATGAAAACTGCCGGACTCAACGGGTGGCGAT
CTGTATATTTGCTTAAATGCCAACGAAGAATCTGCAAGTGCTACCCTGCGGGGATCGCCGAAGGTAGCATGTGGCTGCG
TCTGGTTGATACGTCCTGCGGTTCCCGGCTTTTTACGCGGTGGCAGCAGCCATGAAACCCACAGGTGCTGGGCTTTT
CGAGCTATCAAGTCAAAGCCATAGCTGCGTCTGTTGAAAGCAAACGTGCTCTGAGCC

```

### Supplemental Figure S1:

Top-panel: This picture exemplifies the construction of the vectors designed for expression in *E. coli*. ISA1 and ISA2 genes (from maize or Arabidopsis) optimized for expression in *E. coli* (see below) were synthesized in the form of an operon including START and STOP codons for each ORF and integrated in vector pUC57. From this vector, several constructions were made by transferring ISA1 or ISA2 or ISA1 and ISA2 into the destination vector pBE1343. ISA1 was transferred after digestion with BglII and HindIII and ISA2 was transferred after the digestion with BamHI and XhoI. In both case, the corresponding proteins were tagged with the 8xHis sequence (the STOP codon being placed downstream of the tag). The transfer of both ISA1 and ISA2 as an operon into pBE1343 was achieved by the digestion with both BglII and XhoI. In that case, only ISA2 was tagged with the 8xHis sequence.

Sequences of maize (Zm) and Arabidopsis (At) ISA1 and ISA2 structural genes optimized for expression on *E. coli* are shown from here, as it is included in the expression vector.



### AtISA1-FL

```

ATGGATGCAATCAAAATGCAGTCCAGTTTCCATCACACCAAGCTCAACACTCTCTCTCTAATCACACCTTTCCATAAAATCTCCGCTCCCAATTTCAAGCCCTCTCCGTCGGATTTCGATTTCCGCAAAGGACAGA
AGAAGCAACGAAGCTGAAAATATCCCGTAGTAGAGAAAACCTTAAATCAGATAGATTTTATCTCCGATGGACTTCTCTCCATTCCGACCCCGCTCAGAGACGACGGGTCAATTTCTCTGTACTACAAAC
TCCGTTTCCGCTACCATCTGCTTGTATTTCTCTCCGATCTCCGTCAGAACAAAGTGACGGAGGAGATTACAGTTGATCCATCAAGGAATAGAACTGGCCATGTTTGGCATGTGTTCTGAGAGGAGATTCAAAGATATG
TTGTATGGTTATAGATTTGATGGCAAGTTTCTCTGAAGAAGGTCATTATATGATTTCTCCCAATTTATTTGGATCTTACGCAAAAGGCAATTAAGCAGAGATGAGTTTGGAGTTTGGGACTGATGATAATTTG
TGGCCTCAAATGGCGTGTATGGTACCCTCTGAGGAAAGGTTTGGTTGGAAAGGGGATATGCATCTGAAGCTCCACAGAAAGATCTTGTATATATGAAATGCATGTGGGAGGTTTACAAAGGCATGAGTCTAGTAAA
ATTGAATCCCTGGCACATACCAGGGTGTGACAGAGAAGCTTGACCATTGAAGGAGCTGGGATAAATGTATAGAAATTAATGCCATGTCACAGATTTAATGAGCTGGATTTACAGCTACAATACGATTTGGGAGAC
CACAGGGTAAATTTTGGGGTACTCTACCATTTGGTTCTTCTCGCCATGATCAGATACGCATCAGCAAGCTCTAACAAATTTGCTGGACGAGCCATAAATGAAATCAAAATTTCTGTTAAGGAGGCACATAAACGAGGA
ATTGAGGTAAATCATGGATGTCGCTTTGAACACACAGCCGAGGGAATGAAAAGGGCCATTTTCTCATTAGAGGAGTTGATAACAGTGTCTATACATGCTGTCTCAAAGGGCGAGTTCTATAATTTATCAGGCTGT
GGTAATACATTCACATCACTCTGCTGGTGCATTAATCATATTTGGATGCTGAGATATTTGGTTACAGAAATGCATGTGACGGCTCCGCTTTGATCTTGGTCAATGTCGAAGGACGACAGCTTTGGGAT
CGAGCCATGTTACGGGGCTGATAGAAAGTGACTTGTCAACAATGTTACTCTTATAGCTGCCCTCCAGTAATGACATGATAAGTAATGATCCAATCTCCGGGGTGTAAAGCTAATAGCTGAAGCATGGGATGCG
GGTGGGCTGTACCAAGTTGGCATGTTTCCACACTGGGTAATTTGGTCTGAGTGGAAATGAAAAGTTTCGGGATGTTGAGACAGTTCATAAAAGGCACCGATGGCTTTTCTGGTCTTTTGTGAATGCTCTGTGGAAGC
CCAAATCTGTACAGGGAGGTAGGAAACCTTGGCACAGCATCAATTTATATGTCGCGATGATGGTTTTAGCTTGGCAGATTTAGTAACTTACACAATAAGATAACTTGGCAATGGGAAGAGATAATGATGGAGAG
AATCACAATACAGCTGGAATCTGGAGAGAGGAGACTTTGCGAGTATCTCGGTGAAGAGATAAGGAAACGACAGATGGGAAATTTCTTGTTCCTCATGGTTTCCCAAGTGTCCCAATGATTTACATGGGAGAT
GAATATGGCATACTAAAGGGGAAACACAACACTGATTTGCCATGACAATATATGAATATTTTCGGTGGGATAAAAGGAAGACACATTTGACTTCTTCAAGTCTGCGCTATTTCTATCAAGTTTCTGATGAA
TGTGAATCACTTGGCTTGAATGATTTCCCAACAGCAAAAGCGCTCGAGTGGCATGGCTTGTCTCTGAGATCCCAATTTGGTCTGAACAAGTGCATTTGTTGCAATTTCACTGGTGCATTTCTGTGAAGAAAGAAATCTAT
GTGGCCTCAACACACTCATTTAGCCACACTTTTTCCTACCGAATAGGCCAGGATACCGATGGAGCCATTTGTAGACACGACAAACCGGCCCTTACGACTGCATAACCCGGATCTCCAGAGAGAGAAACGGCG
ATGAGCAGTATAGGCATCTTATAGTCAAAATGTGTACCAATGCTCAGTTACTCATCCATCATTTCTCTTTCACCAATTAAGACCCCTGA

```

### ZmISA1-FL

```

ATGGATGCAATCAAAATGCAGTCCAGTTTCCATCACACCAAGCTCAACACTCTCTCTCTAATCACACCTTTCCATAAAATCTCCGCTCCCAATTTCAAGCCCTCTCCGTCGGATTTCGATTTCCGTCGGCCGAGGCG
GTGACGGCGGAGGAGGACGACGACGACGACGACGAGGAGGTTGGCCGAGGAGAGTTCCGCTGGCGGCGCTGCGGGGATGCGCGGCAATGCCCGCCGCTCGGCCCAACCGGCTCCGCGGGGTGCAACTTCGCC
GTCTACTCCGAGCGTCCCTCCGCGGCTGCTGTGCTTCCGCTCCCGGCGACCTCAAGGCGGATAGGGTGAACGAGGAGGTCGCCCTCGATCCCTGCTCAACCGAAGCGGAAACGTTGGCACGTTCTATCCACGGG
GACCACTGTGACGCGATGCTTACGGATACAGGTTGATGGGCTTTCCGCCCTGAGCGGGACAGTACAGATGTTGCTCAAGCTTGTGGTGGATCCATACGCTAAGGCAAGTGGTAAGCCGAGGTGAATATGTTGTCCT
CGCCCTGGTGGTGTGTTGGCTCAAATGGTGGTATGATCCCTCTCCCTATAAATGTTGATTTGGCAAGGTGACTTACCCTTGGGTACCATCAGAAGGACCTTGCATATGAAATGATTTGGCTGGATTCACA
AAGCAACTCAAGCAAGCAAAACCCAGGAACCTTACATTTGGTGTGTCAAAGCTTGACATCTAAAGGAACTTGGAGTGAAGTGTATAGAGCTAATGCCCTTGCATGAGTTCATGAGTCTAGCTTACGCTCC
TCTTCGAGATGACTTCTTGGGATPATTCCCAATAAATTTTCTCACCATGGCAAGATATTTCTCAAGTGGCATAGAGACTTGGATGTTGGTGCATTAAGCTAATGAAATTAAGCTTTTGTAAAGGGGCCCAAAACCG
GAAATTTAGGTGATCATGGATGTTTCTTCAATCATACAGCTGAAGGTAATGAGAAAGGCCAATATTTATCTTTPAGGGGATAGATAATGATACATACTACATGCTTGCACCTAAGGGAGAGATTTATATATTTCTGAT
TGTGAAATACCTTCAATGTAATCATCTCTGATGCTGTAATTTATGATGGATGCTTGAATACTGGTAAACAGAAATGCAATTTGATGTTTTCGTTTTCGACTTGCATCTATCTGACCAAGGATGCACTATATG
GATCCAGTTAATGTTATGGAATGCAATGGAAGGTGACATGATTCAGCAGGAGCACTTTTGTCCGCCCACTTATTCGACATGATAGCAATGACCAATTTTGGAAATGTCAGCTTATTTGTAAGATGGGAT
GCAGGAGTCTCTATCAAGTTGGTCAAGTTTCTCTACTGGAACGTTTGGTCAAGTGGAAATGGAAGATATCCGATACCGTGGCTCAGTTTCATCAAGGCACAGATGGATTTGCTGGTGTCTTGTGATGCTATGTGGA
AGTCCACAGTTATACAGGAGGGGGAGGAAAGCTTGGCACAGTATCAACTTTGTATGTGCACAGATGATTTACACTGGCTGATTTGGTCAATACAATAGCAAGTACAACTTGTCAAATGGTGAAGGACCAACAGAGAT
GGGAAAATCATAATCTTAGCTGGAATTTGGGGAGGAGGAGAAATTTGCAAGTGTGTCAGTCCGAAAGATTAAGGAAGGCAAAATGGCAATTTCTTTTGTGCTTATGTTTCTCAGGAGTTTCAATGTTCTACATG
GGGATGAAATGTTGTCACAAAGGGAGGAAACAACAATACGTACTGCCATGACCAATATGTCAAATATTTCCGTTGGGATAAAGGAAGGAAACAATCTCTGATTTGATACAGATTTCTGCGCTCATGACCAAAATCCCG
AAAGAATGTAATCTCTTGGCTTTGAGGACTTCCCGACTTCAGAACGTTGAAATGGCAGGCTCATCGCCGAGAAAGCTGACTGGTCAAGGCAAGCCGATTTGCTTGCCTTCAACATGAAAGGCAAAACCAAGGGCGAG
ATCTACGTCGCTTCAACACAGTCACTTCCGCTGGTGTGGGCTTCAGAGCGCTCTGGGTTCCGATGGGACCGCTGGTGGACACCGCAAGGAGGCAACATATGACTTCCACCGATGGCTGCCAGATCTGCT
GTCCAGCTTACAGGTTCTCACTTTCTCAACTCAATCTCTATCTACTCTCAGTACTCTCCATCACTGATTTGAGGCTGATGCTGA

```

### Supplemental Figure S3:

Map of the shuttle vector pMDC32 used for expression of the recombinant genes AtISA1-FL and ZmISA1-FL into *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* (AtISA1-FL) and maize (ZmISA1-FL) full length cDNA sequence of ISA1 gene (depicted above) were introduced between the right (RB) and left (LB) borders of the modified T-DNA and placed under the control of the strong and constitutive 2x35S promoter. The Nos T terminator sequence was placed downstream of ISA1 cDNA. Kan<sup>R</sup> is the selection marker for *E. coli* and *Agrobacterium tumefaciens* conferring resistance to kanamycin. Hyg<sup>R</sup> is the gene that confers resistance to hygromycin B to the transformed plants.

### III. Figures supplémentaires en rapport avec la seconde publication « Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the Zea mays leaf »

```

Phaseolus -----MKCFSLPSLSAPTFTTILPQCALTVRVSLANYRFSQLHETDS
Pea -----MYSLSPPHTTTTTSISHSTTHALINKTKLLELHNHNSRISIT
Arabidopsis -----MDAIKCSSSLFLHHTKLNTLFSNHTFPKISAPNFK
Poplar -----MNLLHSTSHSVHVLKFISQFRSTPKFCLLKRNVTSNLENFGSNL
Grape -----
Potato -----MELLHCPSISTYKPKLSFHNHLFSRRSSNGVDFESIWRKSRSS
Wheat -----MAKAPCLCARPSLAARTRRPGPGPAPRLRRWRPNATAGKGVGEV
Barley -----MKMMAMAEAPCLCARPFLAARAWRPGPAPRLRRWRPNATAGKGVGEV
Brachypodium -----MTIAAQVPCLCARPASLAGPRLGAARRRPNARTARGGARKGVGAVR
Rice MASLPHCLSARPLVVAAAPGRPGPGPWLRGGARRRNAAFSAGNAGRRVGLRRSVASAV
Maize -----MAQQLPCVSSPRLLAVPAGRWRAGVGRPNVAGLGRRLSLHAA

```

```

Phaseolus VIRTVARTRAARNGGAVDTETAVVEKPQLESLFQVSRGYASPFGATVRDGGVNFAIYSLN
Pea ISSKSNSNKTFAIGNRVGVETEIAVVEIHKPQFEVSRGFPSPFGATAQEDGVNFAIYSLN
Arabidopsis PLFRPISISAKDRRSNEAENIAVVEKPLKSDRFFISDGLPSPFGPTVRDDGVNFSVYSTN
Poplar FSNSTASISIKAARDGVDTAVVVEEEGPKLRKFQVFEGHSPFFGATVRDGGVNFAIFSAN
Grape ---MRFSKWVVAAVGSGAEAETVVVEKPKLQPFLVFEGCPAPLGATARDGVNFAVYSGN
Potato VVNAAVDSGRGGVVKTAATAVVVEKPTTERCRFEVLSGKPLPFGATARDGVNFAVFSRN
Wheat CAAVVEVATKAEDE-GEDEPVAEDRYALGGACRVLAGMPTPLGATALAGGVNFAVYSSG
Barley CAAVEAATKAEEEEDEEEPVAEDRYALGGACRVLAGMPTPLGATALAGGVNFAVYSSG
Brachypodium AAALEAQPLVEEGEDEDEEALVEVERHALGGACRVLAGMPTPLGATALAGGVNFAVYSSG
Rice EVGVGEDEEGVEEEEVEVAVMPERYALGGACRVLAGMPTPLGATALDGVNFAVYSSG
Maize AARPVAEAVQAEEDDDDDDEEVAEERFALGGACRVLAGMPTPLGATALRGVNFAVYSSG

```

```

: * . * : * . * . * * * : * . * * * : * .

```

```

Phaseolus AFSATLCLFTLSDFQNNRVTESVPLDPLINKTGGIWHVFLKG-DFSDMLYGYKFDGKFSP
Pea AHSATLCLFTLSDFKNNKVTEYIALDPLVNKTGCVWHVFLKG-DFKDMLYGYKFDGKFSP
Arabidopsis SVSATICLISLSDLRQNKVTEEIQLDPSRNRTGHVWHVFLRG-DFKDMLYGYRFDGKFSP
Poplar AVSATLCLISLSDLPENRVTEQFFLDPLNKTGDVWHVFLKG-DFKDMLYGYKFDGSFSP
Grape AVSATLCLISASDLEDRVTEQISLDPLNKTGDVWHVFLKG-NFENIVYGYKFDGKFSP
Potato ATAATLCLITLSDLPEKRVTEQIFLDPLANKTGDVWHVFLKG-DFENIVYGYKFDGKFSP
Wheat ATAAALCLFTPEDLKADRVTEEVPLDPLMNRTGNVWHVFIEG-ELQDMLYGYRFDGTFAP
Barley ATAAALCLFTPEDLKADRVTEEVPLDPLMNRTGNVWHVFIEG-ELHGMLYGYRFDGTFAP
Brachypodium ATAAALCLFTPDDLKADRVTEEVPLDPEANRTGNVWHVFIEGHLHDMLYGYRFDGAFAP
Rice ASAASLCLFTPDDLEADEVTEEVPLDPLFNRTGNVWHVFIEG-ELHNMLYGYRFDGMFAP
Maize ASAASLCLFAPGDLKADRVTEEVPLDPLLNRTGNVWHVFIHGDQLHGMLYGYRFDGVFAP

```

```

: * : * * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

```

Phaseolus LEGHYDSSRIVLDPYAKAVISRGEFGALGPNGCWPQMAGMVPSDHDEFDWEGDLPLKY
Pea QQGHYYDSSRVLLDPYAKAVISRGEYGAVGLDGCWPQMAGMVPFDPEEFDWEGDLPLKY
Arabidopsis EEGHYDSSNILLDPYAKAVISRDEFGVLGPDDNCWPQMACMVPTREEEFDWEGDMHLKL
Poplar EEGHYDPSQIVLDPYAKAVISRGDFGVLGSDDNCWPQMACMIPTADDKFDWEGDSLLKY
Grape EEGHYDSSRLLLDPYAKAVISRGEFGILGPEGNCWPLMAGMIPSSDAEFDWEGDLPLKY
Potato EEGHYDSSQIVLDPYAKAVISRGEYGVLGPEDDCWPQMAGMVPSASDQFWEGDLPLKY
Wheat HCGHYLDVSNVVVDPYAKAVISRGEYGVPARGNNCWPQMAGMIPLPYSTFDWEGDLPLRY
Barley HCGHYFDVSNVVVDPYAKAVISREYGVPAHNNCWPQMAGMIPLPYSTFDWEGDLPLRY
Brachypodium HCGQRFDASNVVVDPYAKAVISRGEYGVPAPGGECWPQMAGMIPLPYSTFDWQGDLPLRY
Rice HCGQYFDVSNVVVDPYAKAVISRGEYGVPGPGGDCWPQMAGMIPLPYSTFDWQGDLPLRY
Maize ERGQYYDVSNVVVDPYAKAVISRGEYGVPAPGGSCWPQMAGMIPLPYNKFDWQGDLPLGY

```

```

* : * * : * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

```

Phaseolus PQKDLVYEMHVRGFTKHESSNTKFPGTYLGVVEKLDHLKELGVNCLELMPCHEFNELY
Pea PQKDLIIYEMHVRGFTKHESSKTEFPGTYLGVVEKLDHLTELGVNCIQLMPCHEFNELY
Arabidopsis PQKDLVIYEMHVRGFTRHESSKIEFPGTYQGVAEKLDHLKELGINCIELMPCHEFNELY
Poplar PQRDLIYEMHVRGFTQHESSRTEFPGTYLGVVEKLGHLKELGVNCIELMPCHEFNELY
Grape PQKDLIIYEMHVRGFTRHESSRTKFPGTYHGVVEKLDHLKELGVNCIELMPCHEFNELY
Potato PQRDLVIYEMHVRGFTNHESSETKYPGTYLGVVEKLDHLKELGVNCIELMPCHEFNELY
Wheat PQKDLVIYEMHLRGFTKHSSNVEHPGTFIGAVSKLDYLKELGVNCIELMPCHEFNELY
Barley PQKDLVIYEMHLRGFTKHSSNVEHPGTFIGAVSKLDYLKELGVNCIELMPCHEFNELY
Brachypodium PQKDLVIYEMHLRGFTKHSSNVKHPGTFIGAVSKLDYLKELGVNCVELMPCHEFNELY
Rice PQKDLVIYEMHLRGFTKHSSNVEHPGTYIGAISKLDYLKELGVNCVELMPCHEFNELY
Maize HQKDLVIYEMHLRGFTKHSSSKTKHPGTYIGAVSKLDHLKELGVNCIELMPCHEFNELY

```

```

* : * : * * * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *

```

Phaseolus SSYNSVQGDYRVNFWGYSTINFFSPMIRYSSAGIRNCGRDGINEIKFLIKEAHKRGIEVI  
Pea YSYNAVQGDYRVNFWGYSTINFFSPMIRYSSAGTQNCGRDGINEIKFLIKEAHKRGIEVI  
Arabidopsis YSYNTILGDHRVNFYGYSTIGFFSPMIRYASASSNNFAGRAINEFKILVKEAHKRGIEVI  
Poplar YDYNSVFGDYKVNFWGYSTVNYFSPMTRYSSAGTLNCGHDAINEFKLLVREAHKRGIEVF  
Grape FSYNSVLDDYRVNFWGYSTVNYFSPMIRYSSAGIHNCGHDAINEVKLLIREAHKRGIEVL  
Potato YSYNSVLGDYKVNFWGYSTVNFSPMGRYSSAGLSNCGLGAINEFKYLKVEAHKRGIEVI  
Wheat STSS-----SKMNFWGYSTINFFSPMTRYTSGGIKNCGRDAINEFKTFVREAHKRGIEVI  
Barley ATSS-----SKMNFWGYSTINFFSPMTRYTSGGIKNCGRDAINEFKTFVREAHKRGIEVI  
Brachypodium FTSS-----SKMNFWGYSTINFFSPMTRYASGGINNCGRDAINEFKTFVREAHKRGIEVI  
Rice FSCS-----SKMNFWGYSTINFFSPMIRYSSGGIRNCGRDAINEFKTFVREAHKRGIEVI  
Maize FSSS-----SKMNFWGYSTINFFSPMARYSSSGIRDSGCGAINEFKAFVREAHKRGIEVI  
: \*\*\*\*\*:.:\*\*\*\* \*.\*. . : . .\*\*\*.\* :.:\*.\*\*\*\*\*:

Phaseolus MDVVFNHTAEGNEDGPIISFRGVDNSIYYMVAPKGEFYNSGCGNTFNC SHPVVRQFIVD  
Pea MDVVFNHTAEGNEKGPISFRGVDNSVYYMVAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRKFIVD  
Arabidopsis MDVVLNHTAEGNEKGPISFRGVDNSVYYMLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFILD  
Poplar MDVVFNHTAEGNERGPILSFRGVDNSVYYMLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFILD  
Grape MDVVFNHTAEGNENGPILSFRGVDNSVYYMLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFILD  
Potato MDVVFNHTAEGNENGPILSFRGIDNSVFYTLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFIVD  
Wheat LDVVFNHTAEGNENGPILSFRGVDNTTYMYLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFIVD  
Barley LDVVFNHTAEGNENGPILSFRGVDNTTYMYLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFIVD  
Brachypodium LDVVFNHTAEGNENGPILSFRGIDNSTTYMYLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFIVD  
Rice MDVVFNHTAEGNEKGPILSFRGIDNSTTYMYLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFIVD  
Maize MDVVFNHTAEGNEKGPILSFRGIDNSTTYMYLAPKGEFYNSGCGNTFNCNHPVVRQFIVD  
:\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*:\*\*:\*:\*\*\*: \* :\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.:.\*:\*\*:\*:\*

Phaseolus CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRSSSLWDATNVFGAPIEGDLLTTGTPLGSPPLIDLIS  
Pea CLRYWVAEMHVDGFRFDLASIMTRGSSSLWNGVNVFGTPIEGDMLTIGTPLSSPPLIDMIS  
Arabidopsis CLRYWVTEMHVDGFRFDLGSIMSRSSSLWDAANVYGADVEGDLLTTGTPI SCPPVIDMIS  
Poplar CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRSSSLWDVAVNVFGSPIEGDLVTTGTPLGSPPLIEMMS  
Grape CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRGSSSLWDALNVYGNPAEGDSLTTGTPLSSPPLIDMIS  
Potato CLRYWVTEMHVDGFRFDLASILTRSSSSWNAVNVYGN SIDGDVITTTGTPLTSPPLIDMIS  
Wheat CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRGSSSLWDPVNVYGAIEGDMITTTGTPLVTPPLIDMIS  
Barley CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRGSSSLWDPINVYGAIEGDMITTTGTPLVTPPLIDMIS  
Brachypodium CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRGSSSLWDPVNVYGDQIEGDMITTTGTPLVTPPLIDMIS  
Rice CLRYWVTEMHVDGFRFDLASIMTRGCSLWDPVNVYGSPVEGDMITTTGTPLATPPLIDMIS  
Maize CLRYWVTEMHVDGFRFDLASILTRGCSLWDPVNVYGSPMEGDMITTTGTPLVAPPLIDMIS  
\*\*\*\*\* \*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*:\*.\*. \* : \*\*:\* :\*\* \* \*\*\*: \*\*\*:\*\*:\*:\*

Phaseolus NDPILRGVKLIAEAWDAGGLYQVGTFFPHWGIWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
Pea NDPILRGVKLIAEAWDAGGLYQVGIFFPHWGIWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
Arabidopsis NDPILRGVKLIAEAWDAGGLYQVGMFFPHWGIWSEWNGKFRDVVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
Poplar NDPILRDVKLIAEAWDAGGLYQVGMFFPHWHIWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
Grape NDPILRGVKLIAEAWDAGGLYQVGMFFPHWGLWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
Potato NDPILRGVKLIAEAWDCGGLYQVGMFFPHWGIWSEWNGKYRDMVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
Wheat NDPILGGVKLVAEAWDAGGLYQVGFPHWNVWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAGGFAEC  
Barley NDPILGGVKLVAEAWDAGGLYQVGFPHWNVWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAGGFAEC  
Brachypodium NDPILGGVKLVAEAWDAGGLYQVGFPHWNVWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAGGFAEC  
Rice NDPILGDKLVAEAWDAGGLYQVGFPHWKIWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAGGFAEC  
Maize NDPILGNVKLVAEAWDAGGLYQVGFPHWNVWSEWNGKYRDTVRQFIKGTDFGAFAGFAEC  
\*\*\*\*\* .\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* :\*\*\*\*\*:\* \*\*\*\*\*:\*\*\*:\*.\*\*\*\*

Phaseolus LCGSPNLYQGGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYTNKHNLSNGEDNNDGENHNNSWNC  
Pea VCGSPSPLYQGG-RKPWNSINLVCAHDGFTLADLVITYNSKHNL PNGEDNNDGENHNNSWNC  
Arabidopsis LCGSPNLYQGG-RKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNL LANGEENNDGENHNNSWNC  
Poplar LCGSPGLYQEGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNEKHNL LANGEDNNDGENHNNSWNC  
Grape LCGSPNLYQEGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNL LANGEENNDGENHNNSWNC  
Potato LCGSPNLYQKGGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNL LANGEDNNDGENHNNSWNC  
Wheat LCGSPHLYQAGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNYLPNGENNRDGENHNLSWNC  
Barley LCGSPQLYQAGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNYLPNGEDNDRDGENHNLSWNC  
Brachypodium LCGSPHLYQAGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNYLPNGENNRDGENHNLSWNC  
Rice LCGSPHLYQAGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNKNYNSNGEDNDRDGENHNLSWNC  
Maize LCGSPQLYQAGGRKPWNSINFVCAHDGFTLADLVITYNSKYNLSNGEDNDRDGENHNLSWNC  
:\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*:\*\*:\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*. \* \* .\*\*\*:\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*

Phaseolus GQEGEFVSTSVKCLRKRQMRNFLSLMVSQGVPMIYMGDEYGHKGGNNNTYCHDNYLNY

```

Pea GEEGEFVSASVKKLRKRQMRNFFLSLMVVSQGVPMIHMGYEYGHYTKGGNNNTYCHDNYLNY
Arabidopsis GEEGDFASISVKRLRKRQMRNFFVSLMVVSQGVPMIYMGDEYGHYTKGGNNNTYCHDNYMNY
Poplar GQEGELASISVKKLRKRQMRNFFLCLMVVSQGVPMIHMGYEYGHYTKGGNNNTYCHDNYINY
Grape GQEGEFASISVKKLRKRQMRNFFLCLMVVSQGVPMIYMGDEYGHYTKGGNNNTYCHDNYMNY
Potato GEEGEFASIFVKKLRKRQMRNFFLCLMVVSQGVPMIYMGDEYGHYTKGGNNNTYCHDNYINY
Wheat GEEGEFARLSVKRLRKRQMRNFFVCLMVVSQGVPMFYMDEYGHYTKGGNNNTYCHDSYVNY
Barley GEEGEFARSSVKRLRKRQMRNFFVCLMVVSQGVPMFYMDEYGHYTKGGNNNTYCHDSYVNY
Brachypodium GEEGEFARLSVRRLRKRQMRNFFVCLMVVSQGVPMFCMGDEYGHYTKGGNNNTYCHDHYVNY
Rice GEEGEFAGLSVKRLRKRQMRNFFVSLMVVSQGVPMFYMDEYGHYTKGGNNNTYCHDHYVNY
Maize GEEGEFASLSVRRLRKRQMRNFFVCLMVVSQGVPMFYMDEYGHYTKGGNNNTYCHDHYVNY
*:*:*:. . *:*:*****:*:.*****: ** *****:* **

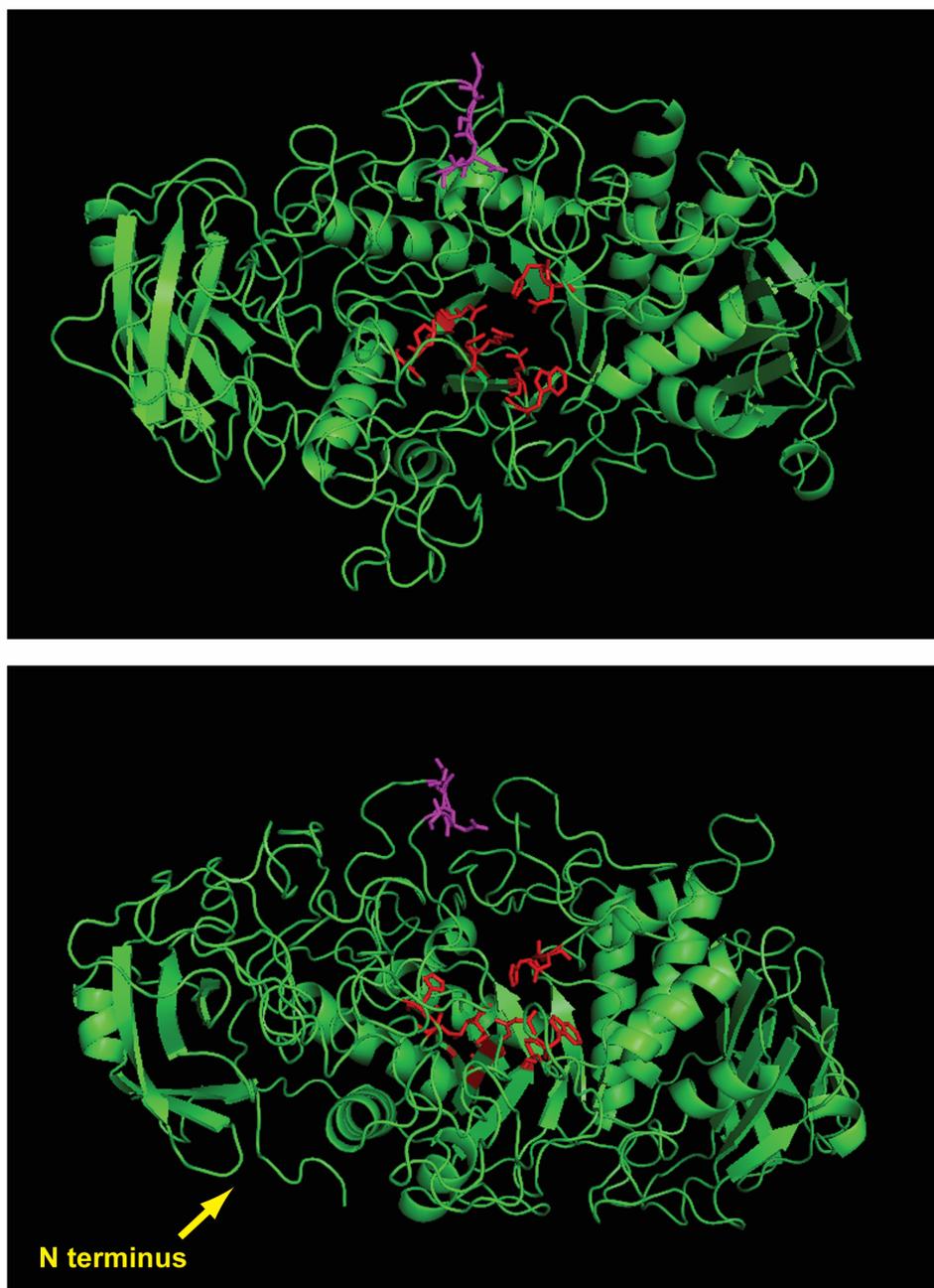
Phaseolus FQWDKKEESSDFFRFCCLVTKFRQECESLGLDDFPTSERLQWHGHFPGMPDWSETSRFV
Pea FQWDKKEESSDFFRFCSLLIKFRQECESLGLDDFPTSERLQWHGHLFPVTPDWSETSRFV
Arabidopsis FRWDKKEEAHSDFFRFRCRILIKFRDECESLGLNDFPTAKRLQWHGLAPEIPNWSETSRFV
Poplar FWWDKKEESSDFFRFRCRLMTKFRHECESLGLNDFPTAERLQWHGHAPGTPDWSETSRFV
Grape FRWDKKEESLSDFFRFCCLMKFRQECESLGLNDFPTAERLQWHGRTPGMPDWSETSRFV
Potato FRWDKKEESSDFFLRFCCLMTKFRHECESLGLDGFPTAERLQWHGHTPRTPDWSETSRFV
Wheat FRWDKKE-QYSDLHRFCCLMTKFRKECEGLGLEDFPTAERLQWHGHQPGKPDWSENSRFV
Barley FRWDKKE-EHSDLHRFCCLMTKFRKECEGLGLEDFPTAERLQWHGHQPGKPDWSEKSRFV
Brachypodium FRWDKKE-QSSDLHRFCCLMTKFRKECECLALEDPTAERLQWHGHEPGKPDWSETSRFV
Rice FRWDKKE-ESSDLQRFCSLMTKFRKQCESLGLADFPPTAERLQWHGHQPGKPDWSETSRFV
Maize FRWDKKEEQSSDLRFRCLMTKFRKECESLGLDFPTSERLQWHGHQPGKPDWSEASRFV
* ***: **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:* **:*

Phaseolus AFTLVDSVKGEIYVAFNMSHLPFTITLPERPGYRWEPLVDTSKPIPFDFLTPDLPRDIA
Pea AFTLVDSVKGEIYIAFNNTSHLPFTVTLPERPGYRWEPLIDTSKSAPYDFLTPDLPRDIA
Arabidopsis AFSLVDSVKGEIYVAFNNTSHLATLVSLPNRPGYRWEFPVDTSKPSPYDCITPDLPERETA
Poplar AFTLIDSVKREIYIAFNASHLSVTITLPERPAYRWEPLVDTGKPAFPDFLSGDLPERDTA
Grape AFTMVDVSVKGEIYVAFNASHLPVITLPERPGYRWPVDTGKPAFPDFLSNDVPERDTA
Potato AFTLVDKVKGELYIAFNASHLPVITLDRPGYRWPVDTGKPAFPDFLTDVPERETA
Wheat AFSMKDERQGEIYVAFNNTSHLPAVVELPERTGRRWEPVVDTGKPAFYDFLTDLDRALT
Barley AFSMKDETKGEIYVAFNNTSHLAAVVELPERIGHRWEPVVDTGKPAFYDFLTDLDRALT
Brachypodium AFSMKDETKGEIYVAFNASHLPVVALPERTGCRWEPVVDTGKPAFYDFLTDLDRHAFS
Rice AFSTKDETKGEIYVAFNASHLPVAVGLPERPGYRWEPLVDTGKPAFYDFLTDLDRAHA
Maize AFTMKDETKGEIYVAFNNTSHLPVVVGLPERSGFRWEPVVDTGKEAPYDFLTDGLPDRAVT
**:* *:. *:*:*** ***. : **:* . **:*:***. **:* **:*: **:* * :

Phaseolus IQQYAHFLDANMYPMLSYSIIILLRTPDQNA-----
Pea IQQYAHFLDVNMYPMLSYSIIILLRTPDVNA-----
Arabidopsis MKQYRHFLDANVYPMLSYSIIILLSPKIDP-----
Poplar MKQYSHFLEANLYPMLSYSIILVLLPVDNAYESSKPP
Grape VKQYSQFTEANLYPMLSYSIILLCPVDENA-----
Potato AKQYSHFLDANQYPMLSYSIILLSSADDA-----
Wheat IHQFSHFLNSNLYPMLSYSIVLVLRPDV-----
Barley VQQFSHFLNSNLYPMLSYSIVLVSRPDV-----
Brachypodium IHQFSHFLSSSLYPMLSYSIILVSRPDV-----
Rice VHLFSHFLNSNLYPMLSYSIILELQPD-----
Maize VYQFSHFLNSNLYPMLSYSIILVLRPDV-----
: :* . . *****:*:** .

```

Supplemental Figure S1: Alignment of ISA1 full-length primary sequences from monocots (red text) and dicots (blue text). Genbank references are as follows: Maize, ACG43008; Rice, ACY56095; Wheat (*Triticum aestivum*), CAC82925; Barley (*Hordeum vulgare*), AAM46866; *Brachypodium distachyon*, XP\_003572394; *Arabidopsis*, AEC09752; Poplar (*Populus trichocarpa*), EEF03224; *Phaseolus vulgaris*, BAF52941; Grape (*Vitis vinifera*), XP\_002265964; Potato, AAN15317; Pea (*Pisum sativum*), AAZ81835. Asterisks indicate conservation in all 11 species and colons indicate conservative substitutions. Plastid transit peptides known directly or predicted by the ChloroP algorithm are indicated in green text. Bold red or blue text within sequences indicates amino acids that are conserved specifically in monocots or dicots, respectively.



Supplemental Figure S2: Structure of *Pseudomonas amyloclavata* isoamylase with regions of homology to maize ISA1 noted. Residues marked in red are conserved in the active site of essentially all members of the  $\alpha$ -amylase superfamily (CAZy group GH13). Residues marked in magenta are located in the alignment between maize ISA1 and *P. amyloclavata* isoamylase at the position of the four consecutive Ser residues that are specific to monocots and absent in dicots. The structures are shown rotated approximately 45° relative to each other. The acid-rich region specific to monocots is located at the N terminus, which is not represented in the *P. amyloclavata* protein.