

Université Lille 1 Sciences et Technologies

-

Ecole Doctorale Biologie-Santé

DOCTORAT

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

FINDINIER Justin

La génétique formelle : un outil puissant pour la
dissection de la dégradation de l'amidon chez
Chlamydomonas reinhardtii

Dirigée par le Dr David DAUVILLEE

Soutenue le 29 Septembre 2015

Jury :

D'HULST Christophe, Professeur de l'Université Lille 1	Président
LI-BEISSON Yonghua, Chargée de Recherche CEA Cadarache	Rapporteur
MOUILLE Grégory, Directeur de Recherche INRA Versailles	Rapporteur
SCHRODA Michael, Professeur de l'Université de Kaiserslautern	Examineur
DAUVILLEE David, Chargé de Recherche CNRS UGSF	Examineur

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à l'attention du Docteur David Dauvillée. Merci d'avoir bien voulu m'encadrer depuis le M2. Malgré les embuches, tu auras toujours su garder un œil sur mes activités.

Merci au Docteur Yonghua Li-Beisson et au Docteur Grégory Mouille qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, merci pour le temps que vous voudrez bien y consacrer.

Merci au Professeur Michael Schroda qui a également accepté d'examiner le résultat de ces trois années de thèse. En espérant que nos démarches entreprises en vue d'une future collaboration soient couronnées de succès.

Merci au Professeur Christophe D'Hulst de bien vouloir assurer la présidence de ma thèse mais aussi de m'avoir accepté en tant que pièce rapportée suite à l'arrivée de David dans l'équipe.

Merci au Professeur Claire Remacle, membre du jury de mes comités de suivi de thèse et qui m'aura accueilli une semaine au sein de son laboratoire de Liège. Merci également à tous les thésards/post-docs du laboratoire de Génétique des Micro-organismes pour leur accueil chaleureux.

Second remerciement au Docteur Yonghua Li-Beisson qui avait également accepté de faire partie de mon jury de CST.

Merci au Docteur Gilles Peltier de m'avoir accueilli dans son laboratoire à Cadarache. Merci à Stéphan et Jean-Pierre pour leur aide, merci à Geneviève et son mari pour leur accueil.

Merci à Thierry Duchêne ! Merci pour toutes les tétrades qu'on t'aura fait disséquer et pour les litres et les litres de milieux de culture que je t'aurais commandés.

Merci au personnel du service financier, notamment Nadège et Yvon pour leur disponibilité lors de l'organisation de mes missions, CST et de cette thèse.

Merci à mon ami Mathieu. Nos chemins ne se seront pas séparés depuis la L2 et c'est tant mieux. Merci de m'avoir fait sortir de mon trou quelques soirées même si tu aurais sûrement préféré que celles-ci soient plus nombreuses ! Merci également pour ces quelques bières qu'on aura partagées après ces journées harassantes.

Merci à Hande avec qui on aura pu se soutenir mutuellement lorsque nous étions tous les deux thésards de David !

Merci à Derifa. Merci pour ton soutien et ton écoute au cours de mes pauses de rédaction.

Merci à l'équipe de Génétique Microbienne où j'aurais effectué le plus gros de ma thèse. Merci à Steven Ball pour m'avoir accepté dans l'équipe. Merci à Christophe Colleoni, Catherine Ball et Maria-Cecilia Arias pour leur bonne humeur au jour le jour.

Merci à l'équipe de Glycobiologie Végétale pour leur accueil au cours de cette dernière année. Merci à Fabrice Wattebled, Xavier Roussel, Adeline Courseaux et Monika Morchen (pour ses gâteaux). Vous aurez su faire en sorte de maintenir une ambiance favorable à mon intégration.

Merci à Nicolas Szydlowski également pour son aide sur cette fin de thèse et pour avoir su garder la pêche lorsque je commençais à perdre mes nerfs.

Merci à tous les M2, thésards et post-doc que j'aurais côtoyés, Ugo, Sylvain, Laura, Maud, Malika, Adeline et Binqan pour tous les bons moments qu'on aura pu partager, que ce soit autour d'un café, lors d'une pause parfois très allongée dans l'après-midi, lors d'une séance d'apprentissage linguistique enrichissante ou même à la paillasse.

Merci également à toutes les personnes de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle qui auront pu m'apporter de l'aide au cours de ces quatre années.

Merci à mes parents sans qui je n'en serais peut-être pas arrivé là ou en tout cas pas si vite. Merci à ma sœur Juliette et à mon frère Simon. Ce n'est pas des choses que l'on a l'habitude de se dire dans la famille, mais je vous aime.

Merci finalement à Olivia. Tu m'auras supporté et soutenu tout au long de ces huit années d'études. Merci pour avoir enduré les moments très nombreux où je perds un peu les pédales à la maison. Merci pour la participation que tu auras apporté à la vérification de ce manuscrit. Je t'aime !

Abbreviations

3-PGA: 3-PhosphoGlyceric Acid
ADN: Acide DéoxyriboNucléique
ADP: Adénosine DiPhosphate
AMP: Adénosine MonoPhosphate
AMPKK: AMP Kinase Kinase
AMY: α -Amylase
ARN: Acide RiboNucléique
ATP: Adénosine TriPhosphate
BAM: β -Amylase
BE: Branching Enzyme
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CBM: Carbohydrate Binding Module
CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DMSO: DiMéthylSulfOxyde
DPE: DisProportionating Enzyme
DSP: Dual Specificity Phosphatase
DTT: 1,4-DiThio-DL-Thréitol
EDTA: EthyleneDiamineTetraAcetic acid
Fru6P: Fructose-6-Phosphate
G1P: Glucose-1-Phosphate
G6P: Glucose-6-Phosphate
GBSS: Granule Bound Starch Synthase
GWD: Glucan Water Dikinase
h: heures
HSA: High Salt Acetate
H XK: Hexokinase
IFMAS: Institut Français des Matériaux Agro-Sourcés
ISA: Isoamylase
LDA: Limite Dextrinase
LSF: Like Sex Four
MEX: Maltose Exporter
min: minute
MT: Mating Type
NAD: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
PAB: acide Para-AminoBenzoïque
pb: paire de base
Pi: Phosphate inorganique
PGI: PhosphoGlucolSomérase
PGM: PhosphoGlucolMutase
PWD: Phosphoglucan Water Dikinase
rpm: Révolution Par Minute
sec: secondes
SDS: Sodium Dodécyl Sulfate
SEX: Starch Excess
SnRK: SNF1 Related Kinase
SS: Starch Synthase
TAP: Tris Acetate Phosphate
TMP: Tris Minimal Phosphate
TPT: Triose Phosphate Translocator
UDP: Uridine DiPhosphate

Résumé

Alors que les études effectuées sur la biosynthèse de l'amidon ont permis, depuis une vingtaine d'années, une compréhension approfondie de ce mécanisme, les travaux sur la dégradation sont aujourd'hui assez peu développés et restreints essentiellement au modèle de l'amidon transitoire chez *Arabidopsis thaliana* chez qui une approche de génétique inverse est mise en œuvre. Dans ce contexte, nous avons entrepris une démarche complémentaire de génétique formelle chez *Chlamydomonas reinhardtii*, organisme modèle permettant l'étude du métabolisme de l'amidon transitoire et de réserve, dans le but d'identifier de nouvelles fonctions notamment impliquées dans la régulation du processus catabolique. L'application d'un crible à l'iode en deux étapes a permis l'isolement de 62 souches potentiellement déficientes pour la dégradation de l'amidon parmi plus de 32000 transformants. L'identification des gènes touchés a mis en évidence des fonctions déjà caractérisées chez le modèle *Arabidopsis*, telles que les protéines Mex, Bam1 et Dpe2, confirmant ainsi la force du crible et validant la démarche entreprise. La caractérisation d'autres mutants nous permet d'envisager l'identification de nouvelles fonctions impliquées dans la dégradation de l'amidon ou dans la régulation de ce processus chez les végétaux. En parallèle, la caractérisation de la granulométrie des amidons produits par nos mutants augure également de la découverte de fonctions impliquées dans le déterminisme de la taille des grains d'amidon

Mots-clés : amidon, microalgues, dégradation, *Chlamydomonas reinhardtii*

Forward genetics: a powerful tool to decipher starch catabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*

Abstract

Starch biosynthesis has been widely studied for more than twenty years and the understanding of this process is now quite complete. Meanwhile, studies on starch catabolism have mainly been restricted to one single organism, *Arabidopsis thaliana*, a plant model for transitory starch metabolism studies through reverse genetics. We then decided to apply a complementary forward genetics approach in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in order to decipher the catabolism of both transitory and storage starches. Using random mutagenesis and a two-step iodine screening, we were able to isolate 62 putative catabolic mutants among more than 32000 insertional transformants. The localization of the foreign DNA insertion sites allowed the identification of mutations for key catabolic activities such as Mex, Bam1 and Dpe2, which were already described in *Arabidopsis*, revealing the strength of our phenotypic screening procedure. The preliminary characterizations performed on the other mutants defective for previously uncharacterized functions may define new functions affecting starch catabolism or regulation of this process in microalgae. . Some of these mutants are also harboring altered size distributions of their starch granules and may represent a valuable material for understanding the mechanisms controlling the starch granule sizes determination in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Key words: starch, microalgae, catabolism, *Chlamydomonas reinhardtii*

Introduction	12
I. Composition et structure de l'amidon	15
1. Amylopectine et amylose	16
2. Les différentes morphologies de l'amidon	18
3. Les composants du grain d'amidon	19
4. Interaction à l'iode	20
II. La biosynthèse de l'amidon	22
1. La source de carbone	22
2. Production du précurseur : l'ADP-Glucose	23
3. Initiation de la synthèse du grain	25
4. Elongation des α -glucanes et branchement	27
5. Débranchement et précipitation de l'amylopectine	29
6. Autres activités enzymatiques intervenant dans la biosynthèse du grain	30
III. La dégradation de l'amidon	33
1. Solubilisation du grain	33
2. Voie phosphorolytique versus voie amylolytique	37
3. Hydrolyse du polysaccharide	39
Les β -amylases.....	39
Les enzymes de débranchement.....	41
Les α -amylases.....	42
La D-Enzyme	42
4. Export du maltose et du glucose vers le cytosol	44
5. Prise en charge cytosolique du maltose	45
6. La dégradation de l'amidon de réserve	47
7. Régulation de la dégradation de l'amidon	50
La régulation redox.....	50
Formation de complexes protéiques et phosphorylation.....	51

La régulation circadienne	52
Le « sugar signaling »	53
IV. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	56
1. Architecture cellulaire	56
2. Cycle de vie	57
3. Pourquoi <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ?	59
V. Approche expérimentale	62
Matériels et Méthodes	64
I. Souches	64
II. Milieux et conditions de culture	65
1. Conditions standards	65
2. Milieux de culture de <i>C. reinhardtii</i>	65
3. Conditions jour/nuit	67
III. Construction de la banque de mutants	68
1. Préparation de l'autolysine	68
2. Test de l'autolysine	68
3. Amplification de la cassette	69
4. Préparation du plasmide	69
5. Transformation de <i>Chlamydomonas</i>	70
Préparation de la souche.....	70
Méthode des billes de verre.....	70
Electroporation.....	70
6. Crible des transformants	71
IV. Caractérisations biochimiques	72
1. Extraction et dosage de l'amidon	72
2. Dosage des polysaccharides solubles	72
3. Chromatographie de tamisage moléculaire (CL-2B)	73

4. Distribution en longueur de chaînes (CLD) de l'amylopectine	73
5. Dosage du NAD(P)/NAD(P)H	74
6. Dosage de la chlorophylle	75
V. Caractérisations enzymatiques	76
1. Préparation des extraits bruts	76
2. Dosage des protéines	76
3. Préparation des échantillons avant dépôt sur gel	76
4. Zymogramme révélant les activités hydrolytiques	77
5. Zymogramme révélant les activités phosphorylase	77
6. Zymogramme révélant les activités de branchement	77
VI. Caractérisations moléculaires	78
1. Extraction de l'ADN génomique	78
2. Réaction de Polymérisation en Chaîne	78
3. Extraction des ARN totaux	79
4. Reverse-Transcription PCR	79
5. Identification du site d'insertion	80
« Plasmid Rescue »	80
PCR Inverse	81
TAIL PCR.....	83
VII. Analyse de coségrégation	86
VIII. Complémentation fonctionnelle	87
IX. <i>Escherichia coli</i>	88
1. Souche	88
2. Milieux de culture	88
3. Construction des vecteurs	89
4. Analyse de la complémentation	90
X. <i>Arabidopsis thaliana</i>	91

1. Lignées	91
2. Milieux et conditions de culture	91
3. Extraction d'ADN génomique	91
4. PCR	92
5. Extraction d'ARN	92
6. RT-PCR	92
7. Construction des vecteurs	93
Vecteur de complémentation de la lignée mutante <i>mex1</i> d' <i>Arabidopsis</i> : pMDC32-Mex1	93
Vecteur d'expression de la protéine fusionnée à la GFP : pH7FWG2-Mex1	94
8. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	96
9. Transformation de la lignée <i>mex1</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	96
10. Sélection des transformants	96
11. Dosage des polysaccharides	97
12. Isolement de protoplastes	97
13. Transformation de protoplastes	98
14. Observations en microscopie confocale	98
Résultats	99
Chapitre I Complémentation du mutant de synthèse <i>sta8</i>	99
Chapitre II Construction de la banque de mutants	100
I. Transformation nucléaire et crible phénotypique	100
II. Caractérisations biochimiques des souches CAT	102
1. Cinétique de dégradation et accumulation d'amidon	102
2. Structure de l'amidon	104
3. Zymogrammes	105
III. Caractérisations moléculaires	107
IV. Discussion	109
Chapitre III Projet IFMAS : à la recherche d'amidons de structure modifiée	112

I. Analyse de la granulométrie des souches CAT	112
II. Discussion	114
Chapitre IV Etude de la souche CAT33 à granulométrie altérée.....	115
I. Caractérisation de la souche	115
II. Identification de la défectuosité	118
III. Analyse de coségrégation	120
IV. Discussion	123
Chapitre V Etude de la souche déficiente <i>nadk</i>	125
I. Caractérisation de la souche CAT60	125
II. Identification de la fonction affectée	128
III. Analyse de coségrégation	131
IV. Complémentation fonctionnelle	134
V. Analyse du métabolisme du NAD	136
VI. Discussion	137
Chapitre VI Etude du mutant <i>mex1</i> : CAT3	139
I. Caractérisation de la souche CAT3	139
II. Identification de la mutation	144
III. Analyse de coségrégation et complémentation fonctionnelle	147
IV. Complémentation fonctionnelle de la lignée <i>mex1</i> d'Arabidopsis	154
1. Obtention des lignées transformantes	154
2. Génotypage des lignées	155
3. Analyse du phénotype	157
4. Localisation cellulaire de la protéine Mex de Chlamydomonas	159
V. Complémentation hétérologue d' <i>E. coli malF</i>	161
VI. Discussion	163
Conclusions et Perspectives	167

Bibliographie	173
Annexe 1:	192
Annexe 2:	193
Annexe 3:	211
Annexe 4:	224

Introduction

L'amidon est l'une des principales formes de stockage énergétique que l'on peut retrouver chez les plantes. Il consiste en effet en un polymère de glucoses qui constitue le produit majeur issu de la photosynthèse. Mais en plus de ce rôle de réserve carbonée chez la plante, il représente également la principale source de nutriments des alimentations humaine et animale. Il est accumulé chez les céréales telles que le riz, le blé, le maïs mais aussi dans la pomme de terre. L'amidon est donc consommé sous sa forme native mais pourra également subir des transformations pour entrer dans la composition du pain et de la bière. Il sera alors dégradé par amylolyse qui libérera des sucres simples qui serviront de source d'énergie à la levure, elle-même finalement responsable de la production de gaz et/ou d'alcool par fermentation. Ses propriétés physico-chimiques sont également mises à profit dans la fabrication de sauces, de soupes ou de confiserie où il servira de liant, d'épaississant ou de gélifiant. En dehors de ce rôle majeur dans l'alimentation humaine et animale, l'amidon trouve également des applications dans les industries non alimentaires. Il fait par exemple partie des ingrédients participant à la conception du papier. Il est utilisé au moment du couchage du papier et va lui conférer sa résistance au pliage, sa réceptivité aux encres d'impression et d'écriture, et même parfois son éclat.

Plus récemment, avec l'essor des préoccupations environnementales, l'amidon a commencé à être utilisé dans la fabrication de bioplastiques. Il va notamment servir à la fabrication des sacs plastiques dit biodégradables qui remplacent progressivement les sacs plastiques traditionnels issus du pétrole et qui constituent une part non négligeable de la pollution environnementale par les plastiques. Dans ce même contexte de développement durable mais surtout d'épuisement des réserves en énergies fossiles, l'amidon présente un intérêt croissant pour la production des carburants renouvelables. En effet, la production de bioéthanol commence à se développer sérieusement et l'amidon en représente le réactif de base. Il est digéré en glucose qui sera par la suite fermenté en éthanol par la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, ce procédé reste pour le moment très

coûteux compte tenu du rendement actuel. De plus, le développement de ces procédés entre en compétition avec l'agriculture traditionnelle et risque d'entraîner une augmentation du prix de ces matières premières, la destruction de nouveaux habitats naturels et va à l'encontre du besoin croissant en nourriture des pays en voie de développement.

Dans ce contexte, l'utilisation de microalgues présente certains avantages non négligeables comme substituant des céréales en tant que source d'amidon. Leur culture est bien maîtrisée et pourra se faire hors-sol dans des zones non adaptées à la culture des sources conventionnelles d'amidon, laissant ainsi toutes les terres arables disponibles pour l'agriculture à des fins nutritives. Cette culture est possible en bioréacteurs fermés, évitant ainsi les pertes d'eau par évaporation et permettant son économie de manière conséquente par rapport à l'agriculture conventionnelle. Toutefois, les procédés de production de biocarburants à partir de microalgues ne sont pas encore suffisamment au point et la rentabilité reste insuffisante à ce jour.

La faisabilité d'une production d'énergie renouvelable à grande échelle par les microalgues passe donc par l'optimisation de la mobilisation de leur pool de réserves carbonées, parmi lesquelles l'amidon occupe une place importante (Radakovits *et al.*, 2010). La microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* représente aujourd'hui un modèle d'étude très répandu dans le cadre de la production de bioéthanol, de biodiesel ou de bio-hydrogène (Ho *et al.*, 2014 ; Kruse et Hankamer, 2010). En ce qui concerne le bio-hydrogène, le processus a été mis en évidence il y a bien longtemps (Gaffron et Rubin, 1942). Il est aujourd'hui connu que la production d'hydrogène par *Chlamydomonas reinhardtii* passe par deux voies : directe et indirecte. La première consiste en la production de deux électrons par photo-oxydation de l'eau, ces deux électrons étant transportés via la chaîne de transport d'électrons par les photosystèmes II puis I pour finalement être acceptés par une hydrogénase pour la synthèse de H₂. La seconde est indépendante du photosystème II puisque les électrons proviennent de processus métaboliques comme la dégradation de l'amidon. Toutefois, la fin de cette voie est commune à la première à partir du photosystème I. L'optimisation de la production de bio-hydrogène passe donc

potentiellement par la compréhension et l'optimisation de la dégradation de l'amidon (Chochois *et al.*, 2009).

Finalement, la compréhension des mécanismes de stockage et de mobilisation de l'amidon apparaît nécessaire pour rendre possible la production de sources d'énergie propres à partir des microalgues. C'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de thèse. Dans ce manuscrit, un point sera d'abord effectué sur l'état de l'art, à savoir les mécanismes de biosynthèse et de dégradation de l'amidon chez les végétaux. L'intérêt du modèle *Chlamydomonas reinhardtii* dans ce contexte sera ensuite discuté avant la présentation des résultats obtenus au cours de mes travaux.

I. Composition et structure de l'amidon

L'amidon et le glycogène constituent deux des formes de stockage énergétique les plus répandues à travers le règne du vivant. Tous deux possèdent une structure primaire très simple puisque ce sont des polymères constitués uniquement de glucoses liés en α -1,4 et ramifiés en α -1,6 par ce que l'on appelle des points de branchement. Toutefois, ils diffèrent de par leur distribution dans le vivant, leur structure macroscopique et par conséquent dans leurs propriétés.

Le glycogène est le polysaccharide de réserve des animaux, bactéries, champignons et protozoaires (Manners, 1991). Il est constitué de chaînes linéaires longues de 10 à 15 résidus et présentant un taux de branchement compris entre 8 et 12 %. La molécule de glycogène forme une particule soluble pouvant atteindre au maximum un diamètre de 42 nm (**Figure 1**). En effet, les points de branchement y sont répartis de manière régulière, aboutissant à un encombrement stérique à la périphérie de la molécule et empêchant les enzymes responsables de sa synthèse de poursuivre leur activité (Roach *et al.*, 2012).

L'amidon lui, ne va être présent que chez les organismes issus directement ou indirectement de l'endosymbiose primaire qui se serait produite entre 0,7 et 1,5 milliards d'années avant notre ère (Cavalier-Smith, 2006 ; Yoon *et al.*, 2004) par la phagocytose d'une cyanobactérie par un eucaryote unicellulaire (Raven *et al.*, 2009). Il s'accumule ainsi chez les membres des Archaeplastida qui en ont découlé, à savoir dans le plaste des Chloroplastida tels que les algues vertes et les plantes supérieures, et dans le cytosol des Rhodophytes ou algues rouges et des Glaucophytes parmi lesquels on retrouve des organismes comme *Cyanophora paradoxa*. On pourra également l'observer chez certains organismes dérivant d'endosymbioses secondaires comme des parasites apicomplexes (Coppin *et al.*, 2005) et des dinoflagellées (Deschamps *et al.*, 2008).

Malgré une structure primaire identique à celle du glycogène, l'amidon présente un caractère semi-cristallin et va former un grain insoluble d'une taille allant de 0,1 μ m à 100 μ m de diamètre (**Figure 1** ; Buléon *et al.*, 1998). Il doit cette semi-cristallinité à la répartition non aléatoire de ses points de branchement, caractère qui, au sein même de la molécule, permet de différencier deux sous-fractions : l'amylopectine et l'amylose.

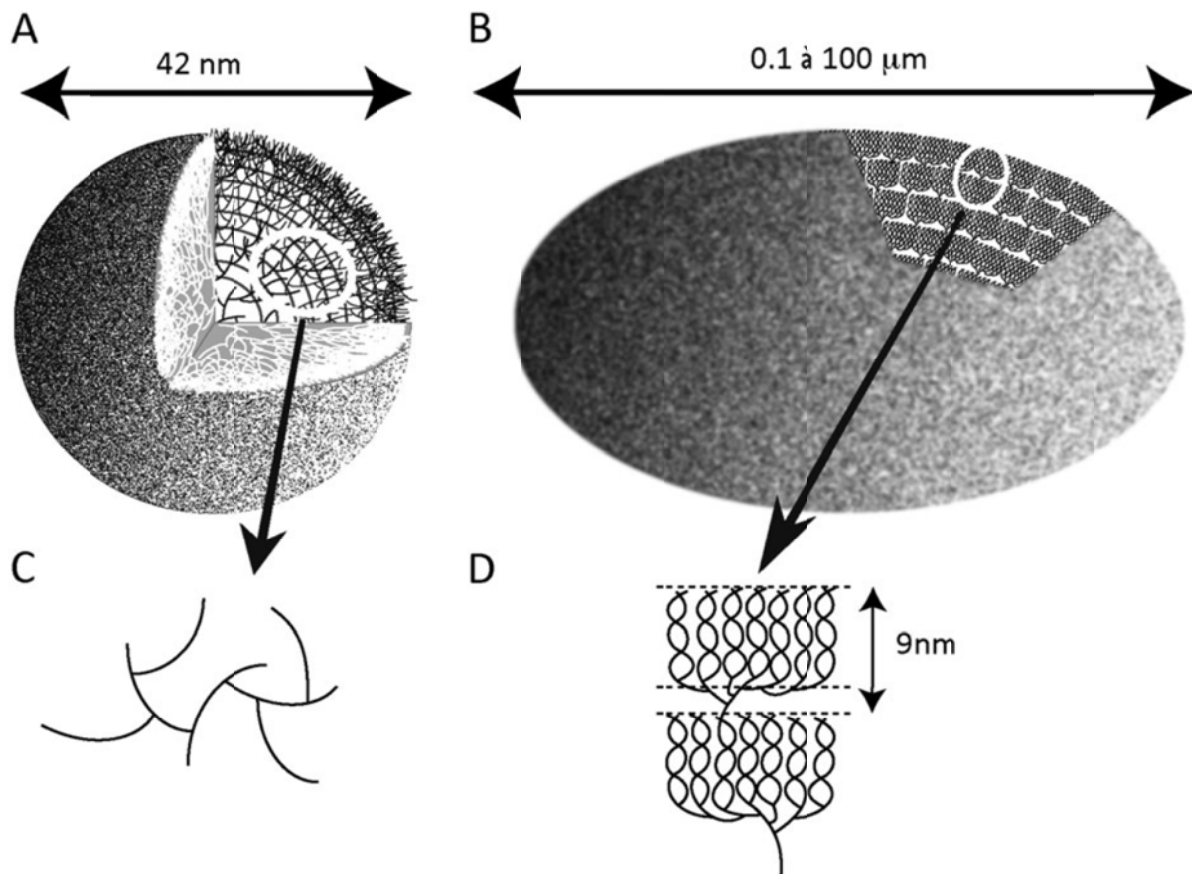


Figure 1 : Représentation schématique des molécules de glycogène (A, C) et d'amidon (B, D). Les lignes représentent des chaînes de glucoses liés en α -1,4 et reliées entre elles par des liaisons en α -1,6. La molécule de glycogène présente une répartition uniforme des points de branchements (C) conduisant à un encombrement stérique qui limite sa taille à 42 nm (A). L'organisation de la molécule d'amidon se fait sous forme de clusters de 9 nm grâce à la concentration des points de branchement au niveau de la lamelle amorphe (D). La taille de la particule ne sera ainsi pas limitée et une grande variété de dimensions existe chez différents organismes (B). D'après Ball *et al.*, 2011.

1. Amylopectine et amylose

L'amylopectine est le constituant majeur de l'amidon puisqu'elle représente en moyenne 75 % du poids sec du grain. Cette molécule a une masse moléculaire comprise entre 10^7 et 10^9 Da et est hautement branchée avec 5 à 6 % de liaisons en α -1,6 (Buléon *et al.*, 1998). Ses chaînes de glucose contiennent entre 6 et jusqu'à plusieurs centaines de résidus mais avec une moyenne comprise entre 20 et 25 (Smith, 2001). Les points de branchement sont arrangés de sorte à obtenir des grappes de chaînes de 12 à 20 résidus de glucose. Certaines chaînes couvrant deux grappes en contiennent environ 45 tandis que d'autres, plus rares, couvrant 3 grappes pourront atteindre les 70 résidus. L'ensemble de ces chaînes est orienté de manière à ce que l'extrémité non réductrice pointe vers l'extérieur du grain.

L'amylopectine serait responsable de la structure semi-cristalline de l'amidon. En effet, les chaînes linéaires de glucoses au sein des grappes s'organisent en double hélice et vont s'empaqueter pour former la lamelle cristalline. Cette lamelle cristalline alterne avec une lamelle amorphe constituée de la concentration des points de branchement, et ceci sur un intervalle régulier d'environ 9 nm (**Figure 1 D**). L'alternance de ces lamelles forme au sein du grain une zone cristalline et concentrique qui alterne elle-même avec une zone amorphe où l'amylopectine serait moins organisée et moins représentée. Ces zones alternent sur quelques centaines de nanomètres et constituent ce que l'on appelle les « anneaux de croissance » (**Figure 2** ; Smith, 2001).

En fonction de l'organisation de l'amylopectine, on pourra être en présence de 3 types cristallins de polysaccharide : A, B ou C. Les doubles hélices s'empaquètent selon un arrangement de type A en lignes très denses ; ou de type B en huit et plus lâche (**Figure 2**). L'amidon de type C contient une mixture de ces deux arrangements.

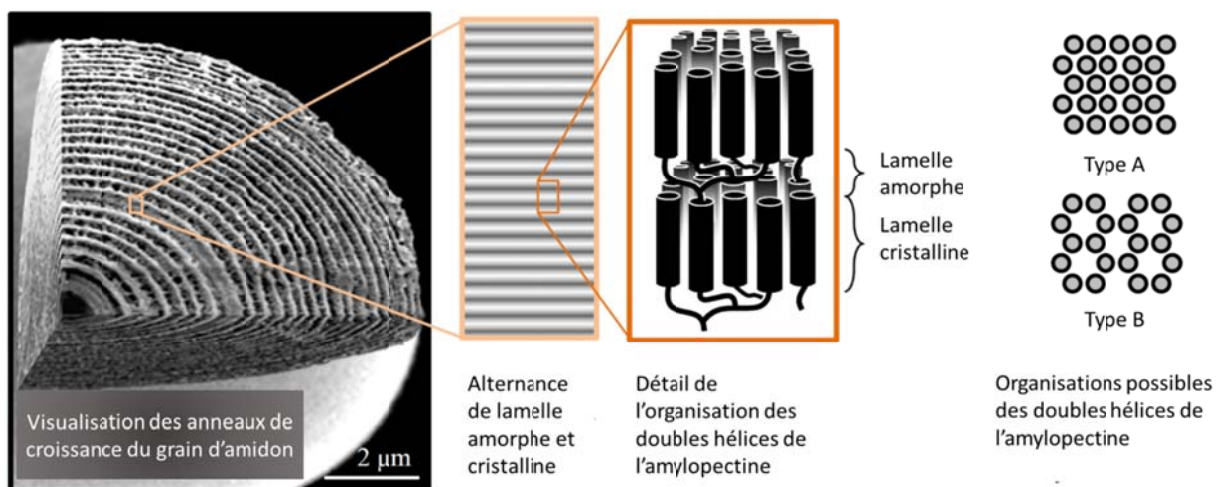


Figure 2 : Structure macroscopique du grain d'amidon et arrangements de l'amylopectine. La microscopie électronique à balayage permet la visualisation d'anneaux de croissance au sein du grain. Ces anneaux sont eux-mêmes composés de l'alternance entre lamelle amorphe et lamelle cristalline. L'organisation des doubles hélices dans la lamelle cristalline prendra deux formes : les types cristallins A et B. D'après Streb et Zeeman, 2012.

L'amylose est un polysaccharide majoritairement linéaire avec un très faible taux de branchement (moins de 1 %). Il représente en moyenne 25 % de la masse du grain d'amidon et possède une masse moléculaire de 10^5 à 10^6 Da (Buléon *et al.*, 1998). Il serait très présent dans les zones amorphes du grain mais son rôle et son

importance dans la structure de l'amidon ne sont à ce jour pas bien compris. On sait en tout cas qu'il n'est pas responsable de la cristallinité du grain puisque celle-ci n'est pas altérée chez le mutant *waxy* totalement dépourvu d'amylose (Delrue *et al.*, 1992).

2. Les différentes morphologies de l'amidon

Comme cela a été dit précédemment, le grain d'amidon peut atteindre une taille allant du dixième de μm jusqu'à 100 μm . Le facteur majeur limitant la taille du grain d'amidon sera son contenant, à savoir la cellule végétale, photosynthétique ou non, où il est produit. On retrouve ainsi les plus gros grains dans les types cellulaires entièrement dédiés à la synthèse et au stockage de l'amidon : les amyloplastes, qui se situent au niveau des racines, rhizomes et tubercules des végétaux. L'amidon de pomme de terre atteint par exemple 75 μm de long et adopte une forme ellipsoïdale (**Figure 3** ; Jane *et al.*, 1994).

Les amidons de céréales seront généralement plus petits avec des formes plus diverses. L'amidon de riz est un polygone d'un diamètre aux alentours de 5 μm , de même pour l'amidon de maïs qui est lui plus grand (5-20 μm). L'amidon de blé adopte la forme d'une faluche d'environ 30 μm de diamètre pour 10 μm d'épaisseur. Dans ce cas, la taille des grains se fait selon une distribution bimodale. En effet, on peut observer, en plus des « gros » grains, quelques petits grains ne dépassant pas les 3 μm de diamètre. Ce même type de distribution est également observé chez l'orge ou le sorgho.

Les organismes servant essentiellement de modèle d'étude du métabolisme de l'amidon ont eux des grains généralement plus petits. Le grain d'amidon de la feuille d'*Arabidopsis thaliana* est un ellipsoïde dont la taille oscille entre 1 et 2 μm (Streb et Zeeman, 2012). L'amidon de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est généralement du même ordre de grandeur (0.5-2.5 μm) et de forme lenticulaire (Buléon *et al.*, 1997).

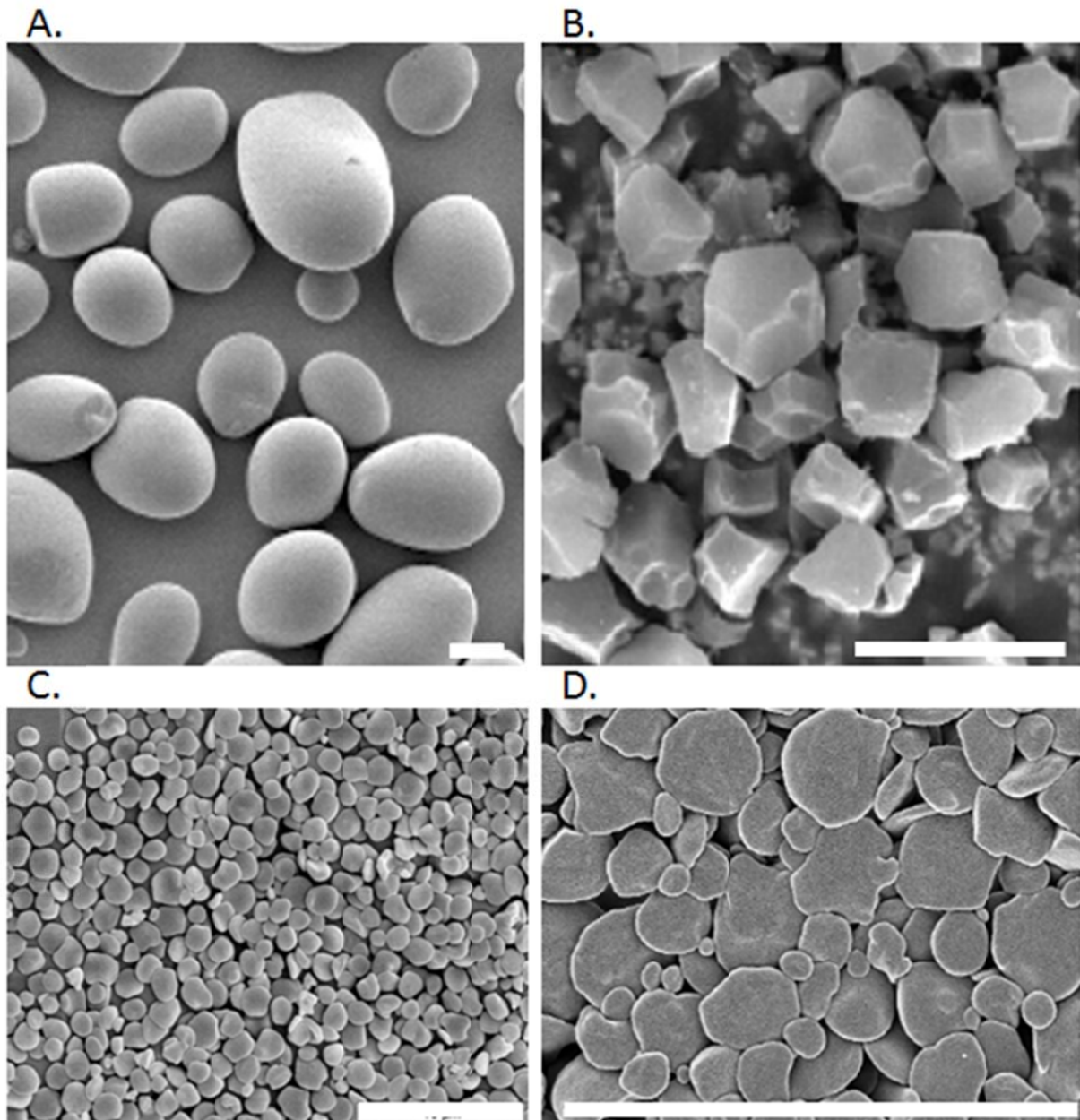


Figure 3 : Observation par microscopie électronique à balayage de la morphologie de grains d'amidon de différentes espèces. A. Amidon de pomme de terre. B. Amidon de riz. C. Amidon de *Chlamydomonas reinhardtii*. D. Amidon d'*Arabidopsis thaliana*. Barre: 2 μm . D'après Streb et Zeeman, 2012.

3. Les composants du grain d'amidon

En supplément des α -glucanes, le grain d'amidon contient également d'autres composants comme des protéines et des lipides. Ces lipides sont le plus souvent retrouvés sous forme de lysophospholipides ou d'acides gras libres ; mais aussi parfois sous forme de triglycérides (Buléon *et al.*, 1998). Ces triglycérides sont situés en surface du grain chez le blé et le maïs. Les lipides internes chez les céréales

seront principalement les lysophospholipides et les acides gras libres dont la quantité est proportionnelle à la teneur en amylose (Morrison, 1988).

Les protéines contenues dans le grain d'amidon sont principalement et fort logiquement des enzymes impliquées dans la synthèse du polysaccharide parmi lesquelles les amidons synthases I et II ainsi qu'une enzyme de branchement (Boren *et al.*, 2004). L'amidon synthase liée au grain (GBSS), notamment impliquée dans la synthèse de l'amylose, en constitue la plus grande partie puisque qu'elle peut représenter jusqu'à 0,1 % du poids sec du grain chez *Chlamydomonas* (Wattebled *et al.*, 2002). On notera également le cas de la friabiline qui semble avoir un rôle important à jouer notamment chez le blé. En effet, l'abondance relative de cette protéine sur le grain va influencer sa texture puisqu'elle est très présente chez un blé mou et assez rare dans un blé dur (Pasha *et al.*, 2010).

Les grains d'amidon contiennent également des groupements phosphates. Ceux-ci sont plutôt rares chez les amidons de céréales où on les retrouve sous la forme de phospholipides. Ils sont par contre relativement important dans les tubercules et les racines, par exemple de pomme de terre, atteignant un niveau de 0.089 % du poids sec du grain. Ils existent alors sous forme de monoesters liés aux résidus de glucose en position C6 principalement, mais aussi en C3 (Buléon *et al.*, 1998).

4. Interaction à l'iode

Un moyen très simple de révéler la présence d'amidon consiste à le soumettre à de l'iode qui présente la capacité d'interagir avec les chaînes de glucoses liés en α -1,4. Cette interaction a pour la première fois été décrite par Banks *et al.* en 1971 sur de l'amylose. Les molécules de diiode viennent se placer au centre d'hélices simples formées par des chaînes de glucoses longues d'au moins 12 résidus (**Figure 4 A**). L'interaction sera de plus en plus forte avec l'augmentation du degré de polymérisation du polysaccharide mais sera affaiblie par une augmentation du taux de branchement. Ces deux paramètres déterminent la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}) du complexe iode/polysaccharide et donc sa couleur. Un amidon de structure différente présentera donc une variation de cette couleur. De même, le

glycogène ne se colorera pas de la même manière que l'amidon, du fait de ses différences structurales (**Figure 4 B**).

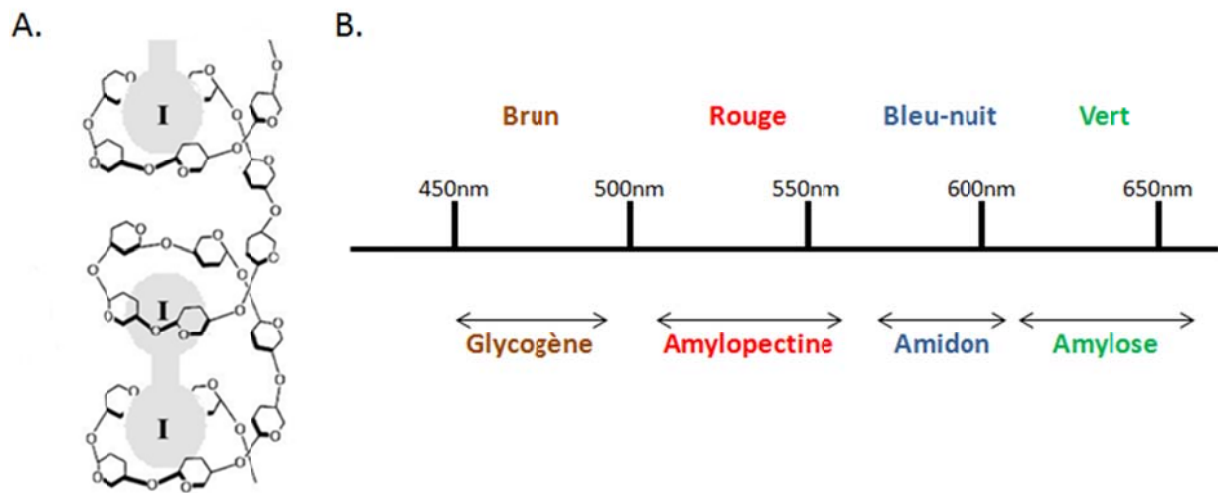


Figure 4 : Principe de l'interaction iode/polysaccharide. A. La molécule de diiode se positionne au cœur d'une hélice formée par une chaîne de glucoses. B. La structure du polysaccharide modifie la force de l'interaction diiode/polysaccharide et influe ainsi sur la teinte affichée après coloration. Une échelle représentant les valeurs caractéristiques de λ_{max} des polysaccharides et les couleurs obtenues lors de l'interaction est présentée.

II. La biosynthèse de l'amidon

1. La source de carbone

Dans les conditions naturelles, la principale source de carbone chez les végétaux provient de la fixation du carbone atmosphérique par l'intermédiaire du cycle de Calvin-Benson et notamment de l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO). Celle-ci est responsable de la fixation d'une molécule de CO₂ sur un ribulose-1,5-bisphosphate. Ce cycle, impliquant 11 activités enzymatiques, a pour but de produire de l'énergie sous forme de molécules carbonées pour aboutir à des sucres (**Figure 5**). Parmi les intermédiaires sucres du cycle de Calvin, l'excès de Fructose-6-phosphate (Fru6P) peut être détourné du cycle et être converti en Glucose-1-phosphate par deux activités enzymatiques afin de servir de substrat à l'enzyme initiatrice de la synthèse de l'amidon. Dans un premier temps, ce Fru6P est converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphoglucoisomérase (Pgi) puis dans un second temps en G1P par la phosphoglucomutase (Pgm). Ces deux étapes sont primordiales pour la biosynthèse de l'amidon. En effet, des mutants de ces activités sont dépourvus ou contiennent des quantités très faibles d'amidon, que ce soit chez *Arabidopsis thaliana* (Yu *et al.*, 2000 ; Caspar *et al.* 1985), *Chlamydomonas reinhardtii* (Van den Koornhuyse *et al.*, 1996) ou le pois (Harrison *et al.*, 2000). La caractérisation de ces mutants a donc permis d'établir le cycle de Calvin-Benson comme la source majeure de substrat pour la biosynthèse de l'amidon.

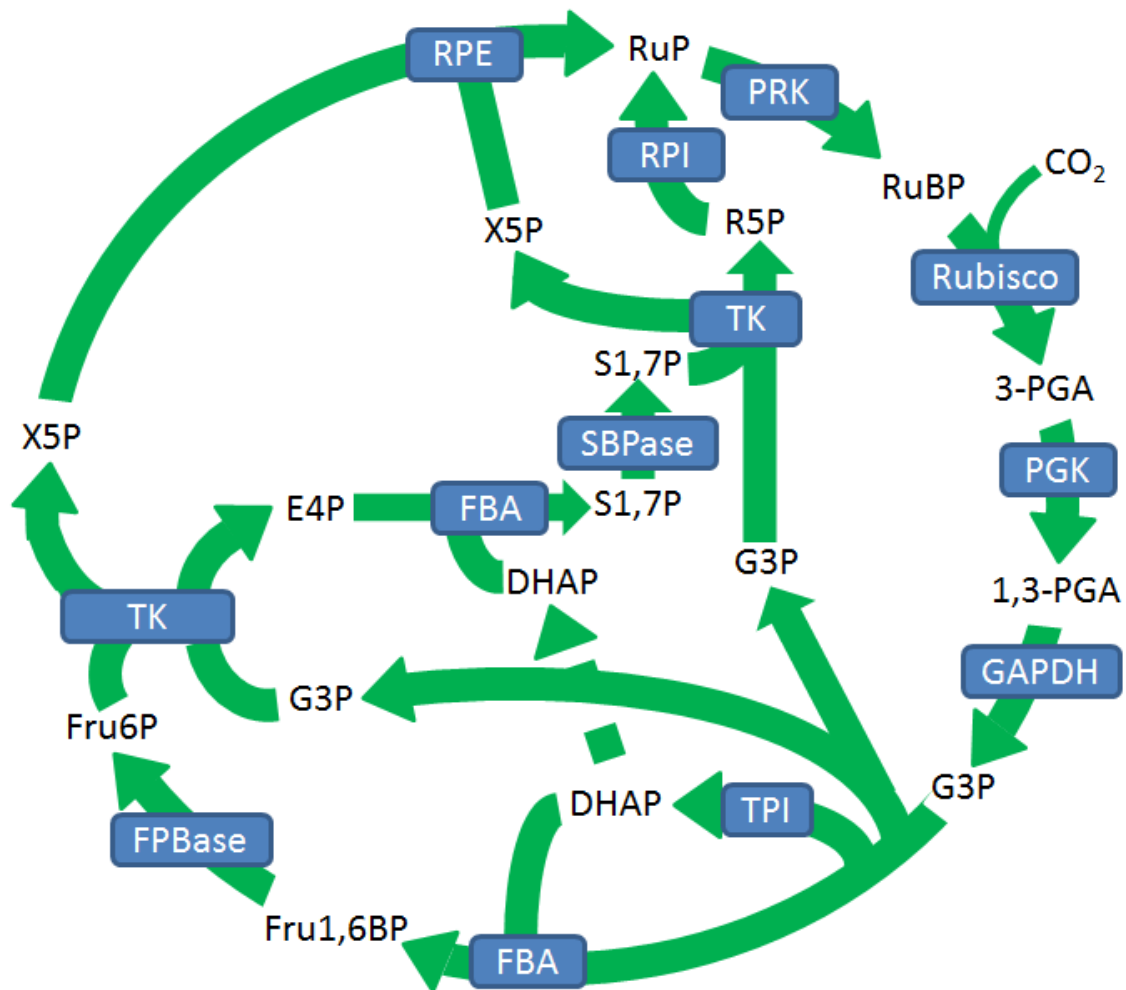


Figure 5 : Le cycle de Calvin-Benson. Les 11 enzymes impliquées sont représentées par des rectangles bleus. Enzymes: Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygénase; PGK, phosphoglycérate kinase; GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase; TPI, triose-phosphate isomérase; FBA, fructose-1,6-bisphosphate aldolase; FBPase, fructose-1,6-bisphosphatase; TK, transkétolase; SBPase, sédoheptulose-1,7-bisphosphatase; RPE, ribulose-5-phosphate 3-épimérase; RPI, ribose-5-phosphate isomérase; PRK, phosphoribulokinase. Métabolites, RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; 3-PGA, 3-phosphoglycérate; 1,3-PGA, 1,3-bisphosphoglycérate; G3P, glycéraldéhyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; Fru1,6P, fructose-1,6-bisphosphate; Fru6P, fructose-6-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; E4P, érythrose-4-phosphate; S1,7P, sédoheptulose-1,7-bisphosphate; S7P, sédoheptulose-7-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; RuP, ribulose-5-phosphate. D'après Michelet *et al.*, 2013.

2. Production du précurseur : l'ADP-Glucose

Dans la lignée verte (plantes et micro-algues vertes), la production de l'unique précurseur de la synthèse d'amidon (l'ADP-glucose) est catalysée par l'ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGPase) à partir de G1P et d'ATP, libérant ainsi du pyrophosphate inorganique (Recondo et Leloir, 1961), le tout de façon dépendante de la présence de cations bivalents Mn^{2+}/Mg^{2+} (Nakamura et Imamura, 1985). Cette réaction est réversible dans les conditions physiologiques mais serait en réalité

largement dans le sens de la synthèse du fait de la rapide hydrolyse du pyrophosphate en phosphate inorganique par la phosphatase alcaline plastidiale (Weiner *et al.*, 1987).

Au contraire de la protéine bactérienne, qui est homomérique, l'AGPase végétale s'organise en un hétérotétramère composé de deux grandes sous-unités β régulatrices et de deux petites sous-unités α catalytiques (Okita *et al.*, 1990). Ces deux sous-unités résulteraient de la duplication d'un gène unique probablement d'origine bactérienne (Nakata *et al.*, 1991 ; Smith-White et Preiss, 1992). Un grand nombre de mutants présentant une synthèse d'amidon fortement diminuée voire totalement abolie ont déjà été décrits chez différents organismes : *Pisum sativum* (mutant *rb*, Hylton et Smith, 1992), *Zea mays* (mutants *sh2* et *bt2*, Tsai et Nelson, 1966 ; Dickinson et Preiss, 1969), *Arabidopsis thaliana* (mutants *adg1* et *adg2*, Lin *et al.*, 1988a), *Chlamydomonas reinhardtii* (mutant *sta1* et *sta6*, Van den Koornhuyse *et al.*, 1996, Zabawinski *et al.*, 2001). A l'inverse, une surexpression d'une AGPase bactérienne chez la tomate entraîne une augmentation de la synthèse d'amidon (Stark *et al.*, 1992), plaçant ainsi la production d'ADP-Glc comme l'étape limitante de la biosynthèse de l'amidon.

L'AGPase constitue en effet le point majeur de contrôle du flux de carbone vers la biosynthèse de l'amidon (Ball et Morell, 2003). Elle est régulée de manière allostérique par le ratio 3-phosphoglycérate (3PGA)/Pi (Ghosh et Preiss, 1966 ; Sowokinos et Preiss, 1982 ; Ball *et al.*, 1991). Lorsque l'activité photosynthétique est élevée, le rendement du cycle de Calvin/Benson excède la demande en énergie et le haut rapport 3PGA/Pi va activer l'AGPase et ainsi stimuler le stockage de cet excès d'énergie sous forme d'amidon (Stitt et Quick, 1989). En sus de ce point de contrôle par l'activité métabolique de la cellule, l'AGPase est également régulée de façon redox par la formation/rupture de ponts disulfures entre ses deux petites sous-unités (Fu *et al.*, 1998 ; Tiessen *et al.*, 2002). Sous sa forme oxydée, la formation de ce pont inactive l'enzyme et son incubation en présence d'agents réducteurs permet de récupérer progressivement son activité. Là encore, le pouvoir réducteur produit par le photosystème I durant la journée permet le stockage de l'énergie produite sous forme d'amidon. Il apparaît que cette régulation de l'AGPase soit également influencée par les métabolites, indépendamment de la lumière. Dans la cellule, cette réduction est notamment médiée par la thioredoxine réductase C NADPH-

dépendante chez *Arabidopsis thaliana* (Michalska *et al.*, 2009 ; Lepistö *et al.*, 2013). Le niveau de saccharose a notamment un effet sur l'état d'activation de l'AGPase et plusieurs études indiquent que cet effet passe par l'intervention du tréhalose-6-phosphate chez *Arabidopsis thaliana* (Kolbe *et al.*, 2005 ; Lunn *et al.*, 2006). Toutefois, l'identification de l'ensemble des intermédiaires et la validation du mécanisme chez d'autres organismes restent à étudier.

3. Initiation de la synthèse du grain

L'initiation de la synthèse n'est évidemment pas un processus primordial dans les organes matures des plantes supérieures étant donné le faible taux de division. Un même grain d'amidon y subira des cycles journaliers d'expansion/dégradation tout au long de la vie de la plante. Toutefois, il prend plus d'importance lorsqu'il s'agit de jeunes plantes ou d'algues unicellulaires mais le mécanisme mis en jeu reste globalement mal compris.

Partant du fait que la biosynthèse de l'amidon aurait évolué à partir d'une capacité ancestrale à produire du glycogène (Ball et Morell, 2003), il paraît logique de supposer l'existence d'un mécanisme très similaire à l'initiation de la synthèse de la molécule de glycogène. Chez les organismes produisant ce polysaccharide soluble à partir d'UDP-glucose, la synthèse est initiée par une protéine : la glycogénine, possédant la capacité de s'auto-glucosyler sur un résidu tyrosine (Smythe et Cohen, 1991 ; Cheng *et al.*, 1995). La glycogène synthase se complexe ensuite avec la glycogénine pour allonger le glucane qui est ensuite branché par l'enzyme de branchement (Alonso *et al.*, 1995). Toutefois, dans le cas d'une synthèse du glycogène bactérien qui s'effectue à partir d'ADP-Glucose, la glycogène-synthase semble capable d'initier la synthèse d'elle-même (Ugalde *et al.*, 2003).

Il existe chez les plantes des protéines également capables d'auto-glycosylation (Ardila et Tandecarz, 1992 ; Singh *et al.*, 1995) mais elles sont généralement impliquées dans la biosynthèse de la paroi cellulaire (Delgado *et al.*, 1998 ; Langeveld *et al.*, 2002). Toutefois, on peut remarquer l'étude d'une lignée RNAi d'*Arabidopsis thaliana* déficiente pour une protéine homologue de la glycogénine (PGSIP1) et dont la synthèse d'amidon semble affectée d'après la coloration des feuilles à l'iode (Chatterjee *et al.*, 2005). Aucune étude plus poussée

n'a hélas permis de donner une explication à ce phénotype et, *a contrario*, une étude plus récente semble infirmer l'idée d'une implication de cette protéine dans la biosynthèse de l'amidon, du fait de sa localisation golgienne (Oikawa *et al.*, 2010).

Il semblerait donc que le processus d'initiation de la synthèse du grain d'amidon diffère assez largement de celui impliqué dans la biosynthèse de la molécule de glycogène animal. Une des principales différences entre les deux métabolismes repose sur l'intervention d'une activité de débranchement qui est uniquement nécessaire à la synthèse du grain d'amidon et non à celle du glycogène. Certaines études se sont donc penchées sur un éventuel rôle de cette activité sur l'initiation du grain, notamment dans des systèmes d'amidon de réserve, amenant à la conclusion qu'elle interviendrait non pas dans la promotion de la synthèse de nouveaux grains mais plutôt dans la prévention d'une trop grande fréquence d'évènements d'initiation (Burton *et al.*, 2002 ; Bustos *et al.*, 2004 ; Kubo *et al.*, 2010).

Finalement, l'initiation du grain d'amidon serait plutôt effectuée par le type d'enzyme impliqué le plus précocement dans la polymérisation de la molécule : l'activité amidon synthase et donc se rapprocherait du système d'initiation du glycogène bactérien. En se basant sur des études d'homologie, on peut distinguer 5 classes d'amidon synthase chez les organismes photosynthétiques : l'amidon synthase liée au grain (GBSS) responsable de la synthèse de l'amylose, et 4 amidon synthases solubles (SSI, SSII, SSIII et SSIV) impliquées dans la biosynthèse de l'amylopectine (Patron et Keeling, 2005). Aucune d'entre elles ne possède la capacité d'auto-glycosylation mais Szydlowski *et al.* (2009) ont montré que la SSIII d'*Arabidopsis* pouvait synthétiser des glucanes à partir d'ADP-Glc, le tout en l'absence d'oligosaccharide pouvant servir de substrat. D'autre part, les mutants *ss4* de cette plante contiennent non seulement une quantité moindre d'amidon mais en plus ne présentent qu'un seul gros grain par chloroplaste contre les cinq présents chez une lignée sauvage (Roldán *et al.*, 2007). Les double mutants *ss3ss4* ne contiennent plus d'amidon, révélant une redondance fonctionnelle entre les deux isoformes (Szydlowski *et al.*, 2009). Dernièrement, les travaux de Crumpton-Taylor *et al.* (2013) donnent une dimension plus large au processus en démontrant que le nombre d'évènements d'initiation dépend également de la division du plaste.

4. Elongation des α -glucanes et branchement

Comme entrevu précédemment, l'élongation des α -glucanes est réalisée par les amidon synthases (ADP-glucose α -1,4 glucane α -1,4 glucosyltransférase) qui utilisent l'ADP-glucose produit par l'AGPase pour en transférer la partie glucidique en α -1,4 sur un glucane en croissance, au niveau de son extrémité non réductrice (Ball et Morell, 2003).

Elles forment donc 5 classes dont les 3 formes SSI, SSII et SSIII semblent les plus impliquées dans l'élongation de la molécule d'amylopectine. En effet, l'amidon d'une lignée mutante *ss4* n'est pas significativement différent de celui d'une lignée sauvage en terme de structure (Roldán *et al.*, 2007) tandis que les analyses génétiques et biochimiques des autres lignées mutantes dégagent une spécificité fonctionnelle pour chacune des trois formes précédemment citées. Par l'intermédiaire d'une analyse de la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine de chaque lignée mutante, il a été conclu que la SSI intervient dans l'élongation de courtes chaînes, produisant des polymères de 8 à 12 glucoses, notamment au niveau des clusters (Delvallé *et al.*, 2005 ; Fujita *et al.*, 2006 ; McMaugh *et al.*, 2014). Les lignées mutantes *ss2* présentent un appauvrissement de leur amylopectine en chaînes de taille intermédiaire (DP12-28), indiquant la participation de la SSII dans l'élongation de ce type de chaînes (Zhang *et al.*, 2008 ; Craig *et al.*, 1998 ; Umemoto *et al.*, 2002). Enfin, la SSIII est impliquée dans l'élongation des chaînes les plus longues (Zhang *et al.*, 2008). Il semble donc que les amidon synthases solubles fonctionnent de manière synergique pour donner sa structure à l'amylopectine mais l'on peut se poser la question d'une potentielle redondance fonctionnelle entre les différentes enzymes. En effet, le mutant *ss3* d'*Arabidopsis thaliana* ne présente pas de défaut de sa synthèse d'amidon, au contraire, celle-ci est augmentée grâce à une activité globale plus forte des autres amidon synthases qui prendraient ainsi le relais (Zhang *et al.*, 2005). Même si chaque famille de synthase semble responsable de l'allongement de chaînes de tailles différentes, une redondance fonctionnelle due au chevauchement de leurs spécificités existe néanmoins. La dernière classe d'amidon synthase, la GBSS (Granule Bound Starch Synthase) est associée à la biosynthèse de la fraction minoritaire du grain d'amidon, à savoir l'amylose. En effet, les lignées déficientes pour cette activité synthétisent un amidon constitué exclusivement d'amylopectine et dont la cristallinité est maintenue (*Zea mays waxy* : Tsai, 1974 ;

Solanum tuberosum amylose-free : Visser *et al.*, 1991 ; *Chlamydomonas reinhardtii sta2* : Delrue *et al.*, 1992).

Au cours de l'élongation, l'introduction des points de branchement s'effectue via le transfert d'un fragment d'une chaîne en α -1,6 soit sur la chaîne donneuse (réaction intramoléculaire) soit sur une autre chaîne (réaction intermoléculaire) par une enzyme de branchement (BE : Branching Enzyme ; α -1,4-glucane-6-glycosyltransférase ; Borovsky *et al.*, 1975).

Il existe deux grandes catégories d'enzymes de branchement : le type I et le type II qui se distinguent par leur différence de substrat (Guan et Preiss, 1993) et par le degré de polymérisation minimal pouvant être transféré (Guan *et al.*, 1997). Les enzymes de branchement de type I (BE1) agissent sur des glucanes d'un DP supérieur ou égal à 16 et en transfèrent un minimum de six résidus. Toutefois, aucune étude n'a à ce jour révélé un impact majeur de l'activité des BE1 dans le métabolisme de l'amidon. L'absence de cette enzyme chez le maïs entraîne une légère perturbation de la distribution des points de branchement sans pour autant affecter la cristallinité du polysaccharide. Cette perturbation serait responsable d'une diminution de l'accessibilité de ses points de branchements lors de la dégradation de l'amidon et ralentit notamment la germination (Xia *et al.*, 2011).

Les enzymes de branchement de type II (BE2) ont un DP minimal nécessaire de 12 résidus et en transfèrent en moyenne 3 à 5. Elles ont un rôle plus important dans la biosynthèse de l'amidon d'après les études publiées sur différentes lignées mutantes. C'est par exemple l'absence d'une BEII responsable d'une diminution de 50 % de la quantité d'amidon qui engendre le phénotype ridé du pois observé par Gregor Mendel (Bhattacharya *et al.*, 1990). Les lignées dépourvues d'activité BE2 présentent en général un enrichissement du grain en amylose si sa synthèse est encore possible (Blauth *et al.*, 2001 ; Nishi *et al.*, 2001) voire à l'abolition de la synthèse du polysaccharide (Dumez *et al.*, 2006). L'action conjuguée des amidon synthases et des enzymes de branchement aboutit finalement à l'élaboration d'une molécule très similaire au glycogène, à savoir hautement branchée et soluble. L'obtention des caractéristiques propres au grain d'amidon passe ensuite par un épissage des points de branchement qui va permettre la précipitation de l'amylopectine.

5. Débranchement et précipitation de l'amylopectine

Cet épissage est réalisé par l'activité isoamylase qui est donc responsable de l'hydrolyse de la liaison en α -1,6 qui unit deux chaînes de glucose. Dans la plante, cette activité provient de l'association de deux sous-unités appelées Isa1 et Isa2. Ces deux protéines forment avec Isa3 les trois classes d'isoamylase impliquées dans le métabolisme de l'amidon (Hussain *et al.*, 2003), la troisième intervenant plutôt dans la dégradation du polymère (voir par ailleurs). Parmi ces deux sous-unités, l'une, Isa1 est catalytique tandis que l'autre ne l'est pas, ce qui s'explique par la substitution de 6 acides aminés du site actif. Par conséquent, les lignées déficientes *isa1* pour l'activité catalytique présentent en général un phénotype beaucoup plus fort que les mutants *isa2* puisque l'isoforme Isa1 a la capacité de former un homomultimère actif en l'absence d'Isa2. L'ensemble de ces mutants synthétise moins d'amidon qui est remplacé par du phytoglycogène, version végétale des glycogènes animaux et bactériens (James *et al.*, 1995 ; Kubo *et al.*, 2010). Toutefois, un phénotype similaire est observé chez les deux lignées mutantes d'*Arabidopsis* puisque l'absence d'une des deux isoamylases conduit à la perte totale de l'activité du complexe (Delatte *et al.*, 2006). En ce qui concerne *Chlamydomonas*, l'absence de la fonction Isa1, codée par le gène *STA7*, entraîne un phénotype drastique avec la disparition quasi-totale de l'amidon et son remplacement par du phytoglycogène (Mouille *et al.*, 1996). Un autre mutant de *Chlamydomonas* dénommé *sta8* possède un phénotype proche des mutants *isa2* du maïs ou du riz puisqu'il contient à la fois de l'amidon et du phytoglycogène (Dauvillée *et al.*, 2001a et b). Néanmoins, la nature moléculaire de cette fonction reste à déterminer.

Cette substitution de l'amidon par du phytoglycogène résulte de l'incapacité du polysaccharide à précipiter en un polymère semi-cristallin. En effet, les points de branchement sont, avant débranchement, organisés de manière désordonnée (**Figure 6 C**), de telle sorte que la formation de doubles hélices n'est pas suffisante pour la cristallisation. Dans une plante sauvage, l'activité isoamylase clive les points de branchements qui sont trop proches d'autres (**Figure 6 D**) et qui par conséquent perturbent la formation de doubles hélices. La molécule possède alors des liaisons en α -1,6 espacées de manière optimale et qui permettent aux chaînes linéaires de s'associer en doubles hélices au sein des clusters et de cristalliser (Ball *et al.*, 1996 ; O'Sullivan et Perez, 1999).

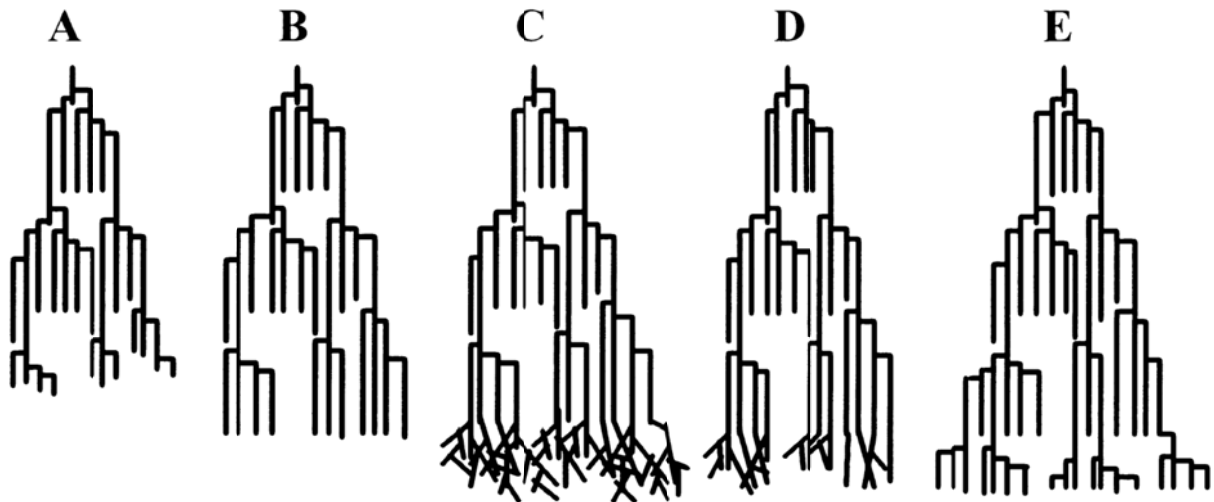


Figure 6 : Modèle de synthèse discontinue de l'amylopectine. (A→B) Les amidon synthases allongent les glucanes à partir des extrémités non réductrices. (B→C) Quand une taille de chaîne suffisante est atteinte, les enzymes de branchement introduisent des liaisons en α -1,6 sur ces glucanes. (C→D) Les isoamylases hydrolysent certains points de branchement. (D→E) La molécule ainsi épissée peut subir un nouveau cycle d'élongation. D'après Ball *et al.*, 1996.

6. Autres activités enzymatiques intervenant dans la biosynthèse du grain

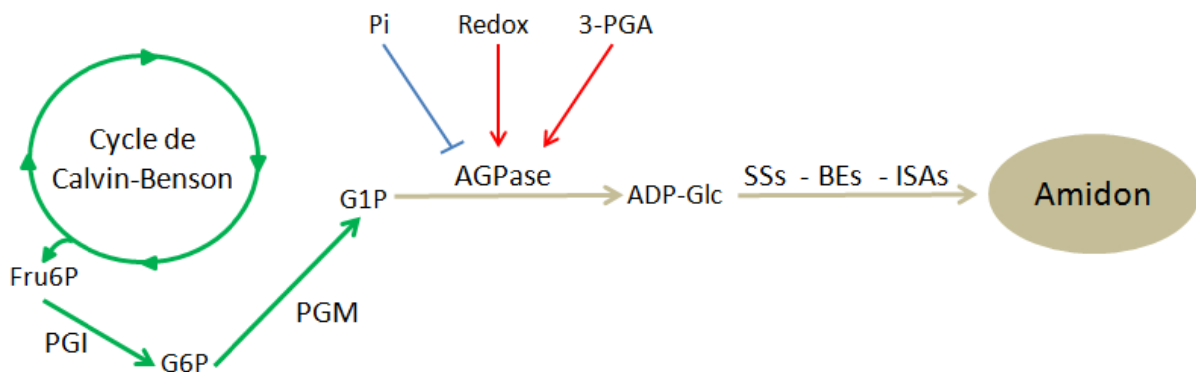


Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'amidon dans les feuilles. Le Fructose-6-phosphate, intermédiaire du cycle de Calvin-Benson est converti en Glucose-1-phosphate (G1P) par l'action successive de la phosphoglucoisomérase (PGI) puis de la phosphoglucomutase (PGM). Le G1P est substrat de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase), l'enzyme responsable de la synthèse du précurseur de la biosynthèse : l'ADP-glucose. Celui-ci est utilisé par les amidon synthases (SSs) qui en font des chaînes linéaires de glucoses qui sont d'abord ramifiées par les enzymes de branchement (BEs) puis réorganisées par les isoamylases (ISAs) pour permettre la cristallisation de la molécule d'amylopectine.

Les activités présentées précédemment sont suffisantes pour permettre la synthèse d'un polysaccharide semi-cristallin (**Figure 7**) mais certaines enzymes peuvent également jouer un rôle complémentaire, à commencer par l'amidon phosphorylase plastidiale Pho1 dont la fonction suspectée était de libérer du G1P à

partir de chaînes linéaires de glucoses. Cette enzyme ne semblait pas pouvoir être impliquée dans la synthèse de l'amidon. En effet, l'étude de plusieurs plantes mutantes ou lignées RNAi de différents organismes ne présentent aucun phénotype lié au métabolisme de l'amidon transitoire (le polysaccharide qui s'accumule dans les feuilles la journée et qui est dégradé la nuit). La lignée *phs1* d'*Arabidopsis thaliana* synthétise par exemple un amidon de structure normale et en quantité équivalente à la lignée sauvage (Zeeman *et al.*, 2004). Il en va de même dans les feuilles de *Solanum tuberosum* contenant un ARN interférant dirigé contre l'ARNm de l'enzyme (Sonnewald *et al.*, 1995) ou chez le mutant de la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii phoB* cultivée en mixotrophie (Dauvillée *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats argue donc en faveur du rôle suspecté de cette enzyme dans la dégradation de l'amidon, une fonction similaire à celle décrite pour la glycogène phosphorylase GlgP chez la bactérie (Alonso-Casajus *et al.*, 2006). De façon surprenante, lorsque le mutant de *Chlamydomonas* est cultivé en carence azotée, qui induit une accumulation massive d'un amidon de type réserve, la quantité du polysaccharide observée est amoindrie par rapport au sauvage et sa structure est modifiée avec un enrichissement en amylose et en longue chaînes de l'amylopectine. Le phénotype observé révèle une implication inattendue de l'amidon phosphorylase dans la synthèse de l'amidon de réserve chez la microalgue. Cette première observation a été confirmée par deux études analysant l'incorporation de G1P dans des coupes de tubercule de pomme de terre (Fettke *et al.*, 2010) et le phénotype du mutant homologue chez le riz (Sato *et al.*, 2008).

Par ailleurs, une seconde enzyme est parfois nécessaire au bon fonctionnement de la biosynthèse de l'amidon : la transglucosidase DPE1. Cette enzyme serait responsable du recyclage des malto-oligosaccharides produits par le débranchement effectué par les isoamylases en libérant un fragment de la chaîne débranchée et en transférant le reste du glucane en α -1,4 d'une chaîne de l'amylopectine. Ce rôle a été prouvé chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii* (Colleoni *et al.*, 1999a et b ; Wattedled *et al.*, 2003) puisque le mutant *sta11* déficient pour cette activité contient une quantité amoindrie d'amidon mais reste à ce jour le seul exemple montrant l'implication de cette enzyme dans la synthèse du polysaccharide.

L'intérêt alimentaire que présente la compréhension de la biosynthèse du grain d'amidon a conduit sur les 30 dernières années à une étude très approfondie de ce mécanisme chez une très grande variété d'espèces d'intérêt agronomique ou fondamental. Dans le même temps, l'étude des mécanismes régissant sa dégradation a été délaissée jusqu'au début du siècle et le développement récent de travaux sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ainsi que l'analyse des activités enzymatiques impliquées dans la germination des céréales ont permis de combler partiellement ce manque.

III. La dégradation de l'amidon

Dans les feuilles des végétaux, la quantité d'amidon présente dans les chloroplastes va suivre un cycle dépendant de la luminosité. Ainsi, celui-ci s'accumule durant la journée grâce à l'excès d'énergie produit via la photosynthèse et va être dégradé durant la nuit pour subvenir aux besoins de la plante qui poursuit sa croissance. L'importance de ce polysaccharide chez les végétaux fait qu'en l'absence de synthèse ou de dégradation, la plante sera affectée dans sa croissance. L'essentiel des études concernant le catabolisme du polysaccharide de réserve a longtemps porté sur le rôle des hydrolases mais, plus récemment, d'autres enzymes dont l'activité affecte les propriétés même du grain d'amidon, ont été caractérisées.

1. Solubilisation du grain

La principale difficulté rencontrée au cours de la dégradation de l'amidon réside dans son caractère semi-cristallin qui le rend inaccessible aux activités hydrolytiques. La première étape requise pour cette voie catabolique consiste donc en la solubilisation de ses chaînes externes de glucoses qui est rendue possible grâce à la phosphorylation de certains résidus. Cette modification de l'amidon est effectuée par des enzymes de type dikinase telle que l' α -glucan, water dikinase (Gwd) qui transfère le groupement phosphate en β d'une molécule d'ATP sur les résidus de glucose en position C6 principalement, le phosphate en γ étant lui libéré sous forme de phosphate inorganique (**Figure 8** ; Ritte *et al.*, 2002). Le rôle de cette protéine, désignée auparavant par le terme R1, a pu être découvert grâce à des travaux réalisés notamment chez *Solanum tuberosum* qui ont mis en évidence une diminution générale du taux de phosphate dans le grain d'amidon associée à un défaut de dégradation et donc à un phénotype *sex* (Starch EXcess) dans les feuilles (Lorberth *et al.*, 1998). Gwd est capable de se lier de manière réversible au grain d'amidon via un domaine de liaison aux carbohydrates (Carbohydrate Binding Module, CBM ; Mikkelsen *et al.*, 2006) et ceci d'une façon dépendante de l'état physiologique de la plante puisque l'association au grain est plus forte durant la nuit, période où la dégradation s'effectue (Ritte *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs lignées *sex1* déficientes pour l'activité Gwd ont également été caractérisées et montrent le même phénotype que chez la pomme de terre, à savoir

une diminution du taux de phosphorylation du grain d'amidon qui s'approche de zéro pour certaines, associée à une augmentation de la quantité d'amidon accumulée tout au long du cycle et un niveau de dégradation très diminué voir aboli au cours de la nuit (Caspar *et al.*, 1991 ; Yu *et al.*, 2001). L'action de Gwd sur le grain d'amidon a le même effet qu'une solubilisation thermique et suffit *in vitro* à le rendre accessible aux activités hydrolytiques puisque l'activité β -amylase sur une molécule préalablement phosphorylée par Gwd est deux fois plus élevée que sur un grain « nu » (Edner *et al.*, 2007) mais il semblerait qu'il en soit autrement *in vivo*.

En effet, une autre isoforme de Gwd, nommée phosphoglucan water dikinase (Pwd) intervient également au cours de ce processus de phosphorylation mais n'agit que sur des résidus préalablement phosphorylés en C6. Elle possède le même mode d'action que Gwd mais transfère le groupement phosphate en position C3 du résidu. L'existence et l'implication de cette deuxième dikinase a été mise en évidence par deux études simultanées effectuées chez *Arabidopsis thaliana* et qui ont montré que la lignée mutante est affectée dans sa dégradation (Baunsgaard *et al.*, 2005 ; Kötting *et al.*, 2005). En effet, la lignée *pwd* d'*Arabidopsis* présente une diminution de la phosphorylation des résidus de glucose en position C3 corrélée à un phénotype sex mais dans une moindre mesure que chez la plante *gwd*. Cette différence est probablement due au fait que la phosphorylation partielle par Gwd dans un premier temps est suffisante pour enclencher l'hydrolyse d'une partie de l'amidon. De plus, l'action de Pwd est également dépendante de l'état physiologique de la plante puisqu'elle se lie au grain d'amidon de préférence durant la nuit (Kötting *et al.*, 2005).

Une troisième isoforme de Gwd a été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* : AtGwd2. Elle possède le même mode d'action que Gwd1 *in vitro* mais n'est *a priori* pas impliquée dans le métabolisme de l'amidon puisque la lignée mutante *gwd2* ne montre aucun phénotype amidon et cette protéine n'est pas adressée au chloroplaste (Glaring *et al.*, 2007).

Gwd et Pwd vont donc agir de manière successive et phosphoryler les résidus de glucose en position C6 et C3, respectivement (Ritte *et al.*, 2006). Cette phosphorylation perturbe l'organisation structurale de l'amylopectine et la rend accessible aux activités hydrolytiques comme les β -amylases qui sont incapables d'agir sur un substrat cristallin (Hejazi *et al.*, 2008). Toutefois, une étude menée *in*

in vitro a montré que les molécules de maltose libérées par les β -amylases sont exclusivement non-phosphorylées (Edner *et al.*, 2007) et Takeda et Hizukuri en 1981 avaient déjà révélé l'incapacité de ces β -amylases à cliver un substrat phosphorylé. La digestion complète du grain nécessite donc l'intervention d'une activité supplémentaire de déphosphorylation.

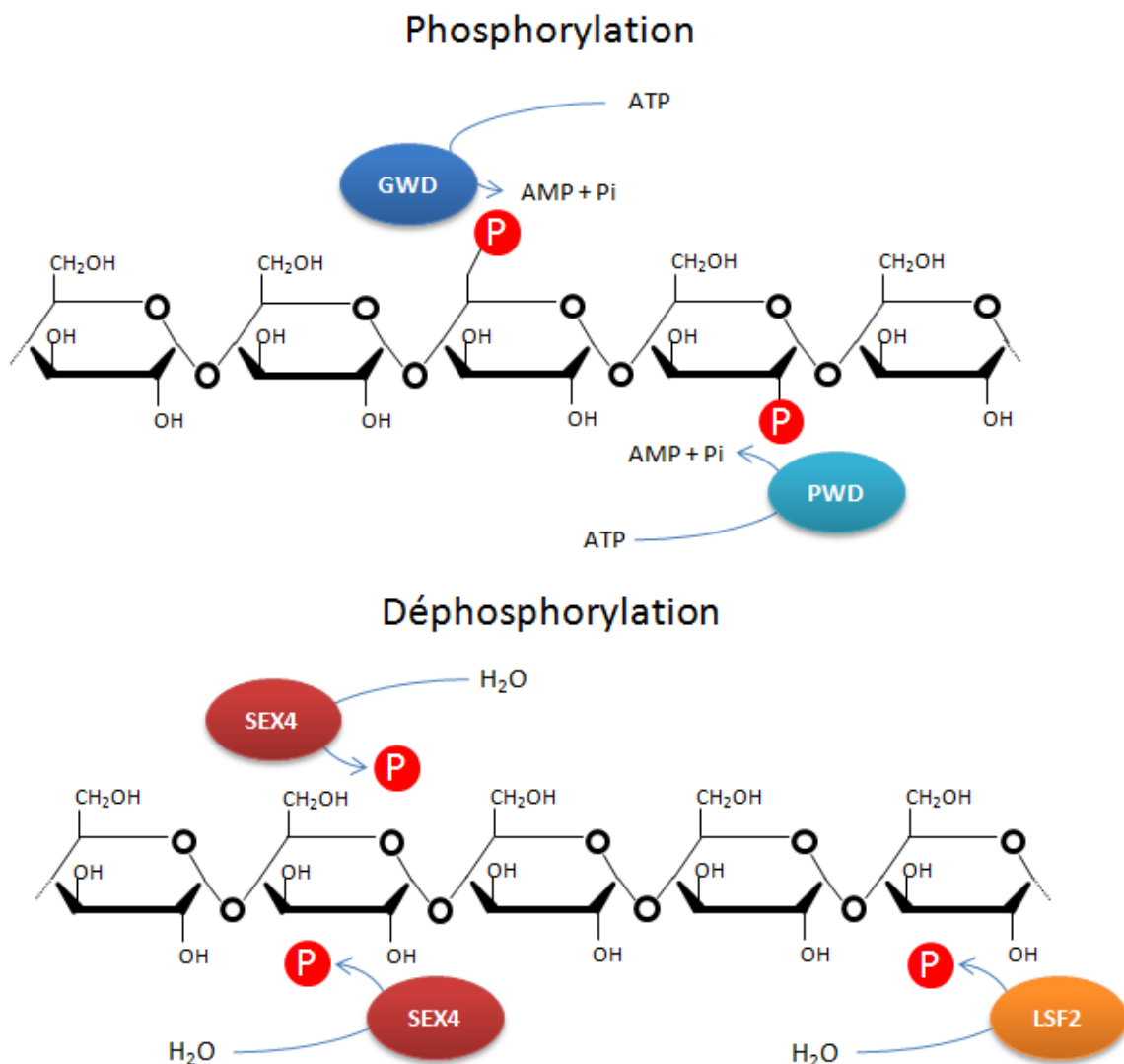


Figure 8 : Spécificités de substrat des dikinases et des phospho-glucane phosphatases. Les dikinases Gwd et Pwd sont capables de phosphoryler en position C6 et C3, respectivement. La phosphatase Sex4 peut déphosphoryler aux deux positions tandis que Lsf2 est C3-spécifique.

Cette activité est principalement représentée chez *Arabidopsis thaliana* par la protéine Sex4 qui est une phospho-glucane phosphatase muni d'un CBM qui lui permet de se lier à l'amidon (Kerk *et al.*, 2006 ; Kötting *et al.*, 2009). La lignée *sex4* d'*Arabidopsis* présente évidemment un phénotype *sex* avec une accumulation de

petits glucanes phosphorylés. La protéine manquante était dans un premier temps prédite comme étant une protéine phosphatase à double spécificité (DSP : dual-specificity phosphatase ; Niittylä *et al.*, 2006) mais des comparaisons de structure et de fonction ont ensuite permis de la relier à la laforine, une DSP capable de déphosphoryler des carbohydrates de structure complexe et notamment le glycogène chez l'homme (Worby *et al.*, 2006 ; Gentry *et al.*, 2007). Son absence conduit à une hyper-phosphorylation de la molécule associée à une dérégulation du branchement et induit la formation des particules de Lafora, forme insoluble de glycogène (Tagliabracci *et al.*, 2007). Au niveau de l'individu, cela se traduit par une épilepsie chez l'enfant qui est fatale sous dix ans. La fonction de cette protéine a donc conduit à révéler le rôle de Sex4 dans la déphosphorylation des résidus de glucose préalablement phosphorylés par Gwd et Pwd (Kötting *et al.*, 2009). Plus particulièrement, Sex4 est capable d'hydrolyser le groupement phosphate aux deux positions C6 et C3 mais montre une préférence pour la position C6 (Hejazi *et al.*, 2010).

Deux autres gènes codant des DSPs similaires à Sex4 existent dans le génome d'*Arabidopsis* et il apparaît que c'est Lsf2 (Like SexFour 2) qui est la plus directement impliquée dans la dégradation de l'amidon. Comme Sex4, Lsf2 se lie au grain d'amidon malgré l'absence de CBM et va déphosphoryler spécifiquement en position C3 (Santelia *et al.*, 2011). Par conséquent, l'amidon de la lignée *lsf2* est fortement phosphorylé en C3 par rapport à la lignée sauvage, mais pas suffisamment pour induire un phénotype *sex*, ceci s'expliquant par la redondance fonctionnelle avec Sex4. Toutefois, l'absence conjointe de Sex4 et Lsf2 conduit à une aggravation du phénotype par rapport au simple mutant *sex4*. Une seconde phosphatase, Lsf1 est également impliquée dans le catabolisme de l'amidon comme le montre le phénotype *sex* observé chez la lignée mutante (Comparot-Moss *et al.*, 2010) mais le taux de phosphorylation de l'amidon y est normal aux deux positions et aucune activité catalytique n'a pu être détectée à partir de l'enzyme recombinante. L'hypothèse formulée par les auteurs est que Lsf1 serait une protéine phosphatase comme la plupart des DSPs et qu'elle ciblerait des enzymes directement impliquées dans la dégradation, les activant ainsi par déphosphorylation.

L'action couplée des dikinases Gwd et Pwd ; et des phosphatases Sex4 et Lsf2 permet donc de rendre le polysaccharide totalement accessible aux activités de dégradation (**Figure 9**). Deux voies bien distinctes peuvent être impliquées dans ce processus : la voie phosphorolytique et la voie amylolytique.

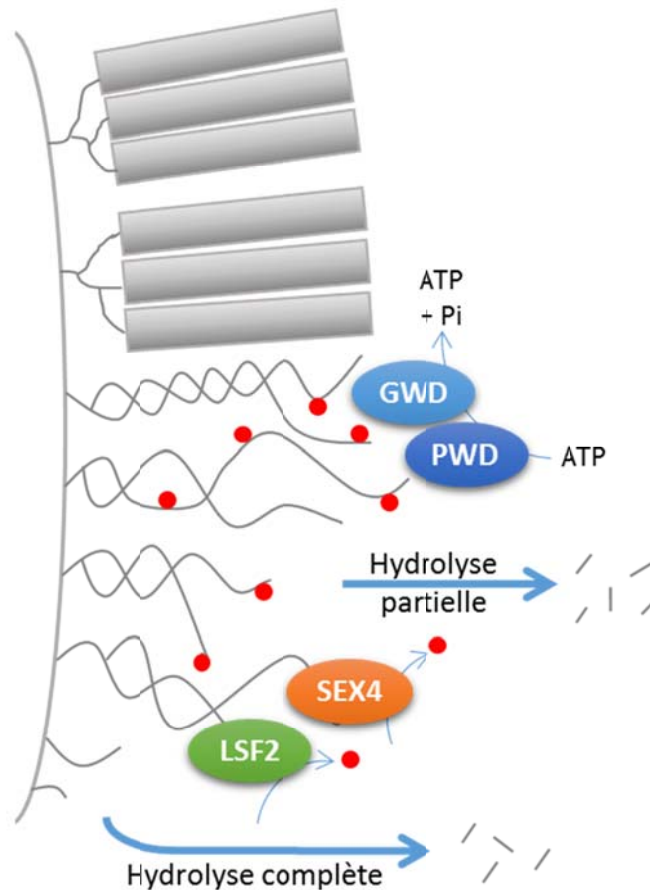


Figure 9 : Principe de la solubilisation du grain. La solubilisation du grain est initiée par phosphorylation via les activités dikinases de Gwd et Pwd. Cette phosphorylation rompt la structure semi-cristalline sur la surface extérieure du polysaccharide, permettant sa digestion partielle par les activités hydrolytiques. Les phosphatases Sex4 et Lsf2 libèrent les glucanes restants de leurs groupements phosphates, la digestion peut alors être complétée.

2. Voie phosphorolytique versus voie amylolytique

Par le passé, la voie phosphorolytique était présumée comme étant la plus fortement impliquée dans la dégradation de l'amidon mais de nombreuses études ont depuis orienté les travaux vers la voie amylolytique.

L'amidon phosphorylase catalyse la libération d'un G1P à partir d'un glucane linéaire mais peut également réaliser la réaction inverse, c'est-à-dire l'élongation d'une chaîne de glucoses. L'orientation de la fonction de cette phosphorylase dans la

voie anabolique ou catabolique dépend du rapport entre le phosphate inorganique (Pi) et le G1P (Rathore *et al.*, 2009). Un faible rapport Pi/G1P stimule l'élongation tandis qu'un haut rapport induit plutôt la dégradation. Dans le chloroplaste et plus particulièrement durant la nuit, le rapport Pi/G1P est largement en faveur de la réaction catabolique (Preiss et Sivak, 1996) mais la phosphorylase est malgré tout capable de réaliser l'élongation en présence d'une forte concentration en Pi (Hwang *et al.*, 2010).

L'action de l'amidon phosphorylase produit donc du G1P mais celui-ci ne pourra pas être utilisé tel quel dans le cytosol pour la synthèse de saccharose. En effet, aucun transporteur d'hexose-phosphate dans le sens stroma-cytosol n'est présent sur l'enveloppe du chloroplaste (Weber, 2004). Il existe des protéines membranaires responsables du transport de G6P et potentiellement capables de prendre en charge le G1P mais celles-ci ne sont pas exprimées dans les feuilles mais plutôt dans les tissus hétérotrophiques (Flügge, 1998 ; Niewiadomski *et al.*, 2005).

La seule possibilité d'utilisation du G1P demeure alors dans sa conversion en triose-phosphate qui serait exporté via les translocateurs à triose-phosphate (TPT) qui, une fois dans le cytosol, seront pris en charge par les enzymes de la néoglucogenèse pour être finalement utilisé pour la synthèse de glucose. Là encore, l'étude de mutants nuls ou RNAi a permis de démontrer le côté anecdotique de cette voie par rapport au catabolisme de l'amidon. En effet, les lignées d'*Arabidopsis thaliana* déficientes pour le TPT (*tpt1*) ou exprimant un ARN antisens de la forme cytosolique de la fructose-1,6-biphosphatase –qui hydrolyse le groupement phosphate en C1 du fructose au cours de la néoglucogenèse– ne présentent aucun problème de dégradation de l'amidon (Strand *et al.*, 2000 ; Schneider *et al.*, 2002). Le même type de résultat a également été observé chez *Solanum tuberosum* (Riesmeier *et al.*, 1993 ; Zrenner *et al.*, 1996).

De plus, les trioses-phosphate ne sont clairement pas la forme majoritaire d'export du carbone au cours de la dégradation. D'après des travaux réalisés chez l'épinard, la tomate ou le haricot, plus des trois quarts du carbone exporté l'est sous forme d'hexoses neutres simples ou doubles, à savoir le glucose et le maltose (Stitt et Heldt, 1981 ; Schleucher *et al.*, 1998 ; Servaites et Geiger, 2002). Weise *et al.* en 2004 ont même identifié le maltose comme la principale forme chez *Arabidopsis*

thaliana et ont supposé que la dégradation phosphorolytique de l'amidon sert d'autres buts que l'approvisionnement de la plante en énergie.

L'ensemble de ces informations explique l'absence de phénotype de dégradation observé chez la lignée *phs1* d'*Arabidopsis* (Zeeman *et al.*, 2004) et il est désormais supposé que le G1P produit par l'amidon phosphorylase serait utile pour (1) la photorespiration, (2) l'alimentation de la voie des pentoses-phosphate (Zeeman *et al.*, 2004) ou (3) le maintien du niveau de certains intermédiaires du cycle de Calvin-Benson ou d'autres métabolismes chloroplastiques (Lu *et al.*, 2006). Toutefois, elle exercerait une influence même minime sur le métabolisme de l'amidon. En effet, lorsque que l'on inhibe la voie hydrolytique, l'absence de Phs1 supprime ou atténue fortement le phénotype sex mais aucune explication satisfaisante n'est à ce jour avancée (Malinova *et al.*, 2014).

3. Hydrolyse du polysaccharide

Les β -amylases

La dégradation du grain d'amidon passe donc principalement par la voie amylolytique et, étant donné les observations de Weise *et al.* (2004) sur l'omniprésence du maltose parmi les produits de dégradation, il est logique de supposer un rôle majeur des β -amylases. En effet, ces β -amylases sont des exoamylases qui hydrolysent les liaisons en α -1,4 et dont le seul produit est le maltose. La compréhension du rôle de ces β -amylases dans la dégradation de l'amidon transitoire a essentiellement été permise grâce aux études des lignées d'insertion d'*Arabidopsis thaliana*. Neuf gènes codant des β -amylases sont présents dans son génome et les analyses de séquences permettent de les classer en quatre sous-familles (Fulton *et al.*, 2008). La première comprend Bam1 et Bam3. Toutes deux sont plastidiales et catalytiques (Sparla *et al.*, 2006 ; Lao *et al.*, 1999) mais Bam3 semble être plus importante puisque les lignées *bam3* suraccumulent l'amidon et peinent à le dégrader tandis qu'une lignée *bam1* présente un phénotype amidon normal (Fulton *et al.*, 2008 ; Kaplan et Guy, 2005). Bam1 est malgré tout impliquée dans la dégradation de l'amidon transitoire puisque le double mutant *bam1bam3* présente un phénotype sex accentué par rapport au simple mutant *bam3* (Fulton *et al.*, 2008).

La seconde sous-famille est composée de Bam5 et Bam6 qui sont deux paralogues, catalytiques mais seule Bam6 est chloroplastique (Monroe *et al.*, 2014). Bam6 est très peu documentée et son rôle dans la dégradation de l'amidon semble dépendant du niveau de développement de la plante (Monroe *et al.*, 2014). Bam5, du fait de sa localisation cytosolique, n'est *a priori* pas impliquée dans la dégradation de l'amidon. En fait, les résultats de différentes études divergent, Laby *et al.* ont montré que cette activité représente la majorité de l'activité β -amylasique tandis que Fulton *et al.* indiquent qu'une lignée *bam5* conserve 80 % de cette activité. D'autre part, Kaplan et Guy ont observé un phénotype *sex* alors que Fulton et Laby n'ont rien détecté de tel. Finalement, aucune étude n'a permis de prouver l'implication de Bam5 dans la dégradation.

Bam2, Bam7 et Bam8 représentent la troisième sous-famille et là encore, Bam2 et Bam7 sont des paralogues (Fulton *et al.*, 2008). Bam2 est catalytique et plastidiale mais son absence n'a aucun impact sur le métabolisme de l'amidon (Kaplan et Guy, 2005 ; Fulton *et al.*, 2008). Bam7 et Bam8 sont très particulières puisque leur activité sur amylopectine est minime par rapport à Bam1 ou Bam3, qu'elles sont adressées au noyau et contiennent un domaine BZR1 impliqué dans la liaison à l'ADN (Reinhold *et al.*, 2011). Elles agissent donc comme des facteurs de transcription mais aucun effet sur la dégradation de l'amidon n'est documenté et leurs cibles ne sont pas encore bien identifiées.

Enfin, la dernière classe de β -amylases est composée de Bam4 et Bam9. Leurs séquences protéiques révèlent, au niveau d'acides aminés clés, quelques délétions les rendant catalytiquement inactives (Fulton *et al.*, 2008). Bam9 est très peu exprimée dans les feuilles, ce qui met en doute sa participation au catabolisme (Chandler *et al.*, 2001). Bam4, malgré son absence d'activité catalytique, est tout de même capable de se lier à l'amidon (Li *et al.*, 2009a) et est impliquée dans sa dégradation dans le chloroplaste où elle est adressée. En effet, la lignée *bam4* présente une altération de la dégradation de l'amidon (Fulton *et al.*, 2008) mais les modalités de son action sont encore à éclaircir.

L'importance des β -amylases dans la dégradation de l'amidon a également été mise en évidence dans les feuilles de *Solanum tuberosum* où une isoforme d'AtBam3 a été inactivée par ARN interférence. La réduction de seulement 20 % de

l'expression de cette β -amylase conduit à l'expression d'un phénotype sex et à une diminution du taux de dégradation de plus de 60 % (Scheidig *et al.*, 2002).

Les enzymes de débranchement

Les β -amylases permettent donc la dégradation des chaînes linéaires de glucane mais l'activité de ces enzymes n'est pas possible face à une liaison en α -1,6. L'hydrolyse complète du polysaccharide nécessite donc l'intervention d'une activité de débranchement. Il existe 4 enzymes de débranchement chez *Arabidopsis thaliana* : Isa1 et Isa2 qui, comme vu précédemment, sont impliquées dans le processus de biosynthèse de l'amidon ; Isa3 et la pullulanase ou limite dextrinase Lda. Ces deux enzymes ont la particularité d'être très actives sur les β -limite dextrines, produits de l'action des β -amylases sur l'amylopectine. L'absence de l'isoamylase 3 induit un phénotype sex chez la plante aussi bien en fin de jour qu'en fin de nuit, mettant en évidence son rôle dans la dégradation (Wattebled *et al.*, 2005 ; Delatte *et al.*, 2006). Au contraire, une lignée *lda* contient une quantité normale d'amidon tout au long de son développement. Malgré tout, elle peut tout de même avoir un rôle à jouer puisque son absence dans un contexte *isa3* aggrave le phénotype observé chez le simple mutant avec en plus une accumulation de β -limite dextrines (Delatte *et al.*, 2006). Ces deux enzymes de débranchement ont donc des fonctions redondantes qui permettent la libération de petits glucanes branchés produits par la digestion β -amylolytique. Delatte *et al.* (2006) ont proposé que dans une plante sauvage, Isa3 libère les malto-oligosaccharides branchés au niveau du grain d'amidon tandis que la pullulanase agirait plutôt en solution au niveau des β -limite dextrines qui se retrouvent dans le stroma.

L'implication de ces deux enzymes est également démontrée chez le riz où le mutant *isa3* contient encore, d'après la coloration des feuilles à l'iode, une quantité significative d'amidon transitoire en fin de nuit (Yun *et al.*, 2011) ; ou chez le maïs avec la constatation que la vitesse de dégradation est réduite dans les feuilles de la lignée nulle *pu1* (Dinges *et al.*, 2003).

Les β -amylases et les enzymes de débranchement permettent donc la production massive de maltose dans le chloroplaste mais d'autres enzymes pouvant

intervenir dans la dégradation de l'amidon sont également actives dans le chloroplaste : les α -amylases et la D-enzyme (Lin *et al.*, 1988b).

Les α -amylases

Les α -amylases sont des endoamylases qui sont capables de libérer des malto-oligosaccharides de différentes tailles et pouvant être branchés. Les α -amylases végétales sont regroupées en trois familles. Ces trois familles sont chacune représentées par un gène chez *Arabidopsis thaliana* et toutes trois sont potentiellement actives au vu de leurs séquences protéiques (Stanley *et al.*, 2002). Sur les trois isoformes existantes, une seule a été localisée au chloroplaste : Amy3 (Yu *et al.*, 2005). Elle est donc la seule isoforme potentiellement impliquée dans la dégradation de l'amidon mais la lignée *amy3* ne présente aucun phénotype amidon. Cette enzyme n'est donc pas indispensable à la dégradation de l'amidon en conditions normales. Elle est malgré tout impliquée puisque son absence chez un mutant *isa3* renforce le phénotype observé (Streb *et al.*, 2012). Logiquement, les lignées dépourvues d'Amy1 ou Amy2 n'ont également aucun phénotype puisqu'elles ne sont pas plastidiales. Amy2 n'a pas encore fait l'objet de caractérisations plus poussées mais il est admis qu'Amy1, qui est sécrétée, est impliquée au moment de la sénescence (Doyle *et al.*, 2007 ; Jie *et al.*, 2009). Une α -amylase chloroplastique a également été étudiée dans la feuille d'*Oryza sativa* où son absence suffit à provoquer un phénotype sex mais le défaut de dégradation n'a pas été étudié (Asatsuma *et al.*, 2005).

La D-Enzyme

L'hydrolyse pratiquée par les β -amylases produit, en plus du maltose, une quantité non négligeable de maltotriose ne pouvant pas être métabolisée par ces enzymes. Ces produits sont pris en charge chez *Arabidopsis* par l'enzyme disproportionnante Dpe1 qui comme vu précédemment, recycle les malto-oligosaccharides en les transférant en α -1,4 d'une autre chaîne avec libération d'une molécule de glucose. La chaîne allongée pourra ensuite être digérée par les activités amylasiques. Cette fonction est suffisamment importante dans la plante pour que l'accumulation de ces malto-oligosaccharides engendre un défaut de dégradation

chez la lignée *dpe1* d'*Arabidopsis* (Crichtley *et al.*, 2001). Le rôle de Dpe1 sur la dégradation de l'amidon a également été mis en évidence chez *Solanum tuberosum* (Lütken *et al.*, 2010).

Les produits finaux de la dégradation plastidiale de l'amidon sont donc le maltose grâce aux β -amylases et le glucose comme co-produit de l'action de Dpe1 (Figure 10). Ces produits seront ensuite pris en charge dans le cytosol, lieu de fabrication du saccharose.

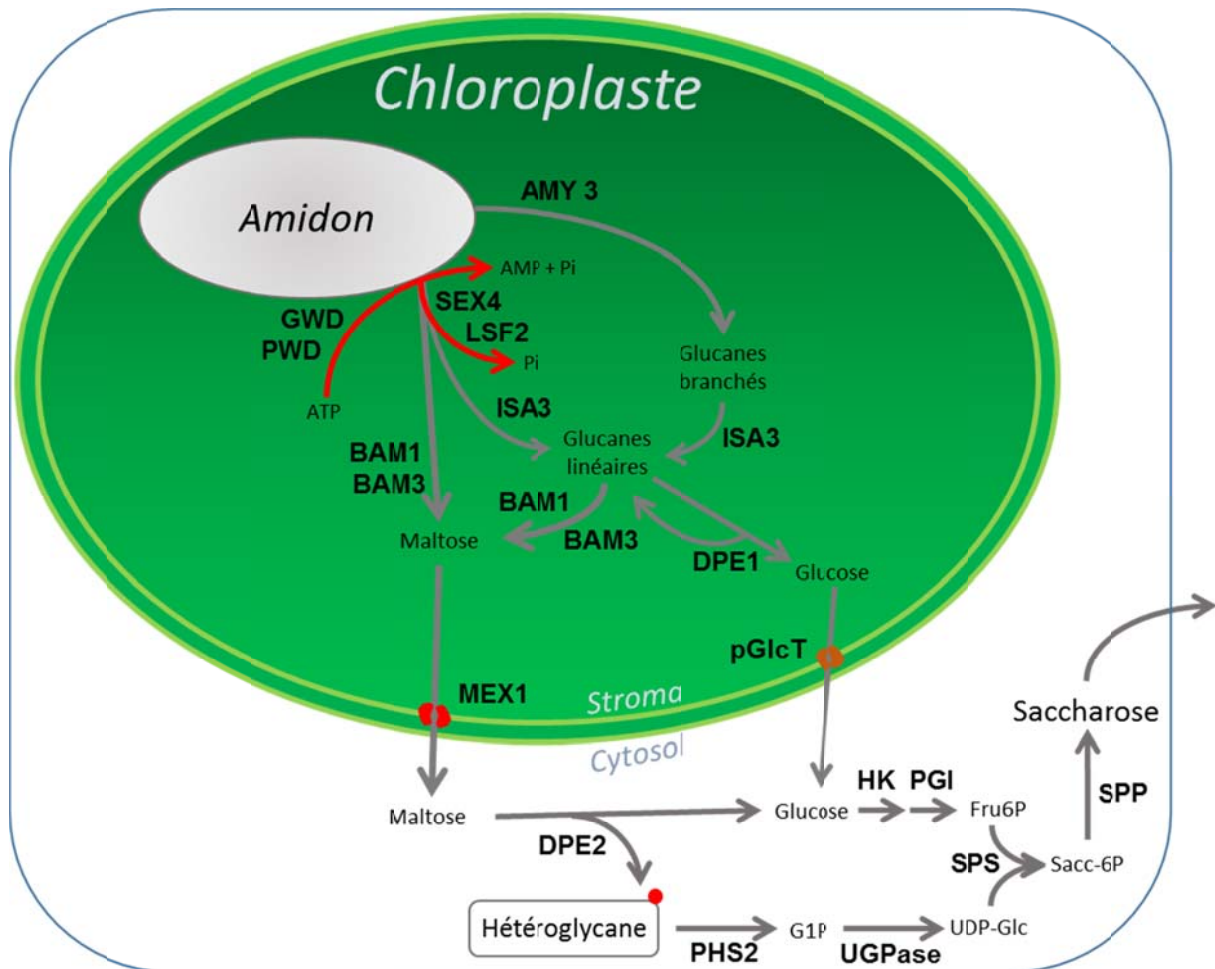


Figure 10 : Modèle de dégradation de l'amidon chez *Arabidopsis thaliana*. La phosphorylation du polysaccharide par les dikinases Gwd et Pwd permet sa solubilisation et sa digestion partielle par les activités hydrolytiques (Bam, Isa3, Amy3). L'hydrolyse des groupements phosphates par les phosphoglucane phosphatases permet sa digestion complète, produisant ainsi en majorité du maltose. Le maltotriose, résidu de la dégradation par les amylases peut être pris en charge par l'enzyme disproportionnante qui libère du glucose et transfère le reste de la molécule en α -1,4 d'un glucane. Le maltose est ensuite exporté du stroma du chloroplaste vers le cytosol où il est converti en saccharose qui sert à la fourniture d'énergie pour la plante. GWD: Glucan Water Dikinase ; PWD: Phosphoglucan Water Dikinase ; SEX4: Starch Excess 4 ; LSF2: Like Sex Four 2 ; AMY3: α -Amylase 3 ; BAM1 & 3: β -Amylases 1 et 3 ; ISA3: Isoamylase 3 ; DPE1 & 2: Disproportionating Enzyme 1 et 2 ; MEX1: Maltose Exporter 1 ; pGlcT: Transporteur de Glc plastidiale ; PHS2: Glucan Phosphorylase 2 ; HK: Hexokinase ; PGI: Phosphoglucoisomérase ; UGPase: UDP-Glc Pyrophosphorylase ; SPS: Sucrose Phosphate Synthase ; SPP: Sucrose Phosphate Phosphatase.

4. Export du maltose et du glucose vers le cytosol

Il est depuis longtemps établi que la membrane du chloroplaste est perméable au maltose (Herold *et al.*, 1981 ; Rost *et al.*, 1996) mais, en l'absence de transporteur de maltose identifiable par comparaison de séquences, l'élucidation du mécanisme impliqué dans son export du stroma vers le cytosol a été permise grâce à une approche de génétique formelle. En effet, la lignée déficiente pour la fonction en question a été isolée par crible d'une banque de mutants *sex* et recherche d'un phénotype de suraccumulation de maltose chez *Arabidopsis*. Cette approche a permis d'isoler une lignée dite *mex* pour *Maltose EXcess* dont l'accumulation de maltose au cours de la nuit est jusqu'à cent fois plus importante que chez la lignée sauvage (Niittylä *et al.*, 2004). La protéine codée par le locus *MEX1* représentait une nouvelle catégorie de protéine puisqu'elle n'était similaire à aucune autre de la plante. Elle est prédite membranaire et adressée au chloroplaste et sa fonction de transport de maltose a été confirmée par la complémentation d'une souche d'*Escherichia coli* mutante *malF* donc déficiente pour l'import du maltose du milieu vers le cytoplasme, via l'expression de la forme recombinante de Mex1. Ce transporteur n'a pas été caractérisé en détails depuis mais il est supposé que le passage du maltose se fait de façon passive, le gradient se formant au cours de la nuit entre le stroma et le cytosol étant suffisant pour cela (Weise *et al.*, 2005).

En plus de l'accumulation de maltose et du phénotype *sex*, la lignée mutante *mex1* présente également une petite taille et une coloration pâle de ses feuilles due à une diminution de la quantité de chlorophylle (Niittylä *et al.*, 2004). Ce phénomène serait dû à l'accumulation du maltose dans le chloroplaste qui engendrerait un stress osmotique néfaste pour l'appareil photosynthétique. L'importance du phénotype observé chez la lignée *mex1* confirme le rôle primordial de la voie maltose au cours de la dégradation de l'amidon.

Par conséquent, la voie d'export du glucose vers le cytosol serait moins importante dans ce processus et les lignées déficientes n'exhiberaient pas un phénotype aussi fort. C'est effectivement le cas comme le montre l'analyse de deux lignées *pglct-1* et *pglct-2*, déficientes pour deux formes de transporteur de glucose de l'enveloppe plastidiale, chez lesquelles le profil d'accumulation et de dégradation de

l'amidon est tout à fait similaire à celui de la lignée sauvage (Cho *et al.*, 2011). Toutefois, le double mutant *mex1pglct-1* est plus affecté dans la dégradation que la lignée *mex1* et il est également altéré dans la synthèse, confirmant ainsi le rôle de ce transporteur dans le métabolisme et plus particulièrement la dégradation de l'amidon (Cho *et al.*, 2011)

On notera que lorsque l'on bloque les deux voies principales maltose et glucose soit par un mutant *mex1dpe1* soit par une lignée *mex1pglct-1*, la dégradation de l'amidon est bien plus fortement altérée que dans le simple mutant *mex1* et cela s'en ressent sur le phénotype de croissance de la plante qui exhibe un phénotype nain extrême (Niittylä *et al.*, 2004 ; Cho *et al.*, 2011).

5. Prise en charge cytosolique du maltose

La prise en charge cytosolique du maltose doit aboutir, via une série de conversions enzymatiques, à la production d'hexoses phosphates qui serviront de précurseurs à la synthèse de saccharose. Plusieurs activités capables de prendre en charge ce maltose sont connues et pourraient *a priori* être impliquées chez la plante : une maltase, une maltose phosphorylase et une 4- α -glucanotransférase. Les maltases sont des α -glucosidases ayant une préférence de substrat pour le maltose. Cinq gènes pouvant coder ce type d'enzyme existent dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* mais aucun rôle dans la dégradation de l'amidon n'a été décrit. Les différentes lignées mutantes étudiées ont plutôt révélé un rôle dans la biosynthèse de la cellulose (Gillmor *et al.*, 2002) et le développement des graines (Boisson *et al.*, 2001). La seconde possibilité passe par la phosphorylation du maltose par une activité maltose phosphorylase. Ce type d'activité libère une molécule de glucose et une autre de G1P. Toutefois, aucune activité de ce type n'a été détectée chez le pois (Kakefuda *et al.*, 1986). De même, aucun gène candidat pour cette fonction n'a été identifié chez *Arabidopsis*.

Puisque ces deux types d'enzyme ne semblent pas être responsables de la conversion du maltose, seul un mécanisme disproportionnant permet d'expliquer le devenir du maltose dans le cytosol. Chez *Escherichia coli*, le maltose entré dans le cytoplasme via le transporteur MalF est pris en charge par MalQ, une 4- α -glucanotransférase (ou transglucosidase ou amyloamylase) qui libère l'un des deux

glucoses et transfère le second sur l'extrémité non réductrice d'un malto-oligosaccharide (Boos et Shuman, 1998). Là où Mex1 est l'équivalent fonctionnel de MalF dans la membrane, l'équivalent de MalQ est représenté par la transglucosidase Dpe2 chez la plante. A partir de maltose, cette enzyme transfère un résidu de glucose vers une molécule acceptrice d'hétéroglycane cytosolique (Chia *et al.*, 2004 ; Lu et Sharkey, 2004 ; Lloyd *et al.*, 2004) et libère le second résidu. L'appellation Dpe2 est due à la similarité de séquence avec la 4- α -glucanotransférase plastidiale Dpe1. Les plantes déficientes pour l'activité Dpe2 affichent un phénotype sex et accumulent jusqu'à deux cent fois plus de maltose, que ce soit chez *Arabidopsis* (Chia *et al.*, 2004 ; Lu et Sharkey, 2004) ou *Solanum tuberosum* (Lloyd *et al.*, 2004). Preuve de la proximité des systèmes bactérien et végétal, MalQ est capable de compléter presque totalement la lignée *dpe2* d'*Arabidopsis thaliana* (Ruzanski *et al.*, 2013). L'inverse est par contre moins vrai à cause de la différence de spécificité de substrat entre les deux enzymes, Dpe2 ne trouvant pas chez la bactérie son accepteur cytosolique et possédant une faible activité sur les malto-oligosaccharides (Lu *et al.*, 2006).

Dpe2 interagit donc dans le cytosol avec une molécule d'hétéroglycane sur laquelle elle transfère un glucose. Cette molécule a été clairement identifiée chez différents organismes tels que le pois ou *Solanum tuberosum* (Fettke *et al.*, 2004 ; Fettke *et al.*, 2005a et b). Elle est composée d'une grande variété de sucres (galactose, arabinose, glucose, fucose, rhamnose, xylose, mannose) dont l'importance relative est très variable d'une espèce à l'autre. Dpe2 interagit avec cette molécule via ses CBMs (Steichen *et al.*, 2008) et le glucose va donc s'accumuler pour former une extension glycanique qui va devoir être ensuite convertie en sucres simples pour alimenter la synthèse de saccharose.

En plus de Dpe2, l'hétéroglycane interagit également avec une forme cytosolique d'amidon phosphorylase (Yang et Steup., 1990 ; Fettke *et al.*, 2004). Cette protéine est capable de libérer par phosphorolyse les glucoses accumulés sur l'hétéroglycane sous forme de G1P. Par conséquent, la lignée d'*Arabidopsis phs2* contient un hétéroglycane plus riche en glucoses, ce qui semble également avoir un effet sur l'activité de Dpe2 puisque le maltose s'y accumule dans des quantités quatre fois supérieures à la lignée sauvage (Lu *et al.*, 2006). Toutefois, le niveau de dégradation y est normal, contrairement aux autres lignées affectées pour une

activité catabolique. Ceci suggère l'existence d'une voie annexe de prise en charge du glucose accumulé sur l'hétéroglycane. Lu *et al.* ont proposé l'intervention d'une activité hydrolytique de type α -glucosidase libérant du glucose qui serait ensuite converti en G6P par l'hexokinase.

Finalement, l'action conjointe de Dpe2 et Phs2 aboutit à la production de glucose et de G1P (**Figure 10**). Le glucose est rapidement converti en G6P par l'hexokinase pour maintenir un gradient en faveur de l'export vers le cytosol. La forme cytosolique de Pgi peut ensuite synthétiser du fructose-6-phosphate (Fru6P) à partir de celui-ci. D'autre part, le G1P libéré par Phs2 peut servir de substrat à l'UDP-glucose pyrophosphorylase, produisant ainsi de l'UDP-glucose. Fru6P et UDP-Glc servent ensuite à la synthèse de saccharose en deux étapes. Dans un premier temps, la saccharose-phosphate synthase catalyse la production de saccharose-6-phosphate puis, dans un second temps, la saccharose-phosphate phosphatase l'hydrolyse en saccharose et phosphate inorganique. Le saccharose ainsi produit pourra servir le but final de la dégradation de l'amidon transitoire : fournir de l'énergie au reste de la plante pour poursuivre la croissance.

6. La dégradation de l'amidon de réserve

A contrario de l'amidon transitoire, la fonction de l'amidon de réserve est de servir de pool énergétique pour initier la croissance d'une nouvelle plante. Il va donc s'accumuler notamment dans les graines des céréales, mais aussi dans les tubercules de pomme de terre par exemple. La compréhension de sa dégradation au cours de la germination représente donc un challenge important au vu de l'utilisation de graines germées dans l'industrie. Par conséquent, le catabolisme de l'amidon chez l'orge plus particulièrement fait l'objet d'un grand intérêt. Au contraire, la dégradation de l'amidon de pomme de terre est assez peu étudiée, si ce n'est par rapport au phénomène de « cold-sweetening », c'est-à-dire d'enrichissement en sucres simples lors du stockage à froid, qui ne représente pas une situation naturelle.

Le savoir accumulé sur la dégradation de l'amidon de réserve vient donc très majoritairement d'études réalisées chez l'orge, *Hordeum vulgare* et dans une moindre mesure chez le riz, *Oryza sativa*. Alors que les amidons de céréales

présentent la particularité d'être très pauvres en groupements phosphate liés en C6 et C3 (Buléon *et al.*, 1998 ; Blennow *et al.*, 2002), une première question se pose sur l'importance des dikinases (Gwd/Pwd) et des phosphatases (Sex4/Lsf2) dans la dégradation de l'amidon de réserve. Une lignée *gwd1* de riz a été obtenue mais l'efficacité de germination n'a pas été étudiée (Hirose *et al.*, 2013). Sex4 a également fait l'objet d'une publication chez l'orge mais son expression dans les graines n'est pas montrée (Ma *et al.*, 2014). De plus amples investigations semblent nécessaires mais les premières études indiquent un rôle mineur si ce n'est nul dans la dégradation de l'amidon au cours de la germination.

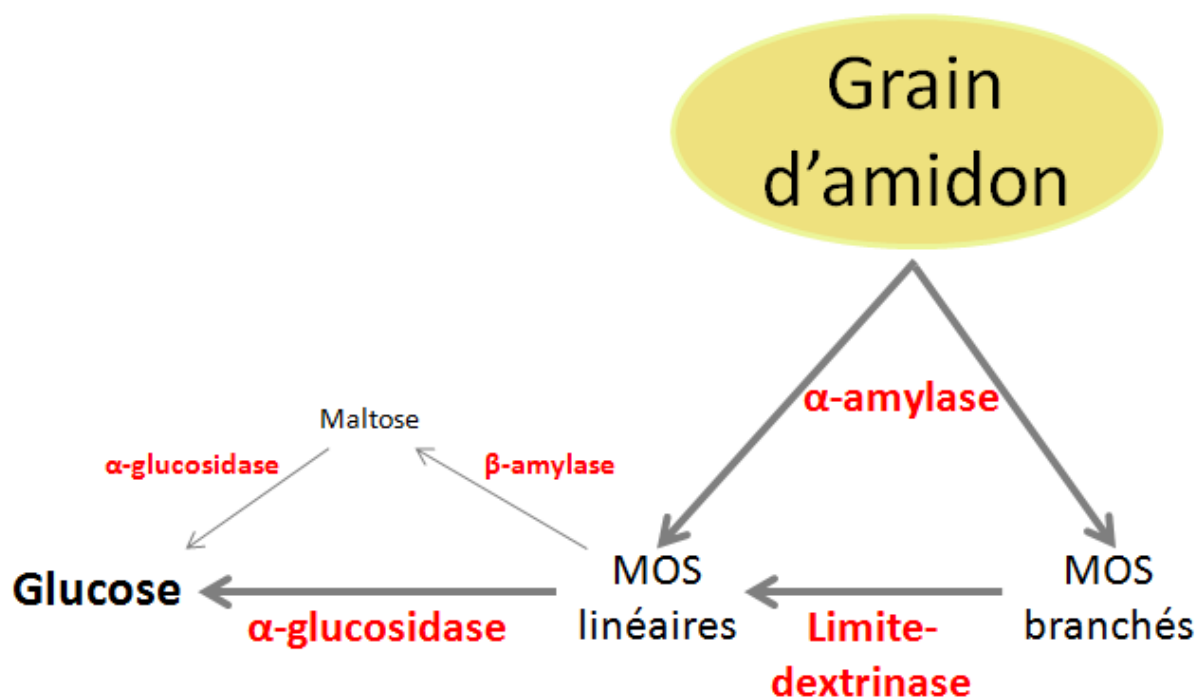


Figure 11 : Modèle de dégradation de l'amidon chez les céréales. Le grain d'amidon est directement attaqué par les α -amylases, produisant ainsi un mélange de malto-oligosaccharides branchés ou non. La limite dextrinase hydrolyse les points de branchement et les MOS linéaires peuvent alors être entièrement digérés par les α -glucosidases principalement, aboutissant à la production de glucose qui va servir le développement de la jeune plante.

En ce qui concerne les activités hydrolytiques impliquées au cours de la germination, la majorité des études y ayant trait s'intéressent notamment aux niveaux d'expression et d'activité des différentes enzymes. L'ensemble de ces études a permis d'aboutir à un modèle de dégradation impliquant l'action concertée de quatre activités : α -amylase, β -amylase, limite dextrinase et α -glucosidase (**Figure 11** ; Sun et Henson, 1991 ; Guglielminetti *et al.*, 1995 ; Awazuhara *et al.*, 2000 ; Yamasaki *et al.*, 2008). Ces enzymes vont donc dégrader progressivement l'amidon en glucoses

qui vont servir de substrat primaire à la croissance et au développement de l'embryon végétal.

L'activité la plus importante est campée par les α -amylases, au contraire de ce qui est observé dans la feuille. En effet, elles sont les seules capables d'attaquer le grain d'amidon natif. Ainsi, l'absence de l'une d'entre elles chez le riz ralentit fortement la germination (Asatsuma *et al.*, 2005). Chez l'orge, dix gènes existent dans le génome mais ce sont deux formes plus précisément qui semblent impliquées et dont l'expression augmente au cours de la germination (Bak-Jensen *et al.*, 2007 ; Rogers, 1985). Les α -amylases attaquent donc le grain et libèrent une population variée de glucanes linéaires et branchés pouvant être pris en charge par les autres hydrolases.

Les points de branchement vont être clivés par l'activité limite dextrinase qui libère à son tour des malto-oligosaccharides linéaires. Cette enzyme est fortement exprimée au cours de la germination chez le riz (Yamasaki *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009b) et l'orge (Burton *et al.*, 1999 ; Kristensen *et al.*, 1999) de manière plus ou moins prématurée. Les malto-oligosaccharides pourront être pris en charge par les activités β -amylases pour produire du maltose. Les β -amylases sont activées au cours de la germination et sont synthétisées au cours de la maturation de la graine (Hardie *et al.*, 1975). Toutefois, leur intervention ne semble pas absolument cruciale pour la germination puisque des lignées de riz et d'orge avec une très faible activité germent normalement (Daussant *et al.*, 1981 ; Kreis *et al.*, 1987). Ceci peut s'expliquer par une redondance fonctionnelle avec les α -glucosidases.

Celles-ci ont pour substrat principal le maltose qu'elles hydrolysent en glucose mais elles sont également capables d'hydrolyser des chaînes plus longues. Elles représentent, avec les α -amylases, les activités les plus importantes au cours de la germination (Awazuhara *et al.*, 2000 ; Sun et Henson., 1991). Leur expression est relativement précoce dès les premiers jours de germination (Nakai *et al.*, 2007 ; Frandsen *et al.*, 2000). Les α -glucosidases agissent en fait de manière synergique avec les α -amylases et sont même capables d'attaquer directement le grain d'amidon *in vitro* (Sun et Henson, 1990 ; Nakai *et al.*, 2007). La perturbation de l'activité α -glucosidase par inhibition chimique chez l'orge peut empêcher la germination mais un mutant RNAi pour une activité est toujours capable de germer

normalement du fait de la redondance fonctionnelle avec, au moins, une seconde isoforme (Stanley *et al.*, 2011 ; Sun et Henson, 1990).

La multiplicité d'isoformes de chaque activité intervenant au cours de la germination et la redondance fonctionnelle entre elles empêchent jusqu'à aujourd'hui d'impliquer clairement telle ou telle activité. Toutefois, devant l'impossibilité d'étudier des mutants nuls pour des activités cruciales, le développement d'inhibiteurs chimiques spécifiques est actuellement à l'étude (Stanley *et al.*, 2011 ; Rejzek *et al.*, 2011).

7. Régulation de la dégradation de l'amidon

Du fait de l'importance de la dégradation de l'amidon pour fournir de l'énergie à l'ensemble de la plante et soutenir sa croissance, ce processus doit être finement régulé afin de bien correspondre aux besoins. Plusieurs mécanismes de régulation peuvent exister chez la plante, tels que la régulation par oxydo-réduction, par phosphorylation ou la formation de complexes hétéromultimériques entre différentes enzymes. Il existe également une régulation de type circadienne et des mécanismes de senseurs du niveau de sucre sont également à l'oeuvre.

La régulation redox

Comme vu précédemment, l'oxydo-réduction est un processus déjà impliqué dans la synthèse du polysaccharide au niveau de l'ADP-Glc pyrophosphorylase. En ce qui concerne le catabolisme, plusieurs enzymes ont été montrées comme pouvant être influencées en terme d'activité par le potentiel redox environnant : la dikinase Gwd (Mikkelsen *et al.*, 2005), la phosphatase Sex4 (Silver *et al.*, 2013), les β -amylases Bam1 et Bam3 (Sparla *et al.*, 2006 ; Glaring *et al.*, 2012), l' α -amylase Amy3 (Seung *et al.*, 2013) et la limite dextrinase Lda (Glaring *et al.*, 2012). Toutefois, comme c'est le cas pour l'AGPase, l'activation se fait toujours par réduction et rupture d'un pont disulfure entre deux cystéines. Il est généralement accepté que le stroma représente un environnement réducteur plutôt durant les périodes de photosynthèse, c'est-à-dire la journée, impliquant ainsi que les enzymes hydrolytiques seraient plus actives durant la période de synthèse du polysaccharide.

Ces données vont à l'encontre d'études ayant par exemple montré que le taux de phosphorylation et donc l'activité de Gwd, est plus fort la nuit (Ritte *et al.*, 2004). L'hypothèse généralement invoquée propose que ces enzymes puissent être activées durant la nuit par l'intervention de thiorédoxines spécifiques comme cela a été mis en évidence *in vitro* (Mikkelsen *et al.*, 2005 ; Valerio *et al.*, 2010 ; Silver *et al.*, 2014). Malheureusement, les données manquent actuellement sur l'abondance et la localisation des thiorédoxines dans la cellule végétale.

Formation de complexes protéiques et phosphorylation

La formation de complexes entre les enzymes impliquées dans la biosynthèse du grain d'amidon est un phénomène bien connu et largement étudié notamment chez le blé et le maïs (Kötting *et al.*, 2010). Cette interaction serait dépendante de la phosphorylation de ces enzymes étant donné que l'ajout de phosphatase alcaline dissocie *in vitro* ces complexes. Les protéines phosphorylées auraient donc la possibilité de s'associer par l'intermédiaire notamment de domaines de liaison protéine-protéine appelés coiled-coiled. Une toute nouvelle protéine contenant ce type de domaine et sans activité catalytique a récemment été identifiée : PTST (Protein Targeting to Starch). Celle-ci serait impliquée dans l'adressage de l'amidon synthase liée au grain (GBSS) et son absence abolit la synthèse d'amylose chez *Arabidopsis thaliana* (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008 ; Seung *et al.*, 2015).

Concernant le catabolisme de l'amidon, assez peu de données existent sur ces phénomènes. Un certain nombre de sites potentiels de phosphorylation peuvent être identifiés sur les enzymes par l'intermédiaire de prédictions bioinformatiques (Heazlewood *et al.*, 2008 ; Lohrig *et al.*, 2009 ; Bayer *et al.*, 2012) mais aucune étude ne rapporte l'influence de la phosphorylation des enzymes sur la dégradation de l'amidon. De même, beaucoup de protéine kinases et phosphatases seraient adressées au chloroplaste mais aucune n'a encore été clairement incriminée dans le catabolisme du grain (Schliebner *et al.*, 2008). Malgré tout, de tels mécanismes peuvent exister et avoir leur importance puisque certaines enzymes contiennent dans leur séquence les domaines coiled-coiled comme Amy3 et Gwd (Lohmeier-Vogel *et al.*, 2008) et une interaction entre Bam1 et Lsf1 a été identifiée (Kötting *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la β -amylase non catalytique Bam4 pourrait également avoir ce type de rôle dans la dégradation.

Il est clair au vu des données existantes que des efforts sont encore à fournir afin d'identifier un rôle des complexes multi-enzymatiques dans le catabolisme de l'amidon.

La régulation circadienne

Au cours du cycle jour-nuit auquel est soumis *Arabidopsis thaliana*, la plante va bien évidemment synthétiser de l'amidon tout au long de la phase photosynthétique puis va le dégrader durant la nuit. Cette corrélation entre le métabolisme de l'amidon et le cycle jour-nuit évoque bien évidemment une régulation circadienne de l'expression/activité des enzymes hydrolytiques. L'aspect transcriptionnel a fait l'objet de plusieurs études. L'expression de certains gènes impliqués dans la dégradation présente effectivement un profil circadien avec un pic de transcrits au début de la phase nocturne (Harmer *et al.*, 2000 ; Smith *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2005). Toutefois, ce profil ne se retrouve pas au niveau traductionnel et les quantités d'enzymes n'évoluent pas aussi significativement (Smith *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2005). Un mécanisme supplémentaire de régulation post-traductionnelle devrait donc intervenir.

Une chose remarquable au cours de la nuit est que la vitesse de dégradation est toujours adaptée au pool d'amidon et permet d'arriver à une dégradation presque totale au moment du début de la journée suivante. Il est clair que l'horloge circadienne intervient sur cette vitesse puisqu'elle sera plus rapide et donc le niveau de carence sera atteint avant la fin de nuit chez une plante dépourvue de Cca1 et Lhy, deux facteurs de transcription centraux des rythmes circadiens (Graf *et al.*, 2010). La question qui se pose concerne alors le moyen utilisé par la plante pour ajuster la vitesse de dégradation au pool d'amidon et donc comment est-elle capable d'évaluer la quantité de polysaccharide disponible pour en optimiser la distribution tout au long de la nuit ? De récentes études orientent la réponse vers l'implication des métabolites formés par la dégradation dans la régulation même du processus.

Le « sugar signaling »

Le « sugar signaling » consiste donc en la régulation d'un métabolisme par le niveau de sucre présent dans la cellule. Plusieurs voies de « sugar signaling » existent chez la plante et impliquent : l'hexokinase Hxk1 ; les kinases SnRK1 (Snf-Related protein Kinase) et des protéines G (Haydon *et al.*, 2013). La voie Hxk1 fait le lien durant la journée entre la disponibilité en énergie grâce à la photosynthèse et la croissance de la plante (Rolland *et al.*, 2006) mais, au vu de sa fonction catalytique dans la phase tardive de la dégradation de l'amidon, un défaut catabolique en son absence ne peut être imputé à la disparition de sa fonction régulatrice. Sa fonction principale s'exerce par l'inhibition de la photosynthèse en cas de haut niveau de glucose (Moore *et al.*, 2003). La voie via les protéines G est, elle, initiée par une protéine régulatrice : AtRgs1 (Regulator of G-protein Signaling ; Chen et Jones, 2004). Comme Hxk1, il s'agit là d'une protéine capable de « sentir » le niveau de glucose et d'affecter l'expression génétique via une cascade de réactions (Grigston *et al.*, 2008). Comme c'est le cas pour Hxk1, l'effet régulateur de cette protéine sur la dégradation de l'amidon n'est pas particulièrement étudié.

Une troisième voie indépendante fait intervenir les kinases SnRK1 (Snf1 Related Kinase 1). Ces kinases font partie d'une famille regroupant les kinases SNF1 (Sugar Non Fermenting) de la levure et les AMPK (AMP-dependant Kinase) mammaliennes qui sont des senseurs métaboliques dont l'activité dépend du ratio AMP/ATP (Hardie *et al.*, 1998). Chez la levure et les mammifères, l'augmentation de ce ratio traduit un appauvrissement en énergie. Ces kinases sont alors phosphorylées par d'autres kinases AMPKK (AMPK Kinases) et vont stimuler l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans des processus cataboliques par l'intermédiaire de facteurs de transcription. Cette stimulation est primordiale chez la plante pour enclencher la dégradation de l'amidon. En effet, une plante déficiente pour les deux isoformes de SnRK1 : KIN10 et KIN11, présente un phénotype sex (Baena-González *et al.*, 2007). Elles sont également capables d'inhiber directement l'activité de certaines enzymes consommatrices d'énergie en attendant le retour à un niveau suffisant (Halford *et al.*, 2003).

Les mécanismes d'activation et d'inhibition de ces protéines ne sont aujourd'hui pas encore complètement compris. Des kinases de types AMPKK et des phosphatases semblent intervenir d'après des données *in vitro* (Shen *et al.*, 2009 :

Rodrigues *et al.*, 2013) mais le lien de ces kinases et phosphatases par rapport aux niveaux de sucre n'est pas clair. Elles pourraient en fait être activées par un facteur lié aux cycles circadiens. En ce qui concerne son inhibition, l'intérêt grandit aujourd'hui autour du rôle du tréhalose-6-phosphate depuis qu'il a été montré comme ayant un effet inhibiteur sur les SnRK1 (Zhang *et al.*, 2009). La quantité de tréhalose-6-phosphate, bien que très faible, est fortement corrélée à celle de saccharose et il a logiquement été considéré comme une partie de la chaîne faisant le lien entre le niveau de sucre et l'expression génique (Lunn *et al.*, 2006). Son implication dans l'activation redox de l'AGPase a été prouvée mais plus récemment encore, un rôle par rapport à la dégradation a été mis en évidence. En effet, une plante surexprimant la tréhalose phosphate synthase (TPS) et qui accumule 2 à 3 fois plus de tréhalose-6-phosphate, voit la dégradation de son amidon ralentie comme le prouve la diminution de la production de maltose (Martins *et al.*, 2013). Le mode d'action du tréhalose-6-phosphate sur la dégradation n'est pas clair, l'inhibition ne se fait en tout cas pas directement sur l'activité des enzymes impliquées dans le catabolisme ni sur leur expression puisque d'une part, il n'y a pas inhibition *in vitro* (Martins *et al.*, 2013) et d'autre part, les quantités d'enzymes évoluent très peu d'un jour sur l'autre (Lu *et al.*, 2005). D'après Martins *et al.*, le tréhalose-6-phosphate serait au début d'une chaîne, partant du cytosol vers le chloroplaste, qui va inhiber les activités hydrolytiques. Quand les besoins de la plante sont inférieurs à l'apport en énergie fournie par la dégradation, le niveau de saccharose augmente et celui de tréhalose-6-phosphate également, entraînant un ralentissement du catabolisme (**Figure 12**).

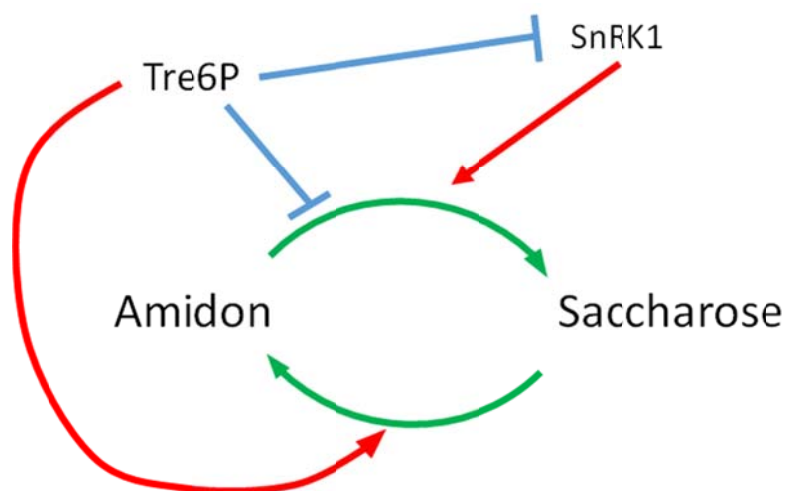


Figure 12 : Rôle du tréhalose-6-phosphate dans le métabolisme de l'amidon. Le tréhalose-6-phosphate (Tre6P) exerce un pouvoir stimulateur sur la synthèse d'amidon en influant sur l'activation redox de l'AGPase. Au niveau de la dégradation du polysaccharide, il joue un rôle inhibiteur, soit via l'extinction de l'activité stimulatrice des SnRK1, soit directement par un mécanisme inconnu.

Le modèle de dégradation établi chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* semble aujourd'hui être presque complet en ce qui concerne les enzymes intervenant très directement sur le polysaccharide et ses produits de dégradation. Toutefois, la majorité d'entre elles pouvaient aisément être suspectées *a priori* comme intervenant dans le catabolisme de l'amidon. Leur mise en évidence provient donc essentiellement d'approches de génétique inverse, c'est-à-dire par l'étude de mutants dont la défectuosité est identifiée. Ce type d'approche ne permet pas, sans beaucoup d'efforts, d'identifier des fonctions régulatrices du processus. Dans ce but, l'utilisation d'une approche sans *a priori* de génétique formelle permet de révéler l'intervention de protéines totalement nouvelles, comme cela a été le cas avec le transporteur Mex1 (Niittylä *et al.*, 2004). Il existe un organisme qui sied parfaitement à ce type d'approche dans le cadre de l'étude du métabolisme de l'amidon, il s'agit de la microalgue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*.

IV. *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii est une microalgue verte unicellulaire d'eau douce d'environ 10 µm de diamètre en moyenne. Elle fait partie du règne des Archaeplastida issus de l'endosymbiose primaire, de l'embranchement des Chlorophytes et plus particulièrement de la famille des Volvocales. Elle possède la capacité de croître en hétérotrophie, c'est-à-dire en utilisant un substrat carboné du milieu extérieur et en se dispensant de photosynthèse, ainsi bien évidemment qu'en photoautotrophie. De par certaines de ses caractéristiques, elle constitue un modèle de choix pour l'étude de la photosynthèse, le phototactisme ou le mouvement des flagelles.

1. Architecture cellulaire

Une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii* est entourée d'une paroi différente de celle des végétaux supérieurs. En effet, elle ne contient pas de cellulose et est plutôt constituée de glycoprotéines riches en hydroxyproline. La cellule en elle-même contient des compartiments classiques: des mitochondries, un noyau et un chloroplaste (**Figure 13**), chacun de ces organelles contenant un génome. Les mitochondries sont réparties uniformément dans le cytosol. Elles contiennent un génome de 16 kpb codant huit gènes (Remacle *et al.*, 2006) et sont indispensables à la croissance en hétérotrophie sur acétate. Le noyau contient lui un génome d'environ 121 Mpb entièrement séquencé et particulièrement riche en GC (64 % ; Merchant *et al.*, 2007). Ce génome se décomposerait en 17 chromosomes d'après les analyses de groupes de liaison (Dutcher *et al.*, 1991) et coderait environ 17750 gènes (Blaby *et al.*, 2014).

Chlamydomonas contient un chloroplaste unique au contraire des plantes supérieures. Celui-ci occupe les deux-tiers du volume cellulaire et contient un génome de 203 kpb codant 99 gènes (Maul *et al.*, 2002). Le chloroplaste contient lui-même plusieurs structures dans son stroma. Les principales sont les thylakoïdes qui sont un empilement de vésicules où se déroulent les réactions de photosynthèse. Il contient également un pyrénoloïde, siège de la fixation du carbone atmosphérique et qui est entourée de grains d'amidon. Une dernière structure remarquable du

chloroplaste est le stigma ou eyespot. Cet organite, essentiellement composé de pigments, est essentiel à la cellule pour se déplacer en fonction de la lumière par le mécanisme de phototactisme.

Le cytoplasme de la microalgue contient également deux vacuoles pulsatiles nécessaires à l'adaptation aux changements osmotiques (Komsic-Buchmann *et al.*, 2014). A l'extrémité de la cellule se trouvent finalement deux flagelles longs d'environ 10 μm et de composition très complexe. Ces structures sont bien évidemment essentielles pour la motilité de la cellule.

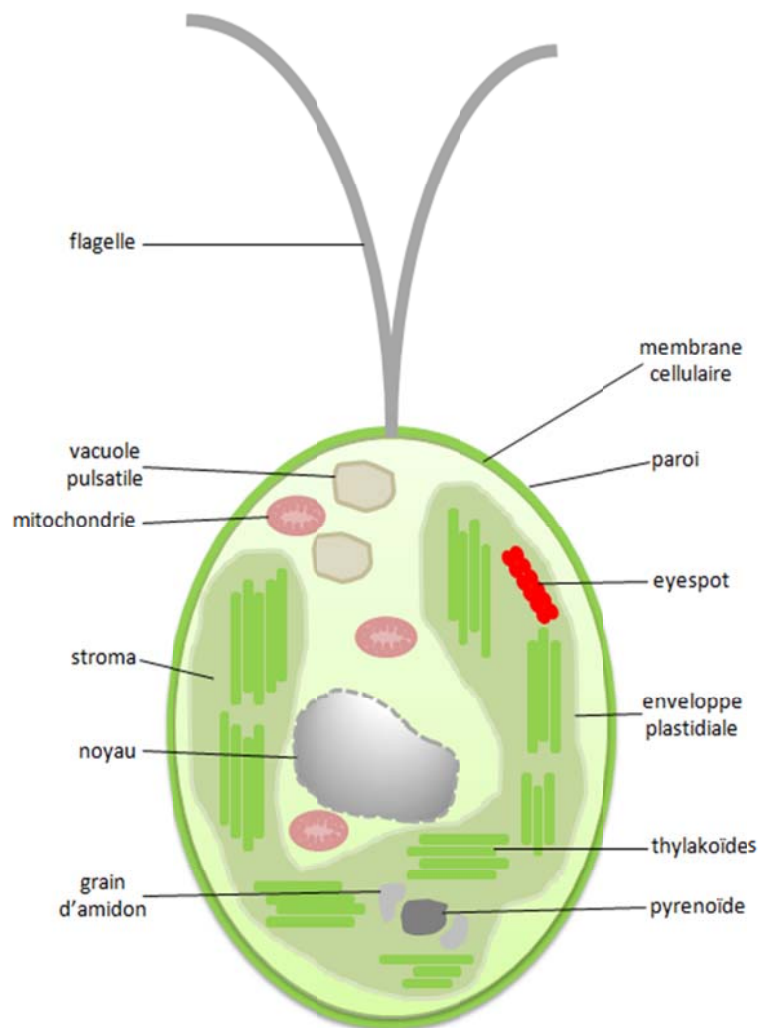


Figure 13 : Représentation schématique d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii*.

2. Cycle de vie

En laboratoire, *Chlamydomonas* se cultive entre 20 et 25°C, à pH neutre et en milieu liquide ou solide. En milieu minimal et en lumière continue (200-

400 μ E/m²/sec), un temps de génération de 6 à 8 heures peut être atteint. En cycle jour-nuit, la division est restreinte à la période obscure et 2 à 3 mitoses auront lieu.

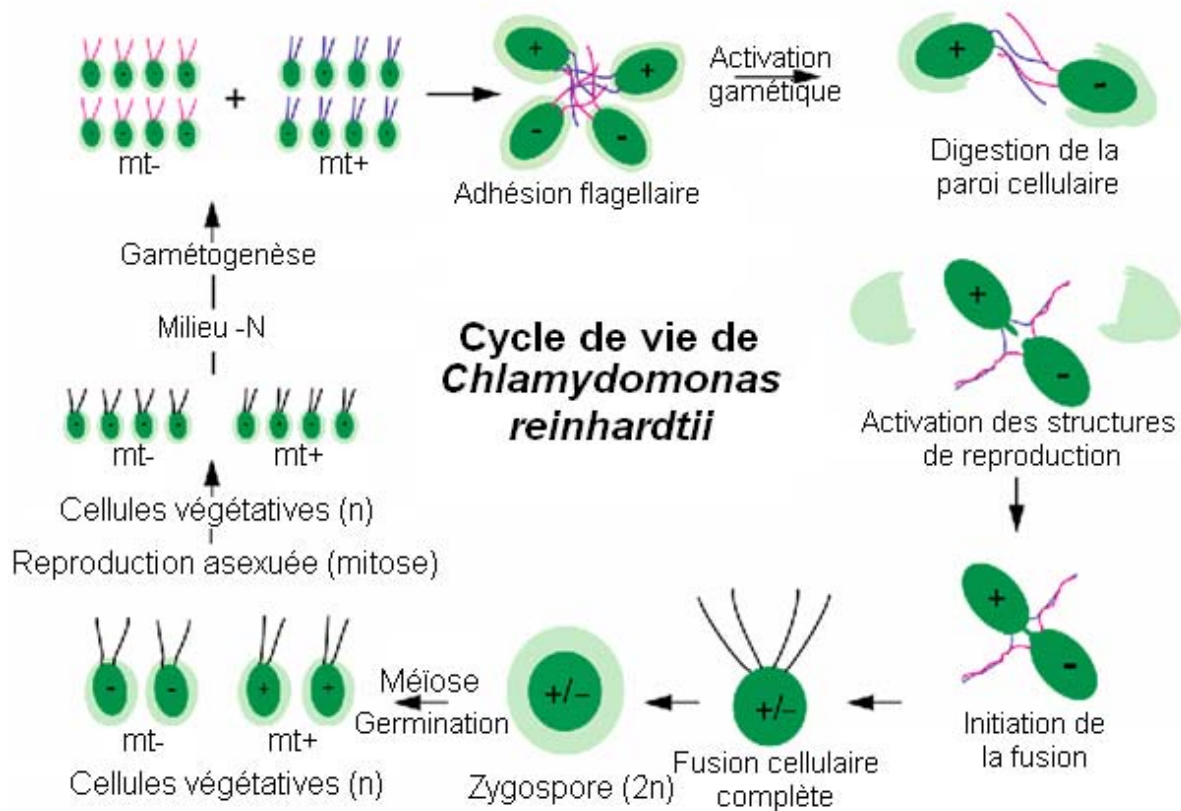


Figure 14 : Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii*. Une cellule végétative mature en gamète en cas de stress environnemental. Elle cherche alors à rencontrer une autre cellule gamétique de polarité sexuelle opposée avec laquelle elle s'apparie puis fusionne après digestion de la paroi. La cellule diploïde qui en résulte mûrit en zygospore pendant 4 à 6 jours et maintient cet état tant que les conditions ne sont pas favorables. Une fois les ressources disponibles, la cellule entre en méiose, donnant naissance à 4 cellules haploïdes dont deux de chaque polarité sexuelle. Ces cellules sont capables de se diviser par mitose indépendamment du cycle sexué. D'après Harris 2001.

Les cellules sont majoritairement haploïdes et de deux polarités sexuelles distinctes (mating type) : positive (*mt+*) ou négative (*mt-*) ; ce qui permet une reproduction sexuée. En conditions de stress, notamment azoté, les cellules végétatives deviennent progressivement compétentes sexuellement (**Figure 14**). Deux cellules de polarités sexuelles opposées peuvent alors s'apparier via leurs flagelles puis fusionner après la digestion de leur paroi respective par une enzyme lytique sécrétée : l'autolysine. On obtient alors un zygote diploïde temporairement tétraflagellé. Celui-ci va s'entourer d'une paroi et mûrir en zygospore durant 4 à 6 jours. Cette forme mature pourra survivre plusieurs mois voire années. Le rétablissement de conditions optimales induit la germination de cette zygospore qui subit donc la méiose et donne 4 cellules haploïdes qui forment une tétrade. Cette

tétrade est finalement libérée par rupture de la zygosporé, parfois précédée d'une mitose supplémentaire. Au cours de ces événements, l'hérédité des génomes diffère. Les génomes plastidial et mitochondrial sont hérités du parent de polarité sexuelle positive et négative, respectivement. En ce qui concerne le génome nucléaire, la transmission est équivalente entre les deux parents et chaque copie d'un gène se retrouvera dans deux des quatre cellules filles, produisant ainsi, au regard de deux gènes distincts, des ditypes parentaux, des ditypes non parentaux et des tétratypés.

3. Pourquoi *Chlamydomonas reinhardtii* ?

Dans le cadre d'une étude du métabolisme de l'amidon par une approche de génétique formelle, *Chlamydomonas reinhardtii* réunit de nombreux avantages.

Elle correspond tout d'abord parfaitement à l'approche de génétique formelle pour plusieurs raisons. La transformation nucléaire est très facile et peut se faire par divers moyens tels que la méthode des billes de verre ou par électroporation (Jinkerson et Jonikas, 2015). Ces méthodes induisent l'insertion par recombinaison non-homologue d'un fragment d'ADN dans le génome de l'algue. La résistance portée par ce fragment permet ensuite la sélection de souches transformantes sur milieu gélosé. La capacité de *Chlamydomonas* à pousser sous forme de colonies isolées telles *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que sa nature haploïde rendent très rapide l'isolement de mutants pour le processus étudié. Finalement, l'insertion tagguée peut être localisée par identification des séquences flanquantes grâce au séquençage complet de son génome nucléaire (Merchant et al, 2007).

Par ailleurs, *Chlamydomonas reinhardtii* convient également à l'étude du métabolisme de l'amidon d'une part car la biosynthèse du polysaccharide est globalement identique à celle des végétaux supérieurs, et d'autre part grâce à sa versatilité métabolique. En effet, la situation physiologique de la cellule diffère en fonction des conditions de culture et permet de mimer soit un système d'amidon transitoire soit celui de l'amidon de réserve (**Figure 15**). En conditions standards, la cellule accumule quelques grains d'amidon autour de son pyrénéoïde, fruit de l'assemblage de produits issus de la photosynthèse. Cet amidon est de type transitoire tel celui que l'on retrouve dans les feuilles. En condition de carence

azotée, l'amidon accumulé provient principalement d'un métabolisme hétérotrophe basé sur l'assimilation d'acétate dans le milieu et correspond à un amidon de réserve comme celui retrouvé chez les céréales. Cette versatilité métabolique a déjà été mise à profit dans le cadre de l'étude de l'implication de l'amidon phosphorylase plastidiale dans la biosynthèse de l'amidon (Dauvillée *et al.*, 2006). Alors que la culture en conditions classiques a permis de confirmer l'absence de phénotype chez le mutant comme cela avait été observé chez une lignée d'*Arabidopsis thaliana*, la culture en carence azotée a révélé une forte perturbation de la biosynthèse du polysaccharide, phénotype confirmé quelques années plus tard chez un autre modèle d'amidon de réserve : le riz (Satoh *et al.*, 2008).

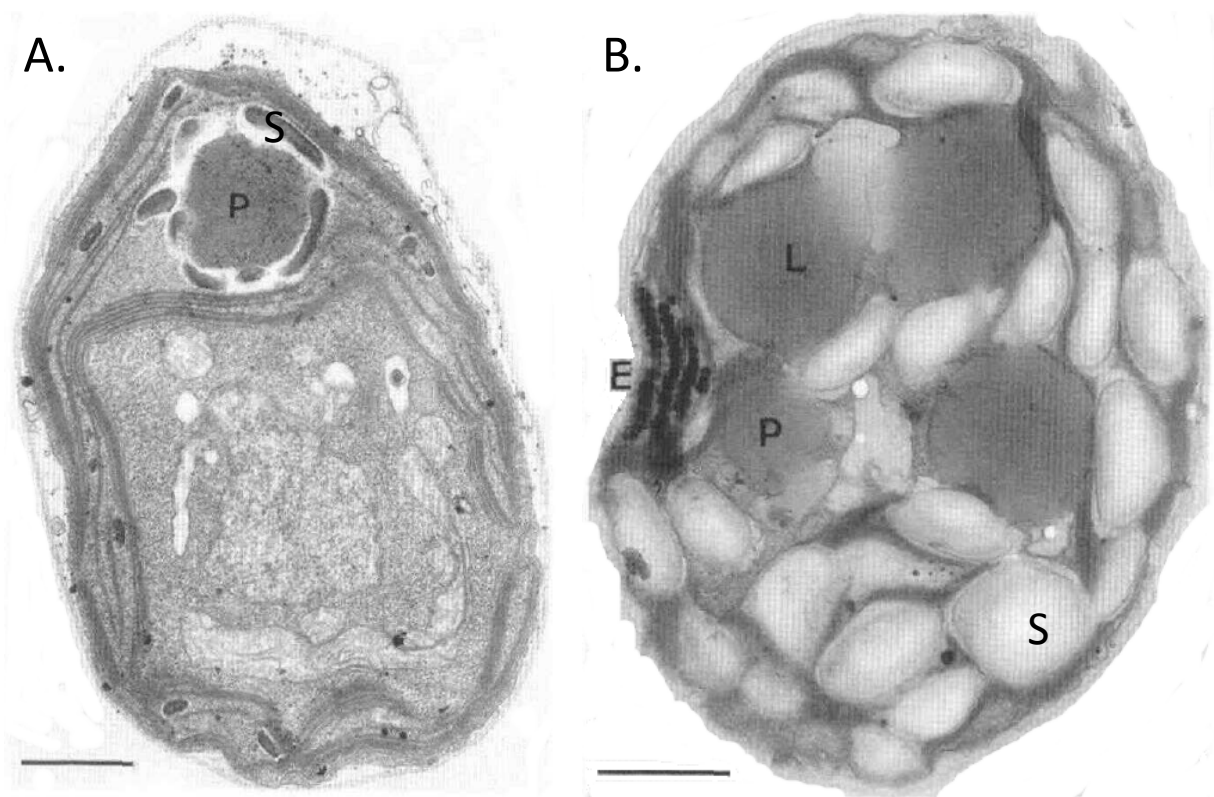


Figure 15 : Observation par microscopie électronique à transmission d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii*. A. Une cellule placée en conditions de culture standard qui accumule quelques grains d'amidon autour du pyrénnoïde. B. Une cellule cultivée en carence azotée et ayant massivement produit des réserves sous forme d'amidon et de corps lipidiques. P : pyrénnoïde. S : amidon. L : corps lipidique. E : eyespot. D'après Libessart *et al.*, 1995.

Chlamydomonas reinhardtii rassemble donc tous les avantages nécessaires pour l'application d'une approche de génétique formelle dans le cadre de l'étude du métabolisme de l'amidon. De plus, un processus de crible à haut débit a déjà été mis en place par le passé dans le but d'isoler des mutants de la voie de biosynthèse du polysaccharide (**Figure 16**). Celui-ci se base sur l'interaction naturelle entre la

molécule de diiode et les polysaccharides de réserve. Des patches cellulaires sont incubés en carence azotée pendant cinq jours pour induire l'accumulation massive d'amidon et la capacité à synthétiser est mise en évidence par la vaporisation de ces plages à l'iode. Au cours de la vaporisation, une souche sauvage se colore en bleu nuit du fait d'une synthèse normale d'amidon. Des mutants de biosynthèse ont été isolés du fait de l'absence d'interaction ou de la modification de la couleur renvoyée par le complexe. Ces phénotypes traduisent une absence de synthèse ou une altération de la structure du polysaccharide du fait de l'absence d'une fonction (**Figure 16 A**). Dans le but d'isoler des mutants de dégradation de l'amidon les patches cellulaires sont réalisés en double exemplaire. Au bout des cinq jours d'accumulation, la carence est levée sur l'une des deux boîtes pour permettre la dégradation du polysaccharide à l'obscurité pendant 24 h. Durant cette période d'incubation, une souche sauvage est capable de dégrader suffisamment d'amidon pour perdre l'interaction à l'iode observée après l'accumulation (**Figure 16 B**). Au contraire, un mutant de dégradation en est incapable et conserve la coloration noire.

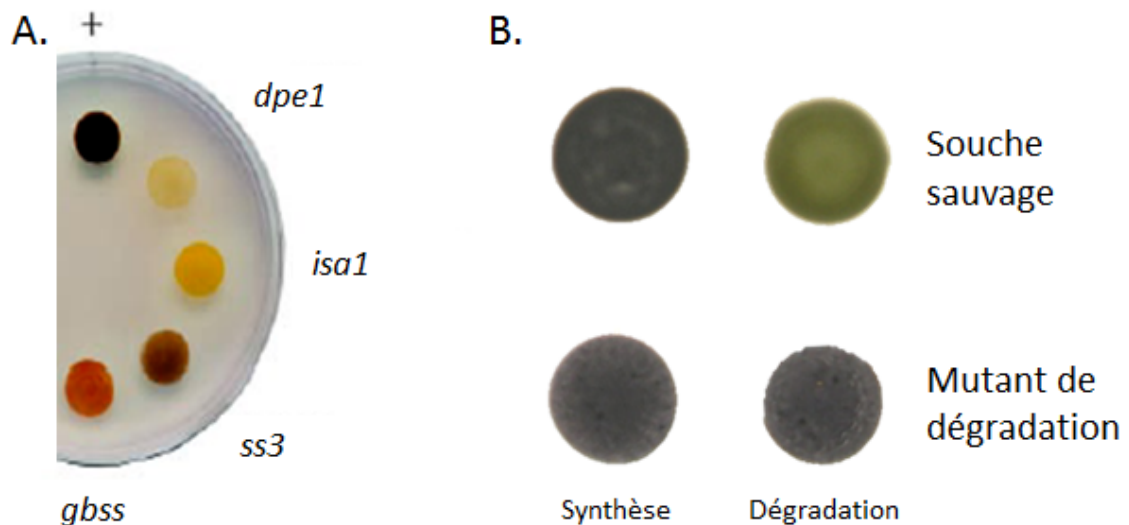


Figure 16 : Le crible à l'iode. A. Coloration à l'iode de patches cellulaires illustrant la capacité de synthèse. Une souche sauvage apparaît noire (+), aucune interaction n'est détectée pour des mutants de synthèse quasiment dépourvus d'amidon (*dpe1* et *isa1*), une coloration altérée est observée lorsque le polysaccharide possède une structure modifiée (*ss3* et *gbss*). B. Crible à l'iode en deux étapes. Sur la coloration de la boîte de synthèse, on ne distingue pas la souche sauvage du mutant de dégradation puisqu'ils se colorent tous deux en noir. Sur la boîte de dégradation, la souche sauvage perd l'interaction à l'iode tandis que celle-ci est maintenue chez le mutant du catabolisme.

V. Approche expérimentale

Dans le but de découvrir de nouvelles fonctions impliquées dans le métabolisme de l'amidon, et plus particulièrement dans sa dégradation, une approche sans *a priori* de génétique formelle a été mise en application chez la microalgue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. La démarche engagée passe par trois étapes (**Figure 17**).

Dans un premier temps, une collection de souches déficientes pour la dégradation du polysaccharide est construite. Une banque de transformants résistants à un antibiotique a été obtenue par insertion d'ADN exogène. Celle-ci est ensuite soumise au crible à l'iode en deux étapes afin d'identifier de potentiels candidats déficients pour la dégradation. Afin de confirmer le phénotype observé sur milieu gélosé, ces candidats sont finalement testés pour leur capacité à dégrader l'amidon en milieu liquide afin de les confirmer ou de les écarter. L'ensemble des souches confirmées font, dans un second temps, l'objet de deux volets de caractérisations dans le but d'identifier la fonction altérée ou manquante chez ceux-ci. Le premier volet de caractérisation fait appel à des techniques de biologie moléculaire qui visent à localiser l'insertion de l'ADN exogène par l'identification des séquences flanquantes. Le second volet de caractérisations enzymologiques utilise des gels d'activités de type zymogramme sur différents substrats afin d'observer directement l'absence d'une activité enzymatique.

Finalement et une fois que la fonction touchée est identifiée, la responsabilité de l'insertion en question dans le phénotype observé est démontrée d'une part par analyse de coségrégation, d'autre part par complémentation fonctionnelle. Après croisement du mutant d'intérêt avec une souche sauvage de polarité sexuelle opposée, la coségrégation entre le phénotype amidon et la défectuosité identifiée est analysée dans la descendance méiotique. Dans le même temps, une copie sauvage du gène interrompu est réinsérée dans le mutant et le retour à un phénotype sauvage est recherché. L'ensemble de ces analyses aboutit à l'identification d'une nouvelle fonction ayant une influence sur la dégradation du polysaccharide.

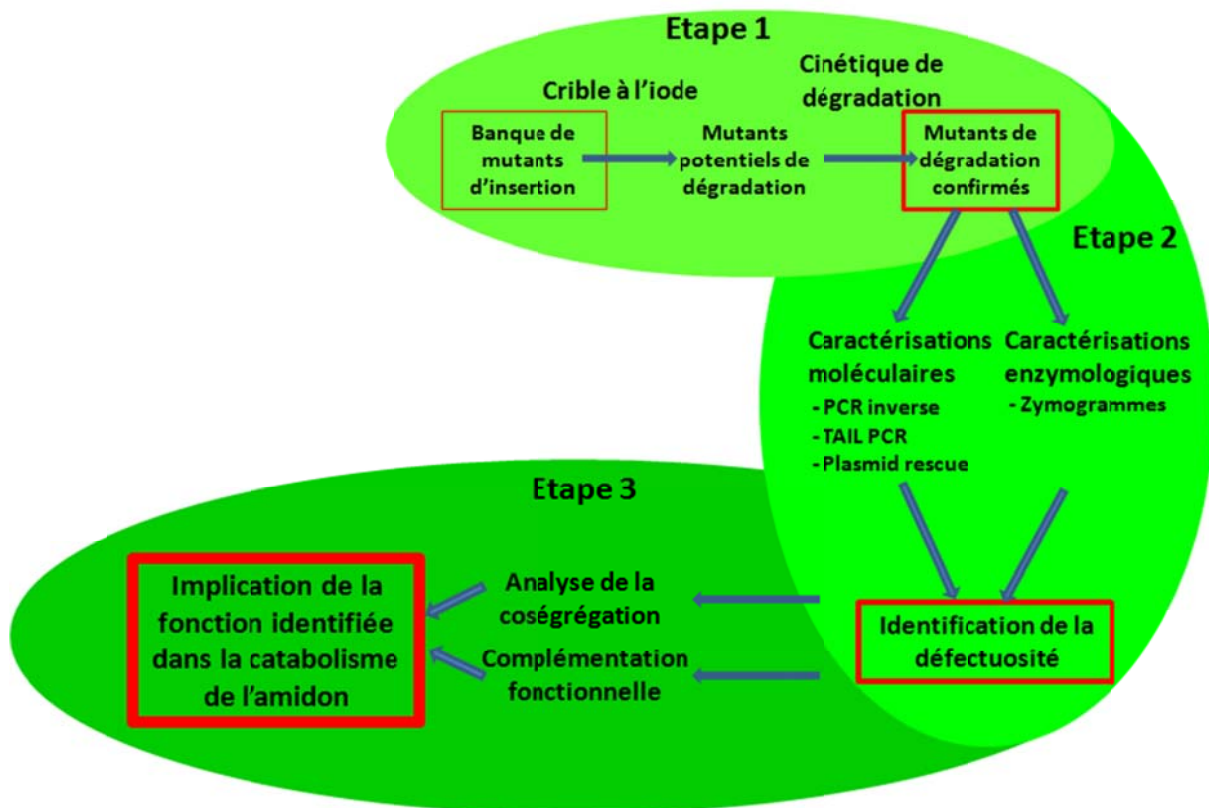


Figure 17 : Schéma général de la démarche expérimentale. Le projet mis en place consiste en trois étapes. Etape 1 : construction de la banque de mutants. Etape 2 : identification de la fonction touchée. Etape 3 : Démonstration de l'implication de la fonction identifiée dans le catabolisme de l'amidon.

Parallèlement à cette activité de décryptage de la voie de dégradation de ce polysaccharide de réserve, une démarche d'analyse de la granulométrie de l'amidon a été effectuée sur l'ensemble des mutants identifiés dans le cadre du projet IFMAS (Institut Français des Matériaux Agro-Sourcés). Le crible à l'iode en deux étapes permettant également l'identification de mutants de synthèse, l'ensemble des souches isolées lors de nos travaux a été analysé à la recherche de modifications de la granulométrie, typiquement une augmentation ou une diminution de la taille moyenne des grains.

Matériels et Méthodes

I. Souches

La souche sauvage utilisée au cours de ces travaux est 137C (*nit1 nit2 mt-*). L'ensemble des mutants de dégradation obtenu résulte de la mutagenèse de cette souche. Dans le cadre de l'analyse de coségrégation, les souches mutantes ont été croisées avec la souche sauvage 37 (*ac14 pab2 mt+*). Pour la production d'autolysine, la souche sauvage 137C est mise en présence d'une troisième souche sauvage : CC-125 (*nit1 nit2 mt+*).

II. Milieux et conditions de culture

1. Conditions standards

Les souches de *Chlamydomonas reinhardtii* sont entretenues sur milieu HSA riche en lumière continue ($40\text{mE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et à 22°C . Avant culture en milieu liquide pour analyse de l'amidon, les cellules sont d'abord adaptées au milieu liquide en préculture de 50 mL par resuspension de colonies puis culture en milieu TAP+N à 120 rpm pendant 5 à 7 jours jusqu'à atteindre une densité cellulaire de l'ordre de 10^7 cellules/mL. Les cellules sont alors en phase stationnaire et peuvent être ensemencées en Erlenmeyer de 2L.

2. Milieux de culture de *C. reinhardtii*

En culture liquide, trois types de milieux sont utilisés : le milieu TAP+N pour analyser l'accumulation du polysaccharide en condition mixotrophique ; le milieu TAP-N pour induire l'accumulation en condition hétérotrophe ; et le milieu TMP qui est en fait un milieu TAP+N sans acétate et qui est utilisé pour analyser la capacité des cellules à dégrader, à l'obscurité, leur réserves et donc leur amidon qui constitue la principale réserve de carbone. Les compositions des milieux et des solutions utilisées sont indiquées dans les **Tableaux 1 et 2** (selon Harris, 1989).

Solution	Quantité pour 1L		
	Milieu TAP	Milieu TAP -N	Milieu TMP
Cr Salt 20X	50 mL (+N)	50 mL (-N)	50 mL (+N)
Tris 100X		10 mL	
Cr KPO ₄		5 mL	
Cr Oligo		1 mL	
Cr MgSO ₄		1 mL	
pH 7	A l'acide acétique		A l'acide chlorhydrique
PAB (1 mg/mL)		1 mL	

Tableau 1 : Composition des milieux liquides utilisés pour *Chlamydomonas reinhardtii*.

Composants		Quantité	
Solution Salt X20		+N	-N
NH ₄ Cl		8 g/L	-
MgSO ₄ , 7H ₂ O		2 g/L	2 g/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O		1 g/L	1 g/L
NaCl		-	8,7 g/L
Cr KPO₄		Milieu liquide	Milieu gélosé
K ₂ HPO ₄		93,5 g/L	72 g/L
KH ₂ PO ₄		63 g/L	36 g/L
Cr Oligo			
H ₂ BO ₃		11,4 g	
ZnCl ₂ (ZnSO ₄)		10,4 g (22 g)	
MnCl ₂ , 4H ₂ O		5,1 g	
FeSO ₄ , 7H ₂ O		4,99 g	Dissolution dans 550 mL H ₂ O à 100°C
CoCl ₂ , 6 H ₂ O		1,61 g	
CuSO ₄ , 5H ₂ O		1,57 g	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O (MoO ₃)		1,1 g (0,8 g)	
EDTA		50 g	
KOH		20 g	100 mL H ₂ O
pH 6,5-6,8 à la potasse et à 80°C			
Cr MgSO₄			
MgSO ₄ , 7H ₂ O		123,25 g/L	
Cr Tris 100X			
Tris		242 g/L	

Tableau 2 : Composition des solutions mères entrant dans la compositions des milieux de culture liquide et solide de *Chlamydomonas reinhardtii*.

En milieu gélosé, les cellules sont amplifiées sur un milieu HSA riche pouvant parfois contenir des antibiotiques afin d'obtenir une pression de sélection : la paromomycine (10 µg/mL) ou l'hygromycine (20 µg/mL). Pour l'analyse du phénotype de dégradation en milieu gélosé, un milieu TAP-N gélosé (1,2 %) a été utilisé. Enfin,

pour l'analyse de coségrégation, les cellules diploïdes s'enkystent dans un milieu HSA riche contenant 4 % d'agarose et la validité des tétrades obtenues est confirmée par analyse de la recombinaison des caractères parentaux en testant les différentes auxotrophies (milieux HS, HS + PAB, HS + AC, NIT mini, NIT complet). La composition de ces milieux est résumée dans le **Tableau 3**.

Solutions	Milieux	HSA Riche	HS	HS+AC	HS+PAB	HS+AC +PAB	NIT mini	NIT complet
Cr Salts 20 X				50 mL (+N)				50 mL (-N)
Cr KPO4					10 mL			
Cr Oligo					1 mL			
MgSO4					1 mL			
PAB (1 mg/mL)		1 mL	-		1 mL	1 mL	-	1 mL
Acétate de sodium		1 g	-	1 g	-	1 g	-	1 g
Extrait de levure		4 g				-		
Agar					12 g			
KNO3				-			0,4 g	0,4 g
NaNO2				-				0,4 g

Tableau 3 : Composition des milieux de culture gélosés utilisés pour *Chlamydomonas reinhardtii*.

3. Conditions jour/nuit

Lors des expériences réalisées en conditions jour/nuit (12/12), les cellules ont étéensemencées dans un milieu TMP dans un photobioréacteur d'un litre autoclavé (BIOSTAT Aplus; Sartorius Stedim Biotech) avec bullage d'un air enrichi en CO₂ (2 %) à un débit de 0,5 L/min (EL flow; Bronkhorst). La densité optique à 880 nm mesurée par une sonde de biomasse (Excell probe, Exner) est maintenue à 0,4 par injection de milieu frais (Stepdos FEM03TT18RC; KNF). Le pH (Easyferm K160;Hamilton) est lui maintenu à 7 par injection de KOH 0,2 M ou de HCl 0,2M par l'intermédiaire d'un module BIOSTAT. En jour, l'intensité lumineuse s'élève à 250 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

III. Construction de la banque de mutants

1. Préparation de l'autolysine

L'autolysine est l'enzyme produite par *Chlamydomonas reinhardtii* dans le but de dégrader la paroi d'un partenaire sexuel de polarité opposée. Sa préparation passe donc automatiquement par la mise en présence de deux souches distinctes, l'une de polarité *mt+*, l'autre *mt-*. Dans un premier temps, les deux souches 137C (*mt-*) et CC125 (*mt+*) sont incubées séparément en milieu TAP-N pendant une nuit afin d'induire la gamétogenèse. Elles sont ensuite mises en présence l'une de l'autre pour induire la production de l'enzyme mais à l'obscurité, ce qui empêche la fusion des cellules et maximise le rendement en autolysine. L'incubation dure deux heures puis l'autolysine secrétée dans le milieu est isolée des cellules par centrifugation 10 minutes à 4000 rpm puis stérilisation sur filtre 0,22 µm avant d'être stockée à -80°C.

2. Test de l'autolysine

Pour évaluer la qualité de l'autolysine produite, sa capacité à dégrader la paroi cellulaire est testée sur la souche sauvage 137C. 1 mL d'autolysine est ajouté à 100µL d'une suspension dense de cellules. Un témoin est réalisé parallèlement pour lequel l'autolysine est remplacée par de l'eau. Les mélanges sont ensuite incubés une heure à 22°C et à la lumière. Après cette incubation, l'intégrité de la paroi est vérifiée par traitement des cellules au Triton X-100 0,1 %. Les cellules sont d'abord culottées par centrifugation 3 minutes à 3000 rpm afin d'éliminer le milieu et resuspendues dans 300 µL de Triton X-100 0,1 %. Le Triton X-100 induit la lyse des cellules dépourvues de paroi. Ainsi, la suspension soumise à l'autolysine doit lyser et après centrifugation, on observe un culot blanc composé de débris cellulaires et un surnageant de couleur verte due à la présence de chlorophylle. Parallèlement, le tube témoin doit avoir un culot vert composé de cellules saines et un surnageant translucide. Si le test n'est pas concluant, la préparation d'autolysine n'est pas utilisable et ne sera pas utilisée pour une transformation d'algues.

3. Amplification de la cassette

La cassette de résistance à la paromomycine (gène *APHVII* : aminoglycoside 3'-phosphotransférase de *Streptomyces rimosus* ; Sizova *et al.*, 2001) est préparée par PCR sur le plasmide pSL18 (**Figure 18**). Les amorces ParoFor (5'-ACCATGATTACGCCAAGCGCGCAA-3') et ParoRev (5'-CTCGACATGCGTTCCTCCTGTC-3') sont utilisées dans un cycle répété 30 fois comprenant une hybridation des amorces à 55°C et une polymérisation de 2 min pour permettre l'amplification d'un fragment de 1920 pb. Le produit de PCR est vérifié sur gel d'agarose 1 %, purifié et concentré à 100 ng/μL avant utilisation.

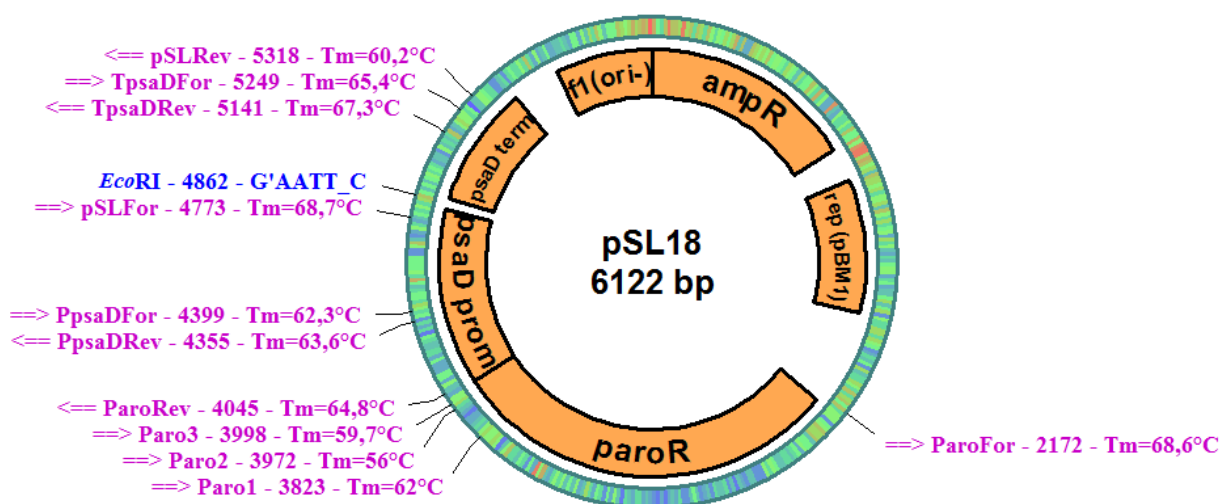


Figure 18 : Carte du vecteur de transformation pSL18. Celui-ci contient une origine de réplication et un gène de résistance à l'ampicilline pour son amplification dans les bactéries ; la cassette de résistance à la paromomycine ainsi que les parties promotrice et terminatrice du gène *PSAD*. En bleu est indiqué le site de linéarisation du plasmide par *EcoRI*. En rose figurent les sites d'hybridation des amorces utilisées pour l'amplification de la cassette, la PCR inverse, la TAIL-PCR et le séquençage.

4. Préparation du plasmide

Le plasmide pSL18 vide est amplifié par transformation puis culture de bactéries compétentes Top10 en milieu LB + ampicilline (50 μg/mL). Les bactéries sont ensuite culottées par centrifugation et le plasmide est purifié à l'aide du kit Nucleospin Plasmid Easypure (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Avant transformation, pSL18 est linéarisé par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

5. Transformation de Chlamydomonas

Préparation de la souche

Dans un premier temps, la souche sauvage est cultivée durant 5 à 7 jours dans 50 à 200 mL de milieu TAP+N. Arrivées en fin de phase exponentielle, les cellules sont centrifugées à 3000 rpm pendant 10 minutes puis incubées pendant 2 heures dans 20 mL d'autolysine à la lumière pour permettre la dégradation de la paroi. Pour la transformation, deux techniques ont été utilisées : la méthode des billes de verre (Kindle, 1990) et l'électroporation.

Méthode des billes de verre

Les cellules sans paroi sont centrifugées (3000 rpm, 5 min) et resuspendues dans 5 mL de TAP+N. 300 µL de cette suspension sont transférés dans un tube stérile contenant 250 mg de billes de verre (diamètre 400 µm). 500 ng de plasmide linéarisé y sont ajoutés et le mélange est vortexé pendant 10 sec pour permettre l'entrée du vecteur dans les cellules. 600 µL de TAP+N sont finalement ajoutés et l'ensemble est étalé sur un milieu HSA riche contenant de la paromomycine (10 µg/mL).

Electroporation

Les cellules sont centrifugées (3000 rpm, 5 min) et resuspendues dans du milieu TAP+N contenant 40 mM de saccharose (stérilisé par filtration sur un filtre 0,2 µm). 250 µL de suspension sont incubés sur glace durant 10 min en présence de 100 ng de cassette de résistance dans une cuvette d'électroporation d'intervalle 4 mm. Un choc électrique exponentiel (voltage 800 V, capacitance 25 µF) est appliqué au mélange sur un système Gene Pulser Xcell™ de Biorad (Richmond, CA, USA). 10 mL de TAP+N sont ajoutés et les cellules sont incubées 18 h en lumière atténuée avant d'être étalées sur milieu HSA riche + paromomycine.

Des colonies isolées apparaissent en 7 à 10 jours. Celles-ci sont repiquées et amplifiées sur milieu HSA riche + paromomycine avant d'être soumis au crible à l'iode en deux étapes.

6. Crible des transformants

Une fois que la quantité de cellules est suffisante (sous 5 à 7 jours), l'ensemble des transformants repiqués ainsi que la référence sauvage 137C sont mis en suspension dans du milieu TAP-N sur une plaque de microtitration 96 puits stérile. 15 μ L de ces suspensions sont déposés de manière ordonnée sur deux boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé TAP-N. Ces patches cellulaires sont ensuite placés 5 jours sous lumière vive, temps nécessaire à l'obtention d'une accumulation massive d'amidon. Au terme de cette période, la carence azotée est levée sur l'une des deux boîtes par ajout de 15 μ L d'une solution de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) à 150 mM sur chaque patch. Celle-ci est ensuite incubée à l'obscurité dans du papier aluminium pendant 24 h pour permettre la dégradation du polysaccharide. Finalement, la boîte où la carence aura donc été maintenue 6 jours, et la boîte incubée à l'obscurité sont soumises aux vapeurs de diiode. Sur la première boîte, la majorité des patches se colorent en bleu-nuit comme la souche sauvage, signe d'une synthèse normale de l'amidon tandis que sur la seconde, cette coloration due à l'interaction iode/polysaccharide sera en principe perdue et les patches présentent alors une couleur verdâtre.

La première boîte que l'on peut désigner « de synthèse » permet l'identification de souches déficientes pour la biosynthèse du polysaccharide et qui présenteront soit une couleur différente de la référence sauvage (rouge, verdâtre, marron), soit une absence de coloration. Sur la seconde boîte, « de dégradation », les patches n'ayant pas perdu l'interaction iode/polysaccharide seront désignés comme candidats mutants de dégradation. Ceux-ci ne sont que des candidats puisque le crible sur milieu gélosé ne permet pas de distinguer un mutant de dégradation qui conserve le pool d'amidon accumulé, d'un mutant surproducteur qui est capable de dégrader son amidon mais pas en quantité suffisante pour perdre l'interaction à l'iode après 24 h.

L'ensemble des candidats obtenus par ce premier crible est repiqué sur milieu HSA riche puis soumis une seconde fois au crible à l'iode. Si le résultat est confirmé, l'analyse du phénotype se poursuit en milieu liquide, notamment pour écarter les mutants surproducteurs.

IV. Caractérisations biochimiques

1. Extraction et dosage de l'amidon

Un litre de culture de *Chlamydomonas* est centrifugé 10 min à 3000 rpm et 4°C. Le culot de cellules est repris dans 5 mL d'eau stérile et soniqué pendant 1 min sur glace. Le culot obtenu après une nouvelle centrifugation (4000 rpm, 15 min) est resuspendu dans 1,5 mL de Percoll 90 % pour en purifier l'amidon par gradient de densité. Celui-ci est culotté par centrifugation 10 min à 13200 rpm et lavé par 1,5 mL d'eau. La suspension obtenue est diluée pour avoir un aspect laiteux correspondant à une concentration en polysaccharide adéquate pour le protocole de dosage enzymatique.

L'amidon étant insoluble, ce dosage ne pourra se faire sans une étape préalable de solubilisation. Trois dilutions ($1/5^{\text{ème}}$, $1/10^{\text{ème}}$ et $1/20^{\text{ème}}$ dans 30 μL) de cette suspension sont bouillies 5 min à 99°C pour obtenir un empois d'amidon utilisable. Celui-ci est ensuite dosé à l'aide du kit Enzytec Starch Assay (R-Biopharm, Darmstadt, GER). Le principe de ce dosage repose sur la libération des molécules de glucose via l'action de l'amyloglucosidase. Ces glucoses sont ensuite convertis en G6P et en 6-phosphogluconate par une hexokinase et une glucose-6-phosphate déshydrogénase. La production de 6-phosphogluconolactone est couplée à la réduction d'une molécule de NADP, produisant ainsi du NADPH dont on mesure l'apparition au spectrophotomètre à 340 nm.

2. Dosage des polysaccharides solubles

Après sonication des cellules et centrifugation, le surnageant peut être utilisé pour doser la quantité de polysaccharides solubles. Dans ce cas, il sera d'abord bouilli 10 min à 99°C pour inactiver toute enzyme pouvant les dégrader. Un échantillon non dilué sera ensuite soumis au kit de dosage avec en parallèle un témoin sans amyloglucosidase qui permettra d'évaluer la part de glucose libre dans la totalité des polysaccharides.

3. Chromatographie de tamisage moléculaire (CL-2B)

La chromatographie de tamisage moléculaire a pour but de séparer les deux sous-fractions de l'amidon, l'amylopectine et l'amylose afin d'évaluer la part de chacune et de mettre en évidence une éventuelle altération structurale de l'amylopectine par variation de la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}).

Dans un premier temps, 2 mg d'amidon sont bouillis dans 100 μL de DMSO 100 % pendant 10 min à 99°C avant d'être précipités par 900 μL d'éthanol et conservés à -20°C. L'échantillon est ensuite centrifugé (13200 rpm, 10 min), le culot est resuspendu dans 300 μL de soude 10 mM (NaOH) puis déposé sur une colonne de sépharose CL-2B de 8 mm de diamètre et 70 cm de hauteur. L'élution se fait par la soude à un débit de 11 à 12 mL/h. Cent fractions de 300 μL sont recueillies et la λ_{\max} est mesurée au spectrophotomètre pour chacune (80 μL de fraction + 20 μL de solution d'iode). La solution d'iode se compose de 10 g d'iodure de potassium (KI) pour 1 g de diiode (I_2) par litre.

L'analyse au spectrophotomètre de chaque fraction permet de déterminer lesquelles contiennent l'amylopectine ou l'amylose. Les fractions peuvent ensuite être poolées en deux fractions principales contenant les deux types de polysaccharide. Le pourcentage d'amylose peut alors être évalué par dosage du glucose contenu dans les deux fractions.

4. Distribution en longueur de chaînes (CLD) de l'amylopectine

Suite à la chromatographie de tamisage moléculaire, l'amylopectine peut être récupérée pour en analyser le profil CLD. Elle est d'abord dialysée pour éliminer la soude puis lyophilisée. Après resuspension dans 1 mL de tampon acétate de sodium 55 mM pH 3.5, elle est incubée en présence de 6 unités d'isoamylase et 3 unités de pullulanase une nuit à 42°C pour permettre l'hydrolyse de la totalité des points de branchement.

Les glucanes linéaires obtenus sont purifiés sur une colonne de charbon graphité, lyophilisés une deuxième fois puis analysés sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anion haute performance à détection

ampérométrique pulsée (HPAEC PAD). L'élution est réalisée dans la soude 150 mM à l'aide d'un gradient de 0 à 400mM d'acétate de sodium en 49 minutes.

5. Dosage du NAD(P)/NAD(P)H

Des cellules de *Chlamydomonas* en phase exponentielle de croissance (15-20 µg de chlorophylle par mL) sont culottées et congelées à -80°C. Pour chaque métabolite, un volume différent aura été prélevé, à savoir : 2,5 mL pour le NAD, 10 mL pour le NADH, 5 mL pour le NADP et 14 mL pour le NADPH. Ensuite, le protocole diffère selon que l'on veut analyser la forme réduite ou oxydée.

Pour les formes oxydées NAD⁺/NADP⁺, le culot est resuspendu dans 300 µL de milieu TAP. 250 µL d'acide chlorhydrique 0,1 M sont ajoutés et le mélange est bouilli 2 min à 100°C. L'ensemble est neutralisé par 250 µL de soude 0,1 M puis refroidi sur glace avant d'être centrifugé 1 min à 7000 rpm. Le surnageant est alors utilisé pour le dosage en lui-même. Pour les formes réduites NADH/NADPH, le culot est d'abord resuspendu dans 250 µL de TAP, l'extraction est effectuée par 250 µL de soude 0,1 M et la neutralisation à l'aide d'acide chlorhydrique 0,1 M.

Lors du dosage du couple NAD⁺/NADH, un mélange est réalisé. Celui-ci contient 152 µL du surnageant extrait, 30 µL de tampon Bicine 1 M, 30 µL d'EDTA 40 mM, 30 µL de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) 4,2 mM, 30 µL de phénazine éthosulfate (PES) 16,6 mM et 30 µL d'éthanol absolu. L'ensemble est porté à 37°C par incubation pendant 5 min puis 6,4 µL d'alcool déshydrogénase (500 U/mL) sont ajoutés avant de suivre l'évolution de l'absorbance à 570 nm pendant 10 min. Le NAD⁺ est converti en NADH par l'action de l'alcool déshydrogénase puis celui-ci réduit, via le PES, le MTT qui absorbe à 570 nm. Ce système permet un renouvellement permanent du NADH, ainsi la vitesse de réduction du MTT sera constante sur un intervalle supérieur à 10 min et est proportionnelle à la concentration du coenzyme.

Pour le couple NADP⁺/NADPH, le principe est le même sauf que l'enzyme utilisée est la glucose-6-phosphate déshydrogénase (5 µL à 500 U/mL) et le substrat le G6P 50 mM. Des courbes étalons ont été réalisées à l'aide de solutions à 100 µM, 200 µM, 400 µM et 600 µM de NADH et 25 µM, 50 µM, 100 µM et 200 µM pour les autres coenzymes d'oxydo-réduction.

6. Dosage de la chlorophylle

La quantité de chlorophylle dans un échantillon est évaluée par la mesure de l'absorbance au maximum d'absorption de chaque forme de chlorophylle, la chlorophylle a à 663 nm et la chlorophylle b à 646 nm.

Un millilitre de culture est culotté à 3000 rpm pendant 5 min puis resuspendu dans 1 mL de mélange Acétone / Méthanol (80:20). L'absorbance du surnageant obtenu après une nouvelle centrifugation (13000 rpm, 5 min) est mesurée à 750 nm, 663 nm et 646 nm. L'absorbance à 750 nm est soustraite aux autres et la concentration en chlorophylle (mg/mL) est calculée selon la formule :

$$0,01776 \times A(646 \text{ nm}) + 0,00734 \times A(663 \text{ nm})$$

V. Caractérisations enzymatiques

1. Préparation des extraits bruts

Une culture cellulaire TAP+N en fin de phase exponentielle de croissance est centrifugée 10 min à 3000 rpm. Un millilitre d'eau distillée est ajouté au culot avant de casser les cellules par sonication 30 sec sur glace. Le lysat est aliquoté en échantillons de 300 µL conservés à -80°C avant utilisation.

2. Dosage des protéines

La concentration protéique dans les extraits bruts préparés est évaluée grâce à la méthode de Bradford et à l'utilisation du kit Biorad Protein Assay. L'extrait brut est d'abord décongelé puis centrifugé 10 min à 13200 rpm et 4°C. Le surnageant est utilisé pour réaliser trois dilutions : 1/500^{ème}, 1/1000^{ème} et 1/2000^{ème} dans un volume de 800 µL. 200 µL de réactif Biorad sont ajoutés à chaque dilution et la concentration en protéines est déterminée par l'absorbance mesurée à 595 nm à l'aide d'une courbe étalon réalisée sur la sérumalbumine bovine pour des concentrations comprises entre 0 et 20 mg/mL.

3. Préparation des échantillons avant dépôt sur gel

La préparation de l'échantillon diffère en fonction des conditions de l'électrophorèse qui peut s'effectuer soit en conditions dénaturantes, soit en conditions natives. Dans le cas d'un zymogramme en conditions natives, le surnageant est directement utilisé avec le tampon de chargement (glycérol 20 %, Tris-Glycine 40 mM pH 8.3, bleu de bromophénol 0,001 %). En conditions dénaturantes, les protéines présentes dans le surnageant seront d'abord dénaturées en présence de β-mercaptoéthanol et de SDS (5 % : 2 %), et ce pendant 5 min à 99°C. L'échantillon peut ensuite être déposé après ajout du tampon de chargement.

La migration s'effectue sur un gel d'électrophorèse composé d'un gel de polyacrylamide à 4 % pour le gel de concentration et à 7 % pour le gel de séparation. Ceux-ci sont respectivement tamponnés par un Tris/HCl 125 mM pH 6.8 et un

Tris/HCl 375 mM pH 8.8. La migration est réalisée dans un tampon Tris-Glycine (25 mM : 192 mM), DTT 1 mM à 150V pendant 1h30. Pour les gels dénaturants, le tampon et le gel contiennent également du SDS concentré à 0,2 %. La migration est effectuée à 4°C pour les gels natifs.

4. Zymogramme révélant les activités hydrolytiques

Ce type de zymogramme permet de mettre en évidence les activités enzymatiques pouvant agir directement sur l'amidon. Celui-ci, provenant de la pomme de terre, est présent à 0,3 % dans le gel. A la fin de la migration en conditions dénaturantes, 4 lavages de 30 min au Tris 40 mM sont effectués pour éliminer toute trace de SDS. Le gel est ensuite incubé une nuit dans du Tris-Glycine DTT 20 mM. L'action des enzymes est finalement révélée par coloration du gel avec une solution d'iode.

5. Zymogramme révélant les activités phosphorylase

La migration s'effectue cette fois-ci sur un gel contenant du glycogène de foie de lapin comme substrat (0,3 %). Après migration, le gel est immédiatement lavé par du Tris 40 mM contenant du pyridoxal phosphate 20 mM, cofacteur essentiel de ce type d'enzyme. Trois lavages au Tris 40 mM sont ensuite réalisés et le gel est incubé une nuit dans un tampon citrate 100 mM contenant 20 mM de G1P après une pré-incubation de 10 min dans le même tampon sans G1P. L'activité phosphorylase est révélée par l'apparition de bandes noires après coloration avec la solution d'iode.

6. Zymogramme révélant les activités de branchement

L'électrophorèse s'effectue ici en conditions natives et sans substrat. La migration dure 4 h à 4°C et à 200V. Le gel est ensuite lavé à deux reprises par un tampon Hepes 50 mM pH 7 / glycérol 10 % et incubé une nuit en présence de G1P 40 mM, d'AMP 2,5 mM et de 10 mg de phosphorylase a de lapin. Les activités de branchement sont révélées par coloration à l'iode.

VI. Caractérisations moléculaires

1. Extraction de l'ADN génomique

Les cellules d'une préculture de *Chlamydomonas reinhardtii* sont centrifugées (3000 rpm, 5 min) et le culot est resuspendu dans 500 µL d'eau. Un volume de tampon de lyse 2X (Tris/HCl 200 mM pH 8.0, EDTA 3,5 mM, SDS 6 % (p/v)) est ajouté ainsi que 6 µL de protéinase K (20 mg/mL). Après 15 min d'incubation à température ambiante, 160 µL de chlorure de sodium 5 M sont ajoutés et le mélange est vortexé. 140 µL de CTAB/NaCl (10 % CTAB dans NaCl 0,7 M) sont ajoutés et l'ensemble est incubé 10 min à 65°C. L'ADN est ensuite obtenu par 2 à 3 extractions successives dans un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 : 1). A chaque extraction, le mélange est vortexé puis centrifugé à 13200 rpm pendant 10 min et la phase aqueuse résultante est reprise dans un volume du mélange jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse translucide. L'ADN est alors précipité par ajout d'un volume d'isopropanol. Il est ensuite culotté puis lavé par 1 mL d'éthanol 70 % avant d'être finalement repris dans 100 µL d'eau désionisée. La concentration et la pureté de l'ADN extrait sont analysées sur un dispositif Nanodrop (Labtech International Ltd., East Sussex, UK).

2. Réaction de Polymérisation en Chaîne

Les PCRs réalisées au cours de ce travail l'ont été en utilisant la polymérase EXT (Life Technologies Ltd, Paisley, UK) pour l'amplification de gènes destinés à l'expression, ou la DreamTaq polymérase (Life Technologies Ltd) pour le génotypage de souches, toujours en présence de 5 % DMSO. Les recommandations du fournisseur sont à chaque fois appliquées pour les paramètres des cycles et ces PCRs sont réalisées dans un Mastercycler Gradient Eppendorf (Eppendorf AG, Hambourg, GER).

L'ensemble des séquences et températures d'hybridation des amorces utilisées pour l'amplification de gènes ou parties de gènes est résumé dans le **Tableau 4**.

Souche	Nom	Séquence	Température	Taille
CAT3	Mex1For	5'-GGTCAGTAGCCGGAAAAAGCCCGTG-3'	72°C	1362 pb
	Mex1500Rev	5'-AGCACCACAGCCACTACACCAG-3'		
	RVMexFor	5'- <u>GATATCAT</u> GGAAGGGCGACGGACAACAG-3'	60°C	2736 pb
	RVMexRev	5'- <u>GATATCTTAT</u> GCGGGCCGCGGGCTTGCTG-3'		
CAT33	CBMFor	5'-CCGGGCGATGTTGACTCGGACAGC-3'	62°C	1078 pb
	CBMRev	5'-ACAATTCTGCCTGAGGCCTATCC-3'		
CAT60	NadkMutF	5'-ATGTCTCATGCAGAGACGGAC-3'	62°C	549 pb
	NadkMutR	5'-GTGAGCCCGGCTGCCACTGCG-3'		
	NdeI_NadkFor	5'- <u>CATATGT</u> TCTCATGCAGAGACGGAC-3'	60°C	4011 pb
	XbaI_NadkRev	5'- <u>TCTAGACT</u> AGGACTGCCGTGACGTCTGC-3'		

Tableau 4 : Caractéristiques des amorces utilisées pour le génotypage et la complémentation des souches mutantes de Chlamydomonas. Le nom de chaque mutant est indiqué en première colonne. Les températures d'hybridation et la taille des amplifiats attendus sont présentées. Lorsque présents les sites de restriction utilisés pour les clonages sont soulignés.

3. Extraction des ARN totaux

Des cellules de Chlamydomonas en phase exponentielle de croissance sont centrifugées, lavées par 5 mL de Tris 20 mM pH 7,8 puis congelées pendant 30 min minimum à -80°C. Le culot est ensuite resuspendu dans 1 mL de Trizol (Sigma-Aldrich, St-Louis, USA) et le mélange est transféré et incubé 5 min dans un tube Phase Lock Gel (5Prime, Gaithersburg, USA). Ce tube est vortexé après ajout de 500 µL de chloroforme avant d'être centrifugé 10 min à 13200 rpm et à 4°C. La phase aqueuse translucide est reprise dans 500 µL d'isopropanol. Si un trouble persiste, l'opération est répétée avec 200 µL de chloroforme supplémentaire. Le mélange est alors vortexé 10 sec puis incubé 10 min à température ambiante. Une nouvelle centrifugation à 13200 rpm permet d'obtenir un culot d'ARN qui est lavé par de l'éthanol 70 % puis resuspendu dans 40 µL d'eau traitée au DEPC. Là encore, la concentration et la pureté des ARNs sont évaluées par utilisation du Nanodrop.

4. Reverse-Transcription PCR

La réaction de RT-PCR est réalisée à l'aide du kit « One Step RT-PCR » de QIAGEN (Hilden, GER) qui permet d'une part la réaction de transcription inverse, soit la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN que l'on cherche à révéler et ceci grâce à la

transcriptase inverse ; et d'autre par son amplification par une polymérase. La réaction s'effectue sur 1 µg d'ARN totaux en présence de solution Q et selon les recommandations du fabricant. Les séquences des amorces utilisées ainsi que leur température d'hybridation et la taille des fragments spécifiques sont indiquées dans le **Tableau 5**.

Nom	Séquence	Température	Taille
<i>RTMexA</i>	5'-TCTCTGCCATGTTCTGGCAACAC-3'	60°C	374 pb
<i>RTMexE</i>	5'-CAGCCCAAGCGTGCAAATGAAG-3'		
<i>CAT60RT5F</i>	5'-TGACGGACAGCGCTGCGCTC-3'	69°C	516 pb
<i>CAT60RT5R</i>	5'-CTAGCACGCACTCGTTGAGCAC-3'		
<i>PhoBFor</i>	5'-CAGCCCAAGCGTGCAAATGAAG-3'	60°C	736 pb
<i>PhoBRev</i>	5'-TGCAGGAAGCGCCAGTTGA-3'		

Tableau 5 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification d'ADNc à partir des ARNs des souches CAT3 et CAT60. Le couple PhoBFor/PhoBRev sert à chaque fois de témoin de qualité des ARNs extraits.

5. Identification du site d'insertion

« Plasmid Rescue »

Deux microgrammes d'ADN génomique sont digérés pendant une nuit à température optimale par 20 unités d'enzyme de restriction. Les enzymes utilisées, *AatII* (37°C), *ApaI* (25°C) et *MluI* (37°C) coupent fréquemment dans le génome de la microalgue mais pas dans la séquence du plasmide inséré pSL18. L'enzyme est ensuite inactivée et les fragments obtenus sont circularisés à l'aide de la T4 DNA Ligase (Life Technologies) pendant 2h au minimum à 22°C. La ligase est inactivée puis le mélange de ligation est utilisé pour transformer des bactéries compétentes Top10 par choc thermique. Après étalement sur milieu LB + ampicilline (100 µg/mL), les bactéries ayant reçu un fragment qui contient le plasmide de mutagenèse pourront croître. Ces fragments sont ensuite purifiés à l'aide du kit Nucleospin Plasmid Easypure. La présence du plasmide pSL18 est vérifiée par restriction et recherche de bandes spécifiques sur gel d'agarose 1 % et, le cas échéant, le plasmide est séquencé à partir des amorces pSLFor (5'-CTGGCTTGCTCGGCGAGGAAACC-3') et pSLRev (5'-GATTACCCTGTCCTTGCAAATGC-3') par l'entreprise GATC Biotech (Constance, GER). Ces deux amorces se situent autour du site de restriction utilisé pour la

linéarisation du plasmide et permettent l'identification des séquences flanquant le site d'insertion. L'ensemble de la procédure est résumé dans la **Figure 19**.

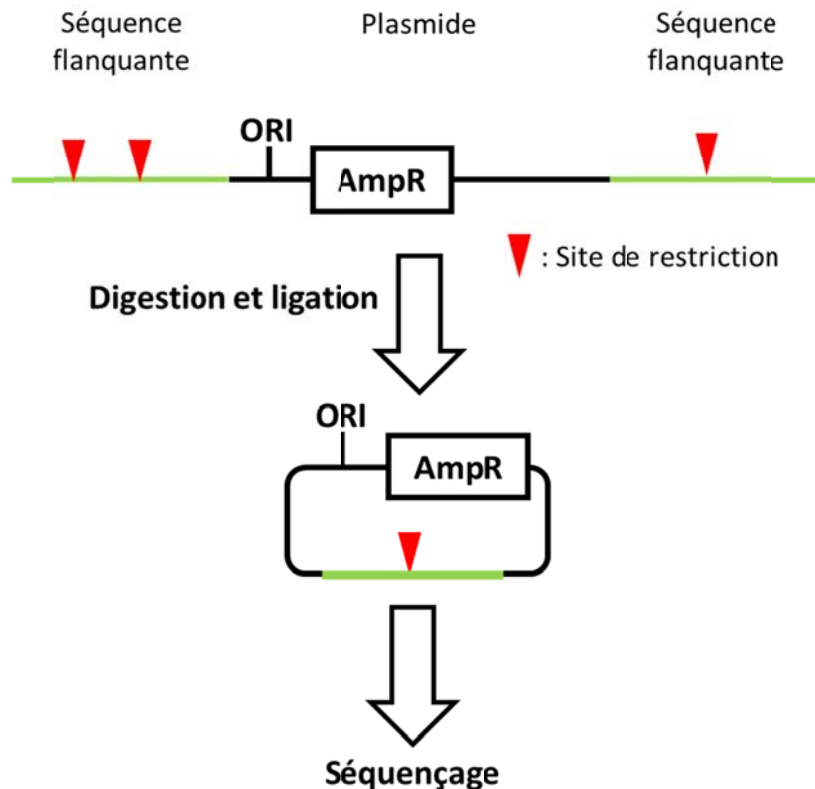


Figure 19 : Principe de la technique de « Plasmid Rescue ». Le plasmide inséré dans le génome peut être « extrait » par restriction par une enzyme coupant fréquemment. Il peut ensuite être amplifié, avec un fragment de génome dans des bactéries après circularisation. Le plasmide ainsi obtenu est finalement séquencé à partir d'amorces s'hybridant autour du site de restriction *EcoRI* utilisé pour la linéarisation avant la transformation.

PCR Inverse

La première partie de la technique de PCR inverse est très similaire à celle du « Plasmid Rescue ». 2 µg d'ADN génomique sont digérés une nuit à température optimale par 20 unités d'enzyme de restriction. Là encore, le choix se porte sur des enzymes coupant fréquemment dans le génome, mais la présence d'un ou plusieurs sites de restriction au sein du plasmide n'est pas un problème tant qu'il ne se situe pas entre les sites d'hybridation des amorces utilisées lors de la réaction de PCR. Les enzymes sélectionnées sont *BssHII* (50°C), *BsrBI* (37°C) et *EaeI* (37°C). Après digestion, celles-ci sont inactivées et les produits sont circularisés par la T4 DNA ligase. Suite à la ligation et à l'inactivation de la ligase, le mélange obtenu est utilisé dans une réaction de PCR utilisant soit les amorces PpsaDFor (5'-CATGTTTGCCCGAACTCGGAG-3') et PpsaDRev (5'-

CATTGCCTGCCTTCACGCATC-3') qui permettent l'amplification à partir de la région promotrice du gène *PSAD* contenue dans le plasmide ; soit les amorces TpsaDFor (5'-TGCAATGTAATGGCCAGGCCATG-3') et TpsaDRev (5'-ACTGGCTCACGCACACGCTAAC-3') spécifiques de la partie terminatrice. Au cours des cycles de PCR, l'hybridation se fait à 60°C et l'élongation dure 3 min à 72°C. L'ensemble du procédé est repris dans la **Figure 20**. Les produits de PCR sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1 % et, si amplifié spécifique il y a, celui-ci sera cloné à l'aide du kit TOPO TA Cloning (Life Technologies) puis séquencé à partir d'amorces standards (Topo-1 : 5'-TCGGATCCACTAGTAACG-3' ; Topo-2 : 5'-GTGTGATGGATATCTGC-3').

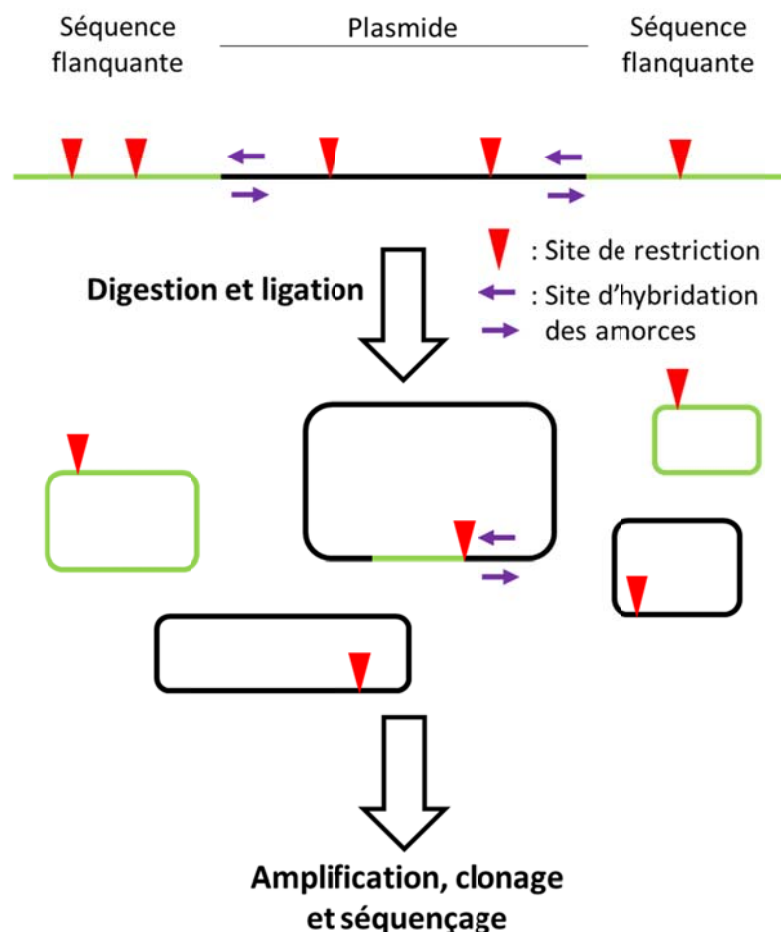


Figure 20 : Principe de la technique de PCR Inverse. Le plasmide inséré ainsi que le génome sont digérés et, après circularisation, donnent une population de fragments circulaires correspondant soit à de la séquence génomique seule, soit de fragments du plasmide ou de séquences hybrides composées d'une partie plasmidique et d'une autre génomique. Sur ces derniers, les amorces de PCR pourront s'hybrider et permettre l'amplification des séquences d'ADN génomique flanquantes. La bande obtenue sur gel d'agarose pourra être extraite, clonée et séquencée.

TAIL PCR

La technique de TAIL-PCR vise à amplifier la région flanquant l'insertion par l'utilisation d'une amorce spécifique de la cassette de résistance d'une part, et d'une amorce aspécifique ou dégénérée de l'autre. Cette procédure s'effectue en 3 réactions de PCR successives dont les produits attendus et leurs proportions dans la totalité des produits sont résumés dans la **Figure 21**. En analyse sur gel, une bande spécifique après la troisième réaction est en principe de taille légèrement inférieure à un produit déjà présent après la deuxième réaction. Si bande spécifique il y a, celle-ci est extraite, clonée puis séquencée, toujours à partir des mêmes amorces standards. Dans les **tableaux 6, 7, 8 et 9** sont regroupés l'ensemble des amorces utilisées pour cette technique ainsi que les conditions appliquées pour les différentes réactions.

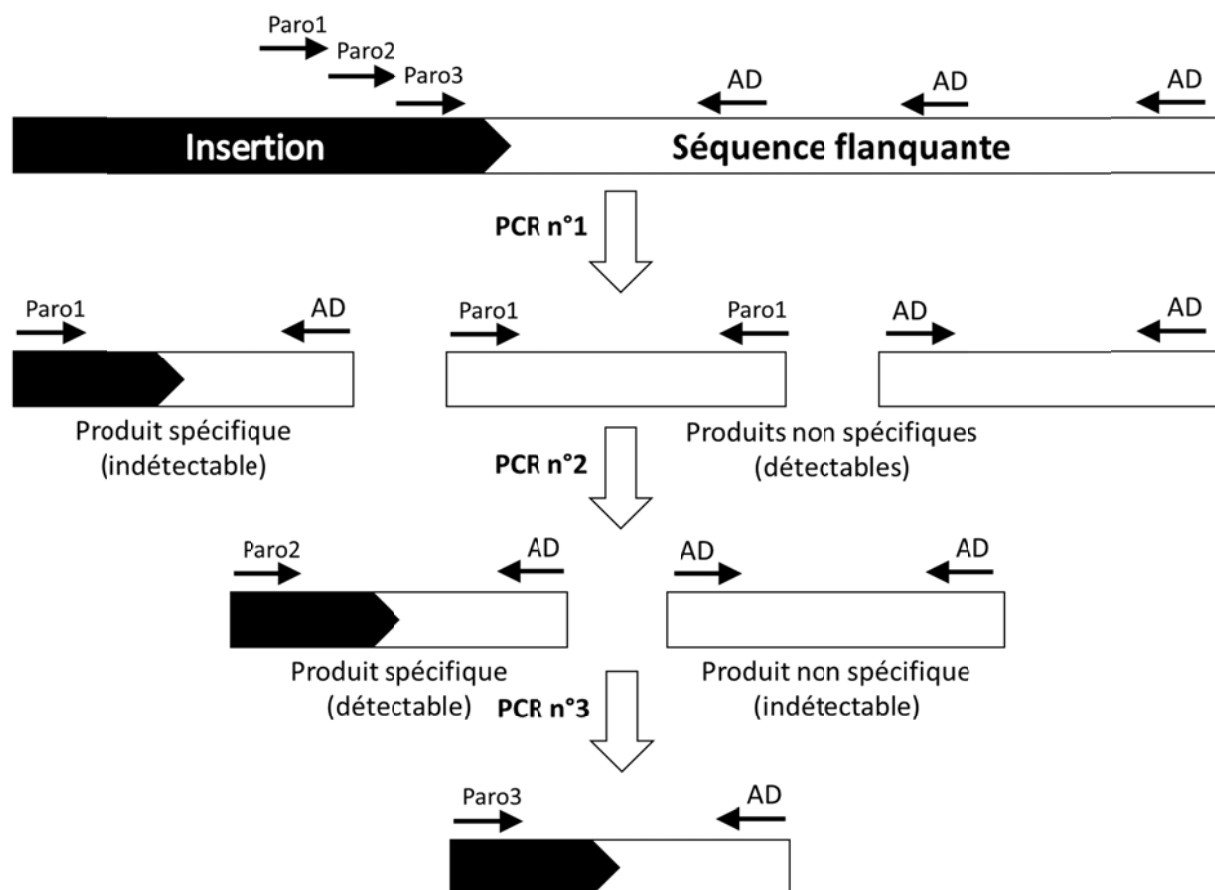


Figure 21 : Principe de la technique de TAIL-PCR. Au cours de la première PCR utilisant les amorces Paro1 et AD, trois types de produits pourront apparaître : un produit spécifique à partir des deux amorces ; deux produits aspécifiques produits chacun à partir de l'hybridation d'un seul type d'amorce. L'ensemble de ces produits est repris comme matrice pour une deuxième PCR utilisant les amorces Paro2 et AD.

	Nom de l'amorce	Séquence
<i>Amorces spécifiques</i>	Paro1	5'-GTGCTCGTTTGTGCTGAAAGT-3'
	Paro2	5'-CAAATCAGTCCTGTAGCTTCA-3'
	Paro3	5'-ACATACGCACCAATCATGTCA-3'
<i>Amorces dégénérées</i>	AD1	5'-STAGASTSTSGWGTS-3'
	AD2	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
	AD3	5'-SASCASASTSWWCTS-3'

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées au cours de la technique de TAIL-PCR. Les amorces spécifiques s'hybrident au niveau de la cassette de résistance à la paromomycine. Les amorces dégénérées (AD : Arbitrary Degenerated) s'hybrident au niveau de multiples régions du génome.

	Température et durée	Cycles
<i>Dénaturation initiale</i>	95°C, 3 min	x1
<i>Dénaturation</i>	95°C, 1 min	x7
<i>Hybridation</i>	65°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 1 min	
<i>Dénaturation</i>	95°C, 1 min	x1
<i>Hybridation</i>	25°C, 1 min	x1
<i>Hybridation</i>	Augmentation de température jusqu'à 72°C à 0,3°C.s ⁻¹	x1
<i>Polymérisation</i>	72°C, 2 min	x1
<i>Dénaturation</i>	95°C, 30 s	x15
<i>Hybridation</i>	65°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Dénaturation</i>	95°C, 30 s	
<i>Hybridation</i>	65°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Dénaturation</i>	95°C, 30 s	
<i>Hybridation</i>	48°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Polymérisation finale</i>	72°C, 5 min	x1

Tableau 7 : Conditions employées pour la PCR n°1 au cours de la technique de TAIL-PCR.

	Température et durée	Cycles
<i>Dénaturation initiale</i>	95°C, 3 min	x1
<i>Dénaturation</i>	95°C, 30 s	x15
<i>Hybridation</i>	65°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Dénaturation</i>	95°C, 30 s	
<i>Hybridation</i>	65°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Dénaturation</i>	95°C, 30 s	
<i>Hybridation</i>	44°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Polymérisation finale</i>	72°C, 5 min	x1

Tableau 8 : Conditions employées pour la PCR n°2 au cours de la technique de TAIL-PCR.

	Température et durée	Cycles
<i>Dénaturation initiale</i>	95°C, 3 min	x1
<i>Dénaturation</i>	95°C, 1 min	x30
<i>Hybridation</i>	50°C, 1 min	
<i>Polymérisation</i>	72°C, 3 min	
<i>Polymérisation finale</i>	72°C, 5 min	x1

Tableau 9 : Conditions employées pour la PCR n°3 au cours de la technique de TAIL-PCR.

Pour chaque technique, le résultat de séquençage est traité de la même manière. La séquence est d'abord « nettoyée » par comparaison deux à deux avec la séquence du plasmide de clonage, puis avec celle du plasmide ou de la cassette de transformation. On obtient ainsi une séquence spécifique du génome de l'algue. Celle-ci est finalement blastée dans la base de données du NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) ou dans la base spécifique des végétaux : Phytozome v10.2 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search>; version du génome : 5.5).

VII. Analyse de coségrégation

Pour contribuer à prouver la responsabilité d'une insertion dans le phénotype observé, la souche mutante peut être croisée avec une souche sauvage de polarité sexuelle opposée, 37. Les deux souches sont amplifiées sur milieu HSA riche puis resuspendues indépendamment en milieu TAP-N et incubées une nuit en lumière vive pour induire la gamétogenèse. Les deux souches sont ensuite mélangées et incubées 2 à 3 h à la lumière, le temps que les partenaires sexuels fusionnent. Des patches cellulaires de 60 μ L sont placés (4 par boîte) sur milieu HSA riche concentré à 4 % en agarose, puis incubés 6 jours minimum à l'obscurité afin d'obtenir l'enkystement des zygotes dans la gélose.

Après cette période d'incubation, les cellules végétatives sont éliminées par traitement de la boîte aux vapeurs de chloroforme et éliminées à l'aide d'un scalpel. Les zygotes résistants à ce traitement sont transférés sur un milieu HSA riche. Une incubation de 24 h en lumière vive permet l'induction de la méiose et la production de 4 cellules haploïdes contenues dans un asque. La paroi de cet asque est rompue et les 4 cellules sont séparées à l'aide d'une pipette Pasteur effilée (**Figure 22**). Les tétrades obtenues sont confirmées par l'analyse de la recombinaison des caractères parentaux, à savoir *ac14 pab2 nit1* et *nit2*, les auxotrophies des souches 137C et 37. Finalement, l'association entre le phénotype de dégradation et l'insertion identifiée est mise en évidence.



Figure 22 : Dissection de tétrades. Un morceau de gélose contenant les zygotes est traîné sur une nouvelle boîte afin de les en libérer (flèche horizontale, zygotes non sélectionnés). Ils sont ensuite isolés les uns des autres le long d'un axe et la germination est induite au cours des 24 h suivantes. Les quatre cellules résultant de la méiose sont finalement libérées de l'asque et séparées perpendiculairement au premier axe (flèche verticale).

VIII. Complémentation fonctionnelle

Pour chaque souche mutante ayant fait l'objet d'une caractérisation plus poussée, une complémentation fonctionnelle a été effectuée. Pour cela, une copie sauvage du gène identifié comme interrompu dans le mutant concerné est amplifiée puis clonée dans le vecteur pSLHyg sous le contrôle du promoteur du gène *PSAD* (**Figure 23**). Celui-ci est alors utilisé pour transformer la souche mutante et sélectionner des souches complémentantes sur un milieu HSA riche contenant de l'hygromycine (20 µg/mL, *APH7*" de *Spectromyces hygroscopicus*, Berthold *et al.*, 2002). En parallèle, cette même souche est également transformée par un vecteur vide. L'ensemble des souches utilisées est ensuite soumise au crible à l'iode en deux étapes. Lors de celui-ci, des souches présentant un retour à un phénotype sauvage sont recherchées.

Les souches complémentantes obtenues sont confirmées par un second crible sur boîte et une cinétique de dégradation en milieu liquide.

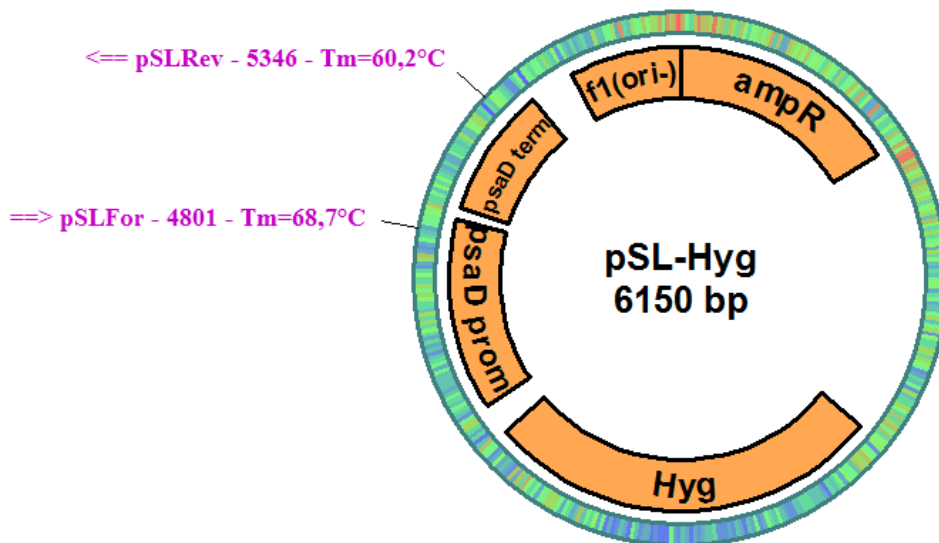


Figure 23 : Carte du vecteur de complémentation pSLHyg. Ce vecteur est identique au vecteur pSL18, mis à part le remplacement du gène de résistance à la paromomycine par un gène de résistance à l'hygromycine (*APH7*").

IX. *Escherichia coli*

1. Souche

La souche TST6 (F⁻, [*araD139*]_{B/r}, $\Delta(\textit{argF-lac})169$, λ^- , *flhD5301*, $\Delta(\textit{fruK-yeiR})725(\textit{fruA25})$, *relA1*, *rpsL150(strR)*, *rbsR22*, *malF55::Tn10*, $\Delta(\textit{fimB-fimE})632(::IS1)$, *deoC1*) a été obtenue au CGSC (Coli Genetic Stock Center, <http://cgsc.biology.yale.edu/index.php>).

La souche Top10 (F⁻, *mcrA*, $\Delta(\textit{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, $\phi80\textit{lacZ}\Delta M15$, $\Delta\textit{lacX74}$, *nupG*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(\textit{ara-leu})7697$, *galE15*, *galK16*, *rpsL(StrR)*, *endA1*, λ^-) est utilisée comme souche de clonage et d'amplification des différentes constructions utilisées.

2. Milieux de culture

Les tests de complémentation ont été réalisés en milieu M9 dont la composition est indiquée dans le **Tableau 10**. Celui-ci contient également une source de carbone, glucose ou maltose à 0,5 %, ainsi que l'inducteur, l'IPTG à 0,5 mM.

Composants		Quantité	
M9 sels		200 mL	
	Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	28,203 g	
	KH ₂ PO ₄	15 g	
	NaCl	2,5 g	
	NH ₄ Cl	5 g	
	pH 7,4		
	H ₂ O	qsp 1L	
MgSO ₄ 1 M			1 mL
CaCl ₂ 0,1 M			1 mL
Thiamine 1 M			1 mL
H ₂ O mQ			qsp 1 L

Tableau 10 : Composition du milieu minimum M9.

3. Construction des vecteurs

Les ADNc de *MEX* ont été amplifiés à l'aide des amorces précisées dans le **Tableau 11**. Dans le cas du gène de *Chlamydomonas*, une version synthétique composée de codons optimisés pour l'expression hétérologue a été synthétisée pour éviter des défauts d'expression dus au fort biais en G/C du génome de l'algue. Les gènes *MEX* de *Chlamydomonas* et d'*Arabidopsis*, de 1050 pb et 1119 pb respectivement, ont ensuite été transférés dans le vecteur d'expression pQE30 (QIAGEN, **Figure 24**) à l'aide des sites de restriction *Bam*HI et *Kpn*I introduits lors de l'amplification.

Nom	Séquence	Température	Taille
<i>Bam</i> HI <i>Mex</i> SynthF	5'-GGATCCGTTTCTTCTAGAAAGAAGC-3'	60°C	1050 pb
<i>Kpn</i> I <i>Mex</i> SynthR	5'-GGTACCTTAAGCTGGTCTTGGAGAAGC-3'		
<i>Bam</i> HI <i>Mex</i> aF	5'-GGATCCTGTTCCGGCGTCAATGGCTTGAC-3'	60°C	1119 pb
<i>Kpn</i> I <i>Mex</i> aR	5'-GGTACCTTACGGTCCAAAACAAGTTCTTTCAAAG-3'		

Tableau 11 : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification de la copie synthétique du gène *MEX* de *Chlamydomonas* (1^{er} couple) et celle du cDNA d'*Arabidopsis*. Les sites de restriction sont soulignés.

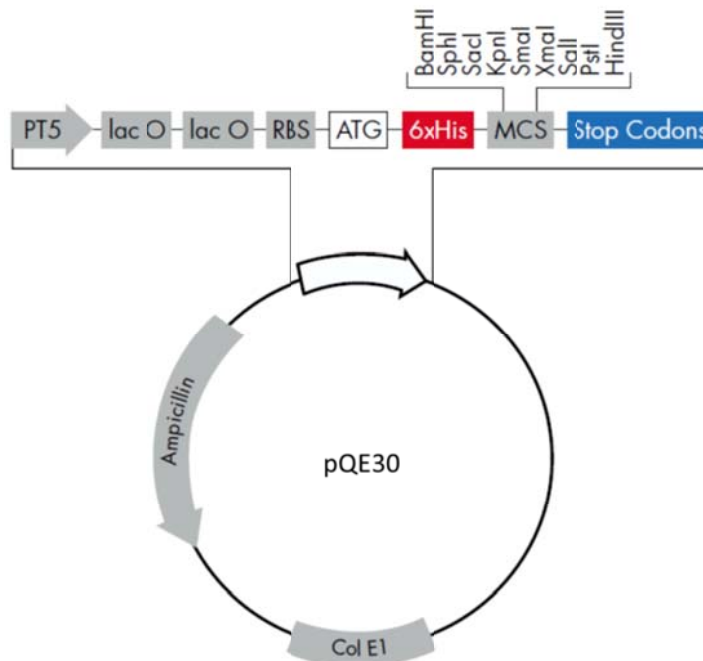


Figure 24 : Carte du vecteur d'expression pQE30. Celui-ci est composé d'une origine de réplication (Col E1) et du gène codant la β -lactamase qui permet la résistance à l'ampicilline. Le gène cloné y sera placé sous le contrôle du promoteur de l'opéron lactose (*lacO*) et son expression sera induite par l'IPTG. La protéine synthétisée sera fusionnée en position N-terminale à un tag Histidine (6xHis).

4. Analyse de la complémentation

Une fois transformée par le vecteur contenant le gène de *Chlamydomonas* ou d'*Arabidopsis*, la croissance de la souche TST6 est testée dans un milieu M9 contenant du maltose 0,5 % comme seule source de carbone. Un témoin où le maltose est substitué par du glucose est réalisé. Après une préculture de 16 h en milieu riche LB à 37°C, le milieu M9 est ensemencé à une densité optique d'environ 0,05 à 620 nm. L'évolution de cette absorbance à 37°C est suivie toutes les heures sur une plage de 8 h.

X. *Arabidopsis thaliana*

1. Lignées

La lignée sauvage Columbia (Col-0) a été utilisée comme témoin. La lignée *mex1* dont la référence est SAIL_574_D11 a été obtenue chez Syngenta (Bâle, SUI). Cette lignée a été obtenue par insertion d'ADN de transfert dans le génome de la lignée sauvage Col-0. La lignée *mex1* contient une insertion localisée au niveau du septième exon du gène.

2. Milieux et conditions de culture

En conditions normales, les plantes sont cultivées dans du terreau, dans une chambre de culture et sous conditions de température, de lumière et d'humidité régulées. Elles sont soumises à un cycle 12 h jour : 12 h nuit à 23°C le jour et 20°C la nuit ainsi qu'à un taux d'humidité relative de 75 %. Pour la sélection de transformants, les graines ont été semées sur un milieu Murashige et Skoog (MS) concentré à 1 % en agarose et contenant de l'hygromycine (20 µg/mL) comme pression de sélection. Les transformants ont ensuite été repiqués sur terreau et transférés en serre. Pour l'isolement de protoplastes, les graines ont été semées sur milieu MS 1 % agarose.

3. Extraction d'ADN génomique

Deux feuilles d'une plante âgée d'environ 4 semaines sont prélevées et congelées dans de l'azote liquide. Ces feuilles sont broyées à l'aide d'un pilon et la poudre obtenue est incubée pendant 30 min dans 400 µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2 %, β-mercaptoéthanol 0,064 %) à 60°C. Un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) est ajouté et, après agitation au vortex, l'ensemble est centrifugé 15 min à 13200 rpm et à 4°C. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est ensuite précipité par 250 µL d'isopropanol puis culotté par centrifugation 30 min à 13200 rpm et 4°C. Le culot est lavé par 300 µL d'éthanol 70 % puis resuspendu dans 50 µL d'eau distillée stérile.

4. PCR

Les réactions de PCR s'effectuent sur 1µg d'ADN en utilisant la GoTaq DNA polymérase (Promega, Madison, USA). Les caractéristiques des amorces utilisées pour le génotypage des lignées sont résumées dans le **Tableau 12**.

Nom	Séquence	Température	Taille
<i>Mex1-For2</i>	5'-GCTTATGATCCCTCGAGCAC-3'	53°C	553 pb (copie sauvage)
<i>RevMexaf</i>	5'-CGGTCCAAAAACAAGTTCTTTCAAAG-3'		
<i>LB1</i>	5'-CCTTTTCAGAAATGGATAAATAG-3'		
<i>BamHIMexSynthF</i>	5'-GGATCCGTTTCTTCTAGAAAGAAGC-3'	60°C	1050 pb
<i>KpnIMexSynthR</i>	5'-GGTACCTTAAGCTGGTCTTGGAGAAGC-3'		

Tableau 12 : Caractéristiques des amorces utilisées pour le génotypage des lignées d'Arabidopsis. Le premier triplet permet, en une seule PCR, de mettre en évidence à la fois le locus sauvage et le locus contenant l'ADN-T du gène *MEX1* d'Arabidopsis. Le second couple d'amorces a été utilisé pour vérifier la présence du gène de Chlamydomonas chez la plante.

Pour la synthèse de gène destinée au clonage et à l'expression, la polymérase haute-fidélité KAPA HiFi HotStart (KAPA Biosystems, Wilmington, USA) a été utilisée selon les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées dans cette optique sont reprises dans le **Tableau 14** (voir X. 7.).

5. Extraction d'ARN

Comme pour l'extraction d'ADN, deux feuilles sont congelées dans de l'azote liquide et broyées à l'aide d'un pilon. Les ARNs contenus dans la poudre obtenue sont extraits à l'aide du kit Nucleospin RNA Plant (Macherey-Nagel). A noter qu'un traitement supplémentaire à la DNase est nécessaire (10 min à 37°C). Les ARNs sont ensuite repurifiés par précipitation à l'éthanol.

6. RT-PCR

La réaction de RT-PCR sur les ARNs d'*Arabidopsis thaliana* se fait avec le même kit « One Step RT-PCR » que pour les ARNs de Chlamydomonas. Les

amorces utilisées, la température optimale d'hybridation pour chaque couple ainsi que la taille attendue sont indiquées dans le **Tableau 13**.

Nom	Séquence	Température	Taille
<i>Mex1For-2</i>	5'-GCTTATGATCCCTCGAGCAC-3'	53°C	247 pb
<i>RevMexaf</i>	5'-CGGTCCAAAAACAAGTTCTTTCAAAG-3'		
<i>LB1</i>	5'-CCTTTTCAGAAATGGATAAATAG-3'		
<i>Mex350For</i>	5'-TTRACTTGTCTGCTATGTTTCG-3'	53°C	522 pb
<i>Mex850Rev</i>	5'-GGTTCCAACAAGTTTCTAACC-3'		

Tableau 13: Caractéristiques des amorces utilisées pour la RT-PCR chez *Arabidopsis thaliana*. Le premier couple permet l'amplification d'un fragment de 247 pb spécifique de l'ARNm du gène *MEX1* endogène de la plante. Le second couple permet l'amplification d'un fragment du cDNA de *Chlamydomonas*. L'utilisation de l'amorce LB1 garantit l'absence d'ADN contaminant dans la préparation d'ARN utilisée.

7. Construction des vecteurs

Vecteur de complémentation de la lignée mutante *mex1* d'*Arabidopsis* :

pMDC32-Mex1

Une copie synthétique contenant des codons optimisés pour l'expression chez la plante du cDNA *MEX* de *Chlamydomonas* a été utilisée (Annexe 1). Cette copie est amputée des codons correspondants aux 26 acides aminés de son peptide de transit qui ont été remplacés par celui de l'isoamylase 1 d'*Arabidopsis*. Ces deux parties ont d'abord été amplifiées indépendamment à l'aide des couples d'amorces 2TagFor/TPMexRev et MexF/MexR puis ont été associées par PCR sans amorce (hybridation à 59°C, élongation 3 min 20 s). Le produit de 1171 pb a été directement cloné dans le vecteur d'entrée pENTR D-TOPO (**Figure 25 A**) grâce au kit TOPO Cloning (Invitrogen) permettant l'introduction des séquences Gateway.

Une fois la construction vérifiée par séquençage, le plasmide a été débarrassé de sa cassette de résistance à la kanamycine par restriction avec l'enzyme *MluI*. Le fragment obtenu a alors été transféré dans le vecteur de destination pMDC32 (**Figure 25 B**) par la méthode Gateway (Invitrogen) et la construction vérifiée par restriction avant transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Nom	Séquence	Température	Taille
<i>2TagFor</i>	5'-CACCATGGATGCAATCAAATGCAGTTCCAGTTTC-3'	60°C	164 pb
<i>TPMexRev</i>	5'-ATGGTGGAACTGGCTTCTTTCTAGAAGAAACGGA AATCGAAATCGGACGGAAGAG-3'		
<i>MexF</i>	5'-GTTTCTTCTAGAAAGAAGCC-3'	55°C	1038 pb
<i>MexR</i>	5'-TTAAGCTGGTCTTGGAGAAGCAGC-3'		
<i>CrMex1ArabidoGFor</i>	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCA TGGATGCAATCAAATGCAG-3'	64°C	1225 pb
<i>CrMex1ArabidoGRev</i>	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGC TGGTCTTGGAGAAG-3'		

Tableau 14 : Caractéristiques des amorces utilisées pour la complémentation hétérologue de la lignée *mex1* d'Arabidopsis et pour la localisation cellulaire de la protéine de Chlamydomonas chez la plante. Le premier couple a été utilisé pour amplifier la séquence du peptide de transit de l'isoamylase 1 d'Arabidopsis qui a été greffée au gène synthétique *MEX* de Chlamydomonas sans son propre peptide de transit. Le 3^{ème} couple d'amorces permet l'amplification du transgène utilisé pour la fusion avec la GFP en y ajoutant les sites nécessaires à la réaction de BP clonage.

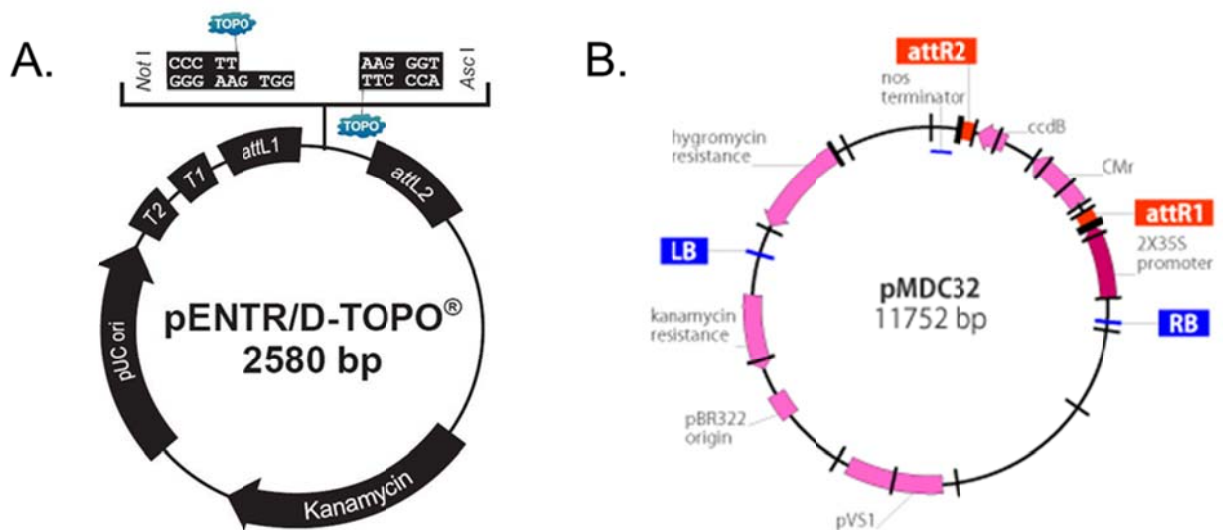


Figure 25 : Carte des vecteurs utilisés pour la complémentation de la lignée *mex1* d'Arabidopsis. Le vecteur pENTR (A) sert de substrat à la réaction de LR clonage pour le transfert de la séquence d'intérêt vers le vecteur de destination pMDC32 (B). Le vecteur pMDC32 porte la résistance à la kanamycine utilisée pour la sélection dans les bactéries, et la résistance à l'hygromycine utilisée pour la sélection des plantes transformantes.

Vecteur d'expression de la protéine fusionnée à la GFP : pH7FWG2-Mex1

Le plasmide pMDC32-MEX construit pour la tentative de complémentation du mutant d'Arabidopsis avec le gène synthétique de Chlamydomonas a servi de base à cette construction. La séquence d'intérêt a été amplifiée à l'aide des amorces CrMex1ArabidoGFor et CrMex1ArabidoGRev afin d'y introduire les séquences gateway et le produit obtenu a été cloné dans le vecteur pDONR201 (**Figure 26 A**)

avant d'être transféré dans le vecteur de destination pH7FWG2 (**Figure 26 B**). Le vecteur p2FGW7 seul a été utilisé comme témoin de localisation de la GFP libre (**Figure 26 C**).

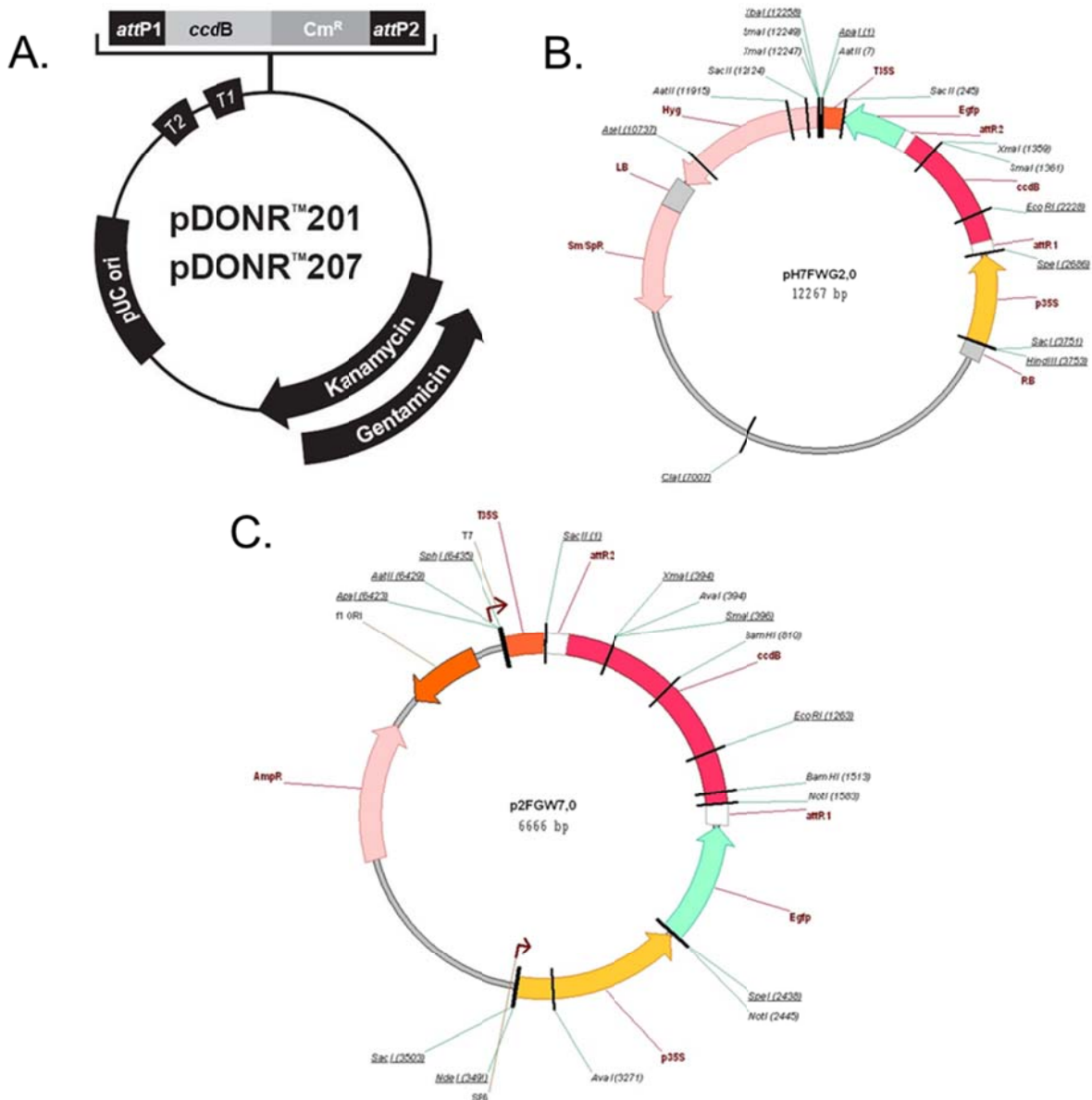


Figure 26 : Cartes des vecteurs utilisés pour la localisation cellulaire de la protéine Mex1 de *Chlamydomonas* dans les protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*. A. Le vecteur pDONR sert d'abord de vecteur d'entrée recevant le transgène par la réaction de BP clonage puis il sert de substrat à la LR clonase qui transfère la séquence vers le vecteur de destination pH7FWG2 (B) afin d'obtenir une fusion avec le gène codant la GFP et sous le contrôle du promoteur p35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. C. Carte du vecteur servant de contrôle de localisation de la GFP libre : p2FGW7. Le gène codant la GFP est directement placé sous le contrôle du promoteur p35S

8. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 se fait selon un processus de congélation/décongélation. Des bactéries sont portées en phase exponentielle de croissance à 30°C en milieu riche LB additionné de gentamycine, antibiotique auquel elles sont capables de résister grâce à un plasmide contenant également les gènes de virulence. Ces cellules sont ensuite congelées dans l'azote liquide puis décongelées à 37°C pendant 5 min, le tout en présence du plasmide de transformation. Une incubation de 2h à 30°C dans 1 mL de LB permet aux cellules de récupérer du choc thermique et de synthétiser la protéine qui dégradera l'antibiotique présent sur le milieu gélosé sur lequel elles sont étalées par la suite.

9. Transformation de la lignée *mex1* d'*Arabidopsis thaliana*

Une culture d'agrobactéries transformées en phase stationnaire ($DO \approx 2$) est centrifugée (4000 rpm, 20 min) puis resuspendue dans le milieu d'infiltration (MS 0.5X, 5 % saccharose, 0,05 % Silwett L77). Les boutons floraux, sur le point de s'ouvrir, ont été imprégnés de cette suspension puis les plantes transformées ont été emballées de manière à maximiser le taux d'humidité, facteur crucial pour la réussite de l'agroinfection. Auparavant, les boutons floraux ouverts auront été éliminés pour maximiser le taux de graines transformées.

10. Sélection des transformants

Au bout d'un mois environ, les boutons floraux transformés ont mûri en siliques qui ont séché et ont été récupérés pour en extraire les graines par tamisage. Ces graines sont ensuite aseptisées par 2 « bains » successifs de 30 sec dans l'éthanol 70 % suivis d'une très brève période dans de l'éthanol absolu. Elles sont alors semées sur milieu MS + hygromycine, vernalisées pendant 48 h à l'obscurité et à 4°C puis transférées en chambre de culture en cycle de 16 h de jour. Les plantes transformées se distinguent alors par leur capacité à pousser en s'alimentant du milieu de culture et sont donc plus grande que les plantes non transformées qui, une fois les réserves de la graine épuisées, sont contre-sélectionnées par l'hygromycine

présente dans le milieu. Les plantes résistantes sont ensuite transférées sur terreau et en serre avant de tester la présence du transgène par PCR.

11. Dosage des polysaccharides

Une rosette est prélevée en fin de nuit ou de jour et est directement congelée dans l'azote liquide. Celle-ci est ensuite broyée dans 5 mL d'eau à l'aide d'un appareil de type Polytron jusqu'à obtenir une solution homogène. Elle est ensuite centrifugée 30 min à 4000 rpm et à 4°C pour séparer les sucres solubles dans le surnageant, de l'amidon que l'on trouvera dans le culot. Le surnageant est bouilli 10 min à 99°C tandis que le culot est resuspendu dans 5 mL d'eau stérile. Les niveaux de sucres dans les deux fractions sont analysés de la même manière que pour *Chlamydomonas*, à l'aide du kit Enzytec Starch Assay, et sur des dilutions de 1/2, 1/4 et 1/8^{ème}.

12. Isolement de protoplastes

Les protoplastes ont été isolés à partir de plantules cultivées en milieu MS gélosé en chambre de culture depuis 2 à 3 semaines. Les parties aériennes sont prélevées et coupées en fragment de moins d'1 mm de large en moyenne dans du mannitol 0,5 M stérile. Afin de séparer les cellules les unes des autres, l'ensemble est digéré par une suspension enzymatique (mannitol 400 mM, acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES) 5 mM, CaCl₂ 8 mM, Cellulase 1 %, Macérozyme 0,25 %, pH 5,6 à la potasse) une nuit à température ambiante dans une boîte de Pétri et à l'obscurité. Les protoplastes sont ensuite délicatement libérés en appliquant un mouvement orbital à cette boîte. A partir de cette étape, chaque manipulation est réalisée à l'aide de pipettes Pasteur présentant une ouverture d'environ 2 mm pour préserver les protoplastes de toute pression par étranglement au cours du pipetage. Les protoplastes sont culottés dans un tube de 13 mL à fond rond par centrifugation 5 min à 50 g avec un rotor à paniers oscillants (accélération et décélération réduites) puis resuspendus dans 5 mL de solution de lavage W5 (NaCl 154 mM, CaCl₂ 125 mM, KCl 5 mM, glucose 5 mM, MES 1,5 mM, pH 5,6 à la potasse). Deux fois 2,5 mL sont déposés à l'interface d'une solution de saccharose 21 %. Une centrifugation à 50 g pendant 10 min permet la séparation des protoplastes intacts, qui restent à

l'interface, des cellules lysées qui culottent. Ils sont alors repris dans un nouveau tube, dans la solution W5 et leur nombre est évalué par comptage. Après une nouvelle centrifugation (50 g, 5 min), ils sont finalement resuspendus dans la solution MaMg (Mannitol 400 mM, MgCl₂ 15 mM, MES 5 mM, pH 5,6 à la potasse) à une densité d'environ 5.10⁶ protoplastes par mL.

13. Transformation de protoplastes

Pour la transformation de ces protoplastes, la méthode utilisant le PEG a été appliquée. 300 µL de protoplastes sont mélangés à 50 µg de plasmide et 50 µg d'ADN de sperme de saumon puis 325 µL d'une solution de PEG 4000 (PEG 4000 40 %, mannitol 400 mM, Ca(NO₃)₂ 100 mM, pH 7-8 à la potasse). Après une incubation de 30 min sur glace, les protoplastes sont resuspendus dans 10 mL de solution W5 par ajout en étapes d'environ ½ volume. Ils sont ensuite culottés 5 min à 50g puis finalement resuspendus dans 4 mL de solution W5 et incubés 24 h à l'obscurité et à température ambiante dans une boîte de Pétri de diamètre 35 mm.

14. Observations en microscopie confocale

Après incubation, l'expression de la fusion protéique Mex-GFP ainsi que celle de la GFP libre (vecteur vide) ont été analysées sur un microscope inversé confocal Zeiss LSM 780 avec un objectif 63X à ouverture 1,40. La chlorophylle est excitée par une diode laser à 405 nm et son autofluorescence est collectée dans une fenêtre entre 593 et 735 nm. La GFP est excitée par un laser Argon à 488 nm et son signal d'émission est récupéré entre 493 et 560 nm. Les imageries 3D ont été réalisées par coupe de 1,2 µm. Toutes les images ont été analysées sur le logiciel Zeiss ZEN 2012.

Résultats

Chapitre I Complémentation du mutant de synthèse *sta8*

Bien que particulièrement axés sur la découverte de nouvelles fonctions impliquées dans la dégradation de l'amidon, mes travaux durant ces trois années de thèse ont également porté sur l'élucidation de la nature moléculaire de la mutation présente chez le mutant *sta8* de *Chlamydomonas*. Ce mutant présente un phénotype de synthèse puisque les mutants portant cette mutation contiennent un taux amoindri d'amidon qui en plus possède une structure altérée. La présence de phytyloglycogène identique à celui retrouvé dans le mutant isoamylase 1 de l'algue (*sta7* ; Mouille *et al.*, 1996) laissait présager que cette souche portait une mutation dans un gène codant une activité du même type. Le candidat le plus probable était bien entendu le gène d'isoamylase 2 déjà décrite chez la plante. Une nouvelle annotation du génome de l'algue lors de ma thèse nous a permis d'identifier la séquence du gène de l'isoamylase 2 de *Chlamydomonas*, une information qui n'était pas disponible lors de l'étude de ce mutant dans notre laboratoire (Dauvillée *et al.*, 2001a et b). Mon implication dans ce projet a été de construire le vecteur de complémentation et de vérifier le retour à un processus normal de synthèse de l'amidon dans les transformants. L'utilisation d'une version tagguée HA du vecteur de complémentation m'a également permis de démontrer l'interaction entre la sous-unité catalytique de l'isoamylase (Isa1, *STA7*) et la sous-unité non catalytique (Isa2, *STA8*). Ce projet n'étant pas au cœur de mes travaux, la description de ces derniers ne sera pas détaillée dans ce manuscrit mais peut être retrouvée dans la publication découlant de la collaboration avec le groupe du Pr Palcic et qui est disponible en annexe (Annexe 2, Sim *et al.*, 2014).

Chapitre II Construction de la banque de mutants

I. Transformation nucléaire et crible phénotypique

Plusieurs campagnes de mutagenèse ont été réalisées sur la souche sauvage de référence 137C, permettant l'insertion du plasmide pSL18 linéarisé par *EcoRI* ou de la cassette de résistance à la paromomycine amplifiée par PCR, et ceci en appliquant soit la méthode des billes de verre (Kindle, 1990), soit l'électroporation. Un total de plus de 32000 souches transformantes résistantes à l'antibiotique a été obtenu (22000 obtenues par transformation avec le plasmide entier et 10000 avec la cassette seule). La transformation par le plasmide linéarisé a été bien plus efficace que celle avec la cassette de résistance seule puisqu'une moyenne de 2000 transformants par microgramme de plasmide a été obtenue contre une centaine seulement par microgramme de cassette.

L'ensemble des 32000 souches a été soumis au crible à l'iode en deux étapes et les candidats potentiellement déficients pour la dégradation de l'amidon ont été soumis une seconde fois à ce crible (**Figure 27**). Un total de 62 souches déficientes pour la dégradation de l'amidon en milieu gélosé a ainsi été isolé et nommé CAT1 à CAT62. Il est à noter que, quelque soit la technique ou l'insert utilisé, la fréquence d'apparition de ces mutants de dégradation parmi les souches résistantes est invariable, de l'ordre d'un mutant tous les 500 transformants. Les souches isolées ont alors fait l'objet de deux volets de caractérisations biochimiques et moléculaires, d'une part pour évaluer l'impact de la mutagenèse sur les quantités d'amidon accumulées, sur sa structure et la capacité de la souche à le dégrader ; et d'autre part pour déterminer la fonction dont l'absence est responsable du phénotype observé.

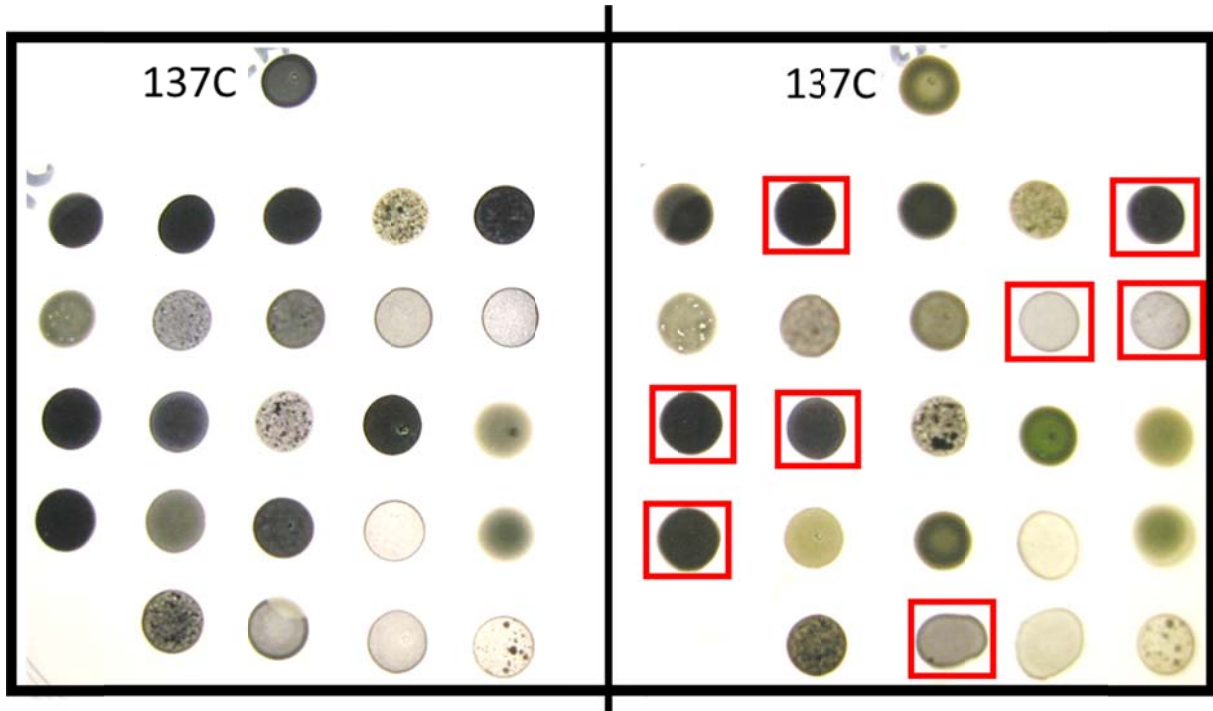


Figure 27 : Crible phénotypique en deux étapes de souches candidates. Après isolement au cours d'un premier crible, les candidats sont vérifiés par un second crible. Le panneau de gauche est constitué de patches cellulaires incubés 5 jours en carence azotée à la lumière et reflètent donc l'accumulation d'amidon. Le panneau de droite est composé de copies des premiers patches pour lesquels la carence azotée a été levée après 5 jours et qui ont été incubés 24 h à l'obscurité pour induire la dégradation du polysaccharide, mise en évidence par une perte de l'interaction à l'iode chez la souche sauvage 137C. Les patches encadrés en rouge représentent des exemples de souches sélectionnées.

II. Caractérisations biochimiques des souches CAT

1. Cinétique de dégradation et accumulation d'amidon

Dans un premier temps, le défaut de dégradation suspecté en milieu gélosé lors du crible à l'iode a été vérifié en milieu liquide à l'aide de cinétiques. Les quantités d'amidon résiduel après 24 h d'incubation à l'obscurité sont indiquées dans la **Figure 28**. En fonction de ces résultats, les souches CAT ont été classées en 3 groupes. La première classe est composée de souches dégradant leur amidon de manière au moins aussi efficace que la souche sauvage en milieu liquide. Ayant été auparavant confirmées par au moins deux cribles successifs sur boîte, ces souches peuvent être considérées comme des faux positifs ou comme des mutants conditionnels dont le phénotype de dégradation dépend du type de culture, liquide ou solide. La seconde classe de mutants regroupe des souches de phénotype intermédiaire, dégradant moins bien leur amidon que 137C sans que la différence soit extrêmement marquée. Dans ce groupe de 15 mutants, les souches contiennent encore de 35 % à 49 % de la quantité de polysaccharide mesurée avant le passage à l'obscurité alors que le sauvage en contient seulement 28 %. Enfin, la dernière classe regroupe les souches ayant dégradé moins de la moitié du pool d'amidon de départ et parmi lesquelles certaines semblent totalement incapables d'enclencher un processus de dégradation dans nos conditions expérimentales.

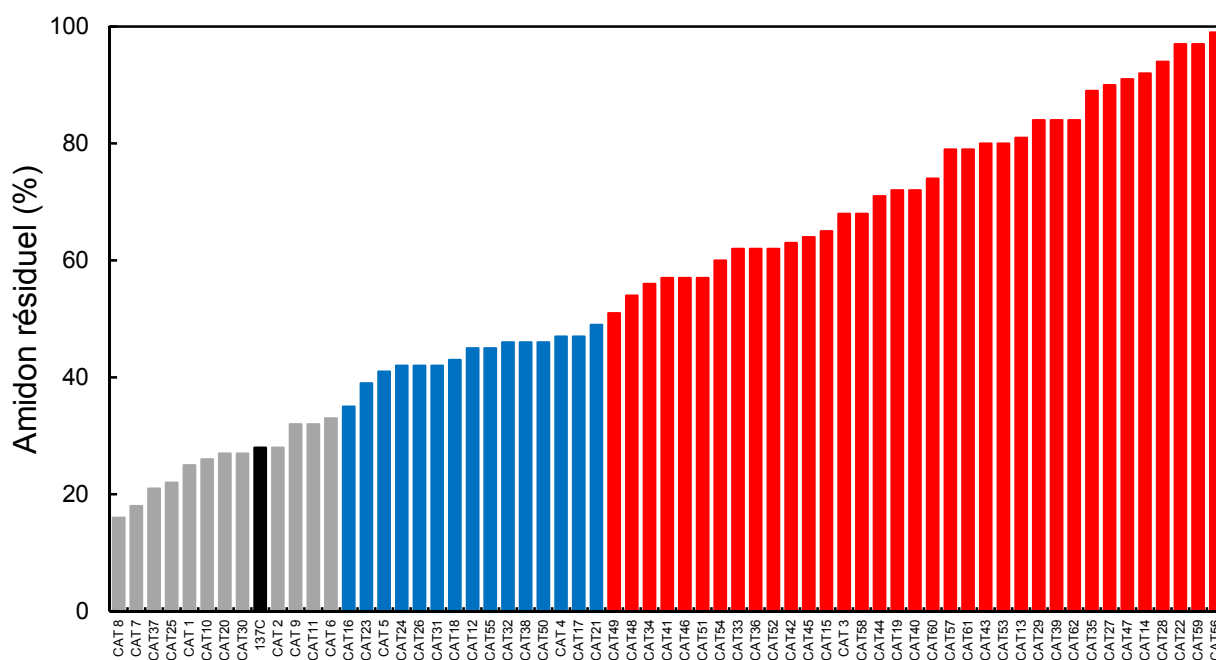


Figure 28 : Quantités d'amidon résiduel après 24 h d'incubation à l'obscurité. Les mutants CAT sont rangés en 3 classes en fonction du ralentissement de la dégradation. La classe I est représentée en gris, la classe II en bleu, la classe III en rouge et le sauvage 137C en noir.

En parallèle, la quantité d'amidon accumulé par les souches CAT a été dosée après cinq jours d'accumulation en carence azotée dans un milieu liquide TAP-N. Une grande dispersion de ces quantités est observée parmi ces souches. En effet, certaines accumulent le polysaccharide dans des proportions peu différentes de la souche sauvage, voire significativement inférieures tandis que d'autres atteignent jusqu'à environ 400 % de la quantité sauvage comme c'est le cas des souches CAT9 ou CAT27 (**Figure 29**). On remarquera que le plus souvent, un fort défaut de dégradation est associé à une suraccumulation d'amidon et donc un phénotype sex (Starch Excess) comme ce qui est observé chez les mutants de dégradation d'*Arabidopsis thaliana*. Toutefois, certaines souches fortement affectées dans la dégradation accumulent une quantité tout à fait normale du polysaccharide. C'est le cas typiquement des souches CAT13, CAT35 et CAT62 qui n'accumulent que 67, 73 et 75 % de la quantité sauvage alors qu'elles ne dégradent que 19, 11 et 16 % du polysaccharide, respectivement soit bien moins que les 72 % observés chez 137C. Le lien entre le défaut de dégradation de l'amidon et la suraccumulation semble donc exister mais ne représente pas une règle absolue.

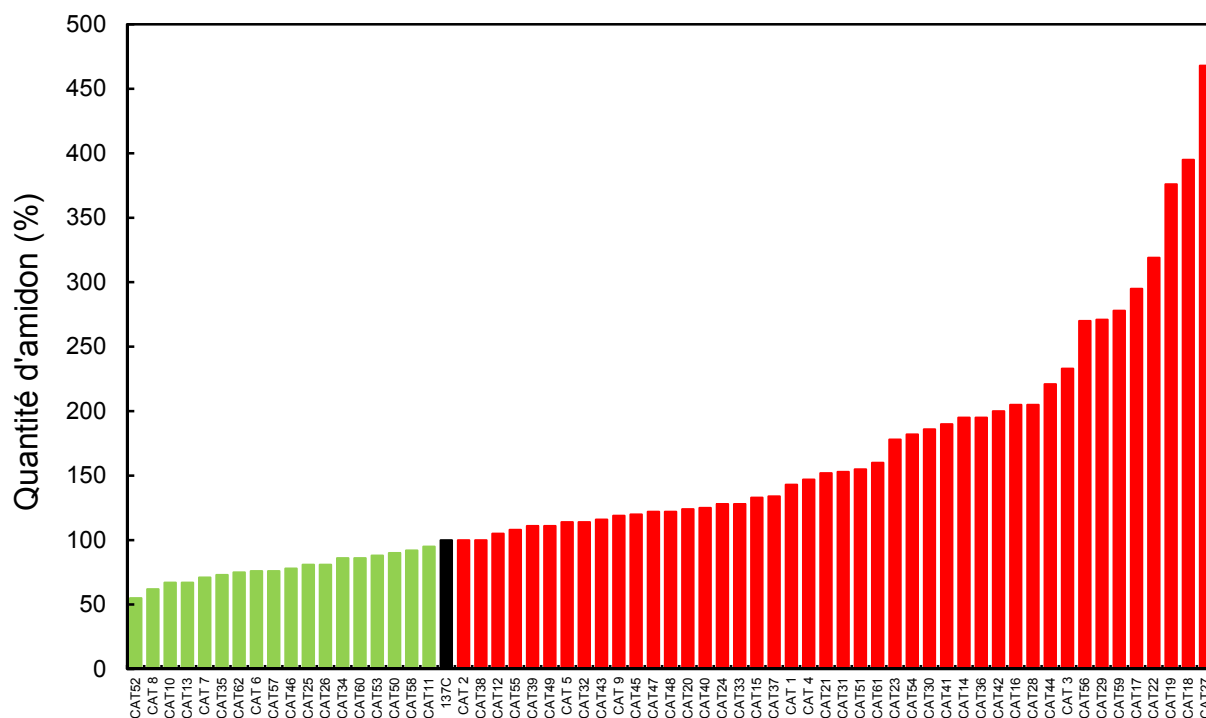


Figure 29 : Pourcentages d'amidon par rapport à la référence sauvage. Les quantités d'amidon accumulées par les souches CAT en milieu carencé sont représentées en pourcentage par rapport au sauvage 137C. Les souches en vert accumulent moins d'amidon que la souche sauvage tandis que les souches en rouge contiennent autant ou plus d'amidon. La souche sauvage est représentée en noir.

2. Structure de l'amidon

Les souches isolées ici ont été identifiées comme mutant de dégradation et on ne s'attend pas *a priori* à observer une altération de la structure de leur amidon. Néanmoins, les amidons produits par nos mutants ont fait l'objet d'une caractérisation après séparation des deux sous-fractions par chromatographie de tamisage moléculaire. L'amidon de la souche sauvage 137C est constitué d'environ 20 % d'amylose et 80 % d'amylopectine avec une longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{\max}) de l'amylopectine aux alentours de 550 nm en moyenne. Deux des 62 souches mutantes affichent une altération de la composition de leur amidon (**Figure 30**). D'une part, l'amylopectine du mutant CAT17 a une λ_{\max} de 567 nm sans enrichissement significatif en amylose. D'autre part, l'amidon de la souche CAT31 est clairement enrichi en amylose avec un taux de 41 % contre 23 % chez la référence sauvage.

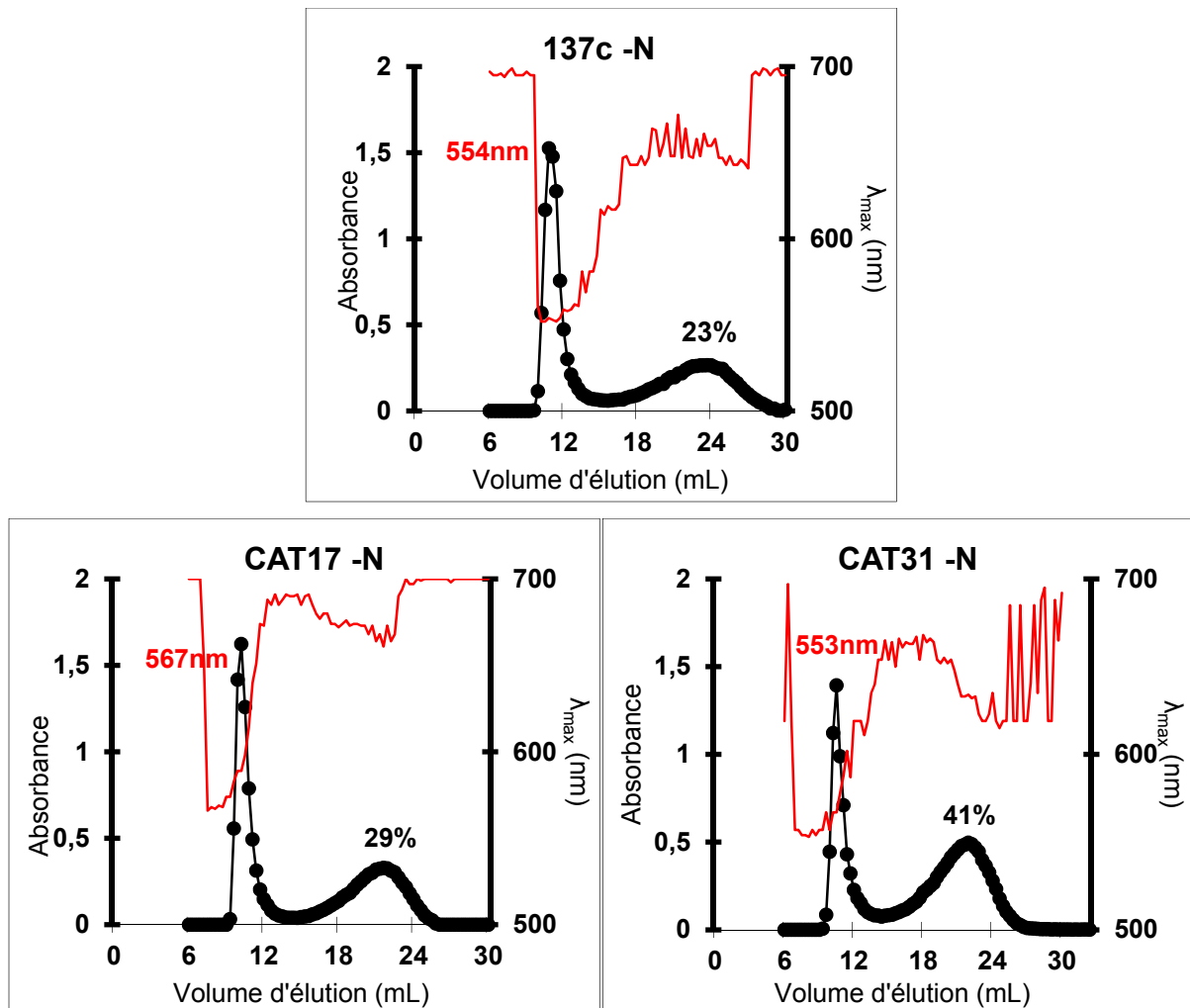


Figure 30 : Séparation par chromatographie de tamisage moléculaire de l'amylose et de l'amylopectine. L'absorbance du complexe iode/polysaccharide de chacune des 100 fractions de 0,3 mL a été mesurée sur un intervalle de longueurs d'onde allant de 500 à 700 nm et l'absorbance maximale est représentée pour chacune (points noirs). La longueur d'onde au maximum d'absorption (en rouge) et le pourcentage d'amylose sont indiqués sur ces graphiques correspondant à la souche sauvage 137C et aux mutants CAT17 et CAT31.

Ces altérations dans la structure du polysaccharide pourraient révéler la présence d'une mutation affectant aussi bien la synthèse que la dégradation du polysaccharide dans ces mutants. Néanmoins, les altérations observées ne nous permettent pas à ce stade d'imaginer la nature de la fonction touchée et d'autres efforts de caractérisation restent nécessaires pour aboutir à ce résultat.

3. Zymogrammes

L'ensemble des mutants a également été analysé à l'aide des techniques de zymogrammes afin de vérifier qu'elles possèdent bien l'intégralité du set enzymatique nécessaire à la dégradation de l'amidon et que nous sommes capables

de visualiser. Un profil sauvage a été observé pour l'ensemble de nos mutants sur les gels contenant de l'amidon et réalisés en conditions dénaturantes. Une exception a cependant été observée puisque chez la souche CAT16, l'absence d'une bande a pu être mise en évidence après coloration à l'iode (**Figure 31**). L'apparition d'une bande rose après modification de l'amidon contenu dans le gel traduit un enrichissement du polysaccharide en points de branchement, phénomène qui se produit soit par ajout de points de branchement par une enzyme de branchement, soit par concentration de ces liaisons en α -1,6 par une activité β -amylase qui raccourcit les chaînes linéaires pour s'arrêter au niveau des points de branchement. L'enzyme correspondante a été purifiée à partir de la souche sauvage et s'est révélée être une activité de branchement. Des amplifications par PCR à partir de l'ADN génomique du mutant ont permis d'identifier la défectuosité du mutant CAT16. Cette souche est mutée dans le gène codant l'enzyme de branchement de type 1 (Tuncay *et al.*, 2013).

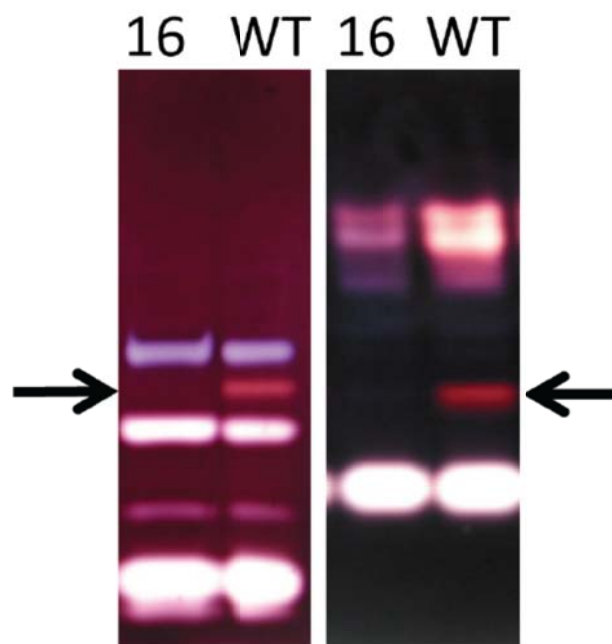


Figure 31 : Profils enzymatiques des souches CAT16 et 137C (WT) sur substrat amidon. Des extraits bruts des deux souches ont été séparés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (profils de gauche) ou natives (profils de droite) avant incubation une nuit puis coloration par une solution d'iode. L'enzyme de branchement de type 1 est indiquée par la flèche.

III. Caractérisations moléculaires

En parallèle de la caractérisation biochimique, l'ADN des souches CAT a été extrait puis utilisé pour localiser l'insertion de l'ADN mutagène à l'aide de trois techniques : la PCR inverse, le « Plasmid Rescue » et la TAIL-PCR (**Tableau 15**). Ces techniques auront permis à ce jour la localisation de 29 insertions dont certaines touchent des fonctions déjà caractérisées dans le contexte de la dégradation de l'amidon (*MEX1*, Niittylä *et al.*, 2004 ; *BAM1*, Fulton *et al.*, 2008 ; *DPE2*, Chia *et al.*, 2004) ; d'autres des fonctions pouvant avoir un impact plus général dont plusieurs kinases qui pourraient également être directement impliquées dans la régulation ; et une troisième catégorie composée de fonctions impliquées dans la motilité de la microalgue. On remarquera la faible efficacité de la technique de « Plasmid Rescue » ce qui s'explique assez aisément par le fait que celle-ci nécessite qu'une grande partie du vecteur de transformation ait gardé son intégrité or l'intégration de celui-ci par recombinaison non homologe est très souvent génératrice de délétion, autant dans le génome que dans le vecteur.

Souche	ADN inséré	Technique d'identification	Locus touché	Fonction
CAT3	Plasmide	PCR inverse	Cre12.g486600	Maltose Exporter-like
CAT4	Plasmide	PCR inverse	Cre06.g307150	β -amylase
CAT14	Plasmide	PCR inverse	Cre06.g266150	Protéine kinase Ca ²⁺ /Calmodulline dépendante
CAT15	Plasmide	Plasmid Rescue	Cre16.g689550	Tyrosine kinase putative
CAT18	Plasmide	PCR inverse	Cre16.g686000	Facteur d'épissage sf4/14
CAT20	Plasmide	PCR inverse	Cre06.g302350	Fonction inconnue
CAT21	Plasmide	PCR inverse	Cre12.g561550	Mitochondrial half-size ABC transporter, membrane protein
CAT22	Plasmide	PCR inverse	Cre07.g338300	Protéine du flagelle
CAT24	Plasmide	PCR inverse	Cre06.g278104	Fonction inconnue
CAT25	Plasmide	PCR inverse	Cre08.g358528	Protéine du flagelle
CAT26	Plasmide	PCR inverse	Cre02.g104450	Sérine/Thréonine kinase
CAT27	Plasmide	PCR inverse	Cre12.g486900	ARNt dihydrouridine synthase
CAT28	Plasmide	PCR inverse	Cre12.g486750	Fonction inconnue
CAT29	Plasmide	PCR inverse	Cre12.g522600	Cytochrome C mitochondrial
CAT30	Plasmide	PCR inverse	Cre10.g459450	Proprotéine convertase
CAT32	Cassette	TAIL-PCR	Cre17.g709600	Fonction inconnue
CAT33	Cassette	TAIL-PCR	Cre02.g091750	Protéine à domaine CBM20 de liaison à l'amidon
CAT34	Cassette	TAIL-PCR	Cre01.g053150	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
CAT35	Cassette	TAIL-PCR	Cre08.g368950	3-dihydroquinone synthase
CAT36	Cassette	TAIL-PCR	Cre02.g084050	Sous-unité Sec62 du translocon du RE
CAT37	Cassette	TAIL-PCR	Cre07.g330100	Sous-unité de l'oligosaccharyl transférase STT3
CAT39	Plasmide	Plasmid Rescue	Cre02.g083800	Epimérase NAD dépendante
CAT40	Plasmide	PCR inverse	Cre11.g468450	Centrine
CAT42	Plasmide	PCR inverse	Cre01.g030750	Fonction inconnue
CAT52	Plasmide	PCR inverse	Cre16.g659750	Cathepsine
CAT57	Cassette	TAIL-PCR	Cre15.g636500	Fonction inconnue
CAT58	Cassette	TAIL-PCR	Cre07.g318950	Protéine à domaine C2
CAT59	Cassette	TAIL-PCR	Cre02.g095126	α -1,4 glucanotransférase (Dpe2)
CAT60	Cassette	TAIL-PCR	Cre10.g431650	NAD kinase

Tableau 15 : Liste des souches pour lesquelles une insertion a pu être localisée et fonction touchée par celle-ci.

IV. Discussion

Afin de découvrir de nouvelles fonctions impliquées dans la dégradation de l'amidon chez les végétaux, une démarche de génétique formelle a été entreprise et, grâce à l'application d'un crible phénotypique par coloration à l'iode, un total de 62 souches potentiellement déficientes pour la dégradation a été isolé parmi plus de 32000 souches transformantes. L'analyse de ces souches par des cinétiques en milieu liquide a permis de mettre en évidence certaines souches dont le défaut de dégradation dépend des conditions de culture ou qui sont simplement des faux-positifs, le plus souvent surproducteurs et qui contiennent encore, après incubation à l'obscurité, assez d'amidon pour conserver l'interaction à l'iode. Les caractérisations phénotypiques des souches CAT ont mis en évidence une certaine diversité notamment au niveau de l'accumulation de l'amidon, le défaut de dégradation n'étant pas forcément associé à une surproduction du polysaccharide.

Les analyses biochimiques par zymogramme n'ont permis de révéler une déficience que chez une souche : CAT16, chez qui l'activité BE1 est absente. Les caractérisations moléculaires par PCR inverse, TAIL-PCR et « Plasmid Rescue » ont quant à elles été relativement fructueuses et ont permis la localisation de 29 insertions dans le génome de l'algue. Par ailleurs, et contrairement à ce à quoi on pouvait s'attendre, les analyses structurales ont révélé deux souches, CAT17 et CAT31, dont la nature de l'amidon est altérée. Rien ne permet actuellement d'expliquer ces phénotypes mais dans l'ensemble, les caractérisations, notamment moléculaires, ont été concluantes.

Celles-ci ont permis d'identifier trois types de fonctions touchées. Les premières sont des protéines dont on pouvait déjà, *a priori*, supposer l'implication dans le métabolisme de l'amidon. C'est le cas pour les souches CAT3 (transporteur de maltose), CAT4 (β -amylase), CAT33 (protéine à domaine CBM20) et CAT59 (DPE2). Les fonctions touchées ici ont même en majorité déjà été décrites chez la plante supérieure. A défaut de représenter une avancée majeure dans la compréhension du métabolisme de l'amidon, l'identification de ces fonctions permet au moins de démontrer la force du crible phénotypique mis en place et de valider la démarche expérimentale entreprise.

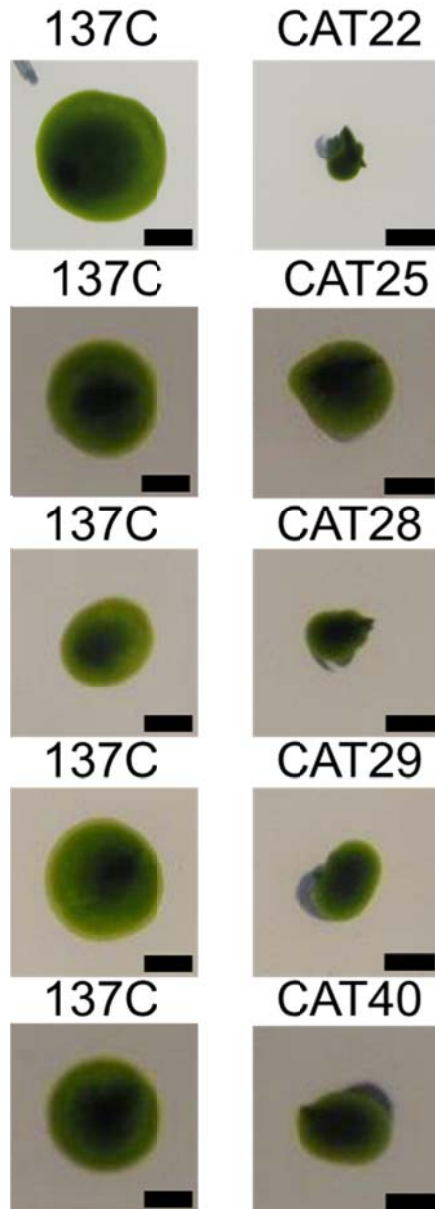


Figure 32 : Test de motilité des souches 137C, CAT22, CAT25, CAT28, CAT29 et CAT40. Ces souches ont été ensemencées à l'aide d'un cure-dent sur un milieu TAP+N contenant 0,6 % d'agar. Les plages cellulaires présentées ici ont été obtenues après 20 jours de culture en lumière continue. Les barres d'échelles correspondent à 2,5 mm.

La seconde classe de mutants de dégradation se compose de souches touchées au niveau de leur fonction de motilité. C'est typiquement le cas de la souche CAT22 chez qui le plasmide de mutagenèse est venu s'insérer au niveau d'un locus codant une protéine du flagelle (Cre07.g338300). L'observation de cette souche en milieu liquide TAP-N permet de confirmer l'effet de cette insertion puisque que le mutant CAT22 est très peu motile, tout comme sur gélose molle TAP+N (**Figure 32**). Ce type de fonction pourrait également être attendu *a priori* puisque les mutants de motilité sont connus comme suraccumulateurs depuis longtemps

(Hamilton *et al.*, 1992) et le défaut de dégradation s'explique aisément par l'absence de consommation d'énergie. Cela concerne également la souche CAT40 touchée au niveau d'une fonction centrine, mais aussi des souches CAT28 et CAT29 chez qui l'insertion identifiée dans le génome est proche d'un locus codant une fonction liée à la motilité (CAT28 : Cre12.g468700, FAP271 ; et CAT29 : Cre12.g522550, kinésine). On remarque cependant que la souche CAT25 dont une insertion du plasmide a également été localisée au niveau d'un locus potentiellement impliqué dans la motilité (Cre08.g358528 : FAP157) ne montre pas de phénotype de nage, pas de suraccumulation du polysaccharide ni de défaut de dégradation en milieu liquide. Ces résultats semblent démontrer l'absence de lien entre cette insertion et le phénotype observé pour cette souche lors de sa sélection.

La troisième classe se compose notamment de protéine kinases, pouvant constituer de nouveaux points de régulation du métabolisme de l'amidon mais il ne faut pas oublier que la déficience en ce type de fonction peut avoir des effets pléiotropiques. L'effet sur la dégradation ne pourrait donc être que le résultat d'une altération métabolique plus globale. Néanmoins, l'identification de certaines fonctions démontre la force du crible utilisé ainsi que l'intérêt que représente la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* dans le but de découvrir de nouvelles fonctions impliquées aussi bien dans la dégradation de l'amidon transitoire que celui de réserve. L'ensemble de ces caractérisations préliminaires ont été validées par une publication pour laquelle je suis co-premier auteur dans PLoS One (Annexe 3 ; Tunçay *et al.*, 2013).

Chapitre III Projet IFMAS : à la recherche d'amidons de structure modifiée

I. Analyse de la granulométrie des souches CAT

L'objectif du projet IFMAS consiste en l'optimisation des bio-ressources utilisées dans les procédés de fabrication de certains matériaux comme les peintures. L'amidon occupe une grande place parmi ces bio-ressources et l'amélioration de ses propriétés physico-chimiques en les rendant plus adaptées aux process d'extraction, etc., est l'une des raisons de la création d'IFMAS. Dans ce but, j'ai obtenu son soutien pour l'identification de nouvelles fonctions intervenant sur la distribution de taille des grains d'amidon, facteur pouvant impacter les propriétés du polysaccharide. Ainsi, l'ensemble des souches déficientes pour la dégradation de l'amidon a fait l'objet d'une caractérisation granulométrique supplémentaire en analysant leur amidon accumulé en condition carencée sur un compteur de particules Beckman Coulter Counter. Un pic de taille a été déterminé pour chaque amidon, mettant en évidence des distributions de taille plus petite, plus grande et d'autres résultats plus surprenants (**Figure 33**). Parmi les 62 amidons testés, 9 présentent une taille moyenne de grains différente de plus de 20 % de celui de la souche sauvage. Les souches CAT4, CAT21, CAT23, CAT35, CAT42 et CAT51 synthétisent un amidon de taille significativement plus petite. La souche CAT42 a été confirmée par une seconde analyse, révélant une taille de grain qui ne représente que 72 % du diamètre radial sauvage. Les souches CAT1, CAT22 et CAT61 contiennent elles un amidon plus gros. La souche CAT22 a également été confirmée par un second passage, établissant son diamètre moyen à 126 % d'un amidon normal de *Chlamydomonas*. Enfin, l'amidon extrait de la souche CAT33 présente une distribution inédite chez la microalgue. En effet, il ne contient pas une mais deux populations de grains (**Figure 34**). De plus, l'une est plus petite que le grain d'amidon de la souche sauvage avec une taille moyenne à 76 % d'un grain normal et la seconde est presque deux fois plus grande que la normale.

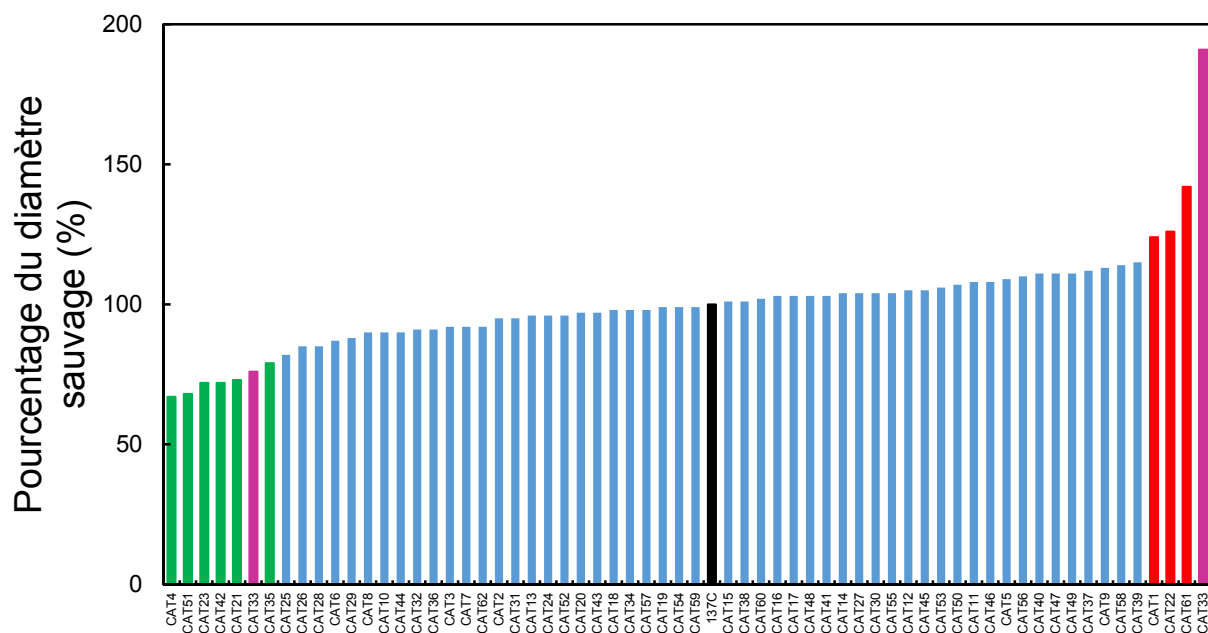


Figure 33 : Distribution de la taille moyenne des grains d'amidon au sein de la population des mutants CAT. L'amidon de chaque souche a été analysé sur Coulter Counter puis comparé à celui de la souche sauvage 137C. Ce diagramme représente la taille de chacun de ces amidons en pourcentage par rapport à la souche sauvage (en noir). Les amidons de tailles 20 % plus petites sont indiqués en vert, ceux de tailles 20 % plus grandes en rouge et les deux populations de l'amidon à distribution bimodale du mutant CAT33 sont en magenta.

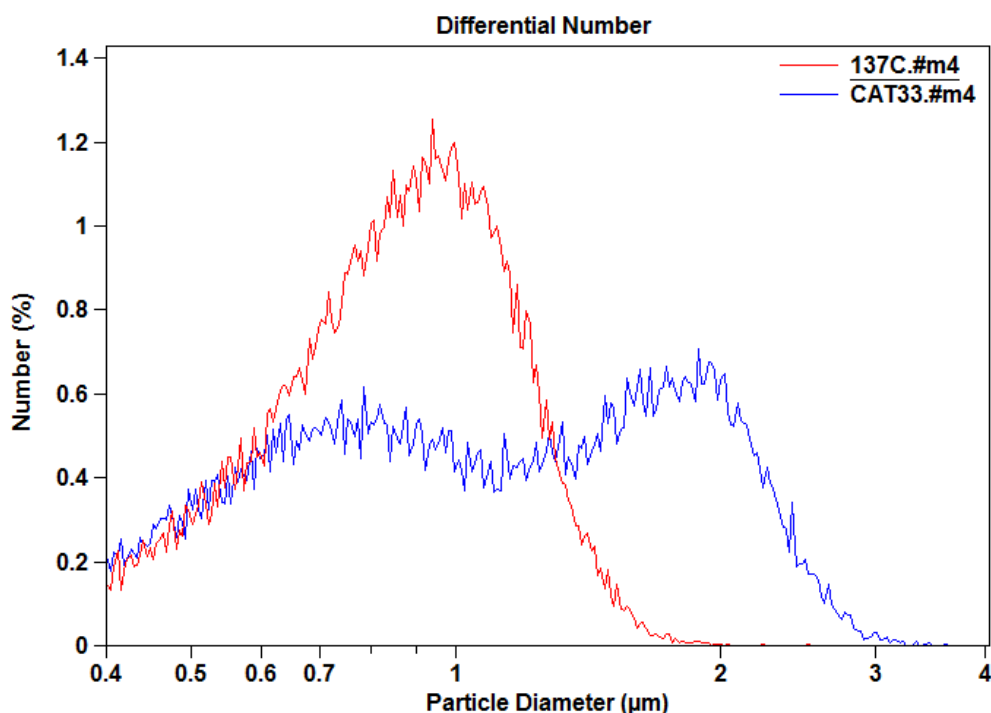


Figure 34 : Superposition des distributions de tailles des grains d'amidon des souches 137C et CAT33. Un échantillon d'amidon de chaque souche a été analysé séparément sur le dispositif Coulter Counter puis les deux distributions obtenues ont été superposées sur un même graphique.

II. Discussion

Les résultats obtenus confirment l'intérêt de la démarche engagée et ne permettent pas seulement l'identification de souches à gros grains comme on pouvait s'y attendre de la part de mutants de dégradation, mais aussi de souches à petits grains et en quantités même supérieures. Les efforts d'analyse doivent maintenant être poursuivis chez les souches déficientes pour la synthèse du polysaccharide que nous avons également isolés lors de la campagne de mutagenèse et l'impact des modifications déjà relevées doit être évalué au regard des propriétés physico-chimiques du polymère et de leur intérêt pour l'industrie. On notera que le phénotype de suraccumulation observé lors de la caractérisation des mutants de dégradation n'est pas forcément associé à une augmentation de la taille des grains. En effet, les trois souches accumulant le plus d'amidon, CAT18, CAT19 et CAT27, n'ont pas montré une distribution de tailles des grains significativement différentes de celle de la souche sauvage 137C.

D'un point de vue fondamental, l'identification des insertions responsables des phénotypes observés représente un intérêt dans la compréhension de la régulation de la granulométrie. Chez la plante *Arabidopsis thaliana*, des grains de taille 3 fois supérieure à la normale sont observés chez la lignée déficiente pour l'isoforme 4 d'amidon synthase (Roldán *et al.*, 2007). Les travaux effectués chez la microalgue pourraient participer à l'explication de ce type de phénotype ou permettre l'identification de toutes nouvelles fonctions. Il est donc maintenant important d'identifier les fonctions touchées si ce n'est pas encore le cas, et ce par l'intermédiaire des techniques de localisation déjà en place au laboratoire ou, le cas échéant, par un séquençage complet du génome des mutants d'intérêt. Pour les souches dont au moins une insertion est localisée, la responsabilité de celle-ci dans le phénotype devra être confirmée par analyse de coségrégation et une complémentation fonctionnelle. Si la fonction identifiée possède un homologue chez *Arabidopsis*, la lignée mutante correspondante pourra être étudiée afin de tester la conservation des effets de la déficience dans la lignée verte, étape indispensable avant l'étude de la fonction chez des espèces d'intérêt agronomique. L'ensemble de ces travaux fera l'objet d'une thèse dans le laboratoire très prochainement via un financement IFMAS.

Chapitre IV Etude de la souche CAT33 à granulométrie altérée

I. Caractérisation de la souche

La souche CAT33 a été générée par insertion de la cassette paromomycine lors de la campagne de mutagenèse. Son phénotype à l'iode traduit un défaut de dégradation puisqu'une coloration persiste après les 24 h d'incubation à l'obscurité (**Figure 35**). La cinétique de dégradation confirme le phénotype de dégradation et permet de classer ce mutant dans la classe III (>50 %/T0) avec 57 % d'amidon résiduel là où le témoin sauvage n'en contient que 28 % (**Figure 36**). Le ralentissement semble assez tardif puisque la quantité dégradée durant les 8 premières heures est similaire à la souche sauvage tandis que sur les 16 heures suivantes, seulement 8 % du polysaccharide est consommé alors que la souche sauvage est parvenue à en dégrader 48 % supplémentaires.

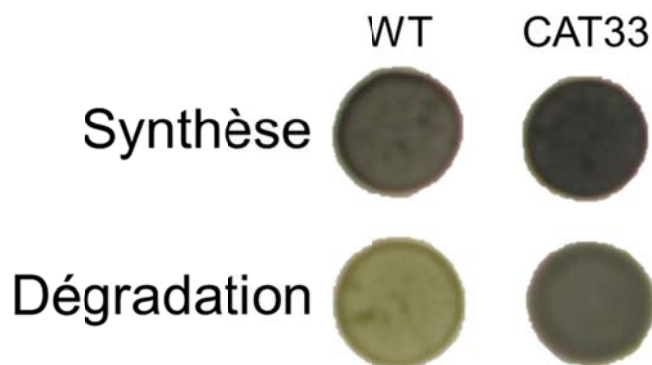


Figure 35 : Phénotype du mutant CAT33 lors du crible à l'iode. Des patches cellulaires de 137C (WT) et CAT33 ont été déposés et incubés 5 jours sur deux boîtes de milieu TAP-N gélosé. Après ces 5 jours, la carence est levée sur l'une des deux boîtes qui est incubée 24 h supplémentaires à l'obscurité. Après cette période, les patches des deux boîtes sont colorés aux vapeurs d'iode.

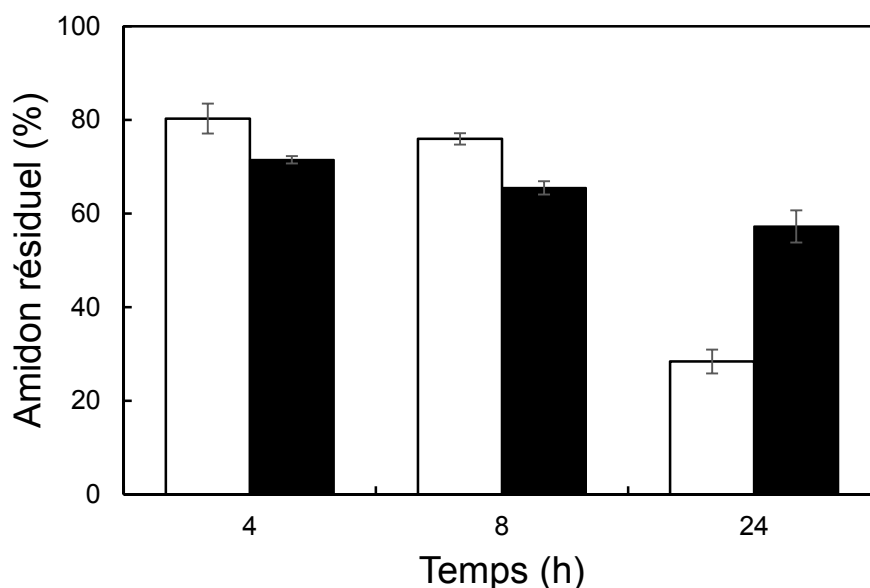


Figure 36 : Cinétique de dégradation de la souche sauvage 137C (blanc) et de CAT33 (noir). Les deux souches ont été placées en carence azotée et à la lumière durant 5 jours, la dégradation de l'amidon ainsi accumulé a ensuite été induite par incubation en milieu minimal TMP à l'obscurité durant 24 h supplémentaires. La quantité d'amidon est dosée après 4, 8 et 24 h d'incubation et exprimée ici en pourcentage par rapport à la quantité présente à T0. Ces résultats proviennent de trois cinétiques indépendantes.

Le défaut de dégradation n'affecte pas significativement l'accumulation en condition carencée mais les quantités synthétisées en mixotrophie sont bien inférieures à la quantité sauvage pour cette souche (**Tableau 16**). Dans ces conditions, la souche CAT33 accumule moins de 30 % de la quantité normale. La structure du polysaccharide accumulé, quant à elle, n'est pas altérée d'après les chromatographies de tamisage moléculaire réalisées (**Figure 37**). En effet, en condition carencée, le profil est tout à fait normal avec une λ_{\max} au maximum d'absorption de l'amylopectine de 552 nm et aucun indice sur une potentielle altération du ratio amylose/amylopectine.

Quantité d'amidon ($\mu\text{g}/\mu\text{g Chl}$)	TAP-N	TAP+N
137C	44,70 \pm 1,06	2,87 \pm 0,36
CAT33	49,71 \pm 1,77	0,83 \pm 0,12

Tableau 16 : Quantités d'amidon accumulées par les souches 137C et CAT66 en milieu carencé et en conditions standards. Les quantités dosées ont été normalisées par la quantité de chlorophylle dans les cellules ensemencées (TAP-N) ou au moment du prélèvement (TAP+N). Les données proviennent de 3 dosages indépendants.

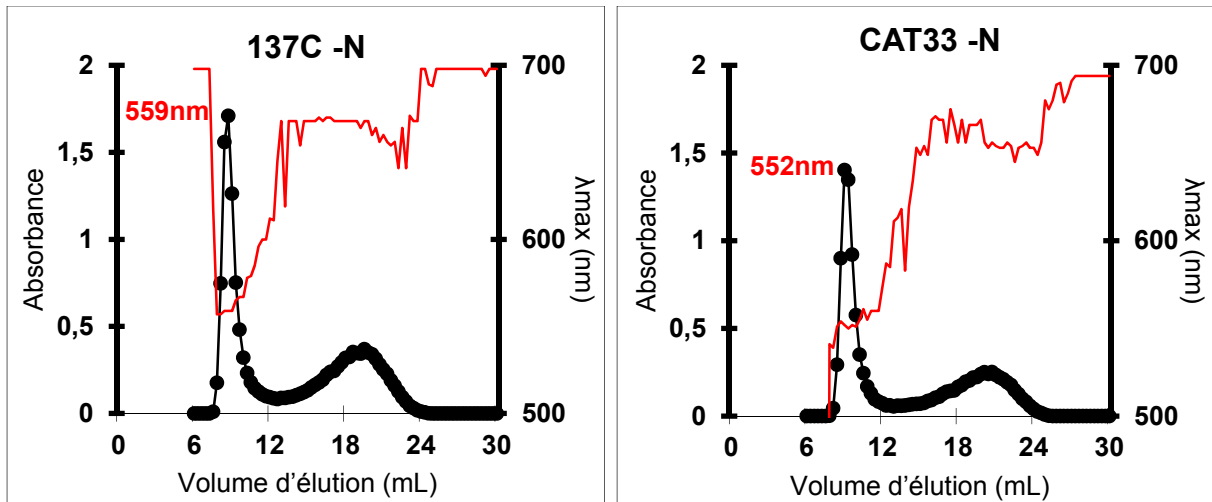


Figure 37 : Profils de chromatographie de tamisage moléculaire des amidons des souches 137C et CAT33. La valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption de l'amylopectine est indiquée en rouge sur chaque graphique. L'absorbance du mélange iode/polysaccharide (points noirs) et la λ_{max} observée (ligne rouge) sont représentées pour chaque fraction d'élution de la colonne.

Par ailleurs, la souche CAT33 possède un phénotype original puisque ce mutant produit deux populations de grains d'amidon de diamètres respectifs de 726 nm et 1840 nm quand un amidon sauvage ne se compose que d'une seule catégorie de grains d'un diamètre moyen de l'ordre du μm (**Figure 34, Chapitre III**). Non seulement ce mutant possède une distribution bimodale de la taille des grains d'amidon accumulés mais de surcroît chacune de ces catégories possède une taille altérée.

II. Identification de la défectuosité

Des extraits bruts des souches 137C et CAT33 ont été séparés en conditions dénaturantes sur deux gels de polyacrylamide contenant de l'amidon ou du glycogène puis incubés de manière à révéler les activités amylolytiques et phosphorylases, respectivement, par coloration à l'iode (**Figure 38**). Ces analyses ne nous ont pas permis d'identifier une quelconque modification dans notre mutant.

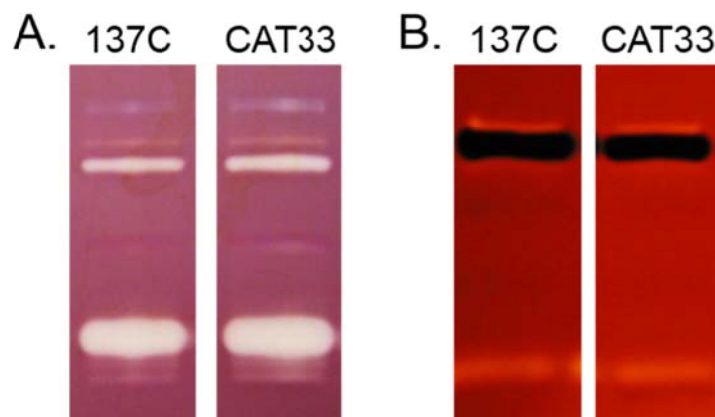


Figure 38 : Profils enzymatiques des souches 137C et CAT33. A. Des extraits bruts des deux souches ont été séparés sur un gel contenant de l'amidon en présence de SDS puis incubés une nuit à température ambiante. B. Les extraits bruts ont été analysés sur un gel contenant du glycogène en conditions dénaturantes et incubés en présence de G1P. 40 µg d'extrait brut ont été déposés dans chaque puits. Les activités hydrolytiques (A) et phosphorylases (B) ont été révélées après coloration par une solution d'iode.

L'identification de la fonction altérée chez la souche CAT33 a été possible via le volet de caractérisations moléculaires grâce à la technique de TAIL-PCR et l'utilisation de l'amorce dégénérée AD2. Un amplifiât d'environ 500 pb a en effet été obtenu à partir de l'ADN de ce mutant. Le séquençage de ce fragment a permis de montrer que ce dernier était composé de 87 pb correspondant à la cassette de résistance à la paromomycine et 446 pb de séquence nucléaire flanquante. Le blast de cette séquence dans Phytozome v10.2 révèle que l'insertion s'est effectuée dans l'extrémité 3' du locus Cre02.g091750 et engendre l'interruption de ce gène 11 nucléotides avant le codon stop (**Figure 39**). Ce locus code une protéine de fonction inconnue mais contenant un domaine de liaison à l'amidon CBM20 d'après l'analyse effectuée sur la base de données Prosite. La présence de cette insertion a été confirmée par PCR puisque nous n'avons pas été capables d'amplifier une séquence de 1078 pb de cette région à partir de l'ADN du mutant CAT33 à l'aide d'amorces situées de part et d'autre du lieu d'insertion (**Figure 40**).

A. Gene Cre02.g091750

▼ Gene Info

Organism Chlamydomonas reinhardtii
Locus Name Cre02.g091750
Transcript Name Cre02.g091750.t1.2 (primary)
Other transcripts Cre02.g091750.t2.1 Cre02.g091750.t3.1
Location: chromosome_2:2449363..2453944 reverse
Alias g1719.t2 Cre02.g091750.t1.1
Description (M=19) PF00686 - Starch binding domain
Links [B](#) [Pm](#)

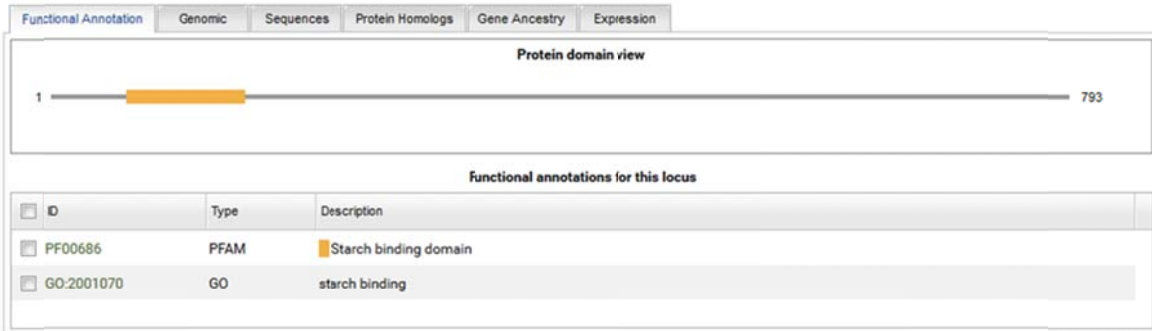


Figure 39 : Localisation de l'insertion de la cassette de résistance dans le génome de la souche CAT33. A. Page de description du gène présentant une homologie avec la séquence amplifiée par TAIL-PCR après blast dans Phytozome v10.2. B. Représentation de l'insertion de la cassette dans le locus Cre02.g091750. Les sites d'hybridation des amorces de génotypage CBMFor et CBMRev sont indiqués par une flèche noire.

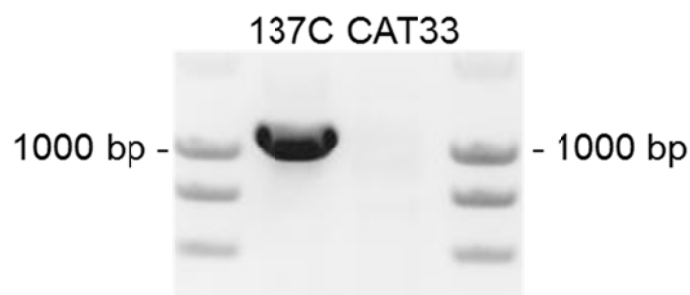


Figure 40 : Amplification par PCR d'un fragment de 1078 pb du locus Cre02.g091750 à partir de l'ADN des souches 137C et CAT33.

III. Analyse de coségrégation

Dans le but d'associer l'insertion identifiée et le phénotype de défaut de dégradation observé, la souche CAT33 a été croisée avec une souche sauvage de polarité sexuelle opposée. Huit tétrades ont été obtenues pour lesquelles la présence de l'insertion de la cassette de résistance et le défaut de dégradation ont été analysés. L'analyse par PCR de l'insertion révèle une distribution parfaite 2 : 2 dans chacune des 8 tétrades (**Figure 41**). L'analyse de la croissance de ces souches sur milieu HSA riche contenant de la paromomycine nous a permis d'établir la coségrégation entre la présence de la cassette dans ce locus et la résistance à l'antibiotique suggérant un événement unique d'intégration dans ce mutant.

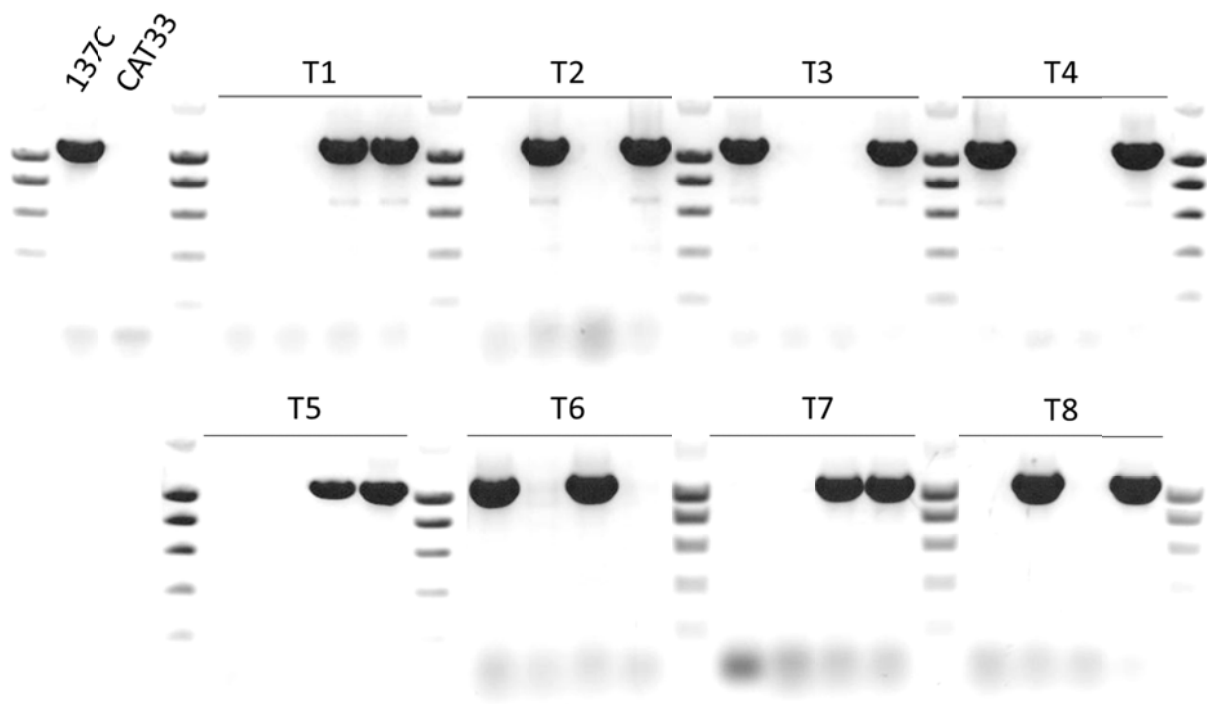


Figure 41 : Analyse par PCR de la présence de l'insertion chez les ségrégeants du croisement CAT33 x 37. La présence de l'insertion de la cassette dans le gène Cre02.g091750 est mise en évidence par l'absence de la bande à 1078 pb amplifiée grâce à l'hybridation des amorces CBMFor et CBMRev.

Parallèlement, la capacité de chaque souche ségrégeante à dégrader son amidon a été analysée par le dosage de la quantité d'amidon résiduel après 24 h de dégradation (**Figure 42 A**). Pour chaque tétrade, deux souches présentent un net ralentissement de la dégradation du polysaccharide de réserve par rapport aux deux autres souches provenant du même événement de méiose. Pour les 8 tétrades testées, ces deux souches possédant une dégradation altérée correspondent aux

deux ségrégeants pour lesquels le locus Cre02.g091750 est interrompu. Considérés globalement, les ségrégeants mutants contiennent encore 69 % de l'amidon dosé avant dégradation après 24 h d'obscurité alors que les ségrégeants sauvages en ont dégradé plus de 65 % (**Figure 42 B**).

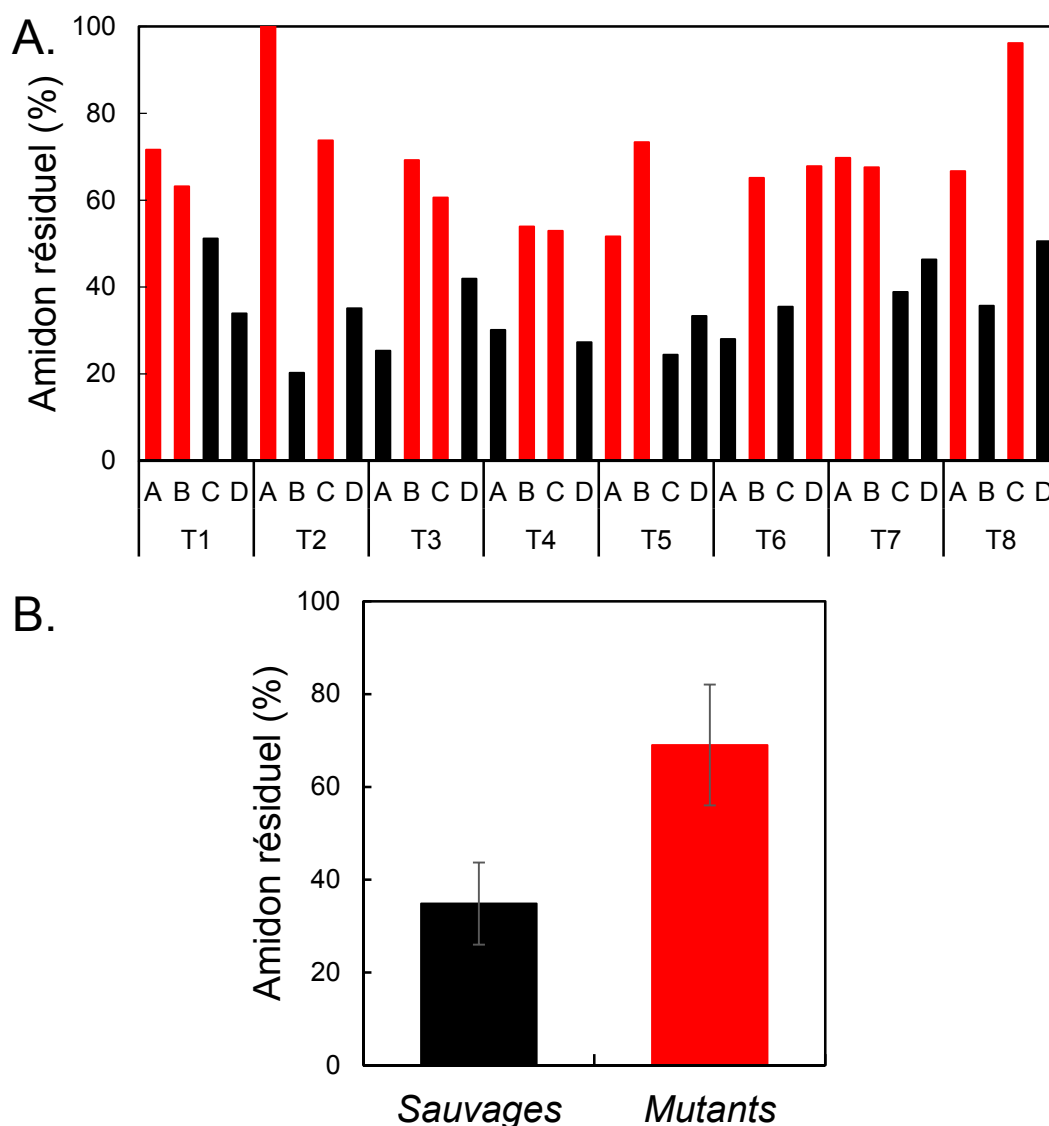


Figure 42 : Analyse du défaut de dégradation chez les ségrégeants du croisement CAT33 x 37. A. Amidon résiduel par rapport au T0 dans chacune des 8 tétrades. B. Amidon résiduel dans l'ensemble des populations sauvages et mutantes issues du croisement CAT33 x 37. Les souches de génotype sauvage sont représentées en noir et celles contenant l'insertion en rouge. L'ensemble des résultats est présenté en % de la quantité initiale mesurée dans chaque souche.

Nous avons également tenté de relier la présence de cette insertion dans ce gène et la distribution bimodale de la taille des grains d'amidon observée dans le mutant CAT33. Les amidons produits par les ségrégeants des 8 tétrades ont été analysés sur le compteur de particules et ces résultats préliminaires semblent confirmer que l'insertion coségrège également avec l'altération de la distribution de

taille des grains comme cela est illustré pour la tétrade 5 où deux populations sont retrouvées dans les amidons des ségrégeants mutants 5A et 5B tandis que les deux autres distributions sont unimodales (**Figure 43**). On notera toutefois au sein de ces tétrades que les tailles moyennes des deux populations sont très variables laissant présager une influence du contexte génétique de la souche.

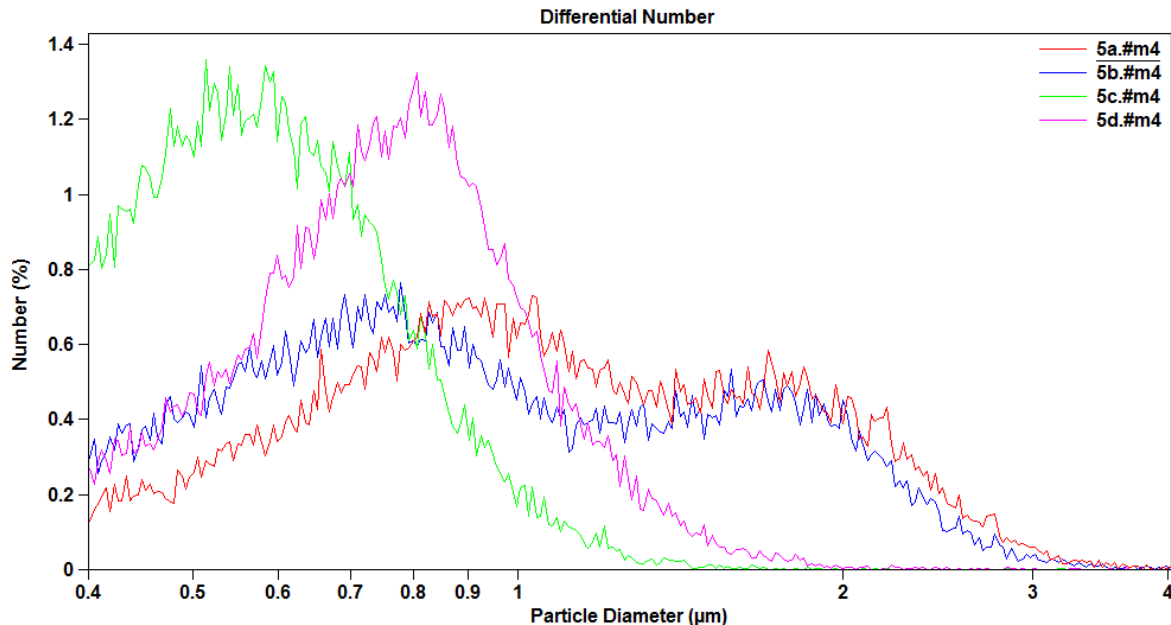


Figure 43 : Distributions de tailles des grains des amidons de la tétrade 5 issue du croisement CAT33x37. Les souches contenant l'insertion identifiée sont 5A (rouge) et 5B (bleu) tandis que les deux autres contiennent la version sauvage du locus Cre02.g091750 (5C : vert ; 5D : rose).

Cette analyse de coségrégation a permis de démontrer une claire association entre l'insertion identifiée et le phénotype de dégradation ainsi que la distribution bimodale de tailles des grains d'amidon. De plus, le fait que cette insertion soit parfaitement associée à la résistance indique qu'elle est très probablement unique. Il ne faut cependant pas écarter la possibilité d'une deuxième insertion qui ne soit pas fonctionnelle pour la résistance, ou même que l'insertion identifiée ait pu engendrer une délétion qui toucherait un gène proche de celui interrompu et qui serait le véritable responsable du phénotype.

IV. Discussion

La souche CAT33 a été isolée lors du crible phénotypique puis confirmée par cinétique comme étant déficiente pour la dégradation de l'amidon. L'analyse de coségrégation effectuée laisse présager que le défaut de dégradation observé est dû à l'insertion de la cassette de résistance à la paromomycine au sein du locus Cre02.g091750 codant une protéine de fonction inconnue mais comportant un domaine CBM20 de liaison à l'amidon. Il semble également que l'absence de cette fonction soit responsable de l'apparition d'une distribution bimodale de la taille des grains, phénotype inédit chez l'algue et que l'on retrouve plutôt chez des espèces céréalières telles le blé ou l'orge (Jane *et al.*, 1994). Il est possible que le défaut de dégradation soit directement lié à cette distribution particulière mais pour s'en assurer, il faudra d'abord pousser les caractérisations plus loin. Dans un premier temps, et bien que l'existence d'un domaine CBM20 laisse supposer que c'est bien l'absence de cette fonction qui est responsable du phénotype, il faudra réaliser la complémentation fonctionnelle de la souche mutante pour écarter toute possibilité de délétion ayant touché un gène proche dont l'interruption pourrait être la raison du phénotype observé.

La protéine codée par le locus Cre02.g091750 contient un domaine CBM20 et les outils de prédiction la localisent au niveau du chloroplaste (**Figure 44**). La suite des travaux sur ce mutant consistera dans un premier temps à vérifier si cette protéine interagit bien avec le grain d'amidon, par exemple par une fusion entre son domaine CBM20 et une protéine fluorescente ; ou en tentant de l'identifier parmi le protéome du grain par spectrométrie de masse. Ensuite, et vu qu'aucun domaine catalytique n'est identifié, on pourra tester l'existence de possibles interactions entre cette protéine et d'autres dont l'implication dans le catabolisme pourrait être plus directe. Un rôle similaire à celui de la protéine PTST peut être envisagé (Seung *et al.*, 2015). Cette protéine pourrait en effet intervenir dans l'adressage des protéines vers le grain. La présence d'homologues uniquement chez les microalgues et son absence dans le le génome des plantes supérieures limite néanmoins l'impact de cette découverte en particulier dans le cadre du projet IFMAS.


```

### chlorop v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Name      Length   Score    cTP      CS-score  cTP-length
-----
CAT33     793      0.565    Y        8.088     50
-----

```

Figure 44 : Résultat de l'outil de prédiction ChloroP de localisation subcellulaire pour la protéine codée par le locus Cre02.g091750. La séquence de la protéine a été analysée à l'aide du logiciel ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>). cTP : indique si la protéine contient un peptide d'adressage au plaste ; Y : oui ; N : non. cTP-length : longueur prédite en acides aminés du peptide d'adressage.

Chapitre V Etude de la souche déficiente *nadk*

I. Caractérisation de la souche CAT60

La souche CAT60 a été obtenue par insertion de la cassette de résistance à la paromomycine. Phénotypiquement, le mutant CAT60 montre une interaction à l'iode qui n'est pas plus forte que la souche sauvage 137C (**Figure 45**) mais qui se maintient parfaitement après 24 h d'incubation à l'obscurité au cours desquelles le témoin sauvage a dégradé une grande partie de son amidon et apparaît vert.

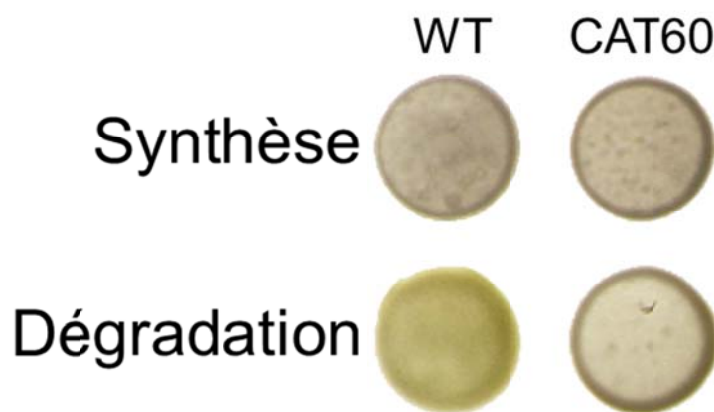


Figure 45 : Phénotype de la souche CAT60 lors du crible à l'iode. Des patches cellulaires de 137C (WT) et CAT60 ont été déposés et incubés 5 jours sur deux boîtes de milieu TAP-N gélosé. Après ces 5 jours, la carence est levée sur l'une des deux boîtes qui est incubée 24 h supplémentaires à l'obscurité.

Ce phénotype sur milieu gélosé a ensuite été analysé en milieu liquide. La souche CAT60, en parallèle du témoin sauvage 137C, a été incubée 5 jours en carence azotée puis la dégradation du polysaccharide accumulée a été stimulée par incubation durant 24 h à l'obscurité dans un milieu TMP dépourvu de source de carbone. L'impossibilité de réaliser la photosynthèse et de s'approvisionner dans le milieu force la souche, si elle en est capable, à dégrader ses réserves pour relancer son cycle végétatif. La quantité d'amidon a été analysée chez le mutant et la souche sauvage au début de l'incubation et après 4, 8 et 24 h (**Figure 46**). Alors que la souche 137C est capable de dégrader environ 60 % du polysaccharide accumulé en 24 h, le mutant CAT60 n'en dégrade que 20 % environ. Dès 4 h d'incubation, ce défaut de dégradation est déjà visible avec seulement 10 % d'amidon consommé contre 35 % chez 137C. L'analyse du phénotype de dégradation en milieu liquide

permet donc de confirmer le défaut catabolique suggéré par le phénotype de la souche en milieu gélosé.

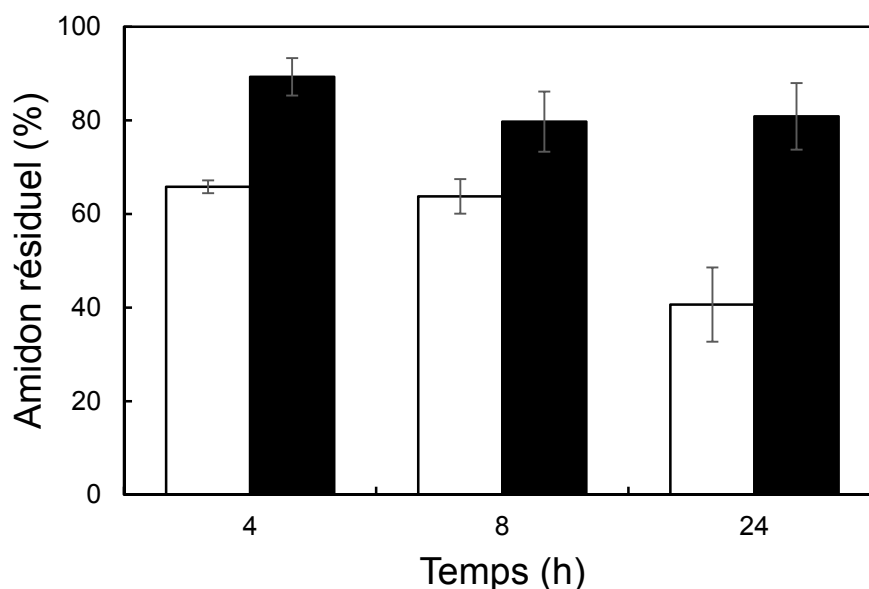


Figure 46 : Cinétique de dégradation de l'amidon de 137C (blanc) et CAT60 (noir). Cet histogramme représente les quantités d'amidon résiduel en pourcentage de la quantité accumulée initialement à T0, après 4, 8 et 24 h d'incubation à l'obscurité. Les données proviennent de 4 expériences indépendantes.

Parallèlement, les quantités d'amidon accumulées dans ces souches ont été dosées, aussi bien en milieu carencé en azote TAP-N, qu'en milieu standard TAP+N (**Tableau 17**). Il apparaît que l'insertion de la cassette n'affecte pas l'accumulation en milieu carencé puisque les quantités accumulées sont proches entre la souche sauvage et le mutant. En revanche, l'accumulation est moins forte en mixotrophie, la souche mutante n'accumulant qu'environ 50 % de la quantité normale.

Quantité d'amidon ($\mu\text{g}/\mu\text{g Chl}$)	TAP-N	TAP+N
137C	54,57 \pm 3,91	1,32 \pm 0,28
CAT60	52,94 \pm 8,42	0,63 \pm 0,07

Tableau 17 : Quantités d'amidon accumulées par les souches 137C et CAT60 en milieu carencé et en mixotrophie. Les quantités dosées ont été normalisées par la quantité de chlorophylle dans les cellulesensemencées (TAP-N) ou au moment du prélèvement (TAP+N). Les données proviennent de 4 expériences indépendantes.

La structure de cet amidon a également été étudiée par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Sépharose CL-2B, à partir du

polysaccharide extrait de souches cultivées en carence azotée, mais aussi en mixotrophie. Les profils obtenus dans les deux conditions sont à chaque fois très similaires entre la souche sauvage et le mutant CAT60 (**Figure 47**) laissant supposer une répartition normale entre l'amylopectine et l'amylose. De même, la structure de l'amylopectine, illustrée ici par la longueur d'onde au maximum d'absorption du polysaccharide, ne semble pas affectée.

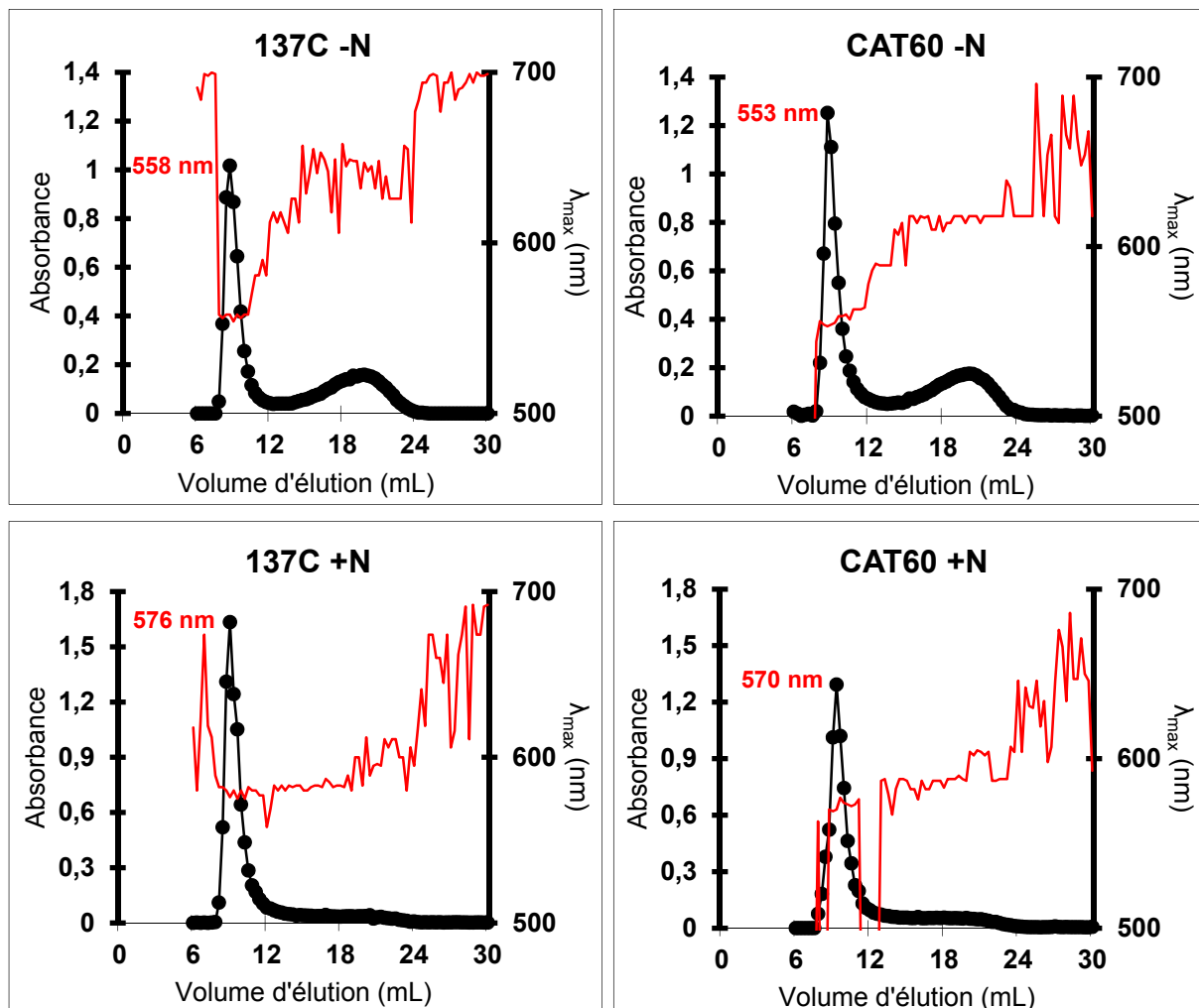


Figure 47 : Profils de chromatographie de tamisage moléculaire des amidons accumulés en carence azotée (-N) et en mixotrophie (+N) par la souche sauvage 137C et le mutant CAT60. La courbe noire représente la variation d'absorbance (axe gauche) et la rouge correspond à la longueur d'onde au maximum d'absorption (axe droit) de chaque fraction. La longueur d'onde indiquée au pic représente la λ_{\max} de l'amylopectine (en rouge).

La souche CAT60 se caractérise donc par un ralentissement très marqué de la dégradation de son amidon sans que cela se traduise par une suraccumulation du polysaccharide. Au contraire, l'accumulation est moindre chez la souche mutante en conditions mixotrophiques. Parallèlement à cet impact apparent sur la synthèse, aucune altération d'ordre structural n'a été détectée.

II. Identification de la fonction affectée

Dans le but d'identifier une fonction déficiente chez la souche CAT60, celle-ci a fait l'objet d'une caractérisation d'une part enzymatique et d'autre part moléculaire.

Dans un premier temps, un extrait brut des souches sauvage et mutante a été séparé sur un gel de polyacrylamide de type zymogramme contenant de l'amidon. Après incubation durant une nuit, les activités hydrolytiques ont été capables de modifier la structure de l'amidon contenu dans ce gel et sont mises en évidence par coloration à l'iode (**Figure 48**). Les profils observés sont en tout point identiques entre les deux souches, ne permettant pas de mettre en évidence un défaut lié aux activités pouvant agir directement sur l'amidon et que nous sommes capables de visualiser sur ce type de gel.

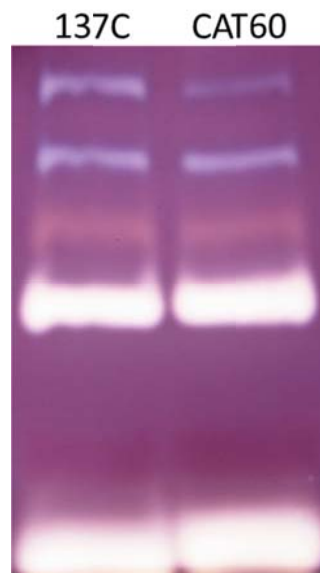


Figure 48 : Zymogramme sur substrat amidon des souches 137C et CAT60. 80 µg de protéines ont été analysées en conditions dénaturantes.

En parallèle, l'ADN extrait de la souche mutante CAT60 a été utilisé comme matrice pour une tentative de localisation de l'insertion par TAIL-PCR. Au cours de l'une de ces tentatives, la série de 3 PCR réalisées à l'aide des amorces spécifiques paro1, paro2, paro3 et de l'amorce dégénérée AD1 a permis l'amplification d'une séquence d'environ 800 pb qui a été clonée puis séquencée. Cette séquence est composée de 85 nucléotides correspondant à la cassette de résistance à la paromomycine tandis que les 696 autres proviennent d'ADN génomique de *Chlamydomonas*. Le Blast de cette séquence dans la base de données Phytozome

révèle une parfaite homologie avec le locus Cre10.g431650 situé sur le chromosome 10. Ce locus code une protéine contenant un domaine d'activité NAD kinase (**Figure 49 A**) responsable de la conversion du NAD en NADP. D'après le séquençage, l'insertion de la cassette de résistance se termine au nucléotide 265 interrompant ainsi la séquence au niveau du 2^{ème} intron du gène (**Figure 49 B**). La borne d'insertion en 5' de la cassette de résistance n'a pas été identifiée.

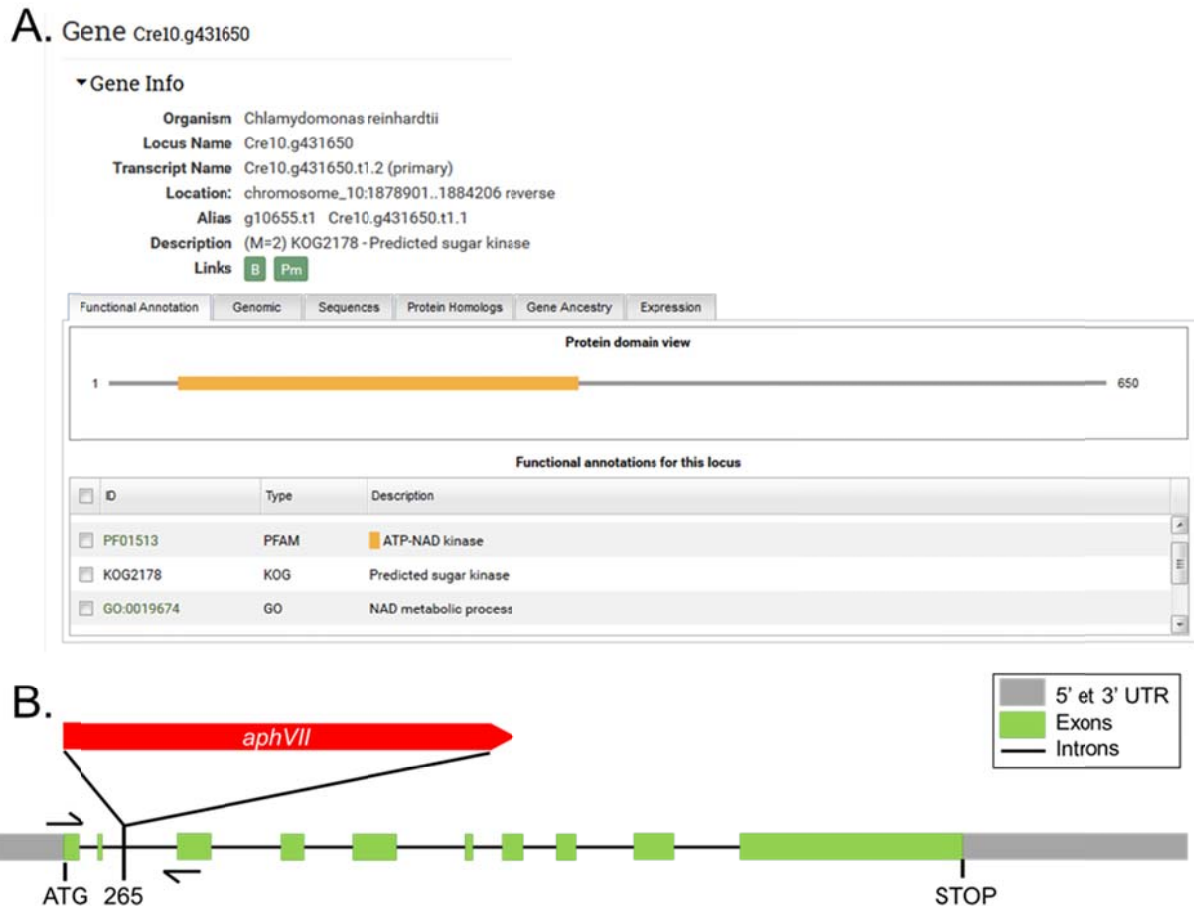


Figure 49 : Localisation de l'insertion de la cassette de résistance dans le génome de CAT60. A. Page de description du gène présentant une homologie avec la séquence amplifiée par TAIL-PCR après blast dans Phytozome v10.2. B. Représentation de l'insertion de la cassette dans le locus Cre10.g431650. Les sites d'hybridation des amorces utilisées pour le génotypage sont indiqués par deux flèches noires.

Cette insertion se traduit par une absence d'expression du gène, comme le montre l'analyse par RT-PCR (**Figure 50**). En effet, le fragment de 516 pb amplifié à partir des ARNs messagers de la souche sauvage 137C est absent chez le mutant CAT60. La qualité des ARNs utilisés a été vérifiée à l'aide d'une réaction de RT-PCR témoin permettant l'amplification d'un fragment du cDNA de la phosphorylase PhoB.

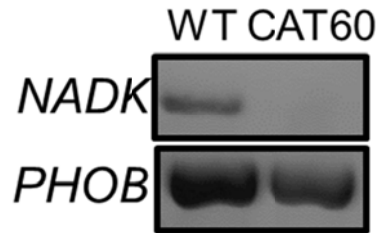


Figure 50 : Analyse par RT-PCR de l'expression du locus Cre10.g431650. L'hybridation des amorces CAT60RT5F et CAT60RT5R permet l'amplification d'un fragment de cDNA de 516 pb (*nadk*) tandis que les amorces PhoBFor et PhoBRev servent de témoin d'intégrité des ARNs et permettent la polymérisation d'une séquence de 736 pb (*PHOB*).

La caractérisation moléculaire de la souche CAT60 a donc permis de localiser une insertion de la cassette de résistance à la paromomycine. Devant la possibilité d'existence de plusieurs insertions indépendantes, il semblait nécessaire de montrer que l'insertion identifiée est bien celle responsable du défaut de dégradation observé. Afin de le démontrer, nous avons effectué une analyse de coségrégation entre le défaut de dégradation et l'insertion au sein de la descendance méiotique issue du croisement de la souche mutante avec une souche sauvage. En parallèle, une copie sauvage du gène Cre10.g431650 a été utilisée afin de tenter de compléter le mutant CAT60.

III. Analyse de coségrégation

La souche mutante a dans un premier temps été croisée avec la souche sauvage 37 de polarité sexuelle opposée (*mt+*). Dix tétrades ont été obtenues à la suite de ce croisement et la validité de ces tétrades a été confirmée par l'analyse de la recombinaison des caractères parentaux. Une fois les tétrades validées, les ségrégeants mutants contenant l'insertion de la cassette paromomycine au sein du gène codant la fonction NAD kinase ont été identifiés à l'aide d'une PCR utilisant deux amorces, NadkMutF et NadkMutR, s'hybridant de part et d'autre de l'insertion et permettant l'amplification d'une séquence de 549 pb chez une souche sauvage (**Figure 51**). Chaque tétrade est bien composée de deux souches sauvages et de deux souches mutantes pour la fonction NAD kinase. Il faut noter également que la ségrégation de l'insertion coségrège parfaitement avec celle de la résistance à la paromomycine, ce qui indique qu'il est fort probable que l'insertion dans le génome de CAT60 soit unique.

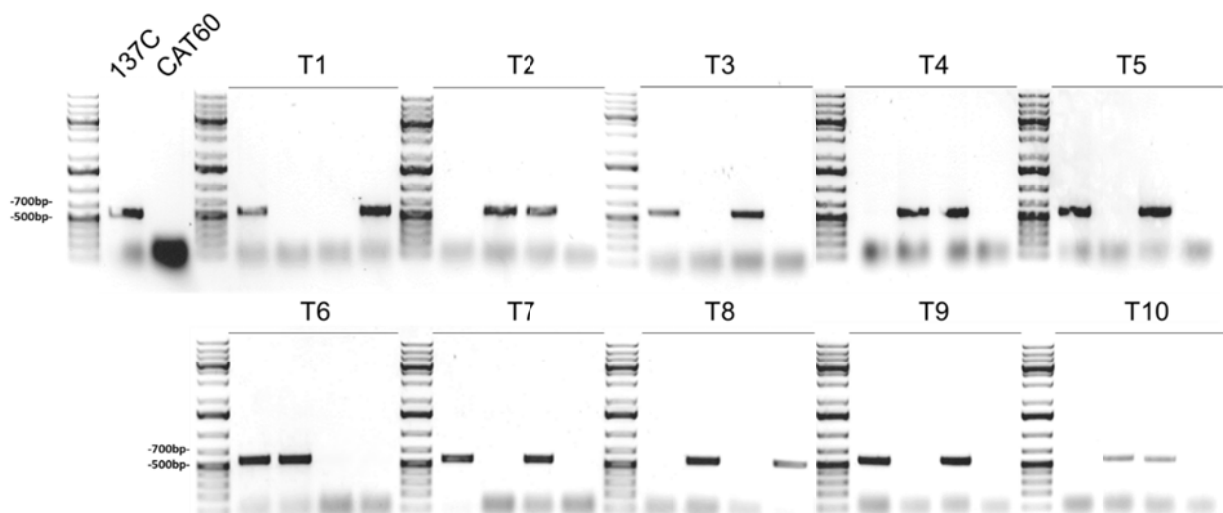


Figure 51 : Analyse par PCR de la présence de l'insertion chez les ségrégeants du croisement CAT60 x 37. La présence de l'insertion de la cassette dans le gène Cre10.g431650 est mise en évidence par l'absence de la bande à 543 pb amplifiée grâce à l'hybridation des amorces NadkMutF et NadkMutR.

La capacité de ces 40 ségrégeants à mobiliser leur amidon a été par la suite analysée. L'ensemble de ces souches a fait l'objet d'un dosage d'amidon après accumulation massive 5 jours en milieu carencé en azote et la quantité résiduelle d'amidon après 24 h de dégradation à l'obscurité a été déterminée. Pour chaque tétrade, deux souches montrent clairement un défaut de dégradation de l'amidon et toutes ces souches sans exception correspondent aux mutants porteurs de l'insertion

dans le gène de la NAD kinase (**Figure 52 A**). Cette observation spécifique pour chaque tétrade est confirmée lorsque tous les ségrégeants sont analysés dans leur ensemble puisque les 20 souches déficientes pour la fonction NAD kinase contiennent encore aux alentours de 80 % d'amidon résiduel contre seulement 37 % en moyenne chez les ségrégeants sauvages après les 24 h d'obscurité (**Figure 52 B**).

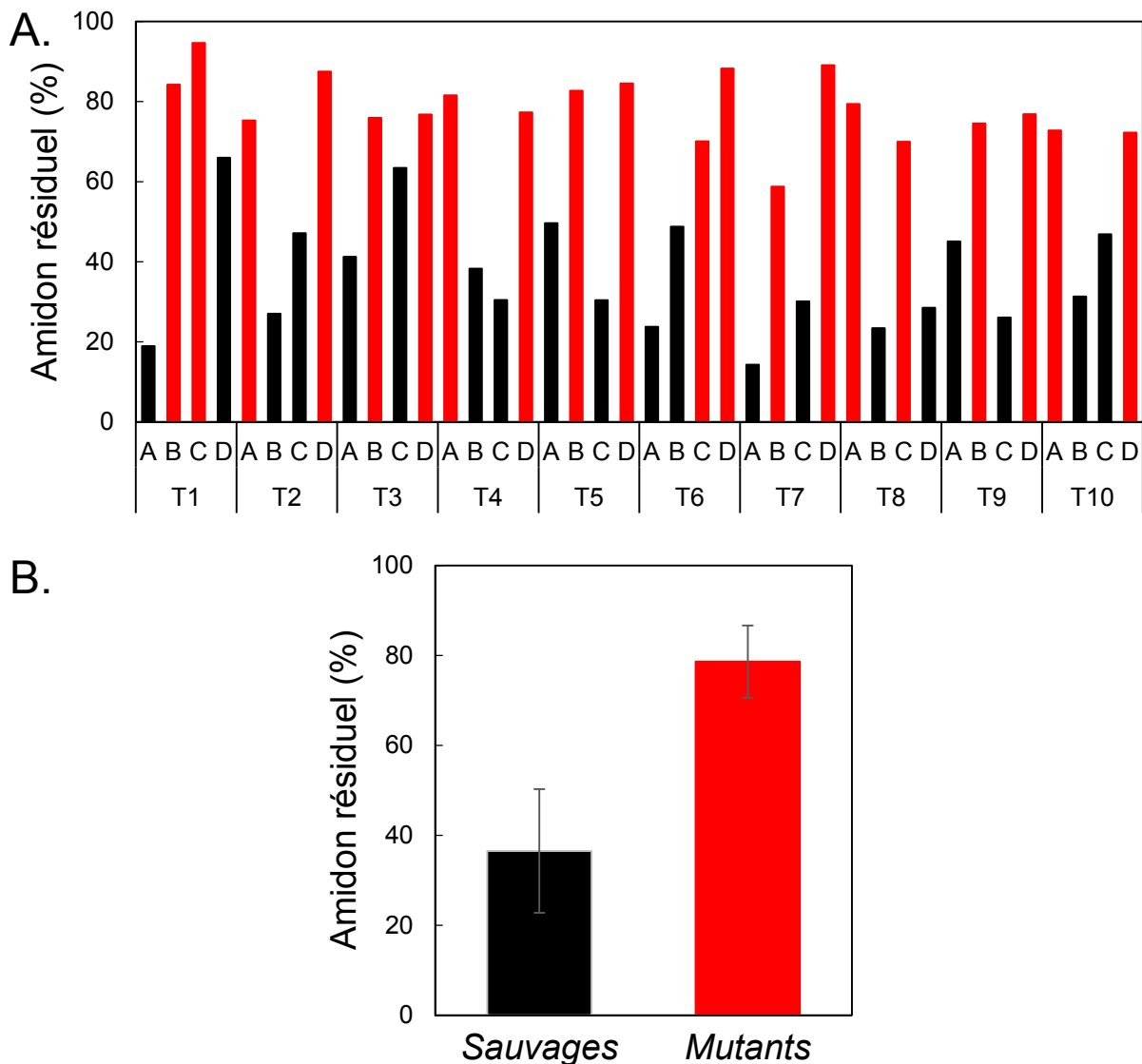


Figure 52 : Analyse du défaut de dégradation chez les ségrégeants du croisement CAT60 x 37. A. Amidon résiduel par rapport au T0 dans chacune des 10 tétrades. B. Amidon résiduel dans l'ensemble des populations sauvage et mutante issues du croisement CAT60 x 37. Les souches de génotype sauvage sont représentées en noir et celles contenant l'insertion en rouge.

La coségrégation entre une mobilisation altérée du polysaccharide et l'insertion de la cassette de résistance dans le gène Cre10.g431650 nous indique donc que le défaut de dégradation semble bien lié à la déficience en cette NAD

kinase. Cette conclusion est en plus renforcée par le fait que d'après la ségrégation de la résistance à la paromomycine, une seule insertion se serait produite dans la souche CAT60. Afin d'assoir définitivement la responsabilité de la mutation en NADK dans le défaut de dégradation de l'amidon, nous avons décidé de réaliser la complémentation fonctionnelle de la souche mutante CAT60.

IV. Complémentation fonctionnelle

Dans le but de compléter la souche mutante CAT60, une copie sauvage du gène Cre10.g431650 a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN de la souche sauvage 137C en utilisant les amorces NdeINadkFor et XbaINadkRev qui permettent l'amplification du gène de 4002 pb en y ajoutant un site *NdeI* en 5' et un site *XbaI* en 3'. Cet amplifiât a ensuite été inséré dans le vecteur de complémentation pSLHyg sous le contrôle du promoteur fort du gène *PSAD*. Ce plasmide a été linéarisé par *XmnI* puis inséré dans le génome de la souche CAT60 après transformation par électroporation. Dans le même temps, une transformation contrôle a été réalisée en utilisant le même vecteur ne contenant pas d'insert. 250 souches résistantes à l'hygromycine ont été sélectionnées et soumises au crible à l'iode en deux étapes, permettant de mettre en évidence un retour à un phénotype sauvage sur boîte chez uniquement 5 d'entre elles (**Figure 53 A**). L'ensemble des souches découlant de la transformation avec le plasmide pSLHyg vide ont quant à elles toutes gardé le phénotype mutant comme illustré par la souche NC1.

Ce phénotype sur boîte est corrélé d'une part avec la cinétique de dégradation en milieu liquide puisque les deux souches complémentantes testées présentent une cinétique de dégradation proche de celle du sauvage 137C alors que la souche NC1 a un comportement identique à celui du mutant d'origine CAT60 (**Figure 53 B**). La réapparition de l'expression du gène NADK a été confirmée chez ces 5 souches complémentantes par RT-PCR (**Figure 53 C**). L'absence de la fonction NAD kinase est donc bien responsable du défaut de dégradation de la souche CAT60. Néanmoins, si on s'intéresse en détails à la cinétique de dégradation, on remarque que les souches complémentantes adoptent un comportement hybride puisqu'elles dégradent aussi peu d'amidon que le mutant d'origine CAT60 durant les 4 premières heures d'obscurité puis ce retard de dégradation par rapport au sauvage 137C est comblé après 8 h pour finalement aboutir à des quantités d'amidon résiduel deux fois inférieures à celle de la référence sauvage en fin de cinétique (**Figure 53 B**).

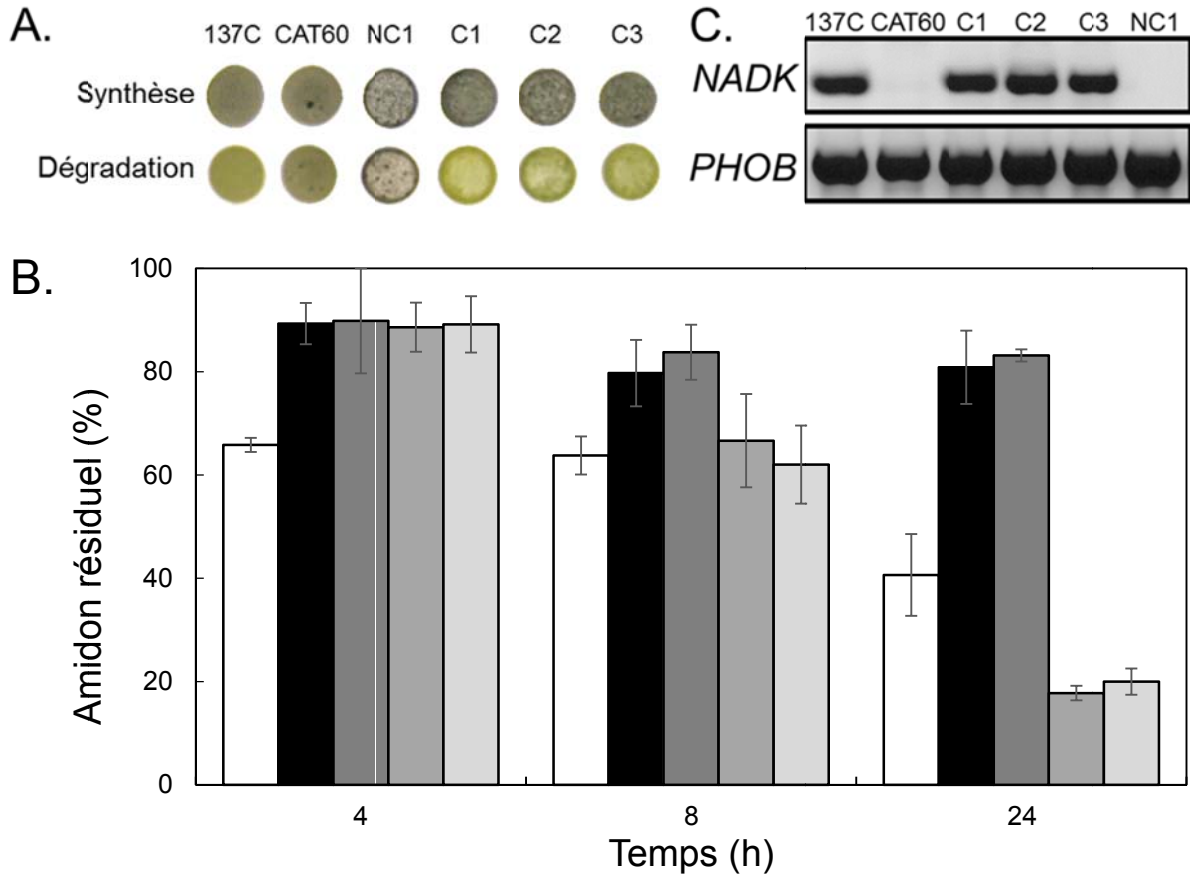


Figure 53 : Complémentation fonctionnelle de la souche CAT60. A. Phénotype au crible à l'iode de trois souches complémentantes (C1 à C3) et d'une souche non complémentante (NC1). B. Cinétique de dégradation de l'amidon dans deux souches complémentantes (gris clairs) et une souche non complémentante (gris foncé). Les quantités d'amidon résiduel sont représentées après 4, 8 et 24 h de dégradation à l'obscurité et par rapport à la quantité dosée à T0. La souche sauvage 137C est représentée en blanc et le mutant CAT60 en noir. Les données proviennent de trois expériences indépendantes. C. Analyse de l'expression du gène Cre10.g431650 par RT-PCR. Les amorces CAT60RT5F et CAT60RT5R permettent l'amplification d'une séquence de 516 pb et les amorces PhoBFor et PhoBRev un fragment de 736 pb du cDNA de l'amidon phosphorylase PhoB.

V. Analyse du métabolisme du NAD

Dans le but d'évaluer l'effet de l'absence de la NAD kinase sur les niveaux des co-enzymes concernés dans la cellule, le NAD⁺, le NADP⁺ mais aussi le NADH et le NADPH ont été dosés chez les souches 137C, CAT60 et C1 en phase exponentielle de croissance. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les 3 souches, et ce concernant les 4 métabolites et leurs ratios. En effet, bien que le ratio NAD/NADP semble légèrement diminué dans le mutant CAT60, le rapport des formes réduites (NADH/NADPH) est plus élevé. De plus, aucune différence ne peut être observée entre les valeurs mesurées dans ce mutant et dans la souche C1 qui ré-exprime la NAD kinase, il faut cependant remarquer que cette souche pourrait surexprimer l'enzyme ce qui expliquerait ce phénomène.

Souche	Quantité de métabolite en nmol.µg ⁻¹ de chlorophylle					
	NAD ⁺	NADP ⁺	ratio	NADH	NADPH	ratio
137C	155,4 ± 28	17 ± 3	9,13	17 ± 2	1,9 ± 0,2	8,88
CAT60	122,4 ± 19	14,9 ± 2	8,18	16,1 ± 3	1,5 ± 0,5	10,77
C1	122,6 ± 10	14,8 ± 1	8,3	16,1 ± 4	1,6 ± 0,2	10,01

Tableau 18 : Quantités de NAD, NADP, NADH et NADPH dosées chez les souches 137C, CAT60 et CAT60C1. Les quantités sont exprimées en nmoles du métabolite normalisées par la quantité de chlorophylle et les ratios représentent les rapports NAD/NADP et NADH/NADPH.

VI. Discussion

Chez la souche CAT60, la cassette de résistance à la paromomycine s'est insérée au niveau du locus Cre10.g431650 codant une activité NAD kinase, et a entraîné, d'après les analyses de coségrégation et de complémentation fonctionnelle effectuées, le défaut de dégradation observé dans ce mutant. Toutefois, cette défektivité n'affecte pas le ratio NAD⁺/NADP⁺ en conditions mixotrophiques, là où un défaut d'accumulation a pu être détecté.

Pour expliquer le défaut de dégradation observé en culture liquide, il est désormais nécessaire de doser également les différents métabolites dans ces conditions afin d'évaluer l'effet de cette insertion après la période d'accumulation en conditions carencées et au cours de la période de remobilisation.

En mixotrophie, il est intéressant d'observer l'absence d'effet de la défektivité en NAD kinase sur le ratio NAD⁺/NADP⁺ alors que l'on aurait pu s'attendre à une augmentation de celui-ci. Ceci peut s'expliquer par une compensation de l'absence de cette isoforme par une activité plus conséquente des deux autres isoformes présentes chez *Chlamydomonas*. En effet, il existe dans le génome de l'algue 3 formes de NAD kinase codées par les loci Cre07.g322950, Cre10.g431650 et Cre12.g560600 et seule la première est prédite comme plastidiale (Li *et al.*, 2014). Ces deux métabolites peuvent traverser la membrane mitochondriale *in vitro* (Neuburger et Douce, 1983 ; Bykova et Møller, 2001), mais aucune information n'est disponible à ce jour concernant la libre diffusion ou la présence de transporteurs spécifiques au niveau de la membrane du chloroplaste. Puisque dans notre mutant, la synthèse du polysaccharide est altérée en mixotrophie et sa dégradation fortement ralentie après accumulation massive en carence azotée, il semble difficile d'exclure la responsabilité d'une modification des quantités de coenzymes disponibles. L'absence de différence observée pour la cellule entière suggère un phénomène de compensation global mais n'exclut pas un déficit localisé à un compartiment cellulaire particulier. Des études plus poussées et en particulier du fractionnement cellulaire nous permettront certainement d'appréhender l'impact de l'absence de l'enzyme sur le métabolisme de l'amidon. Le faible taux de complémentants obtenus lors de la réintroduction d'une copie sauvage du gène de la NAD kinase laisse également présager de l'importance du niveau d'expression de ce

gène. Dans cette optique, une expérience de complémentation fonctionnelle à l'aide du gène sous son propre promoteur pourrait être envisagée.

Chapitre VI Etude du mutant *mex1* : CAT3

L'étude de ce mutant a été réalisée en collaboration avec le Dr Tuncay. Des résultats communs entre ces deux travaux de thèse sont donc présentés dans les deux manuscrits et sont signalés en légende. Ma participation dans ce projet a concerné plus particulièrement l'analyse des complémentants, de la coségrégation et de l'expression hétérologue de la protéine de l'algue chez *Arabidopsis* et *E. coli*.

I. Caractérisation de la souche CAT3

La souche CAT3 a été isolée après mutagenèse de la souche 137C par insertion du plasmide pSL18. Ce mutant présente un phénotype clair de défaut de dégradation lors du crible à l'iode en deux étapes (**Figure 54**), qui est confirmé lors de l'étude de la cinétique de dégradation effectuée en milieu liquide (**Figure 55**). Après 4 h d'incubation à l'obscurité, le mutant CAT3 n'a dégradé que 7 % de son pool d'amidon initial alors que la référence sauvage isogénique en a mobilisé 25 %. Ce très fort ralentissement se maintient tout au long de la cinétique puisque CAT3 n'est capable de dégrader qu'un quart de son amidon en 24 h soit presque trois fois moins que le sauvage.

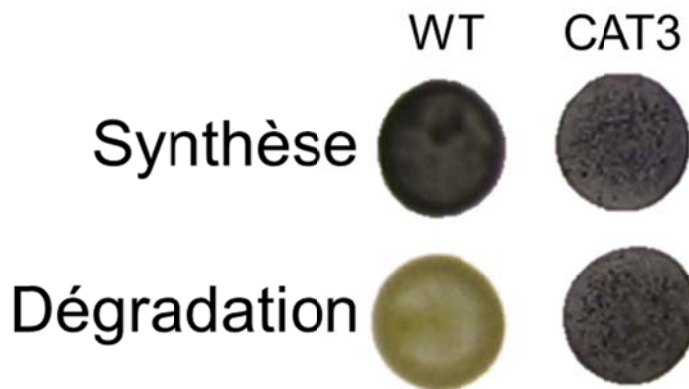


Figure 54 : Phénotype sur milieu gélosé de la souche 137C (WT) et du mutant CAT3. Les patchs cellulaires déposés sur deux boîtes de Pétri ont été incubés 5 jours à la lumière et en carence azotée (Synthèse). La carence a été levée sur l'une des deux boîtes qui a alors été incubée 24 h supplémentaires à l'obscurité (Dégradation). Après cette période, la quantité de polysaccharide présente est révélée par interaction à l'iode sur les deux boîtes.

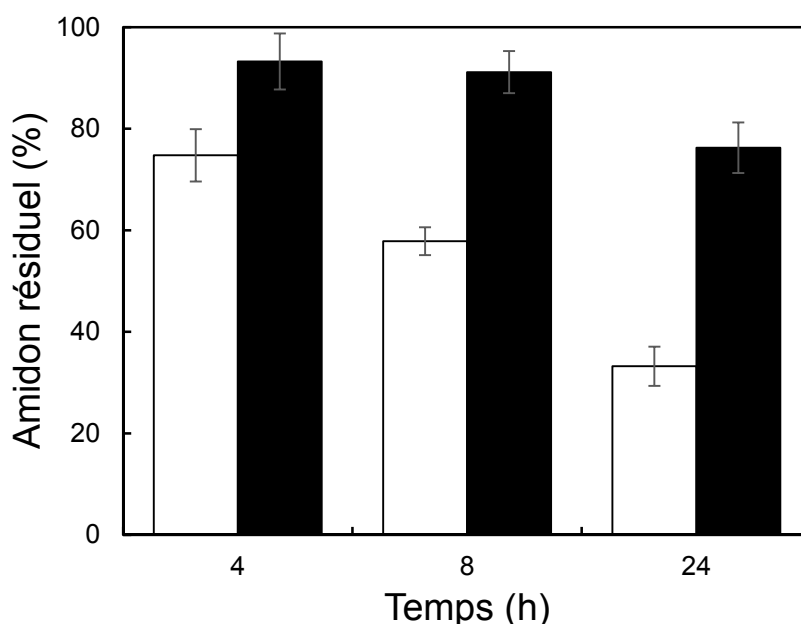


Figure 55 : Cinétique de dégradation de l'amidon par les souches 137C (blanc) et CAT3 (noir). Les souches ont été cultivées 5 jours en carence azotée puis transférées en absence d'acétate à l'obscurité pendant 24 h. Les quantités d'amidon ont été dosées après 4, 8 et 24 h et sont normalisées ici par rapport à la quantité dosée à T0. Les données proviennent de 4 expériences indépendantes.

Ce défaut de dégradation pourrait être responsable du phénotype *sex* observé chez la souche CAT3. En conditions carencées, le mutant contient plus de 200 % de la quantité sauvage d'amidon alors qu'en mixotrophie, cette valeur dépasse allègrement les 300 % (**Tableau 19**). Nous avons également déterminé dans ces deux conditions de culture la quantité de polysaccharides solubles mais leur niveau reste en dessous de la limite de détection de notre technique de dosage, ne permettant pas de mettre en évidence une quelconque différence entre les deux souches.

Quantité d'amidon ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	TAP-N	TAP+N
137C	21 \pm 4	1,3 \pm 0,4
CAT3	50 \pm 5	4,9 \pm 1,1

Tableau 19 : Quantités d'amidon accumulées par les souches 137C et CAT3. Une préculture en fin de phase exponentielle a été ensemencée dans un litre de milieu TAP-N ou TAP+N puis l'accumulation du polysaccharide a été dosée après 5 et 3 jours de culture, respectivement. Les quantités proviennent de 3 dosages indépendants et sont exprimées en μg par million de cellules.

La structure de l'amidon de la souche CAT3 a également été étudiée d'une part par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sépharose CL-2B et ensuite par détermination de la distribution en longueurs de chaînes de l'amylopectine. Les

profils d'absorbance des fractions après chromatographie de tamisage moléculaire sont très similaires entre la souche sauvage et le mutant CAT3 (**Figure 56 A et B**). De même, la structure de l'amylopectine ne semble *a priori* pas affectée puisque sa longueur d'onde au maximum d'absorption (552 nm) est proche de celle de l'amylopectine sauvage (556 nm).

La structure de cette amylopectine a tout de même été analysée plus en détails par HPAEC-PAD. Les fractions correspondant aux amylopectines de 137C et CAT3 ont d'abord été récupérées puis débranchées par une isoamylase et une pullulanase. Les glucanes linéaires obtenus ont été analysés sur une colonne échangeuse d'anions pour déterminer la proportion de chaque chaîne constitutrice de l'amylopectine. Les profils obtenus sont très similaires entre les deux souches et ne permettent pas de relever une différence significative de composition de ces deux polysaccharides (**Figure 56 C et D**). Cette observation est confirmée par la comparaison des deux profils qui montre que la différence de représentation de chaque type de chaînes n'excède pas 0,2 % (**Figure 56 E**). Le mutant CAT3 accumule donc un amidon de structure parfaitement normale.

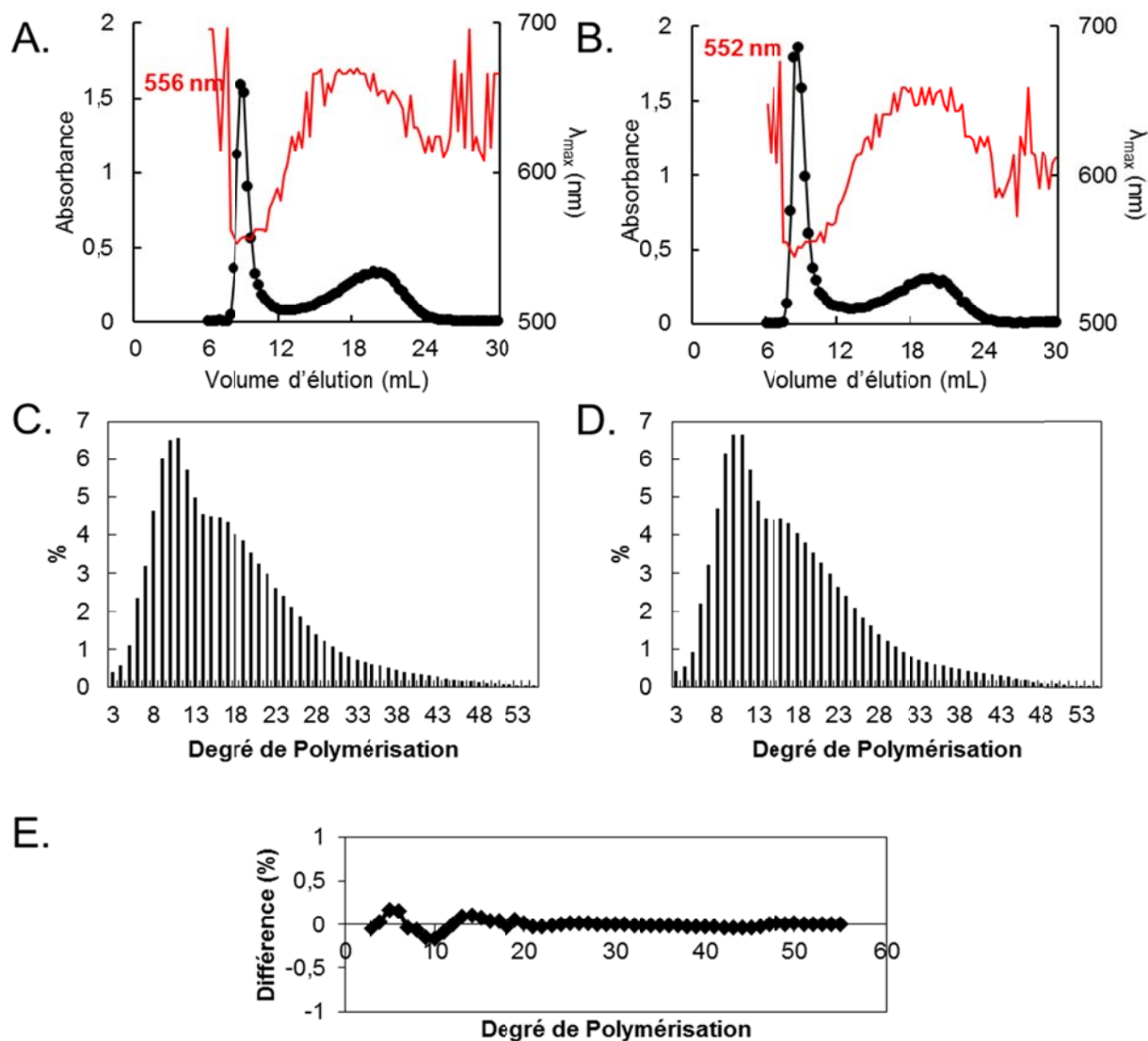


Figure 56 : Etude structurale de l'amidon accumulé dans les souches 137C et CAT3. (A-B) Les deux fractions de l'amidon extrait des souches 137C (A) et CAT3 (B) ont été séparées par chromatographie de tamisage moléculaire et l'absorbance du complexe iode/polysaccharide (points noirs) et la longueur d'onde au maximum d'absorption (ligne rouge) de chaque fraction sont représentées. La valeur de λ_{max} des deux amylopectines est indiquée en rouge sur chaque graphe. (C-D). L'amylopectine de la souche sauvage (C) et du mutant (D) recueillie après gel filtration a été débranchée puis passée sur une colonne HPAEC-PAD permettant de déterminer la distribution de longueur de chaînes. La représentativité de chaque chaîne est indiquée en pourcentage de la totalité des chaînes, les résultats représentent la moyenne de 3 analyses de chaque amylopectine. E. Les valeurs obtenues pour la souche CAT3 ont été soustraites à celle de la référence sauvage pour obtenir un profil différentiel entre les amylopectines des deux souches.

Nous avons également étudié le comportement de la souche CAT3 dans des conditions plus physiologiques c'est-à-dire en cycle jour-nuit, sans acétate et sur des cellules synchronisées afin de se rapprocher des conditions présentes dans un organe photosynthétique de plante. Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire du Dr Gilles Peltier du CEA de Cadarache. Deux cultures de chaque souche ont été synchronisées dans un cycle 12 h jour / 12 h nuit en milieu minimal et l'amidon a été

dosé à partir de prélèvements réalisés toutes les 2h en jour et toutes les 3h en nuit (**Figure 57**). En fin de jour, la quantité d'amidon retrouvée dans le mutant CAT3 ne représente que 120 % de la quantité accumulée par la souche 137C. Au cours de la nuit, la vitesse de dégradation observée pour la souche mutante n'est pas significativement différente de celle de la souche sauvage. Ainsi, les fortes différences observées entre notre mutant et la souche sauvage en mixotrophie ou en carence azotée sont bien plus subtiles en photoautotrophie.

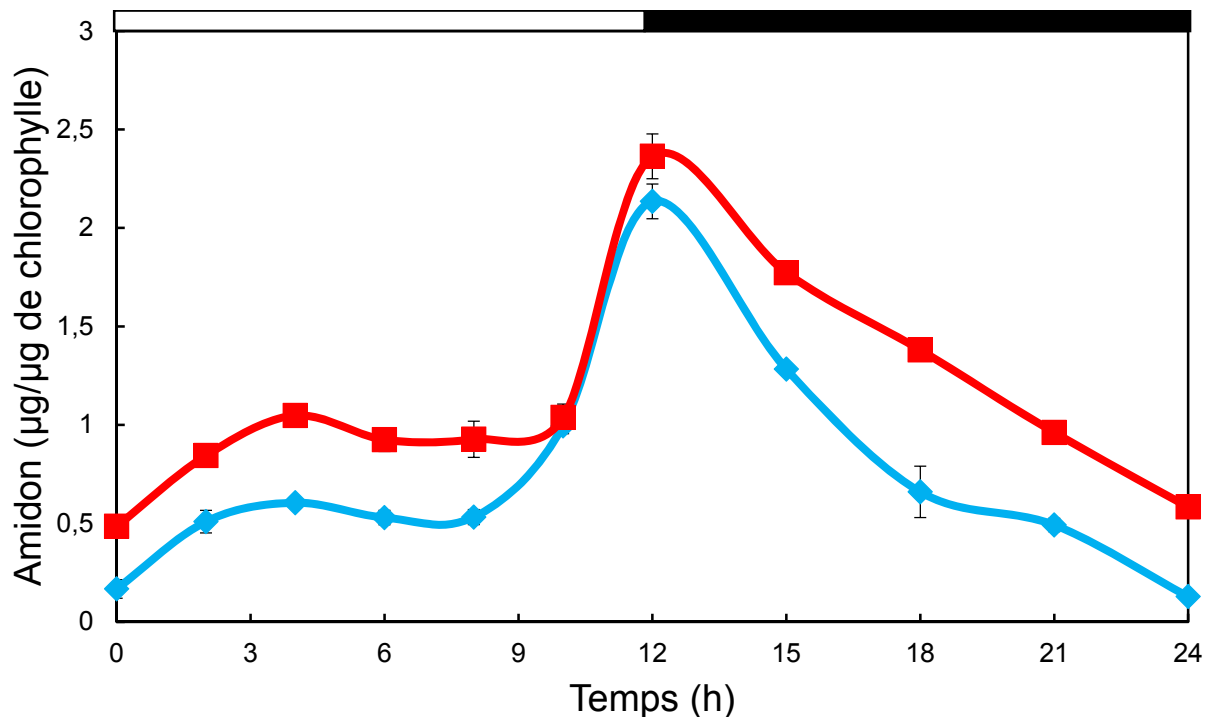


Figure 57 : Evolution de la quantité d'amidon chez les souches 137C (bleu) et CAT3 (rouge) sur un cycle jour/nuit. Des cellules synchronisées des deux souches ont été cultivées dans un cycle de 12 h de jour : 12 h de nuit en milieu minimal et avec bullage d'un air enrichi à 2 % en CO₂. Ces résultats proviennent de trois expériences indépendantes. La barre noire représente la période d'obscurité.

L'ensemble de ces études préliminaires nous permet de certifier que le mutant CAT3 possède bien un défaut de dégradation de l'amidon. Néanmoins, l'effet de la mutation est dépendant des conditions de culture et son expression est bien plus importante dans des conditions mimant la dégradation de l'amidon de réserve (carence azotée puis passage à l'obscurité) que dans un système se rapprochant du métabolisme de l'amidon transitoire de la feuille (photoautotrophie en jour/nuit). Par ailleurs, la ou les mutation(s) présente(s) dans cette souche n'altère(nt) pas la structure du polysaccharide accumulé.

II. Identification de la mutation

Au même titre que les autres souches déficientes pour la dégradation de l'amidon, la souche CAT3 a fait l'objet de deux volets de caractérisations afin de déterminer la fonction touchée par l'insertion du plasmide de mutagenèse.

En premier lieu, un extrait protéique de la souche CAT3 a été utilisé afin de visualiser les différentes activités enzymatiques présentes par les techniques de zymogrammes (**Figure 58**). Quelque soit le substrat utilisé et le type d'activité révélée, aucune différence entre le mutant CAT3 et la souche sauvage 137C n'a pu être mise en évidence. Le volet enzymatique de caractérisation ne nous a donc pas permis d'obtenir une quelconque information quant à la défectuosité présente chez cette souche et une approche moléculaire a été engagée afin d'identifier le lieu d'insertion du plasmide mutagène dans le génome de l'algue.

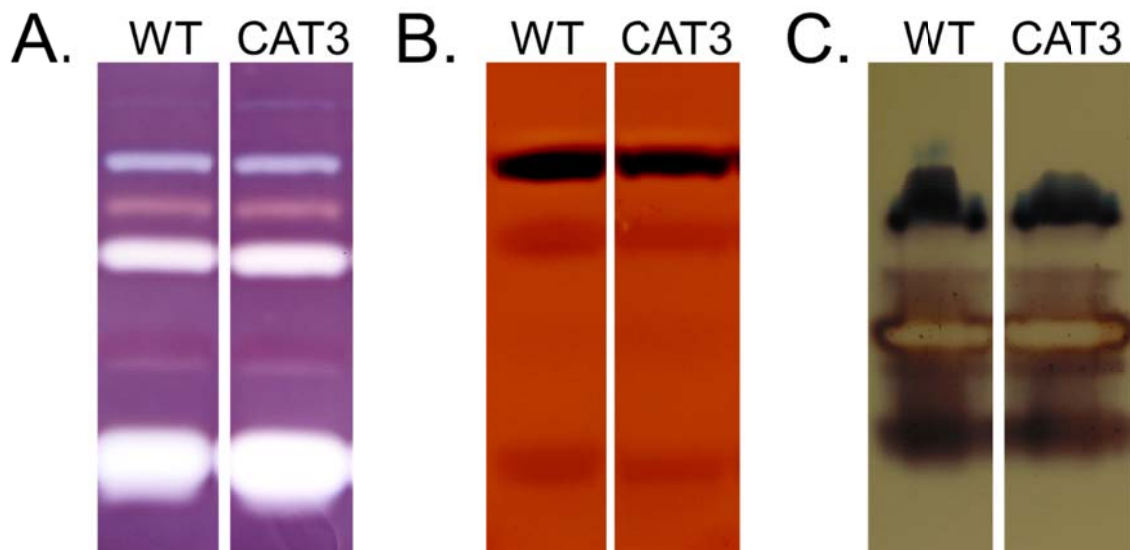


Figure 58 : Profils enzymatiques des souches 137C et CAT3. A. Zymogramme effectué en conditions dénaturantes et révélant les activités hydrolytiques agissant sur l'amidon. B. Zymogramme dénaturant incubé une nuit en présence de G1P et révélant l'activité phosphorylase (bande noire). C. Zymogramme effectué en conditions natives et sans substrat puis incubé en présence de phosphorylase a de lapin et de G1P permettant la détection des enzymes de branchement. Pour chaque zymogramme, 50 µg d'extrait protéique ont été déposés et toutes les activités ont été révélées par coloration à l'iode.

Le mutant CAT3 provenant d'une mutagenèse par insertion du plasmide pSL18, l'ADN génomique de cette souche a été utilisé afin de tenter de localiser une insertion dans le génome par PCR inverse et par « Plasmid Rescue ». Après digestion de cet ADN par *Bss*HII, ligation et amplification par PCR à partir des amorces localisées sur la région terminatrice du plasmide pSL18, un fragment

d'environ 1,9 kpb a été obtenu par PCR inverse. Ce fragment a été amplifié après clonage dans un vecteur TOPO TA cloning et a été séquencé à l'aide des amorces universelles M13. Une séquence de 1164 pb a ainsi été obtenue, parmi lesquelles 86 correspondent au vecteur de clonage, 538 au plasmide pSL18 et 540 *a priori* au génome de l'algue. Le blast de cette séquence dans la base de données Phytozome et contre la version 5.5 du génome de *Chlamydomonas reinhardtii* révèle une homologie parfaite avec les loci Cre12.g486550 et Cre12.g486600 situés sur le chromosome 12. Aucune information n'est disponible quant à la nature du produit du premier gène alors que le second est décrit comme codant un transporteur de maltose du type Mex1 déjà étudié chez *Arabidopsis thaliana* (**Figure 59 A**). D'après ce séquençage, l'insertion du plasmide pSL18 a eu lieu au niveau du nucléotide 285 du locus Cre12.g486600 soit dans le premier intron de ce gène (**Figure 59 B**). Cette intégration empêche l'expression de cet homologue de la protéine Mex1 dans l'algue mutante puisque nous avons été incapables d'amplifier un fragment de 374 pb du cDNA correspondant à partir des ARNs de la souche CAT3 (**Figure 60**).

A. Gene Cre12.g486600

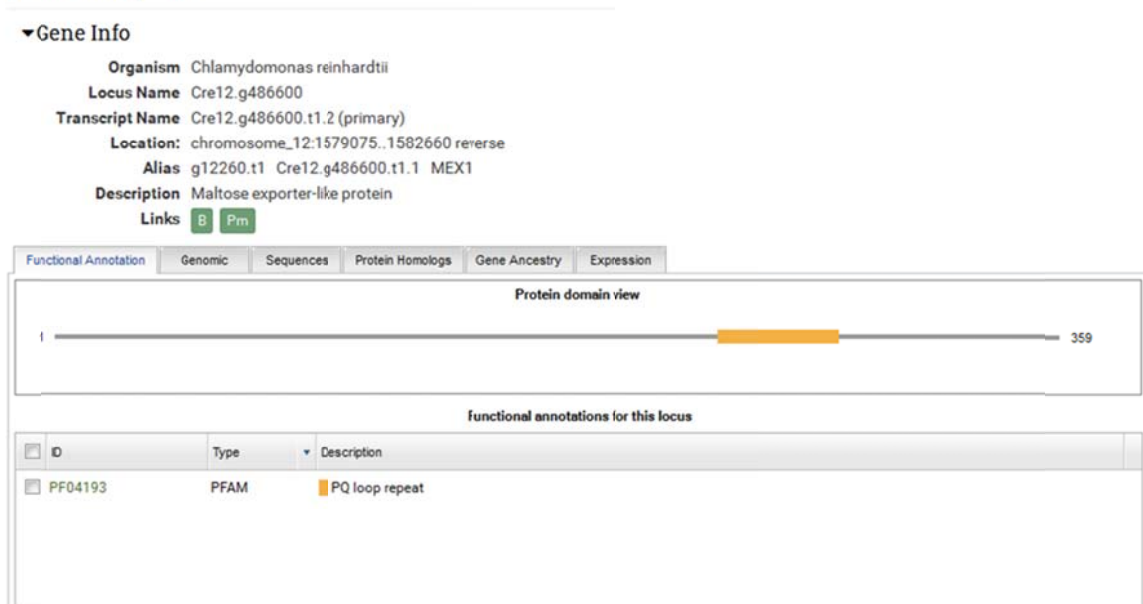


Figure 59 : Localisation de l'insertion du plasmide pSL18 dans le génome de la souche CAT3. A. Cre12.g486600, locus identifié lors du Blast dans Phytozome de la séquence obtenue par PCR inverse. B. Schématisation de l'insertion du plasmide dans le génome de la souche CAT3.

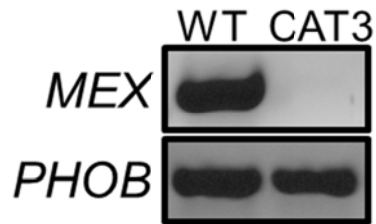


Figure 60 : Analyse par RT-PCR de l'expression du locus *MEX* dans les souches 137C (WT) et CAT3. L'hybridation des amorces RTMexA et RTMexE sur les ARN messagers permettent l'amplification d'un fragment de cDNA de 374 pb. Le témoin d'amplification *PHOB* est lui polymérisé grâce à l'hybridation des amorces PhoBFor et PhoBRev en un fragment de 736 pb.

Les deux volets de caractérisation engagés sur la souche CAT3 nous ont permis de déterminer la présence d'une insertion du plasmide de mutagenèse au sein du locus Cre12.g486600 codant une protéine de séquence homologue à celle du transporteur de maltose Mex1 d'*Arabidopsis thaliana*. Afin de prouver l'implication de cette mutation dans le phénotype de défaut de dégradation observé, la souche CAT3 a fait l'objet d'une analyse de coségrégation et d'une complémentation fonctionnelle.

III. Analyse de coségrégation et complémentation fonctionnelle

Le mutant CAT3 a été croisé avec la souche 37 de polarité sexuelle opposée. 8 tétrades ont été obtenues de ce croisement et ces 32 souches ont dans un premier temps été génotypées. Pour cela, une PCR à trois amorces a été mise au point en utilisant les amorces Mex1For, Mex1500Rev et TpsaDRev. Les deux premières permettent l'amplification d'une séquence de 1316 pb sur le locus *MEX* tandis que la troisième (TpsaDRev) est spécifique de l'insertion et permet, avec l'amorce Mex1For, la polymérisation d'un fragment de 670 pb (**Figure 61 A**). L'ADN de toutes les souches ségrégeantes a été utilisé comme matrice pour cette PCR et a permis de déterminer le génotype sauvage ou mutant de chaque ségrégeant (**Figure 61 B**). On observe ainsi, et au sein de chaque tétrade, une ségrégation 2 : 2 de ce caractère génétique. L'analyse de la résistance à la paromomycine suit également une ségrégation 2 : 2 et coïncide parfaitement avec l'insertion du plasmide de mutagenèse dans le locus *MEX*, ce qui renforce la probabilité d'une insertion unique dans le génome de la souche mutante CAT3.

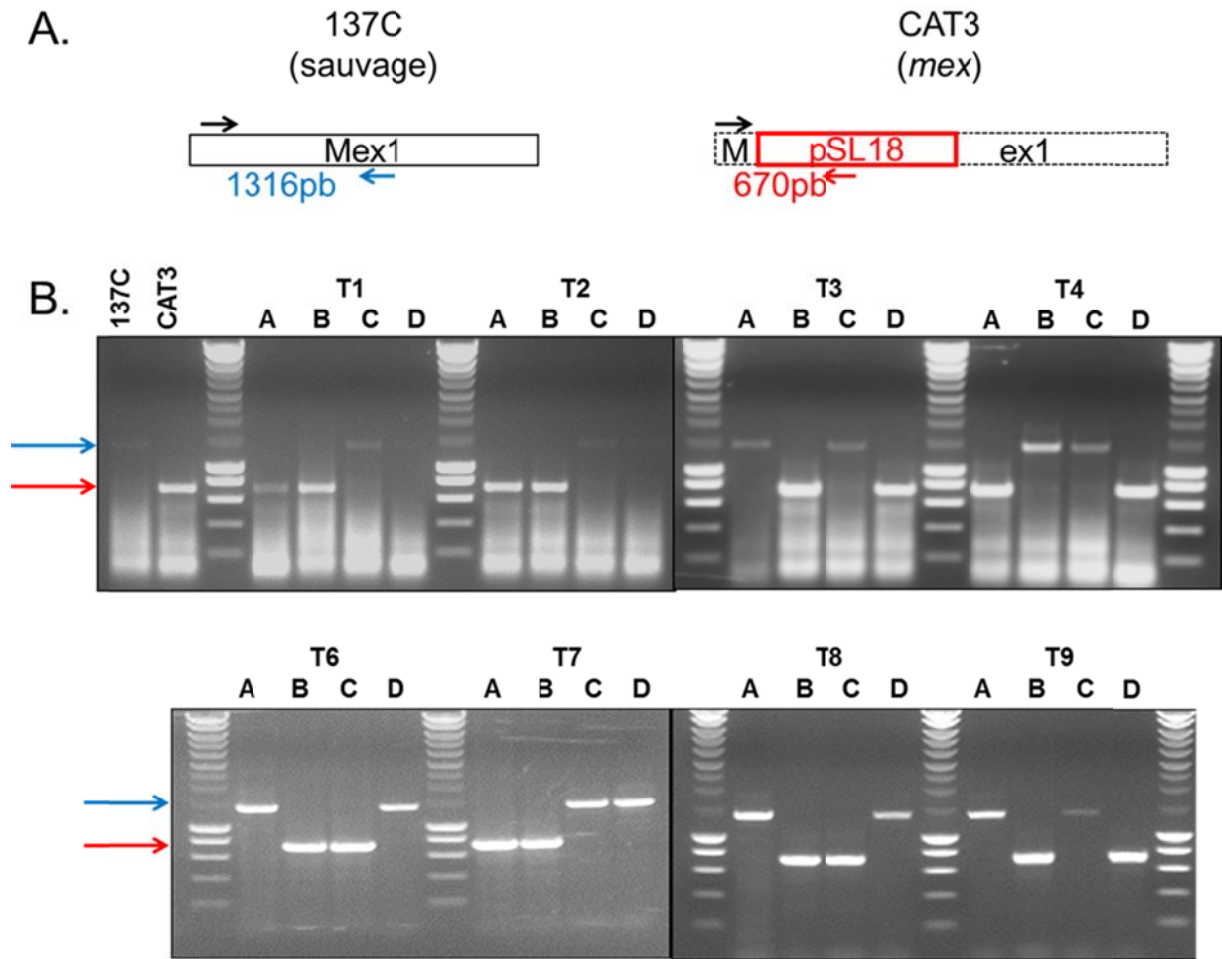


Figure 61 : Génotypage des tétrades issues du croisement CAT3 x 37. A. Représentation schématique du locus *MEX* chez les souches 137C et CAT3 avec positionnement des amorces. B. Produits de la PCR à trois amorces pour les souches 137C, CAT3 et pour les 8 tétrades issues du croisement CAT3 x 37. Le locus sauvage est signalé par une flèche bleue qui montre l'amplification d'un fragment de 1316 pb tandis que le locus muté (flèche rouge) se caractérise par une bande à 670 pb spécifique de l'insertion.

La coségrégation entre l'insertion du plasmide et le défaut de dégradation a ensuite été vérifiée par l'intermédiaire de cinétiques de dégradation sur les souches ségrégeantes. Les quantités d'amidon présentes dans les cellules ont été dosées dès le début de la période de dégradation et comparées à l'amidon résiduel après les 24 h d'obscurité. Ces dosages montrent que les souches contenant l'insertion du plasmide au locus *MEX* dégradent systématiquement leur amidon de manière plus lente que les ségrégeants sauvages, et ce au sein de chacune des 8 tétrades (**Figure 62 A**). Sur l'ensemble des deux populations, les souches mutantes contiennent encore en moyenne 84 % de polysaccharide après la période de dégradation contre 37 % chez les ségrégeants sauvages (**Figure 62 B**). L'analyse de coségrégation prouve donc la responsabilité de l'insertion localisée au niveau du

locus *MEX* dans le phénotype de défaut de dégradation observé chez le mutant CAT3. Reste maintenant à prouver que cette insertion n'ait pas touché un locus adjacent au gène *MEX* et dont l'interruption serait responsable du phénotype. Pour ceci, la complémentation fonctionnelle de la souche CAT3 a été effectuée.

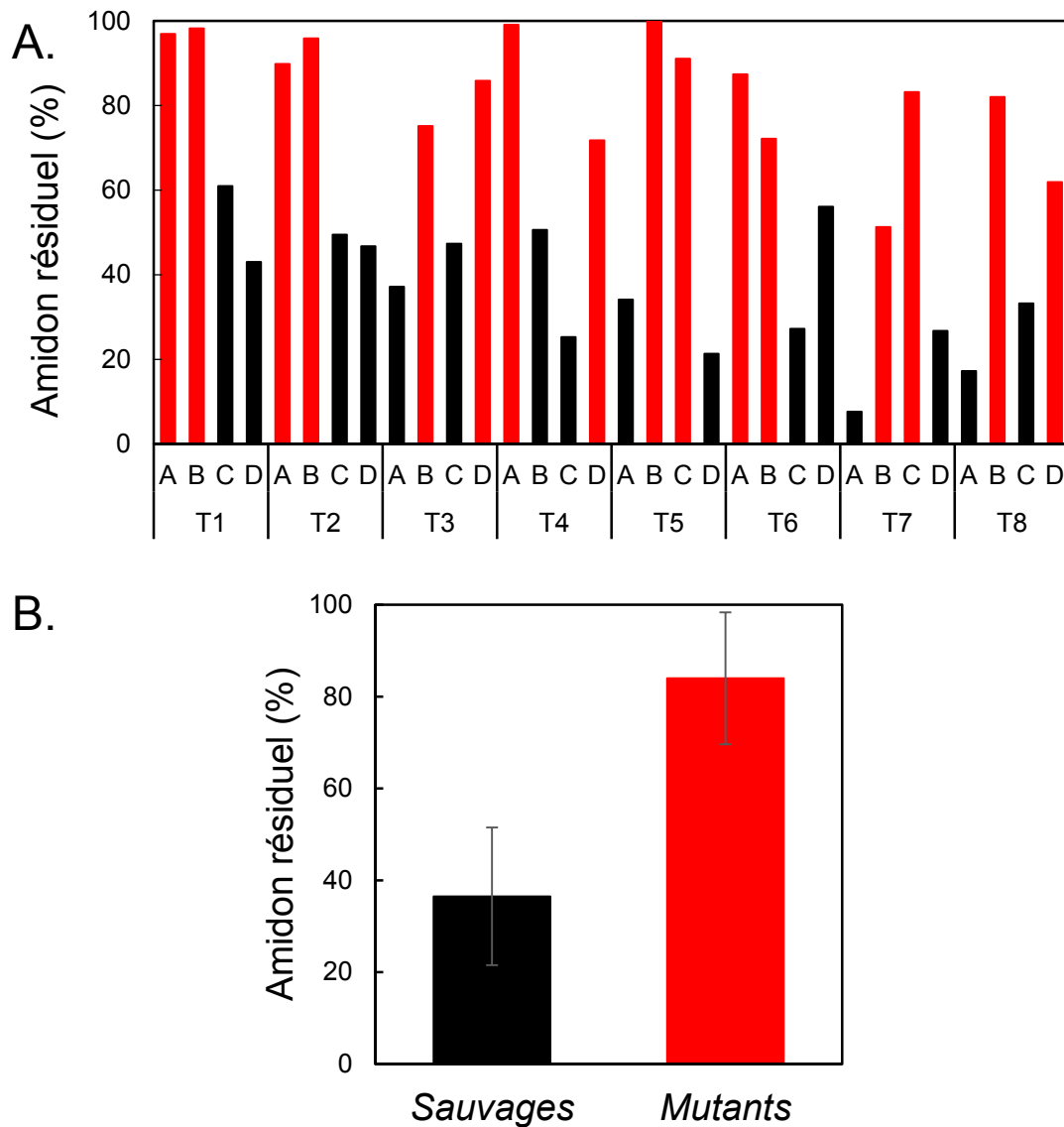


Figure 62 : Analyse du défaut de dégradation chez les ségrégeants du croisement CAT3 x 37. A. Quantités d'amidon résiduel après 24 h de dégradation à l'obscurité pour chaque des 32 souches ségrégeantes. Les souches contenant l'insertion sont représentées en rouge et les souches sauvages en noir. B. Moyenne de la quantité d'amidon résiduel chez l'ensemble des souches ségrégeantes sauvages en noir et mutantes en rouge.

Une copie sauvage du gène *MEX* a été amplifiée à partir de l'ADN de la souche sauvage 137C à l'aide des amorces RVMexFor et RVMexRev. Le produit de 2,7 kpb a ensuite été cloné dans le vecteur de complémentation pSLHyg à l'aide des

sites *EcoRV* introduits lors de la PCR. Le vecteur final contenant le gène *MEX* a finalement été utilisé pour transformer la souche mutante CAT3 avant sélection sur milieu riche contenant de l'hygromycine (20 µg/mL) et de la paromomycine (10 µg/mL). 70 souches transformantes résistantes à ces 2 antibiotiques ont été soumises au crible à l'iode en deux étapes, permettant d'identifier 47 d'entre-elles chez qui un retour au phénotype sauvage est observé (**Figure 63 A**). 20 souches transformées avec le vecteur pSLHyg vide (NC) conservent toutes quant à elles le phénotype de défaut de dégradation. Ces observations sont confirmées lors des études de cinétiques de dégradation en milieu liquide puisque les souches ayant reçu le vecteur de complémentation adoptent un comportement similaire à la souche sauvage et ne contiennent plus que 34 % de leur pool d'amidon initial alors que les souches NC contiennent, après la période de dégradation, une quantité similaire à celle observée dans le mutant originel CAT3 (**Figure 63 B**).

L'étude de l'expression du locus *MEX* par RT-PCR a permis de corrélérer le phénotype sauvage observé chez les souches complémentantes à un retour de l'expression de l'ARNm comme démontré par l'amplification d'un fragment de cDNA de 375 pb (**Figure 63 C**). Dans le même temps, ce fragment est toujours absent chez les souches non complémentantes. La complémentation fonctionnelle de la souche CAT3 par le gène *MEX* permet de conclure que c'est bien l'absence de cette fonction qui est responsable du phénotype de défaut de dégradation ; et confirme l'implication de la fonction Mex dans le catabolisme de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

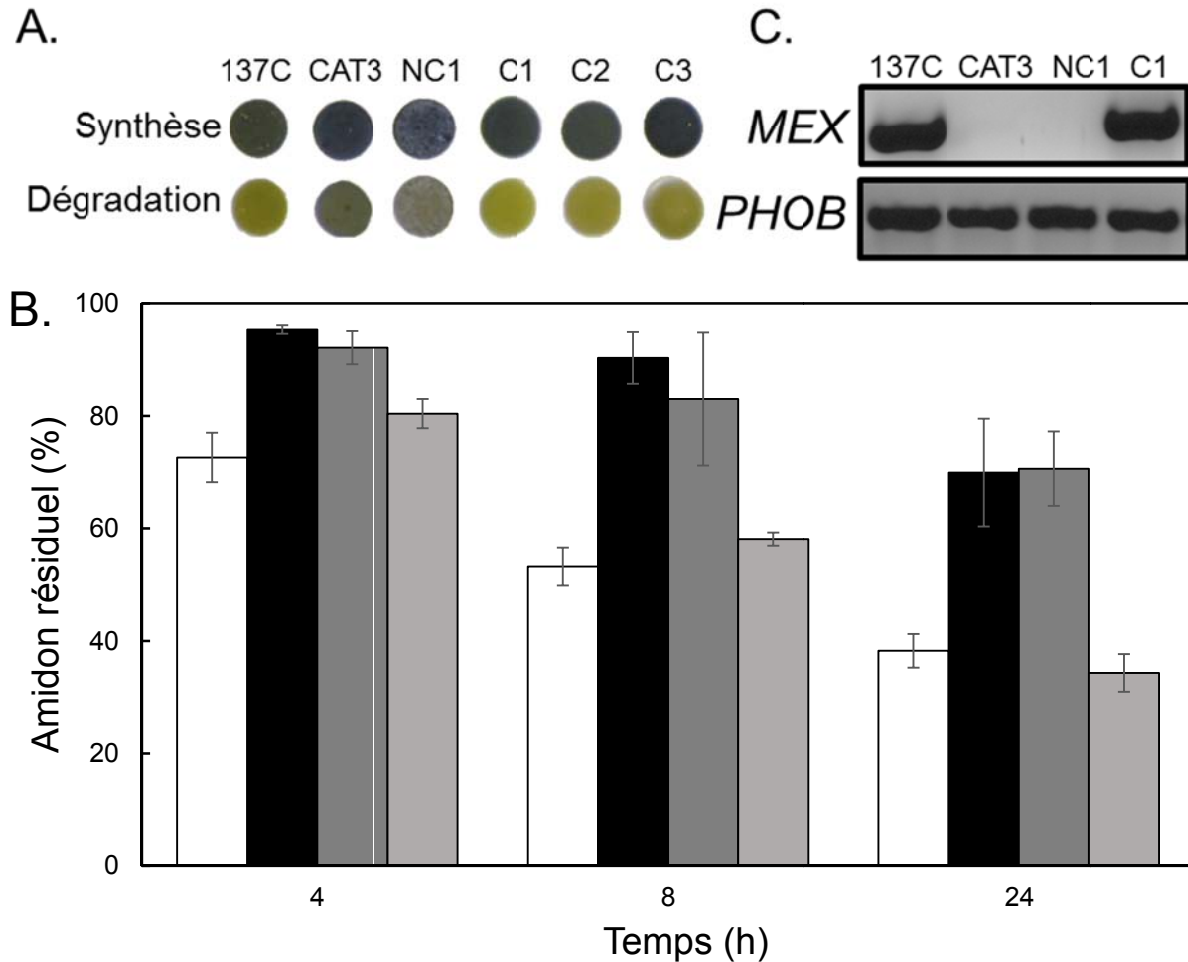


Figure 63 : Complémentation fonctionnelle de la souche CAT3. A. Phénotype des souches complémentées (C1-C3) et de la souche non complémentée NC1 lors du criblé à l'iode en deux étapes. Les souches ont été incubées 5 jours en carence azotée avant de lever cette carence sur l'une des deux boîtes qui est incubée 24 h supplémentaires à l'obscurité. La présence du polysaccharide est ensuite révélée par coloration à l'iode. B. Cinétique de dégradation en milieu liquide. Les souches ont été cultivées en milieu liquide carencé en azote puis transférées dans un milieu minimal et incubées à l'obscurité pendant 24 h. Les quantités d'amidon restantes après 4, 8 et 24 h d'incubation sont exprimées par rapport à la quantité présente à T0. Ces données proviennent de 3 expériences indépendantes. C. Analyse de l'expression du locus *MEX* par RT-PCR. L'expression du locus *MEX* se caractérise par l'apparition d'une bande à 375 pb tandis que le témoin d'amplification consiste en une bande de 736 pb spécifique de l'ARNm de la phosphorylase PhoB. Les parties A et B sont celles présentées dans la thèse du Dr Tuncay et la partie B correspond à de nouvelles cinétiques réalisées lors de ce travail de thèse.

Une fois l'insertion du plasmide de mutagenèse localisée au niveau du locus *MEX*, l'analyse de coségrégation et la complémentation fonctionnelle nous ont permis de confirmer l'implication de cette fonction dans le catabolisme de l'amidon. Toutefois, l'un des caractères les plus marquants de la lignée mutante *mex1* d'*Arabidopsis thaliana* est l'accumulation massive de maltose, le produit de dégradation exporté par la protéine Mex1 vers le cytosol, notamment durant la nuit (Niittylä *et al.*, 2004). C'est d'ailleurs ce phénotype qui avait conduit les auteurs à supposé et a confirmé chez *Escherichia coli* la fonction de transporteur de maltose de la protéine Mex1.

Chez la souche CAT3, l'insertion du plasmide pSL18 touche une protéine ayant *a priori* la même fonction. La protéine Mex de *Chlamydomonas* partage même 32 % d'identité avec la protéine d'*Arabidopsis* et 31 % avec celle du pommier *Malus domestica* qui a été utilisé pour compléter le mutant d'*Arabidopsis* (Reidel *et al.*, 2008). La prédiction subcellulaire par ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) et PredAlgo (<https://giavap-genomes.ibpc.fr/cgi-bin/predalgotdb.perl?page=main>) la localise bien au niveau du chloroplaste. De même, le serveur TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) lui prédit une inclusion membranaire avec 9 segments transmembranaires, soit le même nombre que la protéine d'*Arabidopsis*. Pourtant, et dans toutes les conditions testées, nous avons été incapables de détecter une quelconque accumulation de maltose dans le mutant CAT3. De plus, aucun défaut de croissance n'a été observé chez *Chlamydomonas* alors que la lignée d'*Arabidopsis* présente un phénotype de croissance et ne contient que 60 % de la quantité normale de chlorophylle et des lésions de type chlorose (**Figure 64**).

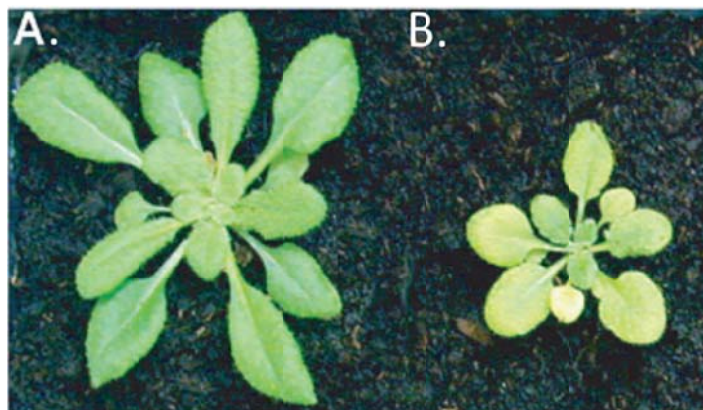


Figure 64 : Phénotype de la lignée *mex1* d'*Arabidopsis thaliana*. Les lignées Col-0 (A.) et *mex1* (B.) ont été cultivées en cycle 12/12 en chambre de culture à 20°C et avec une humidité relative de 75 %.

L'ensemble de ces observations nous a conduits à nous interroger sur la fonction de la protéine Mex chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Pour tester la possibilité qu'elle puisse exercer le même rôle que celle d'Arabidopsis, nous avons décidé de tenter la complémentation de la plante mutante avec le gène de *Chlamydomonas* comme cela avait été réalisé avec succès avec l'homologue du pommier (Reidel *et al.*, 2008).

IV. Complémentation fonctionnelle de la lignée *mex1* d'*Arabidopsis*

1. Obtention des lignées transformantes

Afin d'exprimer la protéine Mex de *Chlamydomonas* chez *Arabidopsis*, la séquence nucléotidique a été modifiée afin d'optimiser son expression dans la plante. En effet, l'expression du gène natif riche en GC serait très probablement atténuée au sein du génome riche en AT d'*Arabidopsis*. De plus, et afin d'assurer l'adressage de la protéine au chloroplaste, la séquence de l'algue a été délestée de ses 26 premiers acides aminés, représentant son peptide de transit, qui ont été remplacés par le peptide de transit de 43 acides aminés de l'isoamylase 1 d'*Arabidopsis thaliana*. Ce type de stratégie a déjà permis par le passé d'orienter avec succès la localisation de protéines de maïs dans le plaste d'*Arabidopsis* (Facon *et al.*, 2013). Cette fusion a été clonée puis insérée, grâce à la technologie Gateway, dans le vecteur de destination pMDC32. Une fois vérifié, ce vecteur a été transféré dans *Agrobacterium tumefaciens* qui a alors servi à la transformation de la lignée mutante *mex1* d'*Arabidopsis*.

Les graines récoltées ont ensuite été sélectionnées grâce à la résistance à l'hygromycine présente sur l'ADN de transfert qui a dû être intégré au génome de la plante lors de la transformation. Pour cela, ces graines, après stérilisation, ont été semées sur un milieu MS gélosé contenant l'antibiotique (20 µg/mL) et incubées en chambre de culture pendant environ 15 jours. Au bout de ces 15 jours, les plantes transformées se distinguent des autres de par la taille de leur hypocotyle (**Figure 65 A**). En effet, la germination s'effectue d'abord grâce aux réserves contenues dans la graine puis grâce au milieu de culture et à la photosynthèse. La croissance des plantes non transformées sensibles à l'antibiotique contenu dans le milieu va ainsi rapidement s'arrêter et elles seront donc nettement plus petites que les plantules transformées et résistantes. Dans le même temps, l'absence de résistance naturelle à l'hygromycine est bien sûr vérifiée chez la lignée sauvage Columbia (Col-0) et la lignée mutante *mex1* (**Figure 65 B et C**).

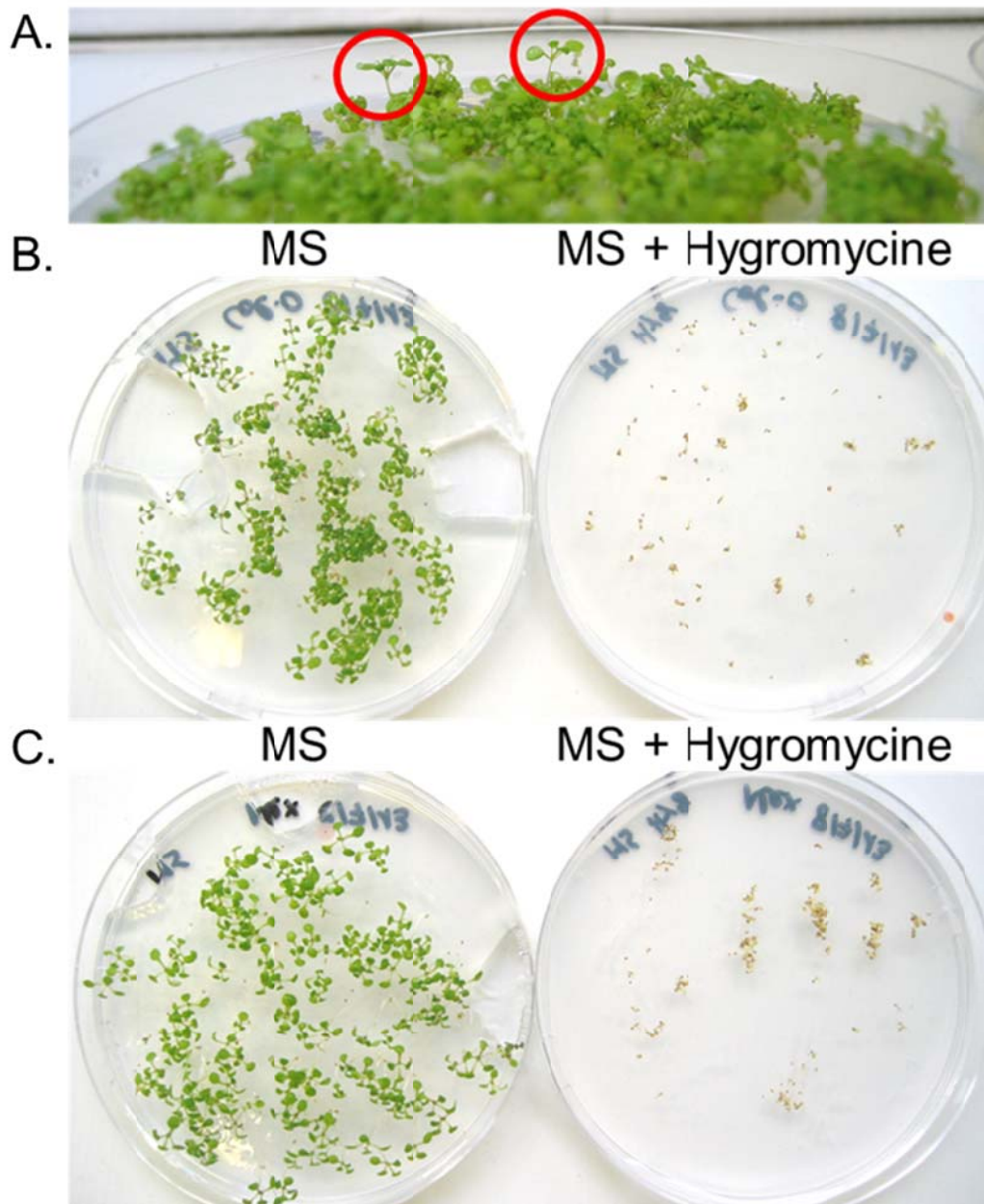


Figure 65 : Sélection à l'hygromycine des plantes transformantes. A. Phénotype des plantes résistantes. Les plantes résistantes à l'hygromycine, entourées en rouge, se distinguent facilement par leur taille plus grande. B-C. Vérification de la sensibilité des lignées témoin. En l'absence de l'antibiotique, les plantules se développent correctement tandis que sur milieu MS contenant de l'hygromycine, les lignées Col-0 (A) et *mex1* (C) meurent. Les photos ont été prises 12 jours après germination.

2. Génotypage des lignées

Cinq cent plantes issues de cette sélection ont été repiquées dans du terreau et, après quelques jours d'adaptation au milieu, transférées en serre. Une dizaine de lignées de transformants a alors été testée par amplification PCR afin de s'assurer de leur génotype. D'une part, l'interruption du locus *mex1* endogène d'*Arabidopsis* a

été vérifiée à l'aide des amorces Mex1-For2 et Revmexaf spécifique du locus sauvage mais aussi l'amorce LB1 spécifique de l'insertion de l'ADN-T chez la lignée *mex1*. Dans une réaction à trois amorces, l'hybridation des deux premières permet l'amplification d'une bande de 553 pb spécifique du gène sauvage tandis que l'hybridation des trois sur la séquence contenant le T-DNA permet la polymérisation de deux fragments de 657 et 385 pb spécifiques cette fois de la lignée déficiente pour la fonction Mex1. Cette première PCR permet de confirmer le contexte génomique *mex1* chez les lignées potentiellement transformantes (**Figure 66 A**).

D'autre part, la présence du transgène *MEX* de *Chlamydomonas* a été analysée par l'utilisation des amorces BamHIMexSynthF et KpnIMexSynthR. Celles-ci permettent l'amplification de l'intégralité de la séquence *MEX* soit un fragment de 1050 pb permettant de confirmer la présence du transgène dans les lignées transformantes (**Figure 66 B**).

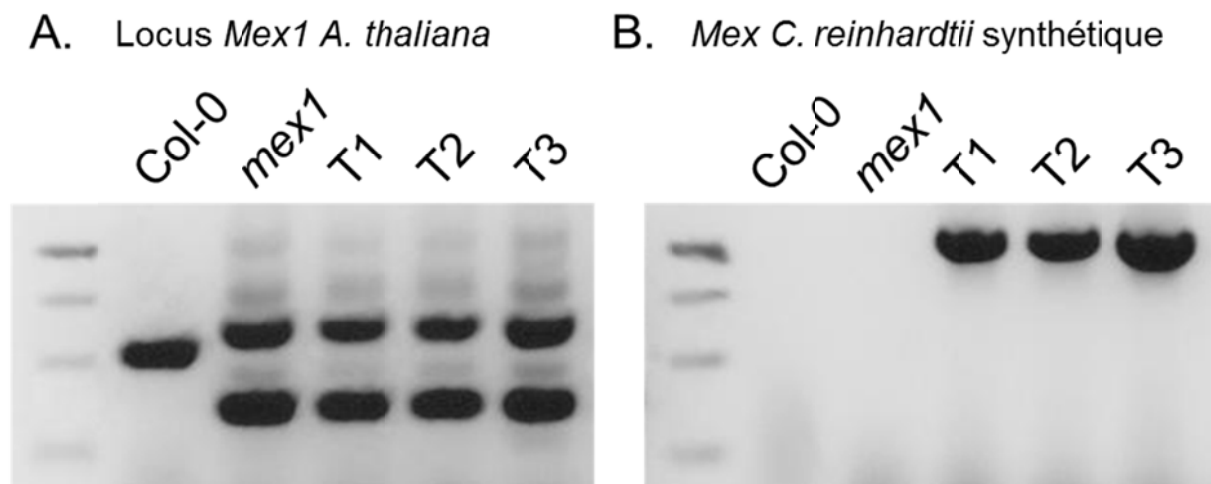


Figure 66 : Génotypage des lignées transformées. A. Analyse par PCR du locus *MEX1* d'Arabidopsis. Le locus sauvage se caractérise par l'amplification d'un fragment de 553 pb grâce à l'hybridation des amorces Mex1-For2 et Revmexaf tandis que l'amorce LB1, avec les deux précédentes, permet l'amplification de deux fragments de 657 et 385 pb à partir du locus contenant l'insertion de l'ADN-T. B. Analyse par PCR de la présence du gène *MEX* de *Chlamydomonas*. L'intégralité de la séquence *MEX* de *Chlamydomonas*, soit 1050 pb est amplifiée après hybridation des amorces BamHIMexSynthF et KpnIMexSynthR.

Les 10 lignées sélectionnées ont été autopollinisées, remises en culture puis autopollinisées une nouvelle fois pour obtenir la génération F2. Avant l'étude du phénotype de ces plantes, l'expression du transgène *MEX* a été vérifiée grâce à l'utilisation des amorces Mex350For et Mex850Rev. L'apparition d'un amplifiât de 522 pb nous a permis de confirmer l'expression de l'ARN messager du gène de *Chlamydomonas* chez la plante (**Figure 67 B**). Parallèlement, l'absence d'expression

du locus *MEX1* endogène a été confirmée à l'aide du même triplet d'amorces que celles utilisées pour le génotypage. L'absence d'amplification de fragments de 385 pb et 657 pb nous permettent également de nous assurer de l'absence de contamination par de l'ADN de notre préparation d'ARNs (**Figure 67 A**). Ces lignées validées ont été utilisées afin d'étudier la complémentation du phénotype *mex1* par la protéine Mex de *Chlamydomonas*.

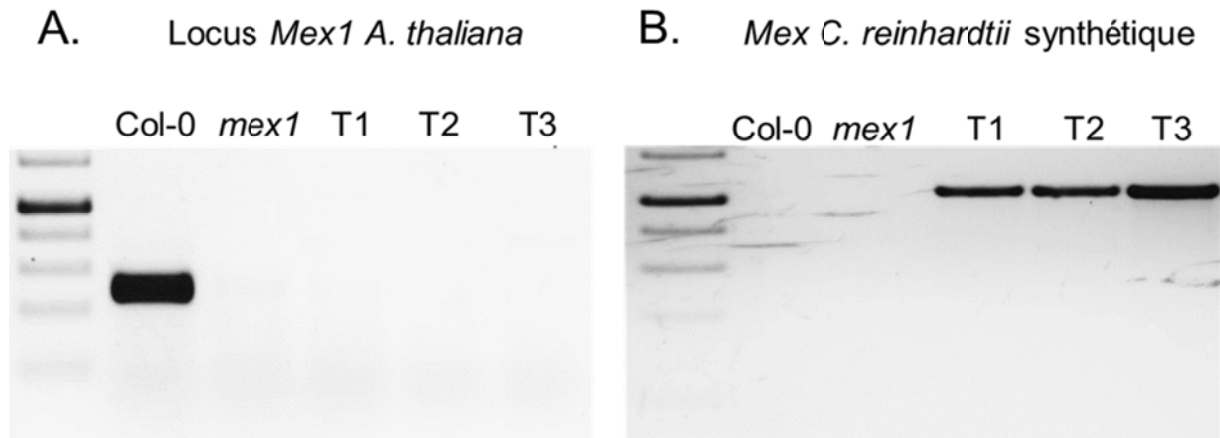


Figure 67 : Analyse par RT-PCR de l'expression de *MEX* chez les lignées transformées. A. Analyse de l'expression du locus *MEX1* d'*Arabidopsis thaliana*. La présence de l'ARNm du gène d'*Arabidopsis* est révélée par l'amplification d'un fragment de 247 pb du cDNA correspondant. B. Expression du transgène *MEX* de *Chlamydomonas reinhardtii*. L'expression du transgène est révélée par l'amplification d'un fragment de 522 pb du cDNA de l'algue dans les lignées transformées.

3. Analyse du phénotype

Cinq lignées transformantes indépendantes ont été cultivées pendant 5 semaines en chambre de culture dans un cycle de 12 h de jour et 12 h de nuit. Visuellement, chacune d'entre elles présente un phénotype de croissance sauvage alors que la lignée non transformée *mex1* possède une taille nettement plus petite. Aucune zone de chlorose ne peut être détectée dans les lignées transformantes au contraire de ce qui est observé chez le mutant (**Figure 68**). Les cinq lignées transformantes testées possèdent donc un phénotype de croissance similaire à la souche sauvage Col-0 et on ne peut pas détecter chez elles de signe de toxicité lié à l'accumulation de maltose dans le chloroplaste.



Figure 68 : Phénotype de croissance de la lignée sauvage Col-0, de la lignée mutante *mex1* et des lignées transformées. Les plantes ont été cultivées pendant 5 semaines en cycle 12 h jour : 12 h nuit. La barre d'échelle correspond à 1 cm.

Les niveaux d'amidon et de maltose ont ensuite été déterminés en fin de nuit chez ces cinq lignées, ainsi que chez les témoins sauvage Col-0 et mutant *mex1*. Ceux-ci n'ont pas permis de mettre en évidence une complémentation complète du phénotype (**Figure 69**). En effet, le meilleur taux de complémentation est observé dans la lignée T3 qui, en fin de nuit, contient 45 % de la quantité d'amidon retrouvée dans la lignée *mex1* soit toujours 3 fois plus que la lignée sauvage Col-0. De même pour le maltose, la quantité diminue jusqu'à 0,44 mg/g de poids frais contre 1,27 chez la lignée mutante mais cette valeur représente toujours 20 fois la quantité normale. Certaines lignées présentent même un phénotype très proche du mutant d'origine mais néanmoins possèdent un phénotype de croissance tout à fait normal.

Puisque la protéine de *Chlamydomonas* ne semble pas capable de restaurer un phénotype normal de dégradation de l'amidon chez la plante mutante *mex1*, nous avons décidé de nous assurer de sa localisation au niveau de l'enveloppe du chloroplaste.

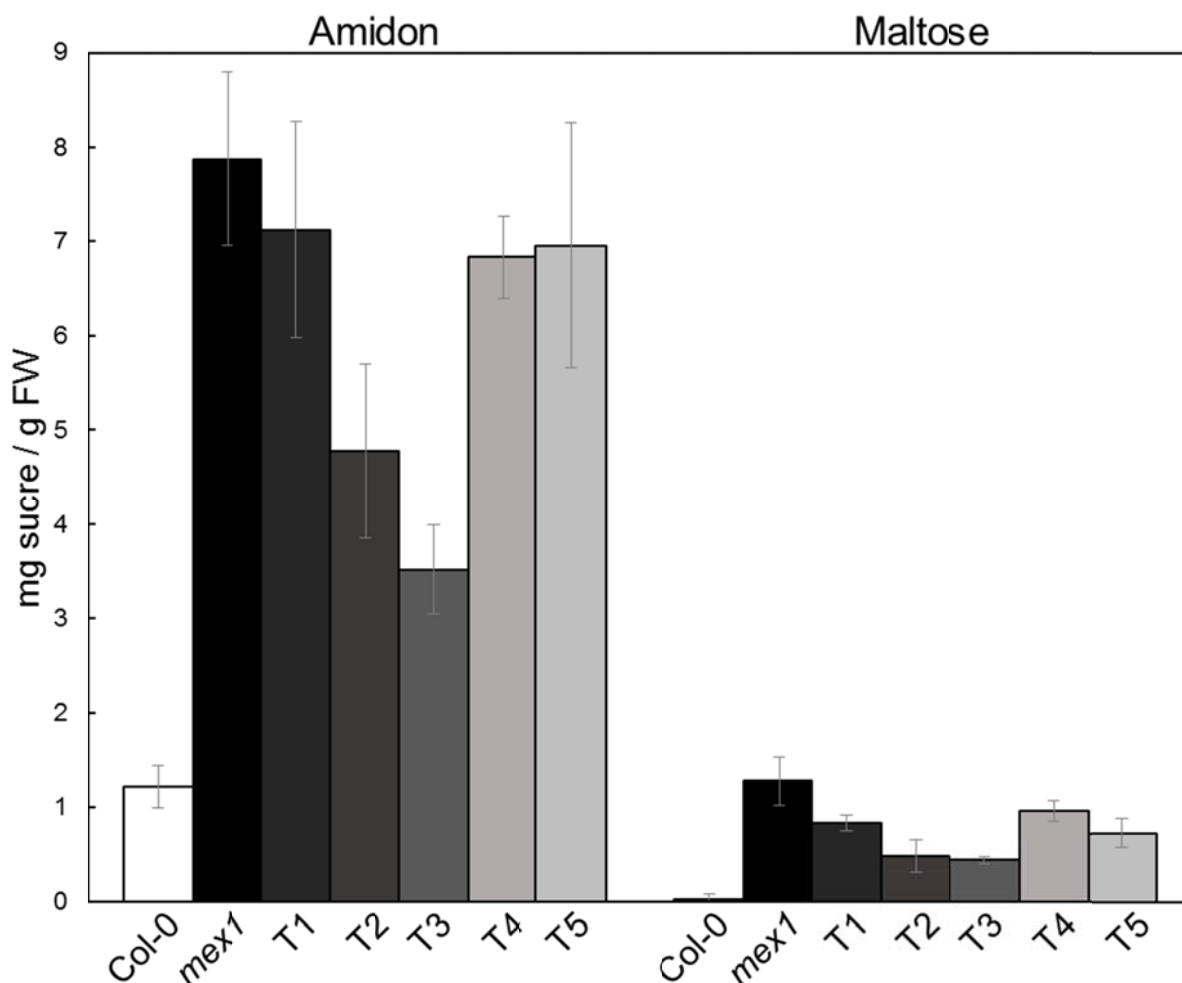


Figure 69 : Contenu en polysaccharides des lignées transformées en fin de nuit. Les plantes ont été cultivées 5 semaines en cycle 12 h jour : 12 h nuit. Les niveaux d'amidon et de maltose ont été dosés à partir de rosettes prélevées en fin de nuit et directement congelées dans l'azote liquide. Ces résultats proviennent de 3 expériences indépendantes.

4. Localisation cellulaire de la protéine Mex de *Chlamydomonas*

Pour identifier la localisation de la protéine Mex de *Chlamydomonas* utilisée pour la tentative de complémentation hétérologue, la construction composée de la fusion des séquences du peptide de transit d'Isa1 d'*Arabidopsis* et de la protéine Mex de l'algue a été transférée dans le vecteur pH7FWG2 dans le même cadre de lecture que la GFP grâce à la technologie Gateway. Le vecteur ainsi obtenu a alors été utilisé pour étudier la localisation de la chimère Mex-GFP dans des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* après transfection. Après 24 h d'incubation à l'obscurité, les protoplastes transformés ont été observés en microscopie confocale (**Figure 70**). La GFP libre, exprimée grâce au vecteur p2FGW7, est retrouvée diffuse dans le

protoplaste observé. La fluorescence émise par la fusion protéique Mex-GFP semble quant à elle se concentrer autour de structures que l'on identifie comme étant les chloroplastes grâce à l'autofluorescence de la chlorophylle. Malgré tout, cette fluorescence est partiellement occultée par le signal émis par de nombreuses structures prenant la forme d'agrégats (**Figure 70 F**).

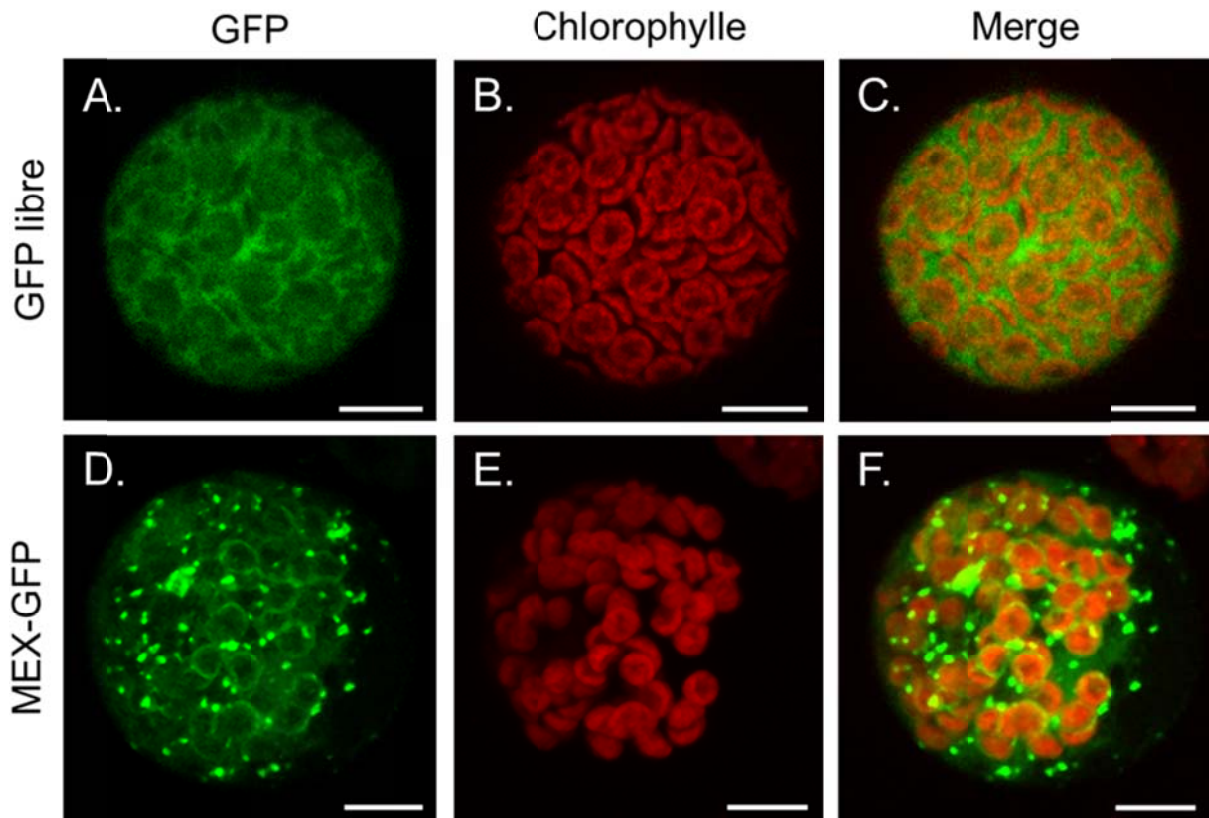


Figure 70 : Localisation de la fusion protéique Mex-GFP. A. Fluorescence émise par la GFP libre. B. Autofluorescence de la chlorophylle. C. Superposition des signaux émis par la GFP libre et la chlorophylle. D. Fluorescence émise par la fusion Mex-GFP. E. Autofluorescence de la chlorophylle. F. Superposition du signal de la fusion Mex-GFP avec celui de la chlorophylle. Les barres d'échelles correspondent à 10 μ m.

V. Complémentation hétérologue d'*E. coli malF*

L'absence d'accumulation de maltose au cours de la dégradation de l'amidon chez la souche CAT3 ainsi que l'obtention d'une complémentation très partielle de la lignée *mex1* d'*Arabidopsis* par la protéine de *Chlamydomonas* nous ont conduit à nous interroger d'autant plus sur la capacité de cette protéine à transporter le maltose. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tenté de compléter le mutant *malF* d'*Escherichia coli* qui est déficient pour l'import de maltose à l'aide de la protéine de *Chlamydomonas*. La souche TST6 a été utilisée, celle-ci est mutée par insertion de transposon Tn10 au niveau du locus *malF*. La protéine MalF fait partie du complexe de translocation MalFGK₂ nécessaire au transport du maltose à partir du milieu extérieur vers le cytoplasme (Boos et Schuman, 1998).

Deux vecteurs ont été construits, l'un pour l'expression de la protéine d'*Arabidopsis* et le second pour la protéine de *Chlamydomonas*. Pour cela, le cDNA d'*Arabidopsis*, dépourvu de la séquence correspondant au peptide de transit a été amplifié à l'aide des amorces BamHIMexaF et KpnIMexaR, cloné dans un vecteur TOPO 2.1 puis inséré dans le vecteur d'expression pQE30 par restriction *BamHI/KpnI* et ligation. La copie du cDNA *MEX* de *Chlamydomonas* optimisée pour l'expression dans *Arabidopsis thaliana* a été amplifiée grâce aux amorces BamHIMexSynthF et KpnIMexSynthR puis le produit de 1050 pb a été cloné et inséré dans le même vecteur pQE30, toujours par restriction *BamHI/KpnI* et ligation. Dans un premier temps, nous avons vérifié que le mutant *malF* non transformé n'était pas capable de croître en présence de maltose comme seule source de carbone. Puis la croissance des bactéries transformées avec l'une des deux constructions a été suivie par mesure de l'absorbance à 620 nm dans un milieu M9 contenant 0,5 mM d'IPTG et soit 0,5 % de maltose (p/v) soit 0.5 % de glucose. Les deux souches cultivées sur glucose présentent une croissance exponentielle et atteignent rapidement la phase stationnaire permettant d'éliminer une toxicité de l'IPTG utilisé pour l'induction de l'expression des protéines Mex dans la bactérie (**Figure 71**). Il en va de même en présence de maltose pour la souche exprimant le cDNA *MEX1* d'*Arabidopsis*. Cette observation confirme les résultats obtenus lors de la caractérisation de la fonction chez *Arabidopsis thaliana* (Niittylä *et al.*, 2004) puisque la protéine de la plante permet à la bactérie d'importer le maltose pour soutenir sa croissance.

En revanche, aucune croissance n'est observée pour les bactéries transformées avec le vecteur exprimant le cDNA de *Chlamydomonas*. La capacité de la protéine Mex de *Chlamydomonas* à transporter du maltose, si elle existe, n'est donc pas suffisamment efficace pour permettre une croissance normale des bactéries l'exprimant.

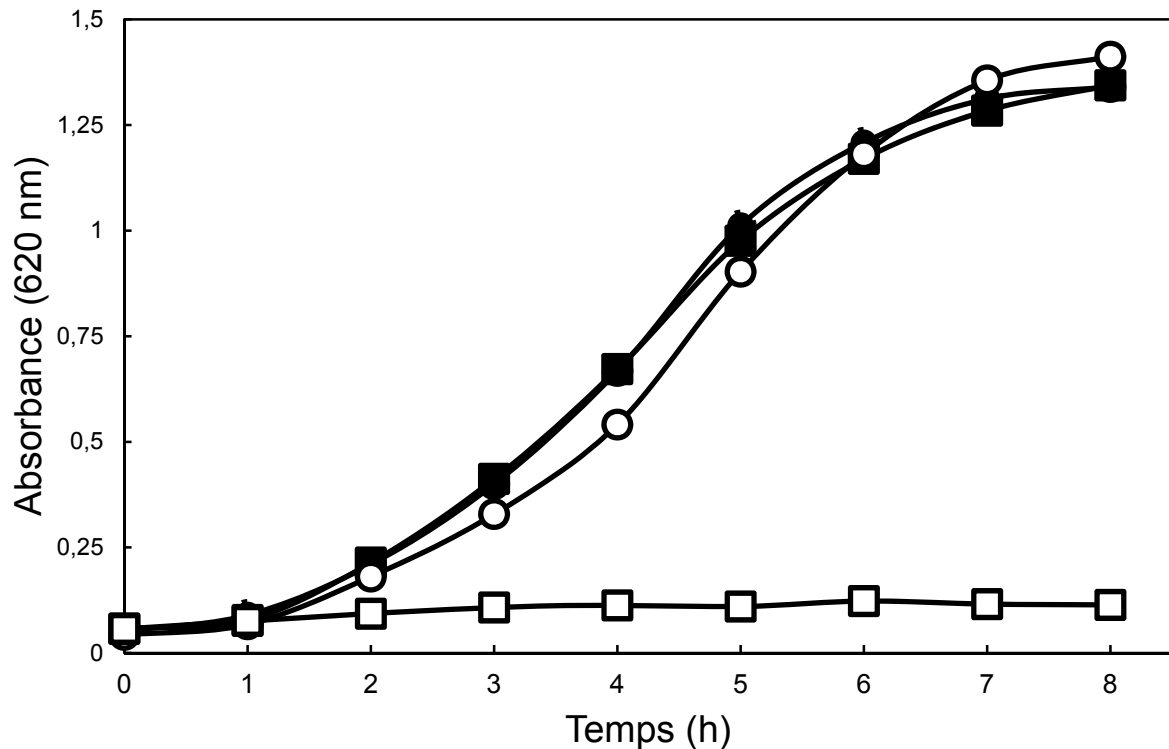


Figure 71 : Complémentation de la souche *malF* d'*Escherichia coli*. Les cellules ont été transformées avec un vecteur d'expression portant le gène *MEX1* d'*Arabidopsis* (ronds) ou la version optimisée de *Chlamydomonas* (carrés), toutes deux déléetées de leur peptide de transit. Les bactéries ont été cultivées en milieu M9 en présence de 0,5 % maltose (symboles vides) ou glucose (symboles pleins) comme source de carbone et de 0,5 mM d'IPTG. La croissance est suivie à 620 nm. Ces résultats proviennent de 5 cultures indépendantes.

VI. Discussion

La souche CAT3 fait partie des premiers mutants de dégradation isolés grâce au crible à l'iode en deux étapes. Les études cinétiques réalisées en milieu liquide nous ont permis de confirmer l'existence d'un défaut de dégradation de l'amidon dans cette souche. Ce mutant suraccumule l'amidon que ce soit en conditions de carence azotée ou en mixotrophie révélant un phénotype sex qui est retrouvé typiquement chez les mutants du catabolisme des plantes supérieures mais qui ne représente pas une règle absolue chez *Chlamydomonas*. A l'aide de la technique de PCR inverse, nous avons mis en évidence dans cette souche une insertion du plasmide de mutagenèse au niveau d'un locus codant une protéine orthologue de la protéine Mex1 d'*Arabidopsis thaliana*. Chez la plante, cette fonction est responsable de l'export du maltose, le produit majeur de la dégradation plastidiale de l'amidon, vers le cytosol. Les analyses de coségrégation et de complémentation fonctionnelle nous ont permis de prouver définitivement l'implication de Mex dans la dégradation de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

La lignée mutante *mex1* d'*Arabidopsis* se caractérise par une accumulation massive de maltose dans le chloroplaste tout au long du cycle jour/nuit, et particulièrement au cours de la nuit, période durant laquelle la dégradation est intense. Or, chez le mutant de *Chlamydomonas* CAT3, aucune accumulation de polysaccharide soluble et donc de maltose n'a pu être détectée, que ce soit en fin de période d'accumulation en carence azotée ou au cours de l'incubation à l'obscurité en milieu minimal lors des cinétiques de dégradation. Cette différence phénotypique nous a conduits à nous demander si les deux protéines exerçaient les mêmes fonctions chez la microalgue et dans la plante. Pour cela, la protéine de *Chlamydomonas* a été exprimée dans la lignée mutante d'*Arabidopsis* et la complémentation du phénotype a été étudiée. Les premières observations montrent une complémentation des phénotypes de croissance et de chlorose qui sont totalement absents chez les lignées transformées. En revanche, les quantités minimales de polysaccharides dosées en fin de nuit dans les 5 lignées transformantes sont toujours extrêmement élevées puisque la lignée présentant la meilleure complémentation contient encore 3 et 20 fois plus d'amidon et de maltose résiduels que la lignée sauvage. Certaines lignées ne peuvent même pas être

différenciées de la lignée mutante *mex1* en ce qui concerne ces taux de polysaccharides en fin de période de dégradation et ce malgré un phénotype de croissance tout à fait normal.

Cette différence pourrait s'expliquer si l'on attribue à la protéine Mex1 une double fonction. Puisque nous sommes capables de découpler dans nos transformants le phénotype de défaut de dégradation d'amidon et d'accumulation de maltose de celui de nanisme et de chlorose, nous pouvons suggérer que ces deux phénomènes ne sont pas directement liés. La complémentation complète de l'ensemble de ces phénotypes à l'aide du cDNA du pommier (Reidel *et al.*, 2008) suggère une double fonction de la protéine de la plante. La première intervient dans le transport du maltose vers le cytosol. Il semble difficile de déterminer à ce stade quel est le second rôle joué par la protéine Mex1 de la plante. Néanmoins, cette fonction semble être portée par la protéine de *Chlamydomonas* puisque l'expression de la protéine de l'algue permet aux transformants de perdre leurs phénotypes de défaut de croissance et de chlorose. La capacité des deux protéines Mex à transporter du maltose a été testée chez une souche d'*Escherichia coli malF* déficiente pour l'import de maltose et incapable de croître sur un milieu minimal ne contenant que ce sucre comme source de carbone. Alors que l'expression de la protéine Mex1 de la plante permet de restaurer la croissance sur maltose, confirmant ainsi l'expérience réalisée par Niittylä *et al.*, la présence du cDNA codant la protéine de *Chlamydomonas* en est incapable. La capacité de la protéine de *Chlamydomonas* à transporter du maltose n'a donc pas pu être démontrée. Toutefois cette expérience reste insuffisante pour affirmer que la protéine de *Chlamydomonas* n'est pas capable de transporter ce sucre. La protéine pourrait nécessiter une ou plusieurs modifications post-traductionnelles non disponibles chez la bactérie ou encore fonctionner en interaction avec un partenaire protéique absent dans le système hétérologue.

A ce stade, la fonction de la protéine dans la microalgue reste à élucider. Au vu des résultats observés lors de la tentative de complémentation de la lignée *mex1* d'*Arabidopsis*, il est possible que Mex soit capable de transporter le maltose puisque l'accumulation de maltose est tout de même atténuée dans certaines lignées transformantes bien que cette capacité semble nettement moins efficace que celle de la protéine d'*Arabidopsis*, comme le suggère la complémentation du mutant *malF*

d'*Escherichia coli*. Le retard de croissance observé chez la plante *mex1* a été attribué au taux de dégradation très réduit qui empêche la poursuite de sa croissance durant la nuit. Les chloroses des feuilles ont quant à elles été attribuées à la toxicité du maltose anormalement accumulé dans le plaste. L'ensemble de ces phénotypes est accentué chez la plante double mutante *mex1 dpe1* qui accumule non seulement du maltose mais également du maltotriose dans son plaste (Stettler *et al.*, 2009). Cette dernière observation argue en faveur d'un lien strict entre la disponibilité des produits de dégradation de l'amidon afin de soutenir une croissance correcte et une viabilité des chloroplastes. Cependant, nos lignées transformantes, qui se développent correctement en ne montrant pas de signes d'autophagie des plastes alors qu'ils contiennent des taux très élevés de maltose et un défaut de dégradation toujours présent démontrent que ce lien n'est pas si direct. D'ailleurs, une mutagenèse effectuée sur des plantes *mex1* a permis d'obtenir des plantes chez qui les chloroses ne sont pas visibles alors que les niveaux de maltose dans le plaste restent inchangés (Stettler *et al.*, 2009). Les protéines Mex pourraient donc également jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité du chloroplaste via un mécanisme encore difficile à appréhender à l'aide des données disponibles actuellement. Le retour à un phénotype de croissance normale dans nos lignées transformantes est lui difficilement explicable puisque certaines lignées transformées sont identiques à la lignée *mex1* en ce qui concerne l'accumulation de maltose et le défaut de dégradation mais celle-ci poussent néanmoins de manière tout à fait normale. La faible efficacité si elle existe de la protéine de l'algue dans le transport du maltose pourrait également laisser présager que son substrat soit différent du maltose ou que celui-ci nécessite d'être modifié avant sa prise en charge pour l'export vers le cytosol.

Des caractérisations plus poussées restent donc à effectuer concernant le rôle de Mex et le fonctionnement de la dégradation de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Une détermination des produits de dégradation pourraient être effectuées par prélèvement au cours de l'incubation à l'obscurité et analyse des sucres par RMN. Si les différents métabolites produits sont identifiés, la souche CAT3 pourra être soumise à la même analyse, ce qui pourrait permettre d'identifier la suraccumulation de l'un d'eux.

L'ensemble des travaux effectués sur la souche CAT3 fait l'objet d'une publication, actuellement en soumission à *New Phytologist*. (Annexe 4)

Conclusions et Perspectives

L'amidon est le polysaccharide de réserve le plus répandu sur Terre et connaît une multitude d'applications, alimentaires ou non. A ce titre, la compréhension des mécanismes régissant sa biosynthèse et sa dégradation présente un grand intérêt en vue d'optimiser les rendements ou d'adapter au mieux ses propriétés physico-chimiques aux applications qui en sont faites. L'étude des mécanismes de biosynthèse du polysaccharide remonte à au moins trente ans et a permis une identification claire des acteurs intervenant dans l'élaboration de la molécule chez les végétaux. Les études se concentrent aujourd'hui sur les mécanismes moléculaires mis en jeu pour chaque activité enzymatique, mais aussi sur les évènements régissant la synthèse *de novo* et ceux agissant sur le déterminisme de la taille des grains.

En ce qui concerne la dégradation, des travaux principalement menés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* par une approche de génétique inverse ont mis en évidence les activités impliquées dans le catabolisme de l'amidon transitoire. Cette démarche a ainsi permis d'établir un modèle indiquant les activités nécessaires pour passer d'une molécule semi-cristalline à des monomères de glucose. Ces avancées présentent toutefois plusieurs limites. Parmi celles-ci, il faut rappeler que le modèle établi est celui de la dégradation de l'amidon transitoire destiné à la production de saccharose afin d'alimenter la plante et soutenir la poursuite de sa croissance durant la nuit. Ce modèle n'illustre donc pas le catabolisme de l'amidon de réserve, voué lui à soutenir le développement d'une toute nouvelle plante. De plus, ce modèle fait essentiellement appel à une approche de génétique inverse, très pratique lorsqu'il s'agit de vérifier l'implication de certains loci impliqués dans un phénotype mais qui ne permet pas d'accéder aisément à des fonctions de régulation ou à des acteurs ne pouvant être soupçonnés comme intervenant dans le métabolisme concerné. Il faut noter que la découverte de la fonction de Mex1 chez *Arabidopsis thaliana* provient d'une approche de génétique formelle alors que ce modèle se prête moins bien à ce type d'approche. Dans ce contexte, nous avons entrepris une démarche complémentaire chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, modèle de génétique formelle et qui permet notamment l'étude des métabolismes de l'amidon transitoire et de réserve.

Un crible à l'iode en deux étapes a ainsi été mis en place pour l'isolement de souches potentiellement déficientes pour la dégradation de l'amidon. Celui-ci a été adapté d'un premier crible, en une seule étape, qui permettait d'isoler des souches déficientes pour la biosynthèse du polysaccharide. Ce dernier se base sur une incubation de 5 jours sur milieu gélosé carencé en azote qui permet d'induire une accumulation massive d'amidon. Pour l'isolement de mutants de dégradation, une étape supplémentaire d'incubation pendant 24 h à l'obscurité après levée de la carence permet d'induire une dégradation de l'amidon conduisant à la perte d'interaction à l'iode dans le contexte sauvage. L'application de ce crible a permis l'isolement de 62 souches, nommées CAT1 à CAT62, potentiellement déficientes pour la dégradation de l'amidon parmi un total de plus de 32000 souches transformantes résistantes à la paromomycine.

L'intégralité de ces 62 souches a ensuite fait l'objet d'une cinétique de dégradation en milieu liquide pour confirmer le phénotype entrevu sur milieu gélosé. Celle-ci a permis de mettre en évidence une classe de souches qui, en milieu liquide, dégradent le polysaccharide accumulé avec une efficacité similaire à celle de la souche sauvage isogénique 137C. Au contraire, 50 souches présentaient une altération significative du catabolisme. Chez *Chlamydomonas*, le défaut de dégradation et la suraccumulation du polysaccharide ne sont pas systématiquement associés puisque plusieurs souches accumulant plus de deux fois la quantité normale d'amidon le dégradent de manière tout à fait normale et d'autres, bien que sous productrices affichent une cinétique altérée de mobilisation du polysaccharide. De façon surprenante, l'analyse de la structure des amidons produits par nos mutants a permis de révéler des défauts chez certains d'entre eux. La souche CAT17 produit un amidon enrichi en longues chaînes comme le démontre la valeur élevée de λ_{\max} de son amylopectine. Le mutant CAT31 quant à lui contient un taux élevé d'amylose sans que la longueur d'onde au maximum d'absorption de son amylopectine ne soit changée. Ce phénotype est très original puisque l'enrichissement en amylose traduit habituellement un ralentissement de la synthèse de l'amylopectine. Ce dernier a pour conséquence une plus grande disponibilité en ADP-glucose pour la GBSS (l'enzyme responsable de la synthèse de l'amylose) et donc un enrichissement en amylose mais également en longues chaînes d'amylopectine entraînant une augmentation de sa λ_{\max} . Alors que l'on peut

suspecter une mutation pour une fonction intervenant aussi bien dans la synthèse que la dégradation pour CAT17, il est difficile à ce jour d'émettre une quelconque hypothèse quant à la nature de la mutation présente chez CAT31. L'identification du ou des sites d'insertion dans cette souche devrait nous permettre d'appréhender ce phénotype original.

Afin de caractériser les mutations présentes chez les souches CAT, ces dernières ont fait l'objet de deux volets de caractérisations. L'analyse réalisée sur zymogrammes s'est révélée peu fructueuse puisque nous n'avons été capables de détecter un défaut pour une enzyme du métabolisme de l'amidon que dans un seul de nos mutants. Chez CAT16, nous avons observé clairement la disparition d'une bande de couleur rose/rouge sur zymogramme amidon après révélation à l'iode. La semi-purification de cette activité à partir d'un extrait de la souche sauvage et sa caractérisation enzymatique nous a permis d'identifier la nature de l'enzyme. Cette enzyme de branchement absente chez CAT16 est codée par le locus Cre06.g289850 et correspond à une enzyme de branchement de type 1 (BE1). Il faut noter qu'aucun rôle clair n'avait été attribué à ce jour à cette classe d'enzymes aussi bien dans la synthèse que dans la dégradation du polysaccharide. Ce mutant laisse présager d'un rôle insoupçonné de cette enzyme dans la dégradation. Il reste néanmoins à confirmer cette première observation via des études de génétique afin de s'assurer de la responsabilité de cette mutation dans le défaut de dégradation. Il faut noter que l'amidon synthétisé par une lignée de maïs déficiente pour l'activité de branchement de type 1 est moins accessible aux activités de dégradation *in vitro*, probablement du fait de la modification de sa structure (Xia *et al.*, 2011). Le défaut de dégradation observé dans notre mutant CAT16 pourrait donc être le reflet de la production d'un amidon moins accessible à la machinerie de dégradation.

L'approche moléculaire s'est révélée quant à elle plus fructueuse. Les techniques de PCR inverse et de TAIL-PCR notamment nous ont permis de localiser l'insertion de l'ADN exogène chez 29 de nos mutants. Parmi les fonctions touchées, on déplore une quantité non négligeable de protéines impliquées dans la motilité de la microalgue qui néanmoins été attendues. En effet, la motilité représente une source conséquente d'utilisation de l'énergie chez *Chlamydomonas*. Les défauts de motilité entraînent une forte réduction des besoins en énergie de la cellule et par conséquent ce type de mutants possède habituellement un phénotype de

suraccumulation d'amidon (Hamilton *et al.*, 1992). Ainsi aussi bien une surproduction d'amidon qu'un défaut de dégradation peut être observé dans les mutants CAT22 (Cre07.g338300 : protéine du flagelle), et CAT40 (Cre11.g468450 : centrine). Ce phénotype est également retrouvé pour des souches chez qui l'insertion est localisée à proximité de loci impliqués dans la motilité (CAT28 : Cre12.g468700, FAP271 ; et CAT29 : Cre12.g522550, kinésine). Il faut cependant noter que le mutant CAT25 pour lequel une insertion a été localisée au locus Cre08.g358528 codant la protéine FAP157 ne présente ni suraccumulation, ni défaut de dégradation apparent. Néanmoins, cette défectuosité pour une protéine associée au flagelle n'a pas rendu cette souche paralysée comme le démontre les tests de nage en gélose molle et explique cette différence.

Une seconde catégorie de fonctions identifiées regroupe des protéines dont le lien avec la dégradation de l'amidon ne semble pas évident. Pour ces mutants tels que CAT27 (Cre12.g486900, tRNA dihydrouridine synthase) CAT30 (Cre10.g459450, sérine protéase) ou CAT35 (Cre08.g368950, dihydroquinate synthase), il semble probable que l'insertion identifiée ne soit pas responsable du défaut de dégradation d'amidon observé. Même si nos conditions de mutagenèse ont été optimisées afin d'avoir en moyenne 1,5 insertions par souche, nous ne pouvons pas exclure le fait d'insertions multiples dans certaines de nos souches. Si la mutation identifiée chez certains de ces mutants était prouvée comme étant liée au défaut de dégradation (via les analyses de coségrégation et de complémentation fonctionnelle), il semble probable que l'impact sur le catabolisme du polysaccharide refléterait plus probablement une perturbation générale du métabolisme de la cellule qu'un effet spécifique sur le métabolisme de l'amidon.

Les fonctions les plus intéressantes se classent en deux dernières catégories. La première se compose de protéines déjà identifiées ou qui de par leur nature peuvent être suspectées comme intervenant dans le métabolisme de l'amidon. C'est notamment le cas de CAT3 (Cre12.g486600 codant le transporteur de maltose Mex), CAT4 (Cre06.g307150 codant la β -amylase Bam1) et CAT59 (Cre02.g095126 codant la transglucosidase Dpe2) mais aussi de CAT16 (Cre06.g289850 codant l'enzyme de branchement BE1) et CAT33 (Cre02.g091750 codant une protéine qui possède un domaine de fixation à l'amidon CBM20). La présence de ce type de mutants dans les souches que nous avons sélectionnées valide notre démarche

expérimentale et permet d'espérer la mise à jour de nouvelles fonctions impliquées dans le processus. Le crible à l'iode en deux étapes nous a en effet permis d'isoler des souches déficientes pour des fonctions directement impliquées dans la dégradation de l'amidon. Il semble donc raisonnable d'imaginer que certains des autres mutants portent des déficiences pour des fonctions clés de la dégradation et à ce jour encore non suspectées. La caractérisation des autres mutants pourrait par exemple nous permettre d'identifier l'intervention de nouvelles fonctions de régulation de la dégradation de l'amidon. La suite des travaux effectués sur la collection de mutants devra donc se concentrer sur les fonctions inédites qui seront identifiées. Puisque la ou les mutations présentes dans la moitié des mutants CAT n'ont pas pu être mises à jour par les techniques de TAIL-PCR et de PCR inverse, nous envisageons le recours au séquençage génome entier pour les souches qui présentent les défauts de dégradation les plus sévères et qui donc portent potentiellement une mutation pour une fonction essentielle au catabolisme. Des caractérisations plus poussées pourront également être menées sur les souches CAT14 (Cre06.g266150, protéine kinase), CAT15 (Cre16.g689550, tyrosine kinase), CAT26 (Cre02.g104450, sérine/thréonine kinase) afin d'éprouver la présence d'une régulation de type phospho/déphospho du catabolisme de l'amidon puisque ce système est démontré comme jouant un rôle essentiel dans le métabolisme du glycogène eucaryote.

Par ailleurs, les caractérisations effectuées chez la souche CAT3 laissent entrevoir que le modèle *Arabidopsis thaliana* ne constitue pas forcément un modèle définitif de la dégradation de l'amidon étant donné que des différences phénotypiques importantes ont été observées entre notre mutant *mex* et la lignée *mex1* de la plante. Ces différences pourraient uniquement reposer sur l'évolution de la fonction lors du passage de l'état unicellulaire à celui d'organisme multicellulaire possédant des organes spécialisés. La protéine Mex ayant acquis sa capacité de transport du maltose lorsque celui-ci devenait essentiel dans un système pour lequel les produits de dégradation de l'amidon doivent impérativement être exportés du plaste afin de soutenir la synthèse de saccharose dans le cytosol et donc la fourniture d'énergie aux organes non photosynthétiques. Dans tous les cas, nos travaux révèlent la nécessité d'une caractérisation plus poussée de cette famille de protéines afin d'appréhender dans son intégralité la ou les fonction(s) jouée(s)

non seulement dans le catabolisme de l'amidon mais également dans le maintien de l'intégrité du chloroplaste.

Finalement, dans le cadre de l'Institut Français des Matériaux Agro-Sourcés (IFMAS), nous avons utilisé les 62 mutants CAT afin de tester la possibilité d'obtenir des souches de *Chlamydomonas* possédant une répartition de la taille des grains d'amidon altérée. L'ensemble de nos mutants potentiellement déficients pour la dégradation de l'amidon ont fait l'objet d'une analyse du profil de distribution de tailles de leurs grains d'amidon. Celle-ci a montré que l'amidon sauvage accumulé en 5 jours de carence azotée a un diamètre radial moyen compris entre 0,8 et 1 μm chez *Chlamydomonas*. Le crible de nos mutants de dégradation a mis en évidence 10 souches pour lesquelles des amidons à distribution de tailles altérée sont produits. Six d'entre eux ont une taille moyenne plus petite et trois sont significativement plus gros. Enfin, la souche CAT33 synthétise un amidon composé de deux sous-populations, l'une plus petite que la normale et la seconde deux fois plus grosse. La distribution bimodale inédite chez la microalgue et observée dans ce mutant mime la situation que l'on observe dans un contexte sauvage chez certaines céréales. On peut également remarquer que le phénotype de suraccumulation d'amidon ne mène pas forcément à une augmentation de la taille des grains produits comme cela est illustré par les mutants CAT18, CAT19 et CAT27 qui accumulent plus de 3 fois la quantité d'amidon normale mais sous la forme de grains de taille sauvage. Ces premiers résultats sont encourageants et pourraient permettre l'identification de fonctions impliquées dans le déterminisme de la taille des grains d'amidon chez la microalgue voire sa transposition aux espèces d'intérêt agronomique.

Les travaux effectués au cours de cette thèse auront permis de valider la démarche entreprise chez *Chlamydomonas reinhardtii*, aussi bien dans le cadre de la dégradation de l'amidon que dans le contrôle de la granulométrie et confirment la qualité de ce modèle pour l'étude des grands processus cellulaires via une démarche de génétique formelle.

Bibliographie

- Alonso M.D., Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J. (1995). A New Look at the Biogenesis of Glycogen. *FASEB J.* 9 (12): 1126-1137.
- Alonso-Casajús N., Dauvillée D., Viale A.M., Muñoz F.J., Baroja-Fernández E., Morán-Zorzano M.T., Eydallin G., Ball S., Pozueta-Romero J. (2006). Glycogen Phosphorylase, the Product of the GlgP Gene, Catalyzes Glycogen Breakdown by Removing Glucose Units from the Nonreducing Ends in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188 (14): 5266-5272.
- Ardila F.J., Tandecarz J.S. (1992). Potato Tuber UDP-Glucose:Protein Transglucosylase Catalyzes its Own Glucosylation. *Plant Physiol.* 99 (4): 1342-1347.
- 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. *Plant Cell Physiol.* 46 (6): 858-869.
- Awazuhara M., Nakagawa A., Yamaguchi J., Fujiwara T., Hayashi H., Hatae K., Chino M., Shimada A. (2000). Distribution and Characterization of Enzymes Causing Starch Degradation in Rice (*Oryza sativa* cv. koshihikari). *J. Agric. Food Chem.* 48 (2): 245-252.
- Baena-González E., Rolland F., Thevelein J.M., Sheen J. (2007). A Central Integrator of Transcription Networks in Plant Stress and Energy Signalling. *Nature.* 448 (7156): 938-942.
- Bak-Jensen K.S., Laugesen S., Ostergaard O., Finnie C., Roepstorff P., Svensson B. (2007). Spatio-Temporal Profiling and Degradation of Alpha-Amylase Isozymes During Barley Seed Germination. *FEBS J.* 274 (10): 2552-2565.
- 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 (1): 17-26.
- Ball S., Guan H.P., 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 (3): 349-352.
- Ball S.G., Morell M.K. (2003). From Bacterial Glycogen to Starch: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 207-233.
- Ball S., Colleoni C., Cenci U., Raj J.N., 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 (6): 1775-1801.
- Banks W., Greenwood C.T., Khan K.M. (1971). The Interaction of Linear, Amylose Oligomers with Iodine. *Carbohydrate Res.* 1v (17): 25-33.
- Baunsgaard L., Lütken H., Mikkelsen R., Glaring M.A., Pham T.T., Blennow A. (2005). A Novel Isoform of Glucan, Water Dikinase Phosphorylates Pre-Phosphorylated Alpha-Glucans and is Involved in Starch Degradation in Arabidopsis. *Plant J.* 41 (4): 595-605.

- Bayer R.G., Stael S., Rocha A.G., Mair A., Vothknecht U.C., Teige M. (2012). Chloroplast-Localized Protein Kinases: A Step Forward Towards a Complete Inventory. *J. Exp. Bot.* 63 (4): 1713-1723.
- Berthold P., Schmitt R., Mages W. (2002). An Engineered *Streptomyces hygroscopicus aph7* Gene Mediates Dominant Resistance against Hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist.* 153: 401-412.
- Bhattacharyya M.K., Smith A.M., Ellis T.H., Hedley C., Martin C. (1990). The Wrinkled-seed Character of Pea Described by Mendel is Caused by a Transposon-like Insertion in a Gene Encoding Starch-branching Enzyme. *Cell.* 60 (1): 115-122.
- Blaby I.K., Blaby-Haas C.E., Tourasse N., Hom E.F., Lopez D., Aksoy M., Grossman A., Umen J., Dutcher S., Porter M., King S., Witman G.B., Stanke M., Harris E.H., Goodstein D., Grimwood J., Schmutz J., Vallon O., Merchant S.S., Prochnik S. (2014). The Chlamydomonas Genome Project: a Decade on. *Trends Plant Sci.* 19: 672-680.
- Blauth S.L., Yao Y., Klucinec J.D., Shannon J.C., Thompson D.B., Guilitinan M.J. (2001). Identification of Mutator Insertional Mutants of Starch-branching Enzyme 2a in Corn. *Plant Physiol.* 125 (3): 1396-1405.
- Blennow A., Nielsen T.H., Baunsgaard L., Mikkelsen R., Engelsen S.B. (2002). Starch Phosphorylation: A New Front Line in Starch Research. *Trends Plant Sci.* 7 (10): 445-450.
- Boisson M., Gomord V., Audran C., Berger N., Dubreucq B., Granier F., Lerouge P., Faye L., Caboche M., Lepiniec L. (2001). Arabidopsis Glucosidase I Mutants Reveal a Critical Role of N-glycan Trimming in Seed Development. *EMBO J.* 20v (5): 1010-1019.
- Boos W., Shuman H. (1998). Maltose/Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Transport, Metabolism, and Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62v (1): 204-229.
- Boren M., Larsson H., Falk A., Jansson C. (2004). The Barley Starch Granule Proteome - Internalized Granule Polypeptides of the Mature Endosperm. *Plant Sci.* 166: 617-626.
- Borovsky D., Smith E.E., Whelan W.J. (1975). The Mechanism of Branching Enzyme Action and its Influence on the Structure of Amylopectin. *Biochem. Soc. Trans.* 3 (1): 48-49.
- 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 (3): 949-957.
- Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. (1998) Starch Granules: Structure and Biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 23 (2): 85-112.
- Burton R.A., Zhang X.Q., Hrmova M., Fincher G.B. (1999). A Single Limit Dextrinase Gene is Expressed both in the Developing Endosperm and in Germinated Grains of Barley. *Plant Physiol.* 119 (3): 859-871.
- Burton R.A., Jenner H., Carrangis L., Fahy B., Fincher G.B., Hylton C., Laurie D.A., Parker M., Waite D., van Wegen S., Verhoeven T., Denyer K. (2002). Starch Granule Initiation and Growth are Altered in Barley Mutants that Lack Isoamylase Activity. *Plant J.* 31 (1): 97-112.

- Bustos R., Fahy B., Hylton C.M., Seale R., Nebane N.M., Edwards A., Martin C., Smith A.M. (2004). Starch Granule Initiation is Controlled by a Heteromultimeric Isoamylase in Potato Tubers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101 (7): 2215-2220.
- Bykova N.V., Møller I.M. (2001). Involvement of Matrix NADP Turnover in the Oxidation of NAD-Linked Substrates by Pea Leaf Mitochondria. *Physiol. Plant*. 111 (4): 448-456.
- Caspar T., Huber S.C., Somerville C. (1985). Alterations in Growth, Photosynthesis, and Respiration in a Starchless Mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Deficient in Chloroplast Phosphoglucosyltransferase Activity. *Plant Physiol*. 79 (1): 11-17.
- Caspar T., Lin T.P., Kakefuda G., Benbow L., Preiss J., Somerville C. (1991). Mutants of *Arabidopsis* with Altered Regulation of Starch Degradation. *Plant Physiol*. 95 (4): 1181-1188.
- Cavalier-Smith, T. (2006). Cell Evolution and Earth History: Stasis and Revolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361 (1470): 969-1006.
- Chandler J.W., Apel K., Melzer S. (2001). A Novel Putative Beta-Amylase Gene and Atbeta-Amy from *Arabidopsis thaliana* are Circadian Regulated. *Plant Sci*. 161: 1019-1024.
- 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 Sci*. 168: 501-509.
- Chen J.G., Jones A.M. (2004). AtRGS1 Function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol*. 389: 338-350.
- Cheng C., Mu J., Farkas I., Huang D., Goebel M.G., Roach P.J. (1995). Requirement of the Self-glucosylating Initiator Proteins Glg1p and Glg2p for Glycogen Accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 15 (12): 6632-6640.
- Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Messerli G., Chen J., Zeeman S.C., Smith S.M., Smith A.M. (2004). A Cytosolic Glucosyltransferase is Required for Conversion of Starch to Sucrose in *Arabidopsis* Leaves at Night. *Plant J*. 37: 853-863.
- Cho M.H., Lim H., Shin D.H., Jeon J.S., Bhoo S.H., 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 Phytol*. 190 (1): 101-112.
- Chochois V., Dauvillée D., Beyly A., Tolleter D., Cuiné S., Timpano H., Ball S., Cournac L., Peltier G. (2009). Hydrogen Production in *Chlamydomonas*: Photosystem II-dependent and -independent Pathways Differ in their Requirement for Starch Metabolism. *Plant Physiol*. 151 (2) : 631-640.
- Colleoni C., Dauvillée D., Mouille G., Buléon A., Gallant D., Bouchet B., Morell M., Samuel M., Delrue B., D'Hulst C., Bliard C., Nuzillard J.M., Ball S. (1999). Genetic and Biochemical Evidence For The Involvement Of Alpha-1,4 Glucanotransferases In Amylopectin Synthesis. *Plant Physiol*. 120 (4): 993-1004.
- Colleoni C., Dauvillée D., Mouille G., Morell M., Samuel M., Slomiany M.C., Linard L., Wattebled F., D'Hulst C., Ball S. (1999). Biochemical Characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* Alpha-1,4 Glucanotransferase Supports a Direct Function in Amylopectin Biosynthesis. *Plant Physiol*. 120 (4): 1005-1014.

- Comparot-Moss S., Kötting O., Stettler M., Edner C., Graf A., Weise S.E., Streb S., Lue W.L., MacLean D., Mahlow S., Ritte G., Steup M., Chen J., Zeeman S.C., Smith A.M. (2010). A Putative Phosphatase, LSF1, is Required for Normal Starch Turnover in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiol.* 152 (2): 685-697.
- Coppin A., Varré J.S., Lienard L., Dauvillée D., Guérardel Y., Soyer-Gobillard M.O., Buléon 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 (2): 257-267.
- Craig J., Lloyd J.R., Tomlinson K., Barber L., Edwards A., Wang T.L., Martin C., Hedley C.L., Smith A.M. (1998). Mutations in the Gene Encoding Starch Synthase II Profoundly Alter Amylopectin Structure in Pea Embryos. *Plant Cell.* 10 (3): 413-426.
- Critchley J.H., Zeeman S.C., Takaha T., Smith A.M., Smith S.M. (2001). A Critical Role for Disproportionating Enzyme in Starch Breakdown is Revealed by a Knock-Out Mutation in Arabidopsis. *Plant J.* 26 (1): 89-100.
- Crumpton-Taylor M., Pike M., Lu K.J., Hylton C.M., Feil R., Eicke S., Lunn J.E., Zeeman S.C., 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 (4): 1064-1075.
- Daussant J., Zbaszyniak B., Sadowski J., Wiatroszak I. (1981). Cereal β -Amylase: Immunochemical Study on Two Enzyme-Deficient Inbred Lines of Rye. *Planta.* 151 (2): 176-179.
- Dauvillée D., Colleoni C., Mouille G., Buléon A., Gallant D.J., Bouchet B., Morell M.K., D'Hulst C., Myers A.M., Ball S.G. (2001). Two Loci Control Phytoglycogen Production in the Monocellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 125 (4): 1710-1722.
- Dauvillée D., Colleoni C., Mouille G., Morell M.K., D'Hulst C., Wattebled F., Liénard L., Delvallé D., Ral J.P., Myers A.M., Ball S.G. (2001). Biochemical Characterization of Wild-Type and Mutant Isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* Supports a Function of the Multimeric Enzyme Organization in Amylopectin Maturation. *Plant Physiol.* 125 (4): 1723-1731.
- Dauvillée D., Chochois V., Steup M., Haebel S., Eckermann N., Ritte G., Ral J.P., Colleoni C., Hicks G., Wattebled F., Deschamps P., D'Hulst C., Liénard L., Cournac L., Putaux J.L., Dupeyre D., Ball S.G. (2006). Plastidial Phosphorylase is Required for Normal Starch Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 48 (2): 274-285.
- Delatte T., Umhang M., Trevisan M., Eicke S., Thorneycroft D., Smith S.M., Zeeman S.C. (2006). Evidence for Distinct Mechanisms of Starch Granule Breakdown in Plants. *J. Biol. Chem.* 281 (17): 12050-12059.
- Delgado I.J., Wang Z., De Rocher A., Keegstra K., Raikhel N.V. (1998). Cloning and Characterization of AtRGP1. A Reversibly Autoglycosylated Arabidopsis Protein Implicated in Cell Wall Biosynthesis. *Plant Physiol.* 116 (4): 1339-1350.
- Delrue B., Fontaine T., Routier F., Decq A., Wieruszeski J.M., Van Den Koornhuyse N., Maddelein M.L., 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 (11): 3612-3620.

- Delvallé D., Dumez S., Wattebled F., Roldán I., Planchot V., Berbezy P., Colonna P., Vyas D., Chatterjee M., Ball S., Mérida A., D'Hulst C. (2005). Soluble Starch Synthase I: a Major Determinant for the Synthesis of Amylopectin in *Arabidopsis thaliana* Leaves. *Plant J.* 43 (3): 398-412.
- Deschamps P., Guillebeault D., Devassine J., Dauvillée D., Haebel S., Steup M., Buléon A., Putaux J.L., Slomianny M.C., Colleoni C., Devin A., Plancke C., Tomavo S., Derelle E., Moreau H., Ball S. (2008). The Heterotrophic Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* Defines a Model Genetic System to Investigate Cytoplasmic Starch Synthesis. *Eukaryot. Cell.* 7 (5): 872-880.
- Dickinson D.B., Preiss J. (1969). Presence Of ADP-Glucose Pyrophosphorylase In Shrunken-2 And Brittle-2 Mutants Of Maize Endosperm. *Plant Physiol.* 44 (7): 1058-1062.
- Dinges J.R., Colleoni C., James M.G., Myers A.M. (2003). Mutational Analysis Of The Pullulanase-Type Debranching Enzyme Of Maize Indicates Multiple Functions In Starch Metabolism. *Plant Cell.* 15 (3): 666-680.
- Doyle E.A., Lane A.M., Sides J.M., Mudgett M.B., Monroe J.D. (2007). An Alpha-Amylase (At4g25000) In *Arabidopsis* Leaves Is Secreted And Induced By Biotic And Abiotic Stress. *Plant Cell Environ.* 30 (4): 388-398.
- Dumez S., Wattebled F., Dauvillée D., Delvalle D., Planchot V., Ball S.G., D'Hulst C. (2006). Mutants of *Arabidopsis* Lacking Starch Branching Enzyme II Substitute Plastidial Starch Synthesis by Cytoplasmic Maltose Accumulation. *Plant Cell.* 18 (10): 2694-2709.
- Dutcher S.K., Power J., Galloway R.E., Porter M.E. (1991). Reappraisal of the Genetic Map of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Hered.* 82: 295-301.
- Edner C., Li J., Albrecht T., Mahlow S., Hejazi M., Hussain H., Kaplan F., Guy C., Smith S.M., Steup M., Ritte G. (2007). Glucan, Water Dikinase Activity Stimulates Breakdown of Starch Granules by Plastidial Beta-Amylases. *Plant Physiol.* 145 (1): 17-28.
- 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 (5): 978-984.
- Facon M., Lin Q., Azzaz A.M., Hennen-Bierwagen T.A., Myers A.M., Putaux J.L., Roussel X., D'Hulst C., Wattebled F. (2013). Distinct Functional Properties of Isoamylase-Type Starch Debranching Enzymes in Monocot and Dicot Leaves. *Plant Physiol.* 163 (3): 1363-1375.
- Fettke J., Eckermann N., Poeste S., Pauly M., Steup M. (2004). The Glycan Substrate of the Cytosolic (Pho 2) Phosphorylase Isozyme from *Pisum sativum* L.: Identification, Linkage Analysis and Subcellular Localization. *Plant J.* 39 (6): 933-946.
- Fettke J., Eckermann N., Tiessen A., Geigenberger P., Steup M. (2005). Identification, Subcellular Localization and Biochemical Characterization of Water-soluble Heteroglycans (SHG) in Leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: Distinct SHG Reside in the Cytosol and in the Apoplast. *Plant J.* 43 (4): 568-585.
- Fettke J., Poeste S., Eckermann N., Tiessen A., Pauly M., Geigenberger P., Steup M. (2005). Analysis of Cytosolic Heteroglycans from Leaves of Transgenic Potato

- (*Solanum tuberosum* L.) Plants that Under- or Overexpress the Pho 2 Phosphorylase Isozyme. *Plant Cell Physiol.* 46 (12): 1987-2004.
- Fettke J., Albrecht T., Hejazi M., Mahlow S., Nakamura Y., Steup M. (2010). Glucose-1-Phosphate is Efficiently Taken up by Potato (*Solanum tuberosum*) Tuber Parenchyma Cells and Converted to Reserve Starch Granules. *New Phytol.* 185 (3): 663-675.
- Flügge U.I. (1998). Metabolite Transporters in Plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (3): 201-206.
- Frandsen T.P., Lok F., Mirgorodskaya E., Roepstorff P., Svensson B. (2000). Purification, Enzymatic Characterization, and Nucleotide Sequence of a High-Isoelectric-Point Alpha-Glucosidase from Barley Malt. *Plant Physiol.* 123 (1): 275-286.
- Fu Y., Ballicora M.A., Leykam J.F., Preiss J. (1998). Mechanism of Reductive Activation of Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* 273 (39): 25045-25052.
- Fujita N., Yoshida M., Asakura N., Ohdan T., Miyao A., Hirochika H., Nakamura Y. (2006). Function and Characterization of Starch Synthase I Using Mutants in Rice. *Plant Physiol.* 140 (3): 1070-1084.
- Fulton D.C., Stettler M., Mettler T., Vaughan C.K., Li J., Francisco P., Gil M., Reinhold H., Eicke S., Messerli G., Dorken G., Halliday K., Smith A.M., Smith S.M., Zeeman S.C. (2008). Beta-AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active Beta-Amylases in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell.* 20 (4): 1040-1058.
- Gaffron H., Rubin J. (1942). Fermentative and Photochemical Production of Hydrogen in Algae. *J. Gen. Phys.* 26: 219-240.
- Gentry M.S., Downen R.H. 3rd, Worby C.A., Mattoo S., Ecker J.R., Dixon J.E. (2007). The Phosphatase Laforin Crosses Evolutionary Boundaries and Links Carbohydrate Metabolism to Neuronal Disease. *J. Cell. Biol.* 178 (3): 477-488.
- Ghosh H.P., Preiss J. (1966). Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase. A Regulatory Enzyme in the Biosynthesis of Starch in Spinach Leaf Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 241 (19): 4491-4504.
- Gillmor C.S., Poindexter P., Lorieau J., Palcic M.M., Somerville C. (2002). Alpha-glucosidase I is Required for Cellulose Biosynthesis and Morphogenesis in Arabidopsis. *J Cell Biol.* 156 (6): 1003-1013.
- Glaring M.A., Zygadlo A., Thorneycroft D., Schulz A., Smith S.M., Blennow A., Baunsgaard L. (2007). An Extra-Plastidial Alpha-Glucan, Water Dikinase from Arabidopsis Phosphorylates Amylopectin in vitro and is not Necessary for Transient Starch Degradation. *J. Exp. Bot.* 58 (14): 3949-3960.
- Glaring M.A., Skryhan K., Kötting O., Zeeman S.C., Blennow A. (2012). Comprehensive Survey of Redox Sensitive Starch Metabolising Enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 58: 89-97.
- Goodstein D.M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R.D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam N., Rokhsar D.S. (2012). Phytozome: a Comparative Platform for Green Plant Genomics. *Nucleic Acids Res.* 40: 1178-1186.

- Graf A., Schlereth A., Stitt M., Smith A.M. (2010). Circadian Control of Carbohydrate Availability For Growth in Arabidopsis Plants at Night. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107 (20): 9458-9463.
- Grigston J.C., Osuna D., Scheible W.R., Liu C., Stitt M., Jones A.M. (2008). D-Glucose Sensing by a Plasma Membrane Regulator of G Signaling Protein, AtRGS1. *FEBS Lett.* 582 (25-26): 3577-3584.
- Guan H.P., Preiss J. (1993). Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 102 (4): 1269-1273.
- Guan H., Li P., Imparl-Radosevich J., Preiss J., Keeling P. (1997). Comparing the Properties of *Escherichia coli* Branching Enzyme and Maize Branching Enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 342 (1): 92-98.
- Guglielminetti L., Yamaguchi J., Perata P., Alpi A. (1995). Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Plant Physiol.* 109 (3): 1069-1076.
- Halford N.G., Hey S., Jhurreea D., Laurie S., McKibbin R.S., Paul M., Zhang Y. (2003). Metabolic Signalling and Carbon Partitioning: Role of Snf1-Related (Snrk1) Protein Kinase. *J. Exp. Bot.* 54 (382): 467-475.
- Hamilton B.S., Nakamura K., Roncari D.A (1992). Accumulation of Starch in *Chlamydomonas reinhardtii* Flagellar Mutants. *Biochem. Cell. Biol.* 70 (3-4): 255-258.
- Hardie D.G. (1975). Control of Carbohydrate Formation by Gibberellic Acid in Barley Endosperm. *Phytochemistry.* 14: 1719-1722.
- Hardie D.G., Carling D., Carlson M. (1998). The AMP-Activated/SNF1 Protein Kinase Subfamily: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67: 821-855.
- Harmer S.L., Hogenesch J.B., Straume M., Chang H.S., Han B., Zhu T., Wang X., Kreps J.A., Kay S.A. (2000). Orchestrated Transcription of Key Pathways in Arabidopsis by the Circadian Clock. *Science.* 290: 2110-2113.
- Harris E.H. (1989). The Chlamydomonas Sourcebook. Academic Press, San Diego.
- Harris E.H. (2001). Chlamydomonas as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 363-406.
- Harrison C.J., Mould R.M., Leech M.J., Johnson S.A., Turner L., Schreck S.L., Baird K.M., Jack P.L., Rawsthorne S., Hedley C.L., Wang T.L. (2000). The *rug3* Locus of Pea Encodes Plastidial Phosphoglucomutase. *Plant Physiol.* 122: 1187-1192.
- Haydon M.J., Hearn T.J., Bell L.J., Hannah M.A., Webb A.A. (2013). Metabolic Regulation of Circadian Clocks. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 24 (5): 414-421.
- Heazlewood J.L., Durek P., Hummel J., Selbig J., Weckwerth W., Walther D., Schulze W.X. (2008). PhosPhAt: a Database of Phosphorylation Sites in *Arabidopsis thaliana* and a Plant-Specific Phosphorylation Site Predictor. *Nucleic Acids Res.* 36: D1015-1021.
- 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. *Plant J.* 55 (2): 323-334.

- Hejazi M., Fettke J., Kötting O., Zeeman S.C., 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 Physiol.* 152 (2): 711-722.
- Herold A., Leegood R.C., McNeil P.H., Robinson S.P. (1981). Accumulation of Maltose During Photosynthesis in Protoplasts Isolated from Spinach Leaves Treated with Mannose. *Plant Physiol.* 67 (1): 85-88.
- Hirose T., Aoki N., Harada Y., Okamura M., Hashida Y., Ohsugi R., Akio M., Hirochika H., Terao T. (2013). Disruption of a Rice Gene for α -Glucan Water Dikinase, Osgwd1, Leads to Hyperaccumulation of Starch in Leaves but Exhibits Limited Effects on Growth. *Front. Plant Sci.* 4: 147.
- Ho S.H., Ye X., Hasunuma T., Chang J.S., Kondo A. (2014). Perspectives on Engineering Strategies for Improving Biofuel Production from Microalgae - A Critical Review. *Biotech. Adv.* 8 (32): 1448-1459.
- Hussain H., Mant A., Seale R., Zeeman S., Hinchliffe E., Edwards A., Hylton C., Bornemann S., Smith A.M., Martin C., Bustos R. (2003). Three Isoforms of Isoamylase Contribute Different Catalytic Properties for the Debranching of Potato Glucans. *Plant Cell.* 15 (1): 133-149.
- Hwang S.K., Nishi A., Satoh H., Okita T.W. (2010). Rice Endosperm-Specific Plastidial Alpha-Glucan Phosphorylase is Important for Synthesis of Short-Chain Malto-Oligosaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.* 495 (1): 82-92.
- Hylton C., Smith A.M. (1992). The *rb* Mutation of Peas Causes Structural and Regulatory Changes in ADP Glucose Pyrophosphorylase from Developing Embryos. *Plant Physiol.* 99 (4): 1626-1634.
- James M.G., Robertson D.S., Myers A.M. (1995). Characterization of the Maize Gene *sugary1*, a Determinant of Starch Composition in Kernels. *Plant Cell.* 7 (4): 417-429.
- Jane J.L., Kasemsuwan T., Leas S., Zobel H., Robyt J.F. (1994). Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch.* 4 (46): 121-129.
- Jie W., Dashi Y., XinHong G., Xuanming L. (2009). Arabidopsis AMY1 Expressions and Early Flowering Mutant Phenotype. *BMB Rep.* 42 (2): 101-105.
- Jinkerson R.E., Jonikas M.C. (2015). Molecular Techniques to Interrogate and Edit the *Chlamydomonas* Nuclear Genome. *Plant J.* 82 (3): 393-412.
- Kakefuda G., Duke S.H., Hostak M.S. (1986). Chloroplast and Extrachloroplastic Starch-degrading Enzymes in *Pisum sativum* L. *Planta.* 168 (2): 175-182.
- Kaplan F., Guy C.L. (2005). RNA Interference of Arabidopsis Beta-Amylase8 Prevents Maltose Accumulation Upon Cold Shock and Increases Sensitivity of PSII Photochemical Efficiency to Freezing Stress. *Plant J.* 44 (5): 730-743.
- Kerk D., Conley T.R., Rodriguez F.A., Tran H.T., Nimick M., Muench D.G., Moorhead G.B. (2006). A Chloroplast-Localized Dual-Specificity Protein Phosphatase in Arabidopsis Contains a Phylogenetically Dispersed and Ancient Carbohydrate-Binding Domain, Which Binds the Polysaccharide Starch. *Plant J.* 46 (3): 400-413.
- Kindle K.L. (1990). High-Frequency Nuclear Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (3): 1228-1232.

- Kolbe A., Tiessen A., Schluempmann H., Paul M., Ulrich S., Geigenberger P. (2005). Trehalose 6-phosphate Regulates Starch Synthesis via Posttranslational Redox Activation of ADP-glucose Pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (31): 11118-11123.
- Komsic-Buchmann K., Wöstehoff L., Becker B. (2014). The Contractile Vacuole as a Key Regulator of Cellular Water Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot. Cell.* 13 (11): 1421-1430.
- 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 Physiol.* 137 (1): 242-252.
- Kötting O., Santelia D., Edner C., Eicke S., Marthaler T., Gentry M.S., Comparot-Moss S., Chen J., Smith A.M., Steup M., Ritte G., Zeeman S.C. (2009). STARCH-EXCESS4 is a Laforin-Like Phosphoglucan Phosphatase Required for Starch Degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 21 (1): 334-346.
- Kötting O., Kossmann J., Zeeman S.C., Lloyd J.R. (2010). Regulation of Starch Metabolism: the Age of Enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (3): 321-329.
- Kreis M., Williamson M., Buxton B., Pywell J., Hejgaard J., Svendsen I. (1987). Primary Structure and Differential Expression of Beta-Amylase in Normal and Mutant Barleys. *Eur. J. Biochem.* 169 (3): 517-525.
- Kristensen M., Lok F., Planchot V., Svendsen I., Leah R., Svensson B. (1999). Isolation and Characterization of the Gene Encoding the Starch Debranching Enzyme Limit Dextrinase from Germinating Barley. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431 (2): 538-546.
- Kruse O., Hankamer B. (2010). Microalgal Hydrogen Production. *Curr. Opin. Biotech.* 21 (3): 238-243.
- Kubo A., Colleoni C., Dinges J.R., Lin Q., Lappe R.R., Rivenbark J.G., Meyer A.J., Ball S.G., James M.G., Hennen-Bierwagen T.A., Myers A.M. (2010). Functions of Heteromeric and Homomeric Isoamylase-type Starch-debranching Enzymes in Developing Maize Endosperm. *Plant Physiol.* 153 (3): 956-969.
- Laby R.J., Kim D., Gibson S.I. (2001). The *ram1* Mutant of Arabidopsis Exhibits Severely Decreased Beta-Amylase Activity. *Plant Physiol.* 127 (4): 1798-1807.
- Langeveld S.M., Vennik M., Kottenhagen M., Van Wijk R., Buijk A., Kijne J.W., De Pater S. (2002). Glucosylation Activity and Complex Formation of Two Classes of Reversibly Glycosylated Polypeptides. *Plant Physiol.* 129 (1): 278-289.
- Lao N.T., Schoneveld O., Mould R.M., Hibberd J.M., Gray J.C., Kavanagh T.A. (1999). An Arabidopsis Gene Encoding a Chloroplast-Targeted Beta-Amylase. *Plant J.* 20 (5): 519-527.
- Lepistö A., Pakula E., Toivola J., Krieger-Liszkay A., Vignols F., Rintamäki E. (2013). Deletion of Chloroplast NADPH-Dependent Thioredoxin Reductase Results in Inability to Regulate Starch Synthesis and Causes Stunted Growth Under Short-day Photoperiods. *J. Exp. Bot.* 64 (12): 3843-3854.
- Li J., Francisco P., Zhou W., Edner C., Steup M., Ritte G., Bond C.S., Smith S.M. (2009). Catalytically-Inactive Beta-Amylase BAM4 Required for Starch Breakdown in Arabidopsis Leaves is a Starch-Binding-Protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 489 (1-2): 92-98.

- Li Q.F., Zhang G.Y., Dong Z.W., Yu H.X., Gu M.H., Sun S.S., Liu Q.Q. (2009). Characterization of Expression of the *Ospul* Gene Encoding A Pullulanase-Type Debranching Enzyme During Seed Development and Germination in Rice. *Plant Physiol. Biochem.* 47 (5): 351-358.
- Li W.Y., Wang X., Li R., Li W.Q., Chen K.M. (2014). Genome-wide Analysis of the NADK Gene Family in Plants. *PLoS One.* 9 (6): e101051.
- Libessart N., Maddelein M.L., Koornhuysen N., Decq A., Delrue B., Mouille G., D'Hulst C., Ball S. (1995). Storage, Photosynthesis, and Growth: The Conditional Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell.* 7 (8): 1117-1127.
- Lin T.P., Caspar T., Somerville C.R., 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 Physiol.* 88 (4): 1175-1181.
- Lin T.P., Spilatro S.R., Preiss J. (1988). Subcellular Localization and Characterization of Amylases in *Arabidopsis* Leaf. *Plant Physiol.* 86 (1): 251-259.
- Lloyd J.R., Blennow A., Burhenne K., Kossmann J. (2004). Repression of a Novel Isoform of Disproportionating Enzyme (*Stdpe2*) in Potato Leads to Inhibition of Starch Degradation in Leaves but not Tubers Stored at Low Temperature. *Plant Physiol.* 134 (4): 1347-1354.
- Lohmeier-Vogel E.M., Kerk D., Nimick M., Wrobel S., Vickerman L., Muench D.G., Moorhead G.B. (2008). *Arabidopsis* At5g39790 Encodes a Chloroplast-Localized, Carbohydrate-Binding, Coiled-Coil Domain-Containing Putative Scaffold Protein. *BMC Plant Biol.* 8: 120.
- Lohrig K., Muller B., Davydova J., Leister D., Wolters D.A. (2009). Phosphorylation Site Mapping of Soluble Proteins: Bioinformatical Filtering Reveals Potential Plastidic Phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 229: 1123-1134.
- 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. *Nat. Biotechnol.* 16 (5): 473-477.
- Lu Y., Sharkey, T.D. (2004). The Role of Amylomaltase in Maltose Metabolism in the Cytosol of Photosynthetic Cells. *Planta.* 218 (3): 466-473.
- Lu Y., Gehan J.P., Sharkey T.D. (2005). Daylength and Circadian Effects on Starch Degradation and Maltose Metabolism. *Plant Physiol.* 138 (4): 2280-2291.
- Lu Y., Steichen J.M., Yao J., Sharkey T.D. (2006). The Role of Cytosolic Alpha-Glucan Phosphorylase in Maltose Metabolism and the Comparison of Amylomaltase in *Arabidopsis* and *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* 142 (3): 878-889.
- Lunn J.E., Feil R., Hendricks J.H.M., Gibon Y., Morcuende R., Osuna D., Scheible W-R., Carillo P., Hajirezaei M.R., Stitt M. (2006). Sugar-induced Increases in Trehalose 6-phosphate are Correlated with Redox Activation of ADPGlucose Pyrophosphorylase and Higher Rates of Starch Synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J.* 397 (1): 139-148.
- Lütken H., Lloyd J.R., Glaring M.A., Baunsgaard L., Laursen K.H., Haldrup A., Kossmann J., Blennow A. (2010). Repression of both Isoforms of Disproportionating Enzyme Leads to Higher Malto-Oligosaccharide Content and Reduced Growth in Potato. *Planta.* 232 (5): 1127-1139.

- Ma J., Jiang Q.T., Wei L., Yang Q., Zhang X.W., Peng Y.Y., Chen G.Y., Wei Y.M., Liu C., Zheng Y.L. (2014). Conserved Structure and Varied Expression Reveal Key Roles of Phosphoglucan Phosphatase Gene Starch Excess 4 in Barley. *Planta*. 240 (6): 1179-1190.
- Malinova I., Mahlow S., Alseekh S., Orawetz T., Fernie A.R., Baumann O., Steup M., Fettke J. (2014). Double Knockout Mutants of Arabidopsis Grown under Normal Conditions Reveal that the Plastidial Phosphorylase Isozyme Participates in Transitory Starch Metabolism. *Plant Physiol*. 164 (2): 907-921.
- Manners D.J. (1991). Recent Developments in our Understanding of Glycogen Structure. *Carbohydrate Polymers*. 1 (16): 37-82.
- Martins M.C., Hejazi M., Fettke J., Steup M., Feil R., Krause U., Arrivault S., Vosloh D., Figueroa C.M., Ivakov A., Yadav U.P., Piques M., Metzner D., Stitt M., Lunn J.E. (2013). Feedback Inhibition of Starch Degradation in Arabidopsis Leaves Mediated by Trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol*. 163 (3): 1142-1163.
- Maul J.E., Lilly J.W., Cui L., De Pamphilis C.W., Miller W., Harris E.H., Stern D.B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats. *Plant Cell*. 14 (11): 2659-2679.
- McMaugh S.J., Thistleton J.L., Anschaw E., Luo J., Konik-Rose C., Wang H., Huang M., Larroque O., Regina A., Jobling S.A., Morell M.K., Li Z. (2014). Suppression of Starch Synthase I Expression Affects the Granule Morphology and Granule Size and Fine Structure of Starch in Wheat Endosperm. *J. Exp. Bot*. 65 (8): 2189-2201.
- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., Witman G.B., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin L.K., Marechal-Drouard L., Marshall W.F., Qu L.H., Nelson D.R., Sanderfoot A.A., Spalding M.H., Kapitonov V.V., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas S.M., Grimwood J., Schmutz J., Cardol P., Cerutti H., Chanfreau G., Chen C.L., Cognat V., Croft M.T., Dent R., Dutcher S., Fernandez E., Fukuzawa H., Gonzalez-Ballester D., Gonzalez-Halphen D., Hallmann A., Hanikenne M., Hippler M., Inwood W., Jabbari K., Kalanon M., Kuras R., Lefebvre P.A., Lemaire S.D., Lobanov A.V., Lohr M., Manuell A., Meier I., Mets L., Mittag M., Mittelmeier T., Moroney J.V., Moseley J., Napoli C., Nedelcu A.M., Niyogi K., Novoselov S.V., Paulsen I.T., Pazour G., Purton S., Ral J.P., Riano-Pachon D.M., Riekhof W., Rymarquis L., Schroda M., Stern D., Umen J., Willows R., Wilson N., Zimmer S.L., Allmer J., Balk J., Bisova K., Chen C.J., Elias M., Gendler K., Hauser C., Lamb M.R., Ledford H., Long J.C., Minagawa J., Page M.D., Pan J., Pootakham W., Roje S., Rose A., Stahlberg E., Terauchi A.M., Yang P., Ball S., Bowler C., Dieckmann C.L., Gladyshev V.N., Green P., Jorgensen R., Mayfield S., Mueller-Roeber B., Rajamani S., Sayre R.T., Brokstein P., Dubchak I., Goodstein D., Hornick L., Huang Y.W., Jhaveri J., Luo Y., Martinez D., Ngau W.C., Otilar B., Poliakov A., Porter A., Szajkowski L., Werner G., Zhou K., Grigoriev I.V., Rokhsar D.S., Grossman A.R. (2007). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*. 318 (5848): 245-250.
- Michalska J., Zauber H., Buchanan B.B., Cejudo F.J., Geigenberger P. (2009). NTRC Links Built-in Thioredoxin to Light and Sucrose in Regulating Starch Synthesis in Chloroplasts and Amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106 (24): 9908-9913.
- Michelet L., Zaffagnini M., Morisse S., Sparla F., Pérez-Pérez M.E., Francia F., Danon A., Marchand C.H., Fermani S., Trost P., Lemaire S.D. (2013). Redox

- Regulation of the Calvin–Benson Cycle: Something Old, Something New. *Front. Plant Sci.* 4: 470.
- Mikkelsen R., Mutenda K.E., 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 (5): 1785-1790.
- Mikkelsen R., Suszkiewicz K., Blennow A. (2006). A Novel Type Carbohydrate-Binding Module Identified in Alpha-Glucan, Water Dikinases is Specific for Regulated Plastidial Starch Metabolism. *Biochemistry.* 45 (14): 4674-4682.
- Monroe J.D., Storm A.R., Badley E.M., Lehman M.D., Platt S.M., Saunders L.K., Schmitz J.M., Torres C.E. (2014). β -Amylase1 and β -Amylase3 are Plastidic Starch Hydrolases in Arabidopsis that Seem to be Adapted for Different Thermal, Ph, and Stress Conditions. *Plant Physiol.* 166 (4): 1748-1763.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Cheng W.H., Liu Y.X., Hwang I., Jones T., Sheen J. (2003). Role of the Arabidopsis Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science.* 300 (5617): 332-336.
- Morrison W.R. (1988). Lipids in Cereal Starches: A Review. *J. Cereal Sci.* 1(8): 1-15.
- Mouille G., Maddelein M.L., Libessart N., Talaga P., Decq A., Delrue B., Ball S. (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell.* 8 (8): 1353-1366.
- Nakai H., Ito T., Hayashi M., Kamiya K., Yamamoto T., Matsubara K., Kim Y.M., Jintanart W., Okuyama M., Mori H., Chiba S., Sano Y., Kimura A. (2007). Multiple Forms of Alpha-Glucosidase in Rice Seeds (*Oryza sativa* L., var Nipponbare). *Biochimie.* 89 (1): 49-62.
- Nakamura Y., Imamura M. (1985). Regulation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* 78 (3): 601-605.
- Nakata P.A., Greene T.W., Anderson J.M., Smith-White B.J., Okita T.W., Preiss J. (1991). Comparison of the Primary Sequences of Two Potato Tuber ADP-Glucose Pyrophosphorylase Subunits. *Plant Mol. Biol.* 17 (5): 1089-1093.
- Neuburger M., Douce R. (1983). Slow Passive Diffusion of NAD⁺ Between Intact Isolated Plant Mitochondria and Suspending Medium. *Biochem. J.* 216 (2): 443-450.
- Niewiadomski P., Knappe S., Geimer S., Fischer K., Schulz B., Unte U.S., Rosso M.G., Ache P., Flügge U.I., Schneider A. (2005). The Arabidopsis Plastidic Glucose 6-Phosphate/Phosphate Translocator GPT1 is Essential for Pollen Maturation and Embryo Sac Development. *Plant Cell.* 17 (3): 760-775.
- Niittylä T., Messerli G., Trevisan M., Chen J., Smith A.M., Zeeman S.C. (2004). A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science.* 303 (5654): 87-89.
- Niittylä T., Comparot-Moss S., Lue W.L., Messerli G., Trevisan M., Seymour M.D., Gatehouse J.A., Villadsen D., Smith S.M., Chen J., Zeeman S.C., Smith A.M. (2006). Similar Protein Phosphatases Control Starch Metabolism in Plants and Glycogen Metabolism in Mammals. *J. Biol. Chem.* 281 (17): 11815-11818.

- Nishi A., Nakamura Y., Tanaka N., Satoh H. (2001). Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-extender Mutation in Rice Endosperm. *Plant Physiol.* 127 (2): 459-472
- O'Sullivan A.C., Perez S. (1999). The Relationship Between Internal Chain Length of Amylopectin and Crystallinity in Starch. *Biopolymers.* 50 (4): 381-390.
- Oikawa A., Joshi H.J., Rennie E.A., Ebert B., Manisseri C., Heazlewood J.L., Vibe Scheller H. (2010). An Integrative Approach to the Identification of Arabidopsis and Rice Genes Involved in Xylan and Secondary Wall Development. *PLoS One.* 5 (11) : e15481.
- Okita T.W., Nakata P.A., Anderson J.M., Sowokinos J., Morell M., Preiss J. (1990). The Subunit Structure of Potato Tuber ADPglucose Pyrophosphorylase. *Plant Physiol.* 93 (2): 785-790.
- Pasha I., Anjum F.M., Morris C.F. (2010). Grain Hardness: a Major Determinant of Wheat Quality. *Food Sci. Technol. Int.* 16 (6): 511-522.
- Patron N.J., Keeling P.J. (2005). Common Evolutionary Origin of Starch Biosynthetic Enzymes in Green and Red Algae. *J. Phycol.* 41: 1131-1141.
- Preiss J., Sivak M. (1996). Starch Synthesis in Sinks and Sources. Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships. Marcel Dekker, New York, 139-168.
- Radakovits R., Jinkerson R.E., Darzins A., Posewitz M.C. (2010). Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryot Cell.* 9 (4): 486-501.
- Rathore R.S., Garg N., Garg S., Kumar A. (2009). Starch Phosphorylase: Role in Starch Metabolism and Biotechnological Applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29 (3): 214-224.
- Raven J.A., Beardall J., Flynn K.J., Maberly S.C. (2009). Phagotrophy in the Origins of Photosynthesis in Eukaryotes and as a Complementary Mode of Nutrition in Phototrophs: Relation to Darwin's Insectivorous Plants. *J. Exp. Bot.* 60 (14): 3975-3987.
- Recondo E., Leloir L.F. (1961). Adenosine Diphosphate Glucose and Starch Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6 (2): 85-88.
- Reinhold H., Soyk S., Simková K., Hostettler C., Marafino J., Mainiero S., Vaughan C.K., Monroe J.D., Zeeman S.C. (2011). β -Amylase-Like Proteins Function as Transcription Factors in Arabidopsis, Controlling Shoot Growth and Development. *Plant Cell.* 23 (4): 1391-1403.
- Rejzek M., Stevenson C.E., Southard A.M., Stanley D., Denyer K., Smith A.M., Naldrett M.J., Lawson D.M., Field R.A. (2011). Chemical Genetics and Cereal Starch Metabolism: Structural Basis of the Non-Covalent and Covalent Inhibition of Barley β -Amylase. *Mol. Biosyst.* 7 (3): 718-730.
- Remacle C., Cardol P., Coosemans N., Gaisne M., Bonnefoy N. (2006). High-efficiency Biolistic Transformation of Chlamydomonas Mitochondria Can be Used to Insert Mutations in Complex I Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 4771-4776.
- Riesmeier J.W., Flügge U.I., Schulz B., Heineke D., Heldt H.W., Willmitzer L., Frommer W.B. (1993). Antisense Repression of the Chloroplast Triose Phosphate

- Translocator Affects Carbon Partitioning in Transgenic Potato Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90 (13): 6160-6164.
- Ritte G., Lorberth R., Steup M. (2000). Reversible Binding of the Starch-Related R1 Protein to the Surface of Transitory Starch Granules. *Plant J.* 21 (4): 387-391.
- Ritte G., Lloyd J.R., Eckermann N., Rottmann A., Kossmann J., Steup M. (2002). The Starch-related R1 Protein is an α -glucan, Water Dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99 (10): 7166-7171.
- Ritte G., Sharf A., Eckermann N., Haebel S., Steup M. (2004). Phosphorylation of Transitory Starch is Increased During Degradation. *Plant Physiol.* 135: 2068-2077.
- 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 Lett.* 580 (20): 4872-4876.
- Roach P.J., Depaoli-Roach A.A., Hurley T.D., Tagliabracci V.S. (2012). Glycogen and its Metabolism: Some New Developments and Old Themes. *Biochem. J.* 441 (3): 763-787.
- Rodrigues A., Adamo M., Crozet P., Margalha L., Confraria A., Martinho C., Elias A., Rabissi A., Lumberras V., González-Guzmán M., Antoni R., Rodriguez P.L., Baena-González E. (2013). ABI1 and PP2CA Phosphatases are Negative Regulators of Snf1-related Protein Kinase1 Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25 (10): 3871-3884.
- Rogers J.C. (1985). Two Barley Alpha-Amylase Gene Families are Regulated Differently in Aleurone Cells. *J. Biol. Chem.* 260 (6): 3731-3738.
- Roldán I., Wattebled F., Mercedes Lucas M., Delvallé D., Planchot V., Jiménez S., Pérez R., Ball S., D'Hulst C., Mérida A. (2007). The Phenotype of Soluble Starch Synthase IV Defective Mutants of *Arabidopsis thaliana* Suggests a Novel Function of Elongation Enzymes in the Control of Starch Granule Formation. *Plant J.* 49 (3): 492-504.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., Sheen J. (2006). Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675-709.
- Rost S., Frank C., Beck E. (1996). The Chloroplast Envelope is Permeable for Maltose but not for Maltodextrins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1291 (3): 221-227.
- Ruzanski C., Smirnova J., Rejzek M., Cockburn D., Pedersen H.L., Pike M., Willats W.G., Svensson B., Steup M., Ebenhöh O., Smith A.M., Field R.A. (2013). A Bacterial Glucanotransferase Can Replace the Complex Maltose Metabolism Required for Starch to Sucrose Conversion in Leaves at Night. *J. Biol. Chem.* 288 (40): 28581-28598.
- Santelia D., Kötting O., Seung D., Schubert M., Thalmann M., Bischof S., Meekins D.A., Lutz A., Patron N., Gentry M.S., Allain F.H., Zeeman S.C. (2011). The Phosphoglucan Phosphatase Like Sex Four2 Dephosphorylates Starch at the C3-position in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23 (11): 4096-111.
- Satoh H., Shibahara K., Tokunaga T., Nishi A., Tasaki M., Hwang S.K., Okita T.W., Kaneko N., Fujita N., Yoshida M., Hosaka Y., Sato A., Utsumi Y., Ohdan T., Nakamura Y. (2008). Mutation of the Plastidial Alpha-Glucan Phosphorylase Gene in Rice Affects the Synthesis and Structure of Starch in the Endosperm. *Plant Cell.* 20 (7): 1833-1849.

- Scheidig A., Fröhlich A., Schulze S., Lloyd J.R., Kossmann J. (2002). Downregulation of a Chloroplast-targeted Beta-amylase Leads to a Starch-excess Phenotype in Leaves. *Plant J.* 30 (5): 581-591.
- Schleucher J., Vanderveer P.J., Sharkey T.D. (1998). Export of Carbon from Chloroplasts at Night. *Plant Physiol.* 118 (4): 1439-1445.
- Schliebner I., Pribil M., Zühlke J., Dietzmann A., Leister D. (2008). A Survey of Chloroplast Protein Kinases and Phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Genomics.* 9 (3): 184-190.
- Schneider A., Häusler R.E., Kolukisaoglu U., Kunze R., van der Graaff E., Schwacke R., Catoni E., Desimone M., Flügge U.I. (2002). An *Arabidopsis thaliana* Knock-Out Mutant of the Chloroplast Triose Phosphate/Phosphate Translocator is Severely Compromised only when Starch Synthesis, but not Starch Mobilisation is Abolished. *Plant J.* 32 (5): 685-699.
- Servaites J.C., Geiger D.R. (2002). Kinetic Characteristics of Chloroplast Glucose Transport. *J. Exp. Bot.* 53 (374): 1581-1591.
- Seung D., Thalmann M., Sparla F., Abou Hachem M., Lee S.K., Issakidis-Bourguet E., Svensson B., Zeeman S.C., Santelia D. (2013). *Arabidopsis thaliana* AMY3 is a Unique Redox-Regulated Chloroplastic α -Amylase. *J. Biol. Chem.* 288 (47): 33620-33633.
- Seung D., Soyk S., Coiro M., Maier B.A., Eicke S., Zeeman S.C. (2015). PROTEIN TARGETING TO STARCH is Required for Localising GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE to Starch Granules and for Normal Amylose Synthesis in Arabidopsis. *PLoS Biol.* 13 (2): e1002080.
- Shen W., Reyes M.I., Hanley-Bowdoin L. (2009). Arabidopsis Protein Kinases GRIK1 and GRIK2 Specifically Activate SnRK1 by Phosphorylating its Activation Loop. *Plant Physiol.* 150 (2): 996-1005.
- Silver D.M., Silva L.P., Issakidis-Bourguet E., Glaring M.A., Schriemer D.C., Moorhead G.B. (2013). Insight into the Redox Regulation of the Phosphoglucan Phosphatase SEX4 Involved in Starch Degradation. *FEBS J.* 280 (2): 538-548.
- Silver D.M., Kötting O., Moorhead G.B. (2014). Phosphoglucan Phosphatase Function Sheds Light on Starch Degradation. *Trends Plant Sci.* 19 (7): 471-478.
- Sim L., Beeren S.R., Findinier J., Dauvillée D., Ball S.G., Henriksen A., Palcic M.M. (2014). Crystal Structure of the Chlamydomonas Starch Debranching Enzyme Isoamylase ISA1 Reveals Insights into the Mechanism of Branch Trimming and Complex Assembly. *J. Biol. Chem.* 289 (33): 22991-23003.
- Singh D.G., Lomako J., Lomako W.M., Whelan W.J., Meyer H.E., Serwe M., Metzger J.W. (1995). β -Glucosylarginine: a New Glucose-Protein Bond in a Self-glucosylating Protein from Sweet Corn. *FEBS Lett.* 376 (1-2): 61-64.
- Sizova I., Fuhrmann M., Hegemann P. (2001). A *Streptomyces rimosus aphVIII* Gene Coding for a New Type Phosphotransferase Provides Stable Antibiotic Resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene.* 277 (1-2): 221-229.
- Smith A.M. (2001). The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules.* 2 (2): 335-341.

- Smith S.M., Fulton D.C., Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Dunstan H., Hylton C., Zeeman S.C., Smith A.M. (2004). Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiol.* 136: 2687-2699.
- Smith-White B.J., Preiss J. (1992). Comparison of Proteins of ADP-glucose Pyrophosphorylase from Diverse Sources. *J. Mol. Evol.* 34 (5): 449-464.
- Smythe C., Cohen P. (1991). The Discovery of Glycogenin and the Priming Mechanism for Glycogen Biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 200 (3): 625-631.
- Sonnewald U., Basner A., Greve B., Steup M. (1995). A Second L-type Isozyme of Potato Glucan Phosphorylase: Cloning, Antisense Inhibition and Expression Analysis. *Plant Mol. Biol.* 27 (3): 567-576.
- Sowokinos J.R., Preiss J. (1982). Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*: III. PURIFICATION, PHYSICAL, AND CATALYTIC PROPERTIES OF ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE IN POTATOES. *Plant Physiol.* 69 (6): 1459-1466.
- Sparla F., Costa A., Lo Schiavo F., Pupillo P., Trost P. (2006). Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted Beta-Amylase of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 141 (3): 840-850.
- Stanley D., Fitzgerald A.M., Farnden K.J.F., MacRae E.A. (2002). Characterization of Putative α -Amylases from Apple (*Malus domestica*) and *Arabidopsis thaliana*. *Biologia.* 57: 137-148.
- Stanley D., Rejzek M., Naested H., Smedley M., Otero S., Fahy B., Thorpe F., Nash R.J., Harwood W., Svensson B., Denyer K., Field R.A., Smith A.M. (2011). The Role of Alpha-Glucosidase in Germinating Barley Grains. *Plant Physiol.* 155 (2): 932-943.
- Stark D.M., Timmerman K.P., Barry G.F., Preiss J., Kishore G.M. (1992). Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science.* 258 (5080): 287-292.
- Steichen J.M., Petty R.V., Sharkey T.D. (2008). Domain Characterization of a 4-Alpha-Glucanotransferase Essential for Maltose Metabolism in Photosynthetic Leaves. *J. Biol. Chem.* 283 (30): 20797-20804.
- Stettler M., Eicke S., Mettler T., Messerli G., Hörtensteiner S., Zeeman S.C. (2009). Blocking the Metabolism of Starch Breakdown Products in Arabidopsis Leaves Triggers Chloroplast Degradation. *Mol. Plant.* 2 (6): 1233-1246.
- Stitt M., Heldt H.W. (1981). Physiological Rates of Starch Breakdown in Isolated Intact Spinach Chloroplasts. *Plant Physiol.* 68 (3): 755-761.
- Stitt M., Quick W.P. (1989). Photosynthetic Carbon Partitioning: its Regulation and Possibilities for Manipulation. *Physiologia Plantarum.* 77 (4): 633-641.
- Strand A., Zrenner R., Trevanion S., Stitt M., Gustafsson P., Gardeström P. (2000). Decreased Expression of Two Key Enzymes in the Sucrose Biosynthesis Pathway, Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphatase and Sucrose Phosphate Synthase, has Remarkably Different Consequences for Photosynthetic Carbon Metabolism in Transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 23 (6): 759-770.

- Streb S., Eicke S., Zeeman S.C. (2012). The Simultaneous Abolition of Three Starch Hydrolases Blocks Transient Starch Breakdown in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 287 (50): 41745-41756.
- Streb S., Zeeman S.C. (2012). Starch Metabolism in Arabidopsis. *Arabidopsis Book*. 10: e0160.
- Sun Z., Henson C.A. (1990). Degradation of Native Starch Granules by Barley Alpha-Glucosidases. *Plant Physiol.* 94 (1): 320-327.
- Sun Z.T., Henson C.A. (1991). A Quantitative Assessment of the Importance of Barley Seed Alpha-Amylase, Beta-Amylase, Debranching Enzyme, and Alpha-Glucosidase in Starch Degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 284 (2): 298-305.
- Szydlowski N., Ragel P., Raynaud S., Lucas M.M., Roldán I., Montero M., Muñoz F.J., Ovecka M., Bahaji A., Planchot V., Pozueta-Romero J., D'Hulst C., Mérida A. (2009). Starch Granule Initiation in Arabidopsis Requires the Presence of Either Class IV or Class III Starch Synthases. *Plant Cell.* 21 (8): 2443-2457.
- Tagliabracci V.S., Turnbull J., Wang W., Girard J.M., Zhao X., Skurat A.V., Delgado-Escueta A.V., Minassian B.A., Depaoli-Roach A.A., Roach P.J. (2007). Laforin is a Glycogen Phosphatase, Deficiency of Which Leads to Elevated Phosphorylation of Glycogen in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 (49): 19262-19266.
- Takeda Y., Hizukuri S. (1981). Re-Examination of the Action of Sweet-Potato Beta-Amylase on Phosphorylated (1-D)-X-D-Glucans. *Carbohydrate Research.* 89: 174-175.
- Tardif M., Atteia A., Specht M., Cogne G., Rolland N., Brugière S., Hippler M., Ferro M., Bruley C., Peltier G., Vallon O., Cournac L. (2012). PredAlgo: a New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Mol. Biol. Evol.* 29 (12): 3625-3639.
- Tiessen A., Hendriks J.H., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farré E.M., 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. *Plant Cell.* 14 (9): 2191-2213.
- Tsai C.Y., Nelson O.E. (1966). Starch-deficient Maize Mutant Lacking Adenosine Dephosphate Glucose Pyrophosphorylase Activity. *Science.* 151 (3708): 341-343.
- Tsai C.Y. (1974). The Function of the Waxy Locus in Starch Synthesis in Maize Endosperm. *Biochem. Genet.* 11 (2): 83-96.
- Tunçay H., Findinier J., Duchêne T., Cogez V., Cousin C., Peltier G., Ball S., Dauvillée D. (2013). A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism. *PLoS ONE.* 8: e74763.
- Ugalde J.E., Parodi A.J., Ugalde R.A. (2003). De Novo Synthesis of Bacterial Glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* Glycogen Synthase is Involved in Glucan Initiation and Elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 (19): 10659-10663.
- 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. *Theor. Appl. Genet.* 104 (1): 1-8.

- Valerio C., Costa A., Marr L., Issakidis-Bourguet E., Pupillo P., Trost P., Sparla F. (2010). Thioredoxin-regulated β -amylase (BAM1) Triggers Diurnal Starch Degradation in Guard Cells, and in Mesophyll Cells Under Osmotic Stress. *J. Exp Bot.* 62: 545-555.
- Van den Koornhuyse N., Libessart N., Delrue B., Zabawinski C., Decq A., Iglesias A., Carton A., Preiss J., Ball S. (1996). Control of Starch Composition and Structure Through Substrate Supply in the Monocellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* 271 (27): 16281-16287.
- Visser R.G., Stolte A., Jacobsen E. (1991). Expression of a Chimaeric Granule-bound Starch Synthase-GUS Gene in Transgenic Potato Plants. *Plant Mol. Biol.* 17 (4): 691-699.
- 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. *Eur. J. Biochem.* 269 (15): 3810-3820.
- Wattebled F., Ral J.P., Dauvillée D., Myers A.M., James M.G., Schlichting R., Giersch C., Ball S.G., D'Hulst C. (2003). Sta11, a *Chlamydomonas reinhardtii* Locus Required for Normal Starch Granule Biogenesis, Encodes Disproportionating Enzyme. Further Evidence for a Function of α -1,4 Glucanotransferases during Starch Granule Biosynthesis in Green Algae. *Plant Physiology.* 132: 137-145.
- Wattebled F., Dong Y., Dumez S., Delvallé 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 Physiol.* 138 (1): 184-195.
- Weber A.P. (2004). Solute Transporters as Connecting Elements Between Cytosol and Plastid Stroma. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (3): 247-253.
- Weiner H., Stitt M., Heldt H.W. (1987). Subcellular Compartmentation of Pyrophosphate and Alkaline Pyrophosphatase in Leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 893: 13-21.
- Weise S.E., Weber A.P., Sharkey T.D. (2004). Maltose is the Major Form of Carbon Exported from the Chloroplast at Night. *Planta.* 218 (3): 474-482.
- Weise S.E., Kim K.S., Stewart R.P., Sharkey T.D. (2005). Beta-Maltose is the Metabolically Active Anomer of Maltose During Transitory Starch Degradation. *Plant Physiol.* 137 (2): 756-761.
- Worby C.A., Gentry M.S., Dixon J.E. (2006). Laforin, a Dual Specificity Phosphatase that Dephosphorylates Complex Carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 281 (41): 30412-30418.
- Xia H., Yandeau-Nelson M., Thompson D.B., Guiltinan M.J. (2011). Deficiency of Maize Starch-Branching Enzyme I Results in Altered Starch Fine Structure, Decreased Digestibility and Reduced Coleoptile Growth During Germination. *BMC Plant Biol.* 11: 95.
- Yamasaki Y., Nakashima S., Konno H. (2008). Pullulanase from Rice Endosperm. *Acta Biochim. Pol.* 55 (3): 507-510.

- Yang Y., Steup M. (1990). Polysaccharide Fraction from Higher Plants Which Strongly Interacts with the Cytosolic Phosphorylase Isozyme: I. Isolation and Characterization. *Plant Physiol.* 94 (3): 960-969.
- Yoon H.S., Hackett J.D., Ciniglia C., Pinto G., Bhattacharya D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21 (5): 809-818.
- 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 Physiol.* 123 (1): 319-326.
- Yu T.S., Kofler H., Häusler R.E., Hille D., Flügge U.I., Zeeman S.C., Smith A.M., Kossmann J., Lloyd J., Ritte G., Steup M., Lue W.L., Chen J., Weber A. (2001). The Arabidopsis *sex1* Mutant is Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and not in the Chloroplast Hexose Transporter. *Plant Cell.* 13 (8): 1907-1918.
- Yu T.S., Zeeman S.C., Thorneycroft D., Fulton D.C., Dunstan H., Lue W.L., Hegemann B., Tung S.Y., Umemoto T., Chapple A., Tsai D.L., Wang S.M., Smith A.M., Chen J., Smith S.M. (2005). Alpha-Amylase is not Required for Breakdown of Transitory Starch in Arabidopsis Leaves. *J. Biol. Chem.* 280 (11): 9773-9779.
- Yun M.S., Umemoto T., Kawagoe Y. (2011). Rice Debranching Enzyme Isoamylase3 Facilitates Starch Metabolism and Affects Plastid Morphogenesis. *Plant Cell Physiol.* 52 (6): 1068-1082.
- 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. *J. Bacteriol.* 183 (3): 1069-1077.
- Zeeman S.C., Thorneycroft D., Schupp N., Chapple A., Weck M., Dunstan H., Haldimann P., Bechtold N., Smith A.M., Smith S.M. (2004). Plastidial Alpha-Glucan Phosphorylase is not Required for Starch Degradation in Arabidopsis Leaves but has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress. *Plant Physiol.* 135 (2): 849-858.
- Zhang X., Myers A.M., James M.G. (2005). Mutations Affecting Starch Synthase III in Arabidopsis Alter Leaf Starch Structure and Increase the Rate of Starch Synthesis. *Plant Physiol.* 138 (2): 663-674.
- Zhang X., Szydlowski N., Delvallé D., D'Hulst C., James M.G., Myers A.M. (2008). Overlapping Functions of the Starch Synthases SSII and SSIII in Amylopectin Biosynthesis in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 8: 96.
- Zhang Y., Primavesi L.F., Jhurrea D., Andralojc P.J., Mitchell R.A., Powers S.J., Schlupepmann H., Delatte T., Wingler A., Paul M.J. (2009). Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. *Plant Physiol.* 149 (4): 1860-1871.
- Zrenner R., Krause K.P., Apel P., Sonnewald U. (1996). Reduction of the Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphatase in Transgenic Potato Plants Limits Photosynthetic Sucrose Biosynthesis with no Impact on Plant Growth and Tuber Yield. *Plant J.* 9 (5): 671-681.

Annexe 1:

Séquence nucléotidique du gène *MEX* synthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* optimisé pour l'expression chez *Arabidopsis thaliana* :

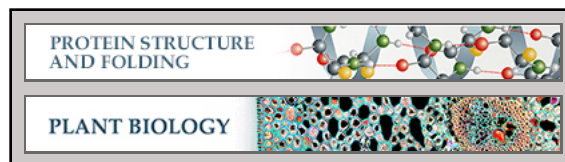
```
ATGGTTTCTTCTAGAAAGAAGCCAGTTCCACCATTCACACGCTGGTGCTACCTCTGGTCCAGC
TTCTGACTCTCAAAGATGGAACGCTTTGACCGACAAGTTGGTTGCTGCTTCTTCTATCCCAT
TCTCTATCTTGGTTTTGCCACAAGTTGTTCAAAACGCTATCAACATGGCTGGTGGTCACCCA
ACCGCTTTGTCTATCATCTCTTGGGAAGGTTACTTGTCTGCTATGTTCCGGTAACACCTTGAT
GTGTTCTCACTTCGCTGCTTCTGGTGAAAGATCTGCTGTTAACGTTCAATTGGTTGGTATCT
TGAACAACCTTCTTGATCTTGACCCAAGTTGCTTTGGCTGGTTTCATGCCATTGGCTGTTTTC
TTGGCTGCTGCTGCTTTACCGCTTTCGCTACCTTCATGAACTTGGCTAGAGTTGCTGCTTT
GGCTGGTGCTGCTCAACCAGCTGACGAAAAGTGGGGTTCTTGGCAAATGTGGCAAATTGGGTT
CTGGTTTTGGTTGGTTTTGGCTGTTGTTCCACAAGTTTTGTACAACACCGTTTTCTCCAGCTGCT
TCTACCTTGTTGCCATTCATCTGTACCTTGGGTTTTGTTGGGTGCTGTTTTGGGTTTGAGATT
GTCTTCTAAGGGTGGTTCTGACGCTGCTACCTTGGTTAGACAATTGCCAGGTTGGGGTGCTA
CCTTGTTGTTGCTTTGTCTCCATTGCCACAATTGGTTAGAACTTGTTGGAACCACAATCT
TTGGAAGGTTTTGTCTGTTGGAACCATGTTGTTGGCTTTGTTGGGTAACGCTTTGATGGTTCC
AAGAGCTTTGTTGTTAGAGACGTTGTTTGGTTGTCTGGAACCTGTTGGGCTTGTGTTGCTG
GTTGGGGTCAATTGTTCTCTATGTTTCAGATCTGCTTCTGCTGCTACCGGTAGAAGATTCTTG
GACCCATGGTTGTTCTTCTCTATCACCGGTGCTTTGTTGTTGTACACCGGTTACGTTGTTGT
TCAACACAGAAGAGCTACCGCTGCTGCTGCTTCTCCAAGACCAGCTTAA
```

Annexe 2 :

Sim L., Beeren S.R., **Findinier J.**, Dauvillée D., Ball S.G., Henriksen A., Palcic M.M. (2014). Crystal structure of the Chlamydomonas starch debranching enzyme isoamylase ISA1 reveals insights into the mechanism of branch trimming and complex assembly. *J. Biol. Chem.* 289 (33): 22991-23003.

Protein Structure and Folding:
**Crystal Structure of the *Chlamydomonas*
Starch Debranching Enzyme Isoamylase
ISA1 Reveals Insights into the Mechanism
of Branch Trimming and Complex
Assembly**

Lyann Sim, Sophie R. Beeren, Justin
Findinier, David Dauvillée, Steven G. Ball,
Anette Henriksen and Monica M. Palcic
J. Biol. Chem. 2014, 289:22991-23003.
doi: 10.1074/jbc.M114.565044 originally published online July 3, 2014



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.565044](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.565044)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](https://www.jbc.org/).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 51 references, 22 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/289/33/22991.full.html#ref-list-1>

Crystal Structure of the *Chlamydomonas* Starch Debranching Enzyme Isoamylase ISA1 Reveals Insights into the Mechanism of Branch Trimming and Complex Assembly*

Received for publication, March 12, 2014, and in revised form, June 16, 2014. Published, JBC Papers in Press, July 3, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.565044

Lyann Sim^{†1}, Sophie R. Beeren[‡], Justin Findinier[§], David Dauvillée[§], Steven G. Ball[§], Anette Henriksen^{†2}, and Monica M. Palcic^{†3}

From the [†]Carlsberg Laboratory, Gamle Carlsberg Vej 10, DK-1799 Copenhagen V, Denmark and the [§]Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR 8576 CNRS-USTL, Bâtiment C9, Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

Background: The ISA1-ISA2 isoamylase complex is involved in starch synthesis.

Results: The ISA1 homodimer from the green algae *Chlamydomonas* is functional without ISA2 and its crystal structure is described.

Conclusion: The ISA1 structure reveals potential substrate recognition sites and explains its low selectivity toward tightly spaced branches.

Significance: Structural conservation with plant ISA1 suggests it may be a useful model for studying branch trimming.

The starch debranching enzymes isoamylase 1 and 2 (ISA1 and ISA2) are known to exist in a large complex and are involved in the biosynthesis and crystallization of starch. It is suggested that the function of the complex is to remove misplaced branches of growing amylopectin molecules, which would otherwise prevent the association and crystallization of adjacent linear chains. Here, we investigate the function of ISA1 and ISA2 from starch producing alga *Chlamydomonas*. Through complementation studies, we confirm that the *STA8* locus encodes for ISA2 and *sta8* mutants lack the ISA1-ISA2 heteromeric complex. However, mutants retain a functional dimeric ISA1 that is able to partly sustain starch synthesis *in vivo*. To better characterize ISA1, we have overexpressed and purified ISA1 from *Chlamydomonas reinhardtii* (CrISA1) and solved the crystal structure to 2.3 Å and in complex with maltoheptaose to 2.4 Å. Analysis of the homodimeric CrISA1 structure reveals a unique elongated structure with monomers connected end-to-end. The crystal complex reveals details about the mechanism of branch binding that explains the low activity of CrISA1 toward tightly spaced branches and reveals the presence of additional secondary surface carbohydrate binding sites.

The semi-crystalline property of starch is an important feature that enables large amounts of glucose to be packed into a tightly condensed form, either for temporary storage in the chloroplasts of leaves (transient starch) or for longer storage in the amyloplasts of cereals (storage starch). It is also a distinguishing feature that separates starch from its analogous storage molecule glycogen. Although both molecules are essentially

linear α 1,4-linked glucose polymers joined by α 1,6-linked branch points, it is the non-uniform branching pattern in the amylopectin component of starch that allows adjacent linear chains to associate into double helices and crystallize. The discontinuous branching produces an amylopectin structure composed of alternating regions of amorphous branched layers and crystalline helical layers that totals \sim 9–10 nm in thickness (1–3). The enzymes involved in amylopectin synthesis include a collection of starch synthase and starch branching enzymes that work together to catalyze chain extension and branching reactions, respectively (for review refer to Refs. 4 and 5). Additionally, mutant studies in maize, rice, *Arabidopsis*, and *Chlamydomonas* revealed that debranching enzymes are involved in the crystallization of starch, although its mechanism is not very well understood (6–8). It is hypothesized that the debranching enzymes, notably the isoamylases ISA1⁴ and ISA2 maintain the non-uniform branching pattern in amylopectin by trimming the misplaced branches that prevent adjacent linear chains from associating and crystallizing (4, 7, 9).

ISA1 is a family 13 glycoside hydrolase, which has activity for hydrolyzing α 1,6-glucosidic linkages corresponding to branch points of growing amylopectin molecules. ISA2 is also classified in the family 13 glycoside hydrolase family, however, the putative catalytic residues are altered, rendering it enzymatically inactive. Despite its inactivity, ISA2 is evolutionarily conserved in plants, and has been suggested to play a role as a regulatory subunit for ISA1. In the cereal species such as rice and maize, one homomeric ISA1 and two heteromeric ISA1-ISA2 complexes exist (10, 11). In contrast, in *Arabidopsis* leaves and potato tubers, only a single heteromeric complex has been

* This work was supported by the Carlsberg Foundation.

¹ To whom correspondence should be addressed. Dept. of Chemistry and Biology, Ryerson University, 350 Victoria St., Toronto, ON M5B 2K3, Canada. E-mail: lya.sim@gmail.com.

² Present address: Novo Nordisk A/S, Novo Nordisk Park, DK-2760 Måløv, Denmark.

³ Present address: Dept. of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Blegdamsvej 3, 2200 Copenhagen N, Denmark.

⁴ The abbreviations used are: ISA1, isoamylase 1 protein; ISA2, isoamylase 2 protein; *ISA1/ISA2*, isoamylase 1/2 gene; CrISA1, recombinant isoamylase 1 from *C. reinhardtii*; CrISA1-M7, recombinant isoamylase 1 in complex with maltoheptaose; M7, maltoheptaose; G(1–7), glucosyl moiety (1–7) of maltoheptaose; ISA2-HA, hemagglutinin-tagged isoamylase 2; AP, amylopectin; SBS, secondary binding site; DP, degree of polymerization; aa, amino acid; PDB, Protein Data Bank; UPLC, ultra performance liquid chromatography.

Crystal Structure of the *Chlamydomonas* ISA1 Dimer

observed *in vivo*. The differences in the ISA1 and ISA1·ISA2 protein complex distribution in the species correlate with the results observed upon inactivation of either *ISA1* or *ISA2* genes through mutagenesis in *Arabidopsis* and cereals or upon decreasing transcript abundance by antisense RNA approaches in potato. In both potato and *Arabidopsis*, both ISA1 and ISA2 seem to be crucial to starch synthesis as elimination or decrease of expression of either subunit gene by such approaches has equal impact on starch synthesis (6, 12, 13). In the cereals, ISA1 seems to be the crucial component in starch synthesis as loss of ISA2 does decrease starch levels but not to the same degree as in *Arabidopsis* and potato (11, 14).

Chlamydomonas reinhardtii is an alga model for studying starch synthesis and it is able to synthesize either transient or storage starch, depending on growth in the presence or absence of nitrogen, respectively (15, 16). Under nitrogen starvation conditions, *Chlamydomonas* strains carrying mutations at either the *STA7* and *STA8* loci display phenotypes similar to that of the respective *ISA1* and *ISA2* mutants observed in the cereal species (7, 17). The *STA7* locus was proven to define the structural gene of the algal ISA1 subunit. However, the nature of the *STA8* locus has remained uncertain as this locus was solely defined through the phenotype consequences of its inactivation after random insertional mutagenesis. Mutation of the *STA7* locus leads to a very severe reduction of starch content and its replacement by a water-soluble polysaccharide phytyloglycogen (7). Although not as severe as the *sta7* mutants, mutants of the *STA8* locus have also been described to accumulate both phytyloglycogen and a reduced amount of high amylose starch (7, 17). In nitrogen-supplied medium, however, whereas the *sta7* mutants remain starchless (18), the *sta8* mutants display no reduction in starch content and phytyloglycogen accumulation is strongly reduced (19). Although *STA7* has been shown to encode ISA1 (7), the molecular nature of the *STA8* locus and its relationship to the ISA2 protein has not previously been documented. However, due to the phenotypic similarity of the *sta8* mutants to the *ISA2* mutants in cereals, we have strong reason to believe that the *STA8* locus encodes for the ISA2 protein in *Chlamydomonas*.

In this study, we show in *Chlamydomonas* that the *STA8* locus encodes ISA2, that ISA2 interacts physically with ISA1, and confirm the presence of both homomeric ISA1 and heteromeric ISA1·ISA2 complexes *in vivo*. We also report the crystal structure of ISA1 from *C. reinhardtii* (CrISA1), the first of any plant or algae ISA1 complex. CrISA1 is shown to be an elongated homodimer with monomers connected end-to-end via their C-terminal domain. Moreover, through crystal complex studies with maltoheptaose, we have mapped the enzyme active site and determined the structural basis of branch binding and recognition by CrISA1. Finally, we compare CrISA1 with other plant ISA1, propose the conservation of the dimeric ISA1 structure in plants, and suggest how it may serve as framework for the assembly of ISA1·ISA2 heterocomplexes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chlamydomonas Strains and Growth—The wild-type 330 strain, and *sta8* mutant strains BafV13 (carrying the *sta8-1::ARG7* mutation) and BafO6 (carrying the *sta8-2::ARG7*

TABLE 1
Complementation of the *sta8* mutant strains with *ISA2* or *ISA2-HA*

Strains	Genotype	Starch	AP	Amylose	Water-soluble polysaccharide
		$\mu\text{g } 10^{-6} \text{ cells}$	λ_{max}	%	$\mu\text{g } 10^{-6} \text{ cells}$
330	Wild-type	40 ± 6	552 ± 2	24 ± 6	0.12 ± 0.07
BafV13	<i>sta8-1</i>	8 ± 3	599 ± 6	49 ± 7	1.70 ± 0.30
V13C	<i>sta8-1::ISA2</i>	31 ± 3	556 ± 4	19 ± 7	0.06 ± 0.04
V13HA	<i>sta8-1::ISA2-HA</i>	43 ± 8	554 ± 3	22 ± 5	0.18 ± 0.07
BafO6	<i>sta8-2</i>	10 ± 2	603 ± 5	46 ± 8	1.10 ± 0.40
O6C	<i>sta8-2::ISA2</i>	36 ± 7	554 ± 4	21 ± 5	0.05 ± 0.02
O6HA	<i>sta8-2::ISA2-HA</i>	33 ± 5	553 ± 3	28 ± 3	0.21 ± 0.14

mutation) were previously described by Dauvillée *et al.* (19). All experiments were carried out in continuous light ($40 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in the presence of acetate at 24 °C in liquid cultures. Nitrogen-starved cultures were inoculated at $5 \times 10^5 \text{ cells ml}^{-1}$ and harvested after 5 days at a final density of 1 to $2 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$. Formula for media and genetic techniques can be found in Harris (20).

Functional Complementation of *sta8* Mutant Strains with *ISA2* or *ISA2-HA*—The plasmid containing full-length *ISA2* (pSL-Isa2) was constructed as follows. The full-length *ISA2* genomic DNA (8.7 kbp) (sequence ref Cre17.g698850 on phytozome) was amplified by PCR in two fragments using the Dynazyme™ Ext polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland) following the supplied standard procedure for amplification. Flanking restriction sites were introduced into the 5' end of the first 3.5-kb PCR product by using EcoRI Isa2F (GGA ATT CAT GAT ACA AGG ACA CGT CCA G) and IntIsa2-5 (GCC GAG TAC ACG TAC GTA CCC AG) primers, whereas a XbaI restriction site was introduced in the second 5-kb PCR product covering the end of the genomic DNA using IntIsa2-3 (GGT TCT GGC GGT TTG GTT GCG G) and XbaIsa2R (GTC TAG ATC AGT GCT TCC GGG CCG CCG C) primers. The full-length *ISA2* genomic sequence was then assembled from PCR products using a unique KpnI restriction site found in the gene and cloned into the pSL18 plasmid (21). This plasmid was called pSL-Isa2 and was used to transform BafO6 and BafV13 mutant strains with the glass beads method (22). Transformants were selected on plates containing 10 $\mu\text{g/ml}$ of paromomycin and were called either O6C or V13C depending on the mutant strain transformed.

A hemagglutinin (HA)-tagged *ISA2* construct, pSL-Isa2::3HA, was obtained as follows. A PCR product covering the 3' end of the gene using IntIsa2-3 and XbaIsa2NS (GTC TAG AGT GCT TCC GGG CCG CCG C) primers allowed deletion of the stop codon and introduction of a XbaI restriction site. The triple HA tag was inserted in the 3' end XbaI site. The transformants containing pSL-Isa2::3HA were called either O6HA or V13HA depending on the mutant strain transformed. *Chlamydomonas* mutant strains and genotypes are summarized in Table 1.

Starch Characterization of Wild Type, *sta8* Mutant, and Complemented *Chlamydomonas* Strains—Starches and water-soluble polysaccharides from 1 liter of nitrogen-starved culture were purified and characterized from three independent cultures of wild-type (330), *sta8* mutants (BafV13 and BafO6), and complemented strains (O6C, O6HA, V13C, and V13HA). A full account of starch characterization procedures including amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradients,

and the wavelength of the maximal absorbance of the iodine-polysaccharide complex (λ_{\max}), can be found in Delrue *et al.* (23). Briefly, 2 mg of each starch sample were subjected to CL-2B gel permeation chromatography (GE Healthcare) to separate amylopectin and amylose components. Both amylopectin (AP) and amylose fractions were then assayed by amyloglucosidase assay allowing the determination of the amylose content (amylose %). The wavelength at the maximum absorbance (λ_{\max}) was monitored for the amylopectin of each strain. The starch and water-soluble polysaccharide amounts (in $\mu\text{g}/10^6$ cells), the percentage of amylose in starch, and the λ_{\max} were averaged from three independent samples. Starch characteristic of the *Chlamydomonas* strains are summarized in Table 1.

Detection of Starch Modifying Activities and ISA1 Complexes on Zymograms—Crude extracts from wild-type, *sta8* mutant strains, and ISA2 and ISA2-HA complemented strains were run on denaturing starch zymograms and native glycogen zymograms to allow identification of starch hydrolyzing activity and isoamylase complexes, respectively. Experimental conditions are detailed in Mouille *et al.* (7) and Dauvillée *et al.* (17), respectively. In each case, 100 μg of total protein extract were loaded on the gels.

Denaturing glycogen zymograms, treated under different conditions, were used to monitor starch phosphorylase and starch synthase activities. After the run, the gels were washed 4×30 min in 40 mM Tris, pH 7, and incubated in the presence of either ADP-glucose or glucose 1-phosphate to detect for starch synthase or starch phosphorylase activities, respectively. To allow the detection of phosphorylase activity in denaturing conditions, the first wash was performed in the presence of 20 mM pyridoxal phosphate.

ISA2-HA Pull-down in Crude *Chlamydomonas* Extract—Crude extracts of *Chlamydomonas* strains were prepared in purification buffer (10 mM Tris, pH 7, + protease inhibitor) at a protein concentration of 2 mg/ml. For HA pulldown experiments, 1 ml of crude extracts from ISA2-HA expressing strains were incubated with 80 μl of EZ viewTM Red anti-HA affinity gel (Sigma) for 1 h at 4 °C. Beads were then washed extensively with purification buffer followed by purification buffer + 0.4 M NaCl. Bound proteins were eluted from the beads by boiling in 100 μl of a water, 20% (w/v) SDS, β -mercaptomethanol mixture (0.85/0.10/0.05 (v/v/v)). The supernatant obtained was analyzed on denaturing starch and glycogen containing zymograms.

Construct Design of Recombinant CrISA1—An *Escherichia coli* codon optimized gene encoding for amino acids 57–875 of *C. reinhardtii* isoamylase 1 (CrISA1) (GenBankTM accession number AAP88032.1) was obtained from GenScript (NJ). The first 56 N-terminal amino acids of CrISA1 were predicted to encode a chloroplast transit peptide by ChloroP (24) and subsequently excluded from the construct. The pET28a-CrISA1 plasmid was constructed by inserting the codon-optimized gene into the pET28a expression vector at NdeI/XhoI restriction sites in-frame with an N-terminal His₆ tag and thrombin cleavage site.

Purification of Recombinant CrISA1—BL21(DE3) *E. coli* cells transformed with pET28a-CrISA1 were grown at 37 °C until an A_{600} of 0.5 was reached. Cells were then induced with 0.4 mM

isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside and incubated at 30 °C for 4 h. After the induction period, cells were harvested and resuspended in HisTrap binding buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 40 mM imidazole) and lysed using a Constant System cell disruptor and centrifuged at $40,000 \times g$ for 30 min. The cleared lysate was loaded onto a 5-ml HisTrapFF Crude column, washed with HisTrap binding buffer until baseline absorbance was reached, and then eluted using an imidazole gradient. After checking purity on an SDS gel, fractions were pooled and DTT was added to a final concentration of 1 mM. Samples were concentrated (using a 30-kDa MWCO spin concentrator) and loaded onto a HiLoad Sephadex 200 26/60 column equilibrated with 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 1 mM DTT at a flow rate of 2 ml/min. CrISA1 eluted as a single peak at an elution volume corresponding to a size of ~ 190 kDa, as determined from molecular weight standards (Fig. 2A).

CrISA1 Crystallization and Maltoheptaose Soak—CrISA1 crystals were grown at 20 °C by hanging well vapor diffusion using a 1:1 volume ratio of protein (10 mg/ml) to well solution (0.2 M triammonium citrate, pH 7.0, and 14–20% PEG3350). Crystals were cryoprotected using 30% glucose (w/v) (dissolved directly in crystallization buffer), 5% glycerol before flash freezing in liquid nitrogen. Maltoheptaose (M7) soaks were achieved by incubating crystals with 50 mM M7 dissolved in crystallization buffer, which were then cryoprotected in 30% glucose, 5% glycerol, 50 mM M7.

X-ray Data Collection and Refinement—Diffraction data of the CrISA1 and M7 soaked crystals were collected at the ESRF ID23-1 and ID23-2 beamlines, respectively. Diffraction data were processed and scaled using XDS (25). Data collection statistics are summarized in Table 2. Precision-indication merging *R* factor values (R_{pim}) (26) calculated using Aimless (27), along with data completeness and $CC_{1/2}$ (28) were considered in the determination of high-resolution cutoffs used for structural refinement. The CrISA1 structure was determined by a molecular replacement method using Phaser (29) and a CHAINSAW (30) trimmed structure of glycogen debranching enzyme TreX (PDB code 2VNC) as a search model (31). Two molecules were found in the asymmetric unit, which corresponded to a solvent content of 65%. The resulting model was rebuilt using ARP/wARP (32), which traced 97% of the structure. The remaining residues were manually built using Coot (33) and refined using restrained refinement and TLS refinement (34) in REFMAC (35). The refined model was subsequently used as a starting model for refinement of the M7-soaked CrISA1 structure. After rigid body refinement and restrained refinement in REFMAC, water was added using ARP/wARP solvent and glucose units were manually built using Coot. Using link restraints generated by JLigand (36), M7 was refined as a covalently bound intermediate. Refinement statistics are summarized in Table 2. Coordinates and structure factors for the CrISA1 and M7 soaked CrISA1 structures were deposited into the Protein Data Bank (PDB) with accession codes 4J7R and 4OKD, respectively.

Activity Assay of Recombinant CrISA1—CrISA1 activity was measured using soluble potato AP (Sigma), glycogen (Oyster Type II, Sigma), β -limit dextrin (Megazyme), and pullulan (Megazyme) substrates. Substrates stock solutions of 10 mg/ml

Crystal Structure of the Chlamydomonas ISA1 Dimer

TABLE 2
X-ray data and structure refinement statistics

Data collection statistics	CrISA	CrISA-M7
X-ray source	ESRF ID23-1	ESRF ID23-2
Wavelength (Å)	0.976	0.873
Space group	P 41 21 2	P 41 21 2
Unit cell parameters		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	102.13, 102.13, 488.63	102.75, 102.75, 487.81
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution range	48.7–2.30	46.0–2.30
No. of unique reflections	114,033	109,429
Redundancy	7.7 (3.6) ^a	6.5 (6.1) ^a
<i>I</i> / σ <i>I</i>	11.9 (1.53)	13.3 (1.37)
Completeness (%)	97.5 (85.8)	93.0 (64.5)
<i>R</i> _{rim} ^b (%)	5.0 (44.7)	5.1 (75.1)
CC _{1/2} ^c	99.6 (59.8)	99.8 (54.2)
Refinement statistics		
Resolution (Å)	48.7–2.30	46.0–2.40
No. of used reflections	114,031	95,751
<i>R</i> _{cryst} / <i>R</i> _{free} (%)	20.2/23.5	19.2/22.7
No. molecules per asymmetric unit	2	2
No. protein atoms	12,404	12,341
No. solvent atoms	488	433
No. ligands atoms	0	268
R.m.s. deviation bond lengths (Å)	0.007	0.009
R.m.s. deviation angles (°)	1.174	1.379
<i>B</i> average (Å ²)		
Protein (mon A/mon B)	37.3/34.1	54.8/51.1
Ligand-active site (G7)	NA ^d	60.4/58.3 ^e
Ligand-active site (GLC)	NA	69.7/NA
Ligand-SBS 1	NA	69.6/77.0
Ligand-SBS 2	NA	84.9/NA
Solvent	34.7	47.3
Ramachandran plot (%)^f		
Favored	95.35	95.08
Outliers	0.13	0.25
PDB ID	4J7R	4OKD

^a Values in parentheses refer to the highest resolution bin.

^b *R*_{rim}, precision-indicating merging *R* factor (26).

^c CC_{1/2}, percent correlation between intensities from random half-datasets (28).

^d NA, not applicable.

^e Ligand associated with monomer A/monomer B, respectively.

^f Values calculated using Molprobity (52).

were prepared in 150 mM NaCl, 50 mM MES, pH 6.5, buffer and if necessary, heated to 80 °C to dissolve. For substrate activity screening, CrISA1, at a final concentration of 0.05 mg/ml, was incubated with 2 mg/ml of substrate at 30 °C for 30 min. The reaction was terminated by heat inactivation at 95 °C before measuring reducing-end equivalents. Duplicates were prepared for each reaction.

Reducing-end equivalents were determined using the bicinchoninic acid reducing sugar assay method of Nelson (37) and Somogyi (38) using maltose as a standard. The debranching reaction was carried out in 1.5-ml microcentrifuge tubes buffered in a final buffer concentration of 40 mM MES, pH 6.5, 120 mM NaCl and a final reaction volume of 50 μ l.

Time Course and HPLC Analysis of CrISA1 Debranched Amylopectin—Soluble potato AP treated with CrISA1 was analyzed at various time points to measure the chain length distribution of the released branches. A 1-ml solution of 2 mg/ml of amylopectin in 50 mM MES buffer, pH 6.0, was treated with 1 μ l of CrISA1 solution (25 mg/ml) at 30 °C for 4 h. Aliquots of reaction mixture (100 μ l) were removed after 1, 5, 60, and 240 min and quenched with EtOH (900 μ l). These samples were evaporated to dryness *in vacuo*.

The samples were then each dissolved in a mixture 1 M 2-aminobenzamide solution (100 μ l) and 1 M sodium cyano-

TABLE 3
UPLC elution conditions for the separation of 2-aminobenzamide-labeled maltooligosaccharides

Time (min)	Flow rate	% Solvent A (10 mM NH ₄ CHO buffer, pH 4.5)	% Solvent B (MeCN)
	<i>ml/min</i>		
0	0.2	22	78
5	0.2	22	78
30	0.2	50	50
45	0.1	65	35
48	0.1	90	10
51	0.1	22	78
55	0.2	22	78

borohydride solution (100 μ l) each in 30% acetic acid in DMSO. The solutions were heated to 60 °C for 4 h. At room temperature, the solutions were diluted with H₂O (1800 μ l) and washed with CH₂Cl₂ (2 \times 8 ml). The aqueous layers (1.4 ml) were collected and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, then 20- μ l aliquots of each were diluted with 180 μ l of a mixture of MeCN and 10 mM ammonium formate buffer, pH 4.5 (75:25). The resulting solutions were analyzed using a Waters Acquity UPLC/MS fitted with a Waters fluorescence detector operating with excitation at 330 nm and detection at 420 nm. Separation was achieved by means of a Waters Acquity UPLC BEH Glycan 1.7 μ m, 2.1 \times 150-mm column operating at room temperature and with an injection volume of 5 μ l. Elution conditions are listed in Table 3.

RESULTS

CrISA1 Activity—CrISA1 activity was screened against potato AP, glycogen, β -limit dextrin, and pullulan substrates. At 2 mg/ml of substrate concentration, CrISA1 showed the highest activity against AP, β -limit dextrin, and glycogen substrates and \sim 10-fold lower activity against pullulan, as typical for isoamylase-type debranching enzymes (Fig. 1A). Hydrolysis products of AP were labeled with 2-aminobenzamide and separated by UPLC-MS. Baseline separation of chain lengths with degree of polymerization (DP) between 2 and 30 could be achieved and peak integration suggests the majority of the peaks are $>$ DP 6 (Fig. 1B). Time course digests reveals that CrISA is slower at hydrolyzing branches with DP 2–5 and that there was no apparent selectivity among branches $>$ DP 6 (Fig. 1C).

Overall Structure of CrISA1—The structure of CrISA1 is composed of 3 domains characteristic of family 13 glycoside hydrolase subfamily 11 members (39). These include the highly conserved catalytic (β/α)₈ A-domain (aa 184–750), N-terminal β -sandwich domain (aa 76–183), and C-terminal β -sandwich domain (aa 751–875) (Fig. 2B). In the crystal structure, the N-terminal region, including the His tag and residues 57–77 of CrISA1, are disordered. The overall architecture of the CrISA1 monomer is very similar to that of TreX (r.m.s. deviation 1.46 Å, PDB code 2VNC), *Pseudomonas* isoamylase (r.m.s. deviation 1.54 Å, PDB code 1BF2) (40), and glycogen debranching enzyme (r.m.s. deviation 1.55 Å, PDB code 2WSK) (41). Calcium ions, observed in the TreX and isoamylase structures at non-conserved positions, were not observed in the CrISA1 structure. This is consistent with the experimental data that suggest that these ions are not required for ISA1 activity (17).

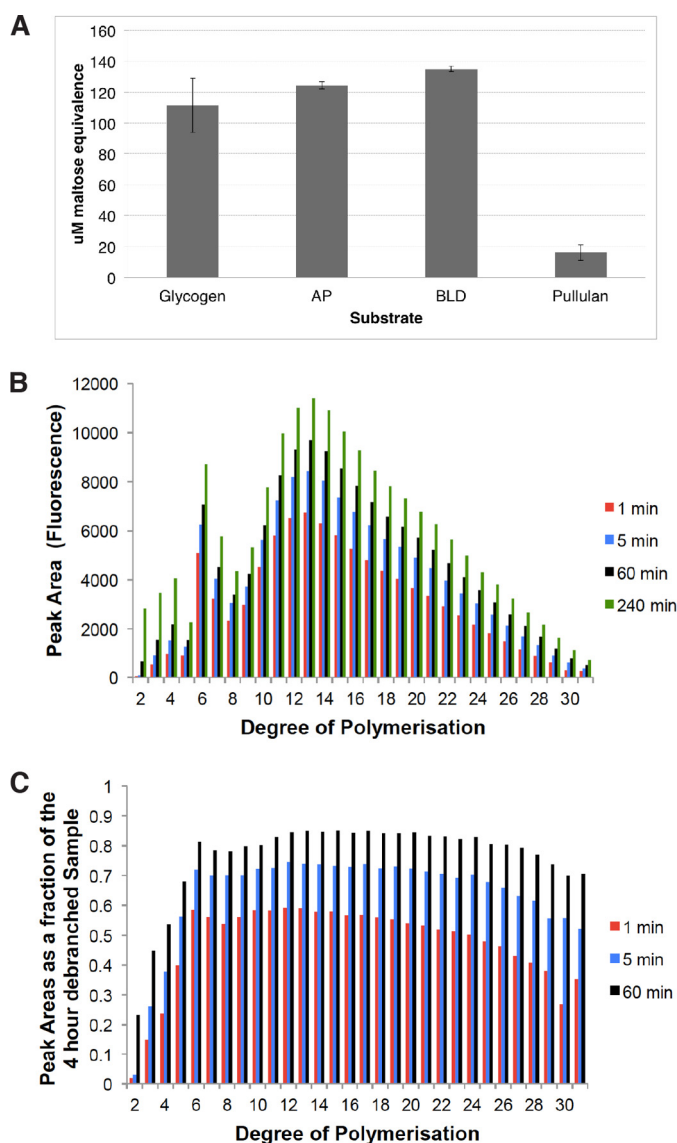


FIGURE 1. **Debranching activity of CrISA1.** *A*, substrate screen of CrISA1 activity against glycogen, amylopectin (AP), β -limit dextrin (β -LD), and pullulan substrates, each at 2 mg/ml. Activity was measured in reducing-end equivalents of maltose. *B*, profiling and quantitation of hydrolyzed AP branches at various time points as represented by peak area integration of UPLC separated and fluorescently labeled AP. *C*, relative rates of debranching as measured by fraction of the peak area from *B* at 1, 5, and 60 min compared with the peak area at 240 min.

Gel filtration chromatography indicates that CrISA1 elutes approximately at a size of 190 kDa, as estimated from molecular mass protein standards (Fig. 2A). As the recombinant CrISA1 is predicted to be 93.0 kDa in size and runs as a monomer on a reducing SDS-PAGE gel (Fig. 2A, inset), this suggests that under non-denaturing conditions CrISA1 assembles as a dimer. Although two monomers, A and B, exist in the asymmetric unit of the crystal structure (Fig. 2B), the biological dimer, assessed by the Protein interfaces, surfaces, and assemblies server (PISA) (42), is generated by monomer A and by a symmetry related copy of monomer B ($-y + 1/2, x + 1/2, z + 1/4$) (Fig. 2C). The biological dimer is an elongated structure (~ 190 Å in length) with individual monomers arranged linearly in a tail-to-tail fashion via interaction with the C termini, which orients the N

termini of each monomer at either end of the dimer (Fig. 2C). The dimerization interface is formed through the $\beta 4$ and $\beta 6$ strands of the C-terminal β -sandwich domain, a loop-helix element inserted between $\beta 5$ and $\beta 6$ and a C-terminal helix extension (Fig. 2, D and E). The 48 participating residues interact mainly via Van der Waals interactions and one salt bridge interaction between NH1 of Arg-667 and OD1 of Asp-848, resulting in a buried interface area of 1888 Å², representing 6.3% of the total monomer surface area. A 2-fold rotation axis, located at the center of the interface, relates the two monomers and places their active sites on the same face of the dimer (Fig. 2C).

Structure of CrISA1 in Complex with Maltoheptaose—The resulting structure generated from CrISA1 crystals soaked with maltoheptaose (M7) reveals significant electron density in the active site cleft of both monomers A and B (Fig. 3A). Following the nomenclature described by Davies *et al.* (43), the electron density spans the substrate binding groove corresponding to putative subsites -7 to -1 . The glucosyl moieties of the M7 residue are numbered from the reducing to non-reducing end from G1 to G7. Moreover, connective density observed between G1 and OD1 of the catalytic nucleophile Asp-542, suggests M7 forms a covalent glycosyl intermediate with CrISA1 (Fig. 3B). Except for a weak density in subsite $+2$, interpreted as a glucose molecule from the cryoprotectant (Fig. 3A), no extended density is observed at the potential $+1$ to $+7$ subsites. Subsite assignment was determined from structural alignment of CrISA1-M7 with the structure of Trex in complex with acarbose (PDB code 2VNC). Overall, there is substantial hydrogen bonding of the M7 to the side chains of residues Glu-640, Arg-450, Asp-620, His-619, Asn-704, Tyr-314, Tyr-706, Arg-389, Trp-229, Thr-228 and the main chain of residues Tyr-331, Gly-417, Asn-387, and Tyr-315. A schematic representation of the CrISA1-M7 interactions is shown in Fig. 4. Moreover, from *B*-factor analysis and hydrogen bonding interactions with M7, it appears that the majority of the stabilizing interactions occur with the G1, G2, and G3 glucosyl moieties (Fig. 5).

The M7 binds to the active site cleft in an "S" shaped configuration and with a distinct kink occurring between the G3 and G4 glucosidic bond (Fig. 5). In this configuration, the O6 groups of G7, G6, G5, and G4 glucosyl moieties are in *syn* with one another, and likewise are the O6 groups of the G3, G2, and G1 moieties, whereas the two sections are *anti* to one another. The ϕ (O5-C1-O4-C4) and φ (C1-O4-C4-C3) torsion angles of the G3-G4 glucosidic bond are 38.0° and 83.8°, respectively, and differ from the ϕ and φ angles of the *syn* attached glucoses, which range from 88.7 to 129.3° and 83.8 to 129°, respectively.

Except for G1, the conformations of the individual glucosyl groups are in the energetically favored chair configuration. As covalently linked to Asp-452, the G1 sugar is distorted toward a half-chair conformation, exhibiting a C2-C1-O5-C5 torsion angle of -12° (Fig. 3B). This configuration is stabilized through interactions between CO6 and OD2 of Asp-542, CO3 and CO₂ with D620, and π -stacking interaction with Tyr-331 (Figs. 3B and 4).

To determine whether there is an active site conformation change that occurs during the binding of M7, we compared the CrISA1 structure with and without bound M7. Only monomer A was used for the structural analysis of the active site, as the

Crystal Structure of the *Chlamydomonas* ISA1 Dimer

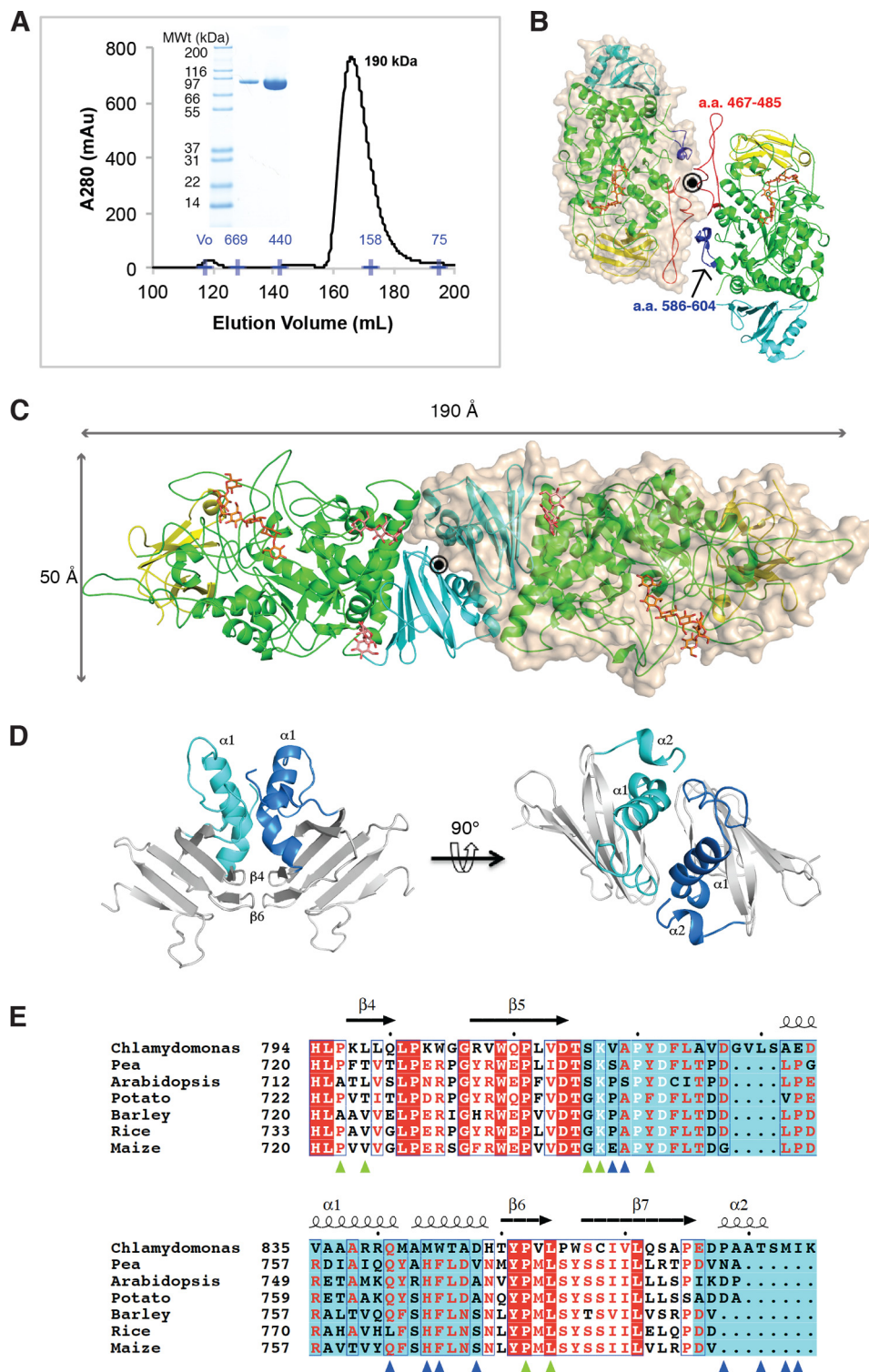


FIGURE 2. Structure of the CrISA dimer and interface. *A*, size exclusion chromatography and SDS-PAGE gel (inset) of purified CrISA1. Void (V_o) and elution volumes of molecular mass (in kDa) standards are labeled in blue. *B*, arrangement of two CrISA1 monomers in the asymmetric unit of the crystal. The N, A, and C subdomains of each monomer are colored yellow, green, and cyan, respectively. Insertional loops (aa 467–485 and 586–604) involved in the crystallographic interface, are colored red and blue, respectively. \odot indicates a 2-fold axis relating the CrISA1 monomers. *C*, biological assembly of the CrISA1 dimer as determined by PISA analysis. Approximate dimensions are displayed Å. Maltoheptaose molecules bound in the active sites are represented in orange sticks and maltotriose and maltotriose residues in the surface binding sites as pink sticks. Coloring of the subdomains is described in *B*. *D*, zoomed-in views of the C-terminal dimer interface. Colored in cyan and blue are the loop helix $\alpha 1$ and helix $\alpha 2$ elements of the dimerization interface. The β -strands participating in the interface are labeled $\beta 4$ and $\beta 6$. *E*, multiple sequence alignment of the C-terminal region of *Chlamydomonas* (AAP88032), pea (AAZ81835), *Arabidopsis* (AEC09752), potato (AAN15317), barley (AAM46866), rice (ACY56095), and maize (ACG43008). Highlighted in cyan is the loop-helix motifs and helix $\alpha 2$ involved in dimerization. Hydrogen-bonding and non-hydrogen bonding interface residues of CrISA1 are indicated in blue and green triangles, respectively. Alignment was generated using ClustalW (50) and prepared using Esript (51).

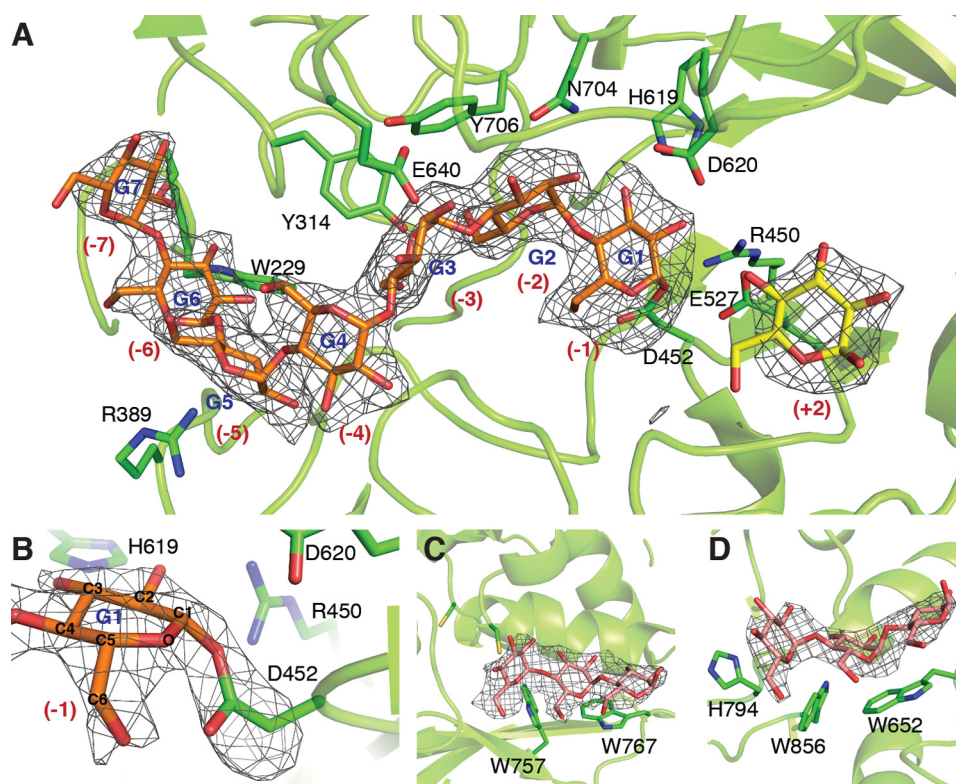


FIGURE 3. Active site and secondary binding sites in CrISA1. *A*, substrate binding cleft of CrISA1 (monomer A) with bound maltoheptaose (orange) and glucose molecule (yellow). Selected substrate binding residues are displayed as green sticks. Glucosyl moieties of M7 are labeled G1 to G7 in blue and putative substrate binding subsites are labeled in red. *B*, zoom-in of the CrISA1 active site displaying the covalent bond between the G1 moiety of maltoheptaose and Asp-452. The contour map displayed in *A* and *B* is the $F_o - F_c$ omit map, with maltoheptaose and the Asp-452 side chain omitted from map calculation, contoured at 3.0 σ and 5.0 σ , respectively. *C*, SBS1, and *D*, SBS2 carbohydrate binding sites. $F_o - F_c$ omit maps surrounding the maltotriose moieties (pink) are contoured at 3.0 σ .

active site of monomer B was partly occluded by crystallographic related molecules. Overlaying the structures reveals that in monomer A, there is a narrowing of the groove upon binding of substrate. In particular, loop 629–652 moves up to 3 Å closer toward the bound M7 (Fig. 5). The movement allows hydrogen bonding to occur between Glu-640 and the O2 group of G3, Asn-704 with the O2 and O4 groups of G2, and Tyr-314 with the O6 group of G3. There is also a substantial conformation change in the catalytic residue Asp-620, allowing for hydrogen bonding interaction with the O3 group of G1 (Fig. 5). Although, no other structural movements outside the active site were observed, we cannot discount the possibility that given our post-soaking conditions, that these rearrangement may be constrained due to crystal packing.

Carbohydrate Surface Binding Site—In addition to fitting the M7 oligosaccharide in the active site of CrISA1, we were able to build maltotriose into electron densities located on two distinct surface sites in each monomer (Fig. 3, C and D). We identified these regions as secondary binding sites (SBS); non-catalytic carbohydrate binding sites found on the surface of the catalytic domain that interact with sugar rings via stacking interactions with aromatic residues (44). These sites, termed SBS1 and SBS2, are located at the reducing end of the active site cleft and at the interface of the catalytic and C-terminal domains, respectively (Fig. 2B). Although we have been able to model maltotriose residues in the electron density, it is likely these glucosyl residues represent only the ordered portion of the M7 oligosac-

charide, which had been soaked into the crystal. In both sites, the maltotriose oligosaccharide binds with a slight curvature, hinting at the possibility that these sites might recognize the helical structure of crystalline amylopectin. At the SBS1 site, the maltotriose interacts via stacking interactions with aromatic residues, Trp-757 and Trp-767 (Fig. 3A), and in the SBS2 site, stacking interactions occurs through residues Trp-652, His-794, and Trp-856 (Fig. 3B). *B*-factor analysis of the bound maltotriose suggests that the interaction is more stable in the SBS1 site compared with SBS2. Additionally, the weak electron density in the SBS2 site of monomer B did not allow proper fitting of glucosyl residues, most likely due to its proximity to a crystal-packing interface.

Functional Complementation of *sta8* Mutants with Wild-type ISA2 and ISA2-HA—The structure of the CrISA1 dimer reported above is the first three-dimensional description of the enzyme thought to be responsible for amylopectin crystallization. We subsequently wanted to confirm the nature of the larger oligomeric assemblies in which ISA1 participates *in vivo* (17). As the *Chlamydomonas sta8* mutants display similar starch characteristic to the *isa2* mutants of certain plant species, we wanted to clarify the relationship of the *STA8* locus to the ISA2 protein. We therefore amplified distinct 5' and 3' regions from wild-type and mutant *sta8-1::ARG7* (strain BAFV13) or *sta8-2::ARG7* (strain BAFO6) with primers taken from the N-terminal and C-terminal parts of the ISA2 gene. Unlike with the wild-type gene, we were unable to amplify frag-

Crystal Structure of the *Chlamydomonas* ISA1 Dimer

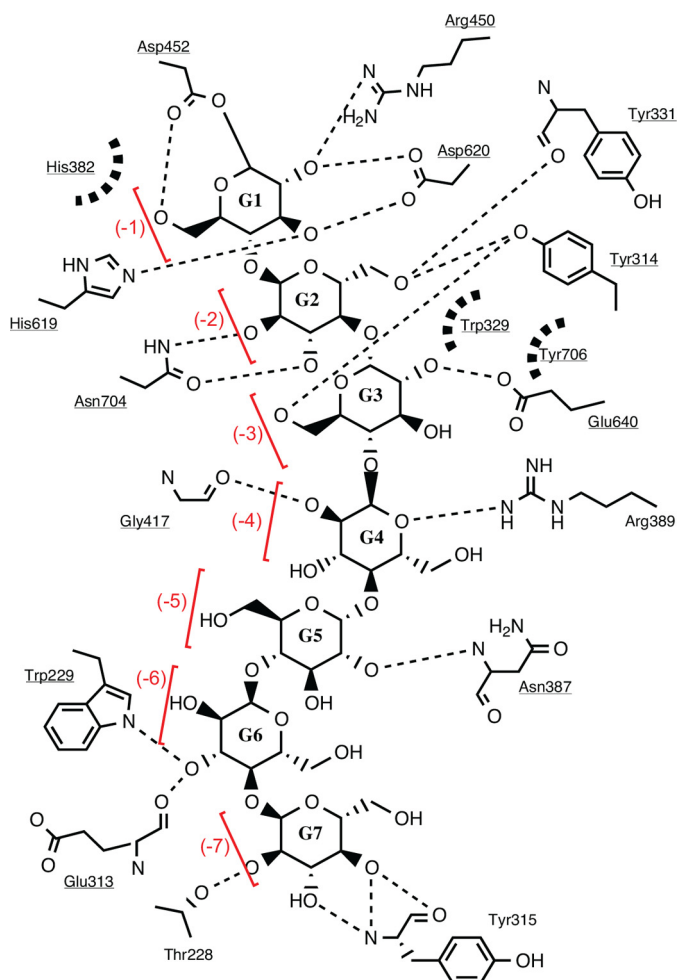


FIGURE 4. **Schematic representation of interaction between CrISA1 active site residues and maltoheptaose.** Shown as dashed lines are hydrogen bonding interactions (between 2.8 and 3.2 Å). Dashed half-moons represent hydrophobic interactions. Individual glucosyl rings are labeled G1–G7 from reducing to non-reducing end and substrate-binding subsites are labeled in red. The solid line between Asp-452 and G1 represents a covalent bond (1.48 Å). Underlined residues are absolutely conserved with plant ISA1 (maize, rice, barley, *Arabidopsis*, and potato).

ments from the 5' and 3' regions from all *sta8-1::ARG7* carrying strains, whereas only fragments corresponding to the C-terminal could be purified from the *sta8-2::ARG7* carrying strains (data not shown). These defects co-segregated in crosses with the corresponding mutant alleles. The two distinct gene disruptions of the *STA8* locus were then complemented with constructs encoding either the wild-type *ISA2* gene or *ISA2* carrying a triple HA tag (*ISA2-HA*). Characteristics of the starch isolated from wild-type strain (330), *sta8* mutant strains (BaFO6 and BaFV13), *sta8::ISA2* (O6C and V13C), and *sta8::ISA2-HA* (O6HA and V13HA) complemented strains are summarized in Table 1. Under nitrogen starvation, compared with the wild-type 330 strain, mutations in *STA8* yield a 60–80% decrease in starch content, a strong increase in the amylose content, and substantial increase in water-soluble polysaccharide accompanied by a modification of the amylopectin structure. These defects could be reversed when complemented by wild-type *ISA2* in both mutant backgrounds, as exhibited by the O6C and V13C strains, and by wild-type *ISA2*-

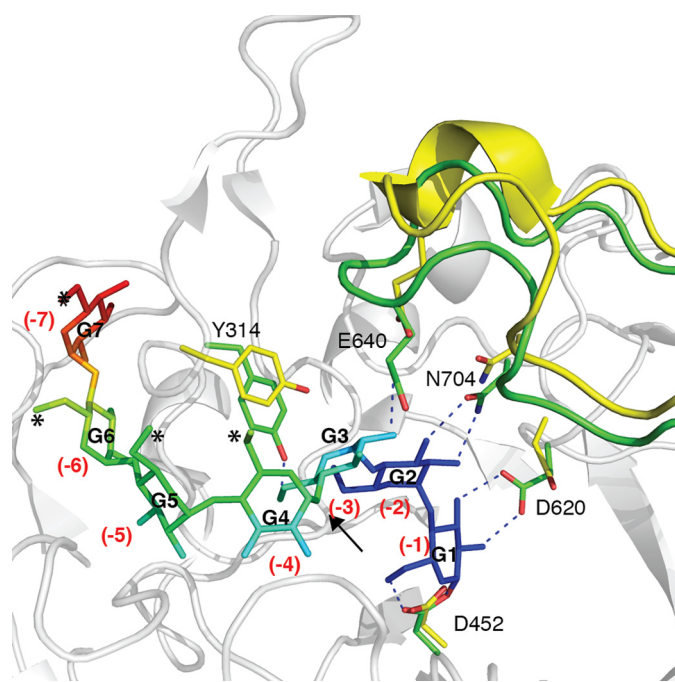


FIGURE 5. **Active site changes in CrISA1 upon binding of maltoheptaose.** Structural differences between the CrISA1 and CrISA1·M7 structures are highlighted in yellow and green, respectively. These include the loop 629–652, and residues Tyr-314, Asp-620, Glu-640, and Asn-704, which in the CrISA1·M7 structure move closer to the active site to hydrogen bond (blue dashes) with the bound M7 ligand. M7, colored according to B-factor values (blue = lowest and red = highest B factor values), binds in an S shape configuration. Asterisks mark the solvent-exposed CO6 groups and the arrow denotes the location of the kink in the M7 strand. Individual glucosyl rings are labeled G1–G7 and substrate-binding subsites are labeled in red.

HA-tagged constructs as exhibited in the O6HA and V13HA strains. These results suggest that *STA8* encodes for ISA2 and that all phenotypic defects previously recorded (15) can be traced to the absence of the ISA2 protein.

In Vivo Interaction of ISA1 and ISA2—We investigated the possible ISA1·ISA2 complex assembly in *Chlamydomonas* *in vivo*. First, we confirmed the presence of the active ISA1 enzyme in all strains. On a denaturing starch zymogram, extracts of wild-type, *sta8*, BaFV13, and V13C and V13HA complemented strains display the 88-kDa band associated with the debranching enzyme activity of ISA1 (19) (Fig. 6A). ISA1 complex assemblies were then analyzed on a native glycogen zymogram. We demonstrated that the 3–4 band pattern of varying mobility observed in wild-type is simplified to one fast moving enzyme band in the BaFV13 mutant extract (Ref. 17 and Fig. 6B). By complementation with *ISA2* and *ISA2-HA* constructs, these features were reverted back to wild-type (Fig. 6B). These zymograms demonstrate that ISA2 exists in higher order oligomeric assemblies with ISA1, and that the ISA1 enzyme is also partially functional without ISA2.

We further confirmed the ISA1·ISA2 complex by pull-down assays. ISA2-HA was pulled down from O6HA crude extracts and was run on denaturing starch-containing zymograms. A clear blue band was detected on the HA pull-down lane on the starch containing gel (Fig. 6C). From its relative migration to the bands detected in the crude extract, the band was determined to be ISA1 (7). Moreover, no other starch modifying activity (starch synthase and phosphorylase) was detected to

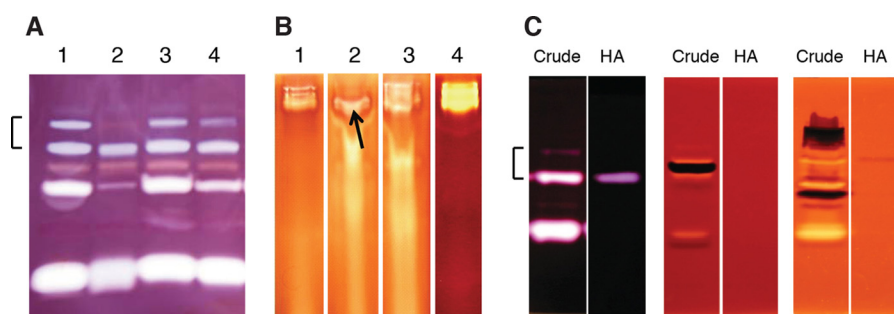


FIGURE 6. Zymogram detection of starch modifying activities from *Chlamydomonas* extracts. *A*, detection of debranching activity in denaturing starch zymogram and *B*, native glycogen zymogram in crude extracts from wild-type parental 330 strain (lane 1), *sta8* BafV13 mutant strain (lane 2), and two complemented strains V13C (lane 3) and V13HA (lane 4). *C*, detection of starch debranching (left panel), phosphorylase (middle panel), and starch synthase (right panel) activities in O6HA crude and HA pull-down extracts. In the denaturing starch zymograms (*A* and *C*, left panel), the brackets indicate the two bands associated with ISA1 activity, the lower being the 88-kDa ISA1 protein and the higher being a covalent modification of ISA1 sometimes observed depending on extract preparation. In the native glycogen containing gel *B*, the top bands are associated with activity from ISA1 and ISA1-ISA2 complexes. The arrow indicates the ISA1 homomeric complex. In the detection of starch synthase activity (*C*, right panel), although the denaturing glycogen zymogram conditions are not optimal for ISA1 activity detection, trace activity can be also seen as a faint brownish band in the HA pull-down lane.

co-elute with ISA2-HA when run on glycogen containing zymograms (Fig. 6C).

DISCUSSION

In previous studies, defects in the *STA8* locus were reported to alter starch characteristics and lead to a simplification of the isoamylase zymogram pattern on activity gels (17, 19). There was also at least a 2-fold decrease in apparent size of the isoamylase complex possibly from a hexamer or tetramer to that of a dimer (17). Although these observations have been previously observed in *ISA2* knockdown and mutant studies in maize and rice (11, 14), the molecular nature of the *STA8* locus and its relationship to the *ISA2* gene was lacking from the initial studies in *Chlamydomonas* (17, 19). We now show that starch defects in the *sta8* mutants can be almost fully reversed through functional complementation with wild-type *ISA2* and *ISA2-HA* (Table 1) suggesting the *STA8* locus encodes for *ISA2*.

In our *ISA2-HA* pulldown assays, we also show that *ISA2* interacts with *ISA1* (Fig. 6C). Combining these results with the previous *STA8* mutant studies and the above mentioned complementation studies, we can now confirm that the *ISA1* activity is present in 3 complexes: one *ISA1* homomeric and two larger *ISA1-ISA2* heteromeric complexes, similar to that observed in the maize and rice species (10, 11). In the wild-type strain, all three complexes exist and range in size from 150 to 500 kDa (as determined by gel permeation chromatography, GPC) (45), whereas in *sta8* mutants, the two larger complexes disappear leaving an *ISA1* homodimer at a size of 150 kDa (17). We have also demonstrated that the recombinant CrISA1 exists as a stable dimer (Fig. 2, *A* and *C*).

The fact that mutants lacking *ISA2* are still able both to assemble a functional isoamylase and to sustain normal rates of starch synthesis in nitrogen-supplied medium, and decreased but significant rates of semi-crystalline starch synthesis under nitrogen starvation (19), suggests that the dimeric structure of *ISA1* described in detail in this work is able to sustain starch synthesis *in vivo*, at least in alga. Through structural analysis as describe below, we investigated possible features in the *ISA1* dimer that would allow it to accomplish its role in branch trimming.

We have determined the crystal structure of CrISA1 to 2.3 Å and CrISA1·M7 to 2.4 Å. The overall structure reveals an elongated shape formed by the dimerization of two monomers in a tail-to-tail manner via their C termini (Fig. 2C). Moreover, through crystal complex studies with maltoheptaose (M7), we have mapped the active site, branch recognition cleft, and additional SBS (Fig. 3, *A*, *C*, and *D*). The covalent bond between M7 and the catalytic nucleophile D452 (Fig. 3B) suggests formation of a glycosyl-enzyme intermediate; a characteristic intermediary state in the two-step reaction mechanism of retaining glycosyl hydrolases. It has been notoriously difficult to trap substrates in wild-type family 13 glycoside hydrolase enzymes due to the high catalytic turnover rates and/or transglycosylating activities. Other intermediate trapping studies in family 13 glycoside hydrolase enzymes have been investigated with cyclodextrin transferase and human pancreatic α -amylase, however, these studies involved modified substrates and/or mutant enzymes (46, 47). Our approach was to soak in high concentrations of M7, a hydrolysis product, to trap an intermediate through the reverse mechanism. As *ISA1* is not known to possess transglycosylating activities, and likewise does not have a defined (+) acceptor-binding site (Fig. 3A), the M7 was fortuitously trapped in the CrISA1 active site. The CrISA1·M7 complex can be considered a trapped intermediate of a released branch product, and structural analysis into the binding of the “branch” provides insights into the substrate specificity of CrISA1.

We have shown from activity assays that the recombinant CrISA1 displays similar activity to that of the purified plant *ISA1* in its substrate preference for long branches of AP, β -limit dextrin and glycogen, and low activity toward pullulan (Fig. 1A). As witnessed from the binding of maltoheptaose in the CrISA1 structure, M7 binds in a twisted “S” structure (Fig. 5). In this configuration the CO6 groups from the G1, G2, and G3 moieties are either buried or hydrogen bonded to the active site residues, whereas those of G4, G5, G6, and G7 are solvent exposed (Figs. 4 and 5). This suggests that the mechanism for branch recognition requires the CO6 group of the G1, G2, and G3 adjacent to the α 1,6-branch to be accessible for optimal interaction with the CrISA1 active site. These observations

Crystal Structure of the *Chlamydomonas* ISA1 Dimer

explain the low activity of CrISA1 in hydrolyzing the α 1,6-linked maltotriose motifs observed in pullulan. If pullulan were to reside in the substrate-binding site, the branched glucosyl group would be positioned in the +1 and additionally the -3 subsites. Due to steric hindrance, it is unlikely that the branched glucosyl residue in the -3 subsite could bind in a conformation that would allow for Tyr-314 and Glu-640 hydrogen bonding interactions, as observed with the G3 glucosyl group of a linear M7 molecule (Figs. 4 and 5). Thus binding affinity would likely be reduced in pullulan compared with substrates with branches spaced further apart. In terms of the role of CrISA1 in branch trimming, we would predict that the enzyme would be less efficient at targeting densely spaced branches separated by less than 4 glucosyl units. Moreover, as the substrate-binding groove of CrISA1 only accommodates a single oligosaccharide chain, in physiological substrates, the enzyme is likely to pass over branches that are involved in double helical strands and hydrolyze more accessible single-chained branches.

The CrISA1 sequence shares ~51–54% sequence identity and 63–65% similarity to those of plant ISA1 and thus can potentially serve as a good model for better understanding the plant enzymes. Sequence alignment of selected plant ISA1 with CrISA1 reveals high conservation in the catalytic core (Fig. 7). Closer examination of the alignment reveals that active site residues are absolutely conserved and substrate-binding residues are conserved from subsites -6 to -1 (Figs. 4 and 7). This suggests that the mechanism of branch recognition and mechanism for hydrolysis is highly conserved in ISA1.

CrISA1 has three additional loops (aa 216–226, 467–485, and 585–603) that are not present in the plant ISA1 sequences (Figs. 7 and 8A). It should be noted that in the crystal asymmetric unit, loops 467–485 and 585–603 interact with one another to form a buried interface area of 785 Å², representing 2.6% of the total monomer surface area (Fig. 2B). This interface is unlikely to exist stably in the solution, as our gel filtration experiments of CrISA1 do not reveal significant amounts of tetrameric or higher order oligomeric species (Fig. 2a). However, *in vivo* experiments have shown the existence of the higher oligomeric ISA1/ISA2 species (Fig. 6B), but only in the presence of ISA2. We therefore cannot exclude the possibility that the loops contribute toward the formation of interface in higher oligomeric species and that ISA2 is required for in-solution stabilization of this interface.

We also investigated whether the dimeric tail-to-tail arrangement of CrISA1 could be conserved in other plant ISA1. The sequences encoding the structural features of the CrISA1 dimer interface were identified and compared with those of plant ISA1. Sequence alignment reveals that the structural loop-helix inserted between strands β -5 and β -6 is conserved in all ISA1 sequences and so is the hydrophobic character of the interface residues from the β 4- and β 6-strands (Fig. 2, D and E). Moderate conservation is observed in interface residues participating in non- and hydrogen bonding interactions, at least among the plant species (Fig. 2E). The conservation of several interface elements suggests that it is highly possible that the dimeric arrangement seen in the CrISA1 is maintained in other plant species. Further analysis of the ISA1-ISA2 complex in

Arabidopsis in the next section shows additional support of this hypothesis.

Sundberg *et al.* (48) investigated the structural assembly of the *Arabidopsis* ISA1-ISA2 heteromer isolated by tandem-affinity purification. Transmission electron microscopy visualization of the ISA1-ISA2 complex revealed an elongated dumbbell structure composed of two lobes (48). We revisited the idea that the ISA1 interface is conserved in plant ISA1, as the elongated shape of the *Arabidopsis* ISA1-ISA2 complex is reminiscent of the shape of the CrISA1 homodimer structure, although the ISA1-ISA2 structures have more prominent lobes. As the *Arabidopsis* ISA1-ISA2 complex was estimated to be ~30 nm in length and that of the CrISA1 dimer was shown to be ~19 nm (190 Å) (Fig. 2C), we propose that assembly of the ISA1-ISA2 heteromer is based on an ISA1 dimer scaffold (linked end-to-end as described by the CrISA1 crystal structure), with two additional ISA2 modules overlapping with ISA1 in their N-terminal regions, creating the prominent lobes. Without a higher resolution ISA1-ISA2 complex structure, we cannot predict exactly where and how ISA2 would bind. As ISA1 has been shown to exist without ISA2, at least in cereals and *Chlamydomonas*, whereas in *Arabidopsis* and potato, both ISA1 and ISA2 subunits are required for heteromer formation, the ISA1/ISA2 interface is unlikely to be conserved throughout all plants species but more likely to be conserved among the plant species that display similar ISA1-ISA2 complex distributions. Interestingly, the N-terminal region of ISA1, which is found to be disordered in the CrISA1 structure (residues 57–77), is conserved within monocots and dicots (49). The N-terminal regions of ISA1 may thus serve to mediate ISA1-ISA2 interactions.

One outstanding question that remains to be answered is how the ISA1-ISA2 complex facilitates crystallization of starch. By solving the first structure of the ISA1 dimer from *Chlamydomonas* in complex with M7, we are closer toward understanding the mechanism by which the enzyme trims misplaced amylopectin branches. Although the exact physiological substrate of ISA1 remains to be determined, the CrISA1 structure in complex with M7 reveals the molecular details of how ISA1 recognizes single-stranded branches and why tightly spaced branches are unfavorable targets for the enzyme. Moreover, the structure reveals additional SBS features and several loops that are unique to CrISA1 (Fig. 8A). Although we do not yet know the exact roles of the SBS1 and SBS2 there are numerous roles reportedly associated with SBS, including the recognition of starch structures, substrate targeting, and substrate guidance into the active site (44). Moreover, it is interesting to note the arrangement of the two substrate-binding grooves in relationship to one another. In the dimeric arrangement, the binding groove of each monomer is placed in such a way that in terms of their non-reducing ends, the branches from the target substrate (Fig. 8B) are binding in opposition to one another (Fig. 8A). Whether the active sites work together on the same target substrate to enable proper trimming of amylopectin has not been studied. Until we have a better understanding of structural features of the physiological substrate of CrISA1, we can only speculate about the cooperativity between the active sites of the two monomers. That is, perhaps assembly of the ISA1 dimer provides an ideal platform with multiple interaction points, which

Crystal Structure of the Chlamydomonas ISA1 Dimer

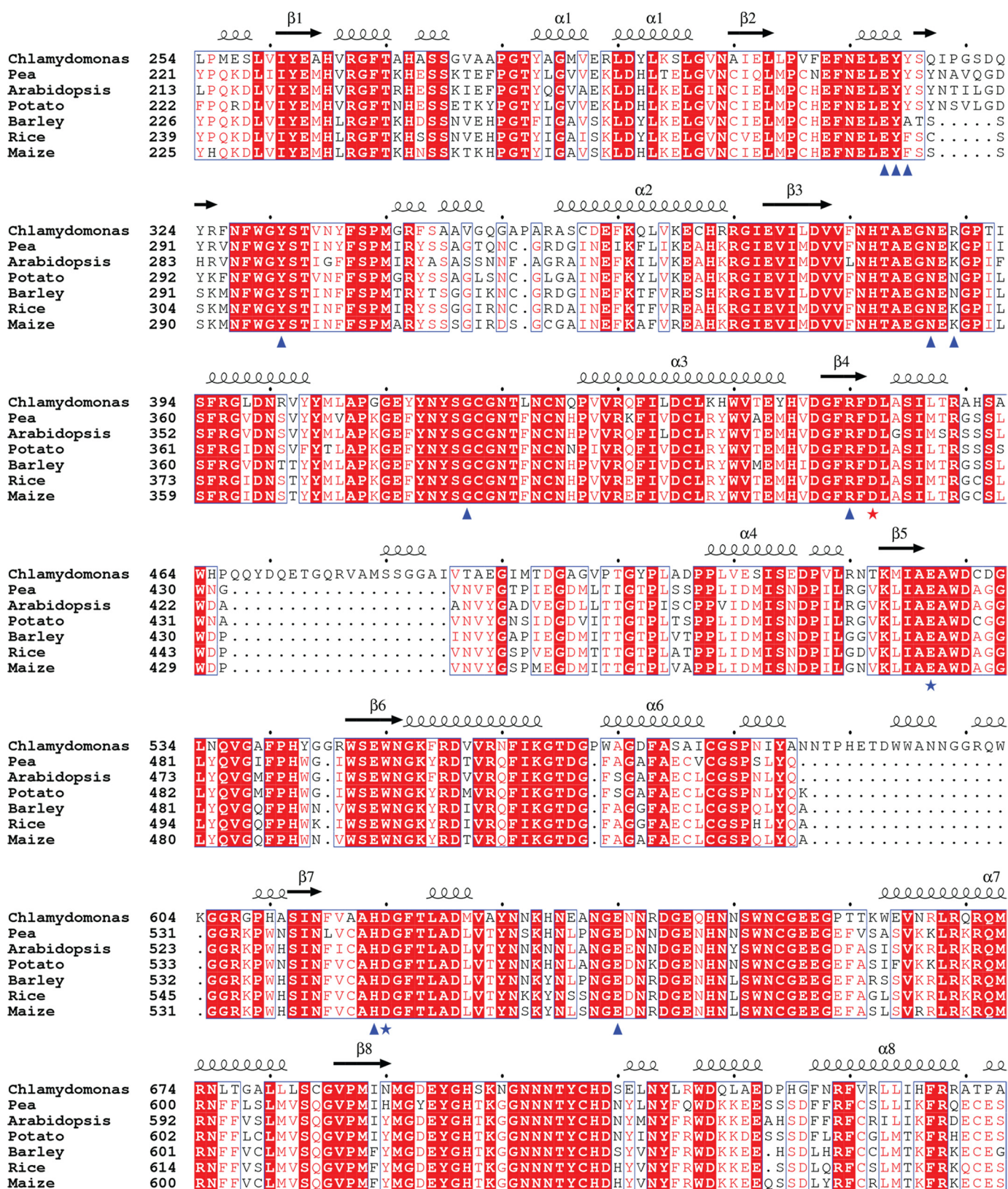


FIGURE 7. Multiple sequence alignment of plant ISA1. Shown is the alignment of the catalytic subdomain of ISA1 from *Chlamydomonas* and representative plant species. Alignment and sequences are described in the legend to Fig. 2C. Secondary structural elements shown above the alignment correspond to the CrISA1 structure. Stars mark catalytic triad residues of CrISA with the nucleophile in red and acid/base residues in blue. Hydrogen bonding residues to the maltoheptaose are marked with blue triangles. Alignment was generated using ClustalW (50) and prepared using Esript (51).

Crystal Structure of the *Chlamydomonas* ISA1 Dimer

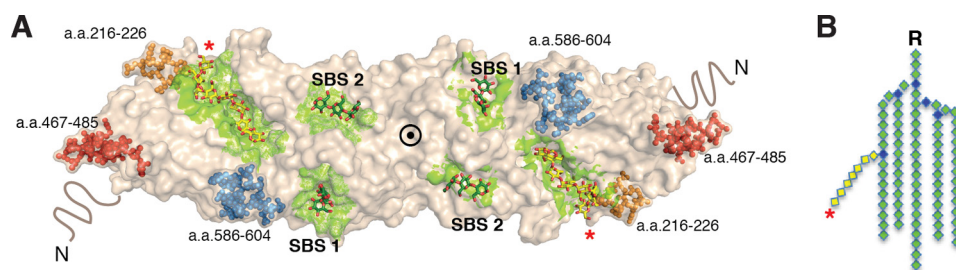


FIGURE 8. Structural features of the CrISA1 dimer. *A*, shown is the dimeric structure of CrISA1 highlighting the arrangement of carbohydrate binding sites (green) and three loop regions unique to CrISA1 (orange, red, and blue spheres). At the N-terminal regions indicated by *N*, disordered residues (aa 57–77) are drawn as wavy lines. *B*, schematic representation of a portion of an amylopectin cluster. Green diamonds represent linear α 1,4-linked glucosyl units, whereas the blue diamonds represent the α 1,6-linked glucosyl branch points. For molecule orientation in *A* and *B*, the reducing end of the branched saccharide is indicated by an *R* and non-reducing end of the branch portion to be cleaved is indicated by the asterisk.

could coordinate with one another to determine the specific branching pattern required for proper amylopectin processing and crystallization. These SBS sites and possible ISA1/ISA2 interfaces would merit further investigation through *in vitro* and *in vivo* mutational work not only in *Chlamydomonas*, but also in other plant ISA1-ISA2 starch debranching complexes.

Acknowledgments—We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility and beamline scientists at ID23-1 and ID23-2 for beam time and assistance, Dr. Jose Antonio Cuesta-Seijo for collecting diffraction data and assisting in the data processing of the CrISA1-M7 crystal, Dr. Alexander Striebeck for assistance with the enzymology, and we thank DANSCATT for access to synchrotron beam time.

REFERENCES

- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**, 85–112
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., and Smith, A. M. (2010) Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 209–234
- Pérez, S., and Bertoft, 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
- 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**, 718–725
- Ball, S. G., and Morell, M. K. (2003) From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 207–233
- Zeeman, S. C., Umemoto, T., Lue, W. L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A. M., and Chen, J. (1998) A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* **10**, 1699–1712
- Mouille, G., Maddelein, M. L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B., and Ball, S. (1996) Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* **8**, 1353–1366
- James, M. G., Robertson, D. S., and Myers, A. M. (1995) Characterization of the maize gene sugary1, a determinant of starch composition in kernels. *Plant Cell* **7**, 417–429
- Myers, A. M., Morell, M. K., James, M. G., and Ball, S. G. (2000) Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **122**, 989–997
- Utsumi, Y., and Nakamura, Y. (2006) Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm. *Planta* **225**, 75–87
- Kubo, A., Colleoni, C., Dinges, J. R., Lin, Q., Lappe, R. R., Rivenbark, J. G., Meyer, A. J., Ball, S. G., James, M. G., Hennen-Bierwagen, T. A., and Myers, A. M. (2010) Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* **153**, 956–969
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C. M., Seale, R., Nebane, N. M., Edwards, A., Martin, C., and Smith, A. M. (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2215–2220
- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M. L., and Zeeman, S. C. (2005) Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* **41**, 815–830
- Utsumi, Y., Utsumi, C., Sawada, T., Fujita, N., and 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
- Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Mouille, G., d'Hulst, C., Kossmann, J., and Ball, S. (1997) Starches from A to C: *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **115**, 949–957
- Libessart, N., Maddelein, M. L., Koornhuyse, N., Decq, A., Delrue, B., Mouille, G., d'Hulst, C., and Ball, S. (1995) Storage, photosynthesis, and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **7**, 1117–1127
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, M. K., d'Hulst, C., Wattedled, F., Liénard, L., Delvallé, D., Ral, J. P., Myers, A. M., and Ball, S. G. (2001) Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol.* **125**, 1723–1731
- Work, V. H., Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Meuser, J. E., Elliott, L. G., Vinyard, D. J., Laurens, L. M., Dismukes, G. C., and Posewitz, M. C. (2010) Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7–10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryotic Cell* **9**, 1251–1261
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Morell, M. K., d'Hulst, C., Myers, A. M., and Ball, S. G. (2001) Two loci control phytoglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **125**, 1710–1722
- Harris, E. H. (1989) *The Chlamydomonas sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.* Academic Press, San Diego
- Dauvillée, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, J.-P., Colleoni, C., Hicks, G., Wattedled, F., Deschamps, P., d'Hulst, C., Liénard, L., Cournac, L., Putaux, J.-L., Dupeyre, D., and Ball, S. G. (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **48**, 274–285
- Kindle, K. L. (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1228–1232
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszkeski, J. M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M. L., Fournet, B., and Ball, S. (1992) Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* **174**, 3612–3620
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., and von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and

- their cleavage sites. *Protein Sci.* **8**, 978–984
25. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
 26. Weiss, M. S. (2001) Global indicators of x-ray data quality. *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 130–135
 27. Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214
 28. Karplus, P. A., and Diederichs, K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336**, 1030–1033
 29. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
 30. Stein, N. (2008) CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **41**, 641–643
 31. Woo, E.-J., Lee, S., Cha, H., Park, J.-T., Yoon, S.-M., Song, H.-N., and Park, K.-H. (2008) Structural insight into the bifunctional mechanism of the glycogen-debranching enzyme TreX from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Biol. Chem.* **283**, 28641–28648
 32. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S., and Perrakis, A. (2008) Automated macromolecular model building for x-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* **3**, 1171–1179
 33. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501
 34. Winn, M. D., Isupov, M. N., and Murshudov, G. N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 122–133
 35. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
 36. Lebedev, A. A., Young, P., Isupov, M. N., Moroz, O. V., Vagin, A. A., and Murshudov, G. N. (2012) JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 431–440
 37. Nelson, N. (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375–380
 38. Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19–23
 39. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., and Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233–D238
 40. Katsuya, Y., Mezaki, Y., Kubota, M., and Matsuura, Y. (1998) Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2-Å resolution. *J. Mol. Biol.* **281**, 885–897
 41. Song, H.-N., Jung, T.-Y., Park, J.-T., Park, B.-C., Myung, P. K., Boos, W., Woo, E.-J., and Park, K.-H. (2010) Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX. *Proteins* **78**, 1847–1855
 42. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797
 43. Davies, G. J., Wilson, K. S., and Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321**, 557–559
 44. Cuyvers, S., Dornez, E., Delcour, J. A., and Courtin, C. M. (2012) Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 93–107
 45. Dauvillée, D., Mestre, V. V., Colleoni, C., Slomianny, M., Mouille, G., Delrue, B., d'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J., and Ball, S. (2000) The debranching enzyme complex missing in glycogen accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* displays an isoamylase-type specificity. *Plant Sci.* **157**, 145–156
 46. Uitdehaag, J. C., Mosi, R., Kalk, K. H., van der Veen, B. A., Dijkhuizen, L., Withers, S. G., and Dijkstra, B. W. (1999) X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 432–436
 47. Zhang, R., Li, C., Williams, L. K., Rempel, B. P., Brayer, G. D., and Withers, S. G. (2009) Directed “*in situ*” inhibitor elongation as a strategy to structurally characterize the covalent glycosyl-enzyme intermediate of human pancreatic α -amylase. *Biochemistry* **48**, 10752–10764
 48. Sundberg, M., Pfister, B., Fulton, D., Bischof, S., Delatte, T., Eicke, S., Stettler, M., Smith, S. M., Streb, S., and Zeeman, S. C. (2013) The heteromultimeric debranching enzyme involved in starch synthesis in *Arabidopsis* requires both isoamylase1 and isoamylase2 subunits for complex stability and activity. *PLoS ONE* **8**, e75223
 49. Lin, Q., Facon, M., Putaux, J.-L., Dinges, J. R., Wattedled, F., D'Hulst, C., Hennen-Bierwagen, T. A., and Myers, A. M. (2013) Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf. *New Phytol.* **200**, 1009–1021
 50. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948
 51. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Métoz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**, 305–308
 52. Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21

Annexe 3

Tunçay H.*, **Findinier J.***, Duchêne T., Cogez V., Cousin C., Peltier G., Ball S.G., Dauvillée D. (2013). A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism. *PLoS One*. 8 (9): e74763.

A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism

Hande Tunçay^{1,9}, Justin Findinier^{1,9}, Thierry Duchêne¹, Virginie Cogez¹, Charlotte Cousin^{1,2}, Gilles Peltier³, Steven G. Ball¹, David Dauvillee^{1*}

1 Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576, CNRS- Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France, **2** Institute Micalis UMR1319, INRA, Thiverval-Grignon, France, **3** UMR Biologie Végétale et Microbiologie Environnementale, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, CEA-CNRS- Aix Marseille Université, Saint-Paul-lez-Durance, France

Abstract

A screen was recently developed to study the mobilization of starch in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. This screen relies on starch synthesis accumulation during nitrogen starvation followed by the supply of nitrogen and the switch to darkness. Hence multiple regulatory networks including those of nutrient starvation, cell cycle control and light to dark transitions are likely to impact the recovery of mutant candidates. In this paper we monitor the specificity of this mutant screen by characterizing the nature of the genes disrupted in the selected mutants. We show that one third of the mutants consisted of strains mutated in genes previously reported to be of paramount importance in starch catabolism such as those encoding β -amylases, the maltose export protein, and branching enzyme I. The other mutants were defective for previously uncharacterized functions some of which are likely to define novel proteins affecting starch mobilization in green algae.

Citation: Tunçay H, Findinier J, Duchêne T, Cogez V, Cousin C, et al. (2013) A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism. PLoS ONE 8(9): e74763. doi:10.1371/journal.pone.0074763

Editor: Miguel A Blazquez, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Spain

Received: June 22, 2013; **Accepted:** August 5, 2013; **Published:** September 3, 2013

Copyright: © 2013 Tunçay et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL) and the Institut Français des Matériaux Agro-Sourcés (IFMAS). PhD grants from the Ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur (HT) and the Région Nord Pas de Calais and the Université des Sciences et technologies de Lille (JF). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: David.Dauvillee@univ-lille1.fr

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Starch represents the most widespread storage polysaccharide found in plants and algae. This insoluble polymer of glucose not only defines an essential source of calories for human and animal nutrition but is also used in many non-food applications including but not restricted to biofuel and hydrogen production. Starch is made of two distinct subfractions: the minor amylose fraction is synthesized by a starch granule bound isoform of starch synthase called GBSS (Granule Bound Starch Synthase). Amylopectin, the major fraction, confers to starch most of its physical properties and in particular its insoluble semi-crystalline nature. Even if amylopectin and glycogen share the same primary structure (they are both composed of linear glucose chains linked together through α -1,4 O-glycosidic bonds and branched in α -1,6), the synthesis of these two storage polysaccharides requires a completely different set of enzymes. While bacterial glycogen is synthesized and degraded through the use in most cases of no more than 5–6 activities [1] starch metabolism in green algae and land plants involves more than 30 different enzymes [2]. The high complexity of this metabolic pathway in the green lineage is conserved from the tiniest free-living green alga known to date to maize [2]. Starch is found in the plastids of both photosynthetic and nonphotosynthetic cells. In source organs as leaves it is accumulated during the light period and degraded in the dark to provide substrates for leaf respiration and to supply the plant with

sucrose. Transient starch turnover is crucial for normal plant growth as revealed by the reduced growth rates of mutant plants unable to synthesize or breakdown the polysaccharide [3]. Storage starch found in amyloplasts of stems, roots, seeds and tubers is remobilized to support plant development as seedling establishment after germination [4] or in response to high demand for carbon as for nectar secretion [5].

The starch biosynthetic process has been extensively studied thanks to both reverse and forward genetics approaches. The high number of enzymatic activities involved and the interaction found between them in the same protein complexes [6,7] reveal the high complexity of the anabolic pathway needed to achieve amylopectin biogenesis. It is therefore expected that mobilization of such a molecule would also require a complex catabolic pathway.

Significant progress in our understanding of starch mobilisation has been made mostly in the last decade. It now defines a very active domain of research that essentially concerns diurnal Arabidopsis leaf starch mobilisation (for review, see [8]). One of the most remarkable discoveries consists of the involvement of dikinases as essential actors of starch degradation. These enzymes, glucan water dikinase (GWD; [9]) and phosphoglucan water dikinase (PWD; [10]) were first found as minor proteins bound to starch granules and were subsequently demonstrated to phosphorylate glucose residues of amylopectin crystalline sections during starch breakdown. However, the exact link between this

phosphorylation process and the ability displayed by degradation enzymes to initiate polysaccharide mobilization is not yet fully understood. It has been recently proposed that this phosphorylation opens up the crystalline structure thereby facilitating subsequent hydrolysis [11]. The process is even more complex as specific phosphatases called Sex4 [12], and LSF2 [13] are necessary to achieve efficient starch degradation. Another homologous protein called LSF1 [14] is also necessary for efficient starch breakdown but this protein was not yet proved to contain a phosphatase activity and may act as a regulator. In addition to the initial discovery of GWD, the analyses performed on different T-DNA insertion mutants of *Arabidopsis thaliana* have yielded a working model for the recurring starch degradation occurring in leaves of this model organism [15]. Taken together, the data revealed the importance of exo-amylases (β -amylases; [16]) and a specific type of isoamylase (ISA3; [17]) as major actors of the starch degradation process in *Arabidopsis* leaves at night. Briefly, the starch granule is subjected to phosphorylation/dephosphorylation thereby allowing the action of hydrolytic activities. The maltose produced by β -amylases is then exported to the cytosol via a plastidial maltose transporter MEX1 [18]. In this compartment, a transglucosylation reaction occurs allowing the release of glucose (catalysed by DPE2, [19]). Nevertheless, the catabolic model established in *Arabidopsis* may not represent a consensus of starch mobilization in photosynthetic tissues. It may predominantly reveal a pathway that is active in only a very specific subset of physiological conditions. These may be limited to massive and immediate export of carbon in the leaf cytosol to feed the nonphotosynthetic parts of the plant at night. Moreover, even if reverse genetics was extensively used to raise this model, the most surprising steps were revealed through distinct approaches such as biochemistry for the initial dikinase discovery or forward genetics for the Mex maltose transporter. While α -amylase activities were thought not to participate to starch degradation [20] in *Arabidopsis* leaves, a recent study revealed that the degradation initiated by the glucan phosphorylation process would require the action of three hydrolytic activities including one particular isoform of α -amylase called AMY3 [21]. Hence there is room to better our knowledge of starch catabolism and to expand these studies to organisms which are not only amenable to very productive forward genetic approaches but which in addition would afford for a greater variety of physiological conditions not restricted to the massive carbon export displayed by *Arabidopsis* leaf cells. We therefore believe that the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* which has been by the past intensively used to study starch synthesis [22,23,24,25,26,27] offers a very useful model to deepen our knowledge of starch mobilization. In addition to offering an excellent forward genetics system with straightforward mutant screening procedure, *Chlamydomonas* was also shown to offer a very diverse spectrum of relevant physiological growth conditions [28] thereby mimicking source sink and storage tissues of higher plants to study the impact of diverse mutations.

In this work, we report the production and the preliminary characterization of an insertional mutant bank of the green alga model *Chlamydomonas reinhardtii*. Our goal was to assess the suitability of the phenotypic screening procedure we set up in the green alga model [29] and that was recently used to study the link between starch degradation and hydrogen production [30]. The molecular analyses performed on our mutants allowed us to identify mutations either in enzymes involved in starch degradation *per se* or in putative regulatory functions revealing the importance to combine both reverse and forward genetic approaches to obtain a clear view on starch catabolism in plants

and algae. Our data obtained so far offer valuable information for the community involved in the study of carbon metabolism in plants and reveal potential functions which may define suitable targets to control the catabolic process for bioenergy production purposes. They also not only validate the two step iodine screening procedure as a tool in identifying starch catabolic functions but also reveal the complexity of the physiological processes taking place in the cells as non directly relevant functions may have been identified too. The complete characterization of the most promising mutants including functional complementation and genetic cosegregation analyses will be described elsewhere.

Results

Generation of the insertional mutant libraries and phenotypic screening

Two independent insertional libraries were generated by transforming our *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type reference strain 137C with either the *EcoRI* linearized pSL18 plasmid [31] or with a 1,9 kb PCR product corresponding to the paromomycin cassette (see Methods). Prior to transformation the cell pellets were treated with home-made autolysin to allow the transformation with glass beads. The efficiency of transformation was clearly different as we obtained around 2000 paromomycin resistant clones with 1 μ g of linearized plasmid while less than 100 were observed with the same quantity of PCR products. This difference could be attributed to the limited size of the non-essential region of the foreign DNA which can be used during the integration process and that most of the insertions with PCR products did not confer paromomycin resistance to the algae. With this approach, we generated 3,000 and 13,000 mutants with respectively the PCR cassette and the linearized plasmid which were thereafter screened with iodine to detect the strains defective for starch catabolism.

The natural interaction between iodine and α -1,4-linked-glucans has been used extensively to study starch anabolism in *Chlamydomonas* [26]. However, as a *Chlamydomonas* strain contains enough starch to appear black while subjected to iodine vapors, the screening procedure has to be modified in order to detect strains which are potentially containing more polysaccharide than a wild-type. Two successive steps were then used to detect the strains in which the insertion has modified either the amount of polysaccharide or produce a defect in the rate of starch mobilization. In a first step, cells were spotted in duplicate on nitrogen free TAP plates and incubated for 5 days under continuous light to trigger massive starch deposition. For one of the plates, the starvation was removed after this incubation by applying 10 μ L of 0,15 M ammonium chloride and incubated in total darkness for one more day. Both plates were then subjected to iodine vapors and immediately photographed. During the incubation in the dark, a strain competent for starch mobilization will be able to degrade nearly all its storage polysaccharide and will then lose its black stain with iodine (Figure 1). A strain which is defective for starch degradation or which contained much more polysaccharide than a wild-type before the transition to darkness will remain black revealing the presence of residual starch. The figure 1 is illustrating the phenotype of the wild-type strain 137C and of 9 mutants that have been selected as putative starch catabolic mutants after a confirmation round of screening. In total, we selected 31 strains displaying a clear black phenotype after 24 h of degradation (that we named CAT1 to CAT31) from our plasmid insertional mutagenesis procedures and 7 generated with the PCR product (called CAT32 to CAT38). The same ratio of starch catabolic mutant was then observed for both foreign DNA used in this study (1 mutant for 428 resistant clones with the PCR

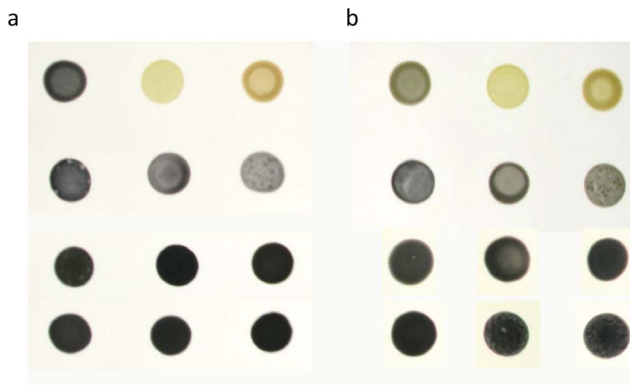


Figure 1. Two step iodine screen of putative starch catabolic mutants. Cell patches of the wild-type strain 137C, two mutant strains defective for starch biosynthesis and of the three mutant classes are displayed after staining with iodine vapors. The cells were incubated 5 days under nitrogen starvation in the light (a) or one more day in the dark after the removal of the starvation (b). The wild-type reference 137C, the BafJ4 mutant strain lacking starch and the BafR1 mutant producing only amylopectin are shown at the top while the CAT1, 6, and 9 (second lane); the CAT17, 21, and 23 (third lane); the CAT 3, 19, and 22 (fourth lane) represent respectively mutants of the three classes. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g001

product and 1 for 483 with the linearized plasmid). All these mutants were then subjected to biochemical characterizations in order to determine which of the candidates identify *bona fide* starch catabolism mutants

Biochemical characterizations of the CAT mutants

Starches accumulated by each of the CAT mutants were assayed after 5 days in liquid TAP-N medium under constant light. The amounts of storage polysaccharide accumulated in all these strains are displayed in figures 2a, 3a and 4a as percentages of the amount assayed in the wild-type. We were expecting that most of our selected mutants would have displayed a starch excess phenotype. This is clearly not the case as 16 of them contain between 64 to 119% of the wild-type value (the wild-type strain 137C contains 21 ± 4 μg of starch per million cells in our standard nitrogen starvation conditions). Fifteen CAT mutants contain a significant higher amount of starch under nitrogen starvation (ranging from 124% to 205%) and only 7 display a clear starch excess phenotype containing more than twice the amount of polysaccharide accumulated by the parental strain (from 233% to 468%). In parallel, we examined the kinetics of starch degradation in each of our strains in liquid cultures. Each strain was used to inoculate one liter of TAP-N liquid medium and grown for 5 days under continuous light. The cells were then transferred to TMP medium (without acetate) and aliquots of the culture were incubated in the dark for 4, 8 and 24 hours. For each time, starch was extracted and assayed in order to determine the amount of polysaccharide broken down. The amounts of residual starch after 24 hours of degradation are displayed in figures 2b, 3b and 4b while the complete kinetics can be found in figure S1. These kinetics experiments allowed us to identify three phenotypic classes in our mutant bank. The first group consisted in strains as efficient as the wild-type with respect to starch mobilization. In fact, after 24 hours darkness, the wild-type 137C strain still contained $28 \pm 7\%$ of its initial starch amount as did 12 of our mutants (figure 2b). Those strains which initially displayed a clear and confirmed phenotype during the 2 step screening procedure should be then either considered as false positives or as mutants

with conditional defects due to different behavior on solid and liquid medium. However, one of them called CAT37 did display a slow rate of starch mobilization during the first 8 hours of the kinetics and may represent a mutant in the signalization process (figure S1a). The second class of mutants displayed a confirmed unconditional defect in starch mobilization. These 13 strains (figure 3b) contain more residual starch than the wild-type after 24 h of degradation (from 35 to 49% of the initial amount while 137C contains 28%). Finally, the most defective strains (figure 4b) define the third class of mutants in which 13 strains harbor a strong starch degradation defect as they still contained between 56 to 97% of their initial amount of starch after 1 day in darkness. It is of prime importance to notice that for each class of mutants we observed strains containing completely different amounts of starch. Even for the most affected strains, some did contain less starch than the wild-type at the end of the starvation phase. This is clearly the case for example for strains CAT13, CAT34 and CAT35 which accumulate respectively 67, 86 and 73% of the wild-type starch amount but are still unable to degrade their polysaccharides as they still contain 81, 56, and 89% of this starch after 24 h in TMP in the dark while 137C was able to catabolize two thirds of its initial amount in the same time. This result and the fact that strains that seem to degrade efficiently while overaccumulating starch (CAT30 for example, figure 2a) reveal that there is not an obligate link between a starch excess phenotype and a defect in starch catabolism. However, the highest starch excess phenotypes are still found in the class 3 mutants corresponding to those strains which are the most impaired in starch mobilization (figure 4).

Despite that we did not expect mutants impaired in starch degradation to yield a structurally modified polysaccharide, we nevertheless analyzed on CL-2B gel permeation chromatography the amylopectin/amylose ratio and the amylopectin λ_{max} which reflects the structure of this storage polysaccharide component in our CAT mutants (figure 5). The wild-type strain 137C produces a starch composed of 20% of amylose and 80% of amylopectin with a λ_{max} of 550 nm for the latter (Figure 5a). Two of our mutants did harbor significant differences concerning either the amylopectin/amylose ratio or the amylopectin structure. CAT17 produced a starch containing a high λ_{max} amylopectin at 567 nm (Figure 5b) compared to the 552 nm recorded for the wild-type. This increase in λ_{max} is surprisingly not correlated with an amylose enrichment as is usually recorded when amylopectin synthesis is impaired (29% compared to 23% in 137C). On the other hand, the CAT31 starch displayed a high amount of amylose as this component represents 41% of the polysaccharide produced by this strain (figure 5c). In this mutant, the amylopectin structure appears unchanged (λ_{max} 553 nm). At this stage, it seems difficult to explain these modifications and further investigations on these two strains are required to explain the observed phenotypes.

In parallel, we tested the presence of the complete set of hydrolytic activities which are easily visualized thanks to our zymogram techniques in such mutants. In fact, some of our mutants may be defective for an enzymatic activity which is required for starch catabolism and zymograms may allow us to quickly ascertain the absence of one of them. In one of our mutants (CAT16), an activity producing a pink band on denaturing starch containing zymograms is lacking (figure 6a, left panel). This phenotype was confirmed on starch containing zymograms performed under native (non denaturing) conditions (figure 6a, right panel). This pink/red staining of the missing activity in CAT16 is characteristic of an increase in the amount of branches in the starch contained as substrate in the gel. Two kinds of activities can be responsible of such a modification. Branching enzyme will catalyze the introduction of new α -1,6 linked chains in

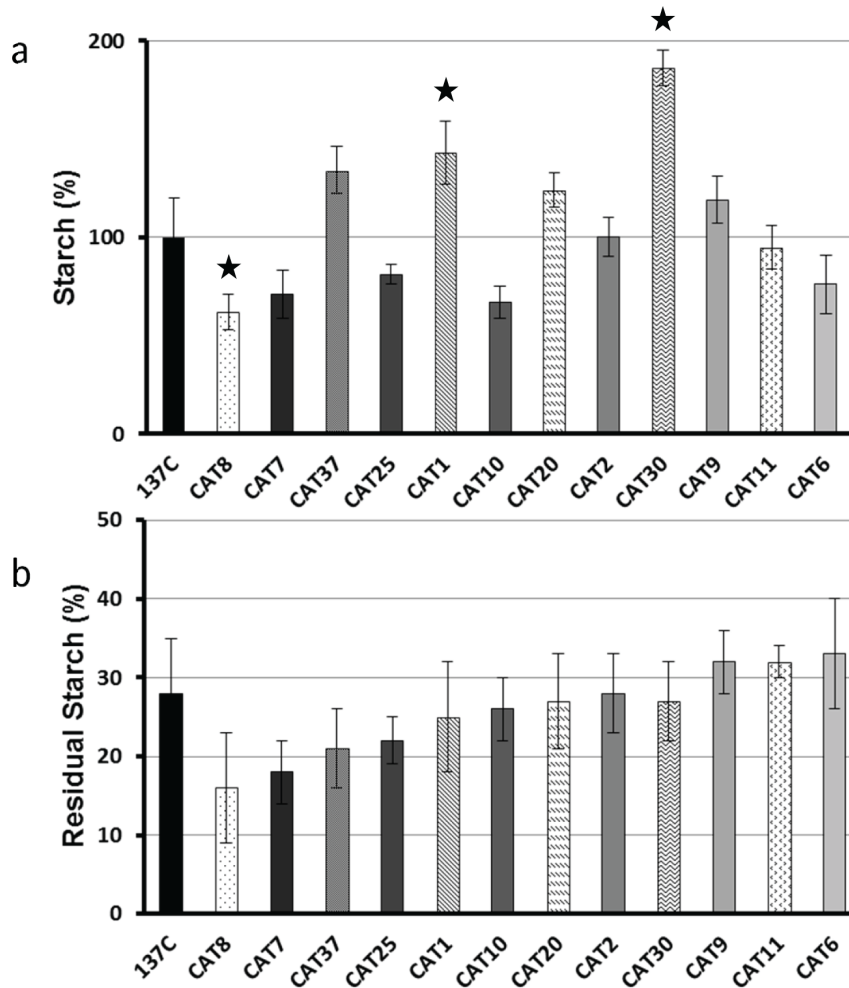


Figure 2. Starch deposition and kinetics of starch mobilization in class 1 mutants. The amount of starch assayed in the strains after 5 days under nitrogen starvation (a) is displayed as a percentage of the value assayed in the wild-type reference strain 137C ($21 \pm 4 \mu\text{g}$ per million cells) cultivated under the same conditions. The amount of starch remaining after 1 day of degradation of the same strains (b) is represented as the percentage of the initial amount measured in the corresponding strain. All data correspond to mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g002

the polysaccharide matrix and β -amylases by shortening the outer chains of starch will produce a so-called beta-limit dextrin which is enriched in branching points compared to the initial substrate found in the gel. To determine the nature of the missing activity in our mutant, we semi purified this activity and determined its precise nature as described below.

Molecular characterizations of the CAT mutants

In order to confirm the validity of our screening procedure, the mutants displaying a possible defect in starch mobilization (i.e. chiefly the class 2 and 3 mutants) were analyzed through molecular techniques in order to identify the genomic sequences of those regions flanking the insertions. Different strategies including plasmid rescue, inverse PCR and TAIL-PCR were attempted. Even if our efforts resulted in limited success, we were still able to determine in a few of our mutants the identity of the genes disrupted by the exogenous DNA. A summary of the genes identified and of the techniques used for the identification is listed in table 1. We were able to find in our mutant bank several insertions in genes which encoded enzymes previously reported as involved in starch catabolism. This is the case for the CAT3

mutant which is disrupted in a gene encoding the MEX transporter previously characterized in Arabidopsis [18]. We were also able to identify a disruption in a catalytic isoform of β -amylase (CAT4) which had been described as a major component of the transient starch degradation machinery in Arabidopsis [16]. Two additional mutants can be suspected to be defective for components of the catabolic machinery even if these functions had not yet been reported as such. This is the case for the CAT33 mutant which carries a disruption for a protein of unknown function but which contains a CBM20 starch binding module. A disruption in an oligosaccharyl transferase was also detected in CAT37 and may also represent a yet undescribed enzymatic function required for efficient starch degradation. In 4 of our mutants, we were able to identify the integration sites in different kinase activities (table 1). If the link between the starch defect and the absence of these kinase activities should be confirmed, it may unravel precious information concerning the regulation of starch catabolism. However, the phenotype on starch catabolism could also reflect indirect consequences of the absence of a kinase activity since such mutants are known to yield numerous pleiotropic effects. Finally, we detected a defect in a gene described as encoding a flagellar/

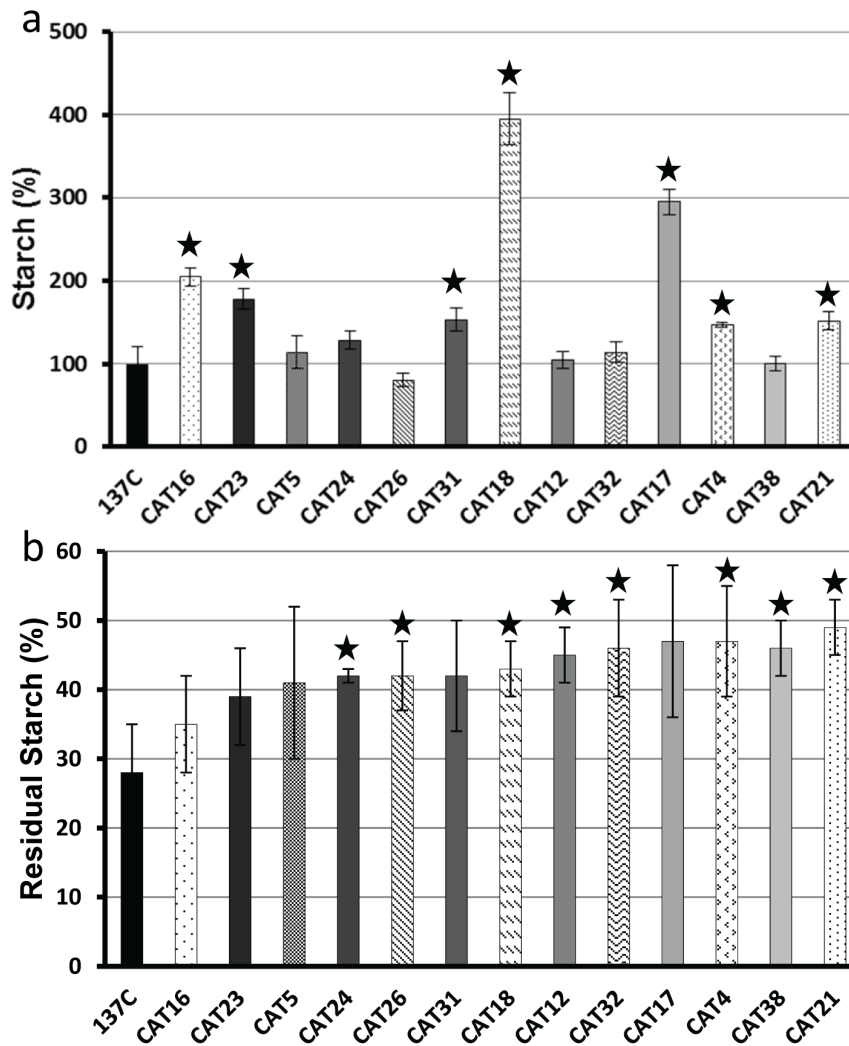


Figure 3. Starch deposition and kinetics of starch mobilization in class 2 mutants. The amount of starch assayed in the strains after 5 days under nitrogen starvation (a) is displayed as a percentage of the value assayed in the wild-type reference strain 137C ($21 \pm 4 \mu\text{g}$ per million cells) cultivated under the same conditions. The amount of starch remaining after 1 day of degradation of the same strains (b) is represented as the percentage of the initial amount measured in the corresponding strain. All data correspond to mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g003

basal body protein which could explain the starch excess phenotype found in the CAT22 mutant as motility has been previously reported to impact starch accumulation [32]. Moreover, we started backcrosses and genetic analyses of our mutants in order to check the co-segregation between the disruption and the observed phenotype. The complete genetic and biochemical characterization of some of them will be described elsewhere.

In this work, we decided to focus on the CAT16 mutant which is the only one in our bank for which we detected a clear enzymatic defect through zymograms.

The CAT16 mutant is defective for starch branching enzyme 1 and displays a starch catabolism defect

A crude extract from the wild-type strain 137C was used to semi-purify the activity missing in the CAT16 mutant (figure 6a). The wild-type extract was subjected to affinity chromatography on an amylose resin and the bounded proteins were eluted with purification buffer containing increasing amount of malto-oligosaccharides (MOS). Each elution fraction was tested on starch

containing zymograms in order to detect fractions containing the pink band forming activity free of any other hydrolytic activity. In 3 elution fractions (E1 to E3 in figure 6b which corresponds to the 3 consecutive elution with the buffer containing 0,5 mg/mL MOS) only the pink band which is missing in CAT16 could be detected on the gel while the next elutions are all contaminated with hydrolytic activities giving a white band on the gel that we already characterized as α -amylase [27]. These fractions were then used to determine the nature of the enzyme activity. To do so, 300 μL of the three fractions were incubated 2 hours in the presence of potato amylose at 30°C. The modified amylose was then stained with iodine (see methods). If the missing activity detected in the CAT16 mutant is of the beta-amylase type, then during the incubation the amylose should be entirely degraded and no interaction with iodine should be recorded. In the case of a branching enzyme activity the greenish color due to the interaction of the long amylose chains with iodine should disappear and a pink to red staining should appear due to the appearance of new branching points. In this case, the λ_{max} of the

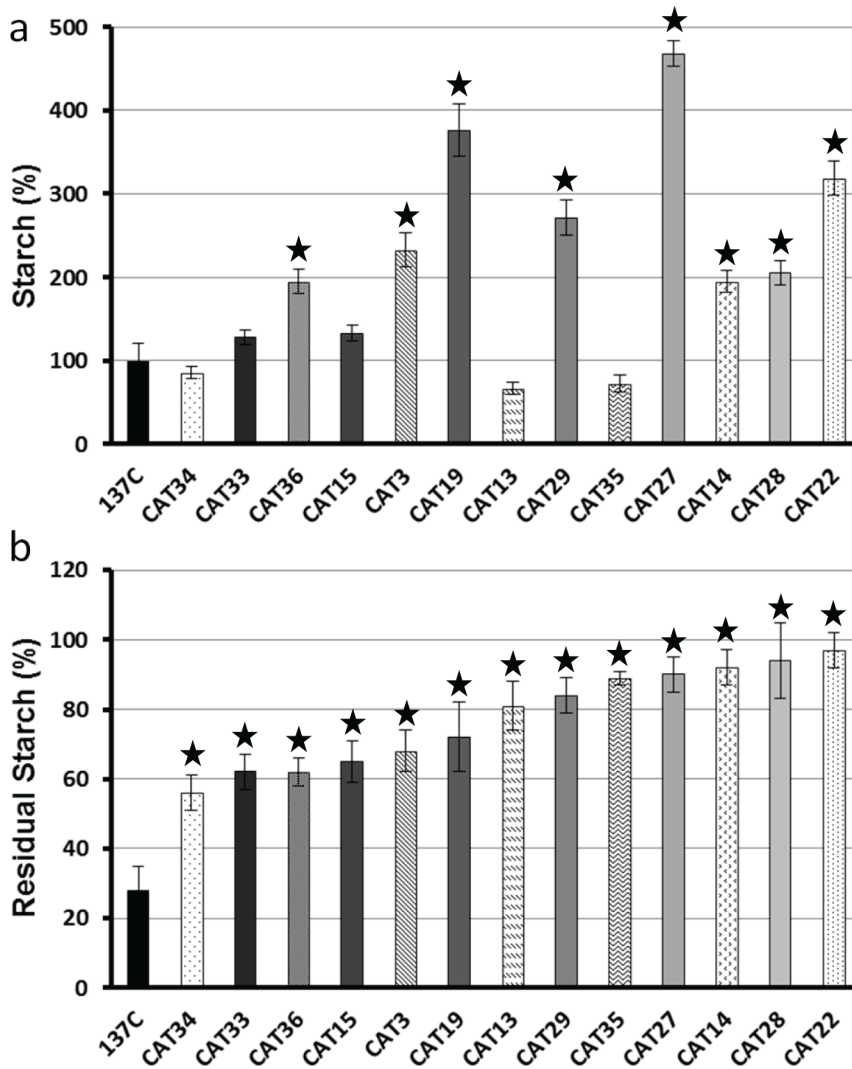


Figure 4. Starch deposition and kinetics of starch mobilization in class 3 mutants. The amount of starch assayed in the strains after 5 days under nitrogen starvation (a) is displayed as a percentage of the value assayed in the wild-type reference strain 137C ($21 \pm 4 \mu\text{g}$ per million cells) cultivated under the same conditions. The amount of starch remaining after 1 day of degradation of the same strains (b) is represented as the percentage of the initial amount measured in the corresponding strain. All data correspond to mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g004

iodine/polysaccharide complex should decrease due to the reduction in length of the glucose chains [33]. No interaction can be recorded between iodine and the purification buffer used alone (figure 6C, lane 1). A clear interaction of amylose and iodine prior to incubation is observed as revealed by a greenish color with a typical λ_{max} of 643 nm due to the long chains composing the polysaccharide (figure 6C, lane 2). In the presence of 0,5 mg/mL MOS, the λ_{max} of the amylose/iodine complex decreases but remains high at 602 nm showing a light interaction with the glucans that were used to elute the enzymatic activity (figure 6C, lane 3). After incubation with the “pink band” producing activity, the iodine interaction was completely changed as the color switched from green to red and the λ_{max} drastically decreased with values around 480 nm (figure 6C, lanes 4, 5 and 6). This modification reveals that the semi purified activity which is lacking in CAT16 is a branching enzyme activity. To ensure this modification was really due to the “pink band” detected on zymograms, the same purification procedure was used on a crude

extract of the CAT16 mutant strain which is lacking this activity (figure S2). As expected, no activity was detected in the elution fractions (figure S2B) and after incubation of these fractions with amylose, no modification of the polysaccharide was detected (figure S2C) revealing the link between the “pink/red” producing enzyme and the branching enzyme activity. As the *Chlamydomonas* genome contains three kind of branching enzymes, we tried to determine which one was missing in our mutant and if this absence was due to the insertion of the mutagenesis plasmid in the structural gene encoding the enzyme. We then designed three primers couples to amplify a part of the three branching enzyme structural genes from the CAT16 genomic DNA. We were able to amplify a fragment of *BE2a* and *BE2b* structural genes in both 137C and CAT16 while no amplification was obtained with the mutant with the primers designed to amplify a part of the *BE1* gene (figure 7a). As insertional mutagenesis in *Chlamydomonas* is known to cause deletions, the lack of amplification is a strong argument in favor of an insertion of pSL18 into the *BE1* structural

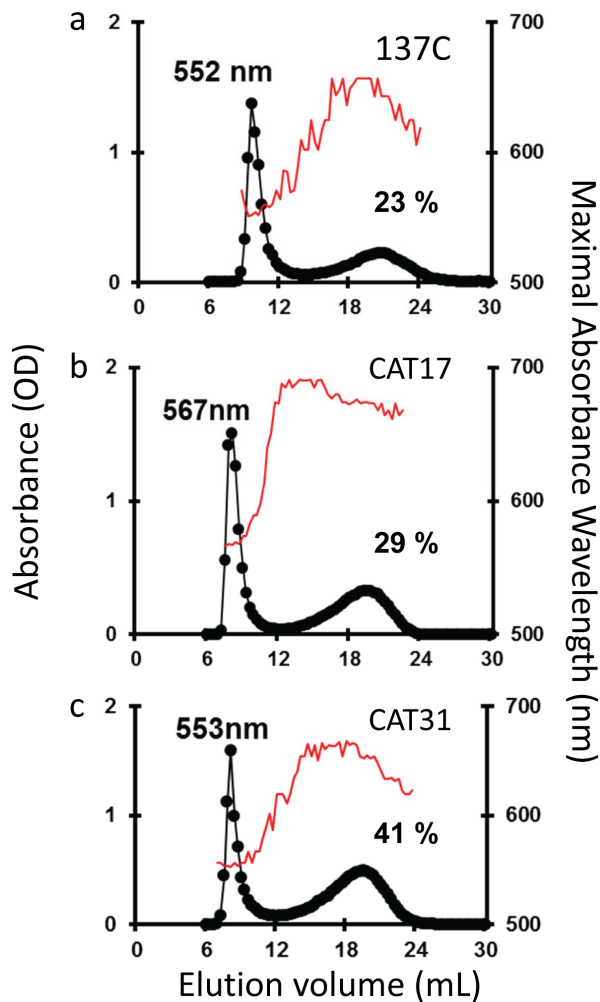


Figure 5. Separation of amylopectin and amylose by CL2B Sepharose chromatography. The optical density (●) was measured for each 0.3-mL fraction at λ_{max} (unbroken thin line). All samples were loaded on the same column setup described by [25]. The wild-type haploid 137C strain starch extracted from nitrogen starved cultures (a) displays both amylopectin and low-molecular weight amylose. Starches from the mutant strains CAT17 and CAT31 are represented in b and c respectively. The amount of amylose (%) and the amylopectin λ_{max} in nanometers are displayed on the corresponding graphs. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g005

gene. We then tested through RT-PCR the expression of the *BE1* gene. As expected, we were not able to amplify a part of the *BE1* cDNA when using the RNAs extracted from the mutant (figure 7b). These preliminary results may argue in favor of an unsuspected role of branching enzyme 1 in starch catabolism in *Chlamydomonas*.

Discussion

While the iodine vapors staining of cell patches has been proved to be an efficient way to selectively detect algal mutants affected in starch biosynthesis and (or) starch structure [26]; the use of this natural interaction had to be tested with respect to starch catabolism. A two-step procedure consisting of the staining of *Chlamydomonas* cell patches with iodine after massive starch accumulation under the light and a duplicate which is incubated one more day in darkness to trigger degradation was recently used

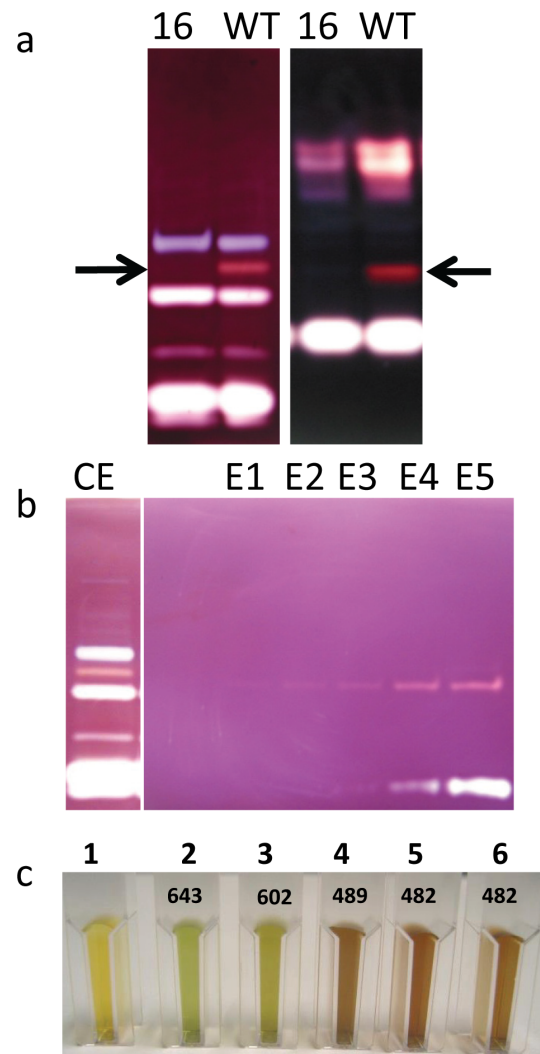


Figure 6. Partial purification of branching enzyme 1 activity. The enzymatic defect in the CAT 16 mutant can be observed through the lack of a pink or a red band (enlightened by arrows) on native (a; left panel) and denaturing (a; right panel) starch zymograms respectively. The lack of contaminating activities in the first elution fractions (E1 to E3) of the amylose column chromatography was assessed on starch denaturing zymogram (b). (c) Interaction of polysaccharides with iodine. Samples 1 to 6 correspond respectively to the iodine alone (1), the interaction of the latter with the unmodified amylose in the absence (2) or in the presence of the MOS in elution buffer (3). The iodine interaction of the polysaccharide modified by the enzyme contained in the 3 elution fractions are displayed in 4, 5 and 6. The values of the λ_{max} of each complex is indicated on the figure in nanometers. doi:10.1371/journal.pone.0074763.g006

to produce mutants and study the link between polysaccharide degradation and photosystem II-independent hydrogen bioproduction [30]. However, in this study, the mutations were not characterized and it appeared important to ascertain that true starch catabolic mutants could be obtained through this screening procedure. Several physiological processes suspected to be highly regulated impact the amount of polysaccharide remaining after incubation in darkness during the phenotypic screening procedure. First, the cells are incubated 5 days on solid medium without nitrogen which triggers starch deposition. Depending of the strain genotype, the amount of storage polysaccharide accumulated can be different from strain to strain and thereby affect the intensity of

Table 1. List of mutants whose molecular nature was identified through molecular or biochemical techniques.

Strain	Origin	Identification Technique	Insertion (Phytozome v9.0)
CAT3	Plasmid	Inverse (T1&T2) <i>BssHII</i>	Cre12.g486600, Maltose exporter-like protein
CAT4	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BssHII</i>	Cre06.g307150, Beta-amylase
CAT16	Plasmid	Zymograms	Cre06.g289850, Branching enzyme 1
CAT33	PCR	TAIL	Cre02.g091750, CBM20 Starch Binding Domain containing protein
CAT37	PCR	TAIL	Cre07.g330100, Oligosaccharyl transferase STT3 subunit
CAT15	Plasmid	Plasmid rescue <i>Apal</i>	Cre16.g689550, Putative tyrosine kinase
CAT24	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>EaeI</i>	Cre06.g307100, ABC1/COQ8 Ser/Thr kinase
CAT26	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BsrBI</i>	Cre02.g107000, Putative protein Kinase
CAT14	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BssHII</i>	Cre06.g266150, Putative kinase
CAT22	Plasmid	Inverse (P1&P2) <i>BssHII</i>	Cre07.g338300, Putative flagellar/basal body protein

doi:10.1371/journal.pone.0074763.t001

the stains. New signals have to be integrated by the cells when

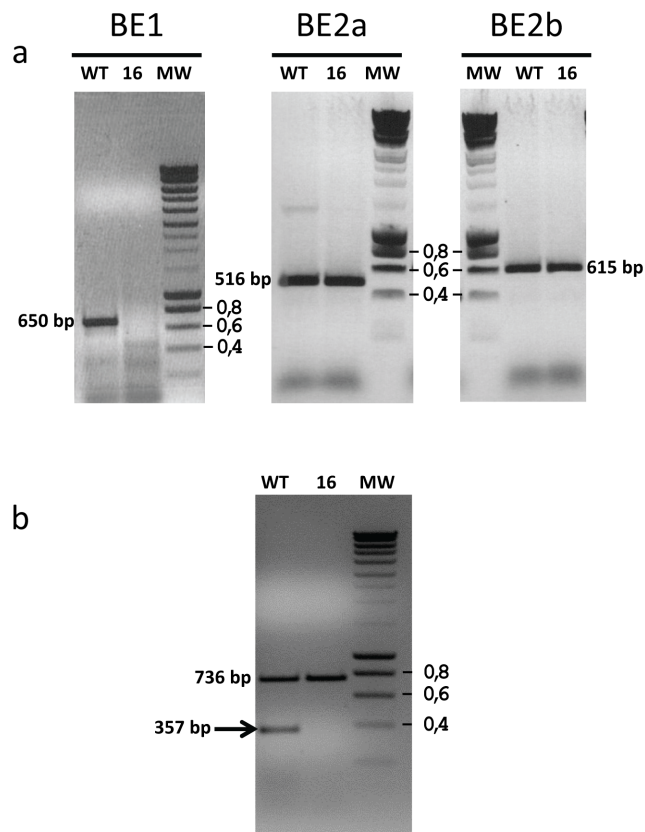


Figure 7. Molecular characterization of the CAT 16 mutant. (a) Amplification of a part of each of the three branching enzyme structural genes was performed on genomic DNA extracted from the wild-type reference 137C (WT) and from the mutant (16). The amplification products sizes for the *BE1*, *BE2a* and *BE2b* structural genes were 650, 516 and 615 bp respectively. (b) RT-PCR analysis performed on total RNAs extracted from the wild-type and the CAT16 mutant allowing the amplification of a 736 bp fragment of the *PHOB* structural gene and a 357 bp fragment of the *BE1* structural gene (indicated by an arrow). Smart ladder (Eurogentec) was used as molecular weight marker (MW), the standard fragments corresponding to 0.4, 0.6 and 0.8 kbp are indicated.

doi:10.1371/journal.pone.0074763.g007

starvation is removed and cell patches transferred to darkness. At this stage again, a high amount of residual starch which will impact the stain intensity can reflect not only the presence of a defect for a starch catabolic function but also any mutation influencing the complex machinery responsible for the detection of either the switch to darkness or the starvation status and the equally complex signaling cascades. We then decided to conduct an insertional mutagenesis assay in *Chlamydomonas* in order to ensure that true starch catabolic mutants could indeed be recovered. Our major goal in this work was then to ascertain that we could recover mutations in genes previously reported or suspected to be selectively involved in starch mobilization. In this case, the effectiveness and at least partial selectivity of the screening procedure would be confirmed thereby allowing a certain level of confidence for the discovery of unsuspected functions.

From 16,000 paromomycin resistant colonies obtained after insertional mutagenesis (13,000 with the linearized pSL18 plasmid and 3,000 with a PCR product corresponding to the resistance cassette) we were able to isolate 38 independent strains which harbor a clear defect for starch mobilization with the two-step iodine screening procedure. Through kinetics of starch mobilization, we were able to show that 12 of these 38 mutants do degrade starch with the same efficiency as the wild-type. Those strains may be either false positive or strains in which the efficiency of starch degradation is not the same on solid and liquid medium. The 26 other mutants were all less effective than the wild-type with respect to starch mobilization and define two different phenotypic classes. The so-called class 2 mutants display a mild phenotype but with a significant starch degradation impairment as these 13 mutants still contain between 35 to 49% of their initial polysaccharide amounts after 1 day of degradation compared to the 28% recorded for the isogenic wild-type. The most defective strains were found in the class 3 for which 13 mutants still contain from 56 to 97% of the initial polysaccharide amounts assayed before degradation. It is worth noting that starch over accumulation and impairment in starch degradation were not linearly linked as overproducers are found in the mutants of class 1 (the one degrading starch with good efficiency) while even in class 3 mutants containing the mutants the most dramatically impaired for starch degradation, some of the strains accumulated nearly wild-type amounts of polysaccharide. These results may reflect the high complexity of the process involved in the regulation of starch deposition and catabolism in *Chlamydomonas*.

For the 26 strains for which a real defect for starch degradation was confirmed thanks to the kinetics of polysaccharide mobilization in liquid cultures, we used several strategies including the starch structure determination, visualization of the starch hydrolytic activities through the use of zymograms and molecular techniques in order to identify the missing function responsible for the catabolic phenotype.

Even if a defect in starch catabolism is not expected to lead to a modification of starch structure, two of our mutants displayed modification either in the amylopectin/amylose ratio or in the amylopectin structure. The CAT31 mutant contains a high amount of amylose as this starch subfraction represents 41% of the total polysaccharide for only 23% in the wild-type. This increase in amylose is not accompanied by a strong modification of amylopectin which displays the classical λ_{\max} value around 550 nm. At the opposite, the CAT17 mutant produces a modified amylopectin with a high λ_{\max} at 567 nm but no amylose increase in this polysaccharide can be recorded. As for now, it is difficult to explain these modifications and the link between the modified structure and the defect in starch degradation cannot be easily explained. The identification of the disrupted functions in these strains will possibly yield some understanding on the reasons for these observations.

The molecular experiments including plasmid rescue, inverse PCR and TAIL PCR allowed us to identify several candidates which still need to be validated as responsible of the starch degradation defects. Nevertheless, the detection of a copy of the mutagenesis plasmid in the structural genes encoding the maltose transporter Mex (CAT3) or an isoform of β -amylase (CAT4), both functions already demonstrated to impact efficient starch mobilization, are encouraging with respect to the specificity of our mutant screen. Several disrupted functions which may be related to polysaccharide metabolism were also identified as a starch binding domain containing protein in CAT 33 or an oligosaccharyl transferase in CAT 37. Such oligosaccharyl transferase are known to be involved in protein N-glycosylation in the ER lumen [34]. The effect on starch catabolism if really linked to this insertion may reflect a consequence of the malfunction of important proteins involved in starch catabolism or also be related to the building in a direct or indirect manner of the heteroglycan which plays a central role in maltose breakdown in the cytosol [35]. Four independent insertions in structural genes encoding kinase activities were also recorded in the CAT14, 15, 24 and 26 mutants. However, at this stage we are not sure these mutations are directly responsible for the slower starch degradation observed in these strains.

One single mutation was identified through the use of zymogram techniques allowing visualization of hydrolytic activities. The missing activity in the CAT 16 mutant was identified as a branching enzyme activity. The molecular characterizations allowed us to prove that this strain was defective for branching enzyme 1, an enzyme for which no function in starch metabolism has been reported so far. A recent study performed in maize revealed a slight modification of starch structure in this homologous mutant [36]. The endosperm starch produced by the *shel1a* mutant was more resistant to α -amylase digestion. During kernel germination, shorter coleoptile lengths and higher residual starch were recorded leading to the hypothesis that less efficient starch utilization was taking place in this mutant. However, at this stage a role of branching enzyme 1 in starch catabolism in *Chlamydomonas* can only be suggested as this and the other mutants reported in this work have to go through a more detailed and comprehensive characterization. Nevertheless, the recovery of such a “mild” defect in starch catabolism suggests that the iodine

screening procedure in *Chlamydomonas* is quite sensitive and effective in this respect.

The discovery of mutants for Mex or β -amylase which are already known as important starch degradation enzymes reveals the two step iodine phenotypic screen as an efficient tool to isolate novel starch catabolic mutants. We believe that the sensitivity of this mutant screening procedure and the physiological plasticity of the *Chlamydomonas* model will enable this system to bring further light into the complex machinery responsible for starch mobilization in green plants and algae.

Methods

Chlamydomonas reinhardtii Strains, Growth Conditions, and Media

The wild-type reference *C. reinhardtii* strains used in this study were 137C (*mt- nit1 nit2*) and 37 (*mt+ ac14 pab2*). All experiments were carried out in continuous light (40 mE m⁻² s⁻¹) in the presence of acetate at 24°C in liquid cultures that were shaken without air or CO₂ bubbling. Late-log phase cultures were inoculated at 10⁵ cells mL⁻¹ and harvested at 2–3.10⁶ cells mL⁻¹. Nitrogen-starved cultures were inoculated at 5.10⁵ cells mL⁻¹ and were harvested after 5 days at a final density of 1 to 2.10⁶ cells mL⁻¹. Recipes for media can be found in [37]. For starch degradation kinetics experiments, the cells harvested after 5 days under nitrogen starvation were collected in sterile conditions and transferred in TMP (TAP medium without acetate; [37]) liquid medium and incubated in the dark for 4, 8 and 24 hours. Starch was purified from these samples and the amount of remaining polysaccharide was assayed and compared to the initial starch amount assayed before the switch to darkness.

Determination of Starch Levels, Starch Purification, and Spectral Properties of the Iodine-Starch Complex

A full account of amyloglucosidase assays, starch purification on Percoll gradient, separation of amylose and amylopectin on CL-2B gel permeation chromatography and λ_{\max} (maximal absorbance wavelength of the iodine polysaccharide complex) measures can be found in [25].

Generation of the Mutant Library

The wild-type *Chlamydomonas* reference strain 137C was transformed with either *EcoRI* linearized pSL18 vector [31] which carries the *AphVIII* gene (aminoglycoside 3'-phosphotransferase from *Streptomyces rimosus*) conferring resistance to paromomycin, or with a 1,9 kb PCR product of this plasmid corresponding to the resistance cassette in order to produce transformants according to the protocol described in [38]. The paromomycin cassette was amplified from the pSL18 plasmid with the primers ParoF (5'-ACCATGATTACGCCAAGCGCGCAA-3') and ParoR (5'-CTCGACATGCGTTCACCTCCTGTC-3') using Dynazyme Ext (Finnzymes, Espoo, FI) following the manufacturer recommendation with an annealing temperature at 55°C and an extension time of 2 minutes for 30 cycles.

After transformation, cells were plated on paromomycin supplemented TAP (10 mg/l) plates for the selection of transformant lines.

Iodine screening of putative starch catabolism mutants

The putative catabolic mutants were screened on the basis of their iodine/starch interaction which reflects the amount of polysaccharide in the cells. Cellular patches (20 μ L) of the wild-type reference strain 137C, the already characterized mutants

Table 2. TAIL-PCR and inverse PCR cycling parameters used to isolate flanking DNA from insertional mutants.

TAIL PCR			
Reaction	Step	Thermal settings	N° of cycles
Primary	1	93°C, 2 min; 95°C, 1 min	1
	2	94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min	7
	3	94°C, 1 min; 25°C, 1 min; ramping to 72°C over 3 min; 72°C, 2.5 min	1
	4	94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 48°C, 1 min; 72°C, 3 min	15
	5	72°C, 5 min	1
Secondary	1	94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 65°C, 1 min; 72°C, 3 min; 94°C, 30 s; 44°C, 1 min; 72°C, 3 min	15
	2	72°C, 5 min	1
Tertiary	1	94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C, 3 min	30
	2	72°C, 5 min	
INVERSE PCR			
	Step	Thermal Settings	N° of cycles
	1	95°C, 1 min	1
	2	95°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 3 min	30
	3	72°C, 10 min	1

doi:10.1371/journal.pone.0074763.t002

BafJ4 [27] and BafR1 [25] which are respectively defective for isoamylase and granule-bound starch synthase and of putative mutants were incubated on nitrogen free solid medium (TAP-N) for 5 days under continuous light in duplicate. Ten microliters of 0.15 M ammonium chloride were added to each spot of one of the two plates and these Petri dishes were incubated 24 hours in complete darkness in order to trigger starch degradation. Both control and test dishes were exposed to iodine vapor and photographed.

Zymograms, Partial Purification and characterization of branching enzyme activity

Zymograms in starch containing gels allowing the detection of most starch hydrolases and branching enzymes have been described for both undenatured samples [39] and for denatured enzymes [27]. The semi-purification of the activity generating the pink/red staining band on starch-containing zymograms was performed from 1 liter of exponential phase TAP culture of the reference strain 137C. Algae were disrupted by sonication in purification buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5; 10 mM EDTA; 8 mM DTT). Twenty five mg of total proteins were incubated with an amylose affinity resin (New England Biolabs, Ipswich, MA) for 10 minutes at 4°C. The affinity resin was then washed 3 times with 5 mL of purification buffer and bound proteins were eluted with 3 times one mL of buffer containing increasing concentrations of malto-oligosaccharides (0.5, 1, 2, 5 and 10 mg/mL MOS in purification buffer). Fifty microliters of each elution fraction were subjected to zymogram analysis to detect the elution fractions free of interfering activities (i.e. containing only the pink band). These fractions (300 µL) were incubated for 2 hours at 30°C in the presence of 1 mg of potato amylose (Sigma, St. Louis, MO). The polysaccharides were then collected by ethanol precipitation (1.2 mL 100% ethanol; 13000 g 10 min., 4°C). The dried pellets were then resuspended in 100 µL of 10 mM NaOH and the interaction with iodine was assessed by adding 200 µL of Lugol

reagent (0.01% I₂; 0.1% KI) and 700 µL of distilled water. The absorbance was measured every nanometer between 400 and 700 nm to determine the wavelength of the maximal absorbance of the iodine-polysaccharide complex (λ_{max}) which reflects the polysaccharide structure.

Nucleic acid Techniques

Total RNA was extracted from *Chlamydomonas* according to Merendino et al., 2003[40]. RT-PCR analysis was performed on 1 µg of total RNA using the One Step RT-PCR Kit (Qiagen) following the manufacturer recommendation. Amplification was achieved with an annealing temperature of 60°C in the presence of Q-solution with the 4 following primers. The BE1RT5 (5'-GAGAGTCACGACCAGGCTCTG-3') and BE1RT3 (5'-GAAGCCGTAGTGGTTGTCGAG-3') allow the amplification of a 357 bp fragment of *BE1* mRNA while PhoBRT5 (5'-GCATGTTCCGCCAGACCA-3') and PhoBRT3 (5'-TGCAG-GAAGCGCCAGTTGA-3') primers are used to amplify a 736 bp fragment of the *PhoB* mRNA used as an internal control. PCR products [23] were resolved in 2% (w/v) agarose gels.

Total DNA from wild-type and mutant strains was extracted as previously described [41].

The integrity of branching enzymes genes was checked by amplifying parts of the corresponding DNA with Dynazyme Ext (Finnzymes, Espoo, FI) following the manufacturer recommendation with an annealing temperature of 60°C and an extension time of 1 minute for 30 cycles. A 650 bp genomic DNA fragment corresponding to BE1 (XM_001695339) was amplified in the reference wild-type using the BE1 FOR5 (5'-ATGGCTGC-GAGGCCGCTTCAG-3') and BE1 REV3 (5'-ACGACCGCC-TACACGCCCTG-3') primers, while BE2aFor5 (5'-CAATGG-CACACCTCCTCCAC-3') and BE2aRev3 (5'-GTTGAACGTGATCTCGTTCAG-3') primers were used to amplify a 516 bp DNA fragment and BE2bFor5 (5'-CTTACTCGCACACAGCAAGCTG-3') and BE2bRev3 (5'-CTTGAAGGTGTACTGCTT

GTC-3') a 615 bp fragment corresponding respectively to the *BE2a* (XM_001696177) and *BE2b* (XM_001690270) genes.

Thermal asymmetric interlaced PCR and inverse-PCR were used to obtain the DNA flanking the paramycins cassette or pSL18 insertion sites [42, 43, 44]. Homology searches were performed using the BLAST server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; [45]), and at Phytozome site (http://www.phytozome.net/search.php?show=blast&method=Org_Creinhardtii). For TAIL-PCR the primers used were the degenerated primer AD2 (5'-NGT CGASWGANAWGAA-3') and 3 specific primers, TAIL1 (5'-GTGCTCGTTTTGTCTCGCTGAAAGT-3'), TAIL2 (5'-CAAAT-CAGTCTCTGTAGCTTCA-3'), and TAIL3 (5'-ACATACGCA CCAATCATGTCA-3') used respectively for the primary, secondary and tertiary reactions. For inverse PCR, the P1 (5'-CATGTTTGCCCGAACTCGGAG-3') and P2 (5'-CATTTG CCTGCCTTCACGCATC-3') or the T1 (5'-TGCATGTA ATGGCCAGGCCATG-3') and T2 (5'-ACTGGCTCACGCA CACGCTAAC-3') primers allowed the amplification of the genomic DNA flanking each side of the unique *EcoRI* site used to linearize the pSL18 plasmid. The cycling parameters for all reactions of TAIL-PCR and inverse PCR are described in Table 2.

Supporting Information

Figure S1 Kinetics of starch mobilization in the insertion mutants. The amount of starch measured in the CAT mutant strains is displayed as percentages of the initial content after 4, 8 and 24 h of degradation. The class 1 mutants are

presented in a while the class 2 and 3 are shown in b and c respectively. Each bar is mean \pm SE of three independent experiments. Significant differences with the wild-type 137C ($p < 0.05$) are indicated with a star. (TIF)

Figure S2 Partial purification of branching enzyme 1 activity from the CAT16 mutant crude extract. The enzymatic defect in the CAT 16 mutant can be observed through the lack of a pink or a red band (enlighted by arrows) on native (a; left panel) and denaturing (a; right panel) starch zymograms respectively. This activity cannot be detected in the first elution fractions (E1 to E3) of the amylose column chromatography as it was the case with the wild-type crude extract as revealed by analysis on starch denaturing zymogram (b). (c) Interaction of polysaccharides with iodine. Samples 1 to 6 correspond respectively to the iodine alone (1), the interaction of the latter with the unmodified amylose in the absence (2) or in the presence of the MOS in elution buffer (3). The iodine interaction of the polysaccharide incubated with the 3 elution fractions (E1 to E3) are displayed in 4, 5 and 6. The values of the λ_{max} of each complex is indicated on the figure in nanometers. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GP SGB DD. Performed the experiments: HT JF TD VC CC. Analyzed the data: GP SGB DD. Wrote the paper: SGB DD.

References

- Wilson WA, Roach PJ, Montero M, Baroja-Fernández E, Muñoz EJ, et al. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria *FEMS Microbiol Rev* 34(6): 952–985.
- Deschamps P, Moreau H, Worden AZ, Dauvillée D, Ball SG (2008) Early gene duplication within Chloroplastida and its correspondence with relocation of starch metabolism to chloroplasts. *Genetics* 178: 2373–2387.
- Smith AM, Stitt M (2007) Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell Environ* 30: 1126–1149.
- Fincher GB (1989) Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating grain cereal grains. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 305–346.
- Razem FA, Davis AR (1999) Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L during flower development. *Protoplasma* 206: 57–72.
- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, et al. (2008) Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multi-subunit complexes. *Plant Physiol* 146(4): 1892–1908.
- Tedlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, et al. (2008) Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiol* 146(4): 1878–1891.
- Smith AM, Zeeman SC, Smith SM (2005) Starch degradation. *Annu Rev Plant Biol* 56: 73–98.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, et al. (2002) The starch-related R1 protein is an alpha-glucan water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(10): 7166–7171.
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, et al. (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves: The phosphoglucan water dikinase. *Plant Physiol* 137(1): 242–252.
- Hejazi M, Fetteke J, Haebel S, Edner C, Paris O, et al. (2008) Glucan water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J* 55(2): 323–334.
- Hejazi M, Fetteke J, Kötting 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 Physiol* 152(2): 711–722.
- Santelia D, Kötting O, Seung D, Schubert M, Thalmann M, et al. (2011) The phosphoglucan phosphatase like sex Four2 dephosphorylates starch at the C3-position in Arabidopsis. *Plant Cell* 23(11): 4096–4111.
- Comparot-Moss S, Kötting O, Stettler M, Edner C, Graf A, et al. (2010) A putative phosphatase LSF1 is required for normal starch turnover in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 152(2): 685–697.
- Weise SE, Schrader SM, Kleinbeck KR, Sharkey TD (2006) Carbon balance and circadian regulation of hydrolytic and phosphorolytic breakdown of transitory starch. *Plant Physiol* 141(3): 879–886.
- Fulton DC, Stettler M, Mettler T, Vaughan CK, Li J, et al. (2008) Beta-AMYLASE4 a noncatalytic protein required for starch breakdown acts upstream of three active beta-amylases in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* 20(4): 1040–1058.
- Wattebled F, Dong Y, Dumez S, Delvallé D, Planchot V, et al. (2005) Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyloglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol* 138(1): 184–195.
- Niitylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, et al. (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* 303(5654): 87–89.
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, et al. (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *Plant J* 37(6): 853–863.
- Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, et al. (2005) Alpha-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *J Biol Chem* 280(11): 9773–9779.
- Streb S, Eicke S, Zeeman SC (2012) The simultaneous abolition of three starch hydrolases blocks transient starch breakdown in Arabidopsis. *J Biol Chem* 287(50): 41745–41756.
- Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, Buléon A, Gallant D, et al. (1999) Genetic and biochemical evidence for the involvement of α -14 glucanotransferase in amylopectin synthesis. *Plant Physiol* 120: 993–1004.
- Dauvillée D, Chochois V, Steup M, Haebel S, Eckermann N, et al. (2006) Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 48: 274–285.
- Dauvillée D, Colleoni C, Mouille G, Morell M, D'Hulst C, et al. (2001) Biochemical characterization of wild-type and mutant isoamylases of *Chlamydomonas reinhardtii* supports a function of the multimeric enzyme organization in amylopectin maturation. *Plant Physiol* 125: 1723–1731.
- Delrue B, Fontaine T, Routier F, Decq A, Wieruszski JM, et al. (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(11): 3612–3620.
- Hicks GR, Hironaka CM, Dauvillée D, Funke RP, D'Hulst C, et al. (2001) When simpler is better: Unicellular green algae for discovering new genes and functions in carbohydrate metabolism. *Plant Physiol* 127(4): 1334–1338.
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, et al. (1996) Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* 8(8): 1353–1366.

28. Libessart N, Maddelein ML, Koornhuysen N, Decq A, Delrue B, et al. (1995) Storage Photosynthesis and Growth: The Conditional Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 7(8): 1117–1127.
29. Bellanger F (1994) «La mutagenèse par insertion d'ADN chez *Chlamydomonas reinhardtii*: une nouvelle voie pour l'élucidation de la biosynthèse de l'amidon» PhD thesis Université de Technologie de Compiègne France.
30. Chochois V, Constans L, Dauvillée D, Beyly A, Soliveres M, et al. (2010) Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Hydrogen Energy* 35: 10731–10740.
31. Fischer N, Rochaix JD (2001) The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genom* 265: 888–894.
32. Hamilton BS, Nakamura K, Roncari DA (1992) Accumulation of starch in *Chlamydomonas reinhardtii* flagellar mutants. *Biochem Cell Biol* 70(3–4): 255–258.
33. Banks W, Greenwood C, Khan K (1971) The interaction of linear amylose oligomers with iodine. *Carbohydr Res* 17: 25–33.
34. Kelleher DJ, Gilmore R (2006) An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16: 47R–62R.
35. Fettke J, Eckermann N, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M (2005) Identification subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *Plant J* 43(4): 568–585.
36. Xia H, Yandea-Nelson M, Thompson DB, Gultinan MJ (2011) Deficiency of maize starch-branching enzyme I results in altered starch fine structure decreased digestibility and reduced coleoptile growth during germination. *BMC Plant Biol* 11: 95.
37. Harris EH (1989) *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*. Academic Press, San Diego.
38. Kindle KL (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1228–1232.
39. Kakefuda G, Duke SH (1984) Electrophoretic transfer as a technique for the detection and identification of the plant amylolytic enzymes in polyacrylamide gels. *Plant Physiol* 75: 278–280.
40. Merendino L, Falcatore A, Rochaix JD (2003) Expression and RNA binding properties of the chloroplast ribosomal protein S1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 53(3): 371–382.
41. Rochaix JD, Mayfield S, Goldschmidt-Clermont M, Erickson J (1991) Molecular biology of *Chlamydomonas*. In C. Shaw ed *Plant Molecular Biology: A Practical Approach* IRL Press Oxford pp 253–275.
42. Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* 8: 457–463.
43. Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120(3): 621–623.
44. Colombo SL, Pollock SV, Eger KA, Godfrey AC, Adams JE, et al. (2002) Use of the bleomycin resistance gene to generate tagged insertional mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that require elevated CO₂ for optimal growth. *Funct Plant Biol* 29: 231–241.
45. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.

Annexe 4

Findinier J., Tunçay H., Miriam Schulz-Raffelt, Maud Facon, Thierry 4 Duchêne, Stéphan Cuiné, Gilles Peltier, Steven Ball, Christophe D'Hulst, Fabrice Wattebled and David Dauvillée. Mutation in the *MEX1* gene of *Chlamydomonas* leads to impaired starch mobilization without maltose accumulation.

1 **Mutation in the *MEX1* gene of *Chlamydomonas* leads to impaired starch**
2 **mobilization without maltose accumulation.**

3
4 **Justin Findinier¹, Hande Tunçay¹, Nicolas Szydłowski², Miriam Schulz-Raffelt^{3,4}, Maud**
5 **Facon¹, Thierry Duchêne¹, Stephan Cuiné³, Gilles Peltier³, Steven Ball¹, Christophe**
6 **D’Hulst¹, Fabrice Wattebled¹ and David Dauvillée¹**

7 ¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Unité Mixte de Recherche 8576, Centre
8 National de la Recherche Scientifique and Université des Sciences et Technologies de Lille,
9 59655 Villeneuve d’Ascq Cedex, France ; ²Miniaturisation pour la Synthèse, l’Analyse et la
10 Protéomique, USR3290 CNRS-Université Lille 1, Sciences et Technologies, F-59655
11 Villeneuve d’Ascq cedex, France. ³ Commissariat à l’Energie Atomique et aux Energies
12 Alternatives, Direction des Sciences du Vivant, Institut de Biologie Environnementale et de
13 Biotechnologie, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et
14 Microalgues, Commissariat à l’Energie Atomique Cadarache, 13108 Saint-Paul-lez-Durance,
15 France. ⁴ Current address: TU Kaiserslautern, Molecular Biotechnology & Systems Biology,
16 Paul-Ehrlich-Straße 23, 67663 Kaiserslautern, Germany.

17
18 Author for correspondence:

19 David Dauvillée

20 Tel: +33 320 43 65 55

21 Email: David.Dauvillee@univ-lille1.fr

22

Total word count (excluding summary, references and legends) :		No. of figures:	
Summary:		No. of Tables:	
Introduction:		No. of Supporting Information files:	
Materials and Methods:			
Results:			
Discussion:			
Acknowledgements:			

24 **Summary**

25 • The *MEX1* locus of *Chlamydomonas reinhardtii* was identified in a genetic screen as a
26 factor that affects starch metabolism. Mutation of *MEX1* causes a slow-down in the reserve
27 polysaccharide mobilization.

28 • Cosegregation and functional complementation was used to assess the involvement of the
29 Mex1 protein in starch degradation. Heterologous expression experiments performed in
30 *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* allowed us to test the capacity of the algal protein
31 in maltose export.

32 • In contrast to the *Arabidopsis mex1* mutant, the defect in *Chlamydomonas* doesn't lead to
33 maltose accumulation or growth impairment. Although the algal protein is localized on the
34 plastid envelope, it does not transport maltose but is still able to partly complement the higher
35 plant homologous mutant.

36 • These findings suggest that Mex1 is essential for both transitory and reserve starch
37 mobilization and that this protein may have several functions in this pathway which can be
38 not restricted to maltose export as demonstrated in *Arabidopsis*.

39 **Key words:** *Chlamydomonas reinhardtii*, maltose, starch mobilisation, storage starch,
40 transitory starch.

41 **Introduction**

42 Significant progress in the understanding of starch breakdown process has been made during
43 the last years. It is now a very active domain of research that essentially applies to diurnal
44 *Arabidopsis* leaf starch mobilization (Smith *et al.*, 2005). A large part of the carbon fixed in
45 the light is stored in the chloroplast as transitory starch which will be subsequently degraded
46 to sustain plant metabolism (Lloyd *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). It was initially thought
47 that starch breakdown was essentially due to phosphorolytic activities and subsequent export
48 of triose phosphates or 3-phosphoglycerate through plastid envelope triose
49 phosphate/phosphate translocators (Flügge, 1999). However, the use of antisense technology
50 in potato and tobacco plants to downregulate the expression of triose phosphate/phosphate
51 translocators revealed that an alternative is active leading to increased starch breakdown and a
52 steady normal plant growth (Riesmeier *et al.*, 1993; Heineke *et al.*, 1994; Haüsler *et al.*,
53 1998). In vascular plant leaves, transitory starch breakdown at night occurs through a

54 hydrolytic pathway with the production of glucose and maltose exported to the cytosol to
55 sustain sucrose synthesis (Heldt *et al.*, 1977; Peavey *et al.*, 1977; Herold *et al.*, 1981; Stitt &
56 Heldt, 1981; Neuhaus & Schulte, 1996; Schleucher *et al.*, 1998; Servaites & Geiger, 2002;
57 Ritte & Raschke, 2003; Chia *et al.*, 2004; Weber, 2004; Lloyd *et al.*, 2005). Maltose
58 represents the major exported product of hydrolytic starch breakdown at night (Weise *et al.*,
59 2004). An *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating both starch and maltose was shown to
60 be defective for a plastidial envelope maltose transporter called Mex1 (Niittylä *et al.*, 2004).
61 The crucial role of maltose export is revealed by the severe growth retardation phenotype
62 recorded in the *mex1* mutant. In the cytosol, maltose is converted into glucose and glucose-1-
63 phosphate by the disproportionating enzyme 2 (DPE2) and a cytosolic isoform of starch
64 phosphorylase (PHS2) to feed sucrose metabolism (Chia *et al.*, 2004; Lu & Sharkey, 2004;
65 Weber, 2004; Lloyd *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004). The discovery of *MEX1* homologous
66 genes in several higher plants argues in favor of a widespread function of this protein in
67 maltose export during starch mobilization. Functional complementation of the *Arabidopsis*
68 *mex1* mutant with the orthologous apple (*Malus domestica*) cDNA leads to the restoration of
69 the wild-type phenotype demonstrating a strong functional conservation between the two
70 proteins (Reidel *et al.*, 2008). In this study, expression of the apple gene was maximal in
71 mature leaves but was also detected in fruits and roots suggesting a possible role for this
72 protein in starch mobilization in sink organs.

73 *Chlamydomonas reinhardtii* is a eukaryotic, unicellular, haploid green alga that is found in the
74 soil and a variety of fresh water habitats (Harris, 1989). Starch metabolism occurs with the
75 same complexity in vascular plants and *C. reinhardtii* arguing in favor of the use of the latter
76 as a model to investigate starch metabolism (Deschamps *et al.*, 2008). *Chlamydomonas* has
77 already been extensively used to discover several crucial functions in starch synthesis in the
78 past (Mouille *et al.*, 1996; Dauvillée *et al.*, 2006). In addition, switching between source or
79 sink tissue land plant like metabolism in *Chlamydomonas* is simply triggered by manipulation
80 of the culture medium (Libessart *et al.*, 1995). This property was favorably used to decipher
81 the function of the plastidial isoform of glucan phosphorylase (PhoB) in both transient and
82 storage starch metabolisms (Dauvillée *et al.*, 2006). In fact, *Chlamydomonas sta4* mutants
83 defective for PhoB activity behave similarly as wild-type strain and the corresponding
84 *Arabidopsis* mutant when grown in conditions favoring active cell division and low starch
85 accumulation (Zeeman *et al.*, 2004; Dauvillée *et al.*, 2006). At the contrary, when grown in
86 conditions of high polysaccharide synthesis (that is triggered by placing cells under nitrogen
87 starvation) the study of the *sta4* mutant revealed a function of PhoB in starch synthesis. This

88 unsuspected synthetic function of starch phosphorylase PhoB in storage starch metabolism
89 was later confirmed in rice (Satoh *et al.*, 2008). Thus, *Chlamydomonas* offers a versatile plant
90 model in which it is possible to decipher the function of a particular gene in both transient and
91 storage starch metabolisms.

92 In this work, we have isolated and characterized a *Chlamydomonas* strain named CAT3
93 which was mutated at the *MEX1* locus by plasmid insertional mutagenesis. Cosegregation and
94 functional complementation analyses have shown the major role of this protein for normal
95 starch catabolism, as already suggested in *A. thaliana*. However, heterologous expression of
96 the algal Mex1 protein in *Escherichia coli* and *A. thaliana* reveals a low ever existing aptitude
97 of this enzyme in maltose export across the plastid envelope and suggests a still to be
98 determined additional function of Mex1 in starch catabolism in sink organs.

99

100 **Materials and Methods**

101 **Organisms and growth conditions**

102 The *Chlamydomonas reinhardtii* wild-type strain 137C (*mt- nit1 nit2*) has been used for
103 nuclear genome transformation. The *mt+* wild-type strain 37 (*ac14 pab2*) was crossed with
104 the *mt-* mutant strain for cosegregation analysis. All experiments have been carried out at
105 24°C in continuous light (40μE m⁻² s⁻¹) in the presence of acetate in liquid cultures with 120
106 rpm shaking. Media's recipes and genetic experiments were performed as in Harris *et al.*,
107 1989.

108 The *Arabidopsis thaliana mex1* line was obtained from Syngenta (SAIL_574_D11.v1). Plants
109 were grown in soil together with the wild-type Col-0 in a growth chamber under controlled
110 conditions (12h light : 12h darkness; 23°C : 20°C; 75% humidity and a light intensity at the
111 plant levels of 120 μE m⁻² s⁻¹ supplied by white fluorescent lamps). After 5 weeks, rosette
112 leaves were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -
113 80°C until use.

114 The *malF E. coli* strain TST6 (F-, [*araD139*]_{B/r}, Δ (*argF-lac*)169, λ^- , *flhD5301*, Δ (*fruK-*
115 *yeiR*)725(*fruA25*), *relA1*, *rpsL150*(strR), *rbsR22*, *malF55::Tn10*, Δ (*fimB-fimE*)632(::*IS1*),
116 *deoC1*) was obtained from the Coli Genetic Stock Center . Growth analysis with heterologous
117 expression of MEX1 was performed at 37°C in M9 medium containing 0.5% glucose or
118 maltose as the carbon source in the presence of 0.5 mM IPTG for protein expression
119 induction.

120

121 Chlamydomonas nuclear genome transformation

122 The CAT3 mutant was isolated after nuclear genome transformation of the wild-type strain
123 137C using the pSL18 plasmid previously linearized by *EcoRI*, conferring resistance to
124 paromomycin (Fisher & Rochaix, 2001). For functional complementation, the mutant strain
125 was transformed either with an empty pSLHyg vector conferring resistance to hygromycin or
126 with the same vector containing the Chlamydomonas *MEX1* gene using the glass beads
127 method (Kindle *et al.*, 1990).

128

129 Starch and water soluble polysaccharides (WSP) assays

130 Starch and WSP were assayed from the insoluble and soluble fractions of lysed
131 Chlamydomonas cells, respectively. Starch content was determined using the Enzytec Starch
132 kit (R-Biopharm) after purification on a Percoll gradient and boiling for 5 min as previously
133 described (Delrue *et al.*, 1992). WSPs were directly assayed from the boiled supernatant with
134 the same protocol.

135

136 Molecular techniques

137 All oligonucleotides used in this work are described and listed in table S1.

138 Total DNA from Chlamydomonas was extracted as previously described (Rochaix *et al.*,
139 1991).

140 Inverse-PCR was used to obtain the DNA sequences flanking the pSL18 insertion site using
141 the same primers and cycling parameters previously described (Tunçay *et al.*, 2013).

142 Homology researches were performed using the Phytozome website (Goodstein *et al.*, 2012).

143 Total RNA from Chlamydomonas was extracted following an established protocol
144 (Merendino *et al.*, 2003). RNAs from Arabidopsis were extracted using the Nucleospin RNA
145 Plant kit (Macherey-Nagel) following supplier's instructions.

146 One μg of total RNA was used for RT-PCR analysis using the One Step RT PCR Kit
147 (Qiagen) following supplier's instructions.

148 The complete *MEX1* gene was amplified as a 2.8 kbp fragment and was subsequently cloned
149 using the TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). This genomic DNA fragment was transferred
150 into pSLHyg in the *EcoRV* site downstream of the *PsaD* promoter and 5'-UTR.

151 For the genotyping of the meiosis progeny, a PCR assay involving three primers was used
152 allowing the amplification of either a 1316 bp fragment of the wild-type gene or a 670 bp
153 fragment specific of the mutagenesis plasmid insertion at the *MEX1* locus.

154 For heterologous complementation of the Arabidopsis *mex1* mutant, a codon optimized
155 Chlamydomonas *MEX1* cDNA without its endogenous transit peptide (deleted for the codons
156 encoding the 26 first aminoacids) was synthesized (Eurofins, Fig. S1). The corresponding
157 1038 bp fragment was then fused to the Arabidopsis *ISAI* (At2g39930) transit-peptide. This
158 chimeric gene was cloned in pENTR D-TOPO vector (Invitrogen) then inserted in the
159 pMDC32 expression vector using the Gateway cloning kit (Invitrogen). *Agrobacterium*
160 *tumefaciens* GV3101 strain was transformed and used for Arabidopsis transformation (Facon
161 et al., 2013).

162 The expression of both the endogenous Arabidopsis *MEX1* locus and of the Chlamydomonas
163 transgene was checked through RT-PCR using specific primers (Table S1).

164 To test the subcellular localization of the Chlamydomonas Mex protein in Arabidopsis, the
165 pMDC32 insert was amplified by PCR and inserted in frame with GFP in the pH7FWG2
166 vector using Gateway technology.

167 For the complementation of the *malF* *E. coli* strain, the Arabidopsis *MEX1* cDNA and the
168 codon optimized Chlamydomonas gene were amplified and cloned using the TOPO TA
169 Cloning kit to be finally inserted into pQE-30 (Qiagen) between the *Bam*HI and *Kpn*I sites.

170

171 Protoplast isolation and transformation

172 Protoplasts were isolated as previously described (Szydlowski *et al.*, 2013) from 3-weeks-old
173 plant grown on MS agar medium and then transfected using polyethylene glycol mediated
174 DNA uptake.

175

176 Confocal imagery

177 Transfected protoplasts were observed on a Zeiss LSM 780 confocal microscope.
178 Autofluorescence of chlorophyll and GFP signal were excited at 405 nm and 488 nm, and
179 collected in 593-735 nm and 493-560 nm intervals, respectively. All images were analyzed on
180 the Zeiss Zen 2012 software.

181

182 Results

183 Isolation and phenotypic characterization of the Chlamydomonas CAT3 mutant.

184 Recently, we isolated 31 Chlamydomonas candidate strains displaying a starch catabolism
185 defective phenotype among 13,000 mutants generated through plasmid insertional
186 mutagenesis of the reference strain 137C (Tunçay *et al.*, 2013). These mutants were identified

187 thanks to a simple and reliable phenotypic procedure taking advantage of the strong and
188 specific interaction between α -glucans and iodine molecules. Briefly, algal cell patches were
189 incubated during five days in the light in duplicated plates on nitrogen free TAP solid medium
190 allowing massive starch deposition. If plates are iodine-stained at this stage, cell patches
191 appear black as consequence of high starch content. Nitrogen starvation was then removed for
192 one of the two replica plates by applying 10 μ l of 0.15 M ammonium chloride solution on
193 each cell patch. Plates were then further incubated for 24 h in the dark to trigger starch
194 degradation. A wild-type strain (such as 137C) fully competent for starch mobilization looks
195 like greenish after iodine staining (Fig. 1a). A strain either defective for starch catabolism or
196 accumulating abnormally high amount of starch at the end of the illuminated period remains
197 black upon iodine staining revealing the presence of high residual amount of polysaccharide.
198 The CAT3 mutant harbored a black staining phenotype suggesting that starch degradation or
199 accumulation is impaired (Fig. 1a). This mutant accumulates three times more starch than the
200 isogenic wild-type strain when grown in mixotrophic conditions (Table 1). In photo-
201 autotrophic conditions, the difference between the mutant and the wild-type was less
202 pronounced as CAT3 accumulates 120 % of the wild-type starch amount recorded at the end
203 of the day (Fig. S2). This starch excess (*sex*) phenotype is also observed when the cells are
204 subjected to nitrogen starvation as CAT3 accumulates two times more polysaccharide than the
205 wild-type (Table 1). As these two culture conditions are mimicking source (photoautotrophy)
206 and storage (nitrogen starvation) tissues of higher plants, we suspect CAT3 to be mutated for
207 an important function of starch metabolism. Storage starch accumulated by this mutant is
208 comparable to that of the wild type. In both cases, the amylopectin-iodine complex λ_{max}
209 (wavelength at the maximal absorbance) value is of 550 nm and the amylose content *c.* 20 %
210 as revealed by gel permeation chromatography of solubilized starch (Fig. S3a-b). Chain
211 length distribution analysis of both wild-type and mutant amylopectins does not reveal any
212 modification of the polysaccharide ultrastructure (Fig. S3c-e). The defect of starch catabolism
213 in the CAT3 mutant was confirmed by time course experiments of starch degradation
214 performed with cells grown in liquid medium. After five days in nitrogen starvation under
215 continuous light to allow massive starch accumulation, cells of each strain were transferred to
216 TMP (without acetate but with nitrogen source) liquid medium and incubated in the dark. At
217 different time points, aliquots of the culture were harvested and used to quantify the amount
218 of residual starch. After 24 hours of darkness, the CAT3 mutant still contains 75 % of its
219 initial amount of polysaccharide while the wild type degrades 60 % of its starch during the
220 same period (Fig. 1b). This slow-down of starch degradation is observed at each point of the

221 kinetics (Fig. 1b). When phototrophic cultures of synchronized cells grown under 12h : 12h
222 light : dark conditions were analyzed, no significant difference in the degradation rates was
223 recorded between the wild type and the CAT3 mutant (Fig. S2). Even if a strong difference in
224 the starch content was recorded between CAT3 and the wild-type cultivated in mixotrophic
225 conditions, we were not able to test the degradation efficiencies of CAT3 in those conditions
226 as the presence of acetate prevents cells synchronization. The CAT3 mutant is then carrying
227 one or several mutations leading to impaired starch catabolism. This defect has a strong
228 impact on storage starch mobilisation while the mutation actually does not greatly impact
229 transient starch degradation.

230 Identification of the mutation in CAT3 and genetic analyses.

231 The CAT3 mutant was produced by plasmid insertional mutagenesis, a method allowing the
232 identification of the site of insertion into the genomic DNA of the alga. Indeed, inverse PCR
233 approach allowed us to identify the insertion of the plasmid into a gene located on
234 chromosome 12 (Cre12.g486600). This gene putatively encodes an homologue of the Mex1
235 transporter previously characterized in *Arabidopsis* (Niittylä *et al.*, 2004). The
236 *Chlamydomonas* locus encodes a 371 amino acids predicted protein sharing 34.2 % sequence
237 identity with the *Arabidopsis* Mex1 transporter. The algal protein is suspected to contain a
238 putative 26 amino acids transit peptide (ChloroP) and nine transmembrane domains
239 suggesting that it is likely a membrane protein. In the CAT3 mutant, the pSL18 plasmid is
240 integrated at nucleotide 285 of the gene into the first intron. This insertion completely
241 abolishes the expression of the gene. This was confirmed by RT-PCR analysis, as we were
242 unable to amplify a cDNA fragment of the *Chlamydomonas MEX1* gene when the RNA
243 extracted from our mutant were used (Fig. 1c).

244 The CAT3 strain was then crossed with strain 37 (a *Chlamydomonas reinhardtii* segregant
245 with a genetic background derived from the wild-type reference) and the meiotic progeny was
246 analyzed by tetrad analysis (in total eight tetrads were analyzed). First, wild type and mutant
247 progenies were distinguished for the presence of the inserted plasmid by PCR amplification.
248 PCR was performed on genomic DNA using a mix of three oligonucleotide primers that
249 discriminates between the wild type and the mutant alleles. Two primers corresponding to the
250 sequence of the *MEX* gene were chosen on both sides of the insertion. The third primer was
251 complementary to the plasmid sequence. In case of wild type allele, a 1316 bp amplicon is
252 expected, while in case of mutant allele, a 670 bp amplicon is expected (Fig. 2a). Second, the
253 phenotype of starch mobilization was scored in the progeny by starch degradation time course

254 experiments (Fig. S4). When considered as a whole, the mutant progeny still contain 84 ± 15
255 % of its initial starch amount after 24 hours of degradation in the dark while the wild-type
256 segregants only contain 37 ± 15 % of their initial polysaccharide pools (Fig. 2b).
257 Moreover, we have introduced the wild type genomic sequence of *MEX1* in the CAT3 mutant.
258 To this end, the 2.7 kbp region comprised between the start and the stop codon was amplified
259 by PCR and was cloned into the pSLHyg plasmid containing the *Aph7''* gene conferring
260 hygromycin resistance to the cells (Berthold *et al.*, 2002). The transformants were selected on
261 TAP plates containing both paromomycin and hygromycin after transformation with the
262 linearized plasmid. Over 70 double resistant strains selected, 47 display a wild-type
263 phenotype upon iodine staining (Fig. 3a). In parallel, the original CAT3 mutant was also
264 transformed with an empty linearized pSLHyg vector. All the 20 transformants resistant to
265 both paromomycin and hygromycin tested still display the initial mutant phenotype and
266 starch-iodine interaction can still be detected after 24 hours of starch degradation in these
267 strains (Fig. 3a). We confirmed this result in time course experiments by assaying the amount
268 of residual starch after 24 h degradation in strains containing either the complementation
269 vector (C) or the empty pSLHyg plasmid (NC). We observed a perfect correlation between
270 the return at a wild-type phenotype upon iodine staining (a greenish staining after 24 h
271 degradation) and an efficient starch degradation as illustrated by the strain C1 (Fig. 3b). All
272 the NC strains tested (n=4) were still containing more than 60 % of their initial starch content
273 after 24 hours of degradation, a value similar to the one recorded for the original CAT3
274 mutant (75 ± 11 %). All the complemented strains displaying a wild type phenotype upon
275 iodine staining and tested (n=12) contained between 20 to 45 % of residual starch after the
276 same period in the dark, values which are in the range of the 35 % recorded for the wild-type
277 strain 137C. The return to an efficient starch degradation process in these complemented
278 strains was correlated to the detection of the *MEX1* mRNA as revealed by RT-PCR analysis
279 (Fig. 3c).

280

281 Complementation of the *Arabidopsis mex1* mutant with the *Chlamydomonas* 282 gene

283 Cosegregation and functional complementation analyses suggest that the algal Mex1 protein
284 is actively involved in storage starch degradation. However, the importance of this function in
285 transient starch breakdown is limited as no difference between the CAT3 mutant and the
286 isogenic wild-type 137C strain can be observed when cells were cultivated in diurnal

287 phototrophic culture conditions. Moreover, conversely to the situation depicted in
288 Arabidopsis, no significant amount of maltose was assayed in CAT3 even during starch
289 degradation in the dark. Functional complementation of the Arabidopsis *mex1* mutant was
290 already achieved using the homologous gene from apple leading to full restoration of the wild
291 type phenotype (Reidel *et al.*, 2008) showing that both apple and Arabidopsis proteins share
292 the same function. Then a synthetic codon-optimized cDNA of the Chlamydomonas protein
293 was introduced in the *mex1* Arabidopsis mutant. To ensure a correct targeting of the algal
294 protein, the synthetic cDNA was fused to the Arabidopsis *ISAI* gene transit peptide sequence
295 already successfully used for the expression of maize proteins inside the Arabidopsis plastid
296 (Facon *et al.*, 2013). The chimeric cDNA was then subcloned into pMDC32 and placed under
297 the control of the 35S promoter (Curtis & Grossniklaus, 2003). This vector was introduced
298 into Agrobacterium strain GV3101:pMP90 (Koncz & Schell, 1986) which was used to
299 transform the Arabidopsis *mex1* mutant by the floral dip procedure (Clough & Bent, 1998).
300 About 500 transformed hygromycin-resistant plants were selected. The presence of the
301 transgene was confirmed on a subset of 10 individuals by PCR amplification of a 1050 bp
302 fragment of the Chlamydomonas gene performed on total genomic DNA (Fig. 4a). All further
303 experiments were performed on T2 hygromycin resistant plants. Expression of the
304 Chlamydomonas gene in the selected transgenic plants was assessed by RT-PCR using
305 primers specific of the algal synthetic gene (Fig. 4b). The phenotype of the transgenic F2
306 plants was indistinguishable from that of the wild type with no detectable chlorosis or growth
307 stunting (Fig. 5a, Table S2). Even if a wild type growth phenotype was recorded in all the
308 transgenic lines tested (n=7), none of them fully recovered a normal phenotype when starch
309 and maltose accumulation were considered. Indeed, at the end of night, all lines harboring still
310 contain at least three times more starch than the wild type (Fig. 5b). In these lines, maltose
311 content was still high with values *c.* 0.5 mg g⁻¹ FW while it is not detectable in the wild type.
312 Some of the complemented lines were statistically indistinguishable from the original
313 Arabidopsis *mex1* mutants regarding starch and maltose contents measured at the end of night
314 (Fig. 5b). Nevertheless, growth of these plants was comparable to that of the wild-type and
315 the other transgenic lines (Fig. 5a). At this stage, we decided to check the localization of the
316 Chlamydomonas protein in the Arabidopsis cells. Expression of the Chlamydomonas gene
317 fused to GFP revealed an expected localization of the algal protein on the chloroplast
318 envelope membrane (Fig. 6). A high background was observed and may be due to
319 overexpression of the Mex-GFP fusion protein under the 35S promoter. This unexpected
320 fluorescent background can also reveal a dual localization of the fusion proteins in both the

321 chloroplast envelope and in a still to be determined subcellular compartment. Nevertheless,
322 our observations are not in favor of a specific second localization as the detected fluorescence
323 does not seem to correlate with any particular subcellular compartment. Because of the high
324 levels of maltose detected in the Arabidopsis transgenic lines expressing the Chlamydomonas
325 Mex protein, we tested the capacity of the algal protein in facilitating maltose movement
326 across membranes by transforming the TST6 *E. coli* strain, a *malF* mutant defective for the
327 maltose transporter and that is unable to grow on a medium where maltose is the sole carbon
328 source. While growth on maltose-containing medium was restored for bacteria transformed
329 with a construct encoding the Arabidopsis *MEX1* cDNA, no growth could be detected on the
330 same medium when the Chlamydomonas synthetic cDNA was expressed (Fig. 7).

331

332 **Discussion**

333 The Chlamydomonas *MEX* locus is mandatory for storage starch catabolism

334 In this work, we have isolated a Chlamydomonas mutant strain (CAT3), produced by plasmid
335 insertional mutagenesis that was selected for its anomaly in starch degradation and thus has a
336 starch excess phenotype recorded at the end of an extended period of starch degradation in the
337 dark (Fig. 1). We were able to identify the mutated gene in CAT3, which is responsible for
338 the starch excess phenotype. This gene encodes for a protein homologous to the Mex1 protein
339 identified in *Arabidopsis thaliana* (Niittylä *et al.*, 2004). Mex1 is localized in the chloroplast
340 envelope and is a transporter of maltose between the stroma and the cytosol. A mutation at the
341 structural gene of Mex1 in Arabidopsis leads to a starch excess and very high maltose
342 phenotype.

343 The Chlamydomonas protein shares 32% identity with Arabidopsis Mex1 and contains a
344 transit peptide for targeting to the plastid and nine transmembrane domains suggesting that
345 this protein may have a function similar to that of the Arabidopsis Mex1. However, the impact
346 of a mutation at the algal *MEX* locus was only recorded when cells were cultivated in
347 conditions of massive starch accumulation mimicking the storage starch process in land plants
348 and not when cells were cultivated in conditions of transient starch synthesis (similar to leaf
349 starch metabolism).

350 The Chlamydomonas plastidial Mex protein is not an efficient maltose
351 transporter

352 In Arabidopsis, a *mex1* null mutant displays a starch excess phenotype and accumulates very
353 high levels of maltose in the leaves compared to the wild-type (Niittylä et al., 2004; Stettler *et*
354 *al.*, 2009). The CAT3 mutant does not share this phenotype as no water soluble
355 polysaccharide (WSP) accumulates in the mutant which is indistinguishable from the wild-
356 type concerning this point. If the algal protein is playing the same role in starch catabolism
357 than its Arabidopsis homologue, we would expect maltose to be detected in the mutant but
358 this was not the case in all the conditions tested. This difference between the two models may
359 reveal a different function of Mex in algae and higher plants. We then decided to test the
360 capacity of the algal protein in maltose transport. The functional complementation of an *E.*
361 *coli* strain defective for a major component of the bacterial maltose import machinery with the
362 Arabidopsis gene was previously used to assess the function of the plant protein (Niittylä *et*
363 *al.*, 2004). In our hands, this experiment led to similar results confirming the plant protein as a
364 maltose transporter. However, when the same experiment was carried out with the
365 Chlamydomonas synthetic cDNA, no growth on maltose could be recorded for the
366 transformed *malF* bacterial mutant (Fig. 7). These results point out a major difference
367 between the two proteins and suggest that the Chlamydomonas Mex is either not able to
368 transport maltose or does it with a very low efficiency which is not sufficient to restore
369 growth of the complemented bacteria. At this stage, we can speculate on a different function
370 of Mex in Arabidopsis and Chlamydomonas even if this protein plays a central role in starch
371 catabolism in these two model organisms. This could be suspected as transient starch
372 degradation in the plant during night has for major role the feeding of sucrose synthesis in the
373 cytosol of leaf cells which will then be exported to the nonphotosynthetic part of the plant. In
374 an unicellular organism such as Chlamydomonas, the export of starch breakdown products
375 may not be essential to sustain cellular metabolism. Moreover, sucrose has been detected in
376 Chlamydomonas but at very low levels excluding an important role of this component in algal
377 metabolism (Klein, 1987). Other explanations would be that the Chlamydomonas protein is
378 not acting alone and requires one or several protein partners to function correctly or this
379 protein may differ from its plant homologue through the requirement of post-translational
380 modifications not available in bacteria. The latter could be tested by expressing the
381 Chlamydomonas Mex in an eukaryotic system.

382 The Chlamydomonas *MEX* gene does not fully complement the Arabidopsis
383 mutant

384 Even if the *Chlamydomonas Mex* protein appears to be mostly involved in storage starch
385 mobilization and seems not to play an important role for transient starch degradation, we
386 decided to test the capacity of the algal gene in restoring the phenotype of the *mex1* mutant
387 plants. In fact, even if the impact of the mutation was only studied on transient starch in
388 Arabidopsis, the *MEX1* transcript was detected in both photosynthetic and non-photosynthetic
389 tissues of Arabidopsis and apple suggesting a widespread process (Niittylä *et al.*, 2004; Reidel
390 *et al.*, 2008). The Arabidopsis *mex1* mutant was then transformed with a synthetic gene made
391 of codons optimized for expression in the plant and corresponding to the *Chlamydomonas*
392 cDNA lacking its transit peptide fused to the Arabidopsis *ISAI* transit peptide, a strategy
393 which was already successful to ensure a correct targeting of the transgene product (Facon *et*
394 *al.*, 2013). The correct localization on the chloroplast envelope of this protein was confirmed
395 through expression in protoplasts of this construct fused to green fluorescent protein. The
396 transgenic lines analyzed displayed a return to a close to wild-type growth phenotype
397 suggesting functional complementation of the plant mutant with the algal gene. However,
398 when starch and maltose were assayed in the transgenic lines, all of them were still displaying
399 a starch and maltose excess phenotypes resulting in only partial complementation of the
400 plants. The use of the apple gene led previously to a complete recovery of the Arabidopsis
401 mutant plants suggesting differences between the algal and the higher plants genes products
402 (Reidel *et al.*, 2008). These results suggest that the *Chlamydomonas* protein may be able to
403 restore sufficiently maltose transport in the transgenic lines to sustain growth but is not as
404 efficient as the Arabidopsis protein since the plants still contain high maltose amounts. The
405 Arabidopsis *mex1* mutant not only over accumulates starch and maltose in its chloroplast but
406 also displays a chlorotic phenotype and growth impairment (Niittylä *et al.*, 2004). Studies
407 performed on the *mex1* mutant plant and different double mutant combinations revealed a link
408 between chlorosis and the accumulation of maltose or malto-oligosaccharides in the
409 chloroplast of the plants (Stettler *et al.*, 2009). Feeding the plants with exogenous sugars
410 triggered a growth improvement without rescuing the chlorotic phenotype uncoupling the two
411 phenomena. However, the nature of the signal that triggers chloroplasts degradation in these
412 mutant plants remains unclear (Stettler *et al.*, 2009). Mutagenesis of *mex1/dpe1* double mutant
413 lines which display a strong chlorotic phenotype and high malto-oligosaccharides
414 accumulation in the chloroplast allowed the isolation of suppressor lines in which chlorosis is
415 cured even in the presence of elevated maltose amounts (Stettler *et al.*, 2009). This reveals the
416 possibility to dissociate the presence of excessive amounts of maltose in the chloroplast and
417 the autophagic degradation of the latter. Moreover, studies performed on other Arabidopsis

418 mutants as the one defective for the transglucosidase DPE2 revealed that excessive maltose
419 accumulation is not obligatory linked to strong chlorosis even if in this case maltose was
420 found in both cytosol and chloroplast (Chia *et al.*, 2004; Lu & Sharkey, 2004; Lu *et al.*,
421 2006). The Arabidopsis transgenic lines expressing the Chlamydomonas Mex protein mimic
422 the phenotype of these suppressor lines. They still contain high levels of maltose but are not
423 displaying growth retardation or visible chlorosis. Our results suggest that the
424 Chlamydomonas gene product may be involved in starch degradation not only as a maltose
425 transporter but also as a regulatory or a sensing component linking efficient starch
426 degradation and chloroplast integrity. A more detailed characterization of this protein family
427 in plants will be required to fully understand the complete functions of Mex which could be
428 not restricted to maltose export outside the chloroplast.

429

430 **Acknowledgements**

431 We thank Elodie Richard and the Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire of Lille for
432 their help with fluorescence microscopy observations.

433

434 **References**

- 435 **Berthold P, Schmitt R, Mages W. 2002.** An engineered *Streptomyces hygrosopicus aph7''*
436 gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*.
437 *Protist* **153**: 401–412.
- 438 **Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith**
439 **AM. 2004.** A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose
440 in Arabidopsis leaves at night. *Plant Journal* **37**: 853-863.
- 441 **Clough SJ, Bent AF. 1998.** Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated
442 transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743.
- 443 **Curtis MD, Grossniklaus U. 2003.** A gateway cloning vector set for high-throughput
444 functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology* **133**: 462-469.
- 445 **Dauvillée D, Chochois V, Steup M, Haebel S, Eckermann N, Ritte G, Ral JP, Colleoni C,**
446 **Hicks G, Wattedled F et al. 2006.** Plastidial phosphorylase is required for normal starch
447 synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal* **48**: 274-285.

448 **Delrue B, Fontaine T, Routier F, Decq A, Wieruszeski JM, Van Den Koornhuysen N,**
449 **Maddelein ML, Fournet B, Ball S. 1992.** *Waxy Chlamydomonas reinhardtii:*
450 monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch
451 synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *Journal of Bacteriology*
452 **174:** 3612–3620.

453 **Deschamps P, Colleoni C, Nakamura Y, Suzuki E, Putaux JL, Buléon A, Haebel S, Ritte**
454 **G, Steup M, Falcón LI et al. 2008.** Metabolic symbiosis and the birth of the plant
455 kingdom. *Molecular Biology and Evolution* **25:** 536-548.

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

459

460 **Fischer N, Rochaix JD. 2001.** The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression
461 in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and*
462 *Genomics* **265:** 888–894.

463 **Flügge UI. 1999.** Phosphate translocators in plastids. *Annual Review in Plant Physiology and*
464 *Plant Molecular Biology* **50:** 27-45.

465 **Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W,**
466 **Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS. 2012.** Phytozome: a comparative platform for green
467 plant genomics. *Nucleic Acids Research* **40:** D1178-1186.

468 **Harris EH. 1989.** An overview of the genus *Chlamydomonas*. In: Harris E ed. *The*
469 *Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.*
470 San Diego: Academic Press, 1–24.

471 **Häusler RE, Schlieben NH, Schulz B, Flügge UI. 1998.** Compensation of decreased triose
472 phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose
473 transport in transgenic tobacco. *Planta* **204:** 366-376.

474 **Heineke D, Kruse A, Flügge UI, Frommer WB, Riesmeier JW, Willmitzer L, Heldt HW.**
475 **1994.** Effect of antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator on
476 photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta* **193:** 174-180.

477 **Heldt HW, Chon CJ, Maronde D, Herold A, Stankovic ZS, Walker DA, Kraminer A,**
478 **Kirk MR, Heber U. 1977.** Role of orthophosphate and other factors in the regulation of
479 starch formation in leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology* **59:** 1146–1155.

480 **Herold A, Leegood RC, McNeil PH, Robinson SP. 1981.** Accumulation of Maltose during
481 Photosynthesis in Protoplasts Isolated from Spinach Leaves Treated with Mannose. *Plant*
482 *Physiology* **67**: 85-88.

483 **Kindle KL. 1990.** High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*.
484 *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **87**: 1228–1232.

485 **Klein U. 1987.** Intracellular Carbon Partitioning in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant*
486 *Physiology* **85**:892-897.

487 **Koncz C, Schell J. 1986.** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific
488 expression of chimeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector.
489 *Molecular and General Genetics*. **204**: 383-396.

490 **Libessart N, Maddelein ML, Koornhuysen N, Decq A, Delrue B, Mouille G, D'Hulst C,**
491 **Ball S. 1995.** Storage, Photosynthesis, and Growth: The Conditional Nature of Mutations
492 Affecting Starch Synthesis and Structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **7**: 1117-1127.

493 **Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G. 2005.** Leaf starch degradation comes out of the shadows.
494 *Trends in Plant science* **10**: 130-137.

495 **Lu Y, Sharkey TD. 2004.** The role of amylopectinase in maltose metabolism in the cytosol of
496 photosynthetic cells. *Planta* **218**: 466-473.

497 **Lu Y, Steichen JM, Weise SE, Sharkey TD. 2006.** Cellular and organ level localization of
498 maltose in maltose-excess *Arabidopsis* mutants. *Planta* **224**:935-943.

499 **Merendino L, Falciatore A, Rochaix JD. 2003.** Expression and RNA binding properties of
500 the chloroplast ribosomal protein S1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular*
501 *Biology* **53**: 371–382.

502 **Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S. 1996.**
503 Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant*
504 *Cell* **8**: 1353-1366.

505 **Neuhaus HE, Schulte N. 1996.** Starch degradation in chloroplasts isolated from C3 or CAM
506 (crassulacean acid metabolism)-induced *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Biochemical*
507 *Journal* **318**: 945-953.

508 **Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC. 2004.** A previously
509 unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* **303**: 87-89.

510 **Peavey DG, Steup M, Gibbs M. 1977.** Characterization of starch breakdown in intact
511 spinach chloroplast. *Plant Physiology* **60**: 305-308.

512 **Reidel EJ, Turgeon R, Cheng L. 2008.** A maltose transporter from apple is expressed in
513 source and sink tissues and complements the Arabidopsis maltose export-defective mutant.
514 *Plant and Cell Physiology* **49**: 1607-1613.

515 **Riesmeier JW, Flügge UI, Schulz B, Heineke D, Heldt HW, Willmitzer L, Frommer WB.**
516 **1993.** Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon
517 partitioning in transgenic potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences,*
518 *USA* **90**: 6160-6164.

519 **Ritte G, Raschke K. 2003.** Metabolite export of isolated guard cell chloroplasts of *Vicia*
520 *faba*. *New Phytologist* **159**: 195-202.

521 **Rochaix JD, Mayfield S, Goldschmidt-Clermont M, Erickson J. 1991.** Molecular
522 biology of Chlamydomonas. In: C. Shaw ed. *Plant Molecular Biology: A Practical*
523 *Approach*. IRL Press Oxford, 253–275.

524 **Satoh H, Shibahara K, Tokunaga T, Nishi A, Tasaki M, Hwang SK, Okita TW, Kaneko**
525 **N, Fujita N, Yoshida M et al. 2008.** Mutation of the plastidial alpha-glucan phosphorylase
526 gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell* **20**:
527 1933-1849.

528 **Schleucher J, Vanderveer PJ, Sharkey TD. 1998.** Export of carbon from chloroplasts at
529 night. *Plant Physiology* **118**: 1439-1445.

530 **Servaites JC, Geiger DR. 2002.** Kinetic characteristics of chloroplast glucose transport.
531 *Journal of Experimental Botany* **53**: 1581–1591.

532 **Smith SM, Fulton DC, Chia T Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C,**
533 **Zeeman SC, Smith AM. 2004.** Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes
534 of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional
535 Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiology* **136**: 2687-
536 2699.

537 **Smith AM, Zeeman SC, Smith SM. 2005.** Starch degradation. *Annual Review of Plant*
538 *Biology* **56**: 73-98.

539 **Stettler M, Eicke S, Mettler T, Messerli G, Hörtensteier S, Zeeman SC. 2009.** Blocking
540 the metabolism of starch breakdown products in Arabidopsis leaves triggers chloroplast
541 degradation. *Molecular Plant* **2**:1233-1246.

542 **Stitt M, Heldt HW. 1981.** Physiological rates of starch breakdown in isolated intact spinach
543 chloroplasts. *Plant Physiology* **68**: 755–761.

544 **Szydlowski N, Bürkle L, Pourcel L, Moulin M, Stolz J, Fitzpatrick TB. 2013.** Recycling
545 of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in Arabidopsis. *Plant Journal* **75**: 40-52.

546 **Tunçay H, Findinier J, Duchêne T, Cogež V, Cousin C, Peltier G, Ball S, Dauvillée D.**
547 **2013.** A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for
548 Exploring Starch Catabolism. *PLoS ONE* **8**: e74763.

549 **Weber APM. 2004.** Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid
550 stroma. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 247-253.

551 **Weise SE, Weber APM, Sharkey TD. 2004.** Maltose is the major form of carbon exported
552 from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474-482.

553 **Zeeman SC, Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P,**
554 **Bechtold N, Smith AM, Smith SM. 2004.** Plastidial α -glucan phosphorylase is not
555 required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of
556 abiotic stress. *Plant Physiology* **135**: 849-858.

557
558
559

560 **Tables**

561 **Table 1.** Starch amounts accumulated by the wild-type and mutant strains during storage (-N) or
562 transitory starch (+N) synthesis.

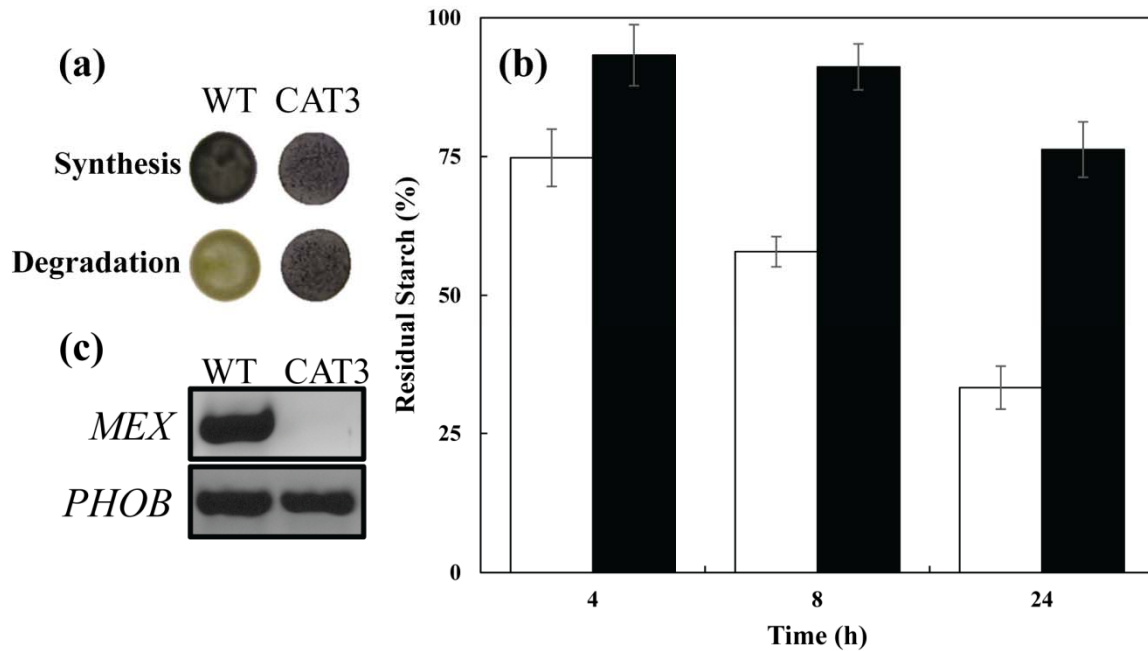
Strain	Starch amount ($\mu\text{g } 10^6$ cells)	
	TAP+N	TAP-N
137C	1,3 \pm 0,4	29 \pm 9
CAT3	4,9 \pm 1,1	60 \pm 10

563 The *Chlamydomonas* wild-type strain 137C and the isogenic mutant CAT3 were grown for either five
564 days under nitrogen starvation (-N) or three days in mixotrophic conditions (+N) prior starch
565 extraction and assay. The values presented are the means \pm SD of five independent experiments.

566

567

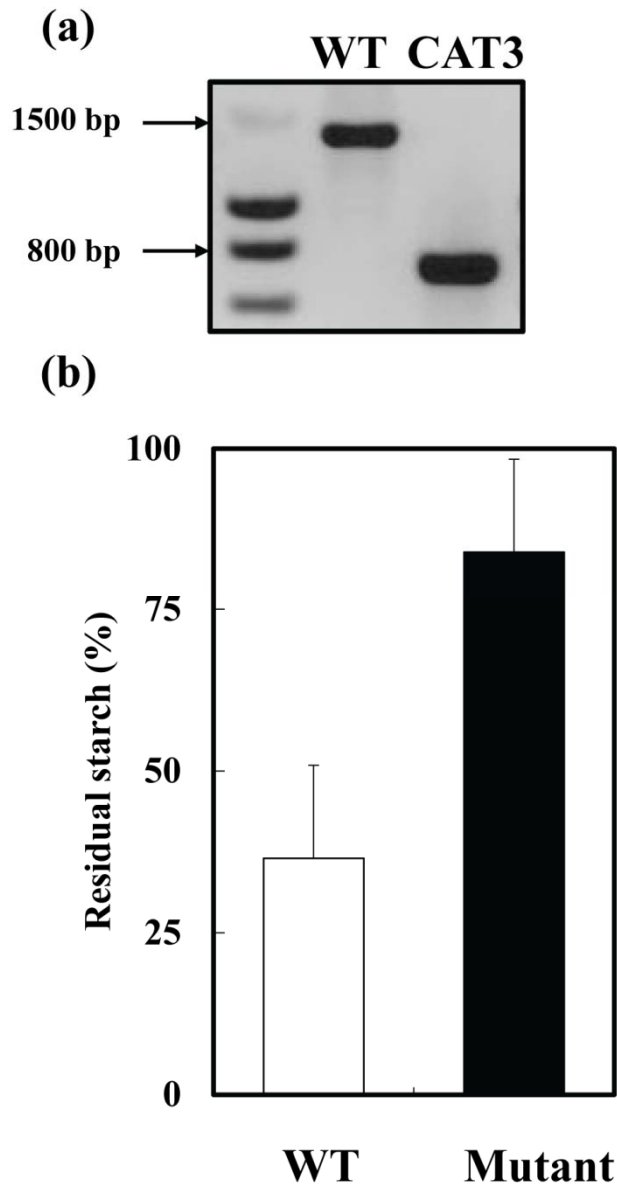
568 **Figures**



569

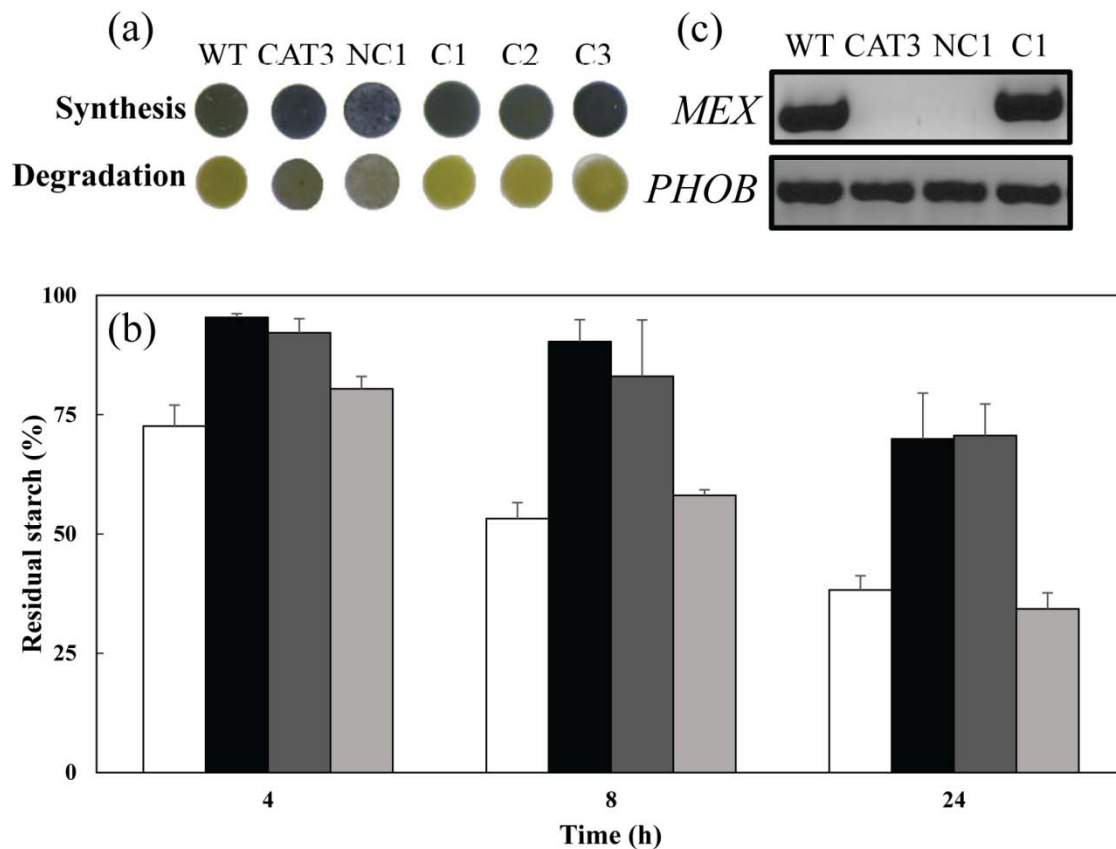
570 **Fig. 1** Phenotypic characterization of the CAT3 mutant strain. (a) Two-step iodine screening.
571 The WT and mutant strains were incubated on nitrogen starved medium for five days
572 allowing massive starch and stained with iodine (upper panel). Starvation was then removed
573 and the cells incubated in the dark for 24 additional hours prior to staining (lower panel). (b)
574 Kinetic of starch mobilization in darkness. After massive starch accumulation in nitrogen
575 starvation for five days in the light, cells were transferred into darkness after starvation
576 removal and starch was assayed at each time point and expressed as a percentage of the initial
577 amount for both the CAT3 mutant (black column) and the isogenic wild-type strain (white
578 column). Values correspond to means \pm SE of three independent experiments. (c) Expression
579 of the *MEX* mRNA in the CAT3 mutant. One microgram of total RNA extracted from the
580 wild-type and the CAT3 mutant were used to amplify a 375 bp fragment of the *MEX* gene by
581 RT-PCR. A 736 bp fragment of the starch phosphorylase gene (*PHOB*) was amplified as a
582 control.

583

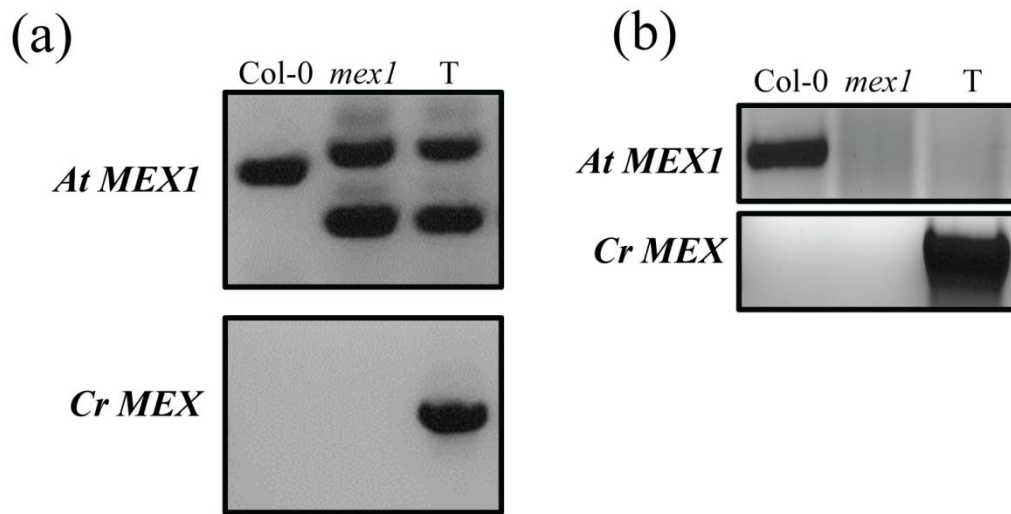


584

585 **Fig. 2** Cosegregation analysis. (a) Wild-type and mutant progeny were obtained by crossing
 586 the original CAT3 mutant and the wild-type reference strain of the opposite mating type 37.
 587 PCR analysis was performed on gDNA of each strain allowing the detection of either a 1316
 588 bp fragment of the wild-type locus or a 670 bp product corresponding to the plasmid insertion
 589 into the *MEX* gene. (b) Residual starch amounts after 24h of degradation in darkness. All the
 590 mutant and wild-type strains from eight complete tetrads were cultivated during five days
 591 under nitrogen starvation. The cells were then transferred to TMP medium and incubated in
 592 the dark 24 hours. Starch was assayed and is expressed as percentage of the initial amount.
 593 Results are expressed as means \pm SE for the mutant (black column) and the wild-type
 594 progenies (white column).

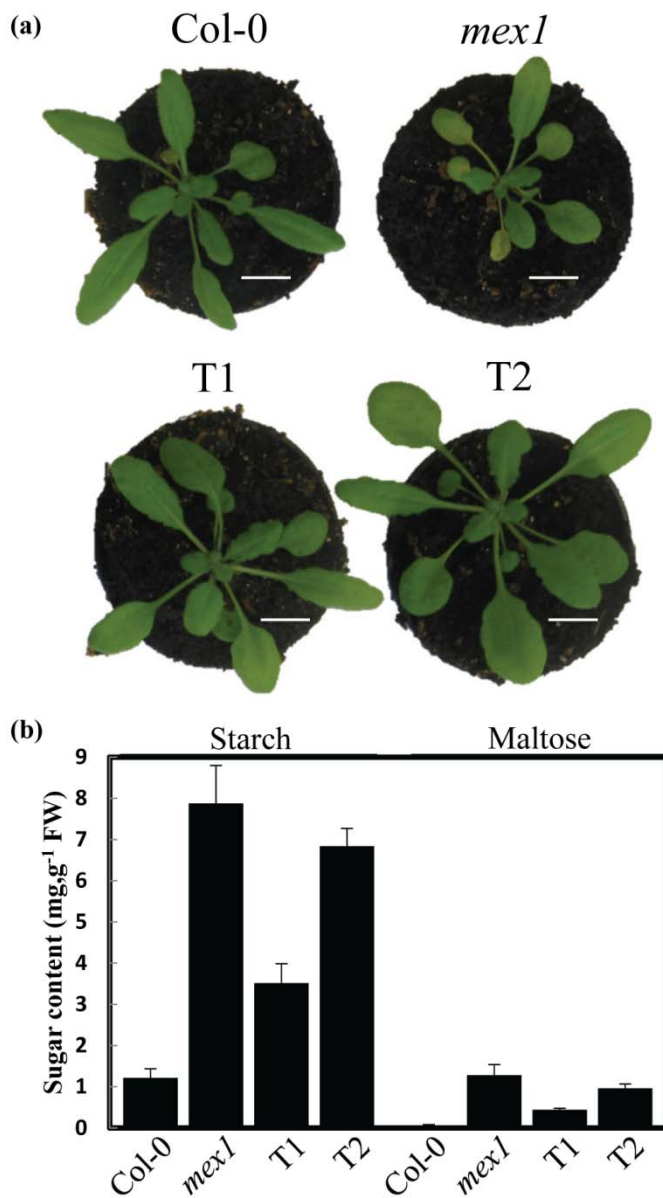


595 **Fig. 3** Functional complementation of the CAT3 mutant. (a) The two-step iodine screening
 596 was performed on hygromycin resistant strains obtained after nuclear transformation of the
 597 CAT3 mutant with either an empty pSLHyg vector (NC) or with the complementation
 598 plasmid carrying the wild-type *MEX* locus (C1-C3). (b) Kinetics of starch degradation. Cells
 599 were incubated five days in the light under nitrogen starvation and then transferred into
 600 darkness after starvation removal. Starch was assayed at each time point and expressed as a
 601 percentage of the initial amount for the wild-type strain 137C (white column), the original
 602 CAT3 mutant (black column), a complemented mutant (light grey) and a NC strain (dark
 603 grey). Results are expressed as means \pm SE of three independent experiments. (c) RT-PCR
 604 analysis. One microgram of total RNA extracted from the wild-type strain 137C, the original
 605 CAT3 mutant, the complemented strain C1 and the non complemented strain NC1 were used
 606 to amplify a 375 bp fragment of the *MEX* gene by RT-PCR. A 736 bp fragment of the starch
 607 phosphorylase gene (*PHOB*) was amplified as a control.



610

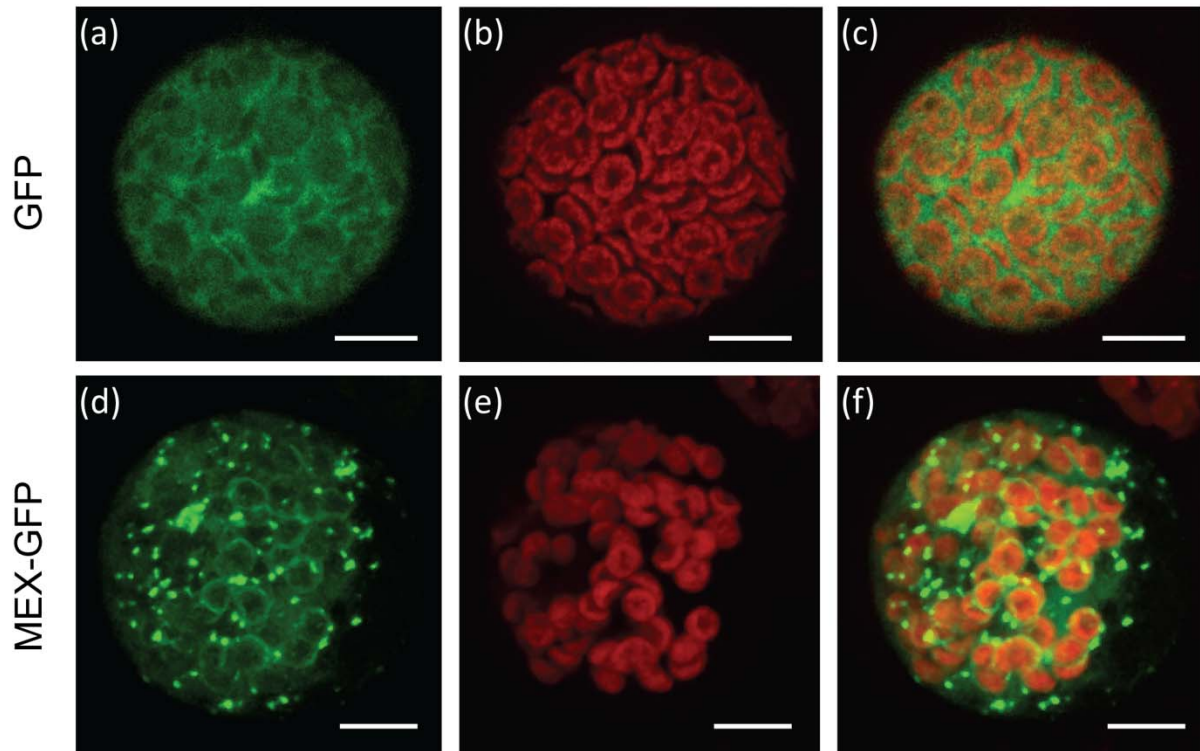
611 **Fig. 4** Expression of Chlamydomonas *MEX* in Arabidopsis *mex1* mutant. (a) PCR analysis for
 612 the Arabidopsis *MEX1* locus (upper panel) and for the presence of the Chlamydomonas
 613 transgene (lower panel). Arabidopsis wild-type *MEX* locus is assessed by the amplification of
 614 a 553 bp fragment of the gene while the T-DNA insertion leads to two fragments of 657 bp
 615 and 385 bp. The Chlamydomonas *MEX* transgene is evidenced by a 522 bp product. (b) RT-
 616 PCR analysis of the expression of the Arabidopsis (upper panel) and Chlamydomonas (lower
 617 panel) *MEX* genes. The expression of the Arabidopsis locus is revealed by a 247 bp cDNA
 618 product while the transgene transcription appears as a 522 bp fragment.



619

620 **Fig. 5** Phenotypic characterization of transgenic Arabidopsis lines. (a) Growth phenotype of
 621 5-wk-old wild-type Col-0, *mex1* mutant line and two F2 lines expressing the synthetic
 622 *Chlamydomonas* gene. Plants were grown under 12 h : 12 h, light : dark conditions. The scale
 623 is represented as a white bar corresponding to 1 cm. (b) Sugar contents of transgenic lines.
 624 Starch and maltose amounts were determined at the end of the night period using leaves of 5-
 625 wk-old plants grown in diurnal cycle. The results are expressed as the means \pm SD of three
 626 independent experiments.

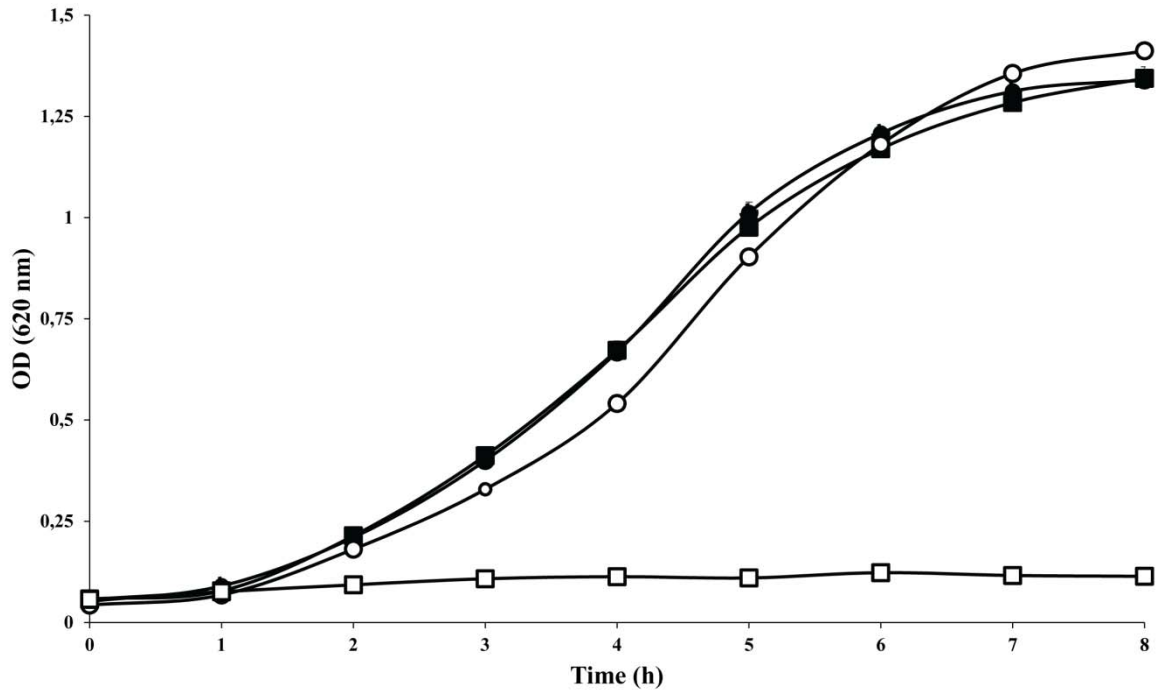
627



628

629 **Fig. 6** Localization of the *Chlamydomonas* Mex-GFP fusion protein to the chloroplast
 630 envelope membrane. GFP fluorescence in wild-type protoplasts expressing the
 631 *Chlamydomonas* Mex-GFP construct (d) or the GFP alone (a). (b) and (e) corresponds to the
 632 chlorophyll fluorescence and (c) and (f) to the merged images. Scale bar, 10 μ m.

633



634

635 **Fig. 7** Complementation of the *E. coli malF* mutant. Bacteria were grown in M9 medium
 636 containing either 0.5 % (w/v) glucose (closed symbols) or maltose (open symbols) as the only
 637 carbon source and growth was monitored at 620 nm for the *malF* strain expressing the
 638 Arabidopsis Mex protein (circles) or the codon optimized Chlamydomonas MEX gene
 639 (squares) both devoided of their transit peptides. Each point represents the mean \pm SD of five
 640 independent cultures.

641

642