

Université de Lille

Ecole Doctorale Biologie-Santé Lille

DOCTORAT

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Sylvain LAURENT

Dissection génétique du déterminisme de la  
granulométrie de l'amidon chez *Chlamydomonas  
reinhardtii*

Dirigée par le Dr David DAUVILLEE

Soutenue publiquement le 12 décembre 2018

Jury

Président	Tony LEFEBVRE, Professeur de l'Université de Lille
Rapporteuse	Claire REMACLE, Professeure de l'Université de Liège
Rapporteur	Grégory MOUILLE, Directeur de Recherche à l'INRA de Versailles
Examinatrice	Yonghua LI-BEISSON, Chercheuse HDR au CEA de Cadarache
Examineur	Christophe COLLEONI, Professeur de l'Université de Lille

---

## REMERCIEMENTS

---

Ces travaux ont été réalisés à l'Université de Lille, au laboratoire de l'UGSF (Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle) UMR 8576 du CNRS, dans l'équipe de glycobiologie végétale dirigée par le Dr Fabrice Wattebled.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé pendant ce travail de thèse.

En premier lieu, je remercie le Dr Fabrice Wattebled qui m'a accueilli dans son laboratoire. Nos discussions m'ont toujours été d'un grand secours, et tu t'es toujours montré disponible quand je sollicitai de l'aide ou des conseils.

Bien sûr, je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le Dr David Dauvillée, qui a guidé mon travail ces trois dernières années. Alors, un grand merci pour tes conseils, ton aide et ta disponibilité.

Je remercie également les deux membres à la fois du jury de thèse et de mes Comité de Suivi Individuel de Thèse, la professeure Claire Remacle de l'université de Liège, et la docteure Yonghua Li-Beisson du CEA de Cadarache. Votre participation et votre collaboration à mes travaux de thèse m'ont été très précieuses.

Mes remerciements s'adressent également au docteur Grégory Mouille de l'INRA de Versailles pour sa participation à mon jury de thèse en tant que rapporteur.

Un grand merci au professeur Christophe Colleoni, bien sûr pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, mais aussi et surtout, pour ton encadrement au cours des stages que j'ai effectué au sein de l'équipe de génétique microbienne pendant mon M2 et même avant. C'est aussi grâce à toi et à l'équipe que j'arrive au bout de cette thèse.

Merci également au professeur Tony Lefebvre, d'avoir accepté de prendre la présidence du jury de thèse, mais aussi pour ton accueil et celui de ton équipe lors de mes quelques visites.

Je veux également remercier le Dr Jean-Luc Putaux ainsi que Christine Lancelon-Pin du CERMAV de Grenoble pour leur collaboration et leurs apports en microscopie électronique.

Merci à Thierry Duchêne, pour ton aide et tes enseignements techniques.

De façon plus générale, je souhaite remercier l'ensemble du personnel de l'UGSF, et plus particulièrement le directeur de l'unité, le professeur Christophe D'Hulst.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe de glycobiologie végétale, Fabrice, Xavier, David, Coralie, Christophe, Adeline et aussi Monika. Vous avez tous contribué à ce travail à travers nos réunions d'équipes, ainsi qu'à mon enrichissement personnel grâce à vos conseils et vos enseignements. Je n'oublie pas non plus les moments privilégiés partagés autours d'un repas ou d'un verre !

Merci également à l'ensemble de l'équipe de génétique microbienne, Steven, Christophe, Cathy et aussi Maria-Cecilia. Je vous suis profondément reconnaissant de votre soutien et de votre accompagnement pendant toutes ces années.

Je ne peux évidemment pas oublier de remercier chaleureusement mes amis et ma famille, autant de preuves vivantes que toutes mes addictions ne sont pas mauvaises, bien au contraire !

Je commencerai par mes amis du bureau avec qui j'ai partagé les bons et les moins bons moments de ma thèse. La team arrageoise (de naissance ou malgré eux), Maud, Hadloub, Camille, François, Stan et Nico. La team 005, Ugo, Malika, Matthieu et Marie (une petite pensée pour elle qui commence sa thèse, je lui souhaite le meilleur !). La team microscopie, deep learning et art contemporain, Dave et Corentin. Sans oublier les autres étudiants de l'UGSF Moyira, Charles, et Maxence, et ceux qui sont parti en cours de route Justin, Derifa, Mathieu. Merci pour tous ces moments passés ensembles pour le meilleur et pour le rire, et vivement le prochain apéro avec vous tous !

Un grand merci à François, Clément, Quentin, Judith, Cindy, Elodie, Xavier, Marc, mais aussi les amis de la fac Charlotte, Raphaëlle, Thomas, Hélène, Hana, Aurélia, Radia, et Matthias. J'en oublie sûrement et j'espère qu'ils ne m'en voudront pas (à mon âge !). Ça commence un faire un sacré bout de temps que vous me supportez, et j'en suis ravi !

J'ai évidemment une pensée émue pour ma famille, en particuliers mes parents, frères et sœurs, mais aussi à ma ribambelle de cousins, cousines, nièces (et peut être bientôt un neveu), oncles, tantes, et grands-parents qui font ma fierté !

---

## ABREVIATIONS

---

- **μm** = Micromètre
- **3-PGA** = 3-phosphoglycérate
- **ADN** = Acide désoxyribonucléique
- **ADNc** = ADN complémentaire
- **ADNg** = ADN génomique
- **ADP** = Adénosine diphosphate
- **AGPase** = ADP-glucose pyrophosphorylase
- **AMY** = α-amylase
- **ARN** = Acide ribonucléique
- **ATP** = Adénosine triphosphate
- **BAM** = β-amylases
- **BE** = Enzyme de branchement
- **BSA** = Sérum albumine bovine
- **C3** = Carbone en position 3
- **C6** = Carbone en position 6
- **CBM** = Domaine de liaison aux carbohydrates
- **CCM** = Mécanisme de concentration du CO<sub>2</sub>
- **CO<sub>2</sub>** = Dioxyde de carbone
- **Da** = Dalton
- **DBE** = Enzyme de débranchement
- **DP** = Degré de polymérisation
- **DPE1** = Amidon-phosphorylase plastidiale
- **DPE2** = Amidon-phosphorylase cytosolique
- **EMS** = Méthanesulfonate d'éthyle
- **Fru6P** = Fructose-6-phosphate
- **G1P** = Glucose-1-phosphate
- **G6P** = Glucose-6-phosphate
- **GBSS** = Amidon synthase liée au grain
- **GWD** = « *α-Glucan water dikinase* »
- **HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** = Bicarbonate
- **I<sub>2</sub>** = Diiode
- **ISA** = Isoamylase
- **kb** = Kilobase
- **kDa** = Kilo-Dalton
- **kV** = Kilo-Volt
- **LSF** = « *Like sex four* »
- **M** = Molaire (mol/litre)
- **MALQ** = Amylomatase d'*E. coli*
- **MEX1** = Transporteur de maltose
- **min** = minute
- **MOS** = Malto-oligosaccharide
- **mt+/-** = Polarité sexuelle positive ou négative
- **NDP** = Nucléotide diphosphate
- **nm** = Nanomètre
- **NTRC** = NADP-thioredoxine réductase C
- **O<sub>2</sub>** = Dioxygène
- **pb** = paire de base
- **PCR** = Réaction de polymérisation en chaîne
- **PGI** = Phosphoglucose isomérase
- **PGLCT** = Transporteur de glucose
- **PGM** = Phosphoglucomutase
- **PHO1 (PHS1 chez *A. thaliana*)** = Amidon phosphorylase plastidiale
- **PHO2 (PHS2 chez *A. thaliana*)** = Amidon phosphorylase cytosolique
- **PPi** = Pyrophosphate inorganique
- **PU1** = Pullulanase
- **PWD** = « *Phospho-glucan water dikinase* »
- **rpm** = Rotations par minute
- **RT-PCR** = *Reverse transcription PCR*
- **RuBisCO** = Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
- **RX** = Rayons X
- **SDS** = Sodium dodecyl sulfate
- **SEX** = Excès d'amidon
- **SnRK1** = « *SNF1-related kinase1* »
- **SPP** = Saccharose phosphate phosphatase
- **SPS** = Saccharose phosphate synthase
- **SS** = Amidon-synthase (soluble)
- **T6P** = Tréhalose-6-phosphate
- **TOR** = « *target of rapamycine* ».
- **TPP** = T6P phosphatase
- **TPS** = T6P synthase
- **TPT** = Translocateur à triose-phosphate
- **UDP** = Uridine diphosphate
- **UV** = Ultra-violet
- **WSP** = Polysaccharide soluble dans l'eau
- **WT** = Souche sauvage
- **λ<sub>max</sub>** = Longueur d'onde au maximum d'absorption

---

## RESUME

---

L'amidon est un polymère que l'on retrouve en abondance dans le domaine du vivant. Il s'agit en effet du principal polysaccharide de réserve des organismes photosynthétiques. Sa fonction de réserve énergétique fait de l'amidon un incontournable des alimentations animale et humaine du fait de sa présence dans les céréales, les tubercules ou encore les fruits. L'amidon occupe également une place importante dans l'industrie qu'elle soit alimentaire ou non puisqu'il est à l'origine des produits nécessitant des étapes de fermentation, sert d'additif alimentaire mais est également utilisé dans d'autres secteurs industriels allant de la papeterie aux cosmétiques.

Plus récemment, l'amidon a également fait son entrée en plasturgie puisqu'il permet la synthèse de plastiques biodégradables et bio-sourcés offrant une alternative aux produits issus de l'industrie pétrochimique. Il représente désormais une solution envisageable pour pallier la raréfaction des ressources fossiles. Dans le contexte qui est le nôtre, où les préoccupations environnementales pèsent lourdement sur notre avenir, ces nouveaux matériaux sont particulièrement prometteurs. Cependant, pour que ces produits remplacent les plastiques traditionnels à grande échelle beaucoup de travail reste à faire afin de les rendre plus compétitifs. En effet, les propriétés de ces nouveaux matériaux ne correspondent pas toujours aux exigences liées à leur utilisation dans l'industrie. Cependant des axes de progressions existent. On sait par exemple, que certaines des propriétés physico-chimiques de ces matériaux sont intimement liées aux propriétés intrinsèques de l'amidon. En effet, la structure de l'amidon, sa taille, sa morphologie ou sa composition peuvent avoir des répercussions sur la qualité du produit fini. Les modifications chimiques de l'amidon ont également un impact sur ses propriétés et représentent un coût supplémentaire non négligeable. C'est pourquoi produire *in vivo* des amidons de structure ou de taille modifiée représente un véritable enjeu économique.

C'est dans ce contexte que j'ai effectué mon travail de thèse. En effet, celui-ci repose sur la découverte récente d'un nouveau mutant de l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* qui arbore une distribution de tailles de grains d'amidon altérées. Dans un environnement favorable à sa croissance, *C. reinhardtii* accumule habituellement un amidon semblable à l'amidon transitoire des feuilles des plantes supérieures autour de son pyrénoloïde. En condition de carence, cet amidon transitoire n'est plus détecté et une accumulation massive d'amidon dans le stroma prend place et finit par occuper la quasi-totalité de l'espace disponible mimant ainsi un organe de réserve tel qu'un tubercule. Le mutant *bsg1*, identifié à l'origine comme un mutant du catabolisme de l'amidon, présente en situation de carence azotée une accumulation atypique de grains d'amidon puisque deux populations de tailles distinctes sont identifiées. Ce mutant arbore un phénotype original encore non décrit à ce jour puisqu'il affiche une distribution bimodale de ses grains d'amidon, à la place de la distribution unimodale normalement observée. L'étude de ce mutant nous ouvre une voie de compréhension des mécanismes moléculaires permettant aux plantes de contrôler la taille des grains d'amidon qu'elles produisent. La mutation portée par cette souche a été identifiée par des approches de biologie moléculaire. Les analyses génétiques et de complémentation fonctionnelle effectuées nous ont permis de révéler l'origine de ce phénotype unique à ce jour dans le règne végétal.

Mots clés : Amidon, *Chlamydomonas reinhardtii*, catabolisme, granulométrie.

---

## ABSTRACT

---

### **Genetic dissection of starch granulometry in *Chlamydomonas reinhardtii***

Starch is one of the major polymer found in the plant kingdom. Indeed, it represents the main storage polysaccharide in photosynthetic organisms which allows them to sustain growth even in the dark. Starch is also the main energetic sources allowing the birth of the next plants generation. It represents one of the major source for both animal and human nutrition as it is found in cereals, tubers or fruits. Starch is widely used in food industry such as bakery and brewery but also served as additive in many derived products. This polymer of glucose is also broadly used in non-food sector such as paper mills industry or cosmetics.

Starch was recently used for producing new biodegradable and bio-based plastics. In our context of fossil resources depletion, these new materials offer a good alternative to replace the products arising from the petrochemical industry. However, the replacement of traditional plastics on a large scale by these eco-friendly materials require many improvements. Indeed, their properties do not always match the requirements related to their industrial use. Nonetheless, it is known that the physicochemical properties of these products are closely related to the starch properties themselves. Several starch characteristics such as its size, its morphology or its composition can affect the end product quality. Moreover, starch chemical modifications represent a significant additional cost. Therefore, producing *in vivo* starches, with modified sizes or structures represents a real economic challenge.

In this work, I analysed the phenotype of a new mutant harbouring a unique phenotype in the model algal *Chlamydomonas reinhardtii*. These algae are able to either produce transitory starch around their pyrenoid under unrestricted growth conditions, or storage starch under adverse growth conditions. When subjected to nitrogen starvation, *C. reinhardtii* cells are rapidly filling the stromal compartment with numerous starch granules. The *bsg1* mutant strain, first identified as a starch catabolism mutant, displays an original phenotype under nitrogen starvation. Indeed, it accumulates two distinct starch granules populations of different sizes leading to an abnormal bimodal distribution. This mutant represents a valuable tool to try to decipher molecular mechanisms controlling the sizes of the starch granules produced by plants. The mutation carried by this strain has been identified using molecular biology tools and genetics and complementation experiments allowed us to unravel the underlying mechanisms responsible of this unique phenotype.

Keywords: Starch, *Chlamydomonas reinhardtii*, catabolism, granulometry

<b>Remerciements</b> .....	<b>i</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>iii</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>I. Les principaux <math>\alpha</math>-glucanes de réserve :</b> .....	<b>2</b>
A. Le glycogène .....	2
B. L'amidon .....	3
1) Les différentes morphologies du grain d'amidon : .....	4
2) L'amylose.....	6
3) L'amylopectine .....	7
4) Les autres composants de l'amidon .....	9
C. Interactions des polymères de glucose avec l'iode .....	10
D. L'amidon dans l'industrie .....	10
1) Gélatinisation de l'amidon .....	12
2) Améliorer les bioplastiques ? .....	13
<b>II. Métabolisme des <math>\alpha</math>-glucanes de réserve</b> .....	<b>14</b>
A. Métabolisme du glycogène chez les bactéries .....	14
B. Métabolisme de l'amidon chez les plantes supérieures.....	16
1) Synthèse de l'amidon .....	17
a) Synthèse du précurseur .....	17
b) Régulation du flux de carbone .....	17
c) Initiation de la synthèse de l'amidon .....	19
d) Elongation des chaînes .....	21
e) Activités de branchement .....	23
f) Activités de débranchement .....	26
2) Dégradation de l'amidon.....	28
a) Initiation de la dégradation de l'amidon.....	28
b) Les voies de dégradation de l'amidon .....	33
i. La voie phosphorolytique .....	33
ii. La voie amylolytique.....	34
c) Export du maltose et du glucose.....	38
d) Prise en charge cytosolique .....	39
e) La dégradation de l'amidon de réserve .....	41
f) Régulation du catabolisme de l'amidon.....	42
i. Régulation diurne et circadienne .....	42
ii. Régulation par oxydo-réduction.....	43
iii. Phosphorylation et formation de complexes hétéromultimériques .....	44
iv. Le « <i>sugar signaling</i> » .....	44
<b>III. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> :</b> .....	<b>45</b>
A. Son architecture cellulaire .....	46
B. Son cycle de vie .....	48
1) La voie végétative.....	48
2) Son cycle sexuel.....	49
C. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> comme modèle d'étude .....	50
1) Génétique inverse .....	50

2) Génétique formelle .....	50
3) Les atouts de <i>C. reinhardtii</i> .....	51
4) Crible à l'iode en deux étapes .....	52
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>54</b>
<b>I. Milieux de culture et lignées cellulaires.....</b>	<b>54</b>
1) Les différentes lignées de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	54
2) Les milieux de cultures .....	54
<b>II. Identification du mutant <i>bsg1</i> par crible à l'iode en deux étapes .....</b>	<b>56</b>
<b>III. Caractérisations biochimiques.....</b>	<b>56</b>
1) Extraction et purification de l'amidon.....	57
2) Dosage de l'amidon.....	57
3) Chromatographie d'exclusion stérique .....	57
4) Chromatographie échangeuse d'anions et distribution en longueur de chaînes. ....	58
<b>IV. Caractérisations morphologiques .....</b>	<b>58</b>
1) Distribution de la taille des grains.....	58
2) Microscopie électronique à balayage .....	58
3) Microscopie électronique à transmission .....	59
<b>V. Analyse de coségrégation.....</b>	<b>59</b>
1) Gamétogenèse .....	59
2) Dissection des tétrades .....	60
<b>VI. Caractérisations enzymatiques.....</b>	<b>61</b>
1) Préparation des extraits protéiques.....	61
2) Dosage des protéines .....	61
3) Préparation des extraits de protéines.....	61
4) Préparation des gels.....	61
5) Zymogramme révélant les activités hydrolytiques .....	62
6) Zymogramme révélant les activités phosphorylases .....	62
7) Zymogramme révélant les activités synthases.....	62
8) Gels SDS-PAGE.....	62
<b>VII. Caractérisations moléculaires .....</b>	<b>63</b>
1) Extraction de l'ADN génomique .....	63
2) Réaction de polymérisation en chaîne .....	63
3) Extraction des ARN .....	63
4) Reverse Transcription PCR .....	64
<b>VIII. Complémentation fonctionnelle.....</b>	<b>64</b>
1) Construction du vecteur de complémentation .....	65
2) Ligation.....	65
3) Amplification et vérification du vecteur d'expression .....	66
a) Préparation des bactéries thermocompétentes.....	66
b) Transformation bactérienne .....	66
4) Transformation de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	67
a) Préparation de l'autolysine .....	67
b) Test de l'autolysine .....	67
c) Transformation nucléaire de <i>C. reinhardtii</i> .....	67
<b>Résultats .....</b>	<b>69</b>
<b>I. Caractérisation phénotypique du mutant <i>bsg1</i>.....</b>	<b>69</b>



1) Identification du mutant par le crible à l'iode.....	69
2) Quantification de l'amidon.....	70
3) Chromatographies d'exclusion stérique.....	72
4) Distributions en longueur de chaîne .....	72
5) Zymogrammes.....	73
6) Taille et morphologie des grains d'amidon du mutant <i>bsg1</i> .....	75
<b>II. Identification de la mutation et analyses génétiques .....</b>	<b>76</b>
1) Identification de la mutation sur le chromosome 2 .....	76
2) RT-PCR .....	78
3) Analyses de coségrégation .....	79
<b>III. Complémentation fonctionnelle.....</b>	<b>83</b>
<b>IV. Caractérisation des deux populations de grains d'amidon du mutant <i>bsg1</i> .....</b>	<b>89</b>
1) Semi-purification des deux populations de grains .....	89
2) Analyses des deux populations par chromatographies d'exclusion stérique .....	90
3) Observations par microscopie électronique à transmission .....	90
<b>Discussion.....</b>	<b>93</b>
A. Le mutant <i>bsg1</i> accumule des grains d'amidon de taille anormale .....	93
1) Plusieurs phénotypes du mutant sont associés à la délétion d'une région du chromosome 2 .....	94
2) Le gène <i>BSG1</i> est responsable de la distribution anormale des grains d'amidon.....	94
B. Le gène <i>BSG1</i> est impliqué dans la transition du métabolisme d'un amidon pyrénoidal vers celui d'un amidon de réserve quand les conditions de culture deviennent défavorables .....	95
<b>Bibliographie .....</b>	<b>98</b>

---

## INTRODUCTION

---

L'amidon et son métabolisme ont fait l'objet d'un nombre conséquent de travaux depuis des temps immémoriaux. Et pour cause, ce polysaccharide de réserve, dont la fonction première est de stocker l'énergie lumineuse captée par les organismes photosynthétiques, et leur permettre de continuer à assurer leurs fonctions cellulaires la nuit ; constitue un élément essentiel de l'alimentation animale et humaine. La principale source d'amidon de notre alimentation est représentée par les céréales (blé, riz, maïs...) dont la production mondiale annuelle s'élève à un peu plus de 2,5 milliards de tonnes (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb>). Sa fermentation est à l'origine de produits d'intérêts tels que le pain et la bière, mais l'intérêt de l'amidon ne se limite pas à notre alimentation. En effet, l'amidon est utilisé dans divers secteurs industriels non-alimentaires, traditionnellement dans l'industrie papetière, le textile et la cosmétique mais de nombreuses innovations lui proposent d'autres usages.

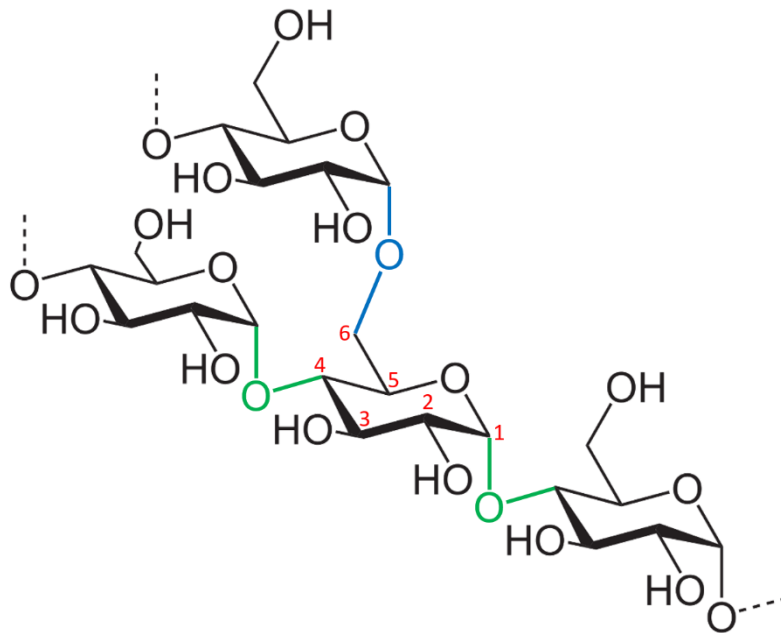
Etant donné l'épuisement des ressources fossiles et le mode de consommation de notre société, beaucoup d'espoirs sont placés dans la synthèse de nouveaux matériaux issus de la chimie verte. En effet, la chimie végétale propose des alternatives aux matériaux dérivés du pétrole, à l'image des plastiques bio-sourcés. Plus en phase avec la notion de développement durable, ces matériaux sont issus de matière première végétale et en particulier de certains polymères comme la cellulose et l'amidon.

Cependant leurs usages sont aujourd'hui encore restreints et les bioplastiques (c'est-à-dire les plastiques bio-sourcés et/ou biodégradables) ne représentent que deux des 320 millions de tonnes de plastique produits chaque année à travers le monde (<https://www.european-bioplastics.org/market/>). Les principaux facteurs limitant l'emploi des bioplastiques résident dans leur coût de production et leurs propriétés physico-chimiques parfois en dessous des exigences des industriels. Il s'avère que l'amélioration de ces facteurs nécessite un meilleur contrôle des propriétés de la matière première. C'est pourquoi l'un des objectifs du laboratoire est d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires mis en place chez les végétaux. Dans ce cadre, nos travaux peuvent conduire à la synthèse d'amidons de structures modifiées, et plus particulièrement dans le cadre de mon travail de thèse à des amidons de taille modifiée.

L'objectif de ce mémoire de thèse est de faire la synthèse de mes travaux sur le sujet, cependant et afin que tous les lecteurs puissent s'y retrouver, il est nécessaire d'aborder certaines notions. Dans un premier temps je décrirai donc la structure des deux principaux polysaccharides de réserve : le glycogène et l'amidon. Nous verrons ensuite en quoi la structure de l'amidon peut impacter la qualité des matériaux amylicés. Je décrirai les mécanismes enzymatiques connus intervenant dans la synthèse et la dégradation de ces polysaccharides, avant de décrire l'organisme modèle avec lequel j'ai pu travailler pendant ces trois années de thèse, à savoir la microalgue verte : *Chlamydomonas reinhardtii*. A la lumière de ses informations j'exposerai et discuterai alors, les résultats obtenus.

## I. Les principaux $\alpha$ -glucanes de réserve :

A travers le règne du vivant, il existe plusieurs formes de stockage de l'énergie dont les plus répandues sont le glycogène et l'amidon (Ball et Morell, 2003). Tous deux se caractérisent par une structure primaire identique et simple puisqu'il s'agit de polymères de glucose, où les unités monomériques sont liées les unes aux autres ; soit via des liaisons osidiques  $\alpha$ -1,4 servant à la formation de chaînes linéaires de glucose, soit via des liaisons osidiques  $\alpha$ -1,6 également appelées « point de branchement » puisqu'elles permettent la ramification des chaînes linéaires (Fig. 1). Bien que semblables, ces deux polysaccharides de réserve se distinguent aussi bien par leur distribution dans les domaines du vivant, que dans leurs structures macroscopiques.

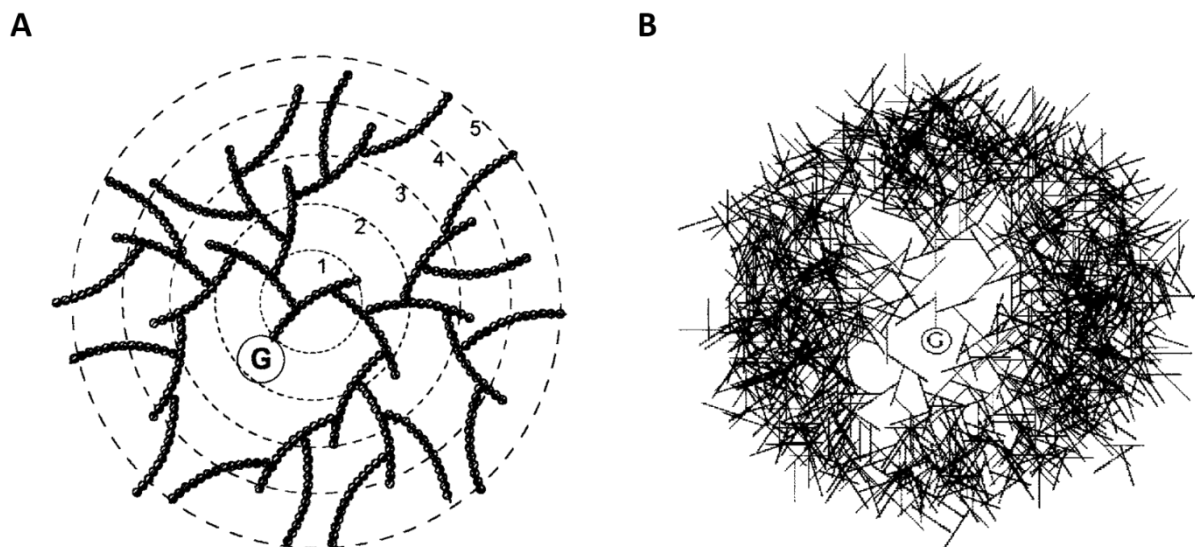


**Figure 1** : Formule semi-développée d'un  $\alpha$ -glucane ramifié. Les liaisons osidiques  $\alpha$ -1,4 apparaissent en vert et les liaisons  $\alpha$ -1,6 (ou points de branchement) en bleu. La numérotation des carbones est représentée en rouge sur le glucose central.

### A. Le glycogène

Le glycogène est le polysaccharide de réserve le plus ancien et le plus représenté. Il s'accumule dans le cytosol des cellules animales, des bactéries et archées, des champignons et des protozoaires (Manners, 1991) sous forme de petites particules sphériques et hydrosolubles. Ce polysaccharide à une structure simple, d'ailleurs son métabolisme ne requiert qu'un minimum de cinq enzymes, une ADP-glucose pyrophosphorylase, une glycogène synthase, une glycogène phosphorylase, une enzyme de branchement et une enzyme de débranchement (Ball et Morell, 2003). La structure du glycogène est conçue pour libérer rapidement une grande quantité d'énergie. En effet, selon le modèle de référence (Fig. 2), le glycogène est composé de deux types de chaînes linéaires d'une taille moyenne de douze à treize résidus glucose. On distingue les chaînes B, arborant en moyenne deux points de branchements, et les chaînes A qui n'en portent aucune. Ce modèle fait également état d'un maximum de douze couches composant la molécule de glycogène. Les chaînes B

occupent les couches les plus internes, et leur nombre s'accroît, de par leurs ramifications, à mesure que l'on s'éloigne du centre. Cette croissance exponentielle conduit à un encombrement stérique sur la couche la plus externe, empêchant l'activité des enzymes de biosynthèse et notamment de l'enzyme de branchement (responsable de la formation des points de branchements). C'est pourquoi les chaînes A que l'on trouve, exclusivement, sur cette couche extrêmement dense (puisque'elle représente à elle seule plus de 50 % des résidus glucose de la molécule), ne portent pas de ramifications. Ainsi on estime qu'une particule de glycogène a un diamètre maximal de  $\approx 44$  nm, et représente  $\approx 55000$  résidus glucose, soit une masse moléculaire de  $\approx 10^7$  kDa (Roach et al., 2012).



**Figure 2 : Structure du glycogène.** (A) Représentation schématique des 5 premières couches de la molécule de glycogène (représentées par les cercles concentriques en pointillés). La glycogénine, l'enzyme responsable de l'initiation de la synthèse du glycogène est représentée par un G. Chaque chaîne B porte 2 ramifications permettant une augmentation exponentielle de leur nombre à mesure que l'on progresse vers les couches externes. (B) Schéma de la structure complète du glycogène montrant l'encombrement stérique des couches externes. Les deux représentations tiennent compte des paramètres suivants : longueur de chaîne = 13 résidus glucose ; nombre de points de branchement par chaîne B = 2. Adapté de Meléndez et al., (1998).

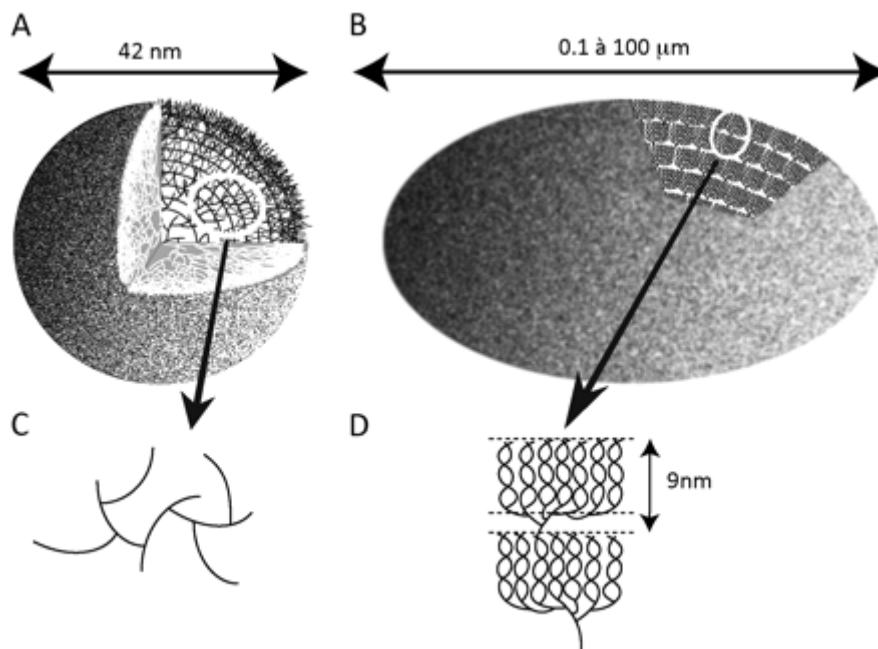
Cet arrangement structural du glycogène offre aux organismes plusieurs avantages (Melendez-Hevia et al., 1993). D'abord le glycogène permet de stocker une grande quantité de glucoses dans le plus petit espace possible, tout en évitant d'augmenter la pression osmotique cytoplasmique. Ensuite, l'exposition de glucanes linéaires non-branchés en très grand nombre à la surface de la particule, autorise une mobilisation rapide des réserves énergétiques. En effet, la glycogène-phosphorylase peut libérer les unités glucose à partir des extrémités non-réductrices sans intervention préalable de l'enzyme de débranchement. Cette caractéristique confère par exemple aux cellules musculaires un accès rapide à l'énergie nécessaire à l'exécution de contractions rapides.

## B. L'amidon

Si le glycogène se retrouve chez un grand nombre d'organismes phylogénétiquement distinct, il est intéressant de noter que l'amidon, quant à lui, s'accumule dans le plaste des

algues vertes et des plantes terrestres (*Chloroplastida*), mais aussi dans le cytoplasme des algues rouges (*Rhodophyceae*), des glaucophytes (*Glaucophyta*), et de certains dinoflagellés (Deschamps et al., 2008a) et parasites *apicomplexa* (Coppin et al., 2005). Or ces organismes dérivent tous de l'endosymbiose primaire du plaste. Cet évènement unique, fondateur du règne végétal, résulterait de l'internalisation par phagocytose d'une cyanobactérie photosynthétique par une cellule eucaryote il y a entre 0,7 et 1,5 milliards d'années (Cavalier-Smith, 2006; Yoon et al., 2004). Au cours du processus, en plus de l'acquisition de l'activité photosynthétique par la cellule phagotrophe, cette dernière a hérité également des enzymes nécessaires à l'édification du grain d'amidon. En effet, la voie de biosynthèse de l'amidon est constituée d'une mosaïque d'enzymes d'origines eucaryote et cyanobactérienne laissant supposer que la synthèse du grain d'amidon n'ait pu avoir lieu qu'après l'endosymbiose (Cenci et al., 2014).

A l'inverse du glycogène, l'amidon se présente sous la forme de grains semi-cristallins, insolubles dans l'eau et dont la taille et la forme varient selon l'origine botanique (Fig. 3, Buléon et al., 1998).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'architecture d'une particule de glycogène (A, C) et d'un grain d'amidon (B, D).** Au sein d'une particule de glycogène, on retrouve les chaînes linéaires associées en moyenne à 2 points de branchement augmentant progressivement le nombre de glucanes linéaires à mesure que l'on s'éloigne du centre de la particule. L'encombrement stérique, inévitable, limite la croissance de la particule à  $\approx 42$  nm. En **D**, seule est représentée la structure de l'amylopectine. On y observe l'alternance de 2 zones formant un bloc de 9 nm, l'une est amorphe et concentre tous les points de branchement ; l'autre est cristalline et regroupe les glucanes linéaires agencés en doubles hélices. Cette conformation permet une extension théoriquement illimitée du grain d'amidon d'où la grande hétérogénéité de taille observée entre les différentes espèces botaniques amidonnières (**B**). D'après Ball et al., 2011.

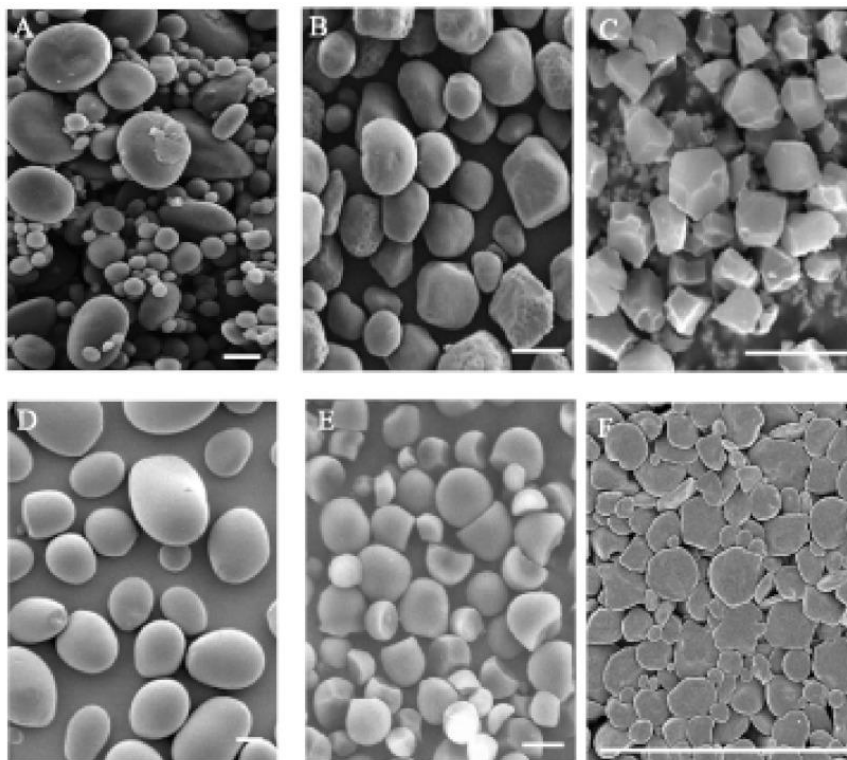
### 1) Les différentes morphologies du grain d'amidon :

Des grains d'amidon purifiés, issus de diverses espèces sont passés sous l'objectif des microscopes (<https://amidotheque.cermav.cnrs.fr>). Les amidons des céréales (Fig. 4 A, B, et

C) montrent déjà des singularités en termes de tailles et de morphologies. Alors que l'amidon de blé est ovoïde (Fig. 4A), celui du riz est polygonal avec une taille moyenne de 5  $\mu\text{m}$  (Fig. 4C). L'amidon de maïs est également polygonal mais plus grand (de 5 à 20  $\mu\text{m}$ ). Les grains les plus gros sont retrouvés dans les amyloplastes, des structures spécialisées dans la synthèse et le stockage de l'amidon que l'on retrouve au niveau des racines, rhizomes et tubercules. C'est le cas de la pomme de terre et de la racine de manioc (Fig. 4 D et E). Dans le cas de la pomme de terre le grain d'amidon, de forme ellipsoïdale, peut atteindre 100  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Les organismes utilisés comme modèle d'étude au laboratoire ont des grains nettement plus petits. Le grain d'amidon de la feuille d'*Arabidopsis thaliana* se caractérise par sa forme plate et ellipsoïdale avec un diamètre de 1 à 2  $\mu\text{m}$  (Fig. 4F, Streb et Zeeman, 2012). Tandis que l'amidon produit par *Chlamydomonas reinhardtii* (qui n'apparaît pas dans cette figure) mesure entre 0,5 et 2,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et est de forme lenticulaire (Buleon et al., 1997).

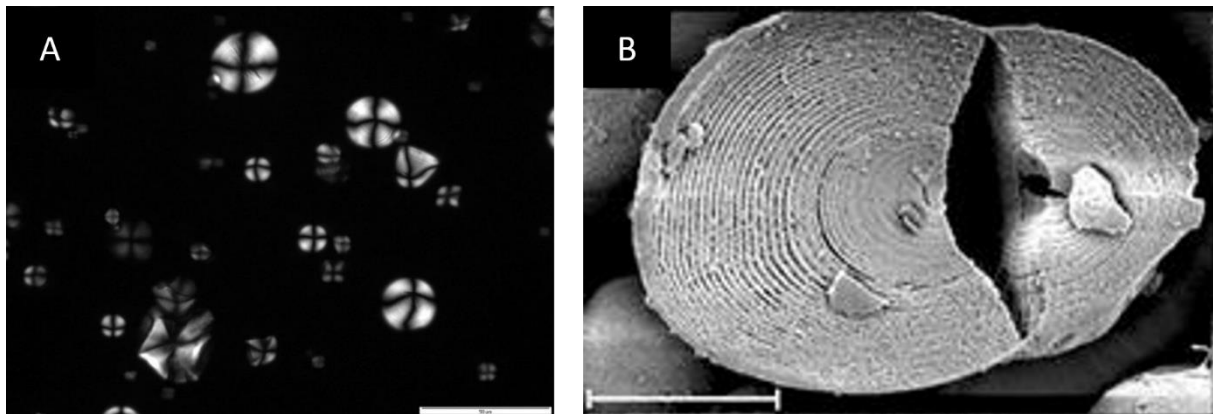
Notons que l'amidon de blé fait figure d'exception (Fig. 4A) avec celui de l'orge, du seigle et du sorgho. En effet, il s'agit des seules espèces répertoriées qui présentent une distribution bimodale de leurs grains d'amidon. On distingue ainsi dans l'albumen du blé, deux populations de grains de tailles différentes. Les grains de type A ont un diamètre de 12 à 20  $\mu\text{m}$  et les grains de type B, plus petits, mesurent entre 2 et 8  $\mu\text{m}$ . Certains rapports font même état d'une troisième population de grains, plus petite, dite de type C (Bechtel et al., 1990).



**Figure 4 : Observations par microscopie électronique à balayage de grains d'amidon issus de différentes espèces botaniques. (A) Amidon de blé, avec une distribution bimodale. (B) Amidon du grain de maïs. (C) Amidon du grain de riz. (D) Amidon du tubercule de pomme de terre. (E) Amidon de la racine de manioc. (F) Amidon de la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ . D'après Streb et Zeeman, 2012.**

L'une des caractéristiques du grain d'amidon est sa nature cristalline, le conduisant à diffracter la lumière polarisée, ce qui se manifeste par l'apparition d'une « croix de malte »

(Fig. 5A) dont les branches se rejoignent au niveau du hile, c'est-à-dire le point de naissance supposé de l'amidon. En effet, après une hydrolyse partielle, on peut observer en microscopie électronique des anneaux de croissance de l'amidon concentriques autour du hile (Fig. 5B). La biréfringence positive de l'amidon indique une organisation radiale des chaînes qui le constituent (Bertoft, 2017; Buléon et al., 1998). L'amidon peut être décomposé en deux polyglucanes. Le premier est l'amylopectine, qui représente la fraction majoritaire de l'amidon. C'est l'organisation structurale de l'amylopectine qui confère à l'amidon son caractère cristallin (Fig. 3D). La seconde fraction, minoritaire, est l'amylose.



**Figure 5 : Micrographies de grains d'amidon.** (A) Grains d'amidon de la patate douce blanche, *Ipomoea batatas* en microscopie optique et sous lumière polarisée, révélant la croix de malte. (Image disponible sur <https://amidotheque.cermav.cnrs.fr>). Barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$ . (B) Observation en microscopie électronique à balayage, d'une coupe de grain d'amidon issu du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Après hydrolyse partielle par des  $\alpha$ -amylases, les anneaux de croissance apparaissent. Adapté de Pilling et Smith, 2003. Barre d'échelle = 10  $\mu\text{m}$ .

## 2) L'amylose

L'amylose représente la partie minoritaire de l'amidon, qui compte pour 15 à 30 % du poids sec du grain. Cependant cette proportion peut varier aux extrêmes puisqu'il existe des amidons « waxy » (cireux) qui ne contiennent pas, ou très peu d'amylose. Et à l'inverse des amidons génétiquement modifiés peuvent atteindre des proportions d'amylose de 50 à 80 % (Banks et al., 1971a; Liu et al., 2013). Carciofi et al., (2012) font même état d'une lignée transgénique d'orge chez laquelle le grain d'amidon est presque entièrement constitué d'amylose (<1 % d'amylopectine).

L'amylose est un polysaccharide essentiellement linéaire avec un taux de branchement très faible (<1 %). Il est constitué de longues chaînes dont la taille moyenne varie d'une espèce à l'autre, allant de plusieurs centaines (maïs) à plusieurs milliers (pomme de terre) résidus glucose. Ces chaînes agencées en hélices, interagissent avec différents composés tels que le diiode, les acides gras, ou certains alcools pour former des complexes d'inclusion. Ces derniers intéressent particulièrement l'industrie alimentaire puisqu'ils permettent à l'amylose de fixer certains composés aromatiques volatils améliorant ainsi la qualité des denrées (Conde-Petit et al., 2006).

On associe généralement l'amylose à la région amorphe de l'amidon, mais bien que sa localisation au sein du grain soit encore sujet à discussion, l'hypothèse selon laquelle l'amylose serait dispersée dans l'amylopectine semble être la plus vraisemblable (Jane et al., 1992).

L'amylose peut être séparé de l'amylopectine lors de la gélatinisation du grain. En milieu aqueux à 60-70 °C, l'énergie thermique perturbe l'organisation moléculaire des grains d'amidon, lesquels gonflent par transfert d'eau et perdent leur caractère cristallin (Tao et al., 2018). Ce processus conduit à une augmentation de la viscosité, à la solubilisation de l'amidon et au lessivage de l'amylose. Ce phénomène est irréversible, cependant après la gélatinisation et si la température diminue, le grain subit une rétrogradation progressive où les chaînes d'amidon ont tendance à se réassocier en une structure ordonnée (Eom et al., 2018). La rétrogradation est responsable par exemple du rassissement du pain et d'autres denrées alimentaires.

Enfin si le caractère cristallin de l'amidon est attribué uniquement à l'amylopectine, l'amylose est toutefois capable d'affecter directement l'organisation de la lamelle semi-cristalline du grain d'amidon (Blazek et al., 2009; Wattedled et al., 2002).

### 3) L'amylopectine

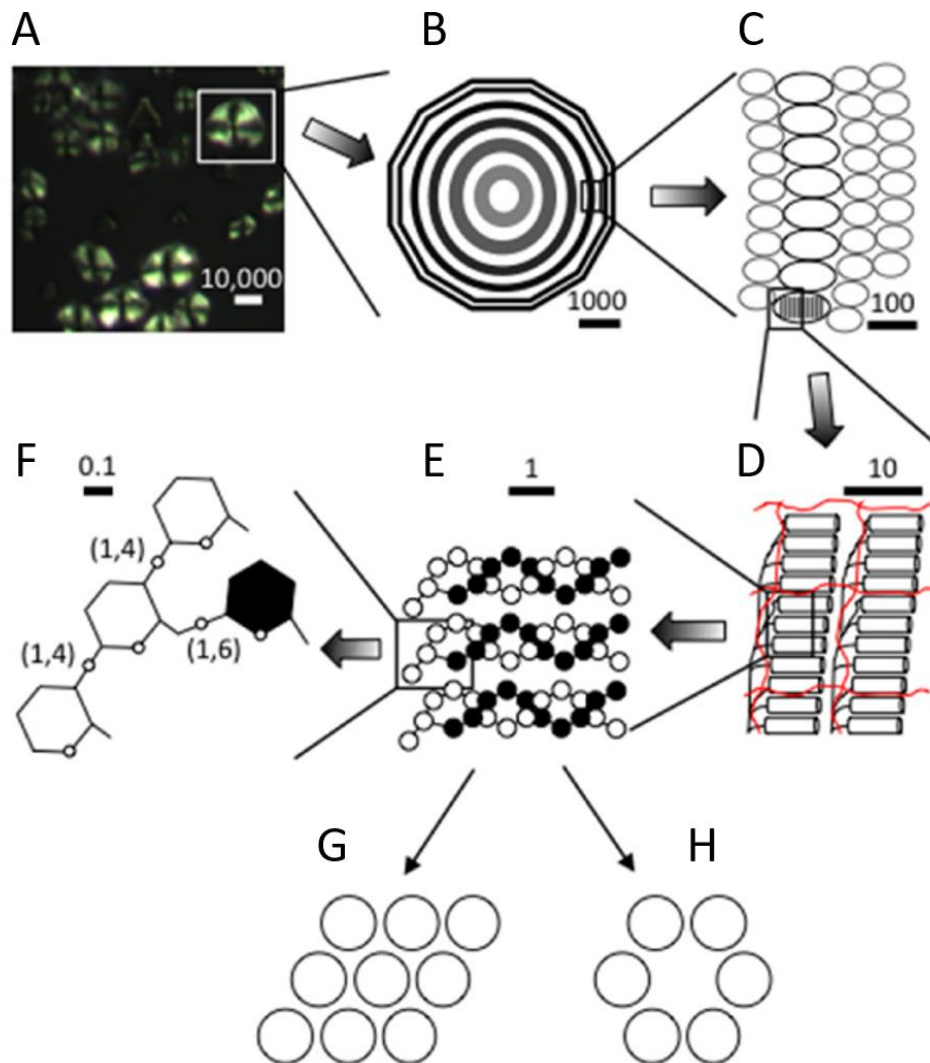
L'amylopectine représente en moyenne 80 % du poids sec de l'amidon. Il s'agit d'une molécule de grande taille dont le poids moléculaire est évalué aux alentours de  $10^7$  à  $10^9$  Da (Buléon et al., 1998). La molécule est constituée de nombreuses chaînes linéaires, lesquelles sont branchées les unes aux autres par des liaisons  $\alpha$ -1,6 qui représentent en moyenne 5 % des liaisons osidiques de la molécule. Notons que ces points de branchements sont concentrés dans une région, délimitant la lamelle amorphe, et obligeant les chaînes linéaires à s'agencer de façon ordonnée en doubles hélices parallèles (Imberty et al., 1991). Cette organisation particulière confère à l'amidon son caractère cristallin. La succession des lamelles amorphes et cristallines forment des structures en grappes (ou clusters) répétées avec une périodicité de 9 nm indépendamment de l'origine végétale (Fig. 3D, Jenkins et al., 1993; Zeeman et al., 2002).

Les chaînes de l'amylopectine sont orientées de telle sorte que leurs extrémités non-réductrices soient tournées vers l'extérieur du grain. Dans la littérature on distingue les glucanes constitutifs de cette sous-fraction de l'amidon en fonction de leur taille, ou degré de polymérisation (DP), c'est-à-dire en fonction du nombre d'unités glucose dont ils sont composés. On distinguera les chaînes courtes et les chaînes longues, avec une frontière entre les deux groupes fixée aux alentours de DP =36 (Bertoft, 2017). D'un point de vue structural, les chaînes d'amylopectine sont classées selon trois types, A, B et C (Peat et al., 1956). Les chaînes de type A, portées par les chaînes de type B, n'arborent aucune ramification. Les chaînes de types B sont à leurs tours supportées par d'autres chaînes de type B plus internes, jusqu'à la chaîne C, unique, portant la seule extrémité réductrice de la molécule. Selon Hizukuri (1986), il existe quatre classes de chaînes B, nommées B1 à B4 en fonction de leurs tailles et de leurs positions. Ainsi les chaînes A et B1 sont des chaînes courtes que l'on retrouve au sein d'un même cluster. Les chaînes B2 et B3 traversent respectivement deux et trois clusters, et les chaînes B4 plus rares s'étendent au-delà.

Si l'organisation en cluster est commune à toutes les amylopectines indépendamment de leurs origines botaniques, l'agencement tridimensionnel des doubles hélices de glucanes au sein d'un cluster peut, quant à lui, diverger selon l'espèce considérée. En effet, selon la disposition des hélices on discerne les amylopectines de type A, B ou C (Buléon et al., 1997). Les amylopectines de type A sont les formes les plus compactes (Imberty et al., 1988) (Fig. 6G)



que l'on retrouve chez les céréales, mais aussi chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Les amylopectines de type B sont à l'inverse, plus lâches, formant des structures où, six doubles hélices gauches entourent 36 molécules d'eau (Imberty et Perez, 1988) (Fig. 6H). Il s'agit de structures que l'on trouve dans les amidons des organes de réserve comme les racines ou les tubercules. La forme C de l'amylopectine est en réalité une combinaison des formes A et B que l'on trouve majoritairement chez les légumineuses.



**Figure 6 : Les différents niveaux d'organisation structurale de l'amidon. (A)** Amidon de maïs sous lumière polarisée, montrant la croix de malte. **(B)** Schématisation d'un grain d'amidon avec ses anneaux de croissance émergeant du hile. **(C)** Organisation des blocklets au sein des anneaux de croissance. Les plus gros forment les couches cristallines « dures » (noir), les plus petits forment les couches amorphes « molles » (gris). **(D)** Lamelles cristallines formées de doubles hélices de glucanes (représentées sous la forme de cylindre) et dont les points de branchement, concentrés dans une même région, forment la lamelle amorphe. Les molécules d'amylose (rouge) s'intercalent à travers les molécules d'amylopectine. **(E)** Trois doubles hélices d'amylopectine, chacune constituées de deux chaînes glucaniques dont les unités glucoses sont représentées par des cercles blancs et noirs. Ces doubles hélices peuvent adopter des conformations tridimensionnelles différentes donnant naissance à des cristaux de type A ou B (**G** et **H** respectivement, où les cercles représentent les doubles hélices en coupe transversale). **(F)** Chaînes glucaniques à l'origine des doubles hélices, où les unités de glucose sont liées en  $\alpha$ -1,4 et branchés en  $\alpha$ -1,6. Les barres d'échelles (en nm) permettant d'apprécier les dimensions sont approximatives. De Bertoft, 2017.

Nous l'avons vu, après digestion partielle de l'amidon par les amylases, apparaissent les anneaux de croissance de l'amidon. Ces anneaux témoignent de l'existence de régions amorphes, sensible à l'action des amylases ; et de régions cristallines résistantes. Cependant cet aspect ne correspond pas à l'alternance des lamelles amorphes et cristallines d'un cluster. En effet si la périodicité des clusters est de 9 nm, la largeur des anneaux de croissance est de l'ordre de plusieurs centaines de nanomètres (Jenkins et al., 1993; Pilling et Smith, 2003; Zeeman et al., 2002). Les anneaux de croissance témoignent donc d'une hiérarchie structurale supérieure.

Ce niveau hiérarchique correspond à ce que Gallant et al., (1997) nomment les « blocklets ». Ces derniers sont décrits comme de petites structures sphériques, elles-mêmes composées de plusieurs clusters. Les blocklets auraient des tailles différentes en fonction de l'origine botanique et de leur localisation sur les anneaux de croissance. Ainsi chez le blé, les blocklets composent les couches amorphes du grain auraient une taille d'approximativement 25 nm, contre 80 à 120 nm dans les couches cristallines. Chez la pomme de terre, ces structures pourraient atteindre une taille allant de 200 à 500 nm. Cependant, comme ces données ont été obtenues à partir d'amidon partiellement hydrolysés, leur fiabilité est parfois remise en cause en raison de la dégradation probable de l'amidon (Cordenunsi et Simão, 2009).

Finalement, l'amylopectine (et par extension l'amidon), bien que composée des mêmes briques élémentaires que le glycogène, arbore une architecture bien plus complexe avec de multiples niveaux hiérarchiques (Fig. 6 A-F). Cette organisation permet une croissance théoriquement illimitée du grain d'amidon, la seule contrainte reposant sur les limites imposées par l'organite ou la cellule qui l'enveloppe.

#### **4) Les autres composants de l'amidon**

Bien que les carbohydrates constituent l'essentiel du grain d'amidon, d'autres molécules représentent quelques pourcents de son poids sec. En effet des lipides, des phosphates et des protéines sont également purifiés avec l'amidon.

Les protéines associées au grain sont principalement les enzymes nécessaires à sa biosynthèse comme les amidons synthases I et II, et une enzyme de branchement (Borén et al., 2004; Grimaud et al., 2008). Les protéines du grain peuvent être soit, faiblement liées à la surface du grain, auquel cas un simple traitement au SDS peut les en dissocier (Helle et al., 2018) ; soit fermement liées et/ou piégées à l'intérieur du grain comme en témoigne l'amidon synthase liée au grain (GBSS). Notons que cette GBSS, responsable de la synthèse de l'amylose, représente à elle seule, plus de 95 % des protéines liées au grain (Rongine de Fekete et al., 1960).

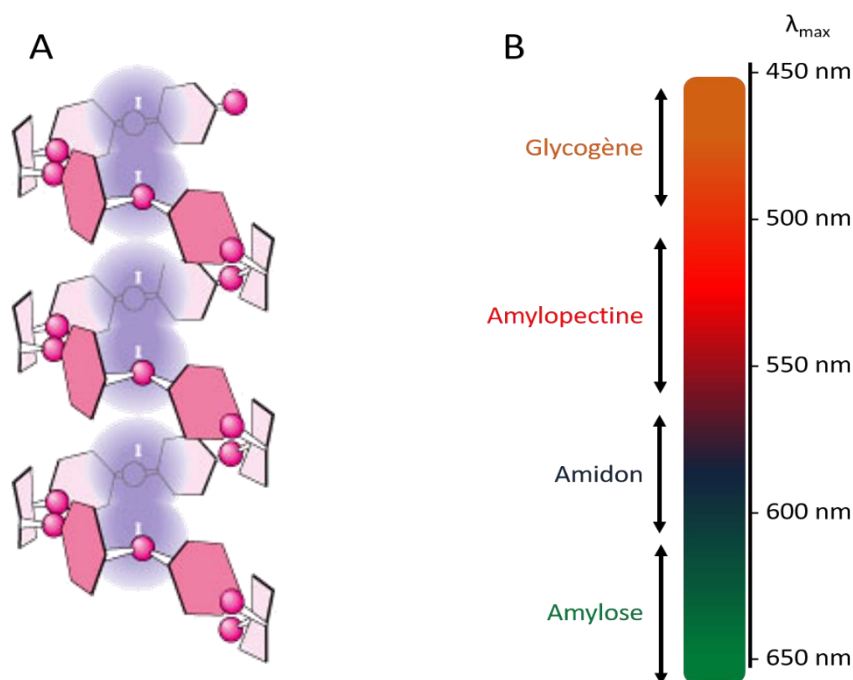
Les lipides associés aux grains d'amidon sont rares pour les racines et les tubercules mais particulièrement abondants pour les céréales comme le blé, le maïs, et le riz où ils représentent entre 0,6 et 1,2 % du poids sec de l'amidon (Waterschoot et al., 2015). Ces lipides sont pour la plupart des acides gras libres ou des lysophospholipides formant des complexes d'inclusion avec l'amylose (Morrison, 1988), ou des triglycérides en surface du grain (Buléon et al., 1998).

Enfin, l'amidon peut aussi contenir des groupements phosphates. A l'inverse des lipides, ils sont plutôt rares chez les céréales où ils sont essentiellement retrouvés sous la forme de phospholipides ; mais bien plus abondants dans l'amidon des tubercules et des racines, sous

la forme de monoesters liés sur les carbones en position 6 et 3 de certains résidus glucose de l'amylopectine. Chez la pomme de terre, les groupements phosphates peuvent ainsi représenter jusqu'à 0,09 % du poids sec du grain d'amidon (Buléon et al., 1998; Verbeke et al., 2016). Dans les mêmes proportions que le phosphate, d'autres éléments peuvent être trouvés dans l'amidon comme du potassium et du magnésium (Blennow et al., 2005).

### C. Interactions des polymères de glucose avec l'iode

Une caractéristique commune des  $\alpha$ -glucanes est leur capacité d'interagir avec l'iode. Cette interaction décrite par Banks et al., (1971b) repose sur deux paramètres, la taille du polysaccharide et son degré de ramification. Effectivement, la molécule de diiode est piégée dans l'hélice formée par les glucanes linéaires de plus de douze résidus glucose, et l'interaction sera d'autant plus forte que le degré de polymérisation de la chaîne sera important (Fig. 7A). Cela se traduit par une augmentation de la valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ), valeur à laquelle est associée une couleur. A l'inverse plus la chaîne sera ramifiée et plus l'interaction sera faible. Ces paramètres permettent donc par un simple test colorimétrique de distinguer les différents polymères de glucose, et les modifications de leurs structures (Fig. 7B).



**Figure 7 : Interaction de l'iode avec les polysaccharides.** (A) Les  $\alpha$ -glucanes linéaires de plus de 12 résidus glucose forment une hélice gauche dans laquelle s'attachent les molécules de diiode ( $I_2$ ). (B) La structure du polysaccharide modifie la longueur d'onde au maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) du complexe, et donc sa couleur. Après coloration du polysaccharide à l'iode il est donc possible de discriminer le glycogène qui se colore en brun, de l'amylopectine (rouge), de l'amidon (bleu nuit), et de l'amylose (vert).

### D. L'amidon dans l'industrie

L'amidon est la première ressource calorique de l'alimentation animale et humaine. Il peut bien sûr, être consommé directement depuis le végétal dont il est issu (pomme de terre, maïs, blé, riz...) mais il peut aussi entrer dans la composition d'un plat préparé. L'industrie

alimentaire peut ainsi utiliser l'amidon sous sa forme native, comme ingrédient naturel, pour l'élaboration de boissons, de desserts, de confiseries, ou encore de pâtisseries ; autant de produits pour lesquels l'amidon est apprécié pour ses propriétés de liant, épaississant, stabilisant, texturant, ou gélifiant. Les amidons peuvent aussi être modifiés physiquement (prégélatinisés, dextrinés) ou chimiquement (réticulés, dérivatisés) dans le but d'améliorer leurs performances. Certains de ces amidons modifiés servent alors d'additifs alimentaires (ils seront identifiés par un code SIN commençant par E14). Mais le plus souvent l'amidon est simplement hydrolysé pour obtenir des édulcorants (sirop de glucose, maltodextrine). L'amidon est donc omniprésent dans notre alimentation, mais l'intérêt de l'industrie pour ce polysaccharide ne se restreint pas à l'activité alimentaire (Fig. 8). En effet, l'amidon est utile à de nombreux autres secteurs industriels comme la papeterie (couchage et glaçage du papier), la construction (conception de mortier, adhésif de contre-plaqué), le textile (apprêt des tissus, impression), la cosmétique (effet matifiant de la peau, absorption du sébum), la pharmaceutique (enrobage, capsulage). Il entre également dans la composition des boues de forage des plateformes pétrolières, des têtes d'allumettes ou de certains procédés de décapage.



**Figure 8** : Liste non-exhaustive des différentes applications industrielles de l'amidon.

Au vu de la crise écologique que nous connaissons aujourd'hui, de plus en plus de normes encourageant le développement durable et la lutte contre le réchauffement climatique sont mises en place. Dans ce contexte, l'amidon peut contribuer à diminuer notre empreinte environnementale. En effet, avec la disparition des ressources fossiles, les industries suivent avec intérêt le développement des matériaux alternatifs aux dérivés du pétrole. Parmi ces matériaux, les bioplastiques produits à partir d'amidon sont particulièrement prometteurs. Les bioplastiques, qui désignent les plastiques bio-sourcés (issus de matière première renouvelable), et/ou biodégradables (un plastique bio-sourcé n'est pas forcément biodégradable et inversement (Babu et al., 2013)) sont déjà utilisés dans la conception de

nombreux objets mais principalement dans les domaines de l'emballage et du conditionnement. Ils pourraient pourtant s'avérer utile dans d'autres secteurs industriels comme par exemple dans l'automobile. En effet, l'automobile est un secteur particulièrement soumis aux normes écologiques. Par exemple, les véhicules émettant plus de 140 g de CO<sub>2</sub> par kilomètre ont été progressivement pénalisés au profit de véhicules plus « propres ». L'une des solutions pour les constructeurs était alors de diminuer le poids des véhicules en remplaçant une partie des métaux par du plastique. Par conséquent, le plastique représente aujourd'hui près de 20 % du poids moyen d'un véhicule. De plus la directive européenne (2000/53) relative aux véhicules hors d'usage (VHU) indique que depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2015 le taux de réutilisation et de valorisation (recyclage et valorisation énergétique) doit atteindre 95 % du poids moyen du véhicule. C'est pour faire face à ces défis que certains projets comme MATORIA (MATériaux d'Origine Renouvelable Innovants pour l'Automobile) pour le groupe PSA Peugeot Citroën ont vu le jour.

Les bioplastiques ne remplissent cependant pas encore toutes les conditions pour de telles applications et manquent de compétitivité vis-à-vis des matériaux de l'industrie pétrochimique. En effet, à l'heure actuelle ces matériaux ont un coût de production élevé, et dans le cas des amidons plastifiés, leur sensibilité aux conditions atmosphériques notamment à l'eau, et au vieillissement limite leur usage (Babu et al., 2013). Beaucoup d'effort sont donc encore requis pour améliorer les procédés et le contrôle des propriétés physico-chimiques de ces nouveaux matériaux.

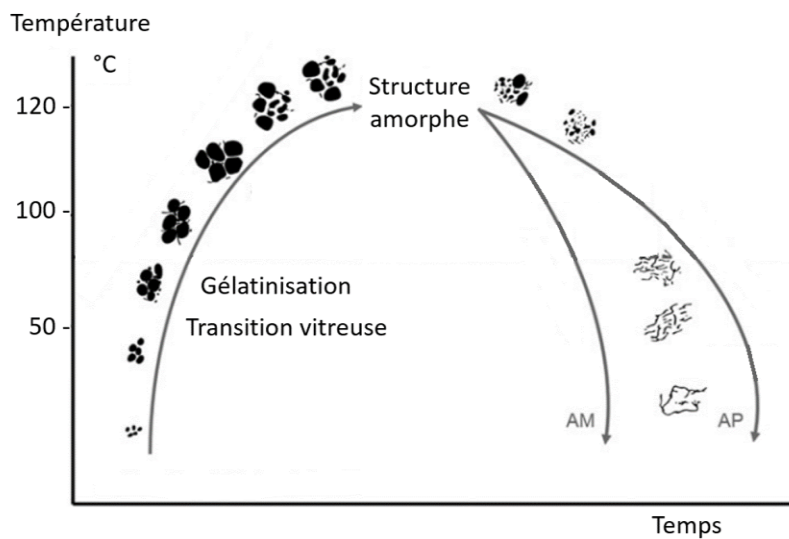
L'utilisation de l'amidon en tant que bioplastique nécessite l'obtention d'une matrice homogène à partir des grains d'amidon afin d'en faciliter le traitement. Pour y parvenir il faut déstructurer l'amidon en lui appliquant une énergie thermique ou mécanique (Thiré, 2009). En plasturgie, plusieurs procédés de déstructuration de l'amidon peuvent être cités comme le casting, où l'extrusion. Ces traitements physiques modifient la structure de l'amidon en fonction de plusieurs paramètres, tels que la composition de l'amidon (quantité d'amylose et d'amylopectine), de la teneur en eau, ou des conditions de traitement. La maîtrise de l'utilisation des matériaux amyliques nécessite la compréhension des transitions de phases de l'amidon et de son comportement rhéologique.

## **1) Gélatinisation de l'amidon**

A température ambiante et en suspension, l'eau pénètre dans les régions amorphes de l'amidon, conduisant à un léger gonflement du grain. A ce stade, le processus est réversible mais à mesure que la température augmente, on assiste à des modifications plus importantes de la structure du grain. On observe ainsi la transition vitreuse, la gélatinisation (ou fusion), et la rétrogradation lors du refroidissement (Schirmer et al., 2015) (Fig. 9).

La transition vitreuse (T<sub>g</sub>) correspond au point de température à partir duquel l'amidon passe d'un état rigide (vitreux) à un état caoutchouteux (Slade et Levine, 1988). Au-delà de cette température l'amidon gélatinise. La gélatinisation commence par une absorption d'eau par les régions amorphes du grain conduisant à la rupture des ponts hydrogènes, la déstabilisation des chaînes se transmet plus tard à la lamelle cristalline. En résulte un gonflement des grains qui atteignent plusieurs fois leur taille d'origine (Parker et Ring, 2001), l'amidon perd sa biréfringence (perte de cristallinité et disparition de la croix de Malte sous lumière polarisée) et on obtient une pâte visqueuse. Notons que la viscosité est due à la dissociation de l'amylose

et de l'amylopectine, ainsi qu'à l'augmentation du volume des grains au cours du processus (Copeland et Preiss, 1981; Parker et Ring, 2001).



**Figure 9 : Représentation des transitions de phase de l'amidon soumis à la chaleur.** Quand l'amidon en suspension est soumis à une température croissante, il franchit d'abord la transition vitreuse qui est encore réversible. Si la température continue de croître la gélatinisation engendre des modifications structurales irréversibles, l'amylose est lessivé augmentant la viscosité du milieu. L'augmentation de la température finit par déstructurer complètement les grains, il en résulte une perte de viscosité et la formation d'une structure amorphe. La rétrogradation s'opère pendant le refroidissement, où les chaînes des polysaccharides vont se ré-agencer en une structure plus ordonnée, ce qui s'accompagne d'une légère augmentation de la viscosité. La rétrogradation de l'amylose (AM) est plus rapide (quelques heures) que celle de l'amylopectine (AP) (plusieurs jours). Adapté de Schirmer et al., (2015).

La gélatinisation dépend des propriétés de l'amidon (composition, morphologie, architecture et poids moléculaire), des contraintes physiques du procédé (force de cisaillement, température), des additifs que l'on peut ajouter dans la préparation, et de la présence d'eau. Remarquons que l'on différencie la gélatinisation (processus ayant lieu en excès d'eau), de la fusion (en conditions limitées en eau) puisque l'eau agit comme un plastifiant, c'est-à-dire une substance permettant de réduire la température de fusion de la matrice (ici l'amidon), et l'amenant en-dessous de la température de décomposition (Thiré, 2009).

## 2) Améliorer les bioplastiques ?

Tous ces paramètres influençant la gélatinisation sont particulièrement importants puisqu'ils affectent également les qualités du produit final (Schirmer et al., 2015). Parmi ces paramètres, l'un d'entre eux est à l'origine de cette thèse. En effet, la taille des grains d'amidon peut elle aussi influencer la gélatinisation (Parker et Ring, 2001). Une étude menée sur l'amidon de blé, espèce pour laquelle, rappelons-le, il existe deux types de grains d'amidon de tailles différentes (grains de type A > 10  $\mu\text{m}$  ; et type B < 10  $\mu\text{m}$ ), a montré que la taille des grains peut influencer la gélatinisation (température de gélatinisation et enthalpie) et la viscosité (Geera et al., 2006). D'autres propriétés semblent, elles-aussi, être conditionnées par la taille des grains comme la capacité de gonflement (Wong et Lelievre, 1982), la

rétrogradation (Zhang et al., 2016), où la rhéologie (c'est-à-dire, la capacité de la matière à se déformer ou à s'écouler sous l'effet d'une contrainte) (Shinde et al., 2003).

Comme nous l'avons vu plus tôt, les amidons peuvent être modifiés pour améliorer certaines de leurs propriétés. La dérivatisation, c'est-à-dire, la transformation d'un composé chimique en un autre de structure similaire mais aux propriétés chimiques différentes, permet par exemple de changer la solubilité, ou le point d'ébullition et de fusion d'un composé chimique. Il est donc possible de modifier les grains d'amidon de façon à améliorer les propriétés des produits amylicés. Cependant, pour avoir une dérivatisation efficace plusieurs facteurs sont à prendre en compte. Parmi ces paramètres la porosité, la capacité de gonflement et la taille des grains améliorent la réactivité. En effet, plusieurs études indiquent une influence de la taille sur la réactivité (Bertolini et al., 2003; Van Hung et Morita, 2005). Une explication possible serait qu'à poids égal, les amidons constitués de petits grains contribuent à une plus grande surface de réaction que les amidons à grains larges (Huber et BeMiller, 2009).

Finalement dans un contexte où l'un des principaux facteurs limitant l'usage des matériaux amylicés est leur manque de compétitivité vis-à-vis de leurs homologues issus de l'industrie pétrochimique, la compréhension des mécanismes moléculaires régissant la taille des grains d'amidon, mais aussi de façon plus générale la synthèse *in vivo* d'amidons de structures modifiées peuvent devenir de formidables leviers conduisant à des matériaux plus rentables et de meilleure qualité.

## **II. Métabolisme des $\alpha$ -glucanes de réserve**

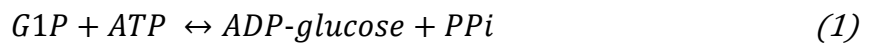
Comme décrit précédemment, le glycogène et l'amidon partagent les mêmes briques élémentaires, puisqu'ils sont tous deux constitués d'unités glucose liées en  $\alpha$ -1,4 et branchées en  $\alpha$ -1,6. En revanche, ils se caractérisent par leurs architectures passant d'une particule sphérique hydrosoluble pouvant atteindre 40 nm de diamètre, à un grain semi-cristallin, insoluble dans l'eau et d'une taille théoriquement illimitée.

Il semble donc logique que les voies métaboliques aboutissant à la construction de ces deux polysaccharides, bien que différentes, partagent au moins quelques activités enzymatiques communes. La théorie endosymbiotique propose même une relation plus intime entre le métabolisme des deux polymères, où l'internalisation d'une cyanobactérie photosynthétique par une cellule eucaryote aurait permis la transition d'un métabolisme du glycogène vers celui de l'amidon (Cenci et al., 2014). En effet, l'amidon se trouve uniquement chez les eucaryotes photosynthétiques ou leurs dérivés non-photosynthétiques (comme les parasites apicomplexes), tandis que le métabolisme du glycogène est beaucoup plus répandu à travers les domaines du vivant. Celui-ci est d'ailleurs particulièrement bien conservé chez les bactéries et les cyanobactéries.

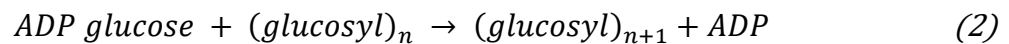
### **A. Métabolisme du glycogène chez les bactéries**

Seules cinq enzymes sont suffisantes et nécessaires au métabolisme du glycogène chez les bactéries. Chez *Escherichia coli* les gènes codant ces enzymes sont organisées en un opéron (Montero et al., 2011) avec d'amont en aval, les gènes *GLGB* (codant une enzyme de branchement, EC 2.4.1.18), *GLGX* (codant une enzyme de débranchement, EC 3.2.1.196), puis

les gènes *GLGC*, *GLGA*, et *GLGP* codant respectivement l'ADP-glucose pyrophosphorylase (EC 2.7.7.27), la glycogène synthase (EC 2.4.1.21) et la glycogène phosphorylase (EC 2.4.1.1). La première étape de la synthèse du glycogène (Fig. 10) consiste à former un nucléotide-sucré (NDP-glucose), précurseur indispensable à l'initiation et l'élongation des chaînes de glucose (Leloir, 1971). Notons que les eucaryotes hétérotrophes construiront leur glycogène à partir d'UDP-glucose, tandis que la plupart des bactéries le feront à partir d'ADP-glucose (Ballicora et al., 2003). Ce dernier est produit selon la réaction 1, catalysée par l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase).

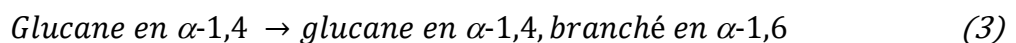


A l'inverse des mammifères, l'activité enzymatique de l'AGPase joue un rôle important dans la régulation de la biosynthèse du glycogène chez les bactéries (Preiss, 2014; Preiss et al., 1983). L'unité glucose sera ensuite transférée du nucléotide-sucré vers l'extrémité non-réductrice d'une chaîne glucanique préexistante, créant ainsi une nouvelle liaison  $\alpha$ -1,4 sous l'action de la glycogène synthase (réaction 2).

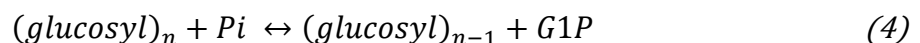


Remarquons que chez les animaux ou les champignons, une protéine capable d'autoglucosylation : la glycogénine, est indispensable à l'initiation de la synthèse d'une chaîne glucanique (Roach et al., 2012). Chez les bactéries, c'est la glycogène synthase qui assure à la fois l'initiation et l'élongation (Ugalde et al., 2003).

A ce stade, l'organisme n'est capable de produire que des chaînes linéaires de glucose. Pour parvenir à une structure ramifiée telle que le glycogène, une enzyme de branchement (BE) est nécessaire. Pour réaliser ces points de branchements, l'enzyme procède en deux temps. D'abord, elle hydrolyse une liaison  $\alpha$ -1,4 à l'extrémité non-réductrice d'un glucane linéaire, libérant un segment de 6 à 9 résidus. Elle transfère ensuite ce segment en C6 d'un résidu glucose, soit sur la même chaîne, soit sur une autre ; formant une liaison  $\alpha$ -1,6 (réaction 3).



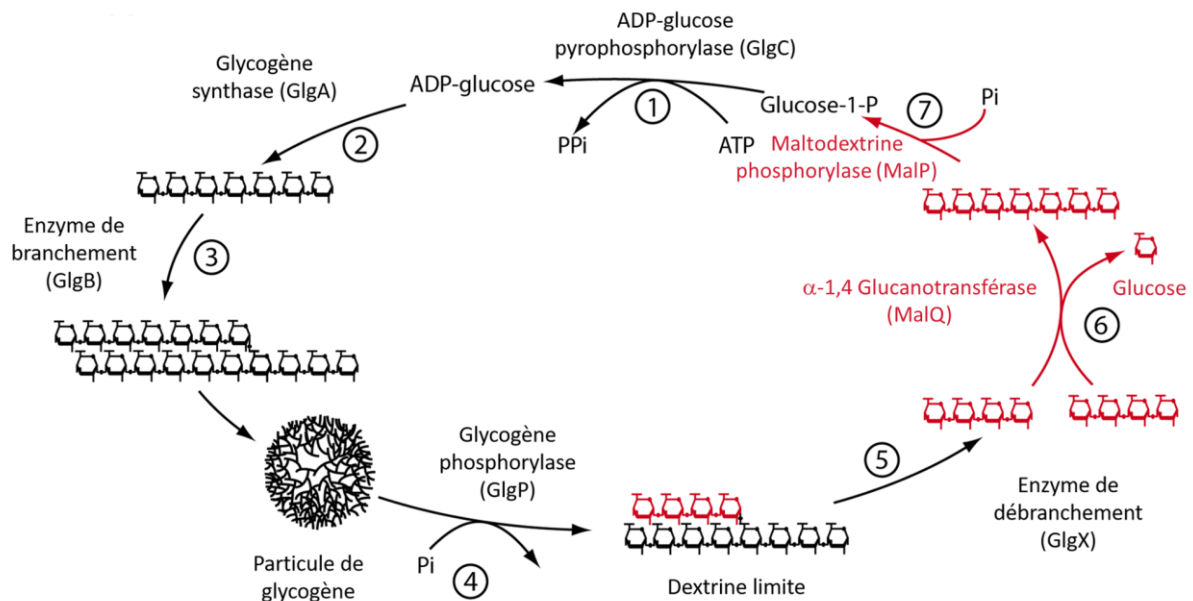
Ces trois réactions sont suffisantes pour générer une particule de glycogène. Son catabolisme quant à lui est assuré par l'action conjointe de la glycogène phosphorylase et de l'enzyme de débranchement. La glycogène phosphorylase permet la libération des unités glucose à partir de l'extrémité non-réductrice des chaînes linéaires du polysaccharide en présence d'orthophosphate (réaction 4) (Alonso-Casajus et al., 2006).



Cependant, les phosphorylases ne sont pas capables de digérer les liaisons  $\alpha$ -1,4 à proximité ( $DP \leq 4$ ) d'une ramification, laissant des résidus maltotétraosyl branchés. Ces derniers sont la cible spécifique de l'enzyme de débranchement (GlgX) permettant leur libération avant qu'ils soient pris en charge par l'enzyme disproportionnante (MALQ) et la maltodextrine phosphorylase (MALP) (Fig. 10). Cette spécificité de substrat de l'enzyme de débranchement permet d'éviter qu'elle ne puisse débrancher les ramifications nouvellement formées par la



BE. Les deux enzymes peuvent ainsi travailler en même temps dans le cytosol bactérien (Dauvillee et al., 2005).



**Figure 10 : Métabolisme du glycogène et des malto-oligosaccharides chez la bactérie *Escherichia coli*.** L'action successive des AGPase, Glycogène synthase (GT5 selon la classification Cazy) et de l'enzyme de branchement conduit à la formation de la particule de glycogène (1 à 3). Le glycogène est ensuite dégradé par la glycogène phosphorylase qui attaque l'extrémité non-réductrice des chaînes linéaires de glucose jusqu'à atteindre une limite de 4 résidus glucose branchés en  $\alpha 1,6$  (dextrine limite). Ce maltotétraose est la cible privilégiée de l'enzyme de débranchement qui le libère (5) avant qu'il ne soit pris en charge par l'activité disproportionnante (MalQ) (6) et la maltodextrine phosphorylase (7). Adapté de (Kadouche, 2016).

## B. Métabolisme de l'amidon chez les plantes supérieures

De nombreuses recherches ayant amélioré notre compréhension du métabolisme de l'amidon ont été menées chez l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*, et en particulier sur l'amidon produit par ses feuilles. L'amidon des feuilles est un amidon transitoire, produit en large quantité pendant la journée et dégradé la nuit quand l'activité photosynthétique cesse. Cependant d'autres organes de la plante produisent également de l'amidon. Par exemple chez *A. thaliana* les cellules de la columelle des racines portent des grains d'amidon qui ne servent pas de réserve énergétique mais qui orientent les racines par gravitropisme. Chez d'autres espèces, il existe des organes spécialisés dans le stockage d'un amidon dit de réserve, à l'image des tubercules de pomme de terre. Cependant, qu'ils soient transitoire ou de réserve, ces amidons sont synthétisés dans les plastes via des enzymes similaires.

Le métabolisme de l'amidon est une voie très conservée chez les eucaryotes photosynthétiques (Deschamps et al., 2008b; Ral et al., 2004) et implique une quarantaine de gènes. Une partie d'entre eux correspond à ceux du métabolisme du glycogène représentés par plusieurs isoformes. En effet, le métabolisme de l'amidon chez les algues et les plantes terrestres fait intervenir une AGPase dérivant de l'enzyme bactérienne, au moins cinq amidon synthases (SS), trois enzymes de branchement (BE) et deux catégories d'enzymes de débranchement sont également identifiées. Ces isoformes n'ont toutefois pas exactement les mêmes fonctions bien qu'il existe des redondances fonctionnelles (Ball et al., 2011).

## 1) Synthèse de l'amidon

### a) Synthèse du précurseur

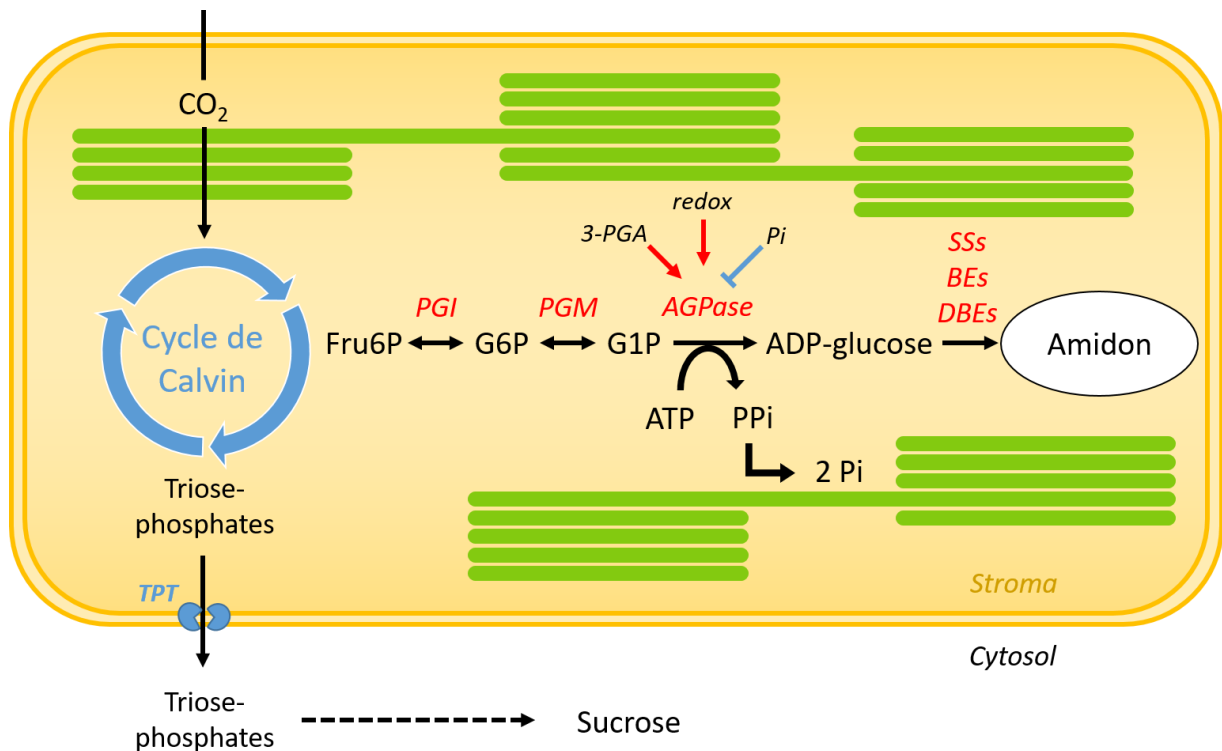
Comme le glycogène, la première étape de la synthèse de l'amidon est la production d'un nucléotide-sucre. Comme chez les bactéries, le nucléotide-sucre précurseur chez les algues vertes et les plantes terrestres est l'ADP-glucose. Cependant, chez les organismes photosynthétiques, la production de l'ADP-glucose est directement liée au cycle de Calvin via trois étapes enzymatiques (Fig. 11). En effet, le fructose-6-phosphate (Fru6P) généré par le cycle est converti successivement en glucose-6-phosphate (G6P) et en glucose-1-phosphate (G1P) sous l'action de la phosphoglucose isomérase (PGI) et de la phosphoglucomutase (PGM). La troisième étape portée par l'AGPase, est identique à celle décrite chez *E.coli* (réaction 1), et aboutit à la formation de l'ADP-glucose et de pyrophosphate (PPi). Ces trois étapes sont réversibles, mais elles sont orientées dans le sens de la synthèse du nucléotide-sucre du fait de l'hydrolyse du pyrophosphate en orthophosphate (Pi) par la pyrophosphatase alcaline plastidiale (Weiner et al., 1987).

Une autre différence entre les AGPases d'origines bactériennes et celles des plantes supérieures réside dans leurs organisations structurales. En effet, l'enzyme bactérienne est un homotétramère tandis que l'AGPase des algues et des plantes terrestres, présente deux paires de sous-unités distinctes (Copeland et Preiss, 1981; Zabawinski et al., 2001) ; à savoir, deux petites sous-unités  $\alpha$  portant les activités catalytiques, et deux grandes sous-unités  $\beta$ , intervenant dans la régulation de l'activité enzymatique. Il existe plusieurs isoformes pour chacune de ces sous-unités. Chez *A. thaliana* par exemple, quatre gènes (*APL1* à *4*) codent la grande sous-unité et deux autres (*APS1* et *2*) la petite (Crevillén et al., 2003). Ces gènes dériveraient de phénomènes de duplication au cours de l'évolution puisque les alignements de séquence des cDNA provenant de nombreuses espèces, suggèrent une origine bactérienne commune à ces sous-unités. (Nakata et al., 1991; Smith-White et Preiss, 1992).

Remarquons que la combinaison de ces différentes isoformes génère des enzymes tissus spécifiques, et ayant des sensibilités aux effecteurs de régulation ou aux substrats différentes. D'ailleurs, chez certaines espèces comme le blé, l'orge, le riz ou le maïs, et plus spécifiquement dans leur albumen ; il existe en plus de l'AGPase plastidiale (que l'on trouve dans tous les tissus capables de synthétiser de l'amidon) une seconde AGPase, cytosolique, nécessitant le transport de l'ADP-glucose dans l'amyloplaste (Tetlow, 2004).

### b) Régulation du flux de carbone

Que ce soit chez les plantes ou les bactéries, l'inactivation partielle ou complète de l'AGPase entraîne une diminution ou l'arrêt total de la synthèse du polysaccharide de réserve (Govons et al., 1969; Lin et al., 1988; Müller-Röber et al., 1992; Tsai et Nelson, 1966; Zabawinski et al., 2001). A l'inverse l'augmentation de son activité induit une suraccumulation du polysaccharide (Li et al., 2011; Preiss et al., 1976; Smidansky et al., 2002; Stark et al., 1992). Cette enzyme est donc un précieux outil de contrôle du flux de carbone vers la synthèse d'amidon. Elle est ainsi soumise à différents modes de régulation.



**Figure 11 : Voie de biosynthèse de l'amidon dans le chloroplaste.** Le carbone atmosphérique est assimilé par le cycle de Calvin. Une partie de ce carbone est exporté dans le cytosol pour la synthèse du sucrose via la voie des triose-phosphates. L'autre partie permet la formation de fructose-6-phosphate (Fru6P) lequel sera converti en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphoglucose isomérase (PGI), puis en glucose-1-phosphate (G1P) par la phosphoglucomutase (PGM). A partir du G1P et d'ATP, l'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) élabore l'ADP-glucose, l'unique nucléotide-sucre précurseur de la synthèse de l'amidon.. L'activité de l'AGPase est réversible mais l'hydrolyse du pyrophosphate en orthophosphate (Pi) par la pyrophosphatase alcaline plastidiale empêche le retour vers le G1P. L'AGPase est également une clé de la régulation de la synthèse d'amidon car son activité est soumise à une régulation allostérique et à une régulation par oxydo-réduction des ponts disulfures. L'ADP-glucose formé sera à l'origine du polysaccharide qui sera synthétisé par l'action concertée d'enzymes d'élongation (SS), de branchement (BE) et de débranchement (DBE). Adapté de Zeeman et al., 2007.

D'abord les AGPases des plantes et des bactéries sont des enzymes allostériques dont les effecteurs sont des métabolites clés de la voie d'assimilation du carbone de l'organisme, à l'image du 3-phosphoglycérate (3-PGA) et de l'orthophosphate (Ghosh et Preiss, 1966; Martin et Smith, 1995). Le ratio 3-PGA/Pi permet donc un premier niveau de régulation tel que l'activité de l'AGPase sera maximale lorsque la cellule sera en excès de carbone et d'énergie, ce qui concorde avec l'utilisation de l'ATP comme substrat.

Chez les plantes, un second niveau de régulation est permis par l'oxydo-réduction de ponts disulfures pouvant se former entre les petites sous-unités de l'enzyme. La création de ces ponts conduit à la dimérisation des petites sous-unités et à l'inactivation de l'AGPase, son activité peut alors être récupérée en présence d'agents réducteurs. Dans les tissus photosynthétiques comme la feuille d'*A. thaliana*, c'est le pouvoir réducteur généré par le photosystème 1 pendant la phase lumineuse qui permet l'activation de l'enzyme par réduction des ponts disulfures (Fu et al., 1998; Tiessen, 2002). Ce processus pourrait impliquer

le système ferredoxine/thioredoxine qui intervient déjà dans la régulation, dépendante de la lumière, de plusieurs activités enzymatiques dans le chloroplaste (Ballicora et al., 2000).

La régulation allostérique et la régulation par oxydo-réduction agissent donc sur l'AGPase de façon synergique pour promouvoir la synthèse d'amidon en présence de lumière et l'inactiver à l'obscurité.

Cependant, la synthèse d'amidon doit aussi être régulée pendant les phases lumineuses. En effet, le flux de carbone assimilé par photosynthèse ne doit pas être dirigé uniquement vers la synthèse de l'amidon, mais doit aussi servir à la croissance de la plante. C'est pourquoi l'oxydo-réduction de l'AGPase semble également pouvoir être influencée par des métabolites indépendamment de la lumière. En effet, des études menées sur les feuilles d'*A. thaliana* à l'obscurité (Hendriks, 2003), ou dans un tissu non-photosynthétique comme le tubercule de pomme de terre (Tiessen, 2002), montrent qu'un niveau élevé de saccharose induit la réduction de l'AGPase et stimule la synthèse d'amidon. Le mécanisme permettant de lier la concentration en saccharose cytosolique et l'activation de l'AGPase est encore mal compris et semble impliquer d'une part, la voie des pentoses phosphates et la NADP-thioredoxine réductase C (NTRC) (Michalska et al., 2009), et d'autre part la voie du tréhalose-6-phosphate (Kolbe et al., 2005; Lunn et al., 2006) et la protéine kinase : SnRK1 (Jossier et al., 2009; Tiessen et al., 2003).

### **c) Initiation de la synthèse de l'amidon**

Chez les organismes photosynthétiques, l'initiation de la synthèse du grain d'amidon est encore mal comprise. Selon la théorie endosymbiotique, le métabolisme de l'amidon serait le fruit d'une évolution de celui du glycogène (Ball et Morell, 2003). Mais l'initiation de la synthèse du glycogène diffère selon les espèces considérées.

Chez les eucaryotes hétérotrophes comme les animaux ou les champignons, la synthèse du glycogène utilise l'UDP-glucose et son initiation nécessite la présence d'une glycogénine. Cette protéine est capable de s'autoglycosyler, formant un accepteur de glucose (amorce) indispensable aux activités d'élongation des glycogène-synthases. Chez la levure, deux gènes *GLG1* et *GLG2* permettent chacun l'expression d'une protéine homologue à la glycogénine des mammifères. Le double mutant *glg1/glg2* n'est alors plus capable de produire le polysaccharide de réserve, mais le phénotype peut être inversé en exprimant la glycogénine du lapin chez ce double mutant (Cheng et al., 1995). Chez les plantes les amidon-synthases nécessitent aussi une amorce pour allonger les chaînes de glucose. Il est possible qu'une protéine semblable à la glycogénine permette la formation de cette amorce.

A l'inverse chez les bactéries, qui construisent leur glycogène à partir d'ADP-glucose, aucune glycogénine n'a été identifiée. Des travaux réalisés chez la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* ont montré que les rôles d'initiation et d'élongation des chaînes glucaniques sont supportés par la même enzyme : la glycogène-synthase. Dans ce cas l'enzyme est capable d'initier la synthèse d'une amorce pour l'élongation des chaînes (Ugalde et al., 2003). Si l'on considère que le plaste dérive d'une cyanobactérie ancestrale qui aurait été internalisée lors de l'endosymbiose primaire, il est alors possible que les mécanismes d'initiation bactériens aient été conservés chez les plantes. Auquel cas les amidon-synthases seraient capables d'initier la synthèse du grain d'amidon.

Les plantes possèdent elles-aussi des protéines capables de s'autoglycosyler, comme les protéines RGP (*Reversibly Glycosylated Polypeptide*). Cependant ces protéines ne semblent pas intervenir dans la synthèse de l'amidon, mais plutôt dans la synthèse des polysaccharides de la paroi cellulaire (Delgado et al., 1998; Langeveld et al., 2002). Chez *A. thaliana*, plusieurs gènes ont été identifiés comme des homologues de la glycogénine et ont permis d'identifier une famille de protéines dont PGSIP1 (pour « *Plant glycogenin-like starch initiation protein 1* ») pour qui l'altération du niveau d'expression semble modifier la quantité d'amidon dans les feuilles (Chatterjee et al., 2005). Ces observations basées sur des colorations des feuilles à l'iode, laissent supposer un rôle de ces protéines dans l'initiation de la synthèse, mais cela n'a pas été démontré.

Plus récemment, des travaux ont mis en lumière des mutants pour lesquels on observe une modification du nombre de grains d'amidon par chloroplaste, témoignant d'une altération du nombre d'évènements d'initiation. Les premiers de ces mutants ayant été caractérisés, sont déficients pour les activités de débranchement portées par les isoamylases. Que ce soit chez l'orge (Burton et al., 2002), la pomme de terre (Bustos et al., 2004) ou chez *A. thaliana* (Wattebled et al., 2005), la perte de ces activités conduit à l'accumulation de phytoglycogène (la version végétale du glycogène) au détriment de l'amidon dont la quantité se trouve être réduite ; mais aussi et surtout, à l'augmentation du nombre de grain d'amidon par plastes, lesquels ont une taille réduite comparée à celle de la souche sauvage. Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle les isoamylases peuvent directement empêcher les évènements d'initiations.

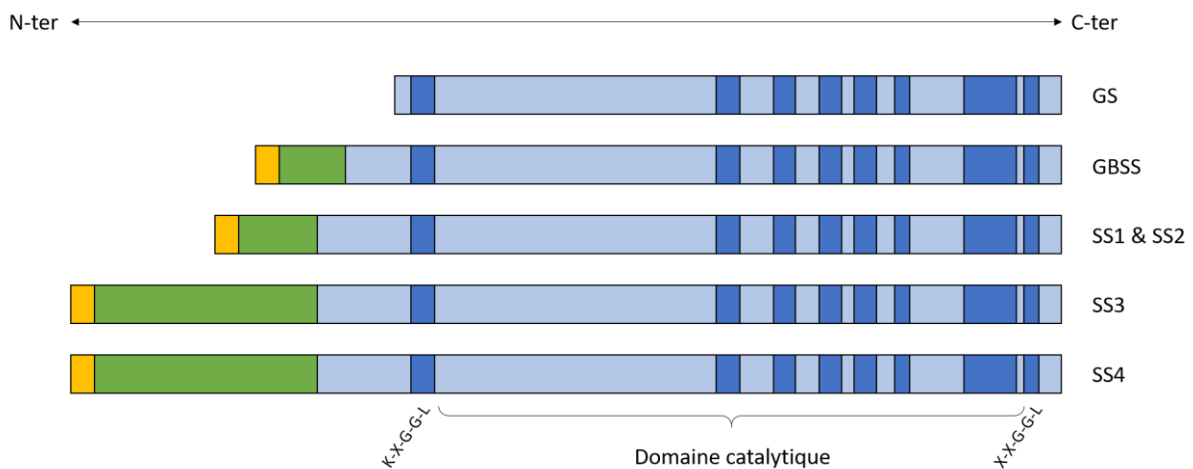
A l'inverse, un mutant d'*A. thaliana* chez lequel l'amidon-synthase IV (SS4) est défectueuse présente une diminution du nombre d'évènements d'initiation, conduisant à l'obtention d'un unique grain d'amidon par chloroplaste quand la souche sauvage en accumule 5 à 7 (Roldán et al., 2007). Remarquons également que ce grain unique est gros et sphérique, tandis que les grains d'amidon de la souche sauvage sont petits, plats et lenticulaires. Chez le double mutant *ss3/ss4*, il n'existe plus du tout d'évènement d'initiation et la plante n'accumule plus ni d'amidon, ni d'autres polysaccharides (Szydłowski et al., 2009). Ces observations suggèrent donc l'implication de ces deux amidon-synthases dans la création de l'amorce indispensable aux activités d'élongation.

Cependant bien d'autres protéines semblent être impliquées dans ce processus (pour revue voir Malinova et al., 2018), suggérant un degré de complexité de l'initiation de la synthèse d'amidon chez les plantes bien au-delà de ce que laissait imaginer le modèle du glycogène. Citons l'exemple du double mutant déficient à la fois pour l'activité de la phosphorylase plastidiale (PHS1) et de l'enzyme disproportionnante (DPE2), qui ne présente lui aussi plus qu'un grain d'amidon par chloroplaste (Malinova et al., 2014). Il a été également montré que la réduction du nombre de grain chez le double mutant *dpe2/phs1* était liée à la dégradation de l'amidon (Malinova et Fettke, 2017). Enfin d'autres protéines semblent interagir avec la protéine SS4 et contribuer au mécanisme d'initiation de la synthèse du grain. C'est le cas de la famille PTST (pour « *protein targeting to starch* ») et en particulier de PTST2 et 3 (Seung et al., 2017) mais aussi de la protéines PII1 (pour « *protein involved in starch initiation* ») (Vandromme et al., 2018) qui est également appelée MRC (« *myosin-resembling chloroplast protein* »), ou encore de la protéine MFP1 (« *mar binding filament-like protein1* ») (Seung et al., 2018).

#### d) Elongation des chaînes

Après la création de l'amorce nécessaire à l'initiation de la synthèse, ce sont les amidon-synthases qui allongent les chaînes de glucose. On distingue cinq isoformes d'amidon-synthases chez les plantes. Lors de leur purification, on retrouve les quatre premières isoformes essentiellement dans la partie soluble (ce qui leur vaut leur nom de « *Soluble Starch Synthase* », abrégé SSS ou plus communément SS). Ces enzymes sont responsables de la formation de l'amylopectine. La cinquième enzyme, quant à elle, est liée au grain d'amidon (« *Granule Bound Starch Synthase* » ou GBSS) et intervient dans la synthèse de l'amylose.

Tout comme la glycogène-synthase (réaction 2), les amidon-synthases utilisent l'ADP-glucose fourni par l'activité de l'AGPase, et créent une liaison osidique  $\alpha$ -1,4 entre la partie glucidique du nucléotide-sucre et l'extrémité non-réductrice de l'amorce. Remarquons que les amidon-synthases et la glycogène-synthase appartiennent à la même famille « GT5 » de la classification Cazy (Coutinho et al., 2003). Notons également que l'extrémité C-terminale des amidon-synthases possède huit régions bien conservées dans le règne végétal qui sont retrouvées dans la séquence des glycogène-synthases (Cao et al., 1999) (Fig. 12) et qui font parties du domaine catalytique. Finalement la différence structurale permettant de distinguer les différentes classes d'amidon-synthases repose sur une extrémité N-terminale de longueur variable. Toutes ces enzymes portent bien entendu une séquence d'adressage au chloroplaste.



**Figure 12 : Alignement des séquences des amidon-synthases et de la glycogène-synthase.** Toutes les amidon-synthases possèdent une région C-terminale (C-ter) similaire à la séquence primaire de la glycogène-synthase (GS). Dans cette région 8 domaines sont particulièrement bien conservés (bleu foncé) dont les séquences peptidiques consensuelles « K-X-G-G-L » et « X-X-G-G-L » de part et d'autre du domaine catalytique. Les amidon-synthases ont, en plus, une extrémité N-terminale (N-ter) (vert) de longueur variable, affublée d'un peptide de transit (jaune) permettant l'adressage des protéines au chloroplaste.

L'analyse des distributions en longueur de chaînes des amidons provenant de mutants *ss1*, *ss2*, ou *ss3*, montrent tous des modifications structurales différentes de leurs amylopectines suggérant des rôles distincts de chacune de ces enzymes. Les mutants *ss1* d'*A. thaliana* (Delvallé et al., 2005), du riz (Fujita et al., 2006), et du blé (McMaugh et al., 2014) montrent une réduction de la quantité des chaînes de DP 8 à 12, suggérant l'implication de la

protéine SS1 dans la synthèse des chaînes courtes de l'amylopectine (chaînes A et B1). Des études menées sur *A. thaliana* (Zhang et al., 2008), le pois (Craig et al., 1998), ou le riz (Umemoto et al., 2002) rapportent que la SS2 allonge les chaînes de tailles intermédiaires de 12 à 28 résidus glucose (chaînes B2 et B3). Enfin la protéine SS3 serait responsable de la synthèse des chaînes les plus longues chez le riz ( $DP \geq 30$ ) (Fujita et al., 2007), mais d'autres études menées chez *C. reinhardtii* indiquent que la protéine SS3, serait responsable de la synthèse d'une plus large gamme de chaînes allant de DP8 à 50 (Fontaine et al., 1993). Au vu de leurs observations du mutant *ss3* d'*A. thaliana*, Zhang et al., (2005) proposent également, que cette amidon-synthase serait responsable d'une régulation négative sur l'activité des autres SS. En effet, chez ce mutant la quantité d'amidon extrait des feuilles est plus importante, et l'activité des autres SS est supérieure par rapport au sauvage. Cette activité de régulation pourrait être portée par les domaines de liaison à l'amidon de son extrémité N-terminale, qui jouent déjà un rôle important dans la régulation de l'activité de l'enzyme (Wayllace et al., 2010).

Ainsi les amidon-synthases ont chacune un rôle spécifique et collaborent pour allonger les différentes chaînes de l'amylopectine. Il existe cependant des redondances fonctionnelles, permettant aux amidon-synthases de prendre en charge une partie de l'activité manquante quand l'une d'entre elles fait défaut.

A la différence des autres amidon-synthases solubles, la perte d'activité de la SS4 n'affecte pas la structure de l'amylopectine. Comme nous l'avons vu précédemment, le mutant *ss4* d'*A. thaliana* présente, en revanche, un seul grain d'amidon par chloroplaste (Roldán et al., 2007). Rappelons également que le double mutant *ss3/ss4* n'accumule plus du tout d'amidon (Szydłowski et al., 2009), ce qui sous-entend l'implication de ces deux protéines dans l'initiation de la synthèse de l'amidon. De plus, en comparaison aux autres amidon-synthases, ces deux enzymes ont la particularité d'arborer, une extrémité N-terminale (N-ter) plus longue (Fig. 12). Il a été montré que l'extrémité N-ter de la SS4, est impliquée dans la sous-localisation de la protéine dans le chloroplaste en permettant son interaction avec la membrane des thylakoïdes et les plastoglobules (Gámez-Arjona et al., 2014). Ce faisant elle peut influencer la forme du grain d'amidon en adressant l'activité de la SS4 au bon endroit. En effet, l'expression dans le mutant *ss4* d'une protéine de fusion avec la partie N-ter de la SS4 associée à la glycogène-synthase bactérienne restaure le nombre et la forme des grains, alors que l'expression de la seule glycogène-synthase restaure le nombre mais pas la forme (Lu et al., 2018).

La dernière catégorie d'amidon-synthase est la GBSS. L'activité de la GBSS n'est pas indispensable à l'élaboration d'un grain d'amidon cristallin. En effet, des mutants du maïs (Tsai, 1974), de la pomme de terre (Visser et al., 1991) ou de *C. reinhardtii* (Delrue et al., 1992) dépourvus de GBSS synthétisent un amidon exclusivement constitué d'amylopectine, mais qui conserve ses propriétés cristallines. La GBSS est la seule enzyme du métabolisme active au sein même de la matrice polysaccharidique. Son activité est dépendante de la présence de l'amylopectine (Dauvillée et al., 1999) et semble être stimulée *in vitro* par la présence de malto-oligosaccharides (MOS) qui pourraient servir d'amorce (Denyer et al., 1996, 1999). Denyer et al., (1999) établissent également que la GBSS, à l'inverse des autres amidon-synthases, allonge les MOS de manière processive *in vitro*. C'est-à-dire qu'elle ajoute

plus d'un résidu glucose avant de se détacher du glucane. D'autres travaux basés sur des observations de « *pulse-chase* » semblent indiquer que la GBSS allongerait les longues chaînes externes de l'amylopectine avant que ces dernières ne soient clivées pour former l'amylose (van de Wal et al., 1998).

Remarquons que la GBSS, qui représente la protéine majoritaire du grain d'amidon ne possède pourtant pas de domaine de liaison à l'amidon. En revanche, Seung et al., (2015) ont montré que chez *A. thaliana* l'enzyme interagit avec une autre protéine – appartenant à la famille PTST – non-catalytique et porteuse d'un domaine (CBM48) de liaison aux carbohydrates. Les mutants dépourvus de cette protéine produisent des amidons sans amylose. L'interaction des deux protéines est donc indispensable à la synthèse de l'amylose, et ils suggèrent que la protéine PTST agisse comme un transporteur permettant d'amener la GBSS au grain d'amidon et de l'y associer.

### e) Activités de branchement

Pour obtenir la structure ramifiée de l'amidon s'ajoute, simultanément à l'activité des amidon-synthases, celle des enzymes de branchement (BE, ou parfois SBE pour « *Starch Branching Enzyme* », EC 2.4.1.18). Pourtant ces enzymes qui sont à l'origine des ramifications (liaisons osidiques en  $\alpha$ -1,6) appartiennent – au même titre que l' $\alpha$ -amylase, l'isoamylase ou la pullulanase – à la famille des Glycoside Hydrolases GH13 et GH57 de la classification Cazy (Coutinho et al., 2003; Lombard et al., 2014). En effet, le mode de fonctionnement des BE les oblige dans un premier temps à cliver une liaison  $\alpha$ -1,4 d'un glucane linéaire (donneur) à son extrémité non-réductrice, puis de transférer le fragment libre sur le groupement hydroxyle en C6 d'un autre glucane (accepteur) pour former une ramification (Fig. 13). Si le glucane est à la fois donneur et accepteur on parle alors d'une réaction intramoléculaire. S'ils sont différents, on parle de réaction intermoléculaire (Borovsky et al., 1975). L'action des BE permet donc d'augmenter le nombre d'extrémités non-réductrices du polysaccharide en cours de formation, ce qui favorise l'action des amidon-synthase en leur fournissant davantage de substrats (Brust et al., 2014).

En se basant sur la structure primaire (séquence en acides aminés) des BE de différentes plantes, on distingue deux catégories d'enzyme de branchement, les BE de type 1 (aussi appelées famille B) et les BE de type 2 (famille A) (Burton et al., 1995; Guan et al., 1997; Rydberg et al., 2001) produits de gènes distincts (Gao et al., 1996). Les deux types de BE partagent avec le reste de la famille des GH13 un domaine catalytique (appelé domaine A) très bien conservé, et caractérisé par la triade d'acide-aminés (deux aspartates + un glutamate) impliquée dans le clivage de la liaison osidique (Abad et al., 2002; MacGregor et al., 2001). Ce domaine catalytique est bordé par deux régions plus variables. D'un côté, par une région N-terminale porteuse d'un domaine de liaison aux carbohydrates (CBM48) et impliquée dans la spécificité du glucane transféré (Kuriki et al., 1997) ; et d'un autre côté par une région C-terminale déterminant l'affinité pour le substrat (Hong et Preiss, 2000). En effet, les deux catégories de BE se distinguent par leur affinité avec le substrat puisque les BE1, à l'inverse des BE2, possèdent une affinité plus forte pour l'amylose que pour l'amylopectine (Guan et al., 1994; Guan et Preiss, 1993; Rydberg et al., 2001). Les deux familles ne fonctionnent pas non plus exactement de la même manière, les BE1 préférant transférer des chaînes plus longues ( $DP \leq 40$ ) que les BE2 ( $DP$  6 à 15) (Guan et al., 1997; Nakamura et al., 2010;



Takeda et al., 1993). L'activité des BE nécessite également une taille minimale du glucane donneur, taille en-dessous de laquelle le glucane n'est plus clivé. Les expériences conduites *in vitro* pour établir la taille minimale requise pour chaque enzyme conduisaient alors, à l'accumulation de ces chaînes. Avec cette méthode Guan et al., (1997) déterminent que chez le maïs (*Zea mays L.*), la taille minimale du glucane donneur de la BE1 est de 16 résidus glucose, contre 12 pour la BE2.

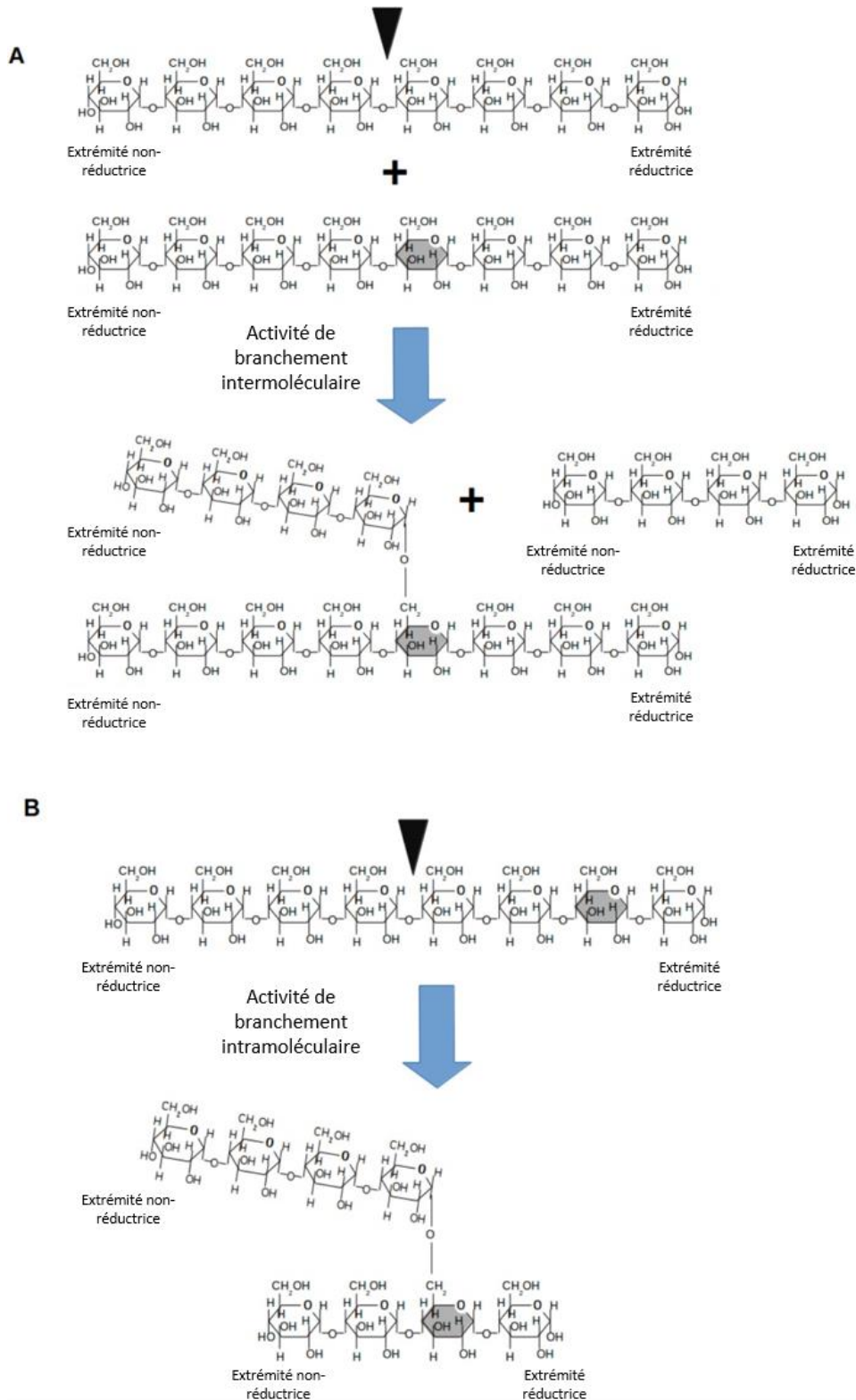
Toutes les plantes étudiées possèdent au moins un exemplaire de chaque type de BE. Mais chez les monocotylédones, comme les céréales, il existe deux isoformes de BE2 (BE2a et BE2b) qui sont tissus-spécifiques. La BE2b se trouve exclusivement dans les tissus de stockage non-photosynthétiques (albumen), tandis que l'isoforme BE2a est réparti de façon ubiquitaire. Notons qu'*A. thaliana* fait ici figure d'exception puisqu'il s'agit de la seule plante dicotylédone connue pour n'avoir aucune BE1 et deux BE2, nommées BE2.1 et BE2.2, produits des gènes *At5g03650* et *At2g36390* (Fisher et al., 1996).

De nombreux mutants déficients pour les activités des BE ont été étudiés, mettant en lumière les fonctions des différents isoformes. Toutefois, les phénotypes les plus marqués sont liés à l'altération de l'activité des BE de type 2. Notons tout de même, que chez le mutant du catabolisme (CAT16) de *Chlamydomonas reinhardtii* le défaut apparaît dans le gène codant la BE1, suggérant un potentiel rôle de cette enzyme dans la mobilisation de l'amidon (Tunçay et al., 2013).

Le mutant « ridé » du pois identifié par Gregor Mendel et avec lequel les lycéens appréhendent les notions d'hérédité des gènes, est un mutant sans activité BE2. Il en résulte une diminution de sa synthèse d'amidon au profit d'une accumulation de saccharose ou d'autres sucres solubles. Ainsi lorsque le grain sèche, on peut observer le phénotype désormais célèbre (Bhattacharyya et al., 1990).

La perte de l'isoforme BE2b chez le maïs ou le riz (mutant *amylose-extender*), conduit à la formation d'amidon riche en amylose, avec les chaînes externes de l'amylopectine plus longues et moins branchées (Nishi et al., 2001). Le mutant est connu pour produire un amidon résistant à l'action des  $\alpha$ -amylases. Ces « amidons résistants » moins digestes sont particulièrement utiles dans l'industrie alimentaire, et notamment en diététique (Lockyer et Nugent, 2017).

Chez *A. thaliana*, les mutants déficients pour l'une des deux BE2 ne présente que de légères modifications de la structure de son amylopectine (dans les deux cas on observe moins de DP 5 à 8 et plus de DP 9 à 15) suggérant une redondance de leurs activités. En revanche les double-mutants déficients à la fois pour BE2.1 et BE2.2 ne synthétisent plus d'amidon, au profit d'une accumulation de maltose cytoplasmique (Dumez et al., 2006).



**Figure 13 : Les différents mécanismes mis en place par les enzymes de branchement.** Les enzymes de branchement fonctionnent de manière séquentielle. Dans un premier temps, elles clivent une liaison osidique ( $\alpha$ -1,4) à l'extrémité non-réductrice d'un glucane linéaire donneur (activité symbolisée par le triangle noir), puis elles transfèrent le fragment libéré sur le groupement hydroxyle en C6 d'une unité glucose acceptrice (symbolisée en gris). En **A** le glucane donneur est distinct du glucane accepteur, la réaction est alors intermoléculaire. En **B** le glucane accepteur est aussi le glucane donneur, la réaction est intramoléculaire. Adapté de Tetlow et Emes, (2014).

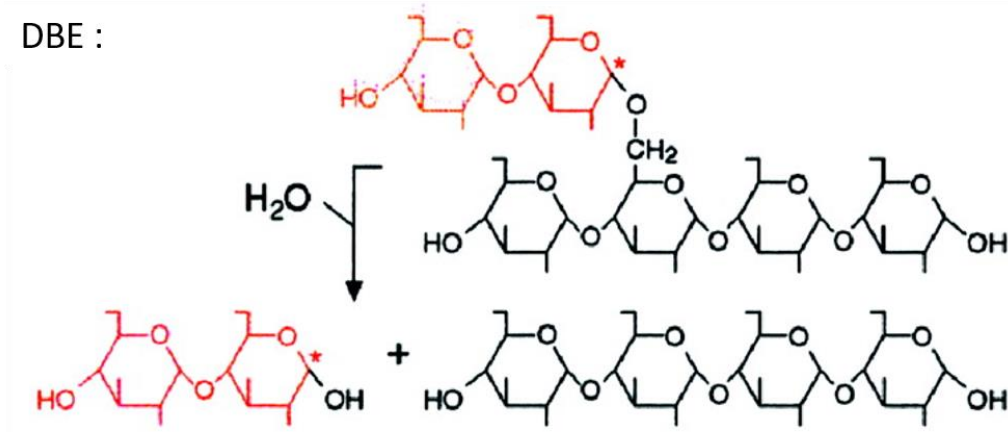
## f) Activités de débranchement

Après l'intervention successive des AGPases, des amidon-synthases et des enzymes de branchement, on obtient un polymère de glucose hautement branché et comparable au glycogène. C'est sans compter sur l'activité des enzymes de débranchement (DBE), indispensables à l'organisation structurale et à la cristallisation de l'amylopectine.

Comme leur nom l'indique, les enzymes de débranchement catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,6 de l'amidon ou des autres polyglucanes branchés (Fig. 14). Les DBE se répartissent en deux catégories en fonction de leur capacité à débrancher le pullulan (un polymère produit par le champignon *Aureobasidium pullulans* et constitué de maltotrioses branchés en  $\alpha$ -1,6), les isoamylases (EC 3.2.1.68) qui en sont incapables, et les pullulanases (EC 3.2.1.41) (Møller et al., 2016). Ces enzymes appartiennent à la famille GH13 de la classification Cazy et partagent donc les mêmes structures décrites précédemment.

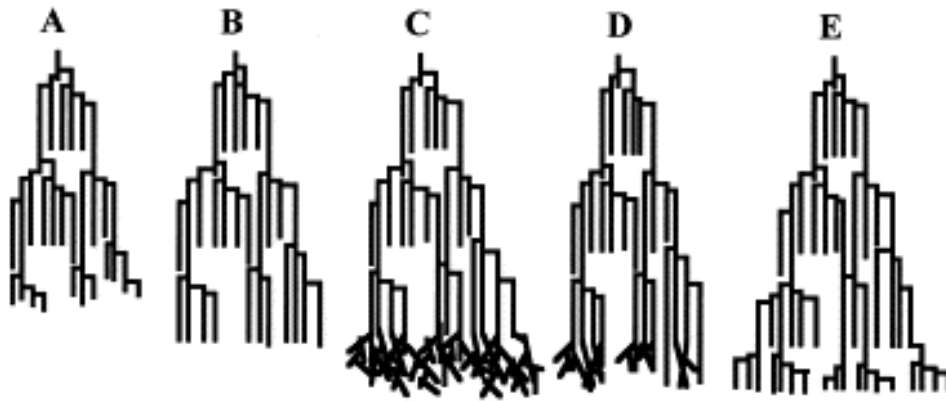
L'importance de l'activité des DBE dans la synthèse de l'amidon a été démontrée par des études réalisées sur des mutants de plantes ou d'algues perdant leurs activités de débranchement, accumulant moins d'amidon et chez lesquels on voit apparaître du phytoglycogène (James, 1995; Kubo et al., 1999; Mouille et al., 1996; Wattebled et al., 2005).

DBE :



**Figure 14 : Schématisation de l'activité de débranchement.** Les enzymes de débranchement catalysent l'hydrolyse de la ramification d'un polyglucane branché. D'après Myers et al., (2000).

A partir de ces observations, une hypothèse solide de l'implication des DBE dans la synthèse de l'amylopectine a été soumise par Ball et al., (1996). Selon celle-ci la distribution des ramifications et donc la cristallisation de l'amylopectine dépend des activités de débranchement. En effet, après l'action des enzymes de branchement, on obtient un polymère hautement branché et non-cristallin (la pré-amylopectine) (Fig. 15) à partir duquel les DBE vont éliminer certaines des ramifications pour ordonner le polysaccharide et lui permettre de cristalliser.



**Figure 15 : Modèle de l'épissage de l'amylopectine.** Sur une molécule d'amylopectine en croissance, les amidon-synthases allongent les chaînes de glucose à partir des extrémités non-réductrices et d'ADP-glucose (A à B). Les enzymes de branchement ajoutent ensuite des ramifications de façon aléatoire conduisant au stade hyperbranché dit pré-amylopectine (C). Simultanément l'isoamylase clive les liaisons  $\alpha$ -1,6 les plus espacées (D), pour ne laisser que les ramifications les plus proches, lesquelles formeront une lamelle amorphe (E).

Dans la lignée verte, il existe quatre gènes bien conservés codant chacun une DBE, trois d'entre eux codent une isoamylase (*ISA1* à *3*) et le dernier une pullulanase (*PU1*) (Deschamps et al., 2008b). Il a été montré en premier lieu chez *Chlamydomonas* (Dauvillée et al., 2001b, 2001a), puis chez le riz (Utsumi et Nakamura, 2006), et le maïs (Kubo et al., 2010) que les protéines *ISA1* et *ISA2* pouvaient se combiner pour former des complexes, soit sous la forme d'un homomère composé d'un assemblage d'*ISA1* ; soit en hétéromère d'*ISA1* et *ISA2*. Cependant, *ISA1* est la seule à porter une activité catalytique. En effet, elle est la seule à posséder les huit résidus les plus conservés de la famille GH13, dont la triade d'acide-aminés responsable de l'activité hydrolytique, évoquée précédemment (MacGregor et al., 2001). Ces huit résidus sont conservés aussi bien chez *ISA1* et *ISA3* mais six d'entre eux ont été substitué chez *ISA2* (Hussain et al., 2003). Ceci expliquerait que les mutants *isa2* aient un phénotype moins marqué que les mutants *isa1*. Dans ce cas, *ISA2* agirait comme une sous-unité régulatrice de l'activité d'*ISA1*. Toutefois chez *A. thaliana*, la présence des deux isoformes *ISA1* et *ISA2* est nécessaire à la formation du complexe (nommé Iso1) et à la synthèse normale de l'amylopectine (Wattebled et al., 2005). Chez l'algue *C. reinhardtii*, deux mutants ont été identifiés, le premier muté sur le gène *STA7* codant la protéine *ISA1* présente une quasi-absence d'amidon et une accumulation de phytoglycogène (Mouille et al., 1996) ; le second est muté sur le gène *STA8* lequel code pour la protéine *ISA2*. A l'inverse du mutant *sta7* chez lequel l'activité de l'isoamylase disparaît complètement sur les gels d'activités (ou zymogrammes), et de la souche sauvage pour laquelle on observe systématiquement trois bandes d'activité (suggérant l'existence de complexes hétéromériques), le mutant *sta8*, quant à lui, ne présente qu'une seule bande, laissant supposer qu'il s'agisse de la forme homomérique du complexe (Dauvillée et al., 2000, 2001b, 2001a). A l'inverse des protéines *ISA1* et *ISA2*, l'isoforme *ISA3* est plutôt impliquée dans la dégradation de l'amidon chez *Arabidopsis*. En effet, l'absence de celle-ci conduit à un phénotype « sex » (*Starch excess*) caractéristique d'un défaut du catabolisme, bien qu'il existe une redondance partielle entre les deux isoformes *ISA1* et *ISA3* (Delatte et al., 2006; Wattebled et al., 2005). Chez le maïs comme chez *A. thaliana*, les mutants sans activité pullulanase, ne présentent pas un phénotype très marqué. Seules de légères modifications ont été observées, avec une

augmentation de la quantité de polysaccharides solubles (WSP pour « *Water soluble polysaccharides* ») et une modification structurale de l'amylopectine semblable à celle observée pour les mutants *isa1* et *isa2*, suggérant une redondance fonctionnelle partielle entre ces enzymes (Dinges, 2003; Wattedled et al., 2005). Cependant, les phénotypes observés sur les double-mutants impliquant la pullulanase et d'autres isoamylases sont plus spectaculaires. La génération du double-mutant *isa3/pu1* chez *A. thaliana* (Wattedled et al., 2008), conduit à une importante augmentation du contenu en amidon, et à une modification structurale de l'amylopectine plus modérée mais suggérant une redondance de leurs activités. D'un autre côté le mutant dépourvu des activités ISA1, ISA3 et PU1 indique une redondance partielle des activités de PU1 et ISA1 dans la synthèse de l'amylopectine. Ainsi la pullulanase serait impliqué à la fois dans la synthèse et dans la dégradation de l'amidon.

## 2) Dégradation de l'amidon

L'amidon est donc un polysaccharide permettant de mettre en réserve l'énergie lumineuse captée et transformée par photosynthèse en énergie chimique. Nous avons vu les mécanismes à l'œuvre chez les organismes photosynthétiques afin de constituer cette réserve pendant la phase lumineuse. Cependant, aucune réserve n'est utile si elle demeure inaccessible. Le rôle du catabolisme est donc de permettre l'accès à cette ressource, aussi bien pour alimenter l'organisme en énergie en l'absence d'activité photosynthétique, que pour permettre aux graines de germer. L'un des premiers obstacles à l'accessibilité de la réserve énergétique est lié à la cristallinité de l'amidon. En effet, cet état ne permet pas aux activités hydrolytiques d'attaquer les chaînes de glucose. La première étape de la dégradation consiste donc à solubiliser l'amidon, permettant la désorganisation des chaînes glucaniques et améliorant l'accès des enzymes à leur substrat (comme lors de la cuisson de l'amidon (Snow et O'Dea, 1981)). Cette étape est réalisable grâce à la phosphorylation de certains résidus glucose.

### a) Initiation de la dégradation de l'amidon

Comme nous l'avons vu lors de la description de ses composants, l'amidon contient des groupements phosphates dont l'abondance est relative à l'origine botanique du polysaccharide. Ces groupements phosphates sont portés principalement par les carbones en position 3 et 6 (C3 et C6) de certains résidus glucose de l'amylopectine. Le cycle de synthèse et de dégradation de l'amidon transitoire dépend de la photopériode, la synthèse ayant lieu le jour et la dégradation la nuit. De façon intéressante, il a été montré chez *C. reinhardtii* et la pomme de terre que le taux de phosphorylation de l'amidon est accru dès les premières minutes d'obscurité (Ritte et al., 2004). La phosphorylation semble donc être associée aux phases précoces de la dégradation de l'amidon.

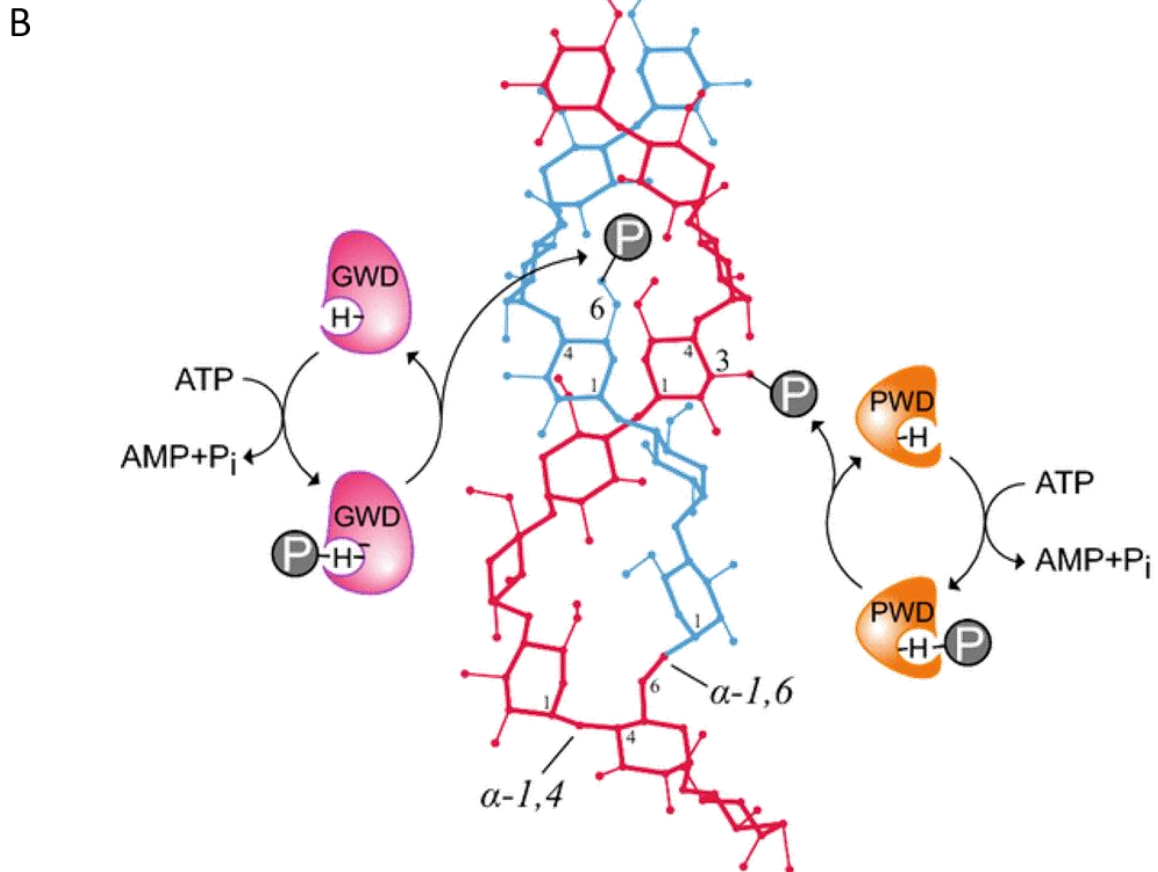
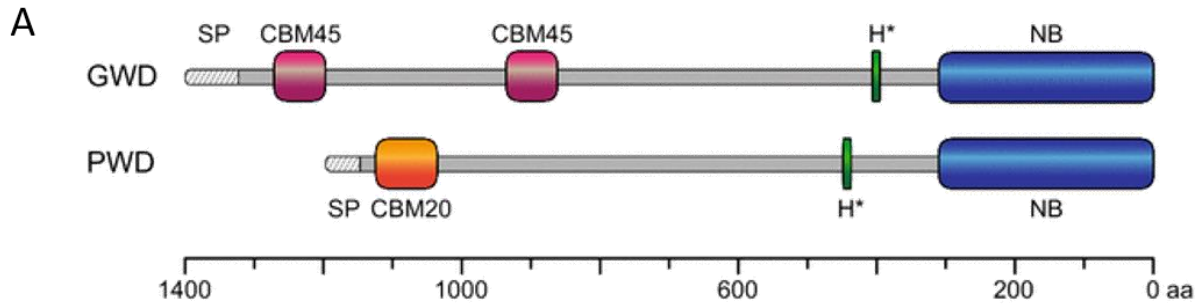
Deux enzymes plastidiales sont responsables de la phosphorylation de l'amylopectine, la GWD ( *$\alpha$ -glucan water dikinase* ; EC 2.7.9.4) et la PWD (*phospho-glucan water dikinase* ; EC 2.7.9.5). La GWD a été identifiée grâce à des travaux réalisés sur des lignées transgéniques de pomme de terre (Lorberth et al., 1998) et des mutants (*sex1*) d'*A. thaliana* (Yu et al., 2001). Dans tous les cas, l'altération de l'expression de GWD entraîne une diminution du taux de phosphates de l'amidon associée à une suraccumulation du polysaccharide. D'autres mutants d'*A. thaliana*, ont ensuite permis d'identifier la PWD (Baunsgaard et al., 2005; Kötting et al.,

2005). Les deux enzymes ont une séquence primaire (Fig. 16 A) et un fonctionnement assez similaire. En effet, les deux enzymes sont capables de s'associer au grain d'amidon par l'intermédiaire d'un domaine de liaison aux carbohydrates (CBM pour *Carbohydrate Binding Module*). Cette liaison est réversible et dépendante de la photopériode puisqu'il a été montré que ces dikinases s'associent préférentiellement à l'amidon la nuit (Kötting et al., 2005; Ritte et al., 2000). De plus, les deux enzymes phosphorylent les résidus glucose en transférant le phosphate en  $\beta$  de l'ATP (le phosphate en  $\gamma$  est libéré sous forme d'orthophosphate). Dans les deux cas, ce mécanisme implique l'autophosphorylation des protéines où le  $\beta$ -phosphate est, dans un premier temps, transféré sur une histidine très conservée chez ces dikinases avant d'être transmis au résidu glucose (Hejazi et al., 2012) (Fig. 16 B).

Toutefois si la GWD estérifie le glucose en C6, la PWD préférera le phosphoryler en C3 (Ritte et al., 2006) (Fig. 16 B). Notons également que, comme son nom l'indique, l'activité de la PWD nécessite un substrat déjà phosphorylé (Baunsgaard et al., 2005; Kötting et al., 2005). Ainsi ces dikinases agissent successivement, la GWD phosphoryle le glucose en C6 et fournit un substrat phosphorylé à la PWD qui lui ajoute un groupement phosphate en C3.

Remarquons qu'un autre isoforme de la protéine GWD a été identifiée chez *A. thaliana*, cependant bien qu'elle soit aussi capable de phosphoryler des glucanes *in vitro*, cette protéine est extra-plastidiale et ne semble pas avoir d'effet sur l'amidon transitoire puisque les mutants n'exprimant plus cette protéine ne présentent pas de phénotypes marqués ni en terme de croissance de la plante, ni en terme d'accumulation d'amidon (Glaring et al., 2007).

D'autres expériences menées *in vitro* montrent que la phosphorylation des glucanes par la GWD améliore l'activité de la  $\beta$ -amylase, l'une des principales enzymes impliquées dans la dégradation de l'amidon transitoire (Edner et al., 2007). Ces observations suggèrent que l'estérification de l'amidon induit une désorganisation des chaînes suffisantes pour le solubiliser, ce qui facilite l'accès des enzymes de dégradation à ces dernières. Pour vérifier cette hypothèse Hejazi et al., (2008) ont utilisé de la maltodextrine cristallisée pour mimer *in vitro* le substrat physiologique de la GWD. Ils ont pu établir deux conclusions (1) la spécificité de substrat de la GWD dépend de l'agencement structural du polysaccharide (elle n'est active qu'avec un substrat cristallin), (2) la réaction catalysée par la GWD permet de passer d'un état cristallin à un état hydraté et moins ordonné. La phosphorylation de l'amidon semble donc bien être une étape importante permettant d'initier la dégradation du grain.



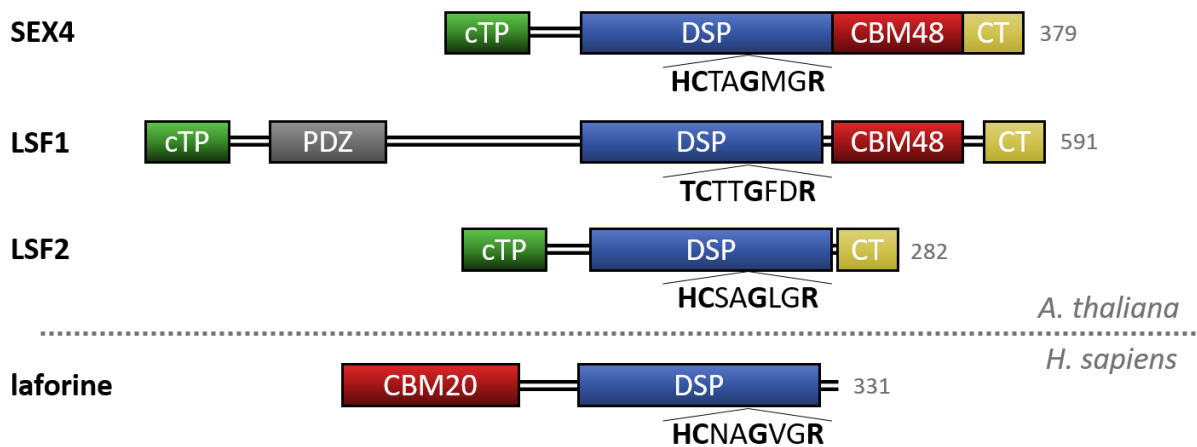
**Figure 16 : Organisation structurale et mode d'action des dikinases plastidiales GWD et PWD d'*Arabidopsis thaliana*.** (A) Les deux enzymes portent un peptide signal (SP) en N-terminal permettant l'adressage de la protéine au chloroplaste. Les enzymes se caractérisent par leurs domaines de liaison à l'amidon, composé de deux domaines CBM45 dans le cas de la GWD et d'un unique domaine CBM20 pour la PWD. Les extrémités C-terminales sont très semblables, les deux enzymes portant un domaine très conservé avec notamment la phosphohistidine (H\*) nécessaire au transfert du groupement phosphate sur le glucane, et un domaine de liaison aux nucléotides (NB) pour l'interaction avec l'ATP. L'échelle est donnée en acide-aminés (aa). (B) Une chaîne glucanique linéaire (en bleu) est branchée en  $\alpha$ -1,6 à une seconde (en rouge). Les deux chaînes s'associent en une double hélice, permettant la cristallisation de l'amylopectine. Les dikinases GWD (en magenta) et PWD (en orange) introduisent respectivement des groupements phosphates en C6 et en C3. Ce groupement phosphate provient de l'hydrolyse de l'ATP. Le  $\gamma$ -phosphate est transféré à l'eau (Pi), tandis que le  $\beta$ -phosphate de l'ATP est successivement transféré à la protéine (phosphohistidine) puis au résidu glucose. D'après Mahlow et al., (2016).

Paradoxalement, Takeda et Hizukuri, (1981), indiquent que la  $\beta$ -amylase est incapable de cliver des glucanes phosphorylés. Dans ces conditions il est légitime de se demander comment l'enzyme peut exercer sa fonction. Un premier élément de réponse est apporté par des expériences de « *pulse-chase* » réalisées sur l'algue *C. reinhardtii* (Ritte et al., 2004). Leurs résultats indiquent que la nuit, 50 % des groupements phosphates marqués sont perdus 20 min après la chasse, tandis que la liaison est plus stable de jour. De plus, Edner et al., (2007) montrent qu'*in vitro* la  $\beta$ -amylase relargue uniquement des maltoses non-phosphorylés. Ceci suggère que la phosphorylation de l'amidon n'est que momentanée et qu'une étape de déphosphorylation est nécessaire pour poursuivre la digestion du grain.

Chez *A. thaliana* deux enzymes plastidiales sont impliquées dans cette seconde étape de déphosphorylation : les phosphatases SEX4 (*Starch excess 4*) et LSF2 (*Like sex four 2*). Comme son nom l'indique, les mutants dépourvus de SEX4 présentent, eux aussi, un phénotype d'accumulation d'amidon caractérisant un défaut de dégradation (Zeeman et al., 1998). SEX4 est décrite comme une protéine chloroplastique, possédant un domaine CBM sur son extrémité C-terminale, et un domaine caractéristique des phosphatases à double spécificité (DSP) en N-terminal (Niittylä et al., 2006) (Fig. 17). Cette combinaison de domaine la rapproche de la structure de la laforine, une phosphatase impliquée dans le métabolisme du glycogène chez les vertébrés et dont l'absence conduit au syndrome de Lafora. Il s'agit d'une épilepsie myoclonique de type 2, une maladie autosomale neurodégénérative où les cellules accumulent des corps d'inclusion (les corpuscules de Lafora) composés d'une forme insoluble du glycogène (pour revue voir Turnbull et al., 2016). Notons que ce sont des études menées *in vitro* par Worby et al., (2006) qui montrent que la laforine est capable de déphosphoryler l'amylopectine, et qui ont ainsi permis d'identifier cette protéine comme une glucane-phosphatase. Gentry et al., (2007), montrent que la laforine est capable de compléter un mutant *sex4* et suggèrent que les deux protéines aient la même fonction. Et c'est finalement en 2009 que Kötting et al., démontrent *in vivo* que la protéine SEX4 est une phosphoglucane-phosphatase impliquée dans la déphosphorylation des résidus glucose, étape indispensable à la dégradation de l'amidon.

Chez *A. thaliana* il existe deux autres phosphatases semblables à SEX4 (*Like sex 4*) : LSF1 et LSF2. Comme SEX4, la protéine LSF1 porte un domaine CBM et un domaine DSP, et est localisée dans le chloroplaste (Fig. 17). De plus, cette enzyme est nécessaire à la dégradation de l'amidon puisque les mutants *lsf1* accumulent une quantité anormale d'amidon. Cependant, le mode de fonctionnement de ces enzymes diffère. En effet, Comparot-Moss et al., (2010) montrent que les mutants *lsf1*, à l'inverse des mutants *sex4*, ne présentent ni d'accumulation de phospho-oligosaccharides, ni une réduction de la quantité de groupements phosphate relargués. Il est suggéré que la protéine LSF1 ayant perdu son activité de phosphatase suite à la mutation de son domaine DSP (substitution d'une histidine par une thréonine du motif HCX<sub>5</sub>R) ne déphosphorylerait pas les glucanes, mais d'autres protéines impliquées dans la dégradation de l'amidon via son domaine d'interaction PDZ (Fig. 17) ; auquel cas elle agirait comme une protéine régulatrice.

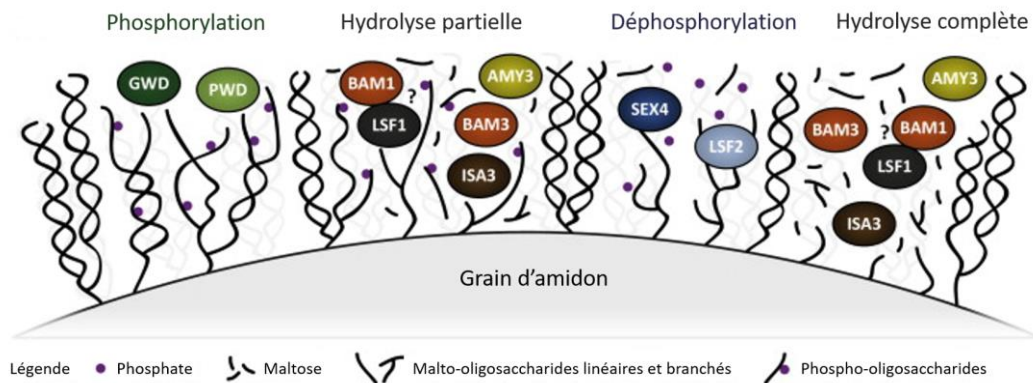




**Figure 17 : Représentation schématique de l'organisation des phosphoglucane-phosphatases.** Chez les plantes il existe 3 phosphoglucane-phosphatases (incluant SEX4 (Starch excess 4), LSF1 (Like sex4 1) et LSF2 (Like sex4 2)). Chez les mammifères il n'en existe qu'une, la laforine. Toutes ces enzymes possèdent un domaine DSP caractéristique de la famille protéique des tyrosine-phosphatases, sur lequel on retrouve un motif conservé [I/V]HCXXGXXR[S/T] (ou HCX<sub>5</sub>R). LSF2 est la seule protéine à ne pas posséder de domaine de liaison aux carbohydrates (CBM). Toutes les phosphoglucane-phosphatases végétales portent un peptide signal d'adressage au chloroplaste (cTP) et un domaine C-terminal stabilisant la protéine. LSF1 semble avoir perdu son activité de phosphatase suite à la mutation de son domaine DSP substituant l'histidine du motif HCX<sub>5</sub>R par une thréonine. Elle est également la seule à porter un domaine d'interaction protéine-protéine (PDZ) en N-ter, confortant l'hypothèse selon laquelle elle agirait comme protéine régulatrice modulant l'activité d'autres enzymes du catabolisme. La taille des protéines est indiquée en acides aminés. Adapté de Silver et al., (2014).

Bien que le mutant *lsf2* ne présente pas de phénotype *sex* et qu'aucun domaine CBM n'est présent sur la protéine LSF2, cette dernière semble pourtant être directement impliquée dans la dégradation de l'amidon. En effet, le double mutant *sex4/lsf2* accumule d'avantage d'amidon que le simple mutant *sex4* (Santelia et al., 2011) traduisant une redondance fonctionnelle des deux protéines. En effet, si la phosphatase SEX4 est capable de cliver les liaisons ester phosphate en C3 et en C6 de l'amylopectine (avec une préférence pour les phosphates en C6) (Hejazi et al., 2010), LSF2 est spécifique des phosphates en C3 (Santelia et al., 2011).

La dégradation de l'amidon nécessite non seulement la phosphorylation des chaînes de l'amylopectine par les dikinases (PWD et GWD), permettant la solubilisation du polysaccharide, et facilitant l'accès aux enzymes hydrolytiques mais également des déphosphorylations catalysées par des phosphatases (SEX4 et LSF2) afin que l'hydrolyse puisse se poursuivre (Fig. 18).



**Figure 18 : Phosphorylation et déphosphorylation de l'amidon lors de la dégradation de l'amidon de la feuille d'*A. thaliana*.** La dégradation de l'amidon est initiée par la phosphorylation de certains résidus glucose de l'amylopectine par les dikinases PWD et GWD, qui transfèrent respectivement un groupement phosphate en position C3 et C6. Cette phosphorylation désorganise les chaînes externes de l'amylopectine qui deviennent plus accessibles aux enzymes hydrolytiques comme les amylases (AMY3, BAM1 et BAM3) ou l'enzyme de débranchement ISA3. A ce stade, les enzymes libèrent du maltose, des malto-oligosaccharides, ou des phospho-oligosaccharides, mais elles sont rapidement gênées dans leur progression par les groupements phosphates. L'hydrolyse complète ne peut donc avoir lieu qu'après la déphosphorylation de ces groupements par les phosphatases SEX4 et LSF2. La protéine LSF1 pourrait déphosphoryler les enzymes hydrolytiques pour moduler leurs activités. Adapté de Silver et al., (2014).

## b) Les voies de dégradation de l'amidon

Après la déstructuration locale des molécules d'amylopectine par la phosphorylation réversible d'une partie des résidus glucose, les enzymes hydrolytiques peuvent accéder aux chaînes et commencer la dégradation du polysaccharide. Deux voies de dégradation de l'amidon dans le chloroplaste ont été décrites : la voie phosphorolytique et la voie amylolytique.

### i. La voie phosphorolytique

La voie phosphorolytique fait intervenir une amidon-phosphorylase, (analogue de la glycogène-phosphorylase évoquée précédemment (cf. Partie II. A.)) et qui catalyse, réversiblement la libération de G1P à partir de l'extrémité non-réductrice d'une chaîne glucanique en présence d'orthophosphate (Pi) ; ou la synthèse d'une liaison  $\alpha$ -1,4 glucosidique à partir de G1P (réaction 4). Le rôle de cette enzyme est donc double, pouvant intervenir soit dans la synthèse, soit dans la dégradation de l'amidon en fonction du rapport Pi/G1P, ce dernier étant en faveur du catabolisme dans le chloroplaste (Rathore et al., 2009). Pour les organismes accumulant du glycogène, l'activité de la glycogène-phosphorylase est indispensable à la dégradation du polysaccharide (Alonso-Casajus et al., 2006), et la communauté scientifique a longtemps pensé qu'il en était de même chez les plantes. Cependant, il s'avère que la fonction de l'amidon-phosphorylase des plantes est plus complexe.

Cette enzyme existe sous deux formes chez les plantes en fonction de leurs localisations subcellulaires, l'une étant plastidiale (PHO1) et l'autre cytosolique (PHO2) (Chez *A. thaliana*, ces deux enzymes sont nommées PHS1 et PHS2 respectivement (Malinova et al., 2014)). L'amidon étant localisé dans le plaste seule l'enzyme PHO1 peut y accéder directement.

L'enzyme plastidiale pourrait donc utiliser l'amidon comme substrat, et bien qu'elle ait été décrite comme ayant peu d'affinité avec les polyglucanes branchés comme l'amidon (Duwenig et al., 1997), elle devrait être en mesure de le dégrader et de générer du G1P. Cependant, le G1P libéré par l'enzyme ne peut pas être exporté tel quel vers le cytosol, puisqu'aucun transporteur d'hexose-phosphate assurant le passage du stroma vers le cytosol n'a été répertorié sur la membrane du chloroplaste (Weber, 2004). Dans la feuille la seule possibilité serait alors d'emprunter les translocateurs à triose-phosphate (TPT) après la conversion du G1P en triose-phosphate (Fig. 20). Une fois dans le cytosol, les triose-phosphates permettront d'alimenter la voie de la néoglucogenèse.

Cependant, il faut noter que les exports de carbone du chloroplaste vers le cytosol se font majoritairement sous la forme de glucose ou de maltose, et non sous la forme de triose-phosphate (Schleucher et al., 1998; Weise et al., 2004). De plus, des tests effectués sur des lignées transgéniques de plants de tabac (*Nicotiana tabacum L.*) et de pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) pour lesquels l'expression du TPT est sévèrement réduite par ARN interférence, ne révèlent aucun défaut dans la dégradation (Häusler et al., 1998; Heineke et al., 1994). Il en est de même lorsque l'on cible directement PHO1 chez la pomme de terre (Sonnewald et al., 1995). Enfin, tout doute semble être écarté avec le mutant *phs1* d'*A. thaliana* chez lequel la perte de l'enzyme n'a aucun impact sur le métabolisme de l'amidon (Zeeman et al., 2004).

En conclusion, la voie phosphorolytique ne semble pas être la voie principale de la dégradation de l'amidon, mais son influence ne peut pas être non plus totalement écartée puisque des preuves de sa participation ont été obtenues dans des lignées d'*A. thaliana* déficientes pour DPE2 ou MEX1, deux protéines impliquées dans le métabolisme du maltose (Malinova et al., 2014). En effet, les mutants *dpe2* et *mex1* présentent une élévation du niveau d'activité de PHS1. De plus, les doubles mutants *dpe2/phs1* et *mex1/phs1* affichent un retard de croissance plus important que les simples mutants. Par contre cette enzyme semble intervenir dans d'autres mécanismes. En effet, il est suggéré que l'activité de PHS1 permette le maintien du chloroplaste à l'obscurité (Malinova et al., 2014), ou favorise la résistance aux stress abiotiques (Zeeman et al., 2004). Des travaux récents menés sur le mutant *phs2* d'*A. thaliana*, arguent pour une fonction similaire de l'enzyme cytosolique dont l'activité semble être importante quand la plante est soumise à des stress lumineux ou pendant la sénescence (Schopper et al., 2015).

## ii. La voie amylolytique

Depuis les travaux de Scheidig et al., (2002) menés sur des plants transgéniques de pomme de terre, on connaît l'existence d'une autre voie de dégradation, dite « amylolytique » et qui représente la voie majoritaire de dégradation de l'amidon dans les feuilles de diverses espèces végétales. En effet, cette voie fait intervenir plusieurs enzymes dont la  $\beta$ -amylase qui catalyse la libération de  $\beta$ -maltose depuis l'extrémité non-réductrice d'un  $\alpha$ -glucane. Or plusieurs études indiquent que le  $\beta$ -maltose est le produit principal de dégradation de l'amidon mais aussi le produit le plus exporté par le chloroplaste la nuit (Niittylä et al., 2004; Weise et al., 2004, 2005). Dans cette partie je décrirai les enzymes impliquées dans cette voie catabolique.

### ➤ Les $\beta$ -amylases

La  $\beta$ -amylase (EC 3.2.1.2 ; GH14 de la classification Cazy) permet donc de libérer du  $\beta$ -maltose à partir de l'amylopectine (Remarquons que le terme de « bêta »-amylase, se rapporte à la configuration anomérique du maltose libéré et non à la liaison hydrolysée). Etant incapable de cliver les liaisons  $\alpha$ -1,6, l'enzyme génère également une  $\beta$ -limite dextrine (Baba et Kainuma, 1987).

Chez *A. thaliana*, neuf gènes codent des  $\beta$ -amylases (BAM1 à 9) (Smith et al., 2004). Sur la base de la position de leurs introns Monroe et al., (2017) proposent de séparer les gènes en deux groupes, la sous-famille I regroupant les *BAM1*, 3 et 9 ; et la sous-famille II regroupant les six autres. Sur la base d'analyses phylogénétiques, ils émettent également l'hypothèse selon laquelle les  $\beta$ -amylases de la sous-famille II dériveraient toutes de la *BAM2*.

Au sein de la famille I, les trois enzymes sont plastidiales mais la *BAM9* est inactive. L'activité des  $\beta$ -amylases dépend de la présence dans le site actif de quinze acides-aminés permettant de créer des ponts hydrogènes avec l'amidon, et qui ont été identifiés sur la  $\beta$ -amylase 5 du soja (Laederach et al., 1999). Remarquons que la *BAM5* est la seule  $\beta$ -amylase cytosolique active, et qu'elle est la première à avoir été purifiée et caractérisée (Monroe et Preiss, 1990). On peut donc identifier avec *BAM9*, trois autres  $\beta$ -amylases inactives : *BAM4*, 7 et 8 (Fig. 19).

BAM 5 (Soja)	Sous-site 1				Sous-site 2			DC		Sous-site 3					4
	D53	H93	D101	R420	K295	N381	A382	E186	E380	R188	Y192	G298	F341	T342	H300
BAM1	D	H	D	R	K	N	A	E	E	R	Y	G	F	T	H
BAM2	D	H	D	R	K	N	A	E	E	R	Y	G	F	T	H
BAM3	D	H	D	R	K	N	A	E	E	R	Y	G	F	T	H
BAM4	E	H	G	R	K	N	T	E	R	R	H	G	I	P	Y
BAM5	D	H	D	R	K	N	A	E	E	R	Y	G	F	T	H
BAM6	D	H	D	R	K	N	A	E	E	R	Y	G	F	T	H
BAM7	D	H	D	R	K	N	S	E	E	R	C	D	F	V	H
BAM8	D	H	G	Q	K	N	A	E	E	K	F	A	F	V	Y
BAM9	P	H	-	R	K	N	S	E	Q	K	H	L	I	P	H

**Figure 19** : Conservation des quinze résidus du site actif des  $\beta$ -amylases impliqués dans la liaison au substrat chez les neuf gènes paralogues *BAM* d'*A. thaliana*. Les résidus sont comparés à la séquence référence de la  $\beta$ -amylase 5 du soja. Les résidus qui diffèrent de cette référence sont grisés. Adapté de Monroe et al., (2017)

Les autres enzymes de la sous-famille I, *BAM1* et *BAM3* sont toutes deux décrites comme étant importantes dans la dégradation de l'amidon transitoire. Notamment *BAM3* puisque l'altération de son expression dans la feuille de la pomme de terre, ou d'*A. thaliana* conduit à une suraccumulation d'amidon (Kaplan et Guy, 2005; Lao et al., 1999; Scheidig et al., 2002). A l'inverse le mutant *bam1*, ne présente pas de phénotype sex mais le double mutant *bam1/bam3* accumule plus d'amidon que le simple mutant *bam3* ce qui suggère une redondance fonctionnelle entre ces deux protéines (Fulton et al., 2008). Bien que le rôle de *BAM3* soit prédominant sur celui de *BAM1* lors de la dégradation de l'amidon la nuit, d'autres

études indiquent que l'expression de ces enzymes dépend de facteurs environnementaux, et permet une réponse adaptée de la plante aux stress. Ainsi le froid conduit à une augmentation de l'expression de BAM3 (Kaplan et Guy, 2005; Maruyama et al., 2009) tandis que l'expression de BAM1 sera plus importante quand la plante est soumise à la chaleur ou à un stress osmotique (Maruyama et al., 2009; Valerio et al., 2011; Zanella et al., 2016).

Si la dégradation de l'amidon est principalement dépendante de l'activité des BAM1 et 3, cette voie catabolique est également influencée par BAM4 qui est adressée au chloroplaste mais pourtant inactive. En effet, le mutant *bam4* présente un phénotype *sex*. Fulton et al., (2008) lui propose alors un rôle dans la régulation bien que les mécanismes moléculaires sous-jacents ne soient pas connus. D'autres enzymes inactives, interviennent dans des mécanismes de régulation, c'est le cas des BAM7 et 8. L'altération de l'expression de ces  $\beta$ -amylases engendre un retard de croissance et de développement de la plante. Elles sont décrites comme adressées au noyau, et possèdent un domaine de liaison à l'ADN BZR1 (« *brassinazole resistant1* ») en N-terminal. Ces protéines agissent comme des facteurs de transcription en modulant l'expression de gènes ayant le motif CACGTGTG correspondant au BBRE (« *BZR1-BAM responsive element* ») dans leurs promoteurs (Reinhold et al., 2011; Soyk et al., 2014). Les auteurs suggèrent que les deux isoformes fonctionnent comme des senseurs, permettant la détection des niveaux de métabolites dans la cellule et autorisant une réponse cellulaire adaptée.

La fonction de BAM6 est peu connue, et son rôle dans le métabolisme semble être dépendant du niveau de développement de la plante (Monroe et al., 2014). Fulton et al., (2008) indique qu'elle aurait évolué à partir de BAM5. Ces deux enzymes sont actives mais BAM6 est adressée au chloroplaste tandis que BAM5 est cytosolique. Bien que BAM5 soit très présente dans la cellule sa fonction demeure inconnue, puisque les travaux menés pour tenter de la caractériser ont abouti à des résultats contradictoires (Fulton et al., 2008; Kaplan et Guy, 2005; Laby et al., 2001)

Enfin la  $\beta$ -amylase 2, est active et plastidiale. A l'origine elle était décrite comme ayant une faible liaison à l'amidon (Li et al., 2009), et une activité négligeable en comparaison à BAM1 et BAM3 (Fulton et al., 2008). Cependant, bien qu'il ait d'abord été rapporté que le mutant *bam2* ne présente pas de phénotype *sex* (Kaplan et Guy, 2005), il s'avère que sous certaines conditions BAM2 soit tout de même impliquée dans le catabolisme de l'amidon. En effet, Monroe et al., (2014) ont montré que le mutant *bam2* arbore une accumulation excessive d'amidon dans les feuilles âgées de huit semaines, suggérant un rôle de BAM2 dans le développement. De plus le gène est très conservé entre les espèces et est coexprimé avec de nombreux autres gènes impliqués dans la dégradation comme *GWD*, *SEX4* et *LSF2*, ce qui oblige à reconsidérer le rôle de BAM2 dans le catabolisme (Monroe et al., 2017).

### ➤ Les enzymes de débranchement

L'hydrolyse complète de l'amylopectine ne peut pas se contenter de l'activité des  $\beta$ -amylases. En effet, ces enzymes étant incapables d'hydrolyser les points de branchements, elles génèrent une  $\beta$ -limite dextrine en plus du  $\beta$ -maltose. Pour compléter la dégradation de l'amidon, une activité de débranchement est donc nécessaire. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe quatre enzymes capables de réaliser cette action chez *A. thaliana* : les isoamylases (ISA1, 2 et 3) et la pullulanase (PU1) (Deschamps et al., 2008b). ISA1 et ISA2

forment le complexe Iso1, impliqué dans le processus de biosynthèse de l'amidon. Concernant la dégradation de l'amidon ce sont les enzymes ISA3 et PU1 qui interviennent. En effet, l'absence d'ISA3 chez *A. thaliana* conduit à un retard de croissance associé à une suraccumulation du polysaccharide aussi bien en fin de jour qu'en fin de nuit (Delatte et al., 2006; Wattedled et al., 2005). A l'inverse l'absence de la pullulanase n'a aucune incidence sur la plante ni en termes de croissance, ni en termes de quantité d'amidon ; sauf dans un contexte mutant *isa3* où on observe alors une amplification du phénotype *sex* qui suggère une redondance fonctionnelle entre ces deux enzymes (Delatte et al., 2006; Wattedled et al., 2008).

L'action conjointe des  $\beta$ -amylases et des enzymes de débranchement conduisent ainsi à la dégradation complète de l'amidon. Cependant d'autres enzymes comme les  $\alpha$ -amylases et la D-enzyme, participent elles aussi à la dégradation du polymère dans le chloroplaste.

#### ➤ Les $\alpha$ -amylases

Les  $\alpha$ -amylases sont des endoamylases (EC 3.2.1.1) appartenant à la famille GH13 de la classification Cazy. Elles catalysent l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4 des polysaccharides de trois résidus glucose ou plus. On les trouve dans la plupart des tissus de réserve, où elles jouent un rôle essentiel pour la dégradation de l'amidon durant la germination (Beck et Ziegler, 1989), mais leur activité ne se restreint pas aux tissus de réserve. Chez *A. thaliana*, il existe trois isoformes pour cette enzyme (AMY1, AMY2 et AMY3) (Stanley et al., 2002), mais seule AMY3 est adressée au chloroplaste et est donc potentiellement impliquée dans la mobilisation du polysaccharide de réserve (Yu et al., 2005). Cependant ni le mutant *amy3*, ni le triple mutant pour lequel les trois  $\alpha$ -amylases sont absentes, n'affichent un phénotype différent du sauvage (Yu et al., 2005). Il en a alors été conclu que ces enzymes n'intervenaient pas dans le catabolisme de l'amidon. Pourtant Delatte et al., (2006) ont montré que des lignées dépourvues d'enzymes de débranchement (ISA3 et PU1) ont un taux de dégradation de leur amidon altéré mais pas stoppé. En revanche ces souches accumulent anormalement de petits glucanes branchés (DP8 à 30) et solubles caractéristiques de l'activité des  $\alpha$ -amylases. De plus, les auteurs enregistrent dans ces lignées, une expression accrue de la protéine AMY3. Enfin, on retrouve ces espèces particulières de glucanes dans des quadruples mutants où toutes les DBEs sont éteintes. Dans ces lignées, une mutation supplémentaire pour le gène *AMY3* conduit à la diminution de la quantité de ces glucanes (Streb et al., 2008). Ce résultat confirme que les glucanes sont bien des produits de l'activité de cette  $\alpha$ -amylase. Il est donc supposé que dans certaines conditions AMY3 soit capable de dégrader l'amidon dans les feuilles d'*A. thaliana*, bien que cette activité ne soit pas indispensable.

#### ➤ La D-enzyme

Pour fonctionner les  $\beta$ -amylases ont besoin d'un substrat d'au moins quatre résidus glucose. Il est donc possible que des glucanes plus courts comme des maltotrioses (DP=3) qui ne sont pas substrat soient libérés par les enzymes de débranchement. Le maltotriose est alors pris en charge par l'enzyme disproportionnante (D-enzyme) (EC 2.4.1.25). A partir de ce substrat, l'enzyme génère du glucose et des chaînes de tailles supérieures. Ces dernières deviennent alors substrat de la  $\beta$ -amylase.

Chez *A. thaliana* ou la pomme de terre, cette enzyme plastidiale est issue du gène *DPE1*, et les lignées qui en sont dépourvues accumulent une large quantité de malto-oligosaccharides

(principalement du maltotriose) dans leurs feuilles pendant les phases de dégradation. Cette accumulation anormale de MOS, s'accompagne d'une diminution du taux de dégradation de l'amidon (Critchley et al., 2001; Lütken et al., 2010). Ce ralentissement est supposé provenir d'un rétrocontrôle négatif de la voie amylolytique par les MOS puisqu'il a été montré *in vitro* que l'activité de BAM3 pouvait être inhibée à une concentration physiologique de maltotriose (Li et al., 2017).

Finalement la dégradation de l'amidon par la voie amylolytique conduit à la libération de deux composés dans le stroma du chloroplaste : du glucose, sous-produit de l'activité disproportionnante, et surtout du  $\beta$ -maltose. Ces deux éléments doivent ensuite être exportés dans le cytosol pour alimenter la voie de biosynthèse du saccharose (Fig. 20)

### c) Export du maltose et du glucose

Il est connu de longue date que le maltose est capable de franchir la membrane du chloroplaste (Herold et al., 1981; Rost et al., 1996), mais ce n'est qu'en 2004 que Niittylä et al., identifient le transporteur permettant son passage. Ce dernier a pu être identifié via une approche de génétique formelle. En effet, les auteurs ont récupéré des mutants d'*A. thaliana* issus d'une collection obtenue par exposition au méthanesulfonate d'éthyle (EMS) et qui présentaient un phénotype *sex*. Ils ont ensuite utilisé un crible phénotypique pour identifier des mutants qui présentaient un niveau anormalement haut de malto-oligosaccharides (dits *mex* pour « *malto-oligosaccharide excess* »). Ils ont ainsi obtenu deux mutants affectés sur le même gène, nommé *MEX1*. La fonction de la protéine associée au gène *MEX1* a pu être identifiée par expression hétérologue de la protéine recombinante (sans le peptide de transit) chez une souche mutante *malF* d'*Escherichia coli*, dépourvue de transporteur de maltose. La souche recombinante étant capable de pousser dans un milieu supplémenté en maltose, les auteurs ont pu conclure au rôle de transporteur de maltose de la protéine *MEX1*. Des homologues de cette protéine ont également été identifiés chez de nombreuses espèces comme le riz (Niittylä et al., 2004), la pomme (Reidel et al., 2008), ou chez la microalgue *C. reinhardtii* (Findinier et al., 2017). Cependant chez la microalgue, l'absence du transporteur ne conduit à un phénotype *sex* que lorsque les cellules ont été cultivées en carence azotée. En effet, les analyses menées en cycle jour/nuit n'ont pas permis de mettre en évidence de phénotype particulier chez le mutant. De plus il s'avère que la protéine de *C. reinhardtii* ne permet pas de restaurer le phénotype du mutant *malF* d'*E. coli*, suggérant son incapacité ou du moins son inefficacité, à transporter le maltose. Les auteurs ont également tenté de compléter le mutant *mex1* d'*A. thaliana* avec la protéine de l'algue, et inversement. Alors que la complémentation est effective lors de l'expression de la protéine d'*A. thaliana* chez le mutant *mex* de l'algue, ce n'est pas le cas dans la situation inverse. De plus, l'expression hétérologue chez *E. coli* a montré que les protéines *MEX* d'*A. thaliana* ou de *C. reinhardtii* sont aussi capables de transporter du glucose. Ces observations suggèrent des voies de dégradation différentes tout au moins en ce qui concerne les étapes finales entre la micro-algue et Arabidopsis.

Ainsi, l'export du maltose qui est indispensable à la dégradation de l'amidon chez les plantes supérieures est assuré par le transporteur *MEX1* (Fig. 20). Cependant le rôle des protéines *MEX* dans la dégradation de l'amidon et l'évolution de leurs fonctions entre les

espèces, restent peu clairs et nécessitent la caractérisation de mutants d'autres espèces modèles.

En parallèle, le transport du glucose à travers la membrane du chloroplaste est également assuré par le transporteur PGLCT. Encore une fois l'absence de la protéine chez *A. thaliana*, n'engendre pas de phénotype marqué. Par contre, le double mutant *mex1/pglct1* présente un phénotype *sex* plus prononcé que le simple mutant *mex1*. Ceci suggère que l'export du glucose par ce transporteur contribue à une dégradation efficace de l'amidon bien que dans une moindre mesure par rapport au transporteur MEX1 (Cho et al., 2011) (Fig. 20).

#### **d) Prise en charge cytosolique**

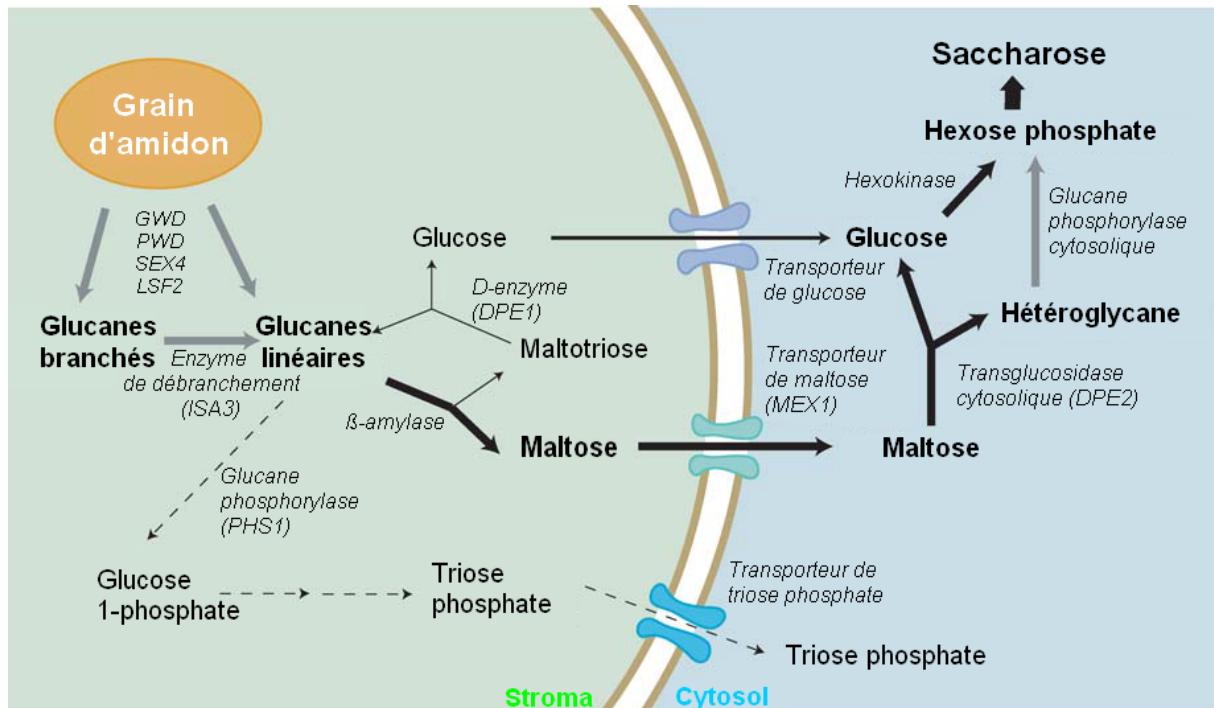
Pour pouvoir alimenter la voie de biosynthèse du saccharose, le maltose et le glucose exportés par le chloroplaste doivent être transformés en hexoses phosphates. Plusieurs étapes enzymatiques sont nécessaires à cette fin.

A partir du maltose, trois étapes initiales peuvent être envisagées (Chia et al., 2004). Soit l'hydrolyse par une maltase (EC 3.2.1.20) permettant la production de glucoses qui seraient alors phosphorylés par une hexokinase ; soit la phosphorylation par une maltose-phosphorylase (EC 2.4.1.8) permettant la production de glucose et de G1P ; soit la libération de glucose passe par l'activité d'une enzyme disproportionnante (D-enzyme). Dans le génome d'*A. thaliana*, cinq gènes permettent l'expression d'une maltase. Certains de ces gènes sont impliqués dans la synthèse de cellulose (Gillmor et al., 2002), d'autres dans le développement des graines (Boisson et al., 2001), mais aucun d'entre eux ne semblent être impliqués dans la dégradation de l'amidon. A l'inverse, aucun gène codant une maltose-phosphorylase n'a été identifié dans le génome d'*A. thaliana*, et les amidon-phosphorylases ne sont pas capables de fonctionner à partir du maltose comme substrat. Chez les bactéries, une enzyme clé du métabolisme du maltose est l'amylomaltase (MALQ chez *E. coli*) (Boos et Shuman, 1998). Les mutants *malQ* ne sont plus capables de pousser en présence de maltose comme unique source de carbone. Il a été proposé que le métabolisme cytosolique du maltose chez les plantes suivait un mécanisme similaire à celui des bactéries (Lu et Sharkey, 2004). Comme nous l'avons vu, les plantes possèdent une enzyme disproportionnante dans leur plaste (DPE1) mais une version cytosolique (DPE2) de cette protéine existe également. Il s'agit d'une enzyme disproportionnante spécifique du  $\beta$ -maltose, permettant la libération d'un résidu glucose et le transfert de l'autre sur un glucane accepteur. En effet, les mutants *dpe2* d'*A. thaliana* arborent un phénotype *sex* et accumulent près de 200 fois plus de maltose que les souches sauvages ; tandis que la nuit, les quantités de G1P, G6P et de saccharose sont amoindries (Chia et al., 2004; Lu et Sharkey, 2004). Des résultats similaires ont également été obtenus chez la pomme de terre (Lloyd et al., 2004).

Il est suggéré que le glucane accepteur prenne la forme d'un hétéroglycane cytosolique soluble, composé principalement d'arabinose et de galactose, permettant de stocker les résidus glucose libérés à court terme (Fettke et al., 2005). Les unités glucose intégrées dans cette structure sont soumises à un renouvellement important, lié à la fois à la réversibilité de la réaction catalysée par DPE2 (Fettke et al., 2006) et à l'action de l'amidon phosphorylase cytosolique PHS2 qui utilise l'hétéroglycane comme substrat afin de libérer du G1P. C'est en tout cas, ce que suggère la lignée *phs2* d'*A. thaliana* qui accumule un hétéroglycane cytosolique contenant davantage de glucose que la souche sauvage (Lu et al., 2006). Ce



mutant accumule également plus de maltose la nuit, soulignant le rôle de PHS2 dans le métabolisme du maltose. Cependant en comparaison à la souche sauvage, le taux de dégradation de l'amidon est normal, et la quantité de maltose accumulée chez le mutant *phs2* n'est que quatre fois supérieures, ce qui est peu, vis-à-vis du mutant *dpe2* qui accumule 200 fois plus de maltose que le sauvage. C'est pourquoi Lu et al., (2006) proposent l'existence d'une voie alternative permettant de convertir le glucose de l'hétéroglycane en hexose phosphate.



**Figure 20 :** Modèle de dégradation de l'amidon dans la feuille d'*Arabidopsis thaliana*. Les étapes encore incertaines sont représentées en pointillés. L'initiation de la dégradation est amorcée dans le stroma par la phosphorylation/déphosphorylation des chaînes externes de l'amylopectine par les dikinases PWD et GWD et les phosphatases SEX4 et LSF2. L'initiation de la dégradation permet aux enzymes hydrolytiques d'accéder aux chaînes de l'amylopectine. La voie principale de la dégradation de l'amidon est la voie amylolytique. Elle fait intervenir conjointement les enzymes de débranchement et les  $\beta$ -amylases permettant principalement la libération de maltose, mais aussi de maltotriose comme sous-produit de dégradation. Celui-ci ne peut pas être utilisé comme substrat par la  $\beta$ -amylase. Il sera en revanche clivé par la D-enzyme plastidiale (DPE1) pour libérer un résidu glucose et allonger un glucane accepteur avec le maltose. Le glucane ainsi allongé pourra de nouveau être la cible de la  $\beta$ -amylase. Le maltose et le glucose sont exportés dans le cytosol via les transporteurs MEX1 et GGLT où ils alimenteront le métabolisme du maltose. Ce dernier fait appel à une cascade enzymatique où interviennent la transglucosidase (DPE2) et l'amidon-phosphorylase (PHS2) et aboutit à la formation d'hexoses phosphate qui seront à leurs tours utilisés pour l'élaboration du saccharose. En parallèle la voie phosphorolytique secondaire, représentée par l'amidon phosphorylase plastidiale (PHS1) génère du G1P à partir de glucanes linéaires pour alimenter la voie des triose-phosphates. Adapté de Smith et al., 2005

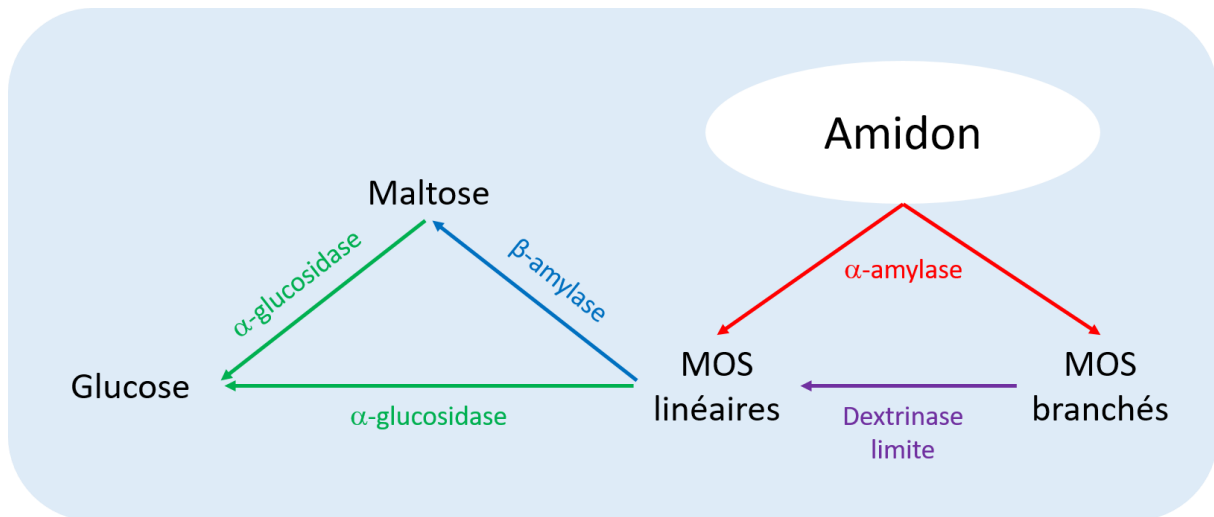
En définitive, l'action conjointe de DPE2 et PHS2 permet de convertir le maltose exporté par le chloroplaste en glucose et en G1P. Le glucose (qui s'ajoute au glucose exporté par le chloroplaste) est pris en charge par une hexokinase permettant de le convertir en G6P, puis en fructose-6-phosphate (Fru6P) grâce à la phosphoglucose isomérase (PGI) cytosolique. En parallèle, le G1P libéré par PHS2 sera utilisé comme substrat par l'UDP-glucose

pyrophosphorylase pour fournir de l'UDP-glucose. Le Fru6P et l'UDP-glucose sont les substrats de la saccharose-phosphate synthase (SPS) permettant la synthèse de saccharose-phosphate lui-même converti en saccharose par la saccharose-phosphate phosphatase (SPP) (Ruan, 2014). Le saccharose permet d'alimenter la cellule en énergie, ou être exporté chez les plantes supérieures via le phloème pour alimenter en énergie d'autres organes.

### **e) La dégradation de l'amidon de réserve**

Notons que la dégradation de l'amidon ne s'effectue pas toujours dans un chloroplaste, ni même au sein d'un plaste. C'est le cas par exemple de l'amidon de réserve de l'albumen des céréales. En effet, au moment de la germination l'amidon se trouve dans un environnement où l'intégrité cellulaire a été perdue pendant la phase de déshydratation du grain. Malgré cet environnement, l'amidon de l'albumen est tout de même dégradé en glucose, lequel est absorbé par le scutellum (l'embryon de la graine). C'est d'ailleurs le scutellum et l'aleurone (un tissu entourant l'albumen) qui contrôlent la dégradation de l'amidon en libérant les enzymes nécessaires dans l'albumen. Cette conversion de l'amidon en glucose fait intervenir quatre classes d'enzymes : les  $\alpha$ -amylases, les  $\beta$ -amylases, les pullulanases et les maltases (Andriotis et al., 2016; Sun et Henson, 1991; Zeeman et al., 2010). Chez les céréales, les  $\alpha$ -amylases sont les principales enzymes de la dégradation de l'amidon (Beck et Ziegler, 1989; Whan et al., 2014), si bien que l'absence d'une isoforme chez le riz entraîne un défaut de la germination (Asatsuma et al., 2005). Les  $\alpha$ -amylases sont également décrites comme étant capables de dégrader directement l'amidon natif sans l'intervention préalable des dikinases (GWD et PWD) et des phosphatases (SEX4 et LSF2). Rappelons que l'amidon des céréales est très peu phosphorylé (Blennow et al., 2002; Buléon et al., 1998). Le début de la germination est marqué par une importante production et sécrétion d' $\alpha$ -amylase par l'aleurone et le scutellum (Fincher, 2011). Chez l'orge 10 gènes codent une  $\alpha$ -amylase, cependant seuls deux isoformes sont sécrétés dans l'albumen (Bak-Jensen et al., 2007). Les  $\alpha$ -amylases sont donc responsables de l'initiation de la dégradation de l'amidon de réserve et libèrent des glucanes linéaires et branchés. Les produits de dégradation sont débranchés par la pullulanase, et les glucanes linéaires ainsi générés peuvent être entièrement dégradés. Cette dégradation passe principalement par l'activité des maltases qui libèrent les résidus de glucose. En effet, elles représentent une activité importante au cours de la germination et elles peuvent aussi agir de manière synergique avec les  $\alpha$ -amylases pour libérer des résidus glucose directement depuis la surface du grain d'amidon (Sun et Henson, 1991). Dans ce système de dégradation, l'activité de la  $\beta$ -amylase semble être une fonction redondante des maltases. En effet, plusieurs variétés d'orge du Tibet exprimant moins de  $\beta$ -amylase que les autres, ne présentent pas de défaut lors de la germination (Kaneko et al., 2000). De plus, le maltose produit par ces enzymes est hydrolysé par les maltases comme les autres glucanes linéaires afin de libérer du glucose.

L'ensemble de ces études menées sur la dégradation de l'amidon notamment dans le grain d'orge permettent l'élaboration d'un modèle de dégradation de l'amidon de réserve des céréales (Fig. 21).



**Figure 21** : Modèle de dégradation de l'amidon de réserve de l'albumen des céréales. L' $\alpha$ -amylase est capable d'utiliser l'amidon natif comme substrat, sans étape préalable de phosphorylation /déphosphorylation. Les malto-oligosaccharides libérés sont débranchés par la dextrinase limite (pullulanase), générant des glucanes linéaires. Ces derniers peuvent soit être directement hydrolysés sous la forme de résidus glucose via l' $\alpha$ -glucosidase, soit indirectement en passant par une étape intermédiaire via la  $\beta$ -amylase. Adapté de Findinier, (2015)

## f) Régulation du catabolisme de l'amidon

Etant donné l'importance de la voie catabolique pour la croissance hétérotrophe et le maintien de la plante, il est raisonnable de croire en l'existence de mécanismes permettant la régulation de la dégradation de l'amidon autorisant une gestion des réserves énergétiques de la plante. Plusieurs études ont mis en évidence de tels mécanismes et proposent même plusieurs niveaux de régulation.

### i. Régulation diurne et circadienne

Etant donné que l'amidon est synthétisé le jour pour être dégradé la nuit, il semble évident que les activités enzymatiques soient soumises à une régulation. Il est d'ailleurs connu que la plante *A. thaliana* soit capable d'adapter la synthèse et la dégradation de l'amidon à la durée des photopériodes. Ainsi une plante soumise à une exposition à la lumière de courte durée aura un taux de synthèse d'amidon plus important, tandis que ses taux de dégradation et de croissance diminueront en comparaison aux plantes contrôles soumises à 12 h de jour et 12 h de nuit (Gibon et al., 2009). De cette façon, la plante évite autant que possible de se retrouver en situation de carence carbonée. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, des cultures synchronisées de l'algue démontrent l'existence d'une régulation circadienne du métabolisme de l'amidon. Celle-ci persiste quand les algues sont transférées d'une alternance jour/nuit à des conditions de lumière ou d'obscurité continues et repose sur la régulation circadienne de l'enzyme clé de la voie métabolique : l'ADP-glucose pyrophosphorylase (Ral et al., 2006) et tout particulièrement de la petite sous-unité catalytique (Zabawinski et al., 2001).

Chez la plante, il a également été décrit, que l'expression de certains gènes codant une enzyme impliquée dans la dégradation de l'amidon (*AMY3*, *GWD1*, *GWD3*, *DPE1*, *ISA3*, *PHS1*), ou dans le métabolisme du maltose (*DPE2*, *PHS2*), était soumise au rythme jour/nuit (Harmer et al., 2000; Lu et al., 2005; Smith et al., 2004). A l'inverse ce n'est pas le cas de la plupart des gènes codant les enzymes participant à la biosynthèse du polysaccharide, pour lesquels le taux

de transcrit reste constant tout au long du cycle diurne, à l'exception toutefois de la GBSS et de la SS2 dont la transcription augmente lors du passage de l'obscurité à la lumière (Smith et al., 2004). Cependant, même si le niveau de transcrit change au cours du cycle jour/nuit, ce n'est pas le cas du niveau d'expression des protéines associées. En effet, la quantité des enzymes de dégradation reste constante (Lu et al., 2005; Smith et al., 2004), à l'exception de la transglucosidase DPE2 chez la pomme de terre dont la quantité augmente en fin de jour et diminue en fin de nuit (Lloyd et al., 2004). Etant donné que l'expression des protéines reste constante, les auteurs suggèrent alors l'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnelle permettant de contrôler l'activité des enzymes *in vivo*.

De façon intéressante, les plantes sont capables la nuit, d'ajuster le taux de dégradation de l'amidon à la quantité d'amidon dont elles disposent. Les plantes régulent ainsi la dégradation de l'amidon de façon à ce que la réserve s'épuise à l'aurore, ni avant, ni après. De cette façon, la plante optimise sa croissance et ses activités, et évite des phases de carence en carbone. Les plantes sont capables de percevoir et de mesurer la longueur des périodes lumineuses (McClung, 2001). Certains avancent l'hypothèse que la plante ajuste le taux de dégradation, lequel est constant pendant la nuit, en fonction de la durée du jour de la veille (Lu et al., 2005). D'ailleurs, lorsque l'on perturbe l'horloge circadienne en interrompant la phase de nuit par une exposition à la lumière soit plus tardive, soit plus tôt que prévue, alors la plante se retrouve respectivement en situation de carence, ou avec un surplus d'amidon (Stitt et Zeeman, 2012). De même, chez des mutants déficients pour des gènes impliqués dans le contrôle du rythme circadien (Graf et al., 2010) les plantes ne sont plus capables d'adapter le taux de dégradation à la durée de la nuit.

Cette adaptation nécessite que la plante soit capable d'évaluer la quantité d'amidon à sa disposition en fin de jour. A ce jour, on ignore encore par quels processus la plante y parvient.

## ii. Régulation par oxydo-réduction

La régulation de la dégradation n'est pas uniquement contrôlée par les cycles jour-nuit. En effet, comme c'était le cas pour l'ADP-glucose pyrophosphorylase, les activités de certaines enzymes de la dégradation sont également sensibles à l'oxydo-réduction. Parmi celles-ci on retrouve la phosphatase SEX4 (Silver et al., 2013; Sokolov et al., 2006), la dikinase GWD (Mikkelsen et al., 2005), les  $\beta$ -amylases BAM1 et BAM3 (Glaring et al., 2012; Sparla et al., 2006), l' $\alpha$ -amylase AMY3 (Seung et al., 2013), et la pullulanase (Glaring et al., 2012).

Ce mode de régulation pose néanmoins problème puisque ces enzymes sont activées en conditions réductrices, c'est-à-dire pendant la journée quand le photosystème 1 est actif. Cette observation entre donc en contradiction avec la fonction des enzymes qui devraient être activées la nuit. Il est donc suggéré que la régulation par oxydo-réduction ne joue qu'un rôle mineur pour la dégradation de l'amidon transitoire la nuit, mais pourrait par contre jouer un rôle plus important lors de la dégradation de l'amidon présent dans les cellules de garde des stomates afin de permettre leur ouverture (Lawson et al., 2014) ; ou être nécessaire à des mécanismes de réponse au stress.

Le contrôle de ces enzymes pourrait passer via l'activité d'une NADPH thioredoxine réductase (NTRC) plastidiale. En effet, il a été montré *in vitro* que la NTRC était capable de restaurer l'activité des enzymes oxydées (Mikkelsen et al., 2005; Silver et al., 2014; Valerio et al., 2011).

### iii. Phosphorylation et formation de complexes hétéromultimériques

Comme nous l'avons vu, certaines enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'amidon sont capables de s'organiser en complexes homomériques (dans le cas d'ISA1) ou hétéromériques (dans le cas de l'association d'ISA1 avec ISA2) (Dauvillée et al., 2001b, 2001a). Chez *A. thaliana*, la formation du complexe Iso1 (nom donné au complexe ISA1/ISA2) est indispensable à la synthèse normale de l'amylopectine (Wattebled et al., 2005). D'autres complexes multi-enzymes ont été répertoriés, notamment dans l'albumen du riz et du maïs pendant le développement de la graine (Kötting et al., 2010). Dans ces complexes multimériques, il n'est pas rare de trouver des domaines d'interaction protéine-protéine, et des sous-unités phosphorylées. D'ailleurs, l'action *in vitro* d'une phosphatase alcaline conduit à la dissociation de ces complexes. Il est suggéré que la formation de tels complexes permette l'acquisition d'activités particulières que les enzymes ne possèdent pas individuellement. Une illustration de cette hypothèse peut être apportée par la protéine PTST, que nous avons déjà mentionné, et qui est capable d'interagir avec la GBSS par l'intermédiaire d'un domaine en super hélice (un domaine d'interaction protéine-protéine). La protéine PTST ne possède pas de domaine catalytique, en revanche elle porte un domaine de liaison aux carbohydrates absent chez la GBSS. Chez le mutant dépourvu de PTST, la GBSS n'est plus associée au grain d'amidon et la synthèse d'amylose n'a pas lieu. Il est donc suggéré que ce soit la formation du complexe qui permette à la GBSS de s'associer au grain et d'assurer la synthèse d'amylose (Seung et al., 2015). D'autres protéines portent ce type de domaines, notamment la protéine MRC (ou PII1) qui s'associe à la protéine SS4 et contribuerait ainsi à l'initiation de la synthèse du grain (Seung et al., 2018; Vandromme et al., 2018). Pour les enzymes impliquées dans le catabolisme de l'amidon, des sites potentiels de phosphorylation ont été prédits (Bayer et al., 2012; Heazlewood et al., 2007; Lohrig et al., 2009), mais aucune étude ne montre l'impact de la phosphorylation des enzymes sur la dégradation. Cependant certaines enzymes portent des domaines d'interaction en super hélice comme AMY3 ou la GWD (Schliebner et al., 2008). Il a été tout de même suggéré qu'une interaction entre les protéines BAM1 et LSF1 pouvait exister (Kötting et al., 2010). L'existence de complexes protéiques impliqués dans la dégradation de l'amidon ne peut donc pas être écartée.

### iv. Le « *sugar signaling* »

L'adaptation de la plante à son environnement nécessite la mobilisation d'énergie. Cependant ses ressources étant limitées, il est vital que la plante puisse contrôler finement cette mobilisation. Il est donc indispensable que cette dernière puisse à tout moment « connaître » son statut énergétique. A cette fin, les sucres et les métabolites libérés au cours de la dégradation de l'amidon, ou générés par la photosynthèse sont de bons outils car ils reflètent le statut énergétique de la plante. Plusieurs voies dites de « *sugar signaling* » faisant intervenir, d'une part la détection du niveau de métabolites et d'autre part la transduction d'un signal permettant de rendre compte du statut énergétique et donc de permettre une réponse adaptée, sont à l'œuvre chez les plantes. Parmi celles-ci, on compte la voie SnRK1 (« *SNF1-related kinase1* »), et la voie TOR kinase (« *target of rapamycine* »). Ces deux voies ont des actions opposées et complémentaires. En effet, la voie SnRK1 est active lors des carences (Baena-González, 2010), tandis que la voie TOR est active pendant les phases

d'abondance (Deprost et al., 2007). L'activation de ces voies est permise par des détecteurs de sucres encore inconnus. Ces derniers sont sensibles à la présence du tréhalose-6-phosphate (T6P) dont la présence est corrélée à celle du saccharose (Lunn et al., 2006). En effet, le T6P est un intermédiaire synthétisé à partir d'UDP-glucose ou de G6P par la T6P synthase (TPS), puis déphosphorylé par la T6P phosphatase (TPP) en tréhalose ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1,1- $\alpha$ -D-glucopyranoside). Quand la disponibilité en saccharose (et donc en T6P puisqu'ils sont issus des mêmes précurseurs) est faible, la voie SnRK1 est activée. Inversement la présence de G1P, de G6P ou de T6P inactive cette voie de régulation (Nunes et al., 2013; O'Hara et al., 2013; Zhang et al., 2009). Ce système de régulation permet l'inhibition de certaines voies de biosynthèse, empêche la croissance de la plante et la dégradation de l'amidon. (Baena-González, 2010; Baena-González et al., 2007; Ghillebert et al., 2011). En toute logique, les mutants dépourvus d'activité SnRK1 présentent un phénotype sex (Baena-González et al., 2007).

D'autres expériences ont permis de souligner l'importance du T6P dans la régulation du métabolisme de l'amidon. En effet, la surexpression de TPS chez *A. thaliana* conduit à une augmentation de la quantité d'amidon accumulée, alors que la plante surexprimant la TPP en contient moins. Il a d'ailleurs été montré que le T6P était impliqué dans l'activation de l'AGPase par oxydo-réduction (Kolbe et al., 2005). D'autres expériences menées par Martins et al., (2013) indiquent que la surexpression de TPS la nuit inhibe la dégradation de l'amidon à une étape précoce et intra plastidiale de la voie catabolique puisqu'il n'observe pas d'accumulation de maltose (ni de maltotriose). Le mode d'action n'est pas encore compris, mais ce n'est pas directement le T6P qui inhibe les enzymes du catabolisme puisque l'inhibition ne peut pas être observée *in vitro*. Ces auteurs proposent que le T6P soit à l'origine d'un rétrocontrôle négatif de la dégradation de l'amidon.

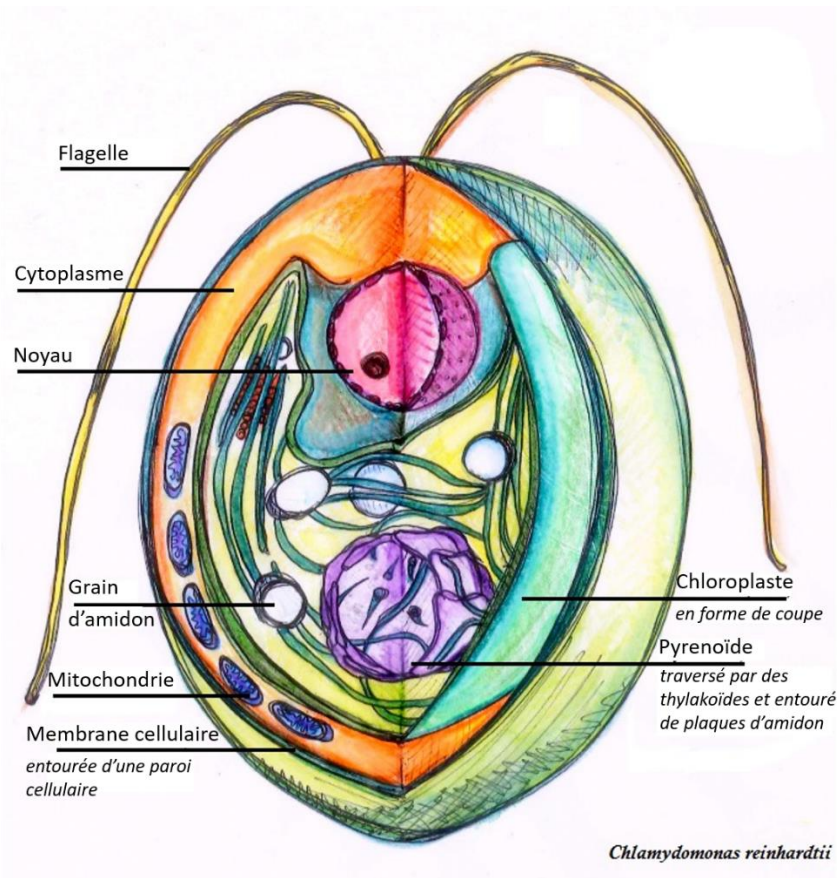
Pour conclure, le catabolisme de l'amidon est un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs. Le modèle de dégradation de l'amidon proposé dans la feuille d'*A. thaliana* est relativement complet. Beaucoup de travail a été réalisé à partir de ce modèle et essentiellement par des approches de génétique inverse. Néanmoins il reste des acteurs à identifier, notamment dans les processus de régulation, pour achever ce travail. Pour y parvenir des approches de génétique formelle peuvent s'avérer plus appropriées. Bien qu'il ne soit pas impossible de conduire de telles approches avec le modèle *A. thaliana*, la microalgue *C. reinhardtii* facilite grandement ce type de démarches.

### III. *Chlamydomonas reinhardtii* :

Les espèces du genre *Chlamydomonas* du grec *chlamy*, manteau ou cape, et *monas*, solitaire ; appartiennent au règne des Archaeplastides (un groupe monophylétique issu de l'endosymbiose primaire du plaste (Cenci et al., 2014; Price et al., 2012)). Elles sont classées dans l'embranchement des Chlorophytes et dans l'ordre des Volvocales. Il s'agit d'algues vertes unicellulaires, polarisées, de forme elliptique ou ovale. On les trouve principalement dans l'eau douce et les sols (Harris, 2009a). *Chlamydomonas reinhardtii* en est un des membres les plus connus et utilisés en laboratoire. En effet, certaines de ses caractéristiques en font un organisme modèle largement utilisé dans l'étude de la photosynthèse, du phototactisme, de la motilité cellulaire, ou du métabolisme de l'amidon.

## A. Son architecture cellulaire

La microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* est délimitée par une membrane plasmique contre laquelle on trouve, à l'image des cellules végétales supérieures, une paroi (Fig. 22). Cependant, cette dernière ne contient pas de cellulose mais est essentiellement constituée de glycoprotéines. Celles-ci sont riches en hydroxyproline et principalement associées à de l'arabinose, du galactose, du glucose, du xylose, et du mannose (Ferris et al., 2001), dont les quantités et l'organisation structurale changeront au cours du cycle cellulaire. A l'extrémité antérieure de la cellule les deux flagelles qui émergent de la paroi, assurent les fonctions motrices de la cellule lui permettant de se déplacer dans son milieu. L'algue vit principalement dans l'eau douce, un environnement hypotonique. Dans ces conditions, la concentration en soluté étant plus importante dans la cellule qu'à l'extérieur, l'eau a une tendance naturelle à entrer dans la cellule par osmose. C'est pourquoi il existe chez *Chlamydomonas reinhardtii*, deux vacuoles contractiles impliquées dans l'osmorégulation, et agissant à l'image d'une pompe, comme des outils de prévention de la lyse cellulaire en cas de pression interne excessive (Buchmann et Becker, 2009).



**Figure 22 :** Représentation schématique d'une cellule de *Chlamydomonas reinhardtii*. Traduit de Ninghui Shi (accessible depuis <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=28369980>).

### ➤ Les trois génomes de *C. reinhardtii*

Dans le cytosol de la microalgue, on retrouve aussi les compartiments conventionnels des cellules eucaryotes photosynthétiques. En effet, on y retrouve un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique bordant un noyau de 2 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre contenant un nucléole

central (Fig. 22), mais également de multiples mitochondries pouvant représenter 1 à 3 % du volume cellulaire, et un chloroplaste, siège de la photosynthèse. A l'inverse des cellules végétales supérieures, le chloroplaste n'est représenté qu'en un unique exemplaire, mais celui-ci peut représenter jusqu'à 40 % du volume cellulaire (Boynton et al., 1972).

Le génome nucléaire est haploïde, et particulièrement riche en GC (64 %), il comprend 17 chromosomes pour une taille totale de 121 Mb, et a été entièrement séquencé. On estime qu'il coderait pour environ 17750 gènes (Blaby et al., 2014; Dutcher et al., 1991; Merchant et al., 2010). Les organites semi-autonomes comme les mitochondries ou le chloroplaste possèdent également leurs propres génomes. Le génome mitochondrial de 16 kb comprend 13 gènes dont 2 codent des ARN ribosomiaux, 3 des ARN de transfert et les 8 derniers des protéines de la chaîne respiratoire (Larosa et Remacle, 2013). Enfin le génome du chloroplaste d'une taille de 203 kb codent 99 gènes, dont 62 sont traduits en protéines, et la majorité d'entre-elles sont impliqués dans la mise en place de l'appareil photosynthétique (Maul et al., 2002).

#### ➤ Le chloroplaste

Au sein du chloroplaste plusieurs structures sont identifiables. Les thylakoïdes constitués d'empilement de sacs vésiculaires sont porteurs des photosystèmes permettant de capter l'énergie lumineuse et de la convertir en énergie chimique par photosynthèse (El-Khouly et al., 2017) (Fig. 22). Les plastoglobules sont des gouttelettes lipidiques associées aux thylakoïdes, qui semblent être impliqués dans le remodelage, la réparation et même la formation des thylakoïdes lors de la biogenèse des chloroplastes (Rottet et al., 2015). On trouve également le stigma, ou eye-spot, impliqué dans le phototactisme. Cette structure composée de granules riches en caroténoïdes agit comme un photorécepteur permettant à la microalgue d'orienter sa nage en direction de la lumière en influençant le battement des flagelles (Ueki et al., 2016).

Enfin le pyrénôïde (Fig. 22), visible en microscopie optique, est impliqué dans plusieurs processus. Cette structure est essentiellement constituée de ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (ou RuBisCO). La RuBisCO est essentielle à l'activité photosynthétique puisqu'elle permet l'initiation du cycle de Calvin-Benson-Bassham par son activité carboxylase, en présence de CO<sub>2</sub> (Wang et al., 2015). Cependant, son site actif peut également accueillir du dioxygène (O<sub>2</sub>), orientant l'enzyme vers son activité oxygénase et vers la photorespiration, une voie particulièrement coûteuse en énergie (Foyer et al., 2009). Les organismes photosynthétiques vivants dans des environnements à faible teneur en CO<sub>2</sub>, comme l'eau douce, ont alors mis en place un mécanisme de concentration du CO<sub>2</sub> (CCM) que l'on retrouve chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce système assure le transport du bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et sa conversion en CO<sub>2</sub> au niveau du pyrénôïde, permettant de diminuer le ratio O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> et ainsi de favoriser l'activité carboxylase de la RuBisCO (Wang et al., 2015). A l'instar du stroma, le pyrénôïde est également un lieu de synthèse de l'amidon. Cependant la biosynthèse de l'amidon pyrénôïdal est régulée différemment de l'amidon stromal. En effet, cet amidon formant une gaine délimitant le pyrénôïde n'est visible en microscopie qu'en condition d'induction du CCM (Ramazanov et al., 1994).

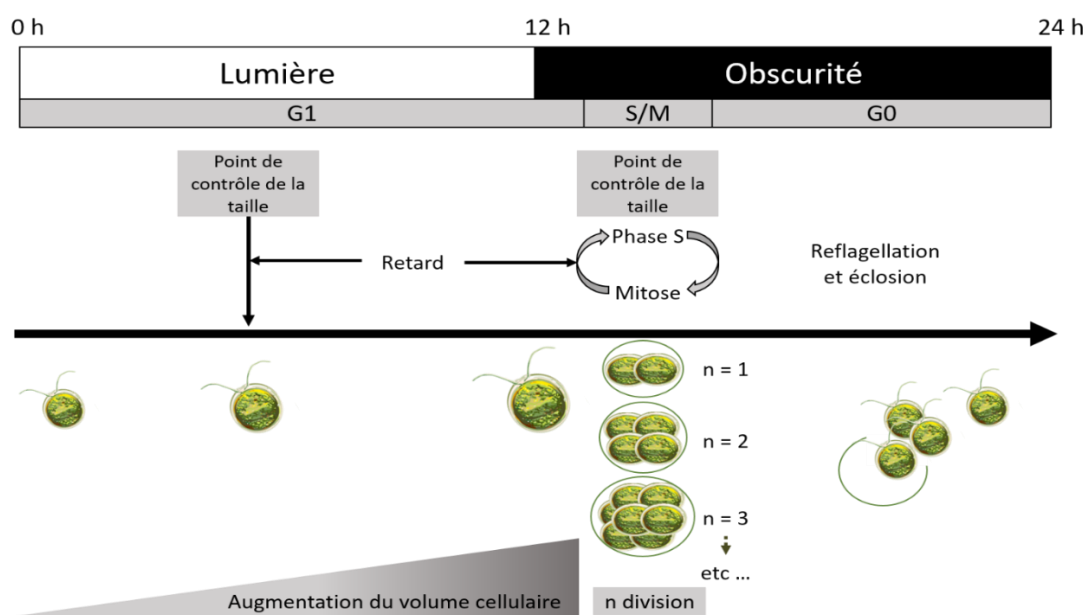


## B. Son cycle de vie

### 1) La voie végétative

*Chlamydomonas reinhardtii* se reproduit essentiellement par voie végétative. En alternance jour-nuit (12 h de lumière et 12 h d'obscurité) la microalgue prolifère par fission multiple (ou palintomie) (Cross et Umen, 2015) (Fig. 23). Dans ce cas, les cellules s'engagent dans un mécanisme de divisions multiples sans interruption par des phases de croissance. Les phases de croissance (G1) ont lieu pendant la journée et sont prolongées, permettant à la cellule d'augmenter son volume. Pendant la nuit, les cellules vont entrer dans une série de phase de réplication du matériel génétique (S), toutes suivies d'une mitose (M). Le nombre de cycles S/M dépend de la taille de la cellule-mère en fin de phase G1, plus la taille est importante plus les cellules filles seront nombreuses. La nouvelle génération de cellule va ensuite dégrader la paroi de la cellule mère qui les retient encore, en libérant une enzyme lytique (V-lysine), c'est l'éclosion. Ce mécanisme de division est une adaptation de la microalgue à la contrainte de flagellation. En effet, pendant la mitose les cellules équipées d'une paroi doivent se débarrasser de leurs flagelles pour permettre la ségrégation des corps basaux dans lesquels les flagelles sont ancrés (Koufopanou, 1994).

Dans les conditions utilisées au laboratoire, c'est-à-dire en lumière continue (200-400  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) et avec les conditions optimales de cultures (entre 20 et 25 °C, à pH neutre), les cultures de *C. reinhardtii* poussent de façon asynchrone et un temps de génération de 6 à 8 heures peut être atteint.



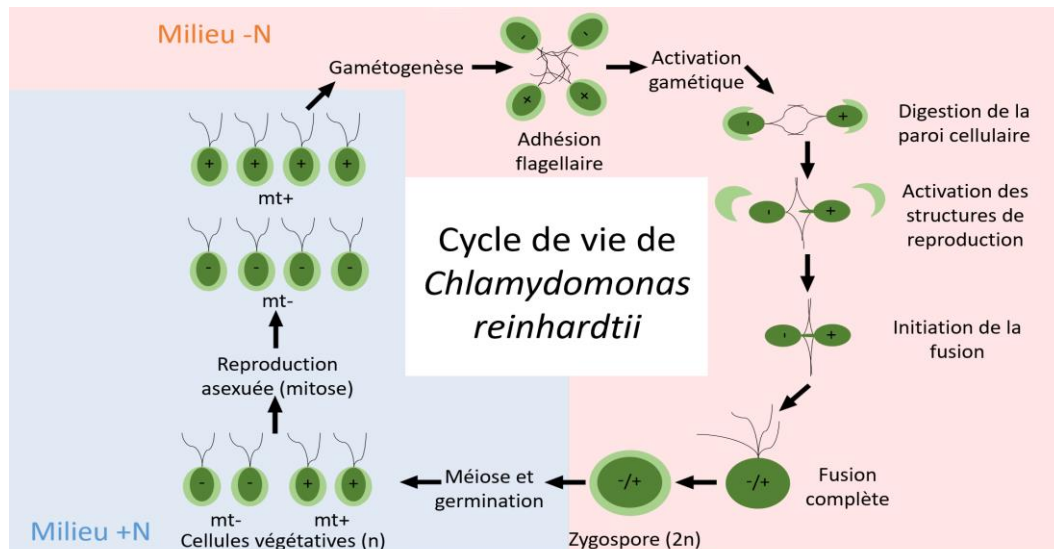
**Figure 23 : Cycle de fissions multiples de *Chlamydomonas reinhardtii*.** La phase de croissance (G1) a lieu essentiellement pendant la journée et dure entre 12 et 14 heures. Le volume cellulaire est multiplié pendant cette phase. Il existe un point de contrôle de la taille pendant la phase G1. Avant ce point, la progression du cycle est dépendante de la taille de la cellule qui doit atteindre une taille minimale. Au-delà de ce point, le déroulement du cycle devient indépendant de la taille cellulaire. Pendant la nuit en fin de phase G1, la cellule perd ses flagelles et initie une série de divisions en alternant rapidement des phases de synthèses (S) et de divisions (M). Le nombre de divisions dépend de la taille de la cellule mère en fin de G1. Après la phase S/M les cellules vont se libérer de la paroi de la cellule mère en la digérant, et se reflageller. Adapté de Harris, 2009b.

## 2) Son cycle sexuel

Sous certaines conditions *C. reinhardtii* peut également avoir recours à la reproduction sexuée (Fig. 24). En effet, l'espèce est hétérothallique et isogame, il existe donc chez cette algue des gamètes indifférenciables morphologiquement, mais de polarités sexuelles différentes. On distingue les polarités ou « mating type » positif (*mt+*) et négatif (*mt-*). Cette méthode de reproduction peut être induite en cas de stress et notamment lors d'une carence azotée (Sager et Granick, 1954), auquel cas les cellules végétatives entrent dans un processus de gamétogénèse. Si des gamètes des deux polarités sexuelles sont en contact, on assiste rapidement à « l'agglutination ». Cette étape consiste en l'adhésion flagellaire d'un gamète avec un, ou plusieurs gamètes de polarité opposée. L'adhésion est permise grâce aux agglutinines distinctes produites par les deux mating types (Adair, 1985). L'agglutination conduit à la formation de « couples » de gamètes de polarités opposées, lesquels fusionneront après la digestion de leur paroi par la G-lysine, et l'activation des structures « mating spécifiques » comme la formation du tubule de fertilisation par le gamète *mt+* (Friedmann et al., 1968; Wilson et al., 1997). Après la fusion des gamètes, le zygote diploïde temporairement quadriflagellé, va mûrir pendant 4 à 6 jours pour former la zygospore qui se caractérise par une paroi cellulaire particulièrement résistante, une perte de la chlorophylle et des chloroplastes, et l'accumulation de réserves lipidiques. C'est sous cette forme que l'algue peut attendre, plusieurs années durant si nécessaire, que les conditions de milieu redeviennent favorables. Ainsi, lors d'un retour à des conditions favorables la germination s'amorce conduisant à la formation par méiose d'une tétrade, soit quatre cellules végétatives haploïdes. Celles-ci seront libérées par rupture de la paroi de la zygospore pour perpétuer le cycle cellulaire.

Notons qu'au cours du processus les cellules d'une tétrade héritent de trois génomes. Le génome plastidial est transmis à la descendance exclusivement par le gamète *mt+*, mais à l'inverse c'est le gamète *mt-* qui transmet le génome mitochondrial (Boynton et al., 1987). Le génome nucléaire est quant à lui transmis par les deux parents selon une ségrégation mendélienne, chaque copie d'un gène étant distribuée à deux des quatre cellules filles. Ainsi pour deux gènes considérés, les combinaisons possibles par la ségrégation permettent la formation de tétrades dites « ditypes parentales », ou « ditypes non-parentales », ou encore de « tétratypés ».

Notons également qu'il n'est pas rare, puisque la fréquence varie entre 1 et 5 % dans les conditions de culture de laboratoire, de voir après la fusion des gamètes, des « diploïdes végétatifs ». Ces zygotes plutôt que de former une zygospore, vont continuer à se diviser de manière végétative par mitose. Les diploïdes végétatifs constituent pour les généticiens un outil très utile puisqu'il ouvre la voie aux tests de complémentation. Enfin il est également possible de voir des phénomènes de cytoduction, c'est-à-dire la division du zygote avant la fusion des noyaux. Dans ce cas, il est possible d'obtenir des cellules avec le génome nucléaire d'un parent mais le génome mitochondrial et/ou plastidial de l'autre (Matagne et al., 1991).



**Figure 24** : Cycle de vie de *Chlamydomonas reinhardtii*. Sous carence azotée (rose), les cellules végétatives haploïdes (n) initient la gamétogenèse, première étape de la reproduction sexuée. Les gamètes se réunissent via leurs flagelles, ce qui aboutit à la formation de paires de gamètes de polarités sexuelles opposées (*mt+* et *mt-*). La fusion commence après la digestion des parois cellulaires, et la formation du tubule de fertilisation par le gamète *mt+*. La fusion des gamètes génère un zygote diploïde quadriflagellé puis, dans la majorité des cas, aboutit à la formation d'une zygospore. Ce n'est qu'au retour à des conditions de milieu favorable (bleu), que la zygospore entre en méiose donnant naissance à 4 cellules haploïdes dont la moitié de chaque polarité sexuelle. Ces dernières pouvant se diviser par mitose indépendamment du cycle sexué. Adapté de Harris, 2001.

### C. *Chlamydomonas reinhardtii* comme modèle d'étude

#### 1) Génétique inverse

Les recherches menées sur le métabolisme de l'amidon au cours des dernières décennies nous permettent maintenant de bien appréhender les mécanismes de sa biosynthèse (Streb et Zeeman, 2012), et bien qu'il soit encore incomplet d'établir un modèle de la dégradation de l'amidon transitoire dans la feuille d'*A. thaliana* (Smith et al., 2005) (Fig. 20). Comme nous l'avons vu, ce modèle est le fruit de nombreux travaux menés sur la feuille par des approches de génétique inverse. Ces approches nécessitent cependant d'avoir un, ou plusieurs gènes candidats. Par exemple, les travaux menés sur les enzymes de débranchement d'*Arabidopsis* ont permis, par la génération et la caractérisation du mutant *isa3*, d'attribuer à la protéine ISA3 son rôle dans le catabolisme de l'amidon (Wattebled et al., 2005). Cette méthode est efficace, mais toute la difficulté réside dans l'identification du gène candidat, on ne peut en effet pas tester un gène si sa fonction n'est pas suspectée. De plus, la génétique inverse ne permet pas d'appréhender aisément les systèmes de régulation. C'est pourquoi nous utilisons au laboratoire une approche complémentaire de génétique formelle.

#### 2) Génétique formelle

En génétique formelle l'approche est sans *a priori*, c'est-à-dire que l'on génère d'abord par mutagenèse une banque de mutants. Un crible phénotypique adapté à la fonction attendue, permettra ensuite d'identifier les mutants d'intérêt. Ces derniers, via les outils de la biologie moléculaire, désigneront le ou les gènes affectés par la mutagenèse et impliqués

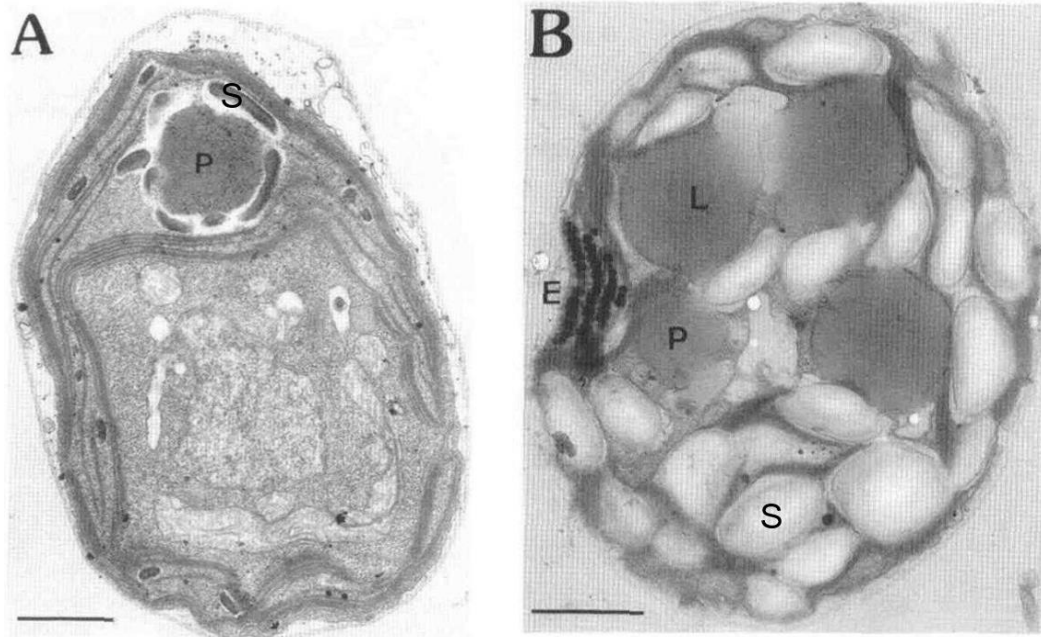
dans la fonction étudiée. Cette méthode répond donc aux limites de la génétique inverse, puisqu'elle autorise l'identification de nouveaux gènes et des facteurs de régulation. Cependant la génétique formelle souffre de ses propres limites. En effet, il n'est pas toujours aisé d'identifier la mutation et il est également possible de passer à côté de certains acteurs si leur phénotype est masqué par des redondances fonctionnelles. Enfin, cette approche nécessite un modèle d'étude adapté à l'image de *Chlamydomonas reinhardtii*.

### **3) Les atouts de *C. reinhardtii***

Un bon modèle de laboratoire doit réunir plusieurs conditions. Parmi les plus élémentaires, il faut que le laboratoire puisse facilement reconstituer son environnement naturel. *C. reinhardtii* offre cet avantage puisqu'elle est peu exigeante. En chambre de culture, elle pousse en lumière continue (200-400  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ ) à une température constante de 21 °C. Elle est maintenue à pH neutre et en présence d'acétate en milieu liquide, mais également sur milieu gélosé sur lequel elle forme des colonies à l'image de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'analogie a d'ailleurs donné à *C. reinhardtii* son surnom de « levure verte ». Dans ces conditions optimales, l'algue accroît rapidement sa population puisqu'une nouvelle génération voit le jour toutes les 6 à 8 heures.

Comme on l'a vu, son cycle de vie est majoritairement haploïde ce qui est très commode pour générer des mutants puisque toute altération de son génome a une forte probabilité d'engendrer une répercussion phénotypique. L'algue est sensible aux mutagenèses par agents physiques (UV ou RX), chimiques (EMS ou nitrosoguanidine), ou par insertion d'ADN exogène. C'est cette dernière méthode qui est utilisée au laboratoire, puisque l'insertion d'une cassette de résistance à un antibiotique (dans notre cas la paromomycine) facilite à la fois la sélection des mutants, et la localisation de la mutation (Findinier et al., 2017; Tunçay et al., 2013).

Ajoutons à cela que la génétique de la microalgue est facilement accessible. Son génome a été entièrement séquencé (Merchant et al., 2010) et, comme il l'a été mentionné précédemment, sa reproduction sexuée peut être induite simplement en la transférant dans un milieu carencé en azote. Le cycle aboutit soit à l'obtention d'un diploïde stable permettant d'effectuer des tests de complémentation, soit après induction de la méiose à l'obtention d'une tétrade autorisant les analyses de coségrégation.



**Figure 25 :** Coupes de cellules de *Chlamydomonas reinhardtii* observées par microscopie électronique à transmission. **(A)** La cellule était en phase active de croissance, elle accumule principalement de l'amidon (S) autour du pyrénioïde (P). Quelques grains d'amidon peuvent être observés dans le stroma du chloroplaste. **(B)** La cellule provient d'une culture carencée en azote pendant 5 jours. On observe cette fois des grains d'amidon de réserve occupant l'essentiel du volume cellulaire, ainsi que des gouttelettes lipidiques (L). Le pyrénioïde est ici toujours visible, à côté du stigma (ou Eyespot) (E). (Libessart et al., 1995).

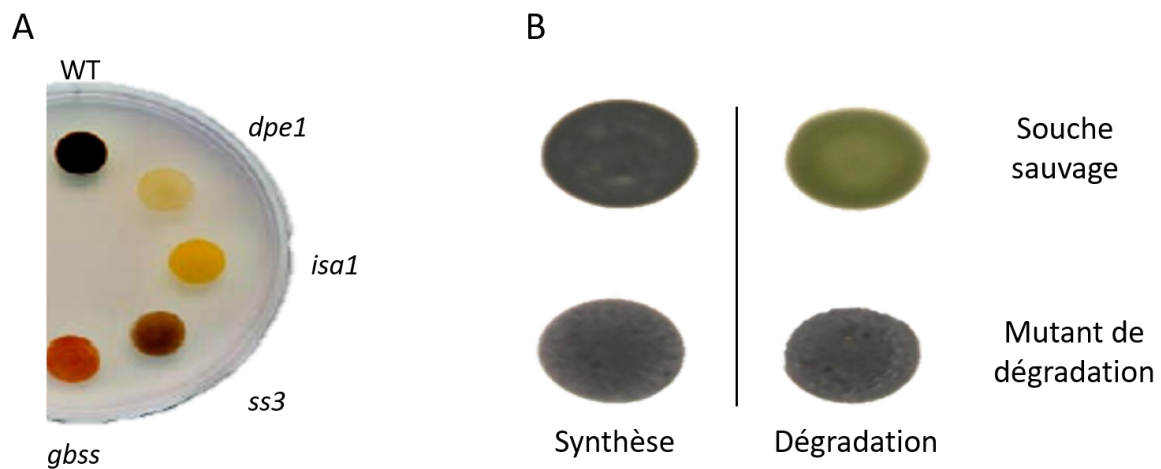
Enfin, et c'est un point capital, pour notre équipe de glycobiologie végétale, le principal intérêt de l'algue est qu'elle partage avec les végétaux supérieurs la même voie de biosynthèse de l'amidon (Deschamps et al., 2008c). Cependant il est important de noter qu'en conditions normales de culture l'algue synthétise un amidon pyrénioïdal comparable à l'amidon transitoire observé chez les feuilles d'*Arabidopsis* avec très peu d'amylose (<5 %) (Libessart et al., 1995). A l'opposé, lorsqu'elle est soumise à un stress tel qu'une carence azotée, l'algue va accumuler un amidon de réserve comparable à celui trouvé chez les céréales (Fig. 25) et provenant principalement d'un métabolisme hétérotrophe utilisant l'acétate du milieu (Libessart et al., 1995).

*Chlamydomonas reinhardtii* est donc un organisme de choix pour l'étude du métabolisme de l'amidon par génétique formelle à condition, toutefois, de disposer d'un crible phénotypique performant permettant l'identification des mutants d'intérêt.

#### 4) Crible à l'iode en deux étapes

Un crible utilisant l'interaction naturelle du diiode ( $I_2$ ) avec les polysaccharides a permis dans le passé l'identification de nombreux mutants de biosynthèse de l'amidon. En effet, des plages cellulaires de la microalgue peuvent être colorées par des vapeurs d'iode et la teinte qu'elles arboreront alors, dépendra de la nature du polysaccharide accumulé. Après 5 jours de carence azotée la souche sauvage de *C. reinhardtii* apparaît noire après coloration à l'iode, les souches dépourvues d'amidon sont jaunes, un mutant déficient dans la synthèse

d'amylopectine (*ss3*) présente une teinte altérée brune/verte, alors qu'un mutant sans amylose (*gbss*) est rouge (Colleoni et al., 1999) (Fig. 26).



**Figure 26 : Cribles à l'iode.** (A) Plages cellulaires de différents mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* colorées aux vapeurs d'iode après 5 jours de cultures sans azote. De haut en bas, la souche sauvage (WT) accumule une quantité normale d'amidon et apparaît en noir. Les mutants *dpe1* et *isa1* dépourvus d'amidon se colorent en jaune. Les mutants *ss3* et *gbss* sont déficients pour la synthèse d'amylopectine et d'amylose respectivement. (B) Crible à l'iode en deux étapes utilisé pour identifier les mutants du catabolisme. Les cellules sont soumises à un système de synthèse puis à une dégradation. Les cellules sont colorées à l'issue des deux phases, permettant de discriminer les souches sauvages qui perdent leur coloration après la phase de dégradation alors que les mutants du catabolisme conservent leur teinte initiale.

Cependant, la détection des mutants de la dégradation de l'amidon ne peut pas se contenter de cette méthode de crible sans une étape supplémentaire. Dans cette optique, les plages cellulaires sont réalisées en doubles exemplaires sur des boîtes séparées. Les deux boîtes sont carencées en azote et placées à la lumière pendant cinq jours, favorisant l'accumulation massive d'amidon. Après cette phase de synthèse, la carence est levée sur l'une des deux boîtes qui est placée pendant 24 heures à l'obscurité afin de permettre la dégradation de l'amidon accumulé. Les deux boîtes sont ensuite colorées aux vapeurs d'iode. Les souches sauvages qui dégradent correctement leur amidon présentent une perte de l'interaction à l'iode sur la boîte de dégradation révélant la diminution du pool du polysaccharide de réserve. Les lignées déficientes dans la dégradation de l'amidon conservent quant à elles une teinte noire caractéristique de l'amidon sur les deux systèmes. (Fig. 26).

---

## MATERIELS ET METHODES

---

### I. Milieux de culture et lignées cellulaires

#### 1) Les différentes lignées de *Chlamydomonas reinhardtii*

Au cours de mon travail de thèse, plusieurs souches de l'algue *C. reinhardtii* ont été utilisées. La souche sauvage de référence 137C (*mt- nit1 nit2*) est la lignée à partir de laquelle les mutagenèses, ayant permis d'isoler les mutants du catabolisme dont *bsg1*, ont été effectuées. Les autres souches sauvages ont été utilisées pour des croisements avec 137C ou les souches en dérivant, et elles ont donc une polarité sexuelle opposée. Il s'agit des souches 37c1 (*mt+ pab2 ac14*) pour les analyses de coségrégation, et de CC-125 (*mt+ nit1 nit2*) pour la production d'autolysine.

#### 2) Les milieux de cultures

Les milieux et les conditions de cultures sont ceux décrits par Harris et al., (2009), Delrue et al., (1992) et Ball et al., (1991). La composition de ces milieux est décrite dans les tableaux suivants (Tableaux 1-3)

Milieux	TAP +N	TAP -N	TMP
Cr Salt 20x +N	50 ml	-	50 ml
Cr Salt 20x -N	-	50 ml	-
Tris (2 M)	10 ml	10 ml	10 ml
Cr KPO <sub>4</sub>	5 ml	5 ml	5 ml
Cr Oligo	1 ml	1 ml	1 ml
MgSO <sub>4</sub> (0,5 M)	1 ml	1 ml	1 ml
PAB (1mg/ml)	1 ml	1 ml	1 ml

**Tableau 1** : Composition des milieux liquides utilisés pour les cultures de *C. reinhardtii*. Les milieux sont réalisés à partir de solutions mères (Cr) dont la composition est donnée en détail dans le tableau 3. Les volumes sont donnés en ml par litre de culture. Les milieux sont équilibrés à pH = 7 à l'acide acétique pour les milieux TAP ±N et à l'acide chlorhydrique pour le milieu TMP, avant d'être stérilisés. PAB = Acide para-aminobenzoïque.

Le milieu standard de culture de *C. reinhardtii* est un mélange de Tris, d'acétate, de phosphate et d'azote (abrégé TAP+N). Il s'agit d'un milieu de culture liquide autorisant la croissance de l'algue en condition mixotrophe, c'est-à-dire qu'elle peut soit adopter un régime hétérotrophe en utilisant le carbone présent dans le milieu (sous forme d'acétate), soit adopter un régime autotrophe en assimilant le CO<sub>2</sub> atmosphérique. C'est le TAP+N qui est utilisé pour les précultures permettant aux cellules de s'adapter au milieu liquide, et de contrôler la densité cellulaire avant le transfert en cultures de plus gros volumes. En fonction de l'usage on pourra transférer les précultures dans du TAP+N pour analyser l'amidon pyrénoidal (équivalent de l'amidon transitoire des plantes), en TAP-N (un milieu équivalent au TAP+N mais sans l'azote) pour analyser l'amidon de réserve, ou en TMP (un milieu équivalent au TAP+N mais sans l'acétate) que l'on utilise pour observer la dégradation de l'amidon à l'obscurité. *C. reinhardtii* peut aussi pousser sur des milieux gélosés, sur lesquels elle forme des colonies (Tableau 2).

Milieux	HSA riche	HS	HS + Ac	HS + PAB	HS + Ac + PAB	NIT mini	NIT complet
Cr Salt 20x +N	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	-	-
Cr Salt 20x -N	-	-	-	-	-	50 ml	50 ml
Cr KPO <sub>4</sub>	10 ml						
Cr Oligo	1 ml						
MgSO <sub>4</sub> (0,5 M)	1 ml						
PAB (1mg/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						
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	0,4 g	0,4 g
NaNO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	0,4 g

**Tableau 2 : Composition des milieux solides utilisés pour les cultures de *C. reinhardtii*.** Les volumes et les quantités indiquées sont donnés pour un litre de milieux de culture.

Cr Salt 20x	+N	-N
NH <sub>4</sub> Cl	8 g	-
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2 g	2 g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1 g	1 g
NaCl	-	8,7 g
<b>CrKPO<sub>4</sub></b>	<b>Milieu liquide</b>	<b>Milieu gélosé</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	93,5 g	72 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	63 g	36 g
<b>Cr Oligo</b>	<b>Pour 550ml d'eau à 100°C</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4 g	
ZnCl <sub>2</sub> (ou ZnSO <sub>4</sub> )	10,4 (ou 22 g)	
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	5,1 g	
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	4,99 g	
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1,61 g	
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	1,57 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O (ou MoO <sub>3</sub> )	1,1 g (ou 0,8 g)	
Puis ajouter		
EDTA	50 g (dans 350 ml d'eau à 100 °C)	
KOH	20 g (dans 100 ml d'eau)	
Equilibrer le pH final à 6,5 à 80 °C avec KOH		

**Tableau 3 : Composition des solutions mères permettant la confection des milieux de culture de *C. reinhardtii*.** Les quantités sont données pour un litre de milieu, sauf mention contraire.



Elles sont d'ailleurs maintenues, et conservées sous cette forme sur des boîtes de milieu HSA riche (*High Salt Acetate*). La chambre de culture dans laquelle est cultivée l'algue est prévue pour permettre une croissance optimale de l'organisme, c'est-à-dire à 21 °C et à une luminosité constante de 400  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ . Dans ces conditions, elles nécessitent peu d'entretien, et sont repiquées sur un milieu frais tous les mois. Les cultures liquides sont en plus, soumises à une agitation constante de 120 rpm.

Il est également possible d'exercer une pression de sélection sur les milieux gélosés en ajoutant des antibiotiques. La plupart du temps, il s'agira d'hygromycine (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ou de paromomycine (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). D'autres milieux gélosés peuvent être utiles pour tester les auxotrophies après un croisement comme les milieux HS, HS+Ac, HS+PAB, NIT mini, ou NIT complet.

Des cultures en conditions photo-autotrophiques ont également été réalisées au CEA de Cadarache. Dans ces conditions, les cellules sont cultivées sous agitation (100 rpm), en milieu minimum (MM ou Milieu I selon Sager et Granick, (1953)) avec un apport contrôlé de  $\text{CO}_2$  (2 % (v/v)). Les cultures sont maintenues à une température de 25 °C, et soumises à un cycle jour/nuit (12 h/12 h).

## II. Identification du mutant *bsg1* par crible à l'iode en deux étapes

Mon travail de thèse repose sur l'identification d'un mutant présentant un phénotype particulier. Ce mutant est issu d'une campagne de mutagenèse dont l'objectif était de générer des mutants du catabolisme, dans le but de découvrir de nouvelles fonctions impliquées dans la dégradation de l'amidon. Les mutants obtenus lors de cette campagne, sont issus de la souche sauvage 137C et proviennent de la mutagenèse par insertion d'une cassette conférant la résistance à la paromomycine. (*Aph VIII*). Les transformants obtenus ont donc pu être sélectionnés sur des boîtes de milieu HSA riche + paromomycine, avant d'être soumis à un crible à l'iode pour trouver parmi eux de potentiels mutants du catabolisme. Comme nous l'avons vu, un tel crible nécessite un procédé en deux étapes que je vais détailler ici.

Les transformants ainsi que la souche sauvage 137C sont individuellement mis en suspension dans du milieu TAP-N. Quinze  $\mu\text{l}$  de ces suspensions sont déposés sur deux boîtes de milieu gélosé TAP-N, et les plages cellulaires sont identifiées. Elles sont ensuite maintenues dans la chambre de culture, à la lumière pendant cinq jours pour permettre l'accumulation massive d'amidon. Au terme des cinq jours, la carence en azote est levée sur l'une des deux boîtes en ajoutant sur les plages cellulaires 15  $\mu\text{l}$  d'une solution de chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) à 150 mM. Cette boîte est alors recouverte d'aluminium et ainsi maintenue pendant 24 heures supplémentaires à l'obscurité pour favoriser la dégradation du polysaccharide. Au sixième jour les boîtes sont alors soumises aux vapeurs de diiode. La coloration des plages cellulaires permet alors de discriminer les souches sauvages, les mutants de synthèse et les mutants de dégradation de l'amidon comme décrit en figure 26.

## III. Caractérisations biochimiques

Une fois le mutant *bsg1* identifié comme un mutant du catabolisme, son phénotype amidon a été caractérisé. Pour cela, la première étape consiste à extraire le polysaccharide.

## 1) Extraction et purification de l'amidon

En fonction de l'amidon que l'on souhaite récupérer, les milieux et les conditions de cultures peuvent varier. Pour de l'amidon pyrénoidal, on part de cultures d'un litre de TAP+Nensemencées à  $10^5$  cellules par ml dans des erlenmeyers de deux litres contenant 1 litre de milieu. Les cellules sont cultivées dans les conditions de la chambre de culture décrites plus haut, et sous agitation constante de 120 rpm. Les cellules sont récoltées à la concentration de  $2-3 \cdot 10^6$  cellules par ml, afin d'éviter que la densité cellulaire n'empêche la lumière d'atteindre les cellules les moins exposées. Pour l'amidon de réserve, les cellules sont cultivées de la même façon mais dans un litre de TAP-Nensemencé à  $5 \cdot 10^5$  cellules par ml. Les cultures en milieu carencé sont arrêtées après cinq jours alors que la densité cellulaire atteint 1 à  $2 \cdot 10^6$  cellules par ml.

A l'arrêt des cultures, on mesure la densité cellulaire au compteur à particules, puis les cellules sont récupérées par centrifugation à 4000 g pendant 10 min et à 4 °C. Le culot est repris dans de l'eau ultrapure et maintenu dans la glace. La lyse cellulaire est effectuée soit via une minute de sonication, soit par Presse de French notamment dans le cas des cultures non-carencées (10000 PSI, deux passages à la presse). Après la lyse, une nouvelle centrifugation de 15 min à 4000 g et à 4 °C permet de récolter l'amidon et les débris cellulaires. Le culot est repris dans 1,5 ml d'une solution de Percoll 90 % pour établir un gradient de densité. Une centrifugation à 16000 g pendant 15 min à 4 °C permet alors de purifier l'amidon. Le culot d'amidon purifié est ensuite rincé dans 1,5 ml d'eau ultrapure, puis dilué en préparation de son dosage.

## 2) Dosage de l'amidon

A partir de la suspension d'amidon obtenue, on réalise une série de trois dilutions ( $1/5^e$  ;  $1/10^e$  ; et  $1/20^e$ ) dans un volume final de 30  $\mu$ l. L'amidon est solubilisé en le chauffant à 99 °C pendant 5 min. Le dosage en lui-même est opéré au moyen du kit enzymatique « *Enzytec Starch Assay* » (R-Biopharm, Darmstadt, GER). Dans un premier temps, l'amyloglucosidase permet de digérer l'amidon en glucose, lequel est converti successivement par l'hexokinase et la G6P-déshydrogénase en G6P et en 6-phosphogluconate, dont la synthèse est couplée à la réduction du NADP en NADPH, H<sup>+</sup>. La production du NADPH, H<sup>+</sup> peut être suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 340 nm.

## 3) Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (ou de tamisage moléculaire) est une méthode permettant de séparer les macromolécules d'un mélange en fonction de leur taille. Dans le cas de l'amidon, cette méthode est très utile pour séparer l'amylose de l'amylopectine. Pour y parvenir, 2 mg d'amidon sont solubilisés dans 200  $\mu$ l de DMSO 100 % à 99 °C pendant 10 min. L'amidon est alors précipité en ajoutant 800  $\mu$ l d'éthanol 100 %, et culoté par une centrifugation de 10 min à 16000g. Le culot est ensuite resuspendu dans 300  $\mu$ l de soude 10 mM, puis déposé sur une colonne de sépharose CL-2B de 70 cm de hauteur pour 5 mm de diamètre interne. L'étape d'élution est réalisée à un débit constant de soude 10 mM à 12 ml/heure. Une centaine de fraction de 300  $\mu$ l sont récupérées. Pour chacune d'entre-elles, 80  $\mu$ l sont utilisés pour tester la présence des glucanes par colorimétrie, en ajoutant 20  $\mu$ l

d'une solution d'iode (KI 1 % + I<sub>2</sub> 0,1 %). Une lecture au spectrophotomètre permet d'établir la valeur de la  $\lambda_{\max}$  (la longueur d'onde au maximum d'absorption), et d'enregistrer la valeur de l'absorbance à la  $\lambda_{\max}$  de chaque fraction. Les fractions contenant l'amylopectine ou l'amylose sont rassemblées dans deux tubes distincts, et le dosage de leur contenu en glucose permet d'établir le ratio amylose/amylopectine.

#### **4) Chromatographie échangeuse d'anions et distribution en longueur de chaînes.**

Après avoir isolé l'amylopectine par CL-2B, celle-ci (environ 1 mg) est dialysée afin d'éliminer la soude et lyophilisée. La poudre d'amylopectine est alors reprise dans 500  $\mu$ l de tampon d'acétate de sodium à 55 mM et à un pH de 3,5. Ce dernier permet l'activité à 42 °C de l'isoamylase et de la pullulanase que l'on incorpore à raison de 6 et 3 unités respectivement. La réaction de débranchement aura lieu toute une nuit, afin de permettre le débranchement total de l'amylopectine.

Les échantillons sont ensuite chauffés à 99 °C pour dénaturer les enzymes, puis dessalés sur une colonne de charbon graphité et lyophilisés. L'amylopectine débranchée est alors reprise dans 300  $\mu$ l d'eau ultrapure et analysée par chromatographie échangeuse d'anion haute performance à détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD). L'analyse est effectuée sur une colonne CarboPac PA-200 250\*3 mm avec un débit de 0,4 ml/min. L'élution s'effectue par un gradient linéaire de 50 min d'acétate de sodium 0 à 400 mM après un rinçage de 4 min avec 150 mM de soude.

### **IV. Caractérisations morphologiques**

#### **1) Distribution de la taille des grains**

A partir de l'amidon purifié et nettoyé, il est possible d'évaluer la taille des grains de l'échantillon en utilisant le compteur à particule (*Beckman Coulter Counter*) couplé au logiciel *Multisizer 4*. Une petite quantité d'amidon ( $\approx 1 \mu$ g) est déposée dans 10 ml d'électrolyte (*IsoFlow Sheath (Beckman Coulter)*) dans lequel plongent deux électrodes dont l'une est cloisonnée dans un tube percé d'un pore de 20  $\mu$ m. Le logiciel est paramétré de telle sorte qu'il aspire la suspension et qu'il enregistre les différences de potentiels générées par le passage d'un grain à travers le pore. Nous avons choisi d'arrêter la mesure après l'enregistrement de 30000 événements. La différence de potentiel étant proportionnelle à la taille de la particule, il est alors possible d'obtenir la distribution de la taille des grains. Celle-ci est représentée sous la forme d'un histogramme avec en abscisse un intervalle de 15 nm sur une échelle allant de 0,5  $\mu$ m à 5  $\mu$ m de diamètre. Chaque groupe est exprimé en ordonné, par le pourcentage relatif qu'il représente sur la quantité de grains mesurée.

#### **2) Microscopie électronique à balayage**

L'amidon purifié a également pu être observé en microscopie électronique à balayage par le Dr Jean-Luc Putaux et son équipe du CERMAV de Grenoble. Une goutte de l'amidon en suspension est déposée sur une couche de mica (un minéral issu du granite) et laissée sécher. Les grains sont ensuite rendus conducteurs en les enduisant d'or et de palladium (Au/Pd). L'observation est réalisée au moyen d'un microscope FEI Quanta 250 équipé d'un pistolet à

champ d'émission et fonctionnant à 2 kV ; permettant le balayage de la surface des grains par un faisceau d'électron et la détection notamment, des électrons secondaires (donnant des informations sur la topographie de l'échantillon) et rétrodiffusés (donnant des informations sur le contraste de phase), produits au contact de la surface. Les détecteurs permettent ainsi la reconstruction d'une image permettant de visualiser la morphologie des grains d'amidon.

### **3) Microscopie électronique à transmission**

La microscopie électronique à transmission nous a été utile pour visualiser la formation des grains d'amidon au sein de la cellule. Pour obtenir ces clichés, les suspensions cellulaires ont d'abord été fixées dans des tampons de cacodylate (0,1 M, pH 7,2) et de glutaraldéhyde (2,5 % glutaraldéhyde + 97,5 % tampon cacodylate (v/v)). Les cellules en cultures ont été culottées par une centrifugation à 3000 g pendant 5 min. Le culot est délicatement repris dans 1 ml de tampon glutaraldéhyde, dans lequel les cellules vont incubé pendant 2 heures à température ambiante. La suspension est centrifugée à 13000 g pendant 15 min pour remplacer le tampon glutaraldéhyde par 1 ml de tampon cacodylate. Les cellules sont rincées 4 fois dans du tampon cacodylate via des centrifugations de 5 min à 13000 g puis conditionnées à 4 °C.

Les étapes suivantes ont été réalisées au CERMAV de Grenoble. Les cellules subissent une post-fixation au tétraoxyde d'osmium ( $OsO_4$ ), avant l'inclusion en résine (EPON). Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome (Leica UC6) avec un couteau diamant, permettant d'obtenir des coupes ultrafines de 70 nm d'épaisseur. Ces coupes ont ensuite été colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb (un contrastant marquant principalement les ribosomes, l'appareil de golgi, et les lipides), puis recueillies sur des grilles de cuivre revêtues de carbone. L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (FEI Philips CM200) à 200 kV, et les clichés ont été pris par une caméra (TVIPS TemCam F216).

## **V. Analyse de coségrégation**

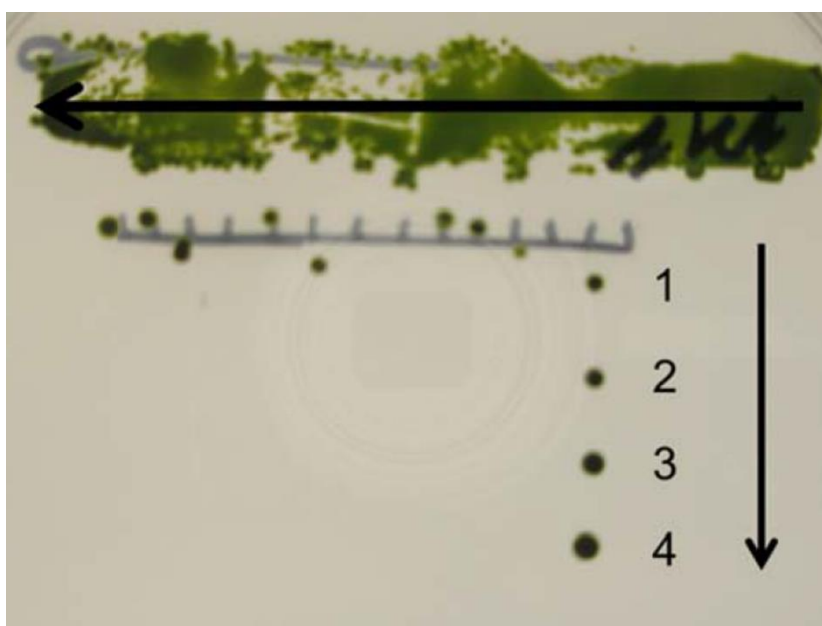
Après l'identification par TAIL-PCR du gène interrompu au locus *Cre02.g091750* par la cassette d'insertion *Aph VIII* chez le mutant *bsg1*, notre objectif était de vérifier que le gène muté était bien responsable des phénotypes « amidon » observés. Une première approche a consisté à caractériser les phénotypes des ségrégeants méiotiques issus du croisement de la souche mutante et d'une souche sauvage de polarité sexuelle opposée : 37c1.

### **1) Gamétogenèse**

Après avoir amplifié les souches mutante (*bsg1*) et sauvage (37c1) sur des boîtes de milieu HSA riche, les cellules sont mises en suspension dans des tubes distincts contenant 1 ml de TAP-N pendant une nuit et sous exposition à la lumière, de façon à ce que le stress lié à la carence induise la gamétogenèse. Les deux souches sont ensuite rassemblées et incubées deux à trois heures de plus de façon à laisser le temps aux partenaires de fusionner. Les cellules sont ensuite déposées sous la forme de plages cellulaires de 200  $\mu$ l sur des boîtes de milieu HSA riche avec 4 % d'agarose, permettant aux zygotes de s'enkyster dans la gélose. Une fois que les plages cellulaires ont suffisamment séchées, les boîtes sont emballées dans de l'aluminium et incubées à l'obscurité pendant une dizaine de jours.

## 2) Dissection des tétrades

Au terme de la période d'incubation, les cellules parentales à la surface de la gélose sont éliminées à l'aide d'un scalpel, en conditions stériles. Cette étape permet de retirer la majorité des cellules végétatives. Les boîtes sont ensuite exposées brièvement ( $\approx 30$  s) à des vapeurs de chloroforme de façon à éliminer les cellules végétatives restantes. Les zygotes étant enkystés dans la gélose et protégés par une paroi particulièrement résistante, survivent aux traitements infligés. La région de la plage cellulaire ainsi éclaircie est découpée au scalpel de façon à isoler les zygotes des cellules végétatives restantes. Ce morceau de gélose est transféré dans une autre boîte de milieu HSA riche standard, et trainé sur la gélose de façon à étaler les cellules enkystées sur un axe de la nouvelle boîte. Cette dernière est ensuite laissée en chambre de culture exposée à la lumière pendant 24 à 48 heures, période permettant la germination des zygotes. Les zygotes ayant germés, se sont divisés par méiose et forment des tétrades pouvant être repérés sous loupe binoculaire. Ils sont isolés des autres cellules suivant un axe parallèle au premier. L'objectif étant de séparer les ségrégeants méiotiques, la paroi de la tétrade est disloquée à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée et étirée. Les quatre cellules peuvent ainsi être séparées et isolées à leur tour, le long d'un axe perpendiculaire aux deux autres (Fig. 27). Les boîtes sont incubées en chambre de culture le temps que les ségrégeants méiotiques se divisent et forment des colonies qui pourront être repiquées et amplifiées avant les analyses.



**Figure 27 : Dissection de tétrades.** Après avoir éliminé les cellules végétatives, le morceau de gélose contenant les zygotes enkystés est trainé le long d'un axe sur une nouvelle boîte de milieu riche comme représenté par la flèche horizontale. Après une incubation en chambre de culture de 24 à 48 heures permettant la méiose, les tétrades sont repérées sous loupe binoculaire et isolées le long d'un axe parallèle au premier (axe gradué). La paroi des tétrades est brisée à l'aide d'une pipette pasteur effilée, et les ségrégeants méiotiques sont séparés les uns des autres selon un axe perpendiculaire aux deux premiers. Après une incubation dans les conditions standards de la chambre de culture, les ségrégeants forment des colonies bien visibles (identifiés de 1 à 4).

Une fois que les cellules ont été amplifiées, on procède à une vérification des tétrades en analysant la distribution des caractères parentaux. On teste ainsi les auxotrophies des souches parentales en analysant la croissance des cellules sur les boîtes de milieux adaptés ; ainsi que la polarité sexuelle par PCR en utilisant deux couples d'amorces spécifiques de chaque polarité et l'ADNg des descendants. Les « tétrades » n'affichant pas une distribution 2 : 2 de ces caractères sont écartées, tandis que les vraies tétrades sont mises en culture pour caractériser leur phénotype amidon.

## **VI. Caractérisations enzymatiques**

Les modifications de la quantité ou de la structure des amidons produits par les différentes souches mutantes de *C. reinhardtii* sont souvent liés à des altérations d'activités enzymatiques dont certaines peuvent être visualisées sur des gels d'activité (ou zymogrammes).

### **1) Préparation des extraits protéiques**

Les extraits bruts proviennent de cultures de 50 ml de *C. reinhardtii* en TAP+N et en fin de phase exponentielle de croissance. Les cellules sont concentrées par 5 min de centrifugation à 3000g et à 4 °C, et le culot est repris dans 500 µl d'eau ultrapure. La lyse cellulaire est réalisée par 30 secondes de sonication à 4 °C. Les lysats sont conservés sous forme d'aliquots à -80 °C.

### **2) Dosage des protéines**

Les lysats sont décongelés et centrifugés pendant 5 min à 16000 g et à 4 °C, de façon à se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant est récupéré pour doser les protéines via la méthode de Bradford (*Biorad protein assay*). La première étape est de réaliser trois dilutions (1/500<sup>e</sup>, 1/1000<sup>e</sup>, 1/2000<sup>e</sup>) à partir de l'extrait brut dans un volume de 800 µl. 200 µl de réactif Biorad sont ajoutés aux dilutions, permettant par mesure de l'absorbance à 595 nm d'établir la concentration protéique de chaque dilution en se rapportant à une courbe étalon, préalablement réalisée avec des concentrations de sérum albumine bovine (BSA) allant de 0 à 20 mg/ml.

### **3) Préparation des extraits de protéines**

Avant de déposer les protéines sur les gels, l'échantillon protéique doit être préparé en fonction des conditions de l'électrophorèse. En effet, la migration peut avoir lieu en conditions natives ou en conditions dénaturantes. En conditions natives, le surnageant obtenu après centrifugation peut être directement déposé après l'ajout d'un tampon de chargement (LB 10x) contenant un mélange de glycérol (20 %), de bleu de bromophénol (0,001 %) et de Tris-glycine (40 mM à pH 8,3). Pour les gels en conditions dénaturantes, les protéines doivent au préalable être dénaturées en les chauffant à 99 °C pendant 5 min en présence de 5 % de β-mercaptoéthanol et 2 % de dodécylsulfate de sodium (SDS).

### **4) Préparation des gels**

Le gel dans lequel les protéines sont séparées par électrophorèse est constitué de deux parties, un gel de séparation surplombé d'un gel de concentration. Le gel de séparation est

composé de polyacrylamide à 8 %, contre 4 % pour le gel de concentration (p/v), et sont tamponnés respectivement par du Tris/HCl 375 mM à pH 8,8 et du Tris/HCl 125 mM à pH 6,8. La migration s'effectue dans un tampon Tris/glycine (25 mM et 192 mM respectivement) auquel on ajoute 1 mM de DTT, à 150 V jusqu'à ce que le front de migration arrive en bas du gel ( $\approx$  1h30). En conditions dénaturantes 0,1 % de SDS sont incorporés à la préparation des gels et du tampon de migration. En conditions natives les gels sont maintenus à 4 °C pendant toute la durée de l'électrophorèse.

### **5) Zymogramme révélant les activités hydrolytiques**

L'objectif de ces gels est de révéler l'activité des enzymes capables d'hydrolyser l'amidon. Il faut donc lors de l'élaboration des gels, incorporer le substrat dans la préparation. Au laboratoire nous utilisons de l'amidon de pomme de terre à une concentration finale de 0,3 %. La migration est effectuée en conditions dénaturantes, puisque les protéines de *C. reinhardtii* peuvent retrouver leur activité en éliminant le SDS par une série de rinçages (4 rinçages de 30 min) dans du Tris 40 mM à l'issue de la migration. Le gel est ensuite incubé une nuit dans un tampon composé de Tris/Glycine (25 mM, pH 8,3) contenant 20 mM de DTT. Le gel est ensuite rincé à l'eau ultrapure, et les activités sont révélées avec une solution d'iode (KI 1 % + I<sub>2</sub> 0,1 %).

### **6) Zymogramme révélant les activités phosphorylases**

Pour ce type de gel, le substrat incorporé est du glycogène de foie de lapin à une concentration finale de 0,3 %. Comme précédemment la migration est effectuée en conditions dénaturantes. Le gel est rincé 30 min dans une solution de Tris 40 mM contenant 20 mM de pyridoxal phosphate, puis 3 fois 30 min dans du Tris 40 mM. Le tampon d'incubation permettant l'activité des phosphorylases est un tampon citrate 100 mM à pH 7 contenant 20 mM de G1P, dans lequel le gel reste une nuit après un rinçage de 10 min dans le tampon citrate sans G1P. Le gel est rincé à l'eau ultrapure et les activités d'élongation de chaînes sont révélées avec une solution d'iode (KI 1 % + I<sub>2</sub> 0,1 %).

### **7) Zymogramme révélant les activités synthèses**

Ces gels contiennent également du glycogène de foie de lapin comme substrat (0,3 %). Les différences avec le zymogramme des activités phosphorylases résident dans les tampons utilisés après la migration. En effet, les gels sont d'abord rincés 4X30 min dans du tampon Tris 40 mM, puis incubés une nuit dans un « mix synthèse » composé de glycyglycine (50 mM pH 9), de sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100 mM, de  $\beta$ -mercaptoéthanol 5 mM, de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) 5 mM, de BSA 0,5 mg/ml, et d'1 mM d'ADP-glucose. Le gel est ensuite rincé à l'eau et coloré à l'iode (KI 1 % + I<sub>2</sub> 0,1 %).

### **8) Gels SDS-PAGE**

Il est également possible d'utiliser les gels sans substrat pour séparer les protéines d'un échantillon en fonction de leur taille. Il s'agit de gels dénaturants que j'ai pu utiliser pour visualiser les protéines associées aux grains d'amidon. Dans ce cas 500  $\mu$ g d'amidon purifié est repris dans 100  $\mu$ l d'une solution de SDS 2 % contenant 50 mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol, et la suspension est chauffée à 99 °C pendant 10 min. Le surnageant est récupéré après une

centrifugation de 10 min à 10000 g, et déposé sur gel avec du tampon de charge LB 10x. La migration est effectuée en conditions dénaturantes, puis le gel est rincé dans de l'eau ultrapure avant d'être coloré au bleu de Coomassie (*InstantBlue* Sigma-Aldrich, USA).

## VII. Caractérisations moléculaires

### 1) Extraction de l'ADN génomique

Les cellules d'une préculture de *C. reinhardtii* en fin de phase exponentielle sont culottées par 5 min de centrifugation à 3000 g et à 4 C, et concentrées en reprenant le culot dans 250 µl d'eau ultrapure. Les cellules sont lysées par l'ajout d'un volume équivalent de tampon de lyse composé de Tris/HCl (200 mM, pH 8), d'EDTA (3,5 mM), et de SDS (6 % p/v) auquel est ajouté 3 µl de protéinase K (20 mg/ml), pendant 15 min à température ambiante. 80 µl d'une solution NaCl 5 M sont ajoutés au lysat et le mélange est homogénéisé. 70 µl de CTAB (10 %)/NaCl (0,7 M) sont également incorporés à la préparation. La mixture est homogénéisée, et incubée 10 min à 65 °C. Au terme de cette incubation, un volume équivalent (653 µl) d'une solution de chloroforme et d'alcool isoamylique (24 : 1) est ajouté. Après homogénéisation et une centrifugation de 5 min à 16000 g, on obtient une séparation du mélange en deux phases, séparées par une galette de protéines. La phase supérieure (aqueuse) est récupérée. L'étape de centrifugation après l'ajout de la solution chloroforme/alcool isoamylique est répétée autant de fois que nécessaire jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse limpide. L'ADN est précipité par l'ajout d'1 ml d'isopropanol et une homogénéisation délicate. L'ADN peut alors être culotté par une centrifugation de 10 min à 10000 g, puis rincé à l'éthanol 70 % avant d'être repris dans 100 µl d'eau. La concentration et la pureté de l'ADN peut enfin être évaluée au moyen d'un Nanodrop (*Labtech International Ltd.*, East Sussex, UK).

### 2) Réaction de polymérisation en chaîne

Deux principales enzymes ont été utilisées pour les réactions d'amplification par PCR. La polymérase EXT (*DyNAzyme EXT DNA Polymerase*, Thermo Fisher Scientific, USA) utile pour l'amplification des gènes destinés à l'expression chez *C. reinhardtii*, puisque l'enzyme est optimisée pour les séquences longues et riches en GC. D'ailleurs, les réactions sont réalisées en présence de 5 % de DMSO et en suivant les recommandations du fournisseur. L'autre enzyme, davantage utilisée pour le génotypage est la Gotaq (*GoTaq DNA Polymerase*, Promega, USA). Là encore, les réactions ont été réalisées en suivant les recommandations du fournisseur et en présence de 5 % de DMSO. Les cycles d'amplification ont été réalisés à l'aide d'un dispositif Mastercycler (*Mastercycler Gradient*, eppendorf, Allemagne). La liste des amorces utilisées pour les amplifications PCR et de RT-PCR, figure dans le tableau 4.

### 3) Extraction des ARN

L'extraction des ARN a été effectuée à l'aide d'un réactif au trizol (*TRizol Reagent*, Thermo Fisher Scientific, USA), permettant la lyse cellulaire et l'extraction des ARN, couplée à l'utilisation de tubes Phasemaker (*Invitrogen Phasemaker Tubes*, Thermo Fisher Scientific, USA), et en suivant les recommandations du fournisseur. Les cultures de *C. reinhardtii* sont arrêtées en phase exponentielle de croissance. A la fin de l'extraction les ARN sont repris dans



de l'eau DEPC fraîche, et les ARN sont dosés au Nanodrop (*Labtech International Ltd.*, East Sussex, UK).

Locus	Nom de l'amorce	Séquence	Taille (en pb)	T (°C)	Exp
<b>Cre02.g091950</b>	091950F	CCATTCCACTCTTCGCGTAGATC	700	55	G
	091950R	CATGACGGCCTCCGGGTCAATGTCC			
<b>Cre02.g091900</b>	091900F	GTCGCATTAGTCCGTCACGAC	640	60	G
	091900R	CGCTCTCAGCCGCAAGGCCTC			
<b>Cre02.g091850</b>	091850F	ACGGCGGTACCTGACATTAG	922	58	G
	091850R	TGGGCAATCCAAACTGTGTA			
<b>Cre02.g091750</b>	091750F1	CCAGGGCACAGCCTGAACATGC	995	53	G
	091750R1	CCACCTTCTGTAGGAGTCATC			
	091750F2	GATGACTCCTACAAGAAGGTGG	912	53	G
	091750R2	GATGTGAGCAACGCGCGCATG			
	091750F3	AAAGACCAGCTGTGACAGCATGC	1048	60	G
	091750R3	GCATGAACTCTGTCGGCGTGAG			
	091750F4	CTCACGCCGACAGAGTTCATGC	804	60	G
	091750R4	ACCTCCACAGCCGAGGATCTG			
	091750F5	TATCACATTGAACAGATCCTGC	926	50	G
	091750R5	GCTTGACTAGTCTTACATAC			
	BSGF	CCGGGCGATGTTGACTCGGACAGC	1078	62	G
	BSGR	ACAACCTTCTGCCTGAGGCCTATCC			
	EcoRVFor	<u>GATATCAT</u> GGGAGCCTGCCGGGTAGGTCG	3745	60	C
	EcoRVRev	<u>GATATCTT</u> ATTGCGCCTTCTCTGTGATGC			
	RTF	GCAACTCTTCTGATGATGCTGGCGC	940	60	R
	RTR	TATGCCACCACGCGGTTG			
<b>PHOB</b>	PhoBF	GCATGTTCCGCCAGACCA	736	60	R
	PhoBR	TGCAGGAAGCGCCAGTTGA			
<b>Cre02.g091700</b>	091700F	GGCACCACAAATGCTAACC	849	55	G
	091700R	GCGGCTTGAAATCTTCTGG			

**Tableau 4** : Liste des amorces utilisées pour les amplifications par PCR et RT-PCR. T = Température d'hybridation. Exp = Type d'expériences (G pour le génotypage, R pour les RT-PCR, et C pour le clonage en vecteur d'expression). Les séquences soulignées correspondent aux sites de restriction.

#### 4) Reverse Transcription PCR

Les RT-PCR ont été réalisées à partir d'1 µg d'ARN fraîchement extraits et à l'aide du kit « *One-step RT-PCR* » de Qiagen (Allemagne), permettant la transcription inverse des ARN cibles en ADNc, et leur amplification par PCR dans le même tube. La préparation a été réalisée selon les recommandations du fournisseur, et en présence de solution Q. La liste des amorces utilisées pour les RT-PCR figure dans le tableau 4 et les cycles d'amplification ont été réalisés avec le Mastercycler (*Mastercycler Gradient*, eppendorf, Allemagne).

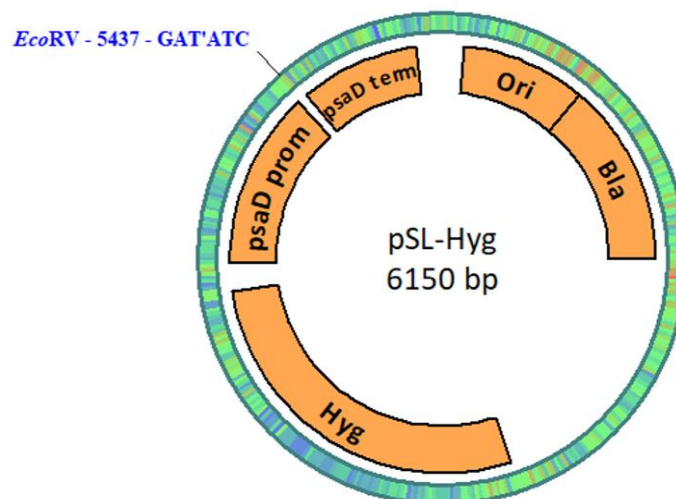
### VIII. Complémentation fonctionnelle

Une étape indispensable à l'identification de la fonction d'un gène est la complémentation fonctionnelle. Cette méthode consiste à réintroduire dans la souche

mutante dont le gène d'intérêt est muté ou absent, une copie fonctionnelle de ce dernier. L'expression de cette copie du gène permettra alors le retour de la souche mutante à un phénotype proche de celui de la souche sauvage. Pour parvenir à ce résultat plusieurs étapes sont nécessaires. La première repose sur la construction du vecteur qui permettra l'expression du gène.

## 1) Construction du vecteur de complémentation

Le vecteur utilisé pour mes travaux est le vecteur pSLhyg. Celui-ci est dérivé du vecteur pSL18 qui porte une origine de répllication et un gène de résistance à l'ampicilline permettant respectivement, son amplification dans la bactérie *E. coli*, et la sélection des transformants bactériens. Le vecteur porte également de part et d'autre d'un site de clonage, le promoteur et le terminateur du gène *PSAD* (une protéine chloroplastique abondante chez *C. reinhardtii*) permettant la bonne expression du gène associé dans le noyau de l'algue (Fischer et Rochaix, 2001). Dans ce vecteur, la cassette de résistance à la paromomycine du vecteur pSL18 a été remplacée par un gène de résistance à l'hygromycine (Fig. 28).



**Figure 28 : Carte du vecteur pSLhyg.** Le vecteur porte le promoteur et le terminateur du gène *PSAD*, une origine de répllication (*Ori*), et deux gènes de résistance à l'ampicilline (*Bla*) et à l'hygromycine (*Hyg*). Le site de restriction de l'enzyme *EcoRV* représenté en bleu indique le site de restriction qui a été utilisé afin d'introduire le gène d'intérêt.

Le gène interrompu du mutant *bsg1*, a été identifié par TAIL-PCR au locus *Cre02.g091750*. En utilisant des amorces (*EcoRVFor* et *EcoRVRev*) capables de s'hybrider avec les régions en amont et en aval du gène et portant le site de restriction de l'enzyme *EcoRV*, il a été possible dans un premier temps d'amplifier le gène *BSG1* à partir de l'ADNg de la souche sauvage 137C. Après vérification de la séquence de cet amplifiat, ce dernier a été introduit dans le vecteur pSLHyg via l'utilisation du site *EcoRV* donnant naissance au vecteur de complémentation.

## 2) Ligation

La ligation permettant l'insertion du gène *BSG1* dans le vecteur d'expression pSLhyg, est réalisée en rassemblant dans un volume final de 10  $\mu$ l, le vecteur linéarisé, le gène amplifié

par PCR, 40 unités de T4 DNA ligase (NEB, USA) et son tampon. Plusieurs conditions sont testées en faisant varier le ratio ADN plasmidique/insert en fonction de leurs tailles. La réaction de ligation a lieu à 4 °C pendant une nuit. L'enzyme est ensuite inactivée à 70 °C pendant 10 min.

### 3) Amplification et vérification du vecteur d'expression

Avant de pouvoir utiliser le vecteur pour transformer *C. reinhardtii*, celui-ci a été amplifié et vérifié. Pour y parvenir le vecteur est introduit dans la bactérie *E. coli* de façon à le multiplier, en utilisant la faculté de la bactérie à répliquer les plasmides. Plusieurs méthodes permettent d'introduire le vecteur dans la bactérie comme l'électroporation, ou le choc thermique. Cette dernière est la méthode que nous utilisons en routine au laboratoire. Elle nécessite cependant une préparation des bactéries pour les rendre compétentes.

#### a) Préparation des bactéries thermocompétentes.

Des bactéries TOP10 (*One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli*, Thermo Fisher Scientific, USA) sont utilisées pour ensemercer une préculture de 3 ml de LB standard une nuit à 30 °C. Le lendemain, la préculture est utilisée pour inoculer 200 ml de Psi Broth (Tableau 5) dans un erlen de 1 litre. Ce dernier est placé sous agitation à 30 °C pendant 2 à 3 heures, temps nécessaire pour que les bactéries soient en phase exponentielle de croissance et que l'absorbance à 550 nm atteigne 0,5. Les cellules sont centrifugées 5 min à 4000 g et à 4 °C, température à laquelle les cellules seront désormais maintenues. Le culot bactérien est rincé dans 10 ml de tampon TFB1, puis le tampon est remplacé par une nouvelle centrifugation par 8 ml de tampon TFB2, puis dans 5 ml de TFB2. La suspension est alors séparée en aliquots de 50 µl qui sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

Milieu	Composition pour 1 litre	pH
PSI Broth	Extrait de levure 5 g Bactotryptone 20 g Sulfate de magnésium 5 g	7,6 (Hydroxyde de potassium)
TFB1	Acétate de potassium 30 mM Chlorure de rubidium 100 mM Chlorure de calcium 10 mM Chlorure de manganèse 50 mM Glycérol 15 % (v/v)	5,8 (acide acétique)
TFB2	MOPS 10 mM Chlorure de rubidium 10 mM Chlorure de calcium 75 mM Glycérol 15 % (v/v)	6,5 (Soude)

**Tableau 5** : Composition des milieux utilisés pour la préparation des bactéries thermocompétentes. Les milieux TFB1 et TFB2 sont stérilisés par filtration.

#### b) Transformation bactérienne

Deux µl du mélange de ligation sont déposés en conditions stériles dans 50 µl de TOP10 thermocompétentes, après leur décongélation sur la glace. Une période d'incubation de 15 min à 4 °C est respectée, avant de passer au choc thermique par une incubation rapide à

42 °C pendant 40 secondes. Les cellules sont redéposées dans la glace immédiatement, et 900 µl de milieu LB sont ajoutés en conditions stériles. Le mélange est transféré dans des falcons de 15 ml et mis sous agitation à 37 °C pendant 1 heure pour permettre aux cellules de se régénérer. Elles sont ensuite étalées sur des boîtes de LB contenant l'antibiotique permettant la sélection des transformants. Dans notre cas, il s'agit de l'ampicilline qui est concentrée à 100 µg/ml sur les boîtes. Les boîtes sont enfin incubées une nuit à 37°C pour permettre aux transformants résistants de former des colonies.

Les colonies obtenues sont mises en culture dans du milieu LB contenant l'antibiotique (100 µg/ml) pour maintenir la pression de sélection, pendant une nuit supplémentaire. Ces cultures nous permettront d'en extraire les plasmides à l'aide du kit d'extraction « *NucleoSpin Plasmid EasyPure* » (Macherey-Nagel, Allemagne) en suivant les recommandations du fournisseur. Les plasmides purifiés pourront être testés pour discriminer le plasmide souhaité par digestion enzymatique avec les enzymes de restrictions choisies. Ils seront également envoyés en séquençage pour valider l'intégrité de notre vecteur de complémentation.

#### **4) Transformation de *Chlamydomonas reinhardtii***

Une fois que le vecteur est validé, la transformation de l'algue peut commencer.

##### **a) Préparation de l'autolysine**

Le premier obstacle à la transformation de *C. reinhardtii* est purement mécanique, puisque la paroi cellulaire ne permet pas l'introduction du vecteur de complémentation dans la cellule. Pour l'éliminer, il est possible d'utiliser l'autolysine produite par l'algue lors de l'initiation de la reproduction sexuée. En effet, la production d'autolysine peut être induite en mettant des cellules de polarités sexuelles opposées (137C et CC125) dans un milieu carencé (20 ml de TAP-N). Dans ces conditions, 16 heures d'incubation permettent l'initiation de la gamétogenèse. Les cellules des deux polarités sont alors mises en contact, et incubées 2 heures à l'obscurité pour empêcher la fusion des gamètes et améliorer le rendement. L'autolysine sécrétée est récupérée en éliminant les cellules par centrifugation (10 min à 4000 g et à 4 °C) et stérilisée en filtrant le surnageant à travers un filtre de 0,22 µm. L'autolysine peut être stockée à -80 °C pour une utilisation ultérieure.

##### **b) Test de l'autolysine**

Un contrôle de la qualité de l'autolysine récupérée peut être effectué assez simplement en ajoutant 250 µl d'autolysine à 250 µl d'une suspension d'une souche de *C. reinhardtii* possédant une paroi telle que la référence sauvage 137C. Un témoin est réalisé en parallèle en ajoutant 250 µl d'eau à 250 µl de la même suspension. Après une heure d'incubation à température ambiante et à la lumière, on centrifuge les cellules 1 min à 13000 g pour remplacer le surnageant par 200 µl de triton X100 à 0,5 %. Ce détergent n'est capable de lyser les cellules que si leur paroi est dégradée. Une nouvelle centrifugation permet alors de constater la lyse des cellules ayant été en contact avec l'autolysine.

##### **c) Transformation nucléaire de *C. reinhardtii***

Dans un premier temps les précultures des souches à transformer sont récupérées en fin de phase exponentielle de croissance. Les cellules sont centrifugées 5 min à 3000 g, pour

remplacer le milieu de culture par 25 ml d'autolysine en conditions stériles. Les cellules sont remises en suspension et incubées 90 min en chambre de culture à la lumière de façon à laisser le temps à l'autolysine de dégrader les parois cellulaires. Un test d'absence de paroi est effectué en prélevant une fraction de la culture qui est mise en contact avec un volume équivalent de Triton X100.

Après le traitement à l'autolysine cette dernière est éliminée par centrifugation à 3000 g pendant 5 min, le culot cellulaire est repris dans le milieu TAP+N. La transformation est réalisée par la méthode des billes de verres décrite par Kindle (1990). 300 µl de la suspension cellulaire sont déposés dans des tubes stériles contenant 250 mg de billes de verre (de 400 µm de diamètre). Un microgramme de plasmide préalablement linéarisé, est ajouté aux cellules. Le mélange est vortexé pendant 15 s, avant l'ajout de 600 µl de TAP+N. Le mélange est étalé sur une boîte de milieu HSA riche gélosé (1,2 %) contenant 20 µg/ml d'hygromycine. Cet antibiotique étant sensible à la lumière, les boîtes de Pétri sont placées en chambre de culture sous lumière atténuée. L'incubation se poursuit jusqu'à disparition des cellules non transformées et la formation de colonies issues de transformants résistants. Une transformation témoin est réalisée à l'aide du plasmide pSL-hyg seul afin d'obtenir des transformants résistants mais non complémentants.

---

## RESULTATS

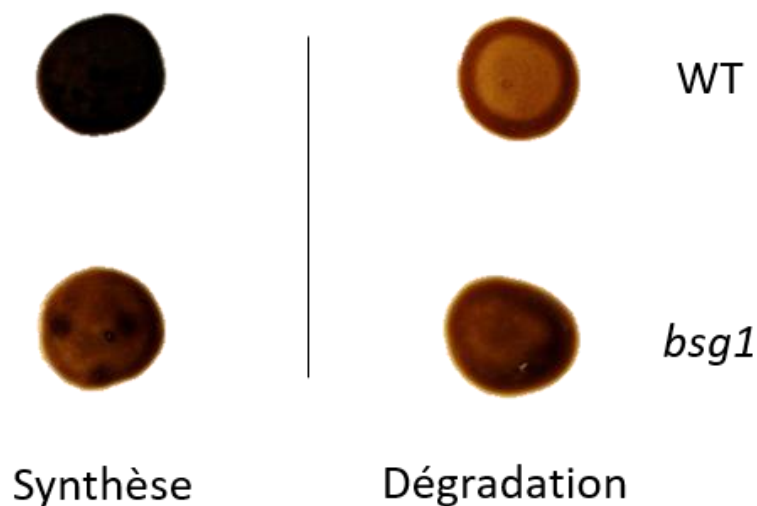
---

### I. Caractérisation phénotypique du mutant *bsg1*

#### 1) Identification du mutant par le crible à l'iode

Les travaux réalisés par l'équipe avant mon arrivée au laboratoire ont permis la construction d'une banque de mutants d'insertion à partir de la souche sauvage 137C. Une partie de ces mutants a été obtenue par l'insertion d'une cassette de résistance à la paromomycine dans le génome de *C. reinhardtii*. L'objectif étant alors d'approfondir nos connaissances de la voie catabolique de l'amidon, l'ensemble de ces mutants a été analysé à travers un crible à l'iode en deux étapes. Parmi les 32000 transformants de la banque, 62 ont ainsi pu être identifiés comme étant des mutants déficients dans la dégradation de leur amidon. Parmi eux, certains mutants étaient interrompus sur des gènes déjà connus et identifiés comme étant impliqués dans le catabolisme de d'amidon, comme les mutants *bam1* et *dpe2*, permettant ainsi de valider l'approche expérimentale.

Le mutant *bsg1*, sur lequel repose mon travail de thèse, est l'un des mutants de cette banque. Bien qu'après une période de 5 jours d'accumulation massive d'amidon, les vapeurs d'iode colorent ce mutant avec une teinte plus claire que la souche sauvage, la coloration affichée par ce mutant reste identique après une phase de dégradation de 24 heures. A l'inverse la souche sauvage, qui apparaît plus foncée après les 5 jours de synthèse d'amidon, perd son interaction à l'iode au terme de la journée de dégradation (Fig. 29).



**Figure 29 : Crible à l'iode en deux étapes du mutant *bsg1*.** Les plages cellulaires ont été obtenues en suivant les étapes décrites dans le « matériels et méthodes ». La partie gauche montre les plages cellulaires après 5 jours d'accumulation massive d'amidon et coloration aux vapeurs d'iode. La partie de droite, montre la coloration des mêmes souches après 5 jours d'accumulation et 24 heures de dégradation.

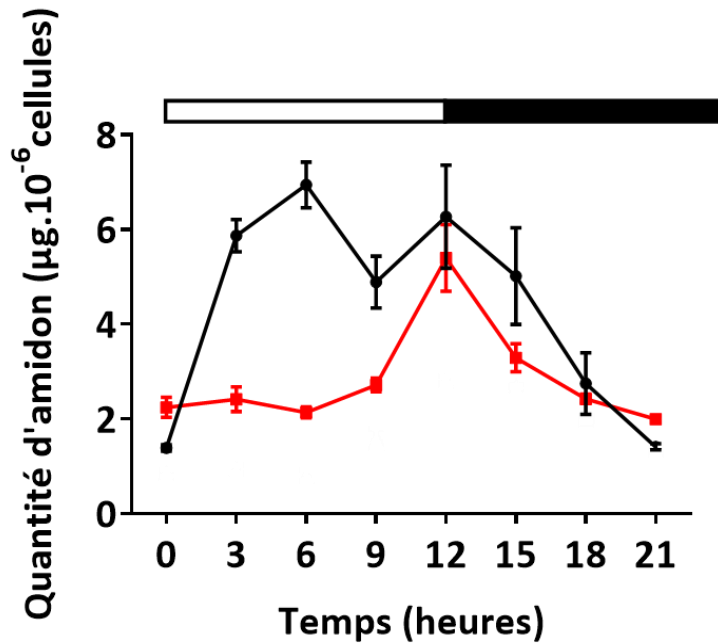
## 2) Quantification de l'amidon

Les phénotypes décrits par le crible à l'iode ont pu être confirmés par des dosages enzymatiques. Les dosages de l'amidon effectués à partir des cultures de 5 jours en milieu carencé en azote, et rapportés au nombre de cellules indiquent effectivement, que le mutant accumule nettement moins d'amidon que la souche sauvage, sur la même échelle de temps. D'ailleurs le même résultat est obtenu à partir de cultures en conditions mixotrophiques (c'est-à-dire en lumière continue et en présence d'acétate). Dans les deux cas, la différence est statistiquement significative (Tableau 6). De la même façon, quand les cellules sont synchronisées en milieu minimum (MM) et soumises à un cycle diurne (12 h-12 h), les cellules mutantes accumulent moins d'amidon que la souche sauvage, peu importe le moment de la cinétique (Tableau 6, Fig. 30). Ce résultat concorde avec la teinte plus claire arborée par les plages cellulaires du mutant en comparaison à celles de la souche sauvage sur les boîtes de criblage.

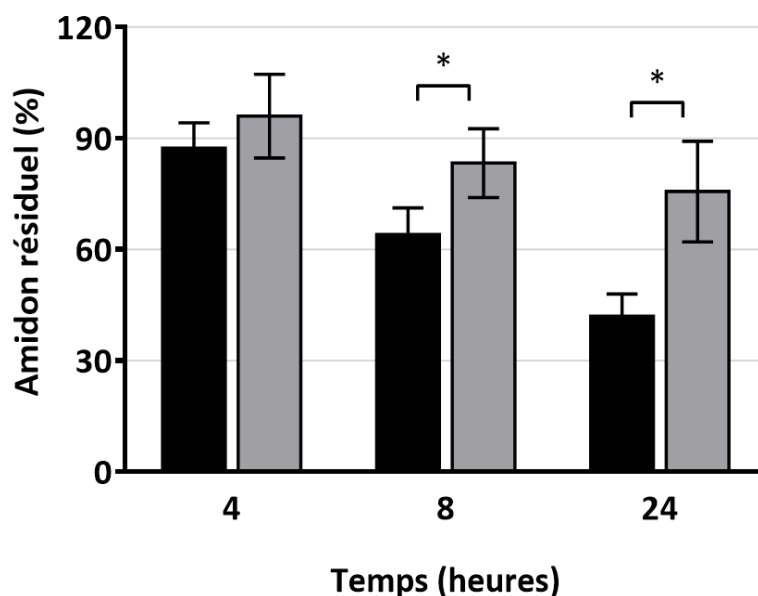
Conditions de croissance	137C	<i>bsg1</i>
TAP+N	2,47 ± 0,27	1,72 ± 0,16***
TAP-N	60,70 ± 2,55	27,40 ± 2,65***
MM	6,27 ± 1,09	5,40 ± 0,70

**Tableau 6 : Dosage de l'amidon.** La quantité d'amidon des souches sauvage (137C) et mutante (*bsg1*) a été mesurée, soit en condition mixotrophique (TAP+N, en lumière continue et en présence d'acétate), soit après 5 jours en condition carencée en azote (TAP-N) et en lumière continue, soit en conditions photo-autotrophiques (MM, CO<sub>2</sub> (2 %), et en cycle jour/nuit (12 h/12 h)). Les résultats sont donnés en µg d'amidon par million de cellules, sous la forme moyenne ± écart-type de trois réplicats biologiques (TAP+N et TAP-N) ou de trois réplicats techniques (MM). En conditions photo-autotrophiques, les dosages ont été effectués en fin de jour. \*\*\* P<0,0001 selon le test de Student.

D'un autre côté, le maintien de la coloration de la souche mutante même après la phase de dégradation de l'amidon, a pu être corrélée par des cinétiques de dégradation montrant une réduction du taux de dégradation de l'amidon chez le mutant *bsg1*. Le taux de dégradation du mutant, exprimé en µg d'amidon dégradé par million de cellules et par heure, est de 0,29 ± 0,14 contre 1,47 ± 0,10 pour la souche sauvage. Soit un taux de dégradation cinq fois inférieur chez le mutant. Les cinétiques de dégradation ont été réalisées à partir de cellules cultivées 5 jours en carence azotée (TAP-N et lumière continue), et transférées à l'obscurité dans un milieu TMP (sans acétate) permettant de lever la carence. De cette façon les cellules sont contraintes d'utiliser les réserves de polysaccharide qu'elles ont accumulé. Les dosages ont été effectués 4, 8 et 24 heures après le transfert en milieu TMP. Après 24 heures de cinétique, la différence des taux de dégradation entre les deux souches conduit à la dégradation de 59 ± 4 % de la quantité initiale d'amidon de la souche sauvage, contre seulement 29 ± 7 % pour le mutant (Fig. 31).



**Figure 30** : Evolution de la quantité d'amidon en cycle jour/nuit. Les cultures synchronisées des souches sauvage (en noir) et *bsg1* (en rouge), sont soumises à un cycle jour/nuit (12 h/12 h) en conditions photo-autotrophes (MM, CO<sub>2</sub> (2 %)) pendant 4 jours. Les cellules sont alors collectées et l'amidon est dosé toutes les 3 heures. Trois réplicats techniques ont été réalisés, permettant de donner des moyennes  $\pm$  écart-types exprimés en  $\mu\text{g}$  d'amidon par million de cellules. La barre horizontale noire, indique la période d'obscurité.

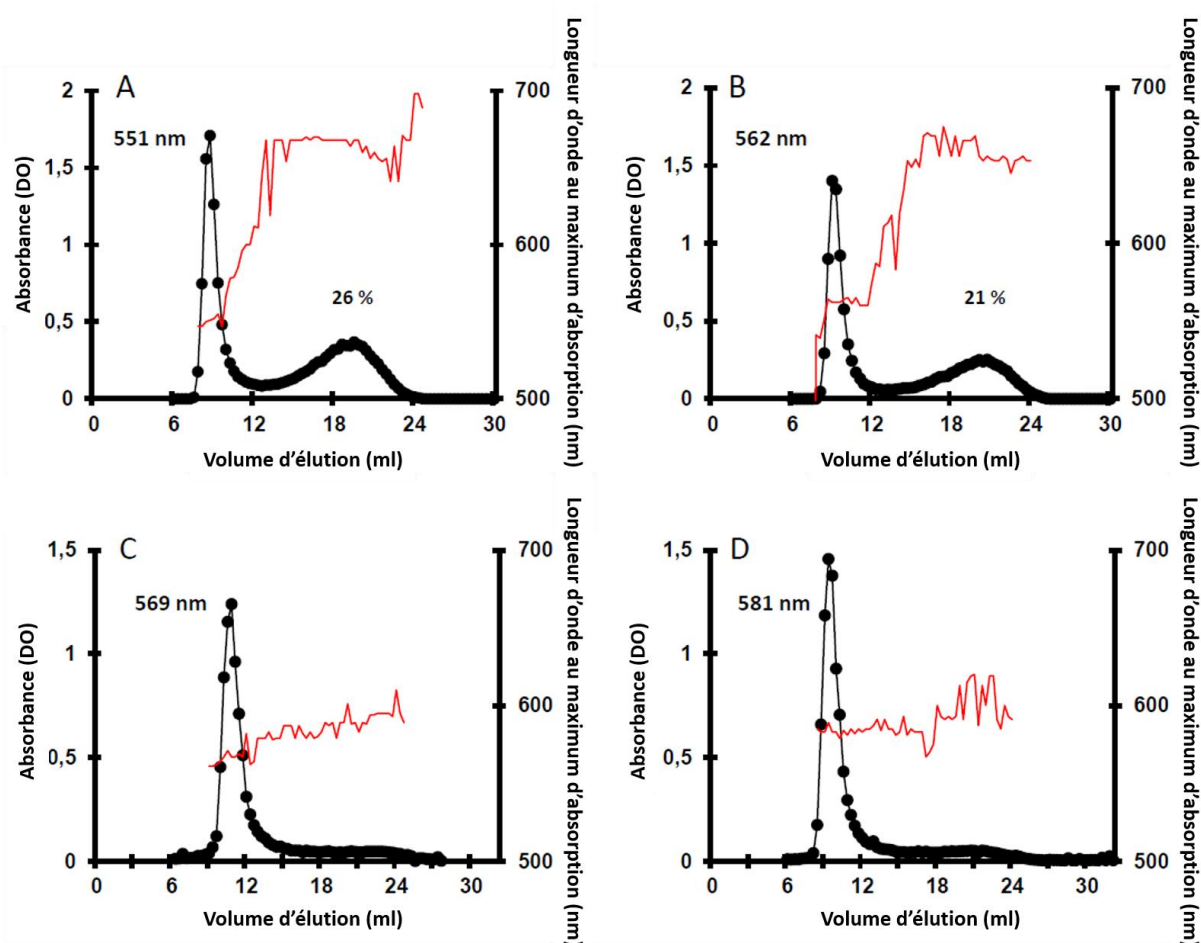


**Figure 31** : Cinétique de dégradation de l'amidon. Après 5 jours de croissance en lumière continue, dans un milieu carencé en azote (TAP-N) la carence est levée et les cellules sont transférées à l'obscurité dans un milieu sans acétate (TMP). Les dosages sont effectués 4, 8 et 24 heures après le transfert. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amidon résiduel moyen  $\pm$  écart-type. Les statistiques sont issues de trois séries de dosages indépendants. Les résultats obtenus avec la souche sauvage (137C) sont représentés en noir, tandis qu'en gris figurent les résultats de la souche mutante (*bsg1*). \* P<0,05 selon le test de Student.



### 3) Chromatographies d'exclusion stérique

Les amidons des souches sauvage (A et C) et mutante (B et D) ont été purifiés et analysés par tamisage moléculaire à l'aide d'une colonne de sépharose CL-2B (Fig. 32). Les amidons sont issus de cultures de 5 jours en milieu carencé (A et B), ou de cultures en milieu non carencé (C et D). Les amidons de réserve des deux souches présentent un ratio amylose/amylopectine comparable, où l'amylose représente entre 20 et 25 % de l'amidon. Par contre l'absorbance mesurée au pic d'amylopectine issue de la souche mutante, est supérieure de 10 nm à celle mesurée sur l'amylopectine de la souche sauvage. Ceci suggère une différence structurale des amylopectines dépendante du fond génétique. Un résultat similaire est obtenu en analysant l'amidon pyrénoidal (C et D). Notons qu'en revanche, l'amidon provenant des cultures non carencées ne contient que très peu d'amylose.

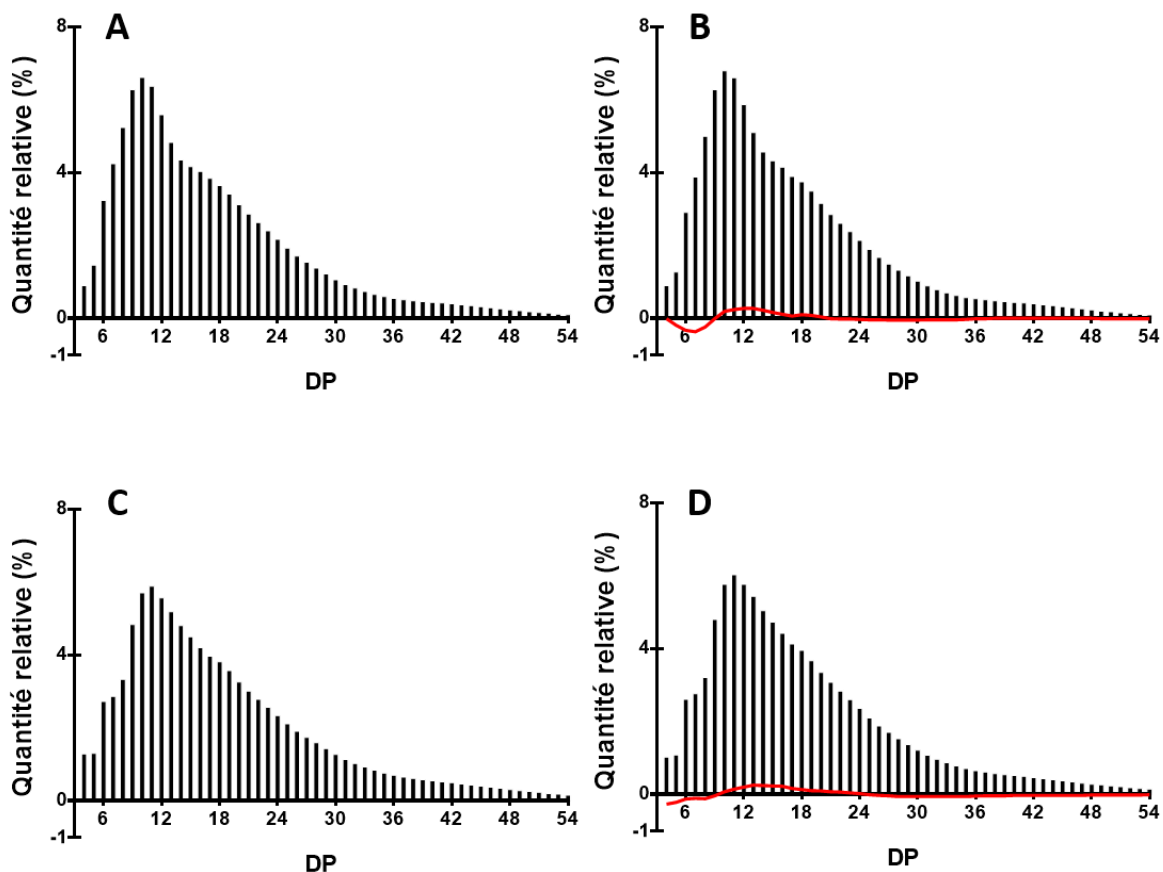


**Figure 32 : Séparation de l'amylose et de l'amylopectine par gel filtration.** Les amidons de la souche sauvage (A et C) et du mutant *bsg1* (B et D) purifiés à partir de cultures en conditions carencées (A et B) ou en conditions non carencées (C et D), ont été déposés sur une colonne de sépharose CL-2B comme décrit dans le « matériels et méthodes ». Les profils obtenus indiquent la densité optique maximale (DO, cercles noirs) enregistrée pour chaque fraction à la longueur d'onde correspondante (en rouge). La valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption correspondant au pic d'amylopectine ainsi que le ratio amylose/amylopectine sont indiqués.

### 4) Distributions en longueur de chaîne

La différence structurale de l'amylopectine suggérée par les profils de CL-2B a été vérifiée en établissant les distributions en longueur de chaînes des amylopectines des souches

sauvage et mutante par HPAEC-PAD (Fig. 33). Malgré la différence de 10 nm de la valeur de l'absorbance mesurée au pic d'amylopectine établie par CL-2B entre les souches sauvage et mutante, seules de légères modifications de la structure de l'amylopectine ont été détectées en comparant les distributions en longueur de chaînes correspondantes. En effet, l'amylopectine du mutant *bsg1* est composée de moins de chaînes courtes (comprenant les DP 4 à 9), et d'un peu plus de chaînes longues (entre les DP 10 à 20) en comparaison à l'amylopectine de la souche sauvage 137C. Cette différence est observée aussi bien à partir de l'amylopectine issue des cellules cultivées en milieu carencé (A et B), qu'à partir des cultures en présence d'azote (C et D).



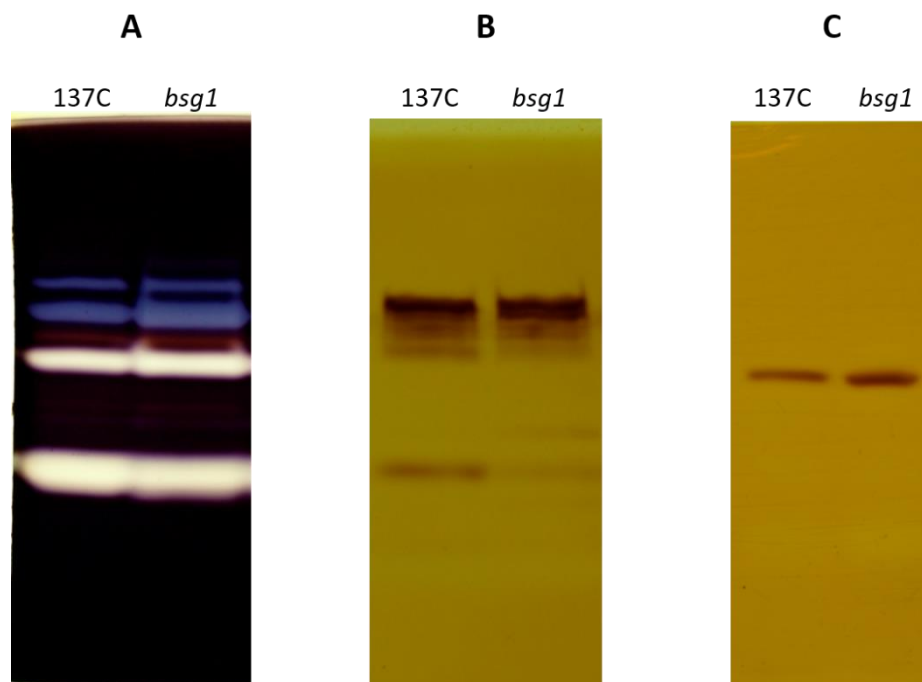
**Figure 33 : Distributions en longueur de chaînes (CLD).** Les CLD ont été obtenues à partir d'amidon purifiés des souches sauvage (137C, A et C) et mutante (*bsg1*, B et D), à partir de cultures en milieu carencé (A et B) ou non-carencé (C et D). Les amidons ont été préparés comme décrit dans le « matériels et méthodes ». Les chaînes débranchées sont séparées en fonction de leur degré de polymérisation (DP) allant de 4 à 54 résidus glucose. La quantité relative de chaque chaîne est représentée en ordonnée. La différence entre les profils (sauvage-mutant) est représentée en rouge.

## 5) Zymogrammes

Les résultats des dosages du polysaccharide, indiquent que le mutant *bsg1* accumule moins d'amidon que la souche sauvage isogénique 137C suggérant une altération de ses activités de synthèse (Tableau 6). De même les résultats des cinétiques de dégradation de l'amidon montrent que le mutant *bsg1* est déficient pour la dégradation de son amidon (Fig. 31). Ces altérations du métabolisme de l'amidon pourraient affecter l'activité des

enzymes du métabolisme, dont certaines sont visualisables sur des gels d'activité (zymogrammes). Nous avons donc entrepris de vérifier l'activité de ces enzymes sur gel (Fig. 34).

Des extraits protéiques provenant de cultures en fin de phase exponentielle de croissance des souches sauvage et mutante, ont été préparés et dosés. Pour chaque gel, la quantité de protéine déposée est identique entre les souches sauvage et mutante (100 µg de protéine sur le gel A, et 300 µg sur les gels B et C). Les zymogrammes réalisés en conditions dénaturantes permettent de mettre en évidence – après l'incubation des gels dans les tampons adéquats et une coloration à l'iode – les activités hydrolytiques (A), synthèses (B) et phosphorylases (C).



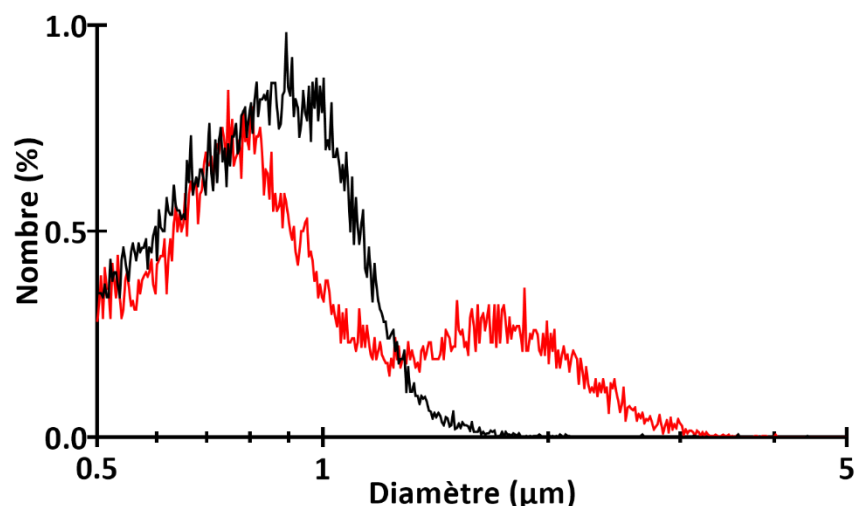
**Figure 34 : Profils enzymatiques des souches sauvage et mutante. (A)** Zymogramme révélant les activités hydrolytiques. Le gel contient de l'amidon de pomme de terre (0,3 %) comme substrat. L'équivalent de 100 µg de protéines issues des extraits bruts des souches sauvage (137C) et mutante (*bsg1*) a été déposé. Après coloration à l'iode les activités apparaissent sous la forme de bandes de couleur. Les bandes bleues correspondent aux activités de débranchement de l'isoamylase (ISA1), les bandes blanches celles des  $\alpha$ - et  $\beta$ -amylases, et apparaissent en rose les activités de branchement (BE1). **(B)** Zymogramme révélant les activités synthèses solubles. Le gel contient 0,3 % de glycogène de foie de lapin comme substrat et 300 µg de protéines ont été déposés. L'activité d'élongation des chaînes de glycogène par les amidon-synthases apparaît sous la forme de bandes brunes. Le groupe de bandes en haut du gel correspond à l'activité de la SS3, tandis que la bande au milieu du gel correspond à l'activité de la SS1. Cette dernière apparaît atténuée et dédoublée chez *bsg1*. **(C)** Zymogramme révélant les activités d'élongation par les amidon-phosphorylases sous la forme de bandes brunes. Le gel contient du glycogène de foie de lapin (0,3 %) comme substrat et 300 µg de protéines de la souche sauvage ou mutante, ont été déposés. Seule la phosphorylase PhoA peut être visualisée sur ce type de gel. L'ensemble de ces gels ont été réalisés en conditions dénaturantes.

Les gels réalisés ne permettent pas de mettre en évidence de différences du niveau d'activité des enzymes révélées par les colorations à l'iode, sauf pour l'activité de l'amidon-synthase 1 qui apparaît moins intense mais dédoublée en plusieurs bandes

d'activité. La SS1 étant décrite comme responsable de l'élongation des chaînes courtes de l'amylopectine (DP 8 à 12), il est possible que cette différence soit à l'origine des modifications structurales des chaînes courtes observées sur les distributions en longueur de chaînes.

## 6) Taille et morphologie des grains d'amidon du mutant *bsg1*

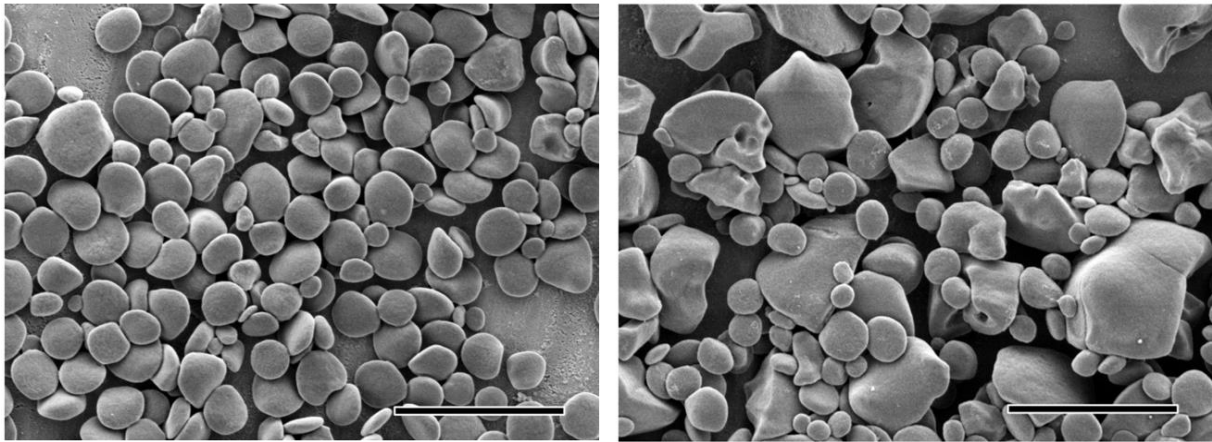
Finalement le phénotype le plus marquant, qui distingue le mutant *bsg1* des 61 autres mutants du catabolisme identifiés par le crible à l'iode, c'est l'accumulation chez ce mutant de deux populations de grains d'amidon. En effet, à partir de cultures carencées en azote, l'analyse au compteur de particules indique que l'amidon de la souche sauvage accumule dans son stroma de nombreux grains d'amidon dont le diamètre se distribue selon une loi quasi normale, centrée sur  $0,83 \pm 0,04 \mu\text{m}$  (Fig. 35). De façon intéressante, et dans les mêmes conditions, la souche mutante accumule de son côté deux populations de grains d'amidon de tailles distinctes. La plus petite à une taille comparable à la population observée chez le sauvage, avec un diamètre moyen de  $0,78 \pm 0,04 \mu\text{m}$ . A l'inverse, la seconde population apparaît deux fois plus grande avec un diamètre moyen de  $1,84 \pm 0,04 \mu\text{m}$ .



**Figure 35 : Détermination de la taille des grains d'amidon au compteur de particules.** Les grains d'amidon ont été extraits et purifiés à partir de cultures carencées en azote de 5 jours en lumière continue. La distribution de taille des grains est définie par l'analyse de 30000 particules, issues des souches sauvage (en noir) et du mutant *bsg1* (en rouge). Le résultat est exprimé en pourcentage relatif de particules (en ordonnée) en fonction de leur diamètre borné de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  (en abscisse).

C'est la distribution bimodale de ces grains d'amidon qui a donné son nom au mutant *bsg1* (*bimodal starch granule*). Ce phénotype original, où l'amidon accumulé dans le stroma de la microalgue mime l'accumulation de l'amidon de réserve des poacées, est totalement inédit chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce phénotype a également pu être confirmé par des observations en microscopie électronique à balayage réalisées par le Dr Jean-Luc Putaux, sur des purifications d'amidon issues de culture de 5 jours en milieu carencé en azote et sous lumière continue (Fig. 36). En effet, sur ces micrographies on peut observer les deux populations de grain d'amidon du mutant. Les grains d'amidon les plus grands semblent même parfois dépasser les 3  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les morphologies affichées par les deux populations de grains sont également très différentes. Les petits grains apparaissent sous la forme de

sphères aplaties et lisses, un peu comme des galets plats. A l'inverse les plus grands présentent des formes plus irrégulières. Notons que les amidons de la souche sauvage ont une morphologie comparable à la petite population de grain du mutant.



**Figure 36 : Observation par microscopie électronique à balayage.** Les amidons sont purifiés à partir de cultures carencées en azote. L'amidon issu de la souche sauvage 137C figure à gauche, celui issu du mutant *bsg1* à droite. Barres d'échelles = 4 µm

L'amidon purifié provenant de cultures en conditions non-carencées (TAP+N) a également fait l'objet d'analyses au compteur de particules, malheureusement la taille des grains passe alors en dessous du seuil de détection de l'appareil.

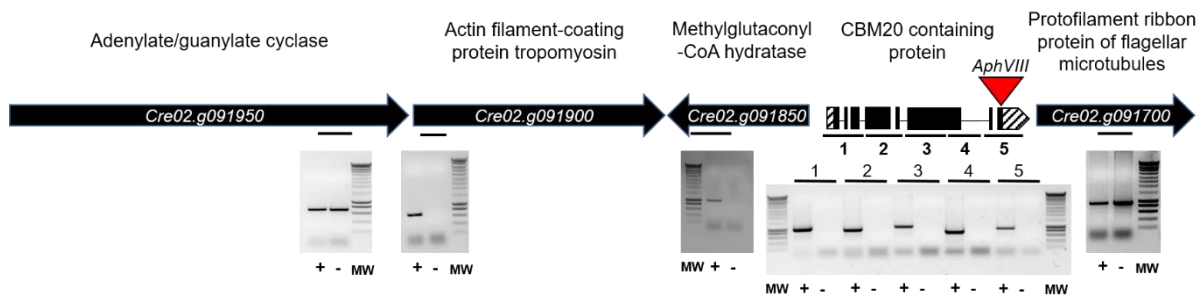
## II. Identification de la mutation et analyses génétiques

### 1) Identification de la mutation sur le chromosome 2

C'est l'insertion d'une cassette de résistance à la paromomycine dans le génome de la souche sauvage (137C) qui est à l'origine du mutant *bsg1*. Le lieu de l'insertion a été identifié par TAIL-PCR (« *Thermal Asymmetric InterLaced* ») à partir de l'ADNg du mutant. La TAIL-PCR a permis l'amplification d'un fragment de 533 pb dont 87 correspondaient à la fin de la cassette de résistance, et les 446 pb restantes à une partie du génome. Les alignements de cette séquence génomique avec la base de données Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>), ont alors permis d'identifier le lieu d'insertion sur le chromosome 2 ; et plus précisément dans l'extrémité 3' du locus *Cre02.g091750*, interrompant le gène du locus 11 nucléotides avant son codon stop.

Les mutations par insertion sont connues pour engendrer des réarrangements chromosomiques comme des délétions plus ou moins importantes au voisinage du lieu d'insertion. Nous avons donc vérifié l'intégrité des gènes en amont et en aval du lieu d'insertion par PCR, en utilisant des amorces spécifiques de ces gènes (Fig. 37). Chaque PCR a été réalisée à partir de l'ADNg de la souche sauvage (137C) et du mutant *bsg1*. Les amorces utilisées ainsi que la taille attendue des amplifications, sont détaillées dans le « matériels et méthodes » (Tableau 4). Les résultats montrent, que le mutant *bsg1* a perdu une région d'environ 15 kpb en amont du site d'insertion, et affectant trois loci. En effet chez le mutant, il n'est plus possible d'amplifier par PCR les régions ciblées des locus *Cre02.g091900* (codant

une tropomyosine), *Cre02.g091850* (codant une Méthylglutaconyl-CoA hydratase), et du locus *Cre02.g091750* codant une protéine décrite par Phytozome comme étant une PWD.



**Figure 37 : Caractérisation de la délétion de la souche mutante *bsg1*.** La région du chromosome 2 du mutant *bsg1* au voisinage de l'insertion, est représentée schématiquement. L'insertion de la cassette de résistance à la paromomycine (*AphVIII*) à la fin de la séquence codante du gène au locus *Cre02.g091750*, est représentée par une pointe de flèche rouge. Le gène interrompu code une protéine possédant un domaine de liaison à l'amidon (CBM20), et est constitué de 8 exons (rectangles noirs). Des PCR ont été réalisées de façon régulière pour couvrir les 4,5 kpb du gène, en utilisant 5 couples d'amorces spécifiques (segments 1 à 5) à partir de l'ADNg de la souche sauvage 137C (+) et du mutant *bsg1* (-). De même des PCR ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques des loci voisins (symbolisées par les segments noirs sous les loci correspondants) à partir de l'ADNg des deux souches. La description de ces loci fournie par la base de données de Phytozome, est indiquée au-dessus de chacun d'entre eux.

Comme nous l'avons vu, les dikinases (GWD et PWD) sont des enzymes essentielles à l'initiation de la dégradation de l'amidon. Cependant leur fonction est dépendante de la présence d'un résidu histidine au sein d'une séquence consensuelle, permettant le transfert du  $\beta$ -phosphate de l'ATP sur les glucanes. Or la protéine codée par le locus *Cre02.g091750* ne contient pas cette séquence. Les seules homologues de séquence entre cette protéine et les dikinases ne concernent qu'une petite région de la protéine, correspondant à un domaine de liaison à l'amidon (CBM20) qu'elles ont en commun. Bien qu'annotée comme codant une PWD, le locus *Cre02.g091750* ne semble donc pas permettre ce type d'activité.

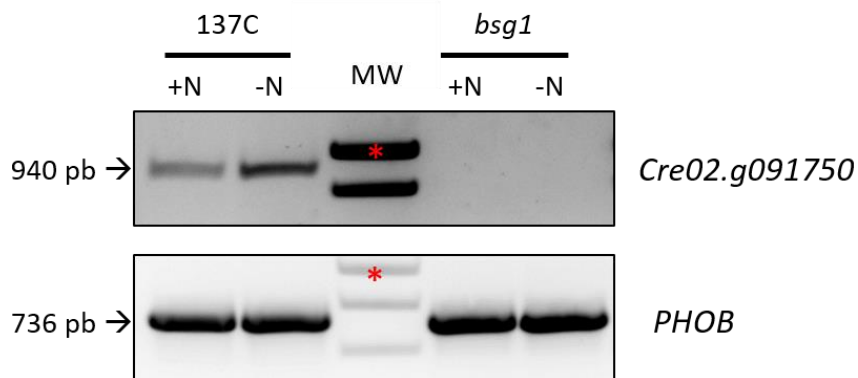
Ajoutons que les alignements de séquence ne permettent pas d'identifier d'homologues de cette protéine chez les plantes supérieures. D'ailleurs, la protéine qui lui ressemble le plus (*Vocar.0001s1160.1*) ne partage que 28 % de similarités et appartient à la microalgue *Volvox carteri*, une espèce très proche de *C. reinhardtii*. La fonction de la protéine de 792 acides-aminés, codée par le locus *Cre02.g091750*, n'est donc pas connue. Toutefois, les outils de prédiction comme ChloroP (Emanuelsson et al., 1999) présumant l'existence d'un peptide d'adressage au chloroplaste de 50 acides-aminés. Cette information, associée à l'existence d'un domaine de liaison à l'amidon dans sa région N-terminale, font de cette protéine un bon candidat pour expliquer les phénotypes observés chez le mutant *bsg1*. Notons également que les trois outils de prédiction (Marcoil, PairCoil2 et PCOILS (Delorenzi et Speed, 2002; Gruber et al., 2006; McDonnell et al., 2006; Zimmermann et al., 2018)) prédisent la présence d'une structure en super-hélices, dans la région comprise entre les acides-aminés 300 et 380 (Tableau 7).

Nom	Marcoil		PairCoil2	PCOILS
Localisation de la structure en super hélice	AA 303 à 328	AA 331 à 367	AA 302 à 384	AA 342 à 371
Probabilité	T = 96,6 %	T = 99,9 %	P<0,01	P>0,906

**Tableau 7 : Prédiction des structures en super-hélices.** La séquence de la protéine codée par le locus *Cre02.g091750* a été soumise aux outils de prédiction Marcoil, PairCoil2 et PCOILS avec les paramètres par défaut. La localisation (en acides aminés (AA)) des structures en super-hélices prédites ainsi que leurs puissances sont indiquées. Pour l'outil Marcoil, la prédiction est considérée comme fortement probable quand le seuil (T) est supérieur à 90 %. De même, la prédiction de l'outil PairCoil est forte quand la prévalence (P) est inférieure à 0,025. Avec PCOILS la prédiction est considérée comme fiable quand P est supérieure à 0,90.

## 2) RT-PCR

L'absence de la protéine codée par le locus *Cre02.g091750*, apparaît être la meilleure explication aux phénotypes observés chez le mutant *bsg1*. Nous avons donc entrepris de vérifier l'absence de transcrits correspondant à ce locus dans la souche mutante par RT-PCR (« *Reverse transcriptase* »). Ces dernières ont été réalisées à partir des ARN extraits des souches sauvage (137C) et mutante (*bsg1*), en phase exponentielle de croissance, mais aussi après 1 heure d'acclimatation dans un milieu carencé en azote (Fig. 38). Les résultats confirment l'absence d'expression du gène chez le mutant *bsg1*, à l'inverse de la souche sauvage 137C. La qualité des ARN extraits a été vérifiée, et ils permettent l'amplification d'une séquence d'ADN complémentaire appartenant à la phosphorylase PhoB dans les deux fonds génétiques.

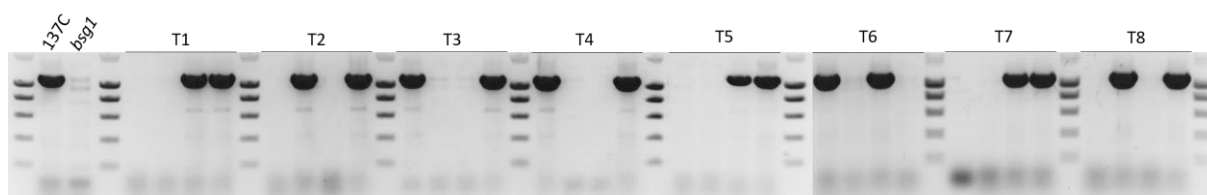


**Figure 38 : Analyse par RT-PCR de l'expression du gène au locus *Cre02.g091750*.** Les ARN des souches sauvage (137C) et mutante (*bsg1*) issus de cultures en phase exponentielles (+N) ou acclimatées 1 heure en carence azotée (-N) ont été extraits. Après la réaction de transcription inverse permettant de convertir les ARNm extraits en ADNc, les amorces RTF et RTR s'hybrident avec l'ADNc du gène au locus *Cre02.g091750* s'il existe. L'expression du gène est donc révélée par l'amplification d'un fragment de 940 pb. La présence d'ARN de qualité dans la réaction est confirmée par l'amplification d'un fragment de 736 pb correspondant à l'ADNc du gène *PHOB* à l'aide des amorces PhoBF et PhoBR. Les amorces utilisées sont détaillées dans le [tableau 4](#). L'astérisque rouge désigne le marqueur de taille de 1 kpb.

### 3) Analyses de coségrégation

L'objectif des analyses de coségrégation est de vérifier si tous les phénotypes observés chez le mutant *bsg1* sont liés à la délétion identifiée sur le chromosome 2. Pour y parvenir la souche mutante a été croisée avec une souche sauvage de polarité sexuelle opposée (37c1). A l'issue de ce croisement, 8 tétrades ont été obtenues et validées par l'analyse des auxotrophies et la détermination de la polarité sexuelle des ségrégeants méiotiques (la tétrade 3 a été perdue par la suite). De cette façon nous nous sommes assurés que la ségrégation des caractères ait eu lieu normalement. De la même façon nous avons testé la résistance à la paromomycine de chaque ségrégeant méiotique. Pour chaque tétrade, deux descendants sont résistants à l'antibiotique et les deux autres y sont sensibles. Ce résultat suggère qu'une seule copie fonctionnelle de la cassette de résistance, utilisée pour la mutagenèse, s'est insérée dans le génome.

L'ADNg de chaque descendant a été extrait pour vérifier par PCR la présence de la mutation au locus *Cre02.g091750* dans leur génome. A cette fin nous avons utilisé des amorces (BSGF et BSGR) s'hybridant spécifiquement sur la séquence codante du domaine CBM20, et permettant l'amplification d'un fragment de 1078 pb si le gène est intègre. Encore une fois pour chaque tétrade, deux descendants sont porteurs de la mutation et ne permettent pas l'amplification, à l'inverse des deux autres (Fig. 39). De plus, à chaque fois les descendants porteurs de l'allèle sauvage sont aussi les descendants sensibles à la paromomycine, tandis que les descendants porteurs de l'allèle muté sont résistants à cet antibiotique.



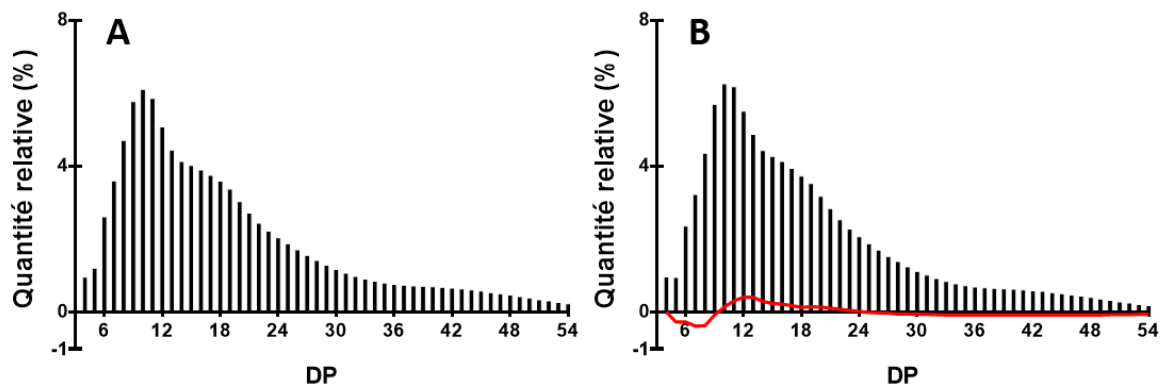
**Figure 39 : Génotypage des tétrades obtenues par le croisement des souches *bsg1* et 37c1.** La souche parentale 37c1 est dérivée de la souche sauvage de référence 137C et est de polarité sexuelle opposée. Les PCR ont été réalisées à partir de l'ADNg extrait de chaque descendant, et des amorces BSGF et BSGR permettant l'amplification d'un fragment de 1078 pb. Les descendants porteurs de la mutation ne permettent pas l'amplification. Les PCR ont également été réalisées à partir des ADNg des souches de référence 137C et *bsg1*. La tétrade 3 a été perdue par la suite.

L'amidon extrait des cultures en milieu carencé de tous ces descendants, a également été analysé pour déterminer leurs « phénotypes amidon ». Les résultats montrent qu'au moins une partie des phénotypes observés chez le mutant coségrègent avec la délétion au chromosome 2.

Les amidons des descendants ont été analysés par CL-2B pour séparer l'amylose et l'amylopectine. Pour rappel, la valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) correspondant au pic d'amylopectine du mutant *bsg1* était 10 nm au-delà de la valeur obtenue à partir de l'amylopectine de la souche sauvage 137C (Fig. 32). Les ségrégeants méiotiques porteurs de l'allèle mutant, présentent eux aussi ce caractère avec une valeur de  $\lambda_{\max}$  moyenne de l'amylopectine de  $563 \pm 7$  nm contre  $554 \pm 3$  nm chez les descendants porteurs de l'allèle sauvage. Cette différence a été validée par un test de Student et est significative ( $p < 0,001$ ).



De même la distribution en longueur de chaînes après le débranchement des amylopectines de chaque descendant a été réalisée. Le profil obtenu pour l'ensemble des descendants mutants est similaire à celui obtenu à partir de l'amylopectine du mutant *bsg1*. A l'inverse, le profil obtenu pour l'ensemble des descendants sauvages est proche du profil que l'on avait obtenu à partir de l'amylopectine de la souche sauvage 137C. La différence des distributions en longueur de chaînes des descendants mutants à laquelle on retranche celle des descendants sauvages, correspond donc à la diminution de la quantité des chaînes courtes (DP 5 à 9) de l'amylopectine, et la légère augmentation des chaînes longues (DP 10 à 24) observées chez le mutant *bsg1* (Fig. 40).



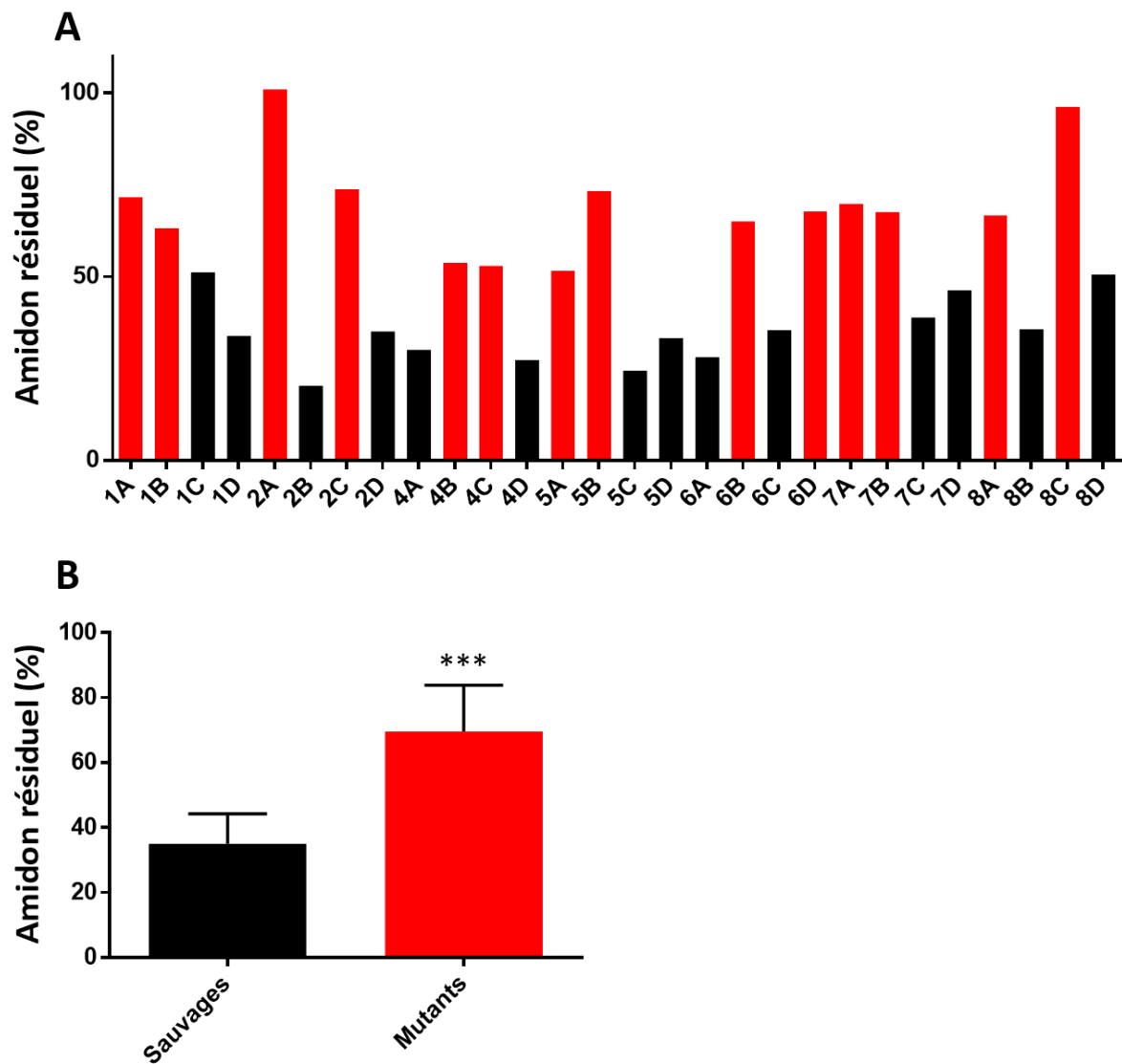
**Figure 40 : Distributions en longueur de chaînes moyennes des ségrégeants méiotiques. (A)** Distribution en longueur de chaînes représentative de l'ensemble des amylopectines des descendants sauvages. **(B)** Distribution en longueur de chaînes représentative de l'ensemble des amylopectines des descendants mutants. En rouge figure la différence des deux profils (sauvage-mutant). Les amidons ont été préparés comme décrit dans le « matériels et méthodes ». Les chaînes débranchées sont séparées en fonction de leur degré de polymérisation (DP) allant de 4 à 54 résidus glucose. La quantité relative de chaque chaîne est représentée en ordonnée.

Nous avons également vérifiés dans la descendance la ségrégation du défaut de dégradation de l'amidon. Là encore, nous avons pu observer la ségrégation mendélienne de ce caractère dans la descendance. En effet, dans chaque tétrade deux descendants sont défectueux pour dégrader leur amidon, tandis que les deux autres descendants le dégradent normalement (Fig. 41 A). De plus, ce caractère coségrége avec la délétion au chromosome 2. En effet, malgré 24 heures de culture dans des conditions (milieu TMP à l'obscurité) obligeant la dégradation des réserves, on peut observer que les descendants mutants, pris dans leur ensemble, dégradent seulement  $29 \pm 15 \%$  de la quantité initiale d'amidon. A l'inverse, les descendants sauvages placés dans les mêmes conditions sont capables de dégrader  $66 \pm 9 \%$  de leurs réserves initiales dans le même laps de temps (Fig. 41 B).

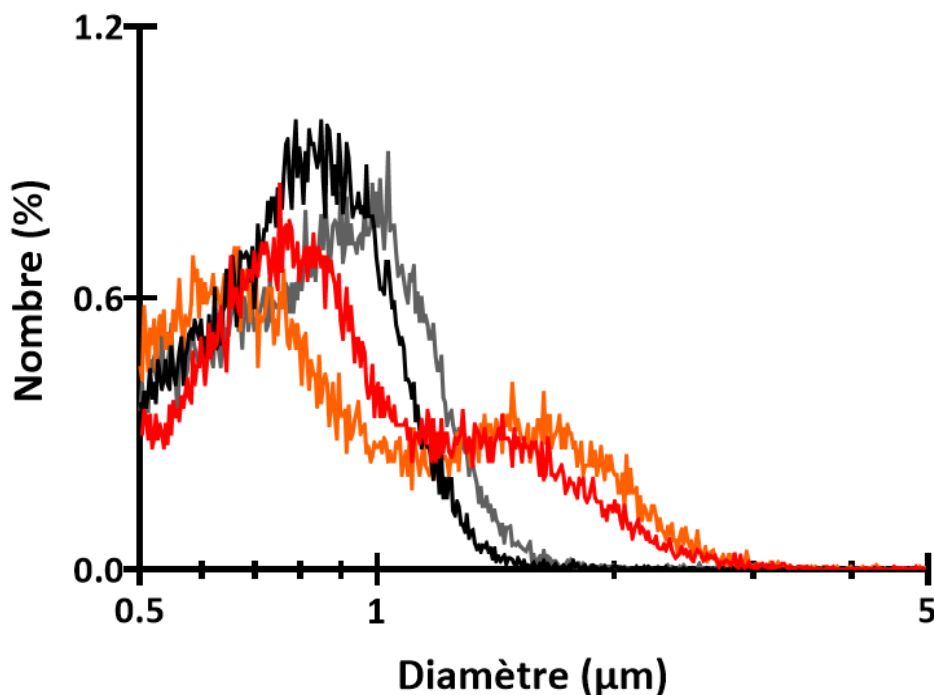
Bien sûr nous avons également regardés si le phénotype majeur du mutant *bsg1*, à savoir la distribution bimodale de ses grains d'amidon, coségrégeait avec la délétion du chromosome 2. Les amidons purifiés issus des cultures de 5 jours en carence azotée, ont été analysés au compteur de particules.

Ces analyses révèlent que tous les descendants mutants possèdent les deux populations de grains d'amidon, comme le mutant d'origine *bsg1*. A l'inverse, tous les descendants porteurs

de l'allèle sauvage, ne possèdent qu'une seule population de grains comparable à celle de la souche sauvage 137C. Ce résultat est illustré par la tétrade 5 dans la figure 42.



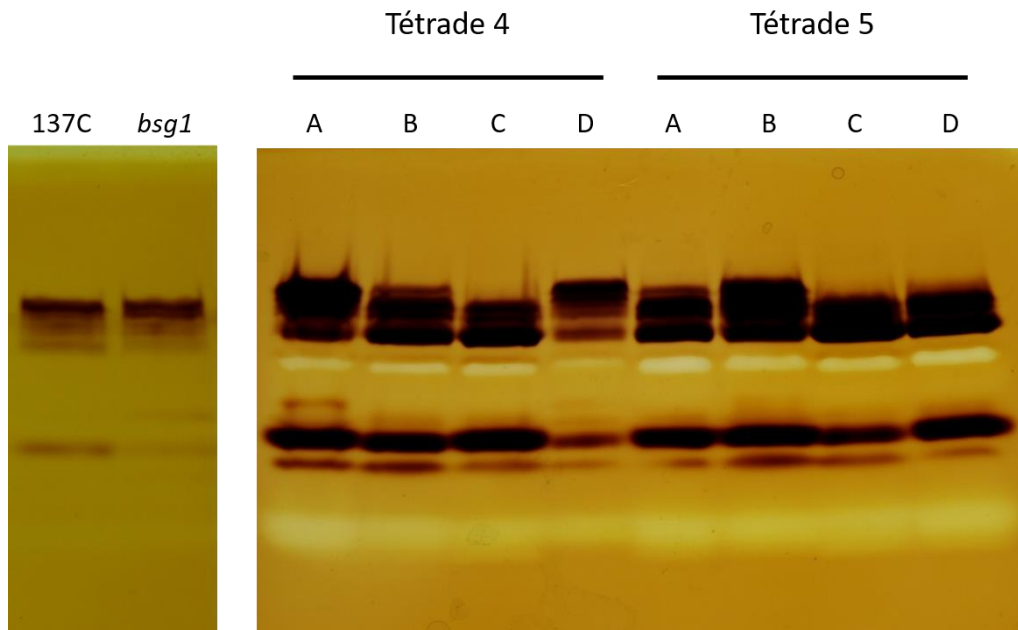
**Figure 41 : Coségrégation du défaut de dégradation de l'amidon. (A)** Les descendants des 7 tétrades issues du croisement de la souche sauvage 37c1 et du mutant *bsg1*, ont été cultivées 5 jours dans un milieu carencé en azote et à la lumière avant d'être transférées à l'obscurité dans un milieu non carencé mais sans acétate, obligeant les cellules à dégrader leur réserve d'amidon. Les dosages ont été réalisés au moment du transfert et après 24 heures, permettant ainsi de déterminer la quantité d'amidon résiduel exprimée en pourcentage. Les descendants porteurs de l'allèle sauvage sont représentés en noir, et les descendants mutants sont représentés en rouge. **(B)** Moyenne de la quantité d'amidon résiduel de l'ensemble des descendants sauvages (en noir) et mutants (en rouge) après 24 heures de dégradation. Le résultat ne prend pas en compte les valeurs de la tétrade 3 qui a été perdue. Les moyennes sont données avec l'écart-type. \*\*\*  $P < 0,001$  selon le test de Student.



**Figure 42 : Analyse de la taille des grains d'amidon des quatre souches d'une tétrade.** Les grains d'amidon ont été extraits et purifiés à partir de cultures carencées en azote de 5 jours en lumière continue. La distribution de taille des grains est définie par l'analyse de 30000 particules, issues des quatre ségrégeants méiotiques composant la tétrade 5. Les deux descendants sauvages figurent en noir et gris, tandis que les deux descendants mutants apparaissent en rouge et orange. Le résultat est exprimé en pourcentage relatif de particules (en ordonnée) en fonction de leur diamètre borné de 0,5 à 5 µm (en abscisse).

D'autres phénotypes, en revanche, ne coségrègent pas avec la délétion observée sur le chromosome 2. En effet, la caractérisation phénotypique du mutant *bsg1* indique que celui-ci est sous-producteur, accumulant près de deux fois moins d'amidon que la souche de référence 137C (Tableau 6). Cependant les dosages effectués à partir des cultures de 5 jours en milieu carencé en azote et à la lumière des ségrégeants méiotiques, ne nous ont pas permis de conclure à une coségrégation de ce caractère avec la mutation sur le chromosome 2. En effet, l'amidon accumulé en moyenne par les descendants porteurs de l'allèle sauvage est de l'ordre de  $41 \pm 19$  µg d'amidon par million de cellules contre  $50 \pm 19$  µg d'amidon par million de cellules pour les descendants mutants.

De même les zymogrammes révélant les activités synthèses montraient une modification de l'activité de l'amidon synthase 1 (SS1) chez le mutant *bsg1* (Fig. 34). Cependant les gels d'activités réalisés dans les mêmes conditions, mais avec les extraits protéiques des ségrégeants méiotiques issus des tétrades 4 et 5, ne montrent pas cette altération de l'activité (Fig. 43).



**Figure 43 : Zymogramme révélant les activités amidon-synthases.** Les extraits protéiques proviennent de cultures en fin de phase exponentielle de croissance, des souches sauvage (137C) et mutante (*bsg1*) à gauche ainsi que des ségrégeants méiotiques des tétrades 4 et 5. Les gels contiennent 0,3 % de glycogène de foie de lapin. 300 µg de protéine ont été déposés dans chaque puits. L'élongation des chaînes de glycogène sont révélées après coloration à l'iode sous la forme de bandes brunes. Les bandes brunes en haut du gel correspondent à l'activité de l'amidon-synthase 3, tandis que les bandes brunes en bas du gel correspondent à l'activité de l'amidon-synthase 1.

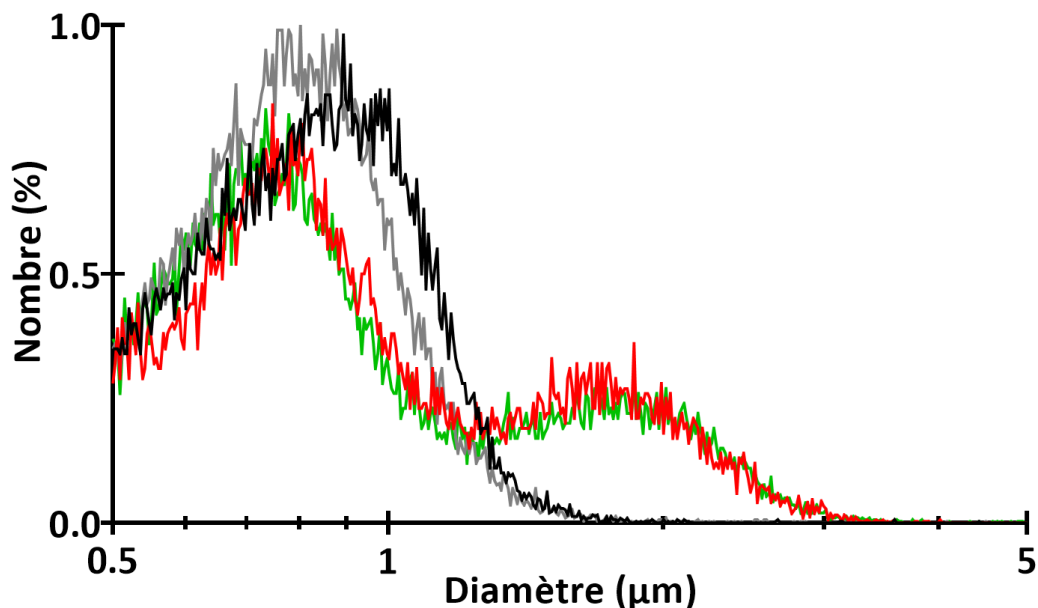
### III. Complémentation fonctionnelle

Les analyses de coségrégation permettent d'établir un lien génétique entre une mutation et un ou plusieurs phénotypes. Cependant, l'existence d'un tel lien ne suffit pas à prouver que la mutation soit responsable des phénotypes observés. Cette relation de cause à effet peut en revanche, être établie par complémentation fonctionnelle. Dans notre cas trois gènes ont été affectés par la mutation (Fig. 37), cependant seule la protéine codée par le locus *Cre02.g091750* semble posséder à la fois un peptide de transit permettant l'adressage au chloroplaste, et un domaine d'interaction avec l'amidon. Cette protéine est donc la meilleure candidate pour expliquer les phénotypes coségrégants avec la mutation, c'est-à-dire le défaut de dégradation de l'amidon, la modification structurale de l'amylopectine (associée à la modification de la valeur de sa  $\lambda_{max}$ ), et la distribution bimodale des grains.

Par conséquent, nous avons réintroduit dans la souche mutante une copie fonctionnelle du gène *Cre02.g091750*, dans le but de vérifier si l'expression de ce gène était capable de ramener les phénotypes du mutant à la normale. Pour y parvenir, nous avons d'abord construit le vecteur de complémentation en amplifiant par PCR les 3,7 kpb entre le codon start et le codon stop du gène. Cet amplifiât a ensuite été cloné sous le contrôle du promoteur fort *PSAD* (une sous-unité du photosystème 1), dans le vecteur pSLhyg qui contient un gène de résistance à l'hygromycine B (*Aph7''*) (Berthold et al., 2002). La transformation a été réalisée selon la méthode décrite dans le « matériels et méthodes », et les transformants ont été sélectionnés sur milieu gélosé avec 10 µg/ml de paromomycine et 20 µg/ml d'hygromycine B.

Vingt des transformants obtenus, ont été cultivés en condition de carence azotée pendant 5 jours avant d'en extraire l'amidon pour analyses.

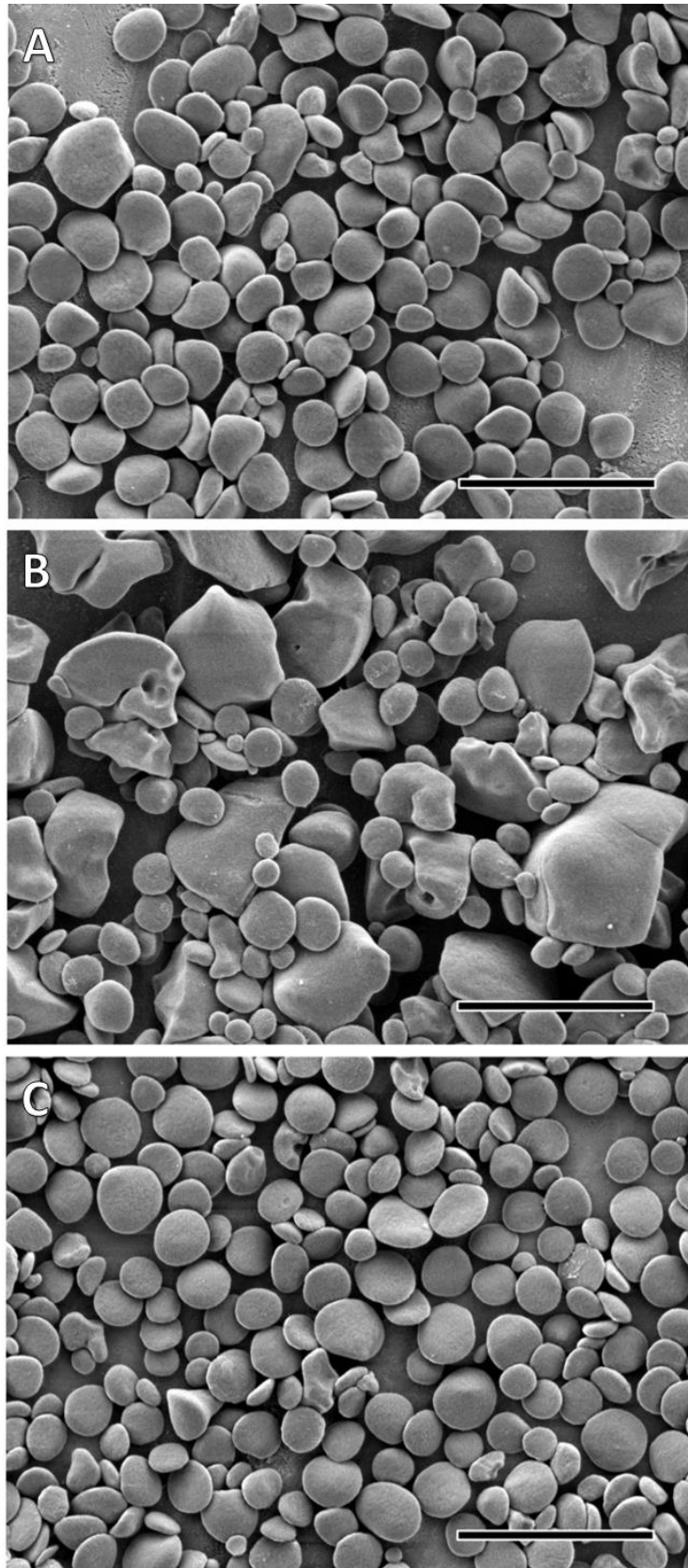
Ces dernières ont permis de montrer que les amidons de 18 transformants sur les 20 testés au compteur de particules, passaient d'une distribution bimodale des grains à une distribution unimodale avec un diamètre moyen de  $0,75 \pm 0,03 \mu\text{m}$ , soit un diamètre similaire à celui des grains d'amidon de la souche sauvage (137C) (Fig. 44). A l'inverse, l'amidon issu de 13 souches transformées avec le vecteur pSLhyg vide, résistantes à l'hygromycine et à la paromomycine, présente toujours la distribution bimodale caractéristique du mutant *bsg1*.



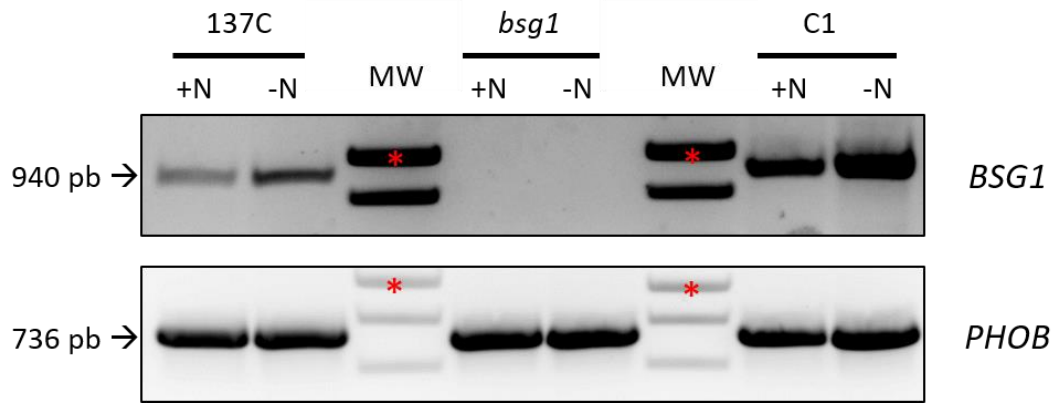
**Figure 44 : Détermination de la taille des grains d'amidon au compteur de particules.** Les grains d'amidon ont été extraits et purifiés à partir de cultures de 5 jours sans azote et en lumière continue. La distribution de taille des grains est définie par l'analyse de 30000 particules, issues des souches sauvage (en noir) et du mutant *bsg1* (en rouge), d'une souche complémentante C1 (en gris) et d'une souche transformée avec le vecteur pSLhyg vide (en vert). Le résultat est exprimé en pourcentage relatif de particules (en ordonnée) en fonction de leur diamètre borné de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  (en abscisse).

Les amidons purifiés des cultures en milieu carencé des souches sauvage, mutante et complémentante ont également pu être observés en microscopie électronique à balayage, permettant de confirmer ce résultat, et de montrer le retour à une morphologie normale des grains (Fig. 45).

Le retour de l'expression chez les souches complémentantes du gène au locus *Cre02.g091750* (rebaptisé gène *BSG1*) a également été vérifiée par RT-PCR (Fig. 46), et permet de corréler le retour au phénotype sauvage avec l'expression du gène.

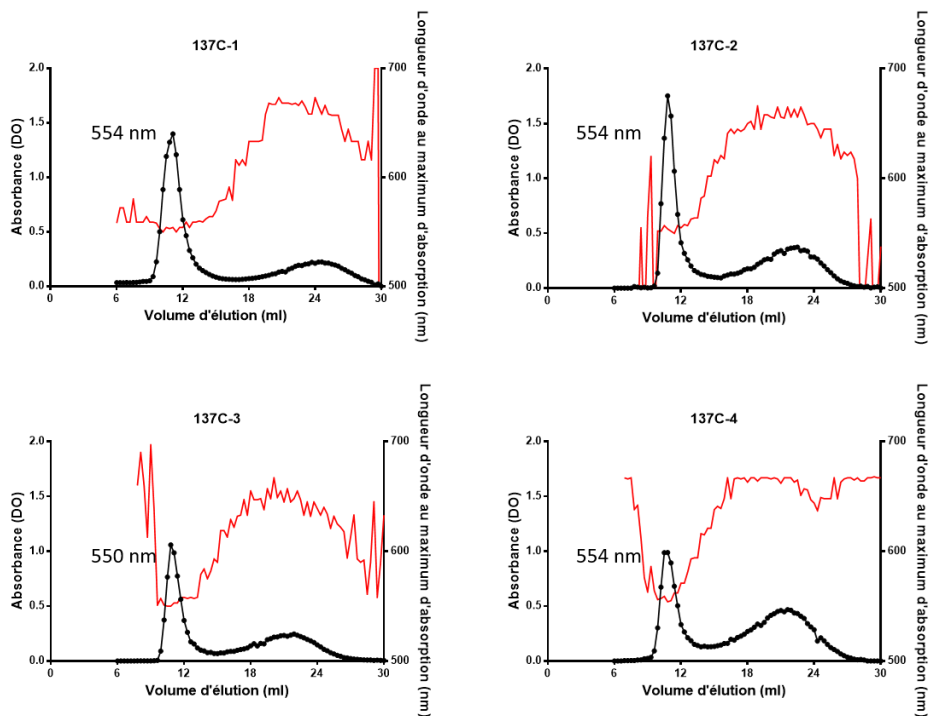


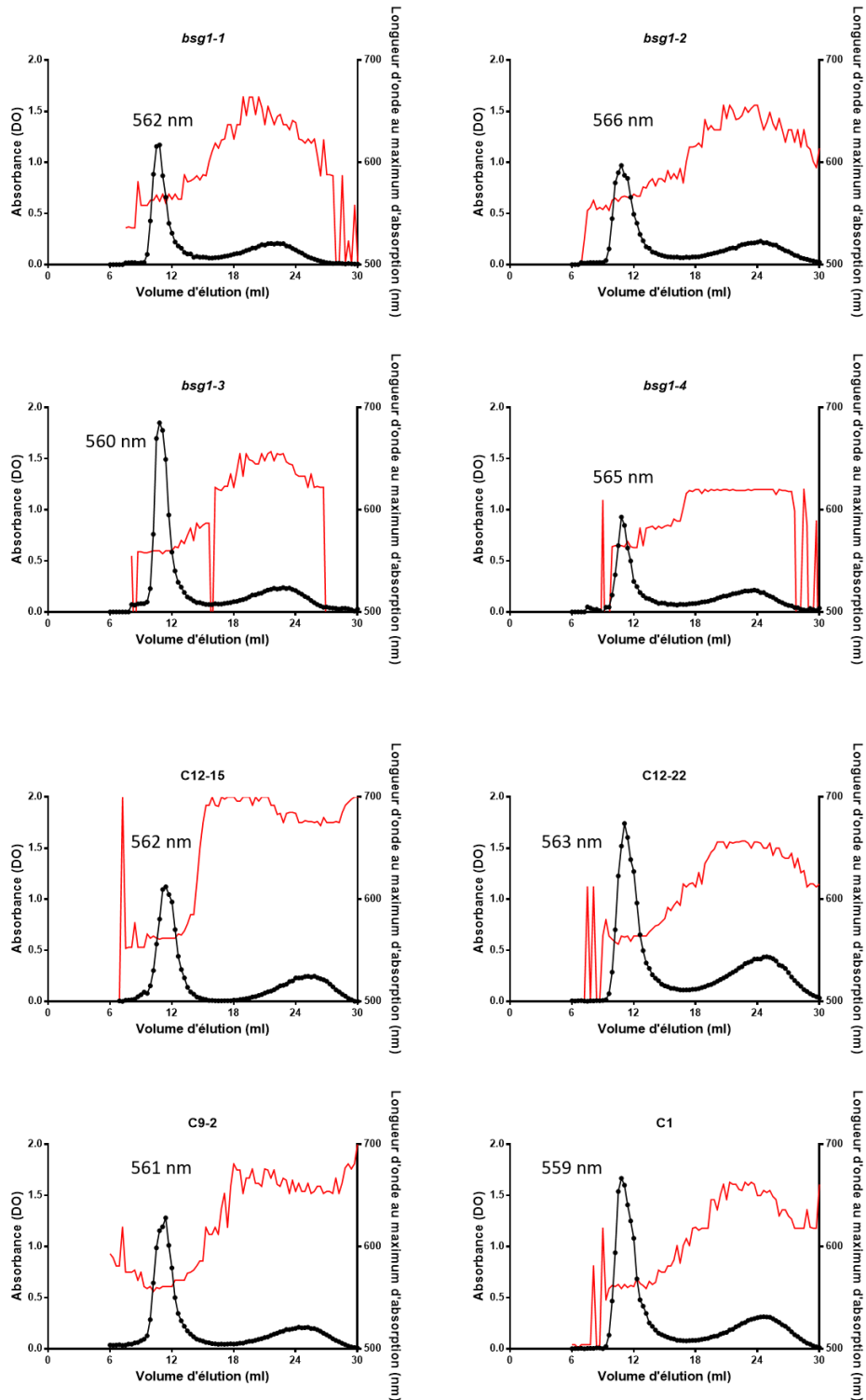
**Figure 45 : Observation par microscopie électronique à balayage.** Les amidons sont purifiés à partir de cultures de 5 jours en milieu carencé en azote. **(A)** Amidon issu de la souche sauvage 137C. **(B)** Amidon issu de la souche mutante *bsg1*. **(C)** Amidon issu de la souche complémentante C1. Barres d'échelles = 4 µm



**Figure 46 : Analyse par RT-PCR de l'expression du gène *BSG1*.** Les ARN des souches sauvage (137C), mutante (*bsg1*) et complémentante (C1) issus de cultures en phase exponentielles (+N) ou acclimatées 1 heure en carence azotée (-N) ont été extraits. Après la réaction de transcription inverse permettant de convertir les ARNm en ADNc, les amorces RTF et RTR s'hybrident avec l'ADNc du gène *BSG1* s'il existe. L'expression du gène *BSG1* est donc révélée par l'amplification d'un fragment de 940 pb. La présence d'ARN de qualité dans la réaction est confirmée par l'amplification d'un fragment de 736 pb correspondant à l'ADNc du gène *PHOB* à l'aide des amorces PhoBF et PhoBR. Les amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 4. L'astérisque rouge désigne le marqueur de taille de 1 kpb.

En revanche, les analyses par chromatographie d'exclusion stérique de l'amidon issu des souches complémentantes cultivées en milieu carencé, nous montrent que la valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption de l'amylopectine ( $\lambda_{\max}$ ), qui était chez le mutant *bsg1* supérieure de 10 nm à la valeur de la  $\lambda_{\max}$  de la souche sauvage de référence, n'est pas corrigée pour les souches complémentantes. En effet, la valeur moyenne obtenue pour quatre souches complémentantes indépendantes reste à  $561 \pm 1$  nm, soit une valeur similaire à celle enregistrée à partir de l'amylopectine du mutant *bsg1* ( $563 \pm 2$  nm, Fig. 47).



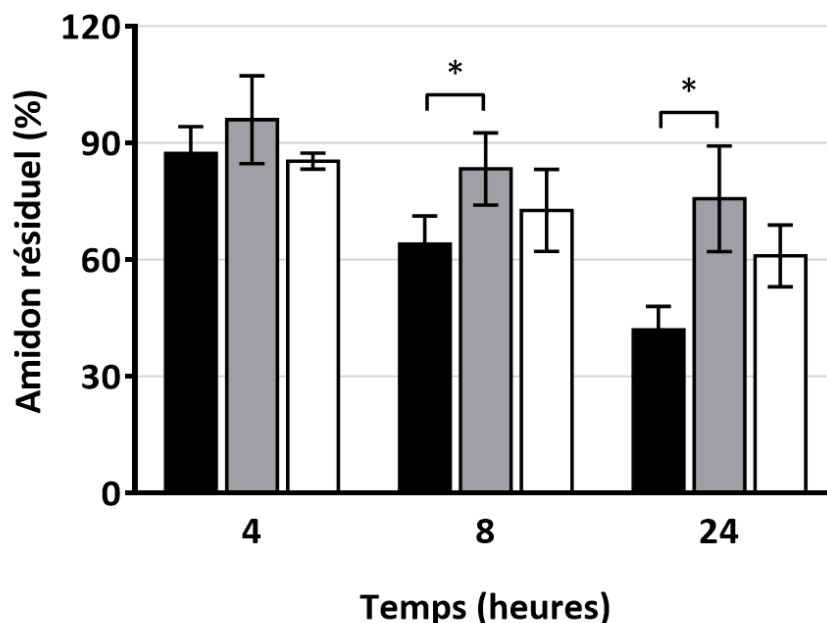


**Figure 47 : Séparation de l’amylose et de l’amylopectine par gel filtration.** Les amidons des souches sauvage, et *bsg1* ont été purifiés à partir de quatre cultures indépendantes en conditions carencées et ont été déposés sur une colonne de sépharose CL-2B comme décrit dans le « matériels et méthodes ». De même l’amidon purifié de quatre souches complémentantes, cultivées dans les mêmes conditions, ont été analysés. Les profils obtenus indiquent la densité optique maximale (DO, cercles noirs) enregistrée pour chaque fraction à la longueur d’onde correspondante (en rouge). La valeur de la longueur d’onde au maximum d’absorption correspondant au pic d’amylopectine est indiquée en nanomètre.



De même, les cinétiques de dégradation réalisées avec les souches complémentantes indiquent que le défaut de dégradation de l'amidon du mutant *bsg1*, n'est pas corrigé non plus par l'expression du gène *BSG1* (Fig. 47). En effet, le taux de dégradation des souches complémentantes représentées par C1, n'est que très légèrement supérieur à celui de la souche mutante *bsg1* (avec respectivement  $0,52 \pm 0,22$  contre  $0,29 \pm 0,14$   $\mu\text{g}$  d'amidon dégradé par heure et par million de cellules). Cette différence n'est pas significative statistiquement, et reste bien en dessous du taux de dégradation observé pour la souche de référence (137C) ( $1,47 \pm 0,10$   $\mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{cellules} \cdot \text{heure}^{-1}$ ).

Un dernier phénotype observé chez le mutant *bsg1* n'est pas corrigé par la complémentation. En effet, le mutant *bsg1* présentait également un défaut d'accumulation d'amidon (Tableau 6). Après 5 jours de culture en milieu carencé (TAP-N) la quantité d'amidon mesurée chez les souches complémentantes reste atténuée en comparaison à la souche sauvage. En effet, la quantité moyenne d'amidon mesurée pour 4 souches complémentantes indépendantes est de  $22 \pm 8$   $\mu\text{g} \cdot 10^{-6} \text{cellules}$ .



**Figure 48 : Cinétique de dégradation de l'amidon.** Après 5 jours de croissance en lumière continue, dans un milieu carencé en azote (TAP-N) la carence est levée et les cellules sont transférées à l'obscurité dans un milieu sans acétate (TMP). Les dosages sont effectués 4, 8 et 24 heures après le transfert. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'amidon résiduel moyen  $\pm$  écart-type. Les statistiques sont issues de trois séries de dosages indépendants. Les résultats obtenus avec la souche sauvage (137C) sont représentés en noir, tandis qu'en gris et blanc figurent respectivement les résultats des souches mutante (*bsg1*) et complémentante (C1). \*  $P < 0,05$  selon le test de Student.

Finalement, la complémentation fonctionnelle nous permet d'écarter le gène *BSG1* comme responsable du défaut de dégradation de l'amidon observé chez le mutant. De même, ce gène ne semble pas être impliqué dans les modifications structurales de l'amylopectine. En revanche, il joue incontestablement un rôle dans le contrôle de la distribution et de la taille des grains d'amidon ainsi que de leurs morphologies.

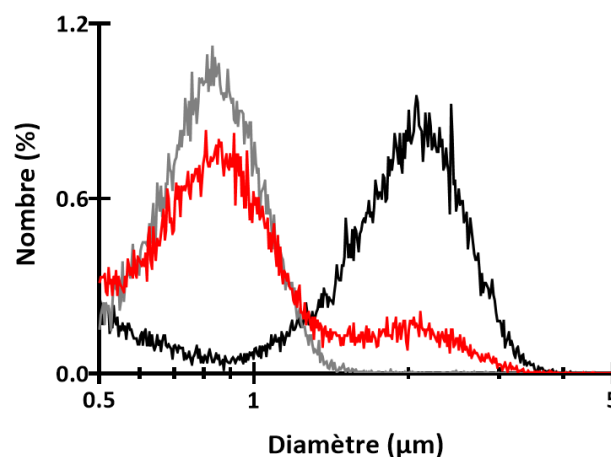
## IV. Caractérisation des deux populations de grains d'amidon du mutant *bsg1*

La principale caractéristique de la souche *bsg1*, est la coexistence chez ce mutant de deux populations de grains d'amidon. Il est également possible d'observer un tel phénotype chez les poacées. Pour ces espèces, l'amidon de réserve s'accumule selon une distribution bimodale. On distingue alors deux types de grains d'amidon, les grains de type A dont le diamètre est compris entre 12 et 20  $\mu\text{m}$  et des grains plus petits de type B, d'une taille allant de 2 à 8  $\mu\text{m}$ . Mais la taille n'est pas la seule différence entre ces deux populations, qui arborent une composition, une structure et une cristallinité différente (Bechtel et al., 1990; Bertolini et al., 2003; Geera et al., 2006; Salman et al., 2009; Soulaka et Morrison, 1985).

Nous nous sommes donc attachés à caractériser les deux populations de grains d'amidon du mutant *bsg1*, dans le but de mieux comprendre les mécanismes permettant au gène *BSG1* d'exercer sa fonction. Cependant cette démarche nécessite de pouvoir séparer les grains en fonction de leur taille.

### 1) Semi-purification des deux populations de grains

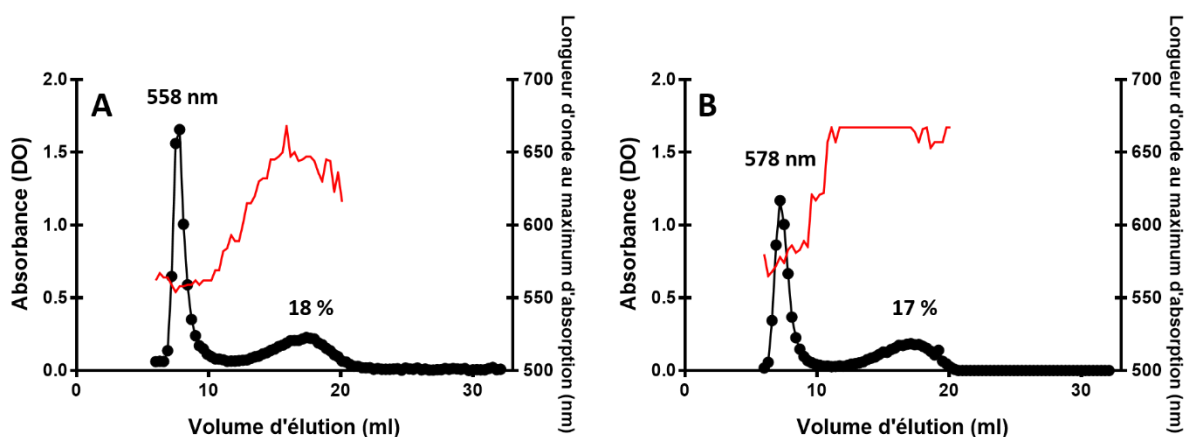
La séparation des deux types de grains du mutant *bsg1* a été réalisée à partir d'amidon extrait de cultures de 5 jours en milieu carencé en azote. L'amidon maintenu en suspension dans l'eau, a ensuite été tamisé à travers un filtre avec des pores de 0,8  $\mu\text{m}$ . Cette méthode permet alors de récupérer à travers le filtre la petite population de grain du mutant *bsg1* purifiée. L'opération a été répétée jusqu'à obtenir, dans la partie retenue par le filtre, un enrichissement en gros grains suffisant pour considérer la petite population comme négligeable (Fig. 49).



**Figure 49 : Semi-purification des deux populations de grains d'amidon du mutant *bsg1*.** Après 5 jours de culture en condition de carence en azote, l'amidon du mutant *bsg1* a été extrait et purifié. L'analyse au compteur de particules permet de révéler les deux populations de grains qu'il contient (en rouge). En faisant passer la suspension d'amidon à travers un filtre de 0,8  $\mu\text{m}$ , il est alors possible de récupérer la petite population de grains (en gris). En répétant l'opération il est possible d'éliminer la majorité des petits grains d'amidon dans la partie retenue par le filtre, jusqu'à obtenir un enrichissement en gros grains (en noir). Le résultat est exprimé en pourcentage relatif de particules (en ordonnée) en fonction de leur diamètre borné de 0,5 à 5  $\mu\text{m}$  (en abscisse).

## 2) Analyses des deux populations par chromatographies d'exclusion stérique

Une fois la séparation effectuée, les deux populations de grains ont été analysées par gel filtration sur une colonne de sépharose CL-2B (Fig. 50). Les résultats indiquent que la petite population de grains a un profil similaire à celui observé pour l'amidon de réserve natif avant la séparation des grains (Fig. 32 B et 50 A), avec une valeur de  $\lambda_{\max}$  au pic d'amylopectine de 558 nm. En revanche pour la grande population de grains cette valeur est bien supérieure avec 578 nm, l'approchant d'avantage des profils obtenus à partir d'amidon pyrénoidal. Il faut noter qu'il existe néanmoins une différence majeure avec l'amidon pyrénoidal qui ne contient que très peu d'amylose alors que la grande population de grains en contient  $17 \pm 1 \%$  (selon 3 dosages indépendants) (Fig. 32 D et 50 B).



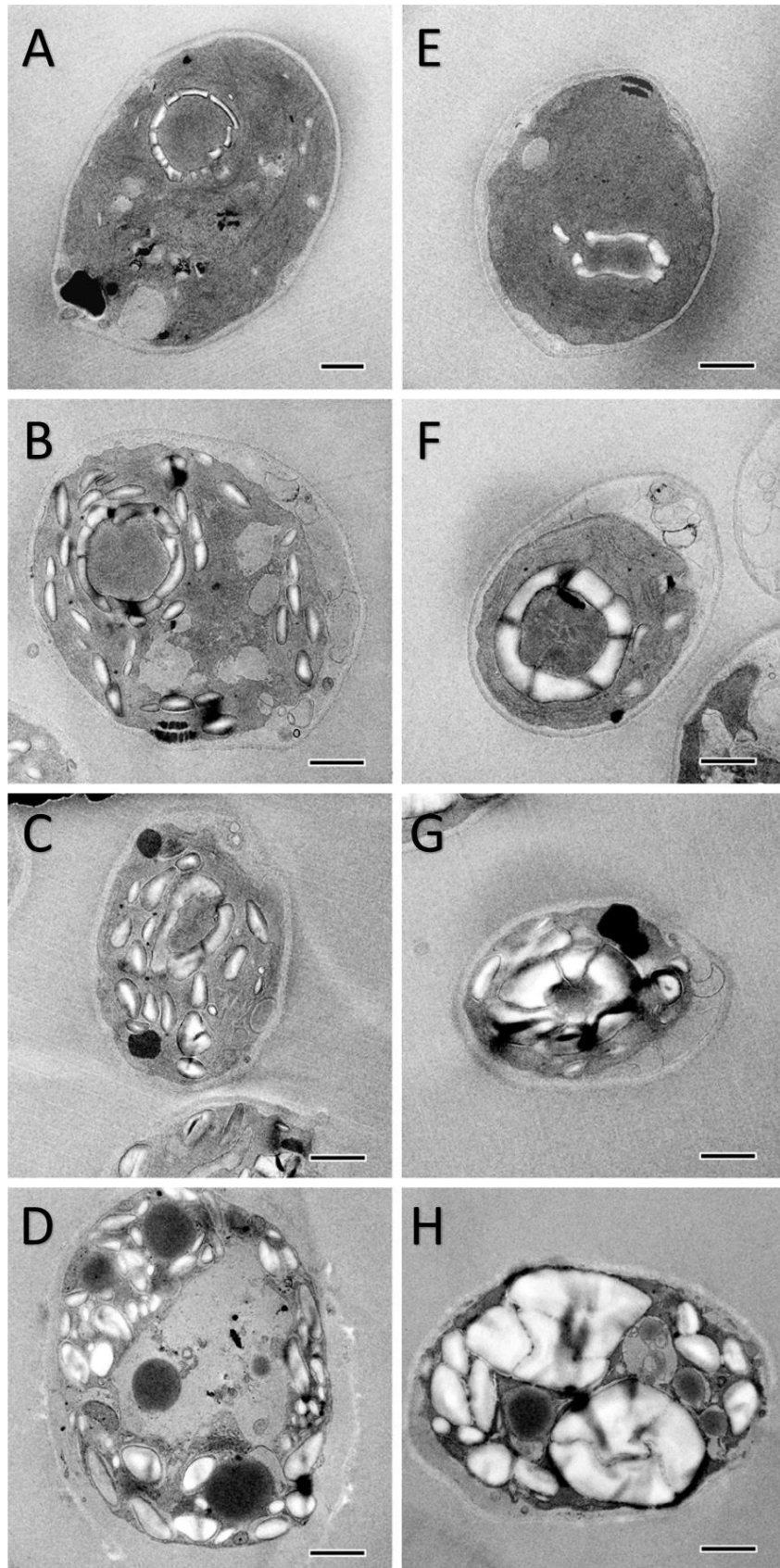
**Figure 50 : Séparation de l'amylose et de l'amylopectine par gel filtration.** La petite population de grains du mutant *bsg1* (A) et la grande (B) ont été purifiées à partir de cultures en carence azotée, séparées par filtration, puis déposés sur une colonne de sépharose CL-2B. Les profils obtenus indiquent la densité optique maximale (DO, cercles noirs) enregistrée pour chaque fraction à la longueur d'onde correspondante (en rouge). La valeur de la longueur d'onde au maximum d'absorption correspondant au pic d'amylopectine ainsi que le ratio amylose/amylopectine sont indiqués.

## 3) Observations par microscopie électronique à transmission

Etant donné que d'une part, la grande population de grain d'amidon du mutant *bsg1* n'est détectée qu'à partir d'amidon issu de culture en milieu carencé, et d'autre part que nos observations sur les profils de chromatographie semblent associer la grande population à de l'amidon pyrénoidal, et la petite à de l'amidon de réserve stromal ; nous avons entrepris de réaliser des coupes de *C. reinhardtii* au moment de la transition d'un milieu non carencé (TAP+N) vers un milieu carencé en azote (TAP-N). Ces coupes ont pu être observées en microscopie électronique à transmission (Fig. 51). Après 3 jours de culture en milieu TAP+N et sous lumière continue, les cellules ont été transférées en milieu TAP-N et prélevées après 8, 24 et 120 heures de culture dans ces conditions. Au moment où la carence azotée survient, les cellules commencent à établir des réserves énergétiques et arrêtent leurs activités dont l'activité photosynthétique. En effet, dans ces conditions les thylakoïdes qui portent les photosystèmes sont désagrégés. De même on observe dans ces cellules la disparition progressive de l'amidon pyrénoidal au profit d'un amidon de réserve dans le stroma. Ainsi on peut observer chez la souche sauvage, des grains d'amidon entourant le pyrénophage quand les

cellules sont cultivées en condition standard (Fig. 51 A). Après 8 heures de culture en milieu carencé, l'amidon pyrénéoïdal persiste, mais on voit également apparaître des grains d'amidon dans le stroma du chloroplaste (Fig. 51 B). L'amidon pyrénéoïdal devient plus difficile à observer après 24 heures de carence, et n'est plus du tout visible après 5 jours (Fig. 51 C et D). En revanche, les observations faites sur le mutant *bsg1* montrent un autre destin de son amidon pyrénéoïdal. En effet, les grains d'amidon entourant le pyrénéoïde semblent grossir au fil du temps. Déjà après 8 heures de carence les grains d'amidon autour du pyrénéoïde semblent plus gros (Fig. 51 E et F). Notons également que l'on voit moins de grains d'amidon apparaître dans le stroma que dans le cas de la souche sauvage (Fig. 51 B et F). Après 24 heures de carence, les deux populations de grains du mutant *bsg1* sont déjà visibles. L'amidon pyrénéoïdal semble représenter à lui seul la grande population de grain, et l'amidon stromal la plus petite (Fig. 51 G). Après 5 jours de carence, la différence entre les grains d'amidon des souches sauvage et mutante apparaît évidente. On distingue très clairement chez le mutant les deux populations de grains, et la distribution unimodale chez le sauvage (Fig. 51 D et H).

Grâce aux images de microscopie fournies par le CERMAV, nous avons pu compter pour les deux souches le nombre de grains moyen par cellule en s'appuyant sur 20 images de cellules indépendantes après 5 jours de carence. Il en résulte que le nombre moyen de grain d'amidon dans la souche mutante est inférieur à celui de la souche sauvage avec respectivement  $11 \pm 4$  contre  $30 \pm 8$  grains d'amidon par cellule.



**Figure 51** : Observations de coupes de *C. reinhardtii* lors de la carence azotée. Les souches sauvage (137C A-D) et mutante (*bsg1* E-H) ont été cultivées en milieu non-carencé (A et E) pendant 3 jours, puis transférées dans un milieu carencé en azote (TAP-N). Les cellules ont été prélevées après 8 heures (B et F), 24 heures (C et G), et 5 jours (D et H) de culture en milieu carencé. Barre d'échelle = 1 µm.

---

## DISCUSSION

---

### A. Le mutant *bsg1* accumule des grains d'amidon de taille anormale

Le travail effectué nous a permis de caractériser le mutant *bsg1*, lequel est issu d'une campagne de mutagenèse à partir de la souche sauvage 137C. En comparaison avec cette souche de référence nous avons pu montrer que le mutant *bsg1* présentait plusieurs phénotypes. Dans un premier temps ce mutant a été identifié comme déficient pour la dégradation de l'amidon, comme le montre le crible à l'iode en deux étapes (Fig. 29) et les cinétiques de dégradation de ce polysaccharide (Fig. 31). Ces dernières nous ont d'ailleurs permis de chiffrer cette défektivité en comparant les taux de dégradation qui s'élevèrent à  $1,47 \pm 0,10 \mu\text{g d'amidon dégradé} \cdot 10^{-6} \text{ cellules.heure}^{-1}$  pour la souche sauvage contre seulement  $0,29 \pm 0,14 \mu\text{g d'amidon dégradé} \cdot 10^{-6} \text{ cellules.heure}^{-1}$  pour le mutant.

Une autre caractéristique de ce mutant était également visible sur le crible à l'iode, puisque les colorations des plages cellulaires semblaient indiquer que le mutant accumulait moins de polysaccharide que la souche sauvage (Fig. 29). Ce phénotype, plutôt inattendu de la part d'un mutant dont la voie de dégradation de l'amidon est défective, a pourtant pu être confirmé par plusieurs séries de dosages. Ces derniers montrent effectivement, que le mutant *bsg1* est sous-producteur, quelles que soient les conditions de cultures (Tableau 6).

De leur côté, les caractérisations biochimiques nous ont appris que la structure de l'amylopectine, le constituant majoritaire de l'amidon, était modifiée chez ce mutant. En effet, les analyses par chromatographies d'exclusion stérique révèlent une modification de 10 nm de la valeur de la  $\lambda_{\text{max}}$  au pic d'amylopectine en faveur du mutant. Or cette valeur reflète l'état structural du polysaccharide. Ce phénotype a d'ailleurs été confirmé en comparant les distributions en longueur de chaînes, obtenues par HPAEC-PAD sur les amylopectines purifiées et débranchées des deux souches (Fig. 33). Ces dernières nous apprennent que l'amylopectine du mutant possède moins de chaînes courtes (DP 4 à 9) et un peu plus de chaînes moyennes (DP 10 à 20) que celle de la souche sauvage. Ce résultat semblait d'ailleurs être en corrélation avec les observations faites sur les gels d'activités. En effet, les zymogrammes permettant de révéler les activités synthèses des souches sauvage et mutante, indiquaient une altération de l'activité de l'amidon synthase 1 (SS1) chez le mutant *bsg1* (Fig. 34). Or cette enzyme est décrite comme étant impliquée dans l'élongation des chaînes courtes de l'amylopectine (Delvallé et al., 2005; Fujita et al., 2006; McMaugh et al., 2014).

Le dernier phénotype caractérisant le mutant *bsg1*, est la coexistence de deux populations de grains d'amidon de tailles distinctes, l'une de  $0,78 \pm 0,04 \mu\text{m}$  et l'autre de  $1,84 \pm 0,04 \mu\text{m}$  de diamètre. Ce phénotype n'est pas sans rappeler les deux types de grains qu'il est possible d'observer dans les organes de réserve des poacées comme le blé, l'orge, le seigle et le sorgho (Burton et al., 2002; Chia et al., 2017; Soulaka et Morrison, 1985). Ce phénotype est totalement inédit chez l'organisme *Chlamydomonas reinhardtii*, et pourrait nous permettre d'appréhender des mécanismes encore inconnus intervenant dans la détermination de la taille des grains d'amidon.

## **1) Plusieurs phénotypes du mutant sont associés à la délétion d'une région du chromosome 2**

L'ensemble de ces phénotypes semble être lié à la mutation par insertion d'une cassette de résistance à la paromomycine. Les analyses de biologie moléculaire nous ont apporté plus de détails sur cette mutation. Pour commencer, le lieu de l'insertion a pu être identifié par TAIL-PCR et des alignements de séquences. Ces derniers révèlent que la cassette de résistance interrompt le gène au locus *Cre02.g091750*, 11 nucléotides avant son codon stop. Cependant le génotypage effectué par PCR, dont le but initial était de tester l'intégrité du gène, nous a permis de découvrir la délétion de deux autres gènes en amont du locus *Cre02.g091750* (Fig. 37).

Les analyses de coségrégation effectuées sur les descendants méiotiques de 7 tétrades, issues du croisement entre le mutant *bsg1* et une souche sauvage de polarité sexuelle opposée (37c1), ont permis d'observer dans la descendance la répartition des phénotypes parentaux. Dans un premier temps, la coségrégation systématique de la résistance à la paromomycine avec la mutation localisée sur le chromosome 2, nous a permis de conclure qu'une seule copie fonctionnelle de la cassette de résistance s'était insérée dans le génome de la souche mutante. Ensuite, nous avons également pu observer que tous les descendants porteurs de la mutation dégradent difficilement leur amidon par rapport à leurs homologues sauvages (Fig. 41). Tous les descendants mutants présentaient également une modification structurale de l'amylopectine similaire à celle de la souche mutante d'origine (*bsg1*) révélée par les distributions en longueur de chaînes, (Fig. 40). Enfin la distribution bimodale des grains d'amidon est également retrouvée chez tous les descendants mutants (Fig. 42). Ces résultats confirment donc un lien génétique entre la délétion de la région du chromosome 2 et ces trois phénotypes.

A l'inverse, aucun lien n'a pu être démontré entre la délétion des trois gènes et le défaut d'accumulation du polysaccharide après 5 jours de culture en milieu carencé ou avec le défaut d'activité de l'amidon synthase 1 (Fig. 43).

## **2) Le gène *BSG1* est responsable de la distribution anormale des grains d'amidon**

A ce stade, nous avons donc trois phénotypes liés à l'amidon qui semblent être dépendants de l'expression des gènes affectés par la mutation du chromosome 2. Sur les trois loci affectés par la délétion, seul le gène au locus *Cre02.g091750* est présumé capable d'avoir une fonction associée à l'amidon. En effet, ce gène code une protéine prédite de 792 acides aminés et les outils de prédiction comme ChloroP détectent, sur la base de cette séquence protéique, un peptide d'adressage de la protéine au chloroplaste de 50 acides aminés. La base de données Phytozome décrit cette protéine comme étant une PWD, une enzyme impliquée dans l'initiation de la dégradation de l'amidon. Cependant, la protéine ne possède pas la séquence consensuelle codant un résidu histidine indispensable à l'activité des dikinases. Toutefois l'annotation de la protéine comme étant une dikinase par Phytozome provient des similitudes du domaine CBM20 de liaison à l'amidon porté par la région N-terminale de la protéine et retrouvé sur les PWD. Enfin, trois outils de prédiction (Marcoil, PairCoil2 et PCOILS (Delorenzi et Speed, 2002; Gruber et al., 2006; McDonnell et al., 2006; Zimmermann et al.,

2018) indiquent l'existence chez cette protéine d'un domaine en super-hélices entre les résidus 300 et 380 (Tableau 7). Cette structure est également retrouvée chez les protéines de la famille des PTST (« *Protein targeting to starch* ») permettant les interactions protéine-protéine avec la GBSS (Seung et al., 2015) ou avec SS4 (Seung et al., 2017, 2018).

L'ensemble de ces éléments fait du gène au locus *Cre02.g091750*, un bon candidat pour expliquer les phénotypes observés chez le mutant *bsg1* et les descendants porteurs de la mutation. De façon attendue la complémentation fonctionnelle permet de rétablir l'expression de ce gène (Fig. 46), et autorise également la souche mutante à revenir à une distribution unimodale de ses grains d'amidon (Fig. 44 et 45). Ce résultat permet d'entériner définitivement la responsabilité du gène au locus *Cre02.g091750* sur ce phénotype et ce gène a été renommé *BSG1*. Par contre, l'expression du gène *BSG1* dans la souche mutante ne permet pas de corriger les deux autres phénotypes qui coségréguaient avec la mutation dans la descendance (Fig. 47 et 48).

A ce stade, nous ne pouvons pas exclure que le défaut de dégradation de l'amidon et la modification structurale de l'amylopectine, observés chez le mutant *bsg1* et les descendants méiotiques porteurs de la mutation, puissent être liés à l'absence des deux autres loci en amont du gène *BSG1*. Par exemple, le locus *Cre02.g091850* décrit comme une méthylglutaconyl-CoA hydratase semble être impliqué dans la voie métabolique conduisant à la dégradation des leucines. Il est donc possible que son absence ait des conséquences sur l'ensemble du métabolisme cellulaire, et donc sur le métabolisme de l'amidon.

Une autre explication pourrait également être liée aux conditions de la complémentation. En effet, la construction du vecteur de complémentation utilisé, place l'expression du gène *BSG1* sous le contrôle d'un promoteur fort (*pPSAD*). Une hypothèse concevable serait que l'expression non-physiologique du gène *BSG1* ne permette pas de corriger ces phénotypes.

## **B. Le gène *BSG1* est impliqué dans la transition du métabolisme d'un amidon pyrénoidal vers celui d'un amidon de réserve quand les conditions de culture deviennent défavorables**

Bien que la protéine *BSG1* soit désormais connue pour être impliquée dans le déterminisme de la taille des grains d'amidon lors des cultures en conditions carencées, nous ne connaissons toujours pas les mécanismes lui permettant d'assurer ce rôle. De plus, aucun orthologue du gène *BSG1* n'a été identifié chez les espèces végétales supérieures, et les protéines qui partagent quelques homologues de séquences sont des protéines appartenant à d'autres algues proches de *C. reinhardtii* comme *Volvox carteri*. Ces informations suggèrent que la protéine est spécifique aux microalgues, mais nous privent de points de comparaison qui auraient pu être utiles pour déterminer la fonction de la protéine.

Toutefois, nous savons que la distribution bimodale des grains d'amidon du mutant, n'apparaît que dans les cultures en milieu carencé. D'ailleurs le niveau de transcription du gène *BSG1*, semble être plus important dans les cultures carencées que dans les conditions standard selon Algaepath (<http://algaepath.itps.ncku.edu.tw/index.html>) (Zheng et al., 2014). De plus, les analyses comparatives entre les deux populations de grains du mutant *bsg1*, associent la grande population de grain à de l'amidon pyrénoidal, et la petite population à de l'amidon de réserve. En effet, l'amylopectine issue des gros grains d'amidon affiche une valeur



de  $\lambda_{\max}$  typique de l'amidon pyrénoidal, et inversement l'amylopectine issue de la petite population de grain affiche une valeur de  $\lambda_{\max}$  correspondant à la valeur observée à partir d'amidon de réserve (Fig. 32 et 50). Ces éléments semblent donc indiquer un rôle de la protéine BSG1 dans la transition, permettant de passer d'un amidon pyrénoidal à un amidon de réserve, quand les conditions de cultures passent d'un milieu standard à un milieu carencé en azote. Ce sont finalement, les apports de la microscopie électronique sur des coupes de *C. reinhardtii*, qui nous ont permis de le démontrer. En effet, après le transfert des cellules dans un milieu carencé, on voit rapidement apparaître des grains d'amidon dans le stroma de la souche sauvage, tandis que l'amidon pyrénoidal disparaît progressivement (Fig. 51 A-D). A l'inverse, l'amidon pyrénoidal de la souche mutante est maintenu et continue sa croissance, donnant naissance à la grande population de grain, tandis que l'amidon stromal forme des grains de taille normale (Fig. 51 E-H).

Les différents domaines détectés ou prédits sur la protéine BSG1 peuvent nous aider à comprendre son mode d'action. Nous avons vu qu'une structure en super-hélices est prédite, avec de bons indices de confiance, dans la région bornée par les acides-aminés 300 et 380 (Tableau 7). Il est intéressant de noter que cette structure est caractéristique des domaines d'interaction protéine-protéine dans la famille des PTST. Or, un orthologue de PTST2 que l'on trouve dans le riz, nommé FLO6, semble pouvoir interagir avec l'enzyme de débranchement ISA1, et influencer la quantité d'amidon produit mais aussi la morphologie du grain d'amidon (Peng et al., 2014). Ajoutons à cela que le module de liaison aux carbohydrates (CBM48) des protéines de la famille PTST, est un domaine considéré comme très proche du domaine CBM20 de la protéine BSG1. En effet, ces deux domaines partagent des similitudes dans leur séquence, leur structure et leur mode d'interaction avec les glucides, et pourraient avoir un ancêtre commun (Janeček et al., 2011). Il est donc possible que la protéine BSG1 ait un fonctionnement similaire aux protéines PTST, et qu'elle permette de mobiliser des enzymes du métabolisme et de les conduire jusqu'à leur substrat. On pourrait alors imaginer que la protéine BSG1 délocalise les enzymes clés de la synthèse de l'amidon du pyrénoidé vers le stroma quand la cellule est confrontée à une carence, ce qui pourrait expliquer le nombre restreint de grains d'amidon observés en l'absence de la protéine chez le mutant.

Récemment il a été montré que la protéine BSG1 figure parmi les 190 protéines composant le protéome du pyrénoidé chez *C. reinhardtii* (Zhan et al., 2018). Cette observation confirme sa localisation dans le chloroplaste et suggère qu'elle puisse avoir un rôle dans le métabolisme de l'amidon pyrénoidal. Dans ce cas, il est possible que la protéine BSG1 intervienne dans la mobilisation des enzymes de la voie catabolique, et qu'elle soit responsable de la disparition progressive de l'amidon pyrénoidal lors de la carence, comme on peut l'observer chez la souche sauvage. Son absence dans la souche mutante expliquerait alors le maintien de l'amidon pyrénoidal et la poursuite de sa synthèse donnant naissance à la grande population de grain.

Remarquons enfin, que ces deux théories ne sont pas mutuellement exclusives. Bien que ce soit peu probable BSG1 pourrait intervenir à la fois, dans la dégradation de l'amidon pyrénoidal en s'associant avec des enzymes du catabolisme, et dans la synthèse de l'amidon stromal en s'associant avec des enzymes intervenant *a priori* dans les étapes précoces de la synthèse du grain.

Pour pouvoir établir le fonctionnement de la protéine BSG1 dans ce contexte d'adaptation de la microalgue à son environnement des caractérisations supplémentaires sont nécessaires. Il serait notamment intéressant de connaître la liste des interactants protéiques de BSG1, pour pouvoir départager les hypothèses formulées.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Abad, M.C., Binderup, K., Rios-Steiner, J., Arni, R.K., Preiss, J., et Geiger, J.H. (2002). The X-ray Crystallographic Structure of Escherichia coli Branching Enzyme. *J. Biol. Chem.* 277, 42164-42170.
- Adair, W.S. (1985). Characterization of Chlamydomonas sexual agglutinins. *J. Cell Sci. Suppl.* 2, 233-260.
- Alonso-Casajus, N., Dauvillee, D., Viale, A.M., Munoz, F.J., Baroja-Fernandez, E., Moran-Zorzano, M.T., Eydallin, G., Ball, S., et 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, 5266-5272.
- Andriotis, V.M.E., Saalbach, G., Waugh, R., Field, R.A., et Smith, A.M. (2016). The Maltase Involved in Starch Metabolism in Barley Endosperm Is Encoded by a Single Gene. *PLoS One* 11, e0151642.
- Asatsuma, S., Sawada, C., Itoh, K., Okito, M., Kitajima, A., et Mitsui, T. (2005). Involvement of  $\alpha$ -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 46, 858-869.
- Baba, T., et Kainuma, K. (1987). Partial Hydrolysis of Sweet-potato Starch with  $\beta$ -Amylase. *Agric. Biol. Chem.* 51, 1365-1371.
- Babu, R.P., O'Connor, K., et Seeram, R. (2013). Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Prog. Biomater.* 2, 8.
- Baena-González, E. (2010). Energy Signaling in the Regulation of Gene Expression during Stress. *Mol. Plant* 3, 300-313.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., et Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448, 938-942.
- Bak-Jensen, K.S., Laugesen, S., Østergaard, O., Finnie, C., Roepstorff, P., et Svensson, B. (2007). Spatio-temporal profiling and degradation of  $\alpha$ -amylase isozymes during barley seed germination. *FEBS J.* 274, 2552-2565.
- Ball, S.G., et 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., Marianne, T., Dirick, L., Fresnoy, M., Delrue, B., et Decq, A. (1991). A Chlamydomonas reinhardtii low-starch mutant is defective for 3-phosphoglycerate activation and orthophosphate inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 185, 17-26.
- Ball, S., Guan, H.-P., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., et Preiss, J. (1996). From Glycogen to Amylopectin: A Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Cell* 86, 349-352.
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J.N., et Tirtiaux, C. (2011). The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J. Exp. Bot.* 62, 1775-1801.

- Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y., Schürmann, P., et Preiss, J. (2000). Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* *275*, 1315-1320.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A., et Preiss, J. (2003). ADP-Glucose Pyrophosphorylase, a Regulatory Enzyme for Bacterial Glycogen Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *67*, 213-225.
- Banks, W., Greenwood, C.T., et Walker, J.T. (1971a). Studies on the Starches of Barley Genotypes. A Comparison of the Starches from Normal and High-Amylose Barley. *Starch - Stärke* *23*, 12-15.
- Banks, W., Greenwood, C.T., et Khan, K.M. (1971b). The interaction of linear, amylose oligomers with iodine. *Carbohydr. Res.* *17*, 25-33.
- Baunsgaard, L., Lütken, H., Mikkelsen, R., Glaring, M.A., Pham, T.T., et 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*, 595-605.
- Bayer, R.G., Stael, S., Rocha, A.G., Mair, A., Vothknecht, U.C., et Teige, M. (2012). Chloroplast-localized protein kinases: a step forward towards a complete inventory. *J. Exp. Bot.* *63*, 1713-1723.
- Bechtel, D.B., Zayas, I., Kaleikau, L., et Pomeranz, Y. (1990). Size-distribution of wheat starch granules during endosperm development. *Cereal Chem.* *67*, 59-63.
- Beck, E., et Ziegler, P. (1989). Biosynthesis and Degradation of Starch in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *40*, 95-117.
- Berthold, P., Schmitt, R., et Mages, W. (2002). An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* *153*, 401-412.
- Bertoft, E. (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy* *7*, 56.
- Bertolini, A.C., Souza, E., Nelson, J.E., et Huber, K.C. (2003). Composition and Reactivity of A- and B-type Starch Granules of Normal, Partial Waxy, and Waxy Wheat. *Cereal Chem. J.* *80*, 544-549.
- Bhattacharyya, M.K., Smith, A.M., Ellis, T.H.N., Hedley, C., et 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*, 115-122.
- Blaby, I.K., Blaby-Haas, C.E., Tourasse, N., Hom, E.F.Y., Lopez, D., Aksoy, M., Grossman, A., Umen, J., Dutcher, S., Porter, M., et al. (2014). The *Chlamydomonas* genome project: a decade on. *Trends Plant Sci.* *19*, 672-680.
- Blazek, J., Salman, H., Rubio, A.L., Gilbert, E., Hanley, T., et Copeland, L. (2009). Structural characterization of wheat starch granules differing in amylose content and functional characteristics. *Carbohydr. Polym.* *75*, 705-711.
- Blennow, A., Nielsen, T.H., Baunsgaard, L., Mikkelsen, R., et Engelsen, S.B. (2002). Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci.* *7*, 445-450.

- Blennow, A., Sjöland, A.K., Andersson, R., et Kristiansson, P. (2005). The distribution of elements in the native starch granule as studied by particle-induced X-ray emission and complementary methods. *Anal. Biochem.* *347*, 327-329.
- Boisson, M., Gomord, V., Audran, C., Berger, N., Dubreucq, B., Granier, F., Lerouge, P., Faye, L., Caboche, M., et Lepiniec, L. (2001). Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development. *EMBO J.* *20*, 1010-1019.
- Boos, W., et Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of Escherichia coli: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 204-229.
- Borén, M., Larsson, H., Falk, A., et 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., et Whelan, W.J. (1975). The mechanism of branching enzyme action and its influence on the structure of amylopectin. *Biochem. Soc. Trans.* *3*, 48-49.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., et Chabot, J.F. (1972). Chloroplast Ribosome Deficient Mutants in the Green Alga Chlamydomonas Reinhardi and the Question of Chloroplast Ribosome Function. *J. Cell Sci.* *10*.
- Boynton, J.E., Harris, E.H., Burkhart, B.D., Lamerson, P.M., et Gillham, N.W. (1987). Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of Chlamydomonas. *Genetics* *84*, 2391-2395.
- Brust, H., Lehmann, T., D’Hulst, C., et Fettke, J. (2014). Analysis of the Functional Interaction of Arabidopsis Starch Synthase and Branching Enzyme Isoforms Reveals that the Cooperative Action of SSI and BEs Results in Glucans with Polymodal Chain Length Distribution Similar to Amylopectin. *PLoS One* *9*, e102364.
- Buchmann, K., et Becker, B. (2009). The System of Contractile Vacuoles in the Green Alga Mesostigma viride (Streptophyta). *Protist* *160*, 427-443.
- Buleon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, G., D’Hulst, C., Kossmann, J., et 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.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., et Ball, S. (1998). Mini review Starch granules: structure and biosynthesis.
- Burton, R.A., Bewley, J.D., Smith, A.M., Bhattacharyya, M.K., Tatge, H., Ring, S., Bull, V., Hamilton, W.D.O., et Martin, C. (1995). Starch branching enzymes belonging to distinct enzyme families are differentially expressed during pea embryo development. *Plant J.* *7*, 3-15.
- Burton, R.A., Jenner, H., Carrangis, L., Fahy, B., Fincher, G.B., Hylton, C., Laurie, D.A., Parker, M., Waite, D., van Wegen, S., et al. (2002). Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J.* *31*, 97-112.
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C.M., Seale, R., Nebane, N.M., Edwards, A., Martin, C., et 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.

- Cao, H., Imparl-Radosevich, J., Guan, H., Keeling, P.L., James, M.G., et Myers, A.M. (1999). Identification of the Soluble Starch Synthase Activities of Maize Endosperm. *Plant Physiol.* *120*, 205-216.
- Carciofi, M., Blennow, A., Jensen, S.L., Shaik, S.S., Henriksen, A., Buléon, A., Holm, P.B., et Hebelstrup, K.H. (2012). Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. *BMC Plant Biol.* *12*, 223.
- Cavalier-Smith, T. (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *361*, 969-1006.
- Cenci, U., Nitschke, F., Steup, M., Minassian, B.A., Colleoni, C., et Ball, S.G. (2014). Transition from glycogen to starch metabolism in Archaeplastida. *Trends Plant Sci.* *19*, 18-28.
- Chatterjee, M., Berbezy, P., Vyas, D., Coates, S., et 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.
- Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M.G., et Roach, P.J. (1995). Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6632-6640.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S.C., Smith, S.M., et 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.
- Chia, T., Adamski, N.M., Saccomanno, B., Greenland, A., Nash, A., Uauy, C., et Trafford, K. (2017). Transfer of a starch phenotype from wild wheat to bread wheat by deletion of a locus controlling B-type starch granule content. *J. Exp. Bot.* *68*, 5497-5509.
- Cho, M.-H., Lim, H., Shin, D.H., Jeon, J.-S., Bhoo, S.H., Park, Y.-I., et 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*, 101-112.
- Colleoni, C., Dauvillée, D., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D., Bouchet, B., Morell, M., Samuel, M., Delrue, B., D'Hulst, C., et al. (1999). Genetic and Biochemical Evidence for the Involvement of  $\alpha$ -1,4 Glucanotransferases in Amylopectin Synthesis. *Plant Physiol.* *120*, 993-1004.
- Comparot-Moss, S., Kötting, O., Stettler, M., Edner, C., Graf, A., Weise, S.E., Streb, S., Lue, W.-L., MacLean, D., Mahlow, S., et al. (2010). A putative phosphatase, LSF1, is required for normal starch turnover in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol.* *152*, 685-697.
- Conde-Petit, B., Escher, F., et Nuessli, J. (2006). Structural features of starch-flavor complexation in food model systems. *Trends Food Sci. Technol.* *17*, 227-235.
- Copeland, L., et Preiss, J. (1981). Purification of Spinach Leaf ADPglucose Pyrophosphorylase'.
- Coppin, A., Varré, J.-S., Lienard, L., Dauvillée, D., Guérardel, Y., Soyer-Gobillard, M.-O., Buléon, A., Ball, S., et Tomavo, S. (2005). Evolution of Plant-Like Crystalline Storage Polysaccharide in the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* Argues for a Red Alga Ancestry. *J. Mol. Evol.* *60*, 257-267.

- Cordenunsi, B.R., et Simão, R.A. (2009). Chapter Characterization of starch granules: An atomic force microscopy approach. In *Starches: Characterization, Properties, and Applications*, (CRC Press), p. 33-44.
- Coutinho, P.M., Deleury, E., Davies, G.J., et Henrissat, B. (2003). An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J. Mol. Biol.* **328**, 307-317.
- Craig, J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L., et Smith, A.M. (1998). Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* **10**, 413-426.
- Crevillén, P., Ballicora, M.A., Mérida, Á., Preiss, J., et Romero, J.M. (2003). The Different Large Subunit Isoforms of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose Pyrophosphorylase Confer Distinct Kinetic and Regulatory Properties to the Heterotetrameric Enzyme. *J. Biol. Chem.* **278**, 28508-28515.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., et Smith, S.M. (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**, 89-100.
- Cross, F.R., et Umen, J.G. (2015). The *Chlamydomonas* cell cycle. *Plant J.* **82**, 370-392.
- Dauvillee, D., Kinderf, I.S., Li, Z., Kosar-Hashemi, B., Samuel, M.S., Rampling, L., Ball, S., et Morell, M.K. (2005). Role of the *Escherichia coli* *glgX* Gene in Glycogen Metabolism. *J. Bacteriol.* **187**, 1465-1473.
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Shaw, E., Mouille, G., D'Hulst, C., Morell, M., Samuel, M.S., Bouchet, B., Gallant, D.J., Sinskey, A., et al. (1999). Novel, starch-like polysaccharides are synthesized by an unbound form of granule-bound starch synthase in glycogen-accumulating mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **119**, 321-330.
- Dauvillée, D., Mestre, V., Colleoni, C., Slomianny, M.-C., Mouille, G., Delrue, B., D'Hulst, C., Bliard, C., Nuzillard, J.-M., et 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.
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Mouille, G., Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Morell, M.K., D'Hulst, C., Myers, A.M., et Ball, S.G. (2001a). Two loci control phytoglycogen production in the monocellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **125**, 1710-1722.
- Dauvillée, D., Colleoni, C., Mouille, G., Morell, M.K., D'Hulst, C., Wattedled, F., Liénard, L., Delvallé, D., Ral, J.P., Myers, A.M., et al. (2001b). 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.
- Dauvillée, D., Chochois, V., Steup, M., Haebel, S., Eckermann, N., Ritte, G., Ral, J.-P., Colleoni, C., Hicks, G., Wattedled, F., et al. (2006). Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **48**, 274-285.
- Delatte, T., Umhang, M., Trevisan, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, S.M., et Zeeman, S.C. (2006). Evidence for Distinct Mechanisms of Starch Granule Breakdown in Plants. *J. Biol. Chem.* **281**, 12050-12059.

- Delgado, I.J., Wang, Z., de Rocher, A., Keegstra, K., et Raikhel, N. V (1998). Cloning and characterization of AtRGP1. A reversibly autoglycosylated arabidopsis protein implicated in cell wall biosynthesis. *Plant Physiol.* *116*, 1339-1350.
- Delorenzi, M., et Speed, T. (2002). An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* *18*, 617-625.
- Delrue, B., Fontaine, T., Routier, F., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Van Den Koornhuyse, N., Maddelein, M.L., Fournet, B., et Ball, S. (1992). Waxy *Chlamydomonas reinhardtii*: monocellular algal mutants defective in amylose biosynthesis and granule-bound starch synthase activity accumulate a structurally modified amylopectin. *J. Bacteriol.* *174*, 3612-3620.
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., et al. (2005). Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* *43*, 398-412.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., et Smith, A.M. (1996). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.* *10*, 1135-1143.
- Denyer, K., Waite, D., Motawia, S., Møller, B.L., et Smith, A.M. (1999). Granule-bound starch synthase I in isolated starch granules elongates malto-oligosaccharides processively. *Biochem. J.* *340* ( Pt 1), 183-191.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaï, M., Bedu, M., Robaglia, C., et Meyer, C. (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* *8*, 864-870.
- Deschamps, P., Guillebeault, D., Devassine, J., Dauvillée, D., Haebel, S., Steup, M., Buléon, A., Putaux, J.-L., Slomianny, M.-C., Colleoni, C., et al. (2008a). The Heterotrophic Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* Defines a Model Genetic System To Investigate Cytoplasmic Starch Synthesis. *Eukaryot. Cell* *7*, 872-880.
- Deschamps, P., Moreau, H., Worden, A.Z., Dauvillee, D., et Ball, S.G. (2008b). Early Gene Duplication Within Chloroplastida and Its Correspondence With Relocation of Starch Metabolism to Chloroplasts. *Genetics* *178*, 2373-2387.
- Deschamps, P., Colleoni, C., Nakamura, Y., Suzuki, E., Putaux, J.-L., Buleon, A., Haebel, S., Ritte, G., Steup, M., Falcon, L.I., et al. (2008c). Metabolic Symbiosis and the Birth of the Plant Kingdom. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 536-548.
- Dinges, J.R. (2003). Mutational Analysis of the Pullulanase-Type Debranching Enzyme of Maize Indicates Multiple Functions in Starch Metabolism. *Plant Cell Online* *15*, 666-680.
- Dumez, S., Wattebled, F., Dauvillee, D., Delvalle, D., Planchot, V., Ball, S.G., et D'Hulst, C. (2006). Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation. *Plant Cell* *18*, 2694-2709.
- Dutcher, S.K., Power, J., Galloway, R.E., et Porter, M.E. (1991). Reappraisal of the Genetic Map of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Hered.* *82*, 295-301.



- Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L., et Kossmann, J. (1997). Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant J.* *12*, 323-333.
- Edner, C., Li, J., Albrecht, T., Mahlow, S., Hejazi, M., Hussain, H., Kaplan, F., Guy, C., Smith, S.M., Steup, M., et al. (2007). Glucan, water dikinase activity stimulates breakdown of starch granules by plastidial beta-amylases. *Plant Physiol.* *145*, 17-28.
- El-Khouly, M.E., El-Mohsnawy, E., et Fukuzumi, S. (2017). Solar energy conversion: From natural to artificial photosynthesis. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* *31*, 36-83.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., et Heijne, G. Von (1999). ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* *8*, 978-984.
- Eom, H., Chang, Y., Lee, E.-S., Choi, H.-D., et Han, J. (2018). Development of a starch/gum-based edible coating for rice cakes to retard retrogradation during storage. *LWT* *97*, 516-522.
- Ferris, P.J., Woessner, J.P., Waffenschmidt, S., Kilz, S., Drees, J., et Goodenough, U.W. (2001). Glycosylated Polyproline II Rods with Kinks as a Structural Motif in Plant Hydroxyproline-Rich Glycoproteins †. *Biochemistry* *40*, 2978-2987.
- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberger, P., et 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*, 568-585.
- Fettke, J., Chia, T., Eckermann, N., Smith, A., et Steup, M. (2006). A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J.* *46*, 668-684.
- Fincher, G.B. (2011). Biochemistry, Physiology, and Genetics of Endosperm Mobilization in Germinated Barley Grain. In *Barley*, (Oxford, UK: Wiley-Blackwell), p. 449-477.
- Findinier, J. (2015). La génétique formelle : un outil puissant pour la dissection de la dégradation de l'amidon chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Lille 1.
- Findinier, J., Tunçay, H., Schulz-Raffelt, M., Deschamps, P., Spriet, C., Lacroix, J.-M., Duchêne, T., Szydlowski, N., Li-Beisson, Y., Peltier, G., et al. (2017). The *Chlamydomonas mex1* mutant shows impaired starch mobilization without maltose accumulation. *J. Exp. Bot.* *68*, 5177-5189.
- Fischer, N., et Rochaix, J.D. (2001). The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics* *265*, 888-894.
- Fisher, D.K., Gao, M., Kim, K.-N., Boyer, C.D., et Guiltinan, M.J. (1996). Two closely related cDNAs encoding starch branching enzyme from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* *30*, 97-108.

- Fontaine, T., D'Hulst, C., Maddelein, M.L., Routier, F., Pépin, T.M., Decq, A., Wieruszeski, J.M., Delrue, B., Van den Koornhuysse, N., et Bossu, J.P. (1993). Toward an understanding of the biogenesis of the starch granule. Evidence that *Chlamydomonas* soluble starch synthase II controls the synthesis of intermediate size glucans of amylopectin. *J. Biol. Chem.* *268*, 16223-16230.
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G., et Noctor, G. (2009). Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* *60*, 455-484.
- Friedmann, I., Colwin, A.L., et Colwin, L.H. (1968). Fine-Structural Aspects of Fertilization in *Chlamydomonas Reinhardi*. *J. Cell Set* *3*, 115-128.
- Fu, Y., Ballicora, M.A., Leykam, J.F., et Preiss, J. (1998). Mechanism of Reductive Activation of Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* *273*, 25045-25052.
- Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H., et Nakamura, Y. (2006). Function and Characterization of Starch Synthase I Using Mutants in Rice. *Plant Physiol.* *140*, 1070-1084.
- Fujita, N., Yoshida, M., Kondo, T., Saito, K., Utsumi, Y., Tokunaga, T., Nishi, A., Satoh, H., Park, J.-H., Jane, J.-L., et al. (2007). Characterization of SSIIIa-Deficient Mutants of Rice: The Function of SSIIIa and Pleiotropic Effects by SSIIIa Deficiency in the Rice Endosperm. *Plant Physiol.* *144*, 2009-2023.
- Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., 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*, 1040-1058.
- Gallant, D.J., Bouchet, B., et Baldwin, P.M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization.
- Gámez-Arjona, F.M., Raynaud, S., Ragel, P., et Mérida, Á. (2014). Starch synthase 4 is located in the thylakoid membrane and interacts with plastoglobule-associated proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* *80*, 305-316.
- Gao, M., Fisher, D.K., Kim, K.N., Shannon, J.C., et Guiltinan, M.J. (1996). Evolutionary conservation and expression patterns of maize starch branching enzyme I and IIb genes suggests isoform specialization. *Plant Mol. Biol.* *30*, 1223-1232.
- Geera, B.P., Nelson, J.E., Souza, E., et Huber, K.C. (2006). Composition and Properties of A- and B-type Starch Granules of Wild-Type, Partial Waxy, and Waxy Soft Wheat. *Cereal Chem. J.* *83*, 551-557.
- Gentry, M.S., Downen, R.H., Worby, C.A., Mattoo, S., Ecker, J.R., et Dixon, J.E. (2007). The phosphatase laforin crosses evolutionary boundaries and links carbohydrate metabolism to neuronal disease. *J. Cell Biol.* *178*, 477-488.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., et Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J.* *278*, 3978-3990.

- Ghosh, H.P., et Preiss, J. (1966). Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase. A regulatory enzyme in the biosynthesis of starch in spinach leaf chloroplasts. *J. Biol. Chem.* *241*, 4491-4504.
- Gibon, Y., Pyl, E.-T., Sulpice, R., Lunn, J.E., Höhne, M., Günther, M., et Stitt, M. (2009). Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when *Arabidopsis* is grown in very short photoperiods. *Plant. Cell Environ.* *32*, 859-874.
- Gillmor, C.S., Poindexter, P., Lorieau, J., Palcic, M.M., et Somerville, C. (2002). Alpha-glucosidase I is required for cellulose biosynthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *J. Cell Biol.* *156*, 1003-1013.
- Glaring, M.A., Zygadlo, A., Thorneycroft, D., Schulz, A., Smith, S.M., Blennow, A., et 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*, 3949-3960.
- Glaring, M.A., Skryhan, K., Kötting, O., Zeeman, S.C., et Blennow, A. (2012). Comprehensive survey of redox sensitive starch metabolising enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* *58*, 89-97.
- Govons, S., Vinopal, R., et Ingraham, J. (1969). Isolation of Mutants of *Escherichia coli* B Altered in Their Ability to Synthesize Glycogen.
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., et Smith, A.M. (2010). Circadian control of carbohydrate availability for growth in *Arabidopsis* plants at night. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9458-9463.
- Grimaud, F., Rogniaux, H., James, M.G., Myers, A.M., et Planchot, V. (2008). Proteome and phosphoproteome analysis of starch granule-associated proteins from normal maize and mutants affected in starch biosynthesis. *J. Exp. Bot.* *59*, 3395-3406.
- Gruber, M., Söding, J., et Lupas, A.N. (2006). Comparative analysis of coiled-coil prediction methods. *J. Struct. Biol.* *155*, 140-145.
- Guan, H.P., et Preiss, J. (1993). Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* *102*, 1269-1273.
- Guan, H., Li, P., Imparl-Radosevich, J., Preiss, J., et Keeling, P. (1997). Comparing the properties of *Escherichia coli* branching enzyme and maize branching enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* *342*, 92-98.
- Guan, H.P., Baba, T., et Preiss, J. (1994). Expression of branching enzyme I of maize endosperm in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* *104*, 1449-1453.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., et Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* *290*, 2110-2113.
- Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *52*, 363-406.
- Harris, E.H. (2009a). The Genus *Chlamydomonas*. In *The Chlamydomonas Sourcebook*, E.H. Harris, D.B. Stern, et G.B.B.T.-T.C.S. (Second E. Witman, éd. (London: Elsevier), p. 1-24.

- Harris, E.H. (2009b). Cell Division. In *The Chlamydomonas Sourcebook*, E.H. Harris, D.B. Stern, et G.B.B.T.-T.C.S. (Second E. Witman, éd. (London: Elsevier), p. 65-87.
- Harris, E.H., Stern, D.B., et Witman, G.B. (2009). Chapter 8-Chlamydomonas in the laboratory. *Chlamydomonas Sourceb.* 241-302.
- Häusler, R.E., Schlieben, N.H., Schulz, B., et Flügge, U.I. (1998). Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta* **204**, 366-376.
- Heazlewood, J.L., Durek, P., Hummel, J., Selbig, J., Weckwerth, W., Walther, D., et Schulze, W.X. (2007). PhosPhAt: a database of phosphorylation sites in *Arabidopsis thaliana* and a plant-specific phosphorylation site predictor. *Nucleic Acids Res.* **36**, D1015-D1021.
- Heineke, D., Kruse, A., Flügge, U.-I., Frommer, W.B., Riesmeier, J.W., Willmitzer, L., et Heldt, H.W. (1994). Effect of antisense repression of the chloroplast triose-phosphate translocator on photosynthetic metabolism in transgenic potato plants. *Planta* **193**.
- Hejazi, M., Fettke, J., Haebel, S., Edner, C., Paris, O., Frohberg, C., Steup, M., et Ritte, G. (2008). Glucan, water dikinase phosphorylates crystalline maltodextrins and thereby initiates solubilization. *Plant J.* **55**, 323-334.
- Hejazi, M., Fettke, J., Kötting, O., Zeeman, S.C., et 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**, 711-722.
- Hejazi, M., Steup, M., et Fettke, J. (2012). The plastidial glucan, water dikinase (GWD) catalyses multiple phosphotransfer reactions. *FEBS J.* **279**, 1953-1966.
- Helle, S., Bray, F., Verbeke, J., Devassine, S., Courseaux, A., Facon, M., Tokarski, C., Rolando, C., et Szydlowski, N. (2018). Proteome Analysis of Potato Starch Reveals the Presence of New Starch Metabolic Proteins as Well as Multiple Protease Inhibitors. *Front. Plant Sci.* **9**.
- Hendriks, J.H.M. (2003). ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of *Arabidopsis* and Other Plant Species. *Plant Physiol.* **133**, 838-849.
- Herold, A., Leegood, R.C., McNeil, P.H., et Robinson, S.P. (1981). Accumulation of Maltose during Photosynthesis in Protoplasts Isolated from Spinach Leaves Treated with Mannose. *Plant Physiol.* **67**, 85-88.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* **147**, 342-347.
- Hong, S., et Preiss, J. (2000). Localization of C-Terminal Domains Required for the Maximal Activity or for Determination of Substrate Preference of Maize Branching Enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **378**, 349-355.
- Huber, K.C., et BeMiller, J.N. (2009). Modified starch. In *Starches: characterization, properties, and applications*, (CRC Press New York, NY, USA), p. 145-203.

- Van Hung, P., et Morita, N. (2005). Physicochemical properties of hydroxypropylated and cross-linked starches from A-type and B-type wheat starch granules. *Carbohydr. Polym.* *59*, 239-246.
- Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A.M., Martin, C., et al. (2003). Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* *15*, 133-149.
- Imberty, A., et Perez, S. (1988). A revisit to the three-dimensional structure of B-type starch. *Biopolymers* *27*, 1205-1221.
- Imberty, A., Chanzy, H., Pérez, S., Buléon, A., et Tran, V. (1988). The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Mol. Biol.* *201*, 365-378.
- Imberty, A., Buléon, A., Tran, V., et Pérez, S. (1991). Recent Advances in Knowledge of Starch Structure. *Starch - Stärke* *43*, 375-384.
- James, M.G. (1995). Characterization of the Maize Gene *sugary1*, a Determinant of Starch Composition in Kernels. *Plant Cell Online* *7*, 417-429.
- Jane, J., Xu, A., Radosavljevic, M., et Seib, P.A. (1992). Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross linking reagents. *Cereal Chem.* *69*, 405-409.
- Janeček, Š., Svensson, B., et MacGregor, E.A. (2011). Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme Microb. Technol.* *49*, 429-440.
- Jenkins, P.J., Cameron, R.E., et Donald, A.M. (1993). A Universal Feature in the Structure of Starch Granules from Different Botanical Sources. *Starch - Stärke* *45*, 417-420.
- Jossier, M., Bouly, J.-P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame Hardie, D., et Thomas, M. (2009). SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *59*, 316-328.
- Kadouche, D. (2016). The comparative biochemistry of storage polysaccharide metabolism in Chlamydiales and Cyanobacteria: insights into the evolution of glycogen and starch metabolism in Eukaryotes.
- Kaneko, T., Kihara, M., Ito, K., et Takeda, K. (2000). Molecular and chemical analysis of *ss*-amylase-less mutant barley in Tibet. *Plant Breed.* *119*, 383-387.
- Kaplan, F., et 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*, 730-743.
- Kindle, K.L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1228-1232.
- Kolbe, A., Tiessen, A., Schlupepmann, H., Paul, M., Ulrich, S., et Geigenberger, P. (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 11118-11123.

- Kötting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., et Ritte, G. (2005). Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol.* *137*, 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., et al. (2009). STARCH-EXCESS4 is a laforin-like Phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* *21*, 334-346.
- Kötting, O., Kossmann, J., Zeeman, S.C., et Lloyd, J.R. (2010). Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Curr. Opin. Plant Biol.* *13*, 320-328.
- Koufopanou, V. (1994). The Evolution of Soma in the Volvocales. *Am. Nat.* *143*, 907-931.
- Kubo, A., Fujita, N., Harada, K., Matsuda, T., Satoh, H., et Nakamura, Y. (1999). The Starch-Debranching Enzymes Isoamylase and Pullulanase Are Both Involved in Amylopectin Biosynthesis in Rice Endosperm. *Plant Physiol.* *121*, 399-410.
- 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., et al. (2010). Functions of heteromeric and homomeric isoamylase-type starch-debranching enzymes in developing maize endosperm. *Plant Physiol.* *153*, 956-969.
- Kuriki, T., Stewart, D.C., et Preiss, J. (1997). Construction of Chimeric Enzymes out of Maize Endosperm Branching Enzymes I and II: *J. Biol. Chem.* *272*, 28999-29004.
- Laby, R.J., Kim, D., et Gibson, S.I. (2001). The ram1 mutant of Arabidopsis exhibits severely decreased beta-amylase activity. *Plant Physiol.* *127*, 1798-1807.
- Laederach, A., Dowd, M.K., Coutinho, P.M., et Reilly, P.J. (1999). Automated docking of maltose, 2-deoxymaltose, and maltotetraose into the soybean beta-amylase active site. *Proteins* *37*, 166-175.
- Langeveld, S.M.J., Vennik, M., Kottenhagen, M., Van Wijk, R., Buijk, A., Kijne, J.W., et de Pater, S. (2002). Glucosylation activity and complex formation of two classes of reversibly glycosylated polypeptides. *Plant Physiol.* *129*, 278-289.
- Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C., et Kavanagh, T.A. (1999). An Arabidopsis gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J.* *20*, 519-527.
- Larosa, V., et Remacle, C. (2013). Transformation of the mitochondrial genome. *Int. J. Dev. Biol.* *57*, 659-665.
- Lawson, T., Simkin, A.J., Kelly, G., et Granot, D. (2014). Mesophyll photosynthesis and guard cell metabolism impacts on stomatal behaviour. *New Phytol.* *203*, 1064-1081.
- Leloir, L.F. (1971). Two Decades of Research on Biosynthesis of Saccharides. *Science* (80- ). *172*, 1299-1303.
- Li, J., Francisco, P., Zhou, W., Edner, C., Steup, M., Ritte, G., Bond, C.S., et 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*, 92-98.

- Li, J., Zhou, W., Francisco, P., Wong, R., Zhang, D., et Smith, S.M. (2017). Inhibition of Arabidopsis chloroplast  $\beta$ -amylase BAM3 by maltotriose suggests a mechanism for the control of transitory leaf starch mobilisation. *PLoS One* 12, e0172504.
- Li, Z., Li, D., Du, X., Wang, H., Larroque, O., Jenkins, C.L.D., Jobling, S.A., et Morell, M.K. (2011). The barley *amo1* locus is tightly linked to the starch synthase IIIa gene and negatively regulates expression of granule-bound starch synthetic genes. *J. Exp. Bot.* 62, 5217-5231.
- Libessart, N., Maddelein, M.-L., Van den Koornhuyse, N., Decq, A., Delrue, B., Mouille, G., D'Hulst, C., et Ball, S.G. (1995). Storage, Photosynthesis, and Growth: The Conditional Nature of Mutations Affecting Starch Synthesis and Structure in *Chlamydomonas*. *Plant Cell Online* 7, 1117-1127.
- Lin, T.-P., Caspar, T., Somerville, C.R., et 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, 1175-1181.
- Liu, D., Parker, M.L., Wellner, N., Kirby, A.R., Cross, K., Morris, V.J., et Cheng, F. (2013). Structural variability between starch granules in wild type and in a high-amylose mutant maize kernels. *Carbohydr. Polym.* 97, 458-468.
- Lloyd, J.R., Blennow, A., Burhenne, K., et 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, 1347-1354.
- Lockyer, S., et Nugent, A.P. (2017). Health effects of resistant starch. *Nutr. Bull.* 42, 10-41.
- Lohrig, K., Müller, B., Davydova, J., Leister, D., et Wolters, D.A. (2009). Phosphorylation site mapping of soluble proteins: bioinformatical filtering reveals potential plastidic phosphoproteins in Arabidopsis thaliana. *Planta* 229, 1123-1134.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., et Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZY) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42, D490-D495.
- Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L., et Kossmann, J. (1998). Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening. *Nat. Biotechnol.* 16, 473-477.
- Lu, Y., et Sharkey, T.D. (2004). The role of amyloamylase in maltose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta* 218, 466-473.
- Lu, K.-J., Pfister, B., Jenny, C., Eicke, S., et Zeeman, S.C. (2018). Distinct Functions of STARCH SYNTHASE 4 Domains in Starch Granule Formation. *Plant Physiol.* 176, 566-581.
- Lu, Y., Gehan, J.P., et Sharkey, T.D. (2005). Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* 138, 2280-2291.
- Lu, Y., Steichen, J.M., Yao, J., et Sharkey, T.D. (2006). The role of cytosolic alpha-glucan phosphorylase in maltose metabolism and the comparison of amyloamylase in Arabidopsis and Escherichia coli. *Plant Physiol.* 142, 878-889.

- Lunn, J.E., Feil, R., Hendriks, J.H.M., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W.-R., Carillo, P., Hajirezaei, M.-R., et 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*, 139-148.
- Lütken, H., Lloyd, J.R., Glaring, M.A., Baunsgaard, L., Laursen, K.H., Haldrup, A., Kossmann, J., et Blennow, A. (2010). Repression of both isoforms of disproportionating enzyme leads to higher malto-oligosaccharide content and reduced growth in potato. *Planta* *232*, 1127-1139.
- MacGregor, E.A., Janecek, S., et Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* *1546*, 1-20.
- Mahlow, S., Orzechowski, S., et Fettke, J. (2016). Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 2753-2764.
- Malinova, I., et Fettke, J. (2017). Reduced starch granule number per chloroplast in the *dpe2/phs1* mutant is dependent on initiation of starch degradation. *PLoS One* *12*, e0187985.
- Malinova, I., Mahlow, S., Alseekh, S., Orawetz, T., Fernie, A.R., Baumann, O., Steup, M., et 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*, 907-921.
- Malinova, I., Qasim, H.M., Brust, H., et Fettke, J. (2018). Parameters of Starch Granule Genesis in Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* *9*.
- Manners, D.J. (1991). Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydr. Polym.* *16*, 37-82.
- Martin, C., et Smith, A.M. (1995). Starch biosynthesis. *Plant Cell* *7*, 971-985.
- Martins, M.C.M., Hejazi, M., Fettke, J., Steup, M., Feil, R., Krause, U., Arrivault, S., Vosloh, D., Figueroa, C.M., Ivakov, A., et al. (2013). Feedback inhibition of starch degradation in *Arabidopsis* leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol.* *163*, 1142-1163.
- Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., Fujita, M., Yoshiwara, K., Matsukura, S., Morishita, Y., et al. (2009). Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol.* *150*, 1972-1980.
- Matagne, R.F., Remacle, C., et Dinant, M. (1991). Cytofusion in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 7447-7450.
- Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., Depamphilis, C.W., Miller, W., Harris, E.H., et Stern, D.B. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats. *Plant Cell* *14*, 2659-2679.
- McClung, C.R. (2001). CIRCADIAN RHYTHMS IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *52*, 139-162.
- McDonnell, A. V., Jiang, T., Keating, A.E., et Berger, B. (2006). Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics* *22*, 356-358.



- McMaugh, S.J., Thistleton, J.L., Anschaw, E., Luo, J., Konik-Rose, C., Wang, H., Huang, M., Larroque, O., Regina, A., Jobling, S.A., et al. (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*, 2189-2201.
- Melendez-Hevia, E., Waddell, T.G., et Shelton, E.D. (1993). Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule.
- Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J., et Cascante, M. (1998). Physical Constraints in the Synthesis of Glycogen That Influence Its Structural Homogeneity: A Two-Dimensional Approach. *Biophys. J.* *75*, 106-114.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-laylin, L.K., Maréchal-drouard, L., et al. (2010). The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* (80- ). *318*, 245-250.
- Michalska, J., Zauber, H., Buchanan, B.B., Cejudo, F.J., et Geigenberger, P. (2009). NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 9908-9913.
- Mikkelsen, R., Mutenda, K.E., Mant, A., Schürmann, P., et Blennow, A. (2005). Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 1785-1790.
- Møller, M.S., Henriksen, A., et Svensson, B. (2016). Structure and function of  $\alpha$ -glucan debranching enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 2619-2641.
- Monroe, J.D., et Preiss, J. (1990). Purification of a beta-Amylase that Accumulates in *Arabidopsis thaliana* Mutants Defective in Starch Metabolism. *Plant Physiol.* *94*, 1033-1039.
- Monroe, J.D., Storm, A.R., Badley, E.M., Lehman, M.D., Platt, S.M., Saunders, L.K., Schmitz, J.M., et Torres, C.E. (2014).  $\beta$ -Amylase1 and  $\beta$ -amylase3 are plastidic starch hydrolases in *Arabidopsis* That Seem to Be Adapted for Different Thermal, pH, and stress conditions. *Plant Physiol.* *166*, 1748-1763.
- Monroe, J.D., Breault, J.S., Pope, L.E., Torres, C.E., Gebrejesus, T.B., Berndsen, C.E., et Storm, A.R. (2017). *Arabidopsis*  $\beta$ -Amylase2 Is a K<sup>+</sup>-Requiring, Catalytic Tetramer with Sigmoidal Kinetics. *Plant Physiol.* *175*, 1525-1535.
- Montero, M., Almagro, G., Eydallin, G., Viale, A.M., Muñoz, F.J., Bahaji, A., Li, J., Rahimpour, M., Baroja-Fernández, E., et Pozueta-Romero, J. (2011). *Escherichia coli* glycogen genes are organized in a single glgXCAP transcriptional unit possessing an alternative suboperonic promoter within glgC that directs glgAP expression. *Biochem. J.* *433*, 107-117.
- Morrison, W.R. (1988). Lipids in Cereal Starches: A Review.
- Mouille, G., Maddelein, M.L., Libessart, N., Talaga, P., Decq, A., Delrue, B., et Ball, S. (1996). Preamylopectin Processing: A Mandatory Step for Starch Biosynthesis in Plants. *Plant Cell* *8*, 1353-1366.

- Müller-Röber, B., Sonnewald, U., et Willmitzer, L. (1992). Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* *11*, 1229-1238.
- Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G., et Ball, S.G. (2000). Recent Progress toward Understanding Biosynthesis of the Amylopectin Crystal. *Plant Physiol.* *122*, 989-998.
- Nakamura, Y., Utsumi, Y., Sawada, T., Aihara, S., Utsumi, C., Yoshida, M., et Kitamura, S. (2010). Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* *51*, 776-794.
- Nakata, P.A., Greene, T.W., Anderson, J.M., Smith-White, B.J., Okita, T.W., et Preiss, J. (1991). Comparison of the primary sequences of two potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Plant Mol. Biol.* *17*, 1089-1093.
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A.M., et Zeeman, S.C. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science* *303*, 87-89.
- Niittylä, T., Comparot-Moss, S., Lue, W.-L., Messerli, G., Trevisan, M., Seymour, M.D.J., Gatehouse, J.A., Villadsen, D., Smith, S.M., Chen, J., et al. (2006). Similar Protein Phosphatases Control Starch Metabolism in Plants and Glycogen Metabolism in Mammals. *J. Biol. Chem.* *281*, 11815-11818.
- Nishi, A., Nakamura, Y., Tanaka, N., et Satoh, H. (2001). Biochemical and genetic analysis of the effects of amylose-extender mutation in rice endosperm. *Plant Physiol.* *127*, 459-472.
- Nunes, C., Primavesi, L.F., Patel, M.K., Martinez-Barajas, E., Powers, S.J., Sagar, R., Fevereiro, P.S., Davis, B.G., et Paul, M.J. (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* *63*, 89-98.
- O'Hara, L.E., Paul, M.J., et Wingler, A. (2013). How Do Sugars Regulate Plant Growth and Development? New Insight into the Role of Trehalose-6-Phosphate. *Mol. Plant* *6*, 261-274.
- Parker, R., et Ring, S.G. (2001). Aspects of the Physical Chemistry of Starch. *J. Cereal Sci.* *34*, 1-17.
- Peat, S., Whelan, W.J., et Thomas, G.J. (1956). 587. The enzymic synthesis and degradation of starch. Part XXII. Evidence of multiple branching in waxy-maize starch. A correction. *J. Chem. Soc.* 3025.
- Peng, C., Wang, Y., Liu, F., Ren, Y., Zhou, K., Lv, J., Zheng, M., Zhao, S., Zhang, L., Wang, C., et al. (2014). FLOURY ENDOSPERM6 encodes a CBM48 domain-containing protein involved in compound granule formation and starch synthesis in rice endosperm. *Plant J.* *77*, 917-930.
- Pilling, E., et Smith, A.M. (2003). Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant Physiol.* *132*, 365-371.
- Preiss, J. (2014). Glycogen: Biosynthesis and Regulation. *EcoSal Plus* *6*.
- Preiss, J., Lammel, C., et Greenberg, E. (1976). Biosynthesis of Bacterial Glycogen' Kinetic Studies of a Glucose-1-P Adenylyltransferase (EC 2.7.7.27) from a Glycogen-Excess Mutant of *Escherichia coli* B.

- Preiss, J., Yung, S.-G., et Baecker, P.A. (1983). Regulation of bacterial glycogen synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* *57*, 80.
- Price, D.C., Chan, C.X., Yoon, H.S., Yang, E.C., Qiu, H., Weber, A.P.M., Schwacke, R., Gross, J., Blouin, N.A., Lane, C., et al. (2012). *Cyanophora paradoxa* genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants. *Science* *335*, 843-847.
- Ral, J.-P., Derelle, E., Ferraz, C., Wattebled, F., Farinas, B., Corellou, F., Buléon, A., Slomianny, M.-C., Delvalle, D., D'Hulst, C., et al. (2004). Starch division and partitioning. A mechanism for granule propagation and maintenance in the picophytoplanktonic green alga *Ostreococcus tauri*. *Plant Physiol.* *136*, 3333-3340.
- Ral, J.-P., Colleoni, C., Wattebled, F., Dauvillée, D., Nempont, C., Deschamps, P., Li, Z., Morell, M.K., Chibbar, R., Purton, S., et al. (2006). Circadian clock regulation of starch metabolism establishes GBSSI as a major contributor to amylopectin synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* *142*, 305-317.
- Ramazanov, Z., Rawat, M., Henk, M., Mason, C., Matthews, S., et Moroney, J. (1994). The induction of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* *195*, 210-216.
- Rathore, R.S., Garg, N., Garg, S., et Kumar, A. (2009). Starch phosphorylase: Role in starch metabolism and biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* *29*, 214-224.
- Reidel, E.J., Turgeon, R., et Cheng, L. (2008). A Maltose Transporter from Apple is Expressed in Source and Sink Tissues and Complements the Arabidopsis Maltose Export-Defective Mutant. *Plant Cell Physiol.* *49*, 1607-1613.
- Reinhold, H., Soyk, S., Simková, K., Hostettler, C., Marafino, J., Mainiero, S., Vaughan, C.K., Monroe, J.D., et Zeeman, S.C. (2011).  $\beta$ -amylase-like proteins function as transcription factors in Arabidopsis, controlling shoot growth and development. *Plant Cell* *23*, 1391-1403.
- Ritte, G., Lorberth, R., et Steup, M. (2000). Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant J.* *21*, 387-391.
- Ritte, G., Scharf, A., Eckermann, N., Haebel, S., et 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., et Steup, M. (2006). Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Lett.* *580*, 4872-4876.
- Roach, P.J., Depaoli-Roach, A.A., Hurley, T.D., et Tagliabracci, V.S. (2012). Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.* *441*, 763-787.
- Roldán, I., Wattebled, F., Mercedes Lucas, M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C., et Mérida, Á. (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* *49*, 492-504.
- Rongine de Fekete, M.A., Luis F, L., et Carlos E, C. (1960). Mechanism of Starch Biosynthesis. *Nature* *187*, 918-919.

- Rost, S., Frank, C., et Beck, E. (1996). The chloroplast envelope is permeable for maltose but not for maltodextrins. *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 221-227.
- Rottet, S., Besagni, C., et Kessler, F. (2015). The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1847, 889-899.
- Ruan, Y.-L. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 33-67.
- Rydberg, U., Andersson, L., Andersson, R., Åman, P., et Larsson, H. (2001). Comparison of starch branching enzyme I and II from potato. *Eur. J. Biochem.* 268, 6140-6145.
- Sager, R., et Granick, S. (1953). Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardi*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 56, 831-838.
- Sager, R., et Granick, S. (1954). Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardi*. *J. Gen. Physiol.* 37, 729-742.
- Salman, H., Blazek, J., Lopez-Rubio, A., Gilbert, E.P., Hanley, T., et Copeland, L. (2009). Structure–function relationships in A and B granules from wheat starches of similar amylose content. *Carbohydr. Polym.* 75, 420-427.
- Santelia, D., Kötting, O., Seung, D., Schubert, M., Thalmann, M., Bischof, S., Meekins, D.A., Lutz, A., Patron, N., Gentry, M.S., et al. (2011). The Phosphoglucan Phosphatase Like Sex Four2 Dephosphorylates Starch at the C3-Position in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 4096-4111.
- Scheidig, A., Frohlich, A., Schulze, S., Lloyd, J.R., et Kossmann, J. (2002). Downregulation of a chloroplast-targeted beta-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.* 30, 581-591.
- Schirmer, M., Jekle, M., et Becker, T. (2015). Starch gelatinization and its complexity for analysis. *Starch - Stärke* 67, 30-41.
- Schleucher, Vanderveer, et Sharkey (1998). Export of carbon from chloroplasts at night. *Plant Physiol.* 118, 1439-1445.
- Schliebner, I., Pribil, M., Zühlke, J., Dietzmann, A., et Leister, D. (2008). A Survey of Chloroplast Protein Kinases and Phosphatases in Arabidopsis thaliana. *Curr. Genomics* 9, 184-190.
- Schopper, S., Mühlenbock, P., Sörensson, C., Hellborg, L., Lenman, M., Widell, S., Fetteke, J., et Andreasson, E. (2015). Arabidopsis cytosolic alpha-glycan phosphorylase, PHS2, is important during carbohydrate imbalanced conditions. *Plant Biol.* 17, 74-80.
- Seung, D., Thalmann, M., Sparla, F., Abou Hachem, M., Lee, S.K., Issakidis-Bourguet, E., Svensson, B., Zeeman, S.C., et Santelia, D. (2013). Arabidopsis thaliana AMY3 is a unique redox-regulated chloroplastic  $\alpha$ -amylase. *J. Biol. Chem.* 288, 33620-33633.
- Seung, D., Soyk, S., Coiro, M., Maier, B.A., Eicke, S., et 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, e1002080.
- Seung, D., Boudet, J., Monroe, J., Schreier, T.B., David, L.C., Abt, M., Lu, K.-J., Zanella, M., et Zeeman, S.C. (2017). Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH Control Starch Granule Initiation in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell* 29, 1657-1677.

- Seung, D., Schreier, T.B., Bürgy, L., Eicke, S., et Zeeman, S.C. (2018). Two Plastidial Coiled-Coil Proteins Are Essential for Normal Starch Granule Initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 30, 1523-1542.
- Shinde, S. V., Nelson, J.E., et Huber, K.C. (2003). Soft Wheat Starch Pasting Behavior in Relation to A- and B-type Granule Content and Composition. *Cereal Chem. J.* 80, 91-98.
- Silver, D.M., Silva, L.P., Issakidis-Bourguet, E., Glaring, M.A., Schriemer, D.C., et Moorhead, G.B.G. (2013). Insight into the redox regulation of the phosphoglucan phosphatase SEX4 involved in starch degradation. *FEBS J.* 280, 538-548.
- Silver, D.M., Kötting, O., et Moorhead, G.B.G. (2014). Phosphoglucan phosphatase function sheds light on starch degradation. *Trends Plant Sci.* 19, 471-478.
- Slade, L., et Levine, H. (1988). Non-equilibrium melting of native granular starch: Part I. Temperature location of the glass transition associated with gelatinization of A-type cereal starches. *Carbohydr. Polym.* 8, 183-208.
- Smidansky, E.D., Clancy, M., Meyer, F.D., Lanning, S.P., Blake, N.K., Talbert, L.E., et Giroux, M.J. (2002). Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1724-1729.
- Smith-White, B.J., et Preiss, J. (1992). Comparison of proteins of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. *J. Mol. Evol.* 34, 449-464.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., et Smith, S.M. (2005). Starch Degradation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 73-98.
- Smith, S.M., Fulton, D.C., Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Dunstan, H., Hylton, C., Zeeman, S.C., et 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 1. *Plant Physiol.* 136, 1-13.
- Snow, P., et O'Dea, K. (1981). Factors affecting the rate of hydrolysis of starch in food. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 2721-2727.
- Sokolov, L.N., Dominguez-Solis, J.R., Allary, A.-L., Buchanan, B.B., et Luan, S. (2006). A redox-regulated chloroplast protein phosphatase binds to starch diurnally and functions in its accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9732-9737.
- Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B., et Steup, M. (1995). A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* 27, 567-576.
- Soulaka, A.B., et Morrison, W.R. (1985). The amylose and lipid contents, dimensions, and gelatinisation characteristics of some wheat starches and their A- and B-granule fractions. *J. Sci. Food Agric.* 36, 709-718.
- Soyk, S., Imkova, K., Zurcher, E., Luginbuhl, L., Brand, L.H., Vaughan, C.K., Wanke, D., et Zeeman, S.C. (2014). The Enzyme-Like Domain of Arabidopsis Nuclear -Amylases Is Critical for DNA Sequence Recognition and Transcriptional Activation. *Plant Cell* 26, 1746-1763.
- Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P., et Trost, P. (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 141, 840-850.

- Stanley, D., Fitzgerald, A.M., Farnden, K.J.F., MacRae, E.A., Stanley, D., et Macrae, K.J.F.& (2002). Characterisation of putative alpha-amylases from apple (*Malus domestica*) and *Arabidopsis thaliana*. *BIOLOGIA-BRATISLAVA*- 57, 137-148.
- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., et Kishore, G.M. (1992). Regulation of the Amount of Starch in Plant Tissues by ADP Glucose Pyrophosphorylase. *Science* (80-. ). 258, 287-292.
- Stitt, M., et Zeeman, S.C. (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 282-292.
- Streb, S., et Zeeman, S.C. (2012). Starch Metabolism in *Arabidopsis*. *Arab. B.* 10, e0160.
- Streb, S., Delatte, T., Umhang, M., Eicke, S., Schorderet, M., Reinhardt, D., et Zeeman, S.C. (2008). Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. *Plant Cell* 20, 3448-3466.
- Sun, Z.T., et 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, 298-305.
- Szydowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M.M., Roldan, I., Montero, M., Munoz, F.J., Ovecka, M., Bahaji, A., Planchot, V., et al. (2009). Starch Granule Initiation in *Arabidopsis* Requires the Presence of Either Class IV or Class III Starch Synthases. *Plant Cell Online* 21, 2443-2457.
- Takeda, Y., et Hizukuri, S. (1981). Re-examination of the action of sweet-potato beta-amylase on phosphorylated (1→4)- $\alpha$ -D-glucan. *Carbohydr. Res.* 89, 174-178.
- Takeda, Y., Guan, H.-P., et Preiss, J. (1993). Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr. Res.* 240, 253-263.
- Tao, J., Huang, J., Yu, L., Li, Z., Liu, H., Yuan, B., et Zeng, D. (2018). A new methodology combining microscopy observation with Artificial Neural Networks for the study of starch gelatinization. *Food Hydrocoll.* 74, 151-158.
- Tetlow, I.J. (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.* 55, 2131-2145.
- Tetlow, I.J., et Emes, M.J. (2014). A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis. *IUBMB Life* 66, 546-558.
- Thiré, R.M. da S.M. (2009). Chapter Starch-based plastics. In *Starches: Characterization, Properties, and Applications*, (CRC Press), p. 115-140.
- Tiessen, A. (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 Online* 14, 2191-2213.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N.G., et Geigenberger, P. (2003). Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.* 35, 490-500.

- Tsai, C.-Y. (1974). The function of the Waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochem. Genet.* *11*, 83-96.
- Tsai, C.-Y., et Nelson, O.E. (1966). Starch-Deficient Maize Mutant Lacking Adenosine Diphosphate Glucose Pyrophosphorylase Activity. *Science* (80- ). *151*, 341-343.
- Tunçay, H., Findinier, J., Duchêne, T., Cogez, V., Cousin, C., Peltier, G., Ball, S.G., et Dauvillée, D. (2013). A Forward Genetic Approach in *Chlamydomonas reinhardtii* as a Strategy for Exploring Starch Catabolism. *PLoS One* *8*, e74763.
- Turnbull, J., Tiberia, E., Striano, P., Genton, P., Carpenter, S., Ackerley, C.A., et Minassian, B.A. (2016). Lafora disease. *Epileptic Disord.* *18*, 38-62.
- Ueki, N., Ide, T., Mochiji, S., Kobayashi, Y., Tokutsu, R., Ohnishi, N., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Tanaka, K., Minagawa, J., et al. (2016). Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 5299-5304.
- Ugalde, J.E., Parodi, A.J., et 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.* *100*, 10659-10663.
- Umemoto, T., Yano, M., Satoh, H., Shomura, A., et 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*, 1-8.
- Utsumi, Y., et 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.
- Valerio, C., Costa, A., Marri, L., Issakidis-Bourguet, E., Pupillo, P., Trost, P., et Sparla, F. (2011). Thioredoxin-regulated  $\beta$ -amylase (BAM1) triggers diurnal starch degradation in guard cells, and in mesophyll cells under osmotic stress. *J. Exp. Bot.* *62*, 545-555.
- Vandromme, C., Spriet, C., Dauvillée, D., Courseaux, A., Putaux, J.-L., Wychowski, A., Facon, M., Hulst, C.D., et Wattedled, F. (2018). PII1: a protein involved in starch initiation that determines granule number and size in *Arabidopsis* chloroplast. *bioRxiv* 310003.
- Verbeke, J., Penverne, C., D’Hulst, C., Rolando, C., et Szydlowski, N. (2016). Rapid and sensitive quantification of C3- and C6-phosphoesters in starch by fluorescence-assisted capillary electrophoresis. *Carbohydr. Polym.* *152*, 784-791.
- Visser, R.G.F., Stolte, A., et Jacobsen, E. (1991). Expression of a chimaeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants. *Plant Mol. Biol.* *17*, 691-699.
- van de Wal, M., D’Hulst, C., Vincken, J.-P., Buléon, A., Visser, R., et Ball, S. (1998). Amylose Is Synthesized in Vitro by Extension of and Cleavage from Amylopectin. *J. Biol. Chem.* *273*, 22232-22240.
- Wang, Y., Stessman, D.J., et Spalding, M.H. (2015). The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO<sub>2</sub>: how *Chlamydomonas* works against the gradient. *Plant J.* *82*, 429-448.

- Waterschoot, J., Gomand, S. V., Fierens, E., et Delcour, J.A. (2015). Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches. *Starch - Stärke* 67, 14-29.
- Wattebled, F., Buléon, A., Bouchet, B., Ral, J.-P., Liénard, L., Delvallé, D., Binderup, K., Dauvillée, D., Ball, S., et D'Hulst, C. (2002). Granule-bound starch synthase I. *Eur. J. Biochem.* 269, 3810-3820.
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., et al. (2005). Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytyloglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.* 138, 184-195.
- Wattebled, F., Planchot, V., Dong, Y., Szydlowski, N., Pontoire, B., Devin, A., Ball, S., et D'Hulst, C. (2008). Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 148, 1309-1323.
- Wayllace, N.Z., Valdez, H.A., Ugalde, R.A., Busi, M. V., et Gomez-Casati, D.F. (2010). The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 277, 428-440.
- Weber, A.P. (2004). Solute transporters as connecting elements between cytosol and plastid stroma. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 247-253.
- Weiner, H., Stitt, M., et Heldt, H.W. (1987). Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves.
- Weise, S.E., Weber, A.P.M., et Sharkey, T.D. (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* 218, 474-482.
- Weise, S.E., Kim, K.S., Stewart, R.P., et Sharkey, T.D. (2005). beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol.* 137, 756-761.
- Whan, A., Dielen, A.-S., Mieog, J., Bowerman, A.F., Robinson, H.M., Byrne, K., Colgrave, M., Larkin, P.J., Howitt, C.A., Morell, M.K., et al. (2014). Engineering  $\alpha$ -amylase levels in wheat grain suggests a highly sophisticated level of carbohydrate regulation during development. *J. Exp. Bot.* 65, 5443-5457.
- Wilson, N.F., Foglesong, M.J., et Snell, W.J. (1997). The *Chlamydomonas* Mating Type Plus Fertilization Tubule, a Prototypic Cell Fusion Organelle: Isolation, Characterization, and In Vitro Adhesion to Mating Type Minus Gametes. *J. Cell Biol.* 137, 1537-1553.
- Wong, R.B.K., et Lelievre, J. (1982). Comparison of the Crystallinities of Wheat Starches with Different Swelling Capacities. *Starch - Stärke* 34, 159-161.
- Worby, C.A., Gentry, M.S., et Dixon, J.E. (2006). Laforin, a Dual Specificity Phosphatase That Dephosphorylates Complex Carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 281, 30412-30418.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Ciniglia, C., Pinto, G., et Bhattacharya, D. (2004). A Molecular Timeline for the Origin of Photosynthetic Eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 809-818.



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., et al. (2005).  $\alpha$ -Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.* *280*, 9773-9779.

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., et al. (2001). The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* *13*, 1907-1918.

Zabawinski, C., Van Den Koornhuise, N., D'Hulst, C., Schlichting, R., Giersch, C., Delrue, B., Lacroix, J.-M., Preiss, J., et Ball, S. (2001). Starchless Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Lack the Small Subunit of a Heterotetrameric ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *J. Bacteriol.* *183*, 1069-1077.

Zanella, M., Borghi, G.L., Pirone, C., Thalmann, M., Pazmino, D., Costa, A., Santelia, D., Trost, P., et Sparla, F. (2016).  $\beta$ -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. *J. Exp. Bot.* *67*, 1819-1826.

Zeeman, S.C., Northrop, F., Smith, A.M., et Rees, T. (1998). A starch-accumulating mutant of Arabidopsis thaliana deficient in a chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J.* *15*, 357-365.

Zeeman, S.C., Tiessen, A., Pilling, E., Kato, K.L., Donald, A.M., et Smith, A.M. (2002). Starch Synthesis in Arabidopsis. Granule Synthesis, Composition, and Structure 1. *Plant Physiol.* *129*, 516-529.

Zeeman, S.C., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., Haldimann, P., Bechtold, N., Smith, A.M., et 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*, 849-858.

Zeeman, S.C., Smith, S.M., et Smith, A.M. (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.* *401*, 13-28.

Zeeman, S.C., Kossmann, J., et Smith, A.M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *61*, 209-234.

Zhan, Y., Marchand, C.H., Maes, A., Mauries, A., Sun, Y., Dhaliwal, J.S., Uniacke, J., Arragain, S., Jiang, H., Gold, N.D., et al. (2018). Pyrenoid functions revealed by proteomics in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* *13*, e0185039.

Zhang, X., Myers, A.M., et James, M.G. (2005). Mutations affecting starch synthase III in Arabidopsis alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiol.* *138*, 663-674.

Zhang, X., Szydlowski, N., Delvallé, D., D'Hulst, C., James, M.G., et 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., Jhurreea, D., Andralojc, P.J., Mitchell, R.A.C., Powers, S.J., Schlupepmann, H., Delatte, T., Wingler, A., et Paul, M.J. (2009). Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* *149*, 1860-1871.

Zhang, Y., Guo, Q., Feng, N., Wang, J., Wang, S., et He, Z. (2016). Characterization of A- and B-type starch granules in Chinese wheat cultivars. *J. Integr. Agric.* *15*, 2203-2214.

Zheng, H.-Q., Chiang-Hsieh, Y.-F., Chien, C.-H., Hsu, B.-K., Liu, T.-L., Chen, C.-N., et Chang, W.-C. (2014). AlgaePath: comprehensive analysis of metabolic pathways using transcript abundance data from next-generation sequencing in green algae. *BMC Genomics* *15*, 196.

Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.-Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A.N., et Alva, V. (2018). A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *J. Mol. Biol.* *430*, 2237-2243.