

Université de Lille
Ecole doctorale Biologie Santé

THESE de DOCTORAT

Camille VANDROMME

**Caractérisation de facteurs impliqués dans
l'initiation et la morphogenèse des grains d'amidon
chez *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 24 juin 2019 devant la commission d'examen composée de :

Dr Yann Guerardel	Université de Lille	Président
Dr Cécile Raynaud	Université Paris-Saclay	Rapporteur
Pr Jerome Pelloux	Université de Picardie Jules Verne	Rapporteur
Pr Muriel Bardor	Université de Rouen	Examineur
Dr Didier Marion	BIA INRA, Nantes	Examineur
Dr Fabrice Wattebled	Université de Lille	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Cécile Raynaud et le professeur Jérôme Pelloux d'avoir accepté d'être membres de mon jury en qualité de rapporteur et pour le temps consacré à l'évaluation de mes travaux de thèse.

Je souhaite également remercier le docteur Didier Marion de m'avoir suivie tout au long de ma thèse durant mes CSI, au côté du Dr Vincent Castric, et d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail de thèse. Je remercie le professeur Muriel Bardor d'être présente au sein de cette commission en temps qu'examinateur.

Un grand merci au docteur Yann Guérardel d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, le docteur Fabrice Wattebled. Merci de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de glycobiologie végétale et de m'avoir confié un projet passionnant. Merci de m'avoir conduit du master jusqu'en thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris et d'avoir volé à mon secours plusieurs fois. Merci pour ta très grande disponibilité à mon égard et pour tes nombreux encouragements au cours de ces trois années.

Je remercie le professeur Christophe D'Hulst, directeur de l'unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, de m'avoir accueillie. J'ai ainsi pu bénéficier d'une très enrichissante expérience professionnelle par la qualité des moyens et du matériel mis à notre disposition.

Mes plus vifs remerciements vont à l'ensemble des membres de l'équipe de glycobiologie végétale. A Adeline, au côté de qui j'ai énormément appris et qui m'a beaucoup soutenue. Merci pour tous tes bons conseils. A David pour ses nombreux conseils et coups de main au moment où j'en avais le plus besoin ^^ . A Coralie et Xavier qui ont toujours pris le temps de m'aider et de répondre à mes questions. Et un grand merci à la team patate pour nos moultes discussions végétales. Un grand merci à Sylvain et Adeline, doctorants de l'équipe avant moi, qui n'ont pas manqué de m'épauler quotidiennement.

Je remercie également nos collaborateurs : le Dr Jean-Luc Putaux et Christine Lancelon Pin (CERMAV) pour les analyses en microscopie électronique. Le Dr Corentin Spriet (TISBio) d'avoir mis au point une nouvelle méthode d'analyse des grains d'amidon *in planta* en microscopie confocale et pour l'ensemble des acquisitions de fluorescence. Ainsi que le Dr Frédéric Krzewinski (PAGÉS) pour le dosage de l'ADP-Glc expresse :)

Un énorme merci à tous les membres de l'UGSF, merci pour votre bonne humeur, votre générosité qui ont, depuis le début, été le moteur de ma motivation. Un grand merci à l'équipe administrative d'avoir toujours répondu présent et soutenu dans mes démarches paprasseresques.

Un énorme merci à mes parents qui m'ont transmis mon goût pour les sciences et pour les longues études ;). Merci pour les vacances libanaises au moment où j'en avais le plus besoin. Merci à ma petite sœur dont je suis très fière ^^ . Et encore un énorme merci du fond du cœur à mon homme, merci pour ton soutien et pour tes conseils qui m'ont aidé à montrer le meilleur de moi-même au quotidien.



Liste des abréviations

At : Arabidopsis thaliana	MES : 2-(Morpholino)ethanesulfonic acid
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	MOPS : acide 4-Morpholinepropanesulfonique
ADN-T : ADN de Transfert	NADP : Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
ADP : Adénosine Diphosphate	Nter : partie Amino-terminale
ATP : Adénosine TriPhosphate	PCR : Polymerisation Chain Reaction
BE : Branching Enzyme	3-PGA : 3-Phosphoglycérate
CAZy : Carbohydate Active enzyme	Pi : Pyrophosphate inorganique
CBM : Carbohydate-binding module	PII1 : protéine impliquée dans l'initiation de la synthèse d'amidon
Col : Columbia	PU : Pullulanase
CTAB : CetylTrimetylAmmonium Bromide	RT-PCR : Reverse transcription PCR
Cter : partie Carboxy-terminale	Rubisco : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
Da : Dalton	SS : Amidon synthase soluble
DMSO : DiMéthylSulfOxyde	Tris : 2-Amino-2-hydroxyméthyl-propane-1,3-diol
dNTP : désoxyriboNucléotide TriPhosphate	UV : Ultra-Violet
DO : Densité Optique	WS : Wassilewskia
DP : Degré de Polymérisation	
EDTA : acide Ethylène-Diamine-TétraAcétique	
Fru-6-P : Fructose-6-Phosphate	
FST : Flanking sequence tag	
GBSS : Granule Bound Starch Synthase	
Glc1P : Glucose 1 Phosphate	
GN : Glucogénine	
GS : Glycogène Synthase	
HCl : Acide Chlorhydrique	
HPAEC-PAD : High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection	
λ_{max} : Longueur d'onde au maximum d'absorbance	

Résumé

L'amidon est un composé permettant le stockage d'énergie et du carbone par les plantes, ce qui en fait un des polysaccharides les plus abondants sur Terre. Malgré nos connaissances sur le métabolisme de l'amidon, le processus d'initiation de la synthèse des grains d'amidon n'est pas décrit. La découverte de l'amidon-synthase 4 (SS4) en tant que protéine principalement impliquée dans le processus d'initiation de l'amidon, a permis de faire de grands progrès dans ce domaine. En effet, cette enzyme est impliquée dans le contrôle du nombre, de la forme et de la taille des grains d'amidon synthétisés dans les chloroplastes.

La recherche de facteurs protéiques interagissant avec SS4 a conduit à la découverte d'un nouveau facteur protéique faisant l'objet principal de ce manuscrit. Cette protéine nommée PII1 (protéine impliquée dans l'initiation de l'amidon ; 90KDa) interagit avec SS4 dans le chloroplaste. L'analyse du phénotype amidon associé à son inhibition révèle l'implication de la protéine PII1 dans le mécanisme déterminant le nombre de grains d'amidon dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

Afin d'avoir un aperçu plus global des connexions qui relient les différents facteurs protéiques impliqués dans l'initiation de la synthèse de l'amidon, des lignées doubles mutantes ont été sélectionnées et caractérisées : *ss3pii1*, *ss4pii1* et *ss4phs1*. Les résultats mettent en évidence le rôle spécifique de PII1 dans l'initiation de l'amidon par rapport aux amidon-synthases. Ils ont également permis de mettre en avant l'implication de la phosphorylase, dans l'initiation de l'amidon dans les tissus non-photosynthétiques.

Abstract

Most of photosynthetic organisms accumulate starch to store carbon and energy produced during photosynthesis. It is thus one of the most abundant storage polysaccharides on earth. Despite our knowledge of starch granule properties and metabolism, its initiation process remains poorly understood. Great progress in this field has been made through the discovery of the starch synthase 4 (SS4) as a major protein involved in starch priming in *Arabidopsis* chloroplasts. Indeed, this enzyme controls the number of the starch granules per chloroplast, but also their shape and their size.

During my PhD, I focused my research on the analysis of a protein called PII1 (protein involved in starch initiation 90KDa) that interact with SS4 within the chloroplast. This study reveals the involvement of the PII1 protein in the machinery determining starch granules number in *Arabidopsis thaliana* leaves.

Then, I tried to find new clues on the global comprehension of starch initiation. This was achieved by reporting the phenotypic analysis of double mutations including mutation of protein involved in starch initiation: *ss3pii1*, *ss4pii1* and *ss4phs1*. These results highlight the specific role of PII1 in starch initiation compared to starch synthase. We also found evidence of the implication of phosphorylase PHS1 in starch initiation within non-photosynthetic organs.

Table des matières

Introduction.....	9
I. Structure du grain d'amidon.....	13
1. L'organisation tridimensionnelle de l'amidon	13
2. L'amylopectine.....	15
3. L'amylose	17
II. <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1. Un modèle d'étude	19
2. De l'amidon de la tête aux pieds	21
III. Métabolisme de l'amidon.....	26
1. Mécanisme de biosynthèse de l'amidon : Une synthèse en 5 étapes.....	26
1.1 La synthèse du glycosyl nucléotide précurseur.....	26
1.2 L'initiation de la synthèse du polysaccharide.....	27
1.3 Elongation du glucane.....	29
1.4 L'introduction des points de branchement	32
1.5 Maturation de la structure.	34
1.6 Ouverture sur la biosynthèse de l'amidon.....	35
2. Dégradation de l'amidon dans les chloroplastes.....	36
2.1 La phosphorylation réversible de l'amidon	36
2.2 Les enzymes de la dégradation	38
IV. L'initiation de la synthèse de l'amidon et le contrôle de sa formation.....	40
1. Le rôle primordial de l'amidon synthase soluble de type 4 (SS4)	40
2. Différents facteurs protéiques impliqués dans l'étape d'initiation.....	45
V. Objectifs de la thèse.....	47

Matériels et méthodes	50
1) Matériel végétal	51
Les croisements chez <i>A. thaliana</i>	51
2) Génotypage des plantes.....	52
Extraction d'ADN à partir de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	52
Sélection des lignées mutantes.....	52
Conditions de culture	54
3) Extraction et dosage d'amidon	55
Extraction MOPS.....	55
Extraction à l'acide perchlorique.....	55
Dosage des polysaccharides	55
4) Caractérisation Amylose/Amylopectine.....	56
Chromatographie d'exclusion stérique (CL2B).....	56
Précipitation de l'amylopectine à la concanavaline A	57
5) Analyse des distributions de longueurs des chaînes polysaccharidiques par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD)	58
6) Mesure de l'ADP-glucose.....	58
7) Caractérisation de la taille des grains d'amidon, de leurs formes et de leur nombre par chloroplaste.	59
Distribution de la taille des grains d'amidon : Compteur de particules	59
Microscopie électronique à balayage (MEB).....	60
Coloration des feuilles au Lugol	60
Analyse du nombre de grains d'amidon par chloroplaste : NegFluo.....	60
8) Expression des protéines de fusion	61
Transformation de protoplastes d' <i>A. thaliana</i>	61
Agroinfiltration de feuilles de tabac (BiFC).....	63

Résultats.....	65
Partie 1 : Mise en évidence d'un nouveau facteur protéique impliqué dans l'initiation de la synthèse d'amidon : Caractérisation de la lignée mutante <i>pil1</i>	66
I) Analyse du transcrit du mutant <i>pil1</i>	68
II) Localisation subcellulaire de la protéine PII1	69
III) Confirmation de l'interaction entre PII1 et SS4 par BiFC	70
IV) Caractérisation de la taille des grains d'amidon et du nombre de grains d'amidon par chloroplaste du mutant <i>pil1</i>	71
V) Dosage de l'amidon et de l'ADP-Glucose	75
VI) Analyse de la structure du grain d'amidon du mutant <i>pil1</i>	77
VII) Analyse de l'amidon racinaire mutant <i>pil1</i>	79
VIII) Conclusion.....	81
Partie 2 : Caractérisation des doubles mutants <i>ss4pil1</i> et <i>ss3pil1</i>	83
I) Caractérisation de la forme des grains d'amidon et de leur nombre par chloroplaste.....	84
II) Détermination de la quantité d'amidon présent dans les feuilles.....	87
III) Analyse de la composition des grains d'amidon.....	88
IV) Etude de l'amidon racinaire	90
V) Etude complémentaire	91
VI) Conclusion	93
Discussion et perspectives.....	95
1. Le rôle de PII1 dans l'initiation de la synthèse d'amidon	96
2. Transposition à un nouveau modèle végétal	99

Introduction

Pour la plupart des végétaux, l'amidon est l'unique polymère de glucose dédié au stockage de l'énergie et de carbone, ce qui en fait un des polysaccharides les plus abondants sur Terre. La synthèse d'amidon est un engrenage essentiel du cycle du carbone, se situant à la suite de la photosynthèse et de l'assimilation de carbone inorganique atmosphérique en carbone organique. Ce carbone organique est stocké sous forme d'amidon et est utilisé comme source d'énergie pour les plantes elles-mêmes, mais également pour l'ensemble de la chaîne alimentaire. Cette macromolécule se présente sous la forme d'un grain semi-cristallin, insoluble dans l'eau. La forme et la taille des grains d'amidon varient selon l'espèce botanique et également en fonction des différents organes d'une même plante.

Le lieu dédié à la synthèse de l'amidon est un compartiment subcellulaire appelé plaste. On parle de chloroplastes pour les plastes situés dans les tissus capables de photosynthèse, et d'amyloplaste dans les tissus non-photosynthétiques. Dans les chloroplastes, l'amidon est dit « transitoire », car il est synthétisé durant la journée et dégradé la nuit. Cet amidon sert de réserve énergétique à la plante en absence de lumière. Le carbone et l'énergie circulent dans la plante sous forme de saccharose et peuvent également être stockés dans les amyloplastides des tissus non photosynthétiques, en des lieux stratégiques à la survie de la plante et à sa multiplication tels que les graines ou les organes de réserve souterrains.

En outre, l'amidon représente la plus importante source calorique des régimes alimentaires humain et animal. En France, les végétaux principalement cultivés pour leur amidon sont le blé (44%), le maïs (48%) pomme de terre (7%) et le pois (1%). En 2016, la France a produit 3,2 millions de tonnes d'amidon à partir de ces cultures, générant un chiffre d'affaires de 3 milliards d'euros. La France se place ainsi au 1^{er} rang des producteurs d'amidon européens et au 4^e rang mondial (usipa.fr). L'amidon se cache au travers de nombreuses utilisations. Avec une répartition entre l'utilisation de l'amidon pour l'industrie agroalimentaire (57%) et son utilisation dans d'autres applications industrielles non alimentaires (figure 1).

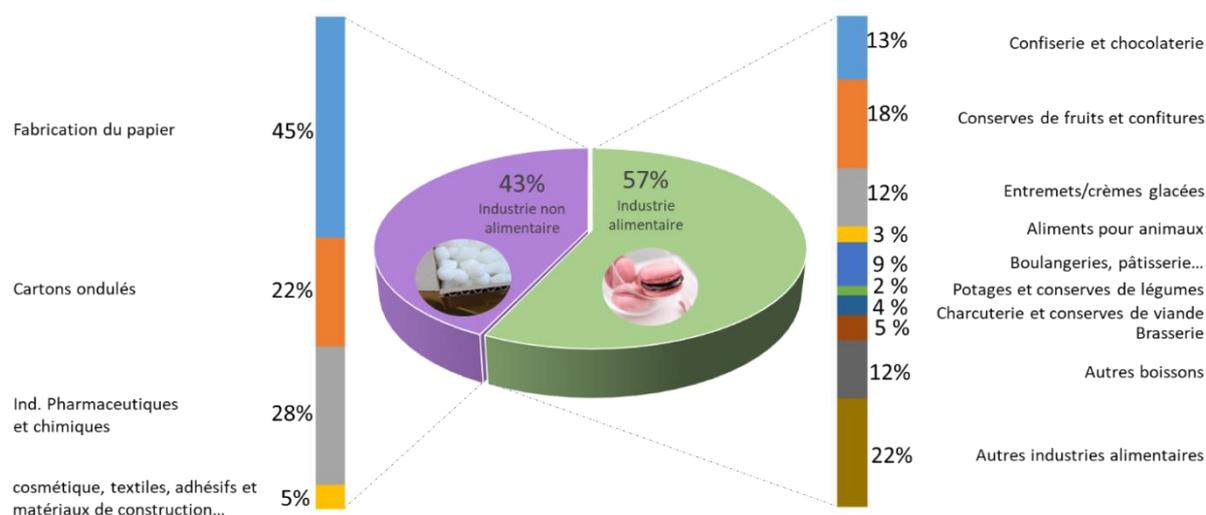


Figure 1 : Marchés de l'amidon et des produits dérivés en France (2016). Représentation des débouchés dans l'industrie agroalimentaire représentant 57 % des usages et utilisation dans l'industrie non alimentaire (43%) (usipa.fr).

L'utilisation de l'amidon dans le secteur industriel couvre un large éventail. Sous sa forme brute, à l'état de farine, il entre dans la confection de gâteaux. Il peut également servir de substrat enzymatique à la fermentation alcoolique dans de nombreux domaines, notamment en brasserie. Il peut également être modifié chimiquement et être ajouté comme additif en industrie agroalimentaire. Ce biopolymère est également utilisé comme matériau, à l'image de la confection de plastique biodégradable.

Des plantes d'intérêt agronomique ont ainsi été sélectionnées dans le but d'augmenter le rendement de production de l'amidon et répondre à la demande croissante des consommateurs. De plus, des caractéristiques plus spécifiques sont recherchées.

Ainsi, des modifications du métabolisme de l'amidon ont conduit à la sélection de plantes d'intérêt agronomique telles que le riz cireux et le maïs doux. En effet, la farine de riz cireux possède des propriétés de viscosité modifiées permettant la confection de nombreux plats. Le maïs doux, quant à lui, possède un goût plus sucré que les autres lignées de maïs. Du point de vue de la santé, certaines lignées végétales produisent des amidons dont la digestion est plus difficile, diminuant la quantité de glucose assimilé par l'organisme et ayant un rôle semblable aux fibres alimentaires sur l'organisme. Ainsi, la

taille et la composition des grains d'amidon modifieront leur capacité d'assimilation comme l'amidon résistant qui aura un impact sur la nutrition similaire à celui des fibres.

Les études menées en recherche fondamentale sur le métabolisme de l'amidon nous permettent de découvrir de nouveaux facteurs protéiques impliqués dans ces processus. La caractérisation de l'amidon issu de ces lignées (rendement, taille et forme des grains, composition chimique et propriété physicochimique) pourrait mettre en avant de nouvelles pistes pour la sélection variétale. De nouvelles propriétés pourraient également permettre la production de polymères végétaux servant de base pour la chimie végétale et les matériaux biosourcés. Ces études fondamentales permettront aux industriels d'augmenter leur rendement d'extraction et de développer des procédures de transformation consommant moins d'énergie.

Ainsi, comprendre et maîtriser le processus d'initiation des grains d'amidon et les paramètres déterminant leur taille et leur forme représentent non seulement des défis scientifiques indéniables, mais également un enjeu économique important.

I. Structure du grain d'amidon

1. L'organisation tridimensionnelle de l'amidon

En fonction de l'organisme et du tissu végétal dans lequel le grain d'amidon est synthétisé, il aura une taille ainsi qu'une morphologie variable (figure 2). Aussi, on retrouve dans les chloroplastes d'*Arabidopsis* des grains d'amidon de 1,5 μm de diamètre en forme de faluche, alors que l'amidon synthétisé dans les amyloplastes des tubercules de pomme de terre peut atteindre 100 μm de diamètre et est de forme ovoïde.

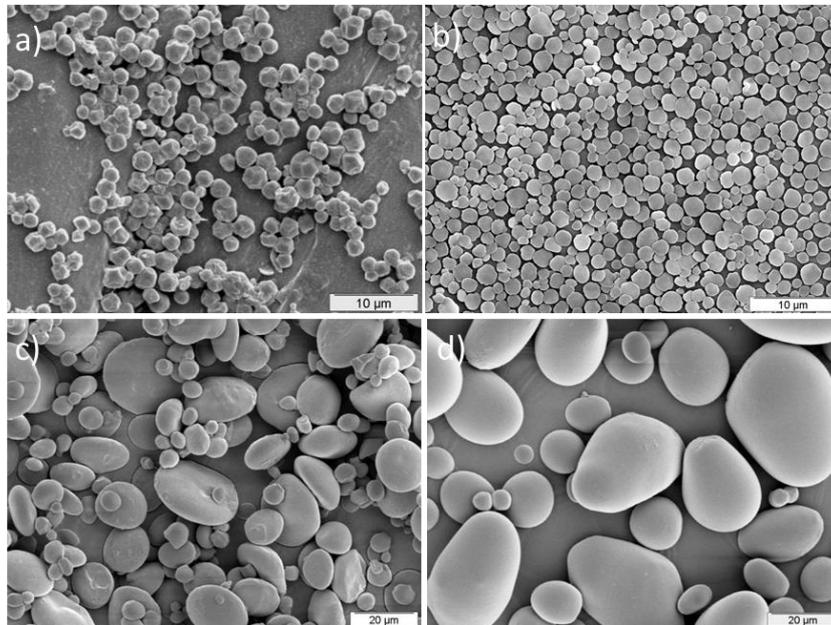


Figure 2 : Photographies de grains d'amidon, d'origines botaniques variées, obtenues par microscopie électronique à balayage. a) amidon extrait de graines d'amarante, forme polyédrique, b) amidon extrait de feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, forme, discoïde et plate, c) amidon de grain de blé, forme plate et ovoïde, d) amidon extrait de tubercules de pomme de terre, forme ovoïde (amidotheque.cermav.cnrs.fr).

Bien que la forme des grains et leur lieu de synthèse soient variés, les grains d'amidon possèdent une composition chimique conservée. Ainsi, deux macromolécules forment principalement le grain d'amidon : l'amylose et l'amylopectine. Elles sont toutes deux composées de résidus de glucose reliés par des liaisons O-glycosidiques de types $\alpha(1\rightarrow4)$ et $\alpha(1\rightarrow6)$. Le grain d'amidon est également composé de protéines et de lipides, piégés en très faible quantité lors de sa croissance (Jobling, 2004).

A l'image des cercles de croissance que l'on observe sur du bois, des anneaux de croissance sont visibles sur des grains d'amidon, organisés de façon concentrique autour d'un hile central (Figure 3).

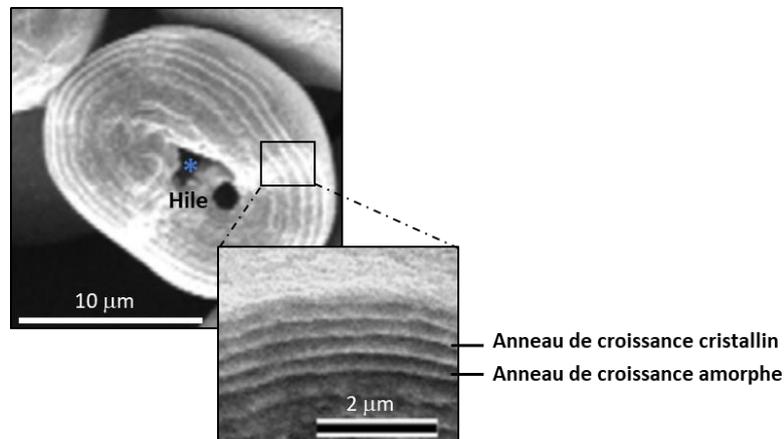


Figure 3 : Amidon de pois digéré, observé par microscopie électronique à balayage (adapté de Cai et al., 2014b). Les grains d'amidon sont digérés 2h par un cocktail d'amylases et d'amyloglucosidases. Cette digestion permet de mettre en relief les anneaux de croissance cristallins moins sensibles à la digestion enzymatique et de creuser les anneaux de croissance amorphes plus sombres. La région centrale du grain d'amidon, appelé hile (*), apparaît en noir, car complètement digérée.

La digestion enzymatique de l'amidon nous permet de distinguer les anneaux de croissances cristallins des anneaux de croissances amorphes, ainsi que le cœur du grain d'amidon appelé hile. Le hile est le point de départ de la synthèse du grain d'amidon. Cette zone est généralement moins organisée que le reste du grain. Le plus souvent, il est situé au centre du grain d'amidon. Il peut également avoir une position excentrique, aussi appelée terminale (Cai and Wei, 2013).

Cette expérience permet également d'observer que la digestion enzymatique du grain ne se fait pas de la surface du grain vers l'intérieur. De façon contre-intuitive, les enzymes creusent le grain jusqu'au hile avant de digérer le grain de l'intérieur (Cai et al., 2014b). De la même façon, les expériences de gélatinisation de l'amidon montrent que la déstabilisation de la structure cristalline de l'amidon ayant un hile central se fait de l'intérieur du grain vers la surface (Cai and Wei, 2013). Cette observation montre que l'organisation en une succession de couches rend la surface de l'amidon de réserve très résistante à la dégradation.

2. L'amylopectine

L'amylopectine est non seulement le polysaccharide majoritaire du grain d'amidon, mais il est également directement responsable de l'architecture du grain en raison de son organisation tridimensionnelle semi-cristalline.

La molécule d'amylopectine possède un degré de polymérisation de l'ordre de 10^5 à 10^6 unités de glucose. Elle est composée de résidus de glucose liés en $\alpha(1\rightarrow4)$. Ce polymère possède 5 à 6% de liaisons O-glycosidiques de type $\alpha(1\rightarrow6)$, aussi appelé point de branchement. Ce sont des liaisons reliant deux chaînes de glucose linéaires, disposées sur la molécule de façon très contrôlée. Les chaînes linéaires les plus représentées de l'amylopectine ont un degré de polymérisation de 10 à 12 résidus de glucose.

L'amylopectine possède une organisation en grappes. Au sein d'une grappe, les points de branchement sont concentrés en une zone restreinte de 2-3 nm appelée lamelle amorphe. Pour le reste de la grappe (6-7 nm), les glucanes s'organisent en doubles hélices parallèles maintenues les unes aux autres par des liaisons hydrogène (cluster), formant une lamelle cristalline. La succession d'une lamelle amorphe et d'une lamelle cristalline mesure de façon constante 9-10 nm (Jenkins et al., 1993). Deux modèles sont envisagés pour expliquer l'organisation de l'amylopectine au sein des lamelles amorphes et cristallines. Le premier propose que les clusters soient interconnectés d'une lamelle cristalline à une autre par une chaîne plus longue (Hizukuri, 1986). Le second modèle propose que les longues chaînes se localisent au niveau des lamelles amorphes et portent les clusters orientés vers la lamelle cristalline (Bertoft, 2004) (figure 4).

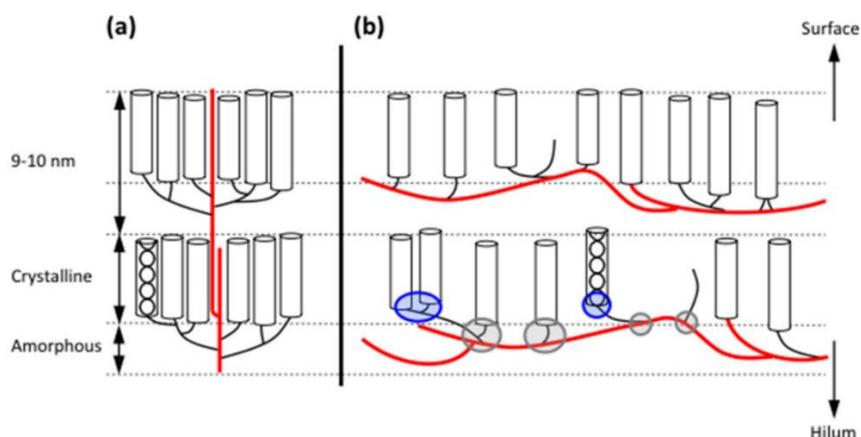


Figure 4 : Représentation schématique de la molécule d’amylopectine dans les anneaux de croissance semi-cristallins (d’après Bertoft, 2017). A) Schéma d’une molécule d’amylopectine selon le modèle dit des « clusters » proposé par Hizukuri. B) modèle de l’amylopectine “backbone” proposé par Bertoft. Les cylindres symbolisent les doubles hélices formées par des chaînes externes. Les lamelles cristallines et amorphes sont indiquées par des lignes grises en pointillés. Les longues chaînes B sont représentées en rouge et les chaînes courtes en noire. Ainsi les ramifications des chaînes courtes peuvent se faire directement sur la chaîne B (rond gris) ou de façon indirecte (rond bleu). Les directions vers la surface et le hile du grain d’amidon sont indiquées à droite.

L’organisation des molécules d’amylopectine dans le grain d’amidon n’est pas encore entièrement comprise. Un premier niveau d’organisation permet de différencier les trois types de cristallinité de l’amidon dû à l’organisation des doubles hélices de l’amylopectine dans les lamelles cristallines. Cette organisation varie en fonction de l’origine botanique de l’amidon.

On distingue ainsi le type A, formé par les doubles hélices d’amylopectine organisées de façon très serrée en quinconce. On retrouve ce type de cristallinité pour l’amidon synthétisé dans les céréales et également dans la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*.

Le type B, quant à lui, est dû à une organisation hexagonale des doubles hélices d’amylopectine plus lâche. Il s’agit du type cristallin retrouvé pour l’amidon transitoire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et dans celui des tubercules de pomme de terre.

Le type C est un mélange des types A et B (Buléon et al., 1997, 1998).

Un second niveau d’organisation de la molécule d’amylopectine est étudié depuis plusieurs dizaines d’années avec dans un premier temps la mise en évidence des blocs presque sphériques par microscopie électronique à balayage de granules d’amidon

partiellement digérés (Gallant et al., 1997). Cette sous-organisation sous forme de “blocklet” a également été visualisée par microscopie électronique à transmission (TEM) et microscopie à force atomique (AFM). L’amylopectine serait le squelette permettant la formation de ces sous-unités. Les « blocklets » sont des sous-unités sphériques de l’amidon et mesurent entre 20nm et 500nm en fonction de l’origine du grain, mais aussi de sa localisation dans le grain d’amidon (figure 5).

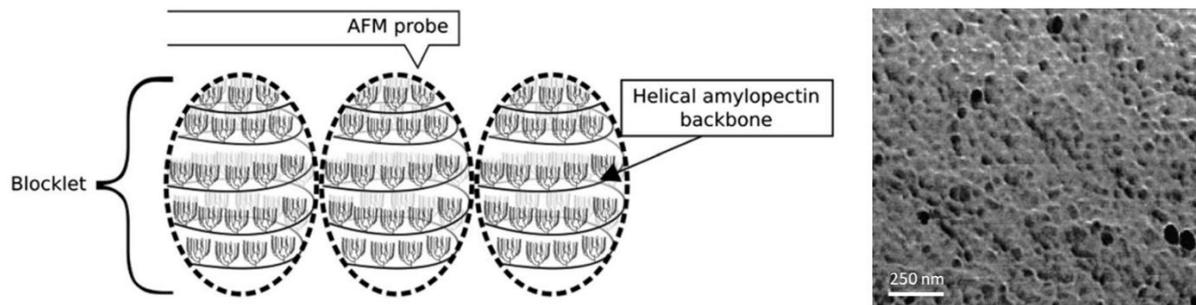


Figure 5 : Représentation de l'analyse AFM de la surface des granules d'amidon (adaptée de Goren et al., 2018; Parker et al., 2008). La microscopie à force atomique permet d’obtenir une imagerie de surface grâce à la pointe AFM représentée sur le schéma. La déviation de la pointe génère des signaux électriques qui forment l’image topographique de la surface des granules. L’image à droite de la figure représente la surface d’une coupe de grain d’amidon de pois obtenue par AFM haute résolution en contraste de phase (Goren et al., 2018). La partie schématique de la figure montre une représentation de structures putatives, appelées « blocklet », identifiées par AFM, qui fournissent un niveau intermédiaire d'organisation entre les lamelles et les anneaux de croissance. L’organisation de l’amylopectine forme une structure hélicoïdale d’après (Bertoft, 2013).

3. L’amylose

Fraction minoritaire de l’amidon, l’amylose constitue environ 20 à 30% du poids sec du grain d’un amidon de réserve. Cette macromolécule s’accumule sous la forme de longues chaînes linéaires et possède un faible pourcentage de ramification (<1%) (Takeda and Hizukuri, 1987). Son degré de polymérisation est compris entre 600 et 6000 résidus de glucose. La localisation précise de l’amylose dans le grain d’amidon reste à déterminer. De nombreuses études montrent que l’amylose se localise principalement dans les zones amorphes du grain d’amidon (Blennow et al., 2003; Cai et al., 2014a; Cai and Wei, 2013; Glaring et al., 2006).

L’étude de mutants *waxy*, dépourvus d’amylose, obtenus dans plusieurs espèces végétales a permis de montrer que l’absence de ce polymère n’a pas d’effet remarquable sur la structure d’un grain (Buléon et al., 1998). Inversement, la suraccumulation

d'amylose conduit à des grains de morphologie très éloignée de la lignée sauvage de référence. C'est le cas de l'amidon de maïs dont la suraccumulation d'amylose conduit à un mélange de grains d'amidon de morphologie variée (Cai et al., 2014a, figure 6).

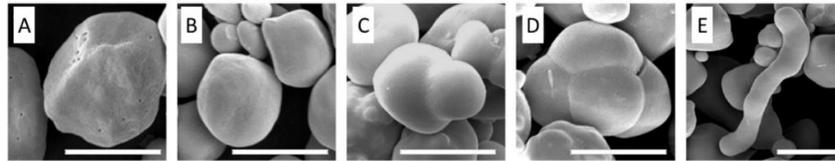


Figure 6 : Amidon de maïs observé par microscopie électronique à balayage (Cai et al., 2014a). A) maïs (27% amylose) ; (B-E) Observation individuelle des différents types d'amidon présent dans la lignée de maïs à haute teneur en amylose (71% amylose). Barre d'échelle = 10 μ m.

Cette observation doit cependant être nuancée, car certaines lignées sont enrichies en amylose, du fait d'un défaut de synthèse de l'amylopectine (Slade et al., 2012). Ces modifications de propriété peuvent être intéressantes pour l'utilisation par l'industrie agroalimentaire de l'amidon. Si le ratio amylose/amylopectine diminue, l'amidon dit « waxy » aura une faible capacité de rétrogradation après cuisson et il apportera plus de viscosité qu'un amidon standard. A l'inverse, si ce ratio augmente, l'amidon riche en amylose dit "résistant" sera digéré par notre organisme, de la même façon qu'une fibre. L'apport énergétique de cet amidon sera donc moindre (Brewer et al., 2012; Buléon et al., 1998; Topping, 2018).

Le marquage de l'amidon à l'APTS (molécule fluorescente qui se fixe sur l'extrémité réductrice d'un glucane) permet de distinguer l'amylose de l'amylopectine et ainsi de visualiser par microscopie confocale la distribution de l'amylose à l'échelle du grain (Blennow et al., 2003). L'amylose s'accumule au niveau des zones amorphes de l'amidon que ce soit au niveau des anneaux de croissance amorphes ou des lamelles amorphes ou encore au niveau du hile central (figure 7). Il a également été montré que l'amylose se localise au niveau de la zone comprenant les ramifications de l'amylopectine (Jenkins and Donald, 1995). L'amylose aurait pour rôle d'augmenter la capacité de stockage du glucose dans le grain d'amidon en augmentant sa densité dans les zones amorphes du grain (Zeeman et al., 2010).

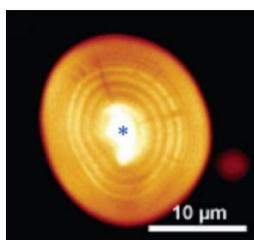


Figure 7 : grain d'amidon de blé marqué à l'APTS et observé en microscopie confocale (Glaring et al., 2006). Le signal le plus intense de couleur jaune, correspondant à l'amylose, et en orange celui de l'amylopectine. La zone centrale du hile est indiquée avec un astérisque bleu (*).

II. *Arabidopsis thaliana*

1. Un modèle d'étude

Arabidopsis thaliana est une petite plante diploïde appartenant à la famille des Brassicacées qui comprend des espèces cultivées comme le chou et le radis ou encore le colza. Elle offre des avantages importants pour la recherche fondamentale en génétique et en biologie moléculaire. En 1943, Friedrich Laibach a démontré la pertinence de son utilisation en tant que modèle, définissant le nombre correct de chromosomes de la plante en isolant les premiers mutants par rayons X.

Mais c'est dans les années 1980 que son étude a connu un grand essor grâce au développement de méthodes efficaces de transformation permettant ainsi d'obtenir des mutants d'insertion (Koornneef et al., 2010).

Il en résulte qu'*Arabidopsis thaliana* est l'organisme modèle majoritairement utilisé pour étudier le métabolisme de l'amidon (figure 8). Les écotypes ou « variétés » les plus couramment utilisés pour la recherche sont *Columbia (Col)*, *Wassilewskija (WS)* et *Landsberg erecta (Le)*.

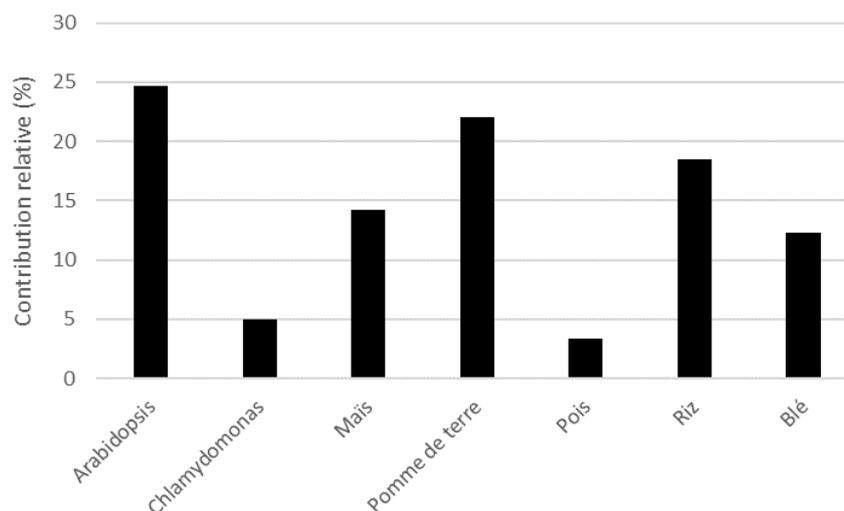


Figure 8 : Contribution relative des différentes espèces végétales à la compréhension du métabolisme de l'amidon ou de son initiation (Scopus 2018).

Arabidopsis thaliana (figure 9) présente de nombreuses caractéristiques qui font de cette plante un modèle d'étude particulièrement intéressant : - C'est une plante de petite taille, environ 30 cm de hauteur après développement des hampes florales - Sa culture ne nécessite pas de grosses infrastructures - Son temps de génération est relativement court avec 2 mois entre le semis et la récolte des graines - Elle synthétise de l'amidon dans ses tissus, principalement au niveau de ses feuilles - Les fleurs s'autopollinisent et donnent naissance à des fruits (silique) portant de nombreuses graines - On peut réaliser, à la main, des croisements entre deux plantes de génotypes différents.



Figure 9 : Photographie d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Wassilewskija (WS). Après trois semaines de croissance dans une cabine de culture (phytotron) avec 16h d'illumination à 23°C et 8h d'obscurité à 20°C. Les hampes florales se développent à partir du centre de la rosette.

De plus, son petit génome de 125Mb repartit sur 5 paires de chromosomes homologues a été complètement séquencé et annoté depuis 2000 (Palm et al., 2000). Ces caractéristiques ainsi que la création de banques de mutants d'insertion ont permis l'essor d'une approche dite de « génétique inverse » permettant de comprendre l'effet de l'inhibition d'un gène donné et d'en déterminer sa fonction par l'analyse phénotypique des mutants correspondants.

- **Transformation d'*A. thaliana* par insertion d'ADN-T d'*A. tumefaciens***

Plus de 400 000 lignées mutantes ont été obtenues par insertion d'un fragment d'ADN exogène, un ADN-T modifié (ADN de transfert) d'*Agrobacterium tumefaciens*. Ce phytopathogène, mis en contact avec les organes reproducteurs d'*A. thaliana*, va insérer aléatoirement une portion de son ADN-T modifié (Figure 10) dans le génome de la plante. Les graines produites sont ensuite semées sur un milieu permettant la sélection des plantes transformées ayant intégré une ou plusieurs copies d'ADN exogène dans leur génome conduisant ainsi à la création de banques de mutants.

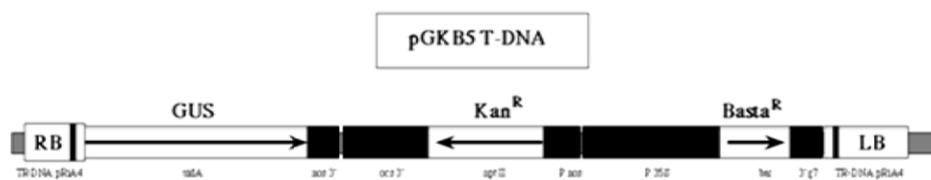


Figure 10 : Représentation schématique de l'ADN-T utilisé à l'INRA de Versailles pour la construction d'une collection de mutants. Les bords droit (RB) et gauche (LB) délimitent la fraction du plasmide pGKB5 T-DNA qui va s'insérer dans le génome de la plante. Les modifications telles que l'introduction de gènes permettant l'expression de la β -glucuronidase (GUS), ainsi que les gènes de résistance à la Kanamycine (KanR) et à l'herbicide Basta (BastaR) permettant de sélectionner les lignées mutantes.

Les régions d'ADN, bordant directement l'insertion (FSTs), sont systématiquement séquencées puis mises à disposition dans une banque de données (arabidopsis.org). Il est alors possible de commander les graines pour lesquelles une FST indique l'existence d'une insertion dans le gène d'intérêt. Les banques de mutants d'insertion sollicitées pour cette étude sont la banque américaine SALK, la banque allemande GABI et la banque française de l'INRA de Versailles (FLAGdb). Suivant son origine, l'éco-type transformé ainsi que la séquence de l'ADN exogène peuvent différer. Les graines reçues au laboratoire correspondent généralement à un mélange d'hétérozygotes, d'homozygotes sauvages et mutants. Une sélection du mutant homozygote est donc nécessaire avant de pouvoir procéder au phénotypage de la lignée.

2. De l'amidon de la tête aux pieds

Les plantes sont des organismes vivants qui doivent s'adapter rapidement aux changements de leur environnement. Dès la germination, les plantules doivent

s'orienter vers le haut pour accéder à la lumière avant que les réserves de graines ne soient épuisées, tandis que les racines doivent descendre dans le sol pour accéder aux nutriments et à l'eau. La plante va ensuite continuer sa croissance en adaptant ses réserves d'énergie, son amidon, et en conservant la capacité de corriger son métabolisme et sa croissance en réponse aux facteurs environnementaux.

L'amidon est synthétisé au niveau des feuilles d'*Arabidopsis* et est également recruté au niveau de ses fleurs et de ses racines (figure 11) pour les raisons développées dans les points suivants.

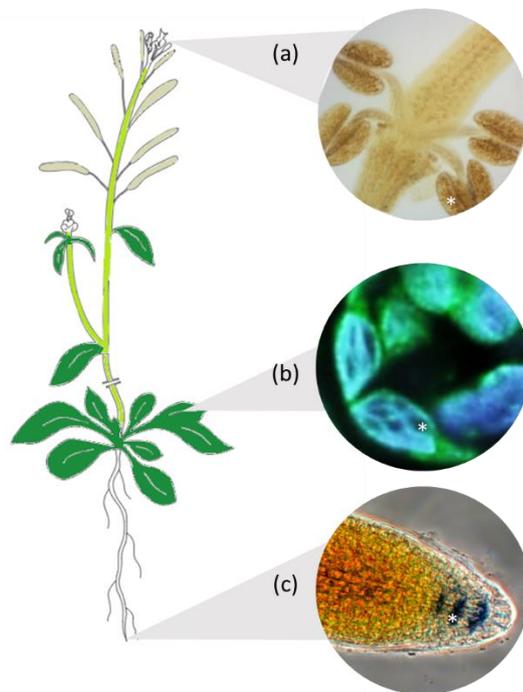


Figure 11 : Observation de l'amidon au niveau des fleurs, feuilles et racines d'*Arabidopsis thaliana*.
a) Coloration à l'iode des fleurs présentant une forte accumulation d'amidon au niveau des grains de pollen des étamines (Hedhly et al., 2016). b) Observation de l'amidon au niveau des chloroplastes. L'auto fluorescence de la chlorophylle est représentée en vert et bleu et l'amidon apparaît en noir par contraste. c) coloration à l'iode des racines. L'amidon est indiqué dans les trois bulles par un astérisque blanc (*).

- **L'implication de l'amidon dans le gravitropisme.**

Le système racinaire permet de nourrir la plante en absorbant de l'eau et des nutriments présents dans le sol et également à l'ancrer dans le sol. Chez *Arabidopsis thaliana* on peut observer le développement racinaire en déposant les graines sur un milieu gélosé. La racine principale résulte du développement de la racine embryonnaire et les racines latérales se développent dans un second temps à partir de cette racine

principale. Des différences métaboliques entre ces deux types racinaires existent, mais sont encore peu décrites (Guyomarc'h et al., 2012).

Les racines jouent un rôle primordial pour la plante, ce qui leur demande d'être capables de s'adapter à leur environnement pour assurer la survie de la plante. La perception de la gravité par les racines leur permet de s'enfoncer dans le sol de façon horizontale (diagravitropisme), oblique (plagiogravitropisme) ou verticale (orthogravitropisme) pour l'accès à l'eau et aux nutriments et également pour contourner des obstacles (Su et al., 2017).

La zone de la racine sensible à la gravité se situe sous le centre quiescent, dans les cellules de la columelle de la coiffe racinaire. Les cellules qui composent la columelle nommées statocystes, sont organisées en ligne de 4 cellules superposées en trois lignes. Elles possèdent des amyloplastes, remplis d'amidon aussi appelés statolithes (figure 12).

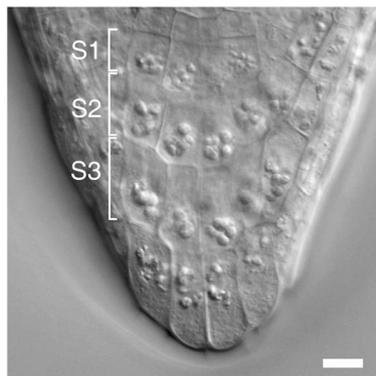


Figure 12 : Coiffe racinaire d'Arabidopsis (Leitz et al., 2009). Micrographie DIC d'une coiffe racinaire d'Arabidopsis (écotype Wassilewskija; Ws) montrant l'organisation de la région tissulaire de la columelle en trois niveaux de cellules distincts, S1 à S3, avec quatre cellules dans chaque niveau. Barre d'échelle = 10 μm .

La perception du gravitropisme par les racines est rendue possible par la sédimentation des statolithes, dans le sens de la gravité, du fait de la structure très dense de l'amidon (figure 13). Cette force gravitationnelle fait pression sur les parois des cellules de la coiffe racinaire induisant un signal biochimique influençant la croissance de la racine.

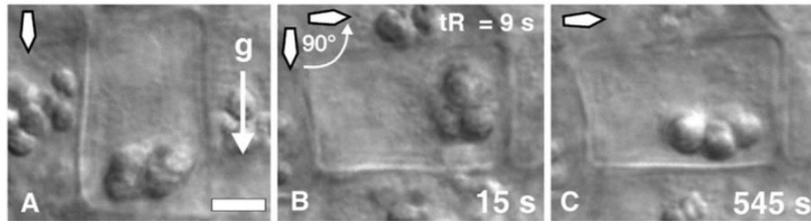


Figure 13 : Sédimentation des statolithes dans les cellules centrales de columelle S2 d'Arabidopsis en quelques secondes après un changement d'orientation de la plante de 90° (Leitz et al., 2009). (A) Position des statolithes (gris transparent) avant la réorientation. (B) Réorientation à 90°. Temps de réorientation de 9 sec. (C) Déplacement des statolithes 545 s après réorientation.

- **De l'amidon transitoire dans la rosette**

Arabidopsis synthétise de l'amidon, au niveau de ses feuilles, pendant la journée afin de stocker le glucose issu de la photosynthèse et ainsi pouvoir restituer à la plante l'énergie stockée en absence de lumière. On dénombre 5 à 7 grains d'amidon d'environ 1,5 µm de diamètre par chloroplaste, dans les feuilles d'*A. thaliana* (figure 2b et 11b).

Dans les feuilles d'Arabidopsis, un rythme quotidien est mis en place par l'alternance jour/nuit. Il s'agit de l'horloge circadienne qui contrôle le taux de dégradation de l'amidon pour assurer un approvisionnement optimal et continu en carbone.

Le lien entre le métabolisme de l'amidon et le rythme circadien a été décrit dans un premier temps chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas*. En effet, une étude de 2006 montre que cette microalgue est capable, en présence d'acétate comme source de carbone et après une adaptation à un cycle jour nuit, de synthétiser et dégrader de façon constante son amidon en condition et jour ou de nuit continue (Ral et al., 2006).

Des études menées sur Arabidopsis ont mis en évidence le contrôle par le rythme circadien de la régulation de la dégradation constante de l'amidon, ainsi que de l'anticipation des transitions entre les différentes photopériodes (Graf et al., 2010; Graf and Smith, 2011; Scialdone et al., 2013). Le rythme circadien de l'amidon est impacté par l'inactivation de gènes codants pour des facteurs de régulation de l'horloge circadienne tels que les PRR et CCA (pseudo response regulator et les circadian clock associated) (Fernandez et al., 2017; Seki et al., 2017). Ce qui montre que le métabolisme de l'amidon est impacté par des facteurs protéiques impliqués dans d'autres voies métaboliques, tels que ceux du contrôle du rythme circadien.

- **Implication de l'amidon dans le développement de la fleur**

La floraison demande beaucoup d'énergie à la plante. L'amidon va servir de carburant pendant le développement de la hampe florale, la floraison, la maturation du pollen, la pollinisation et durant la maturation de la graine ((Streb and Zeeman, 2012, figure 11a).

Après pollinisation, l'amidon est principalement présent au niveau du tégument de la graine et sert à approvisionner l'embryon en saccharose pendant son développement. Celui-ci est converti en acetyl CoA, précurseur de la synthèse des acides gras (Andriotis et al., 2010; O'Neill et al., 2003). Une fois mature, il ne reste dans la graine que très peu d'amidon remplacé par une grande quantité de lipides qui servira à la réserve énergétique de l'embryon au moment de la germination.

Le métabolisme des carbohydrates et la reproduction d'Arabidopsis étant liés, étudier des mutants dépourvus d'enzymes impliqués dans ce métabolisme peut avoir des effets inattendus sur le développement de la plante. On peut ainsi observer :

- i)* Une diminution de la taille de leur silique associée à une diminution du nombre de graines (Malinova et al., 2014a),
- ii)* Un impact sur la quantité et la qualité des graines de ces mutants (Andriotis et al., 2012; Liu et al., 2016),
- iii)* De façon plus drastique, on peut être confronté à des problèmes de stérilité de la plante empêchant d'étudier une mutation à l'état homozygote (Egli et al., 2010; Kunz et al., 2014).

Ce lien entre le métabolisme de l'amidon et celui des lipides peut être détourné à des fins industrielles. Ainsi, sélectionner des lignées de colza, plante cousine d'Arabidopsis, avec une mutation du métabolisme de l'amidon peut conduire à augmenter son rendement en huile (Liu et al., 2016).

III. Métabolisme de l'amidon

1. Mécanisme de biosynthèse de l'amidon : Une synthèse en 5 étapes

1.1 La synthèse du glycosyl nucléotide précurseur

Lors de la photosynthèse, l'énergie solaire est convertie en énergie chimique (ATP, NADPH, H⁺) permettant au cycle de Calvin de fonctionner. Ce cycle va permettre au carbone atmosphérique (CO₂) d'être assimilé sous la forme de carbone organique via la Rubisco. L'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA) est le premier produit stable issu de la photosynthèse. Il servira à la synthèse du triose-phosphate exporté du chloroplaste vers le cytosol de la cellule végétale conduisant à la synthèse de saccharose. Le triose-phosphate restant dans le chloroplaste entre quant à lui dans la voie de synthèse principale de l'amidon.

L'isoforme plastidiale de la phosphoglucose isomérase (PGI) est impliquée dans la biosynthèse de l'amidon en générant du Glc-6-phosphate (Glc6P) à partir du produit photosynthétique primaire Fru6P. Le Glc6P est ensuite converti en Glc-1-phosphate (Glc1P) et en ADP-glucose via l'action respective de la phosphoglucomutase (PGM) et de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (figure 14, Stitt and Zeeman, 2012).

L'ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) est l'enzyme clé permettant la régulation de la synthèse d'amidon. L'enzyme catalyse la réaction permettant de passer du glucose-1-phosphate et d'une molécule d'ATP à de l'ADP-Glucose et une molécule de pyrophosphate (pp_i). L'ADP-glucose est le substrat donneur du glucose utilisé par les amidon-synthases pour synthétiser l'amidon (figure 14). L'AGPase, est un hétérotétramère, issu de l'expression de plusieurs gènes, composé de deux sous-unités S et de deux sous-unités L (L₂S₂). Cette enzyme est régulée de façon allostérique. L'acide 3-phosphoglycérique (3-PGA), issu de la photosynthèse est un effecteur qui l'active, tandis que l'orthophosphate (Pi), produit de la réaction de synthèse de l'ADP-Glc, l'inactive. L'enzyme est également sujette à une régulation de type oxydation/réduction et est active sous sa forme réduite (Geigenberger, 2011; Hendriks et al., 2003).

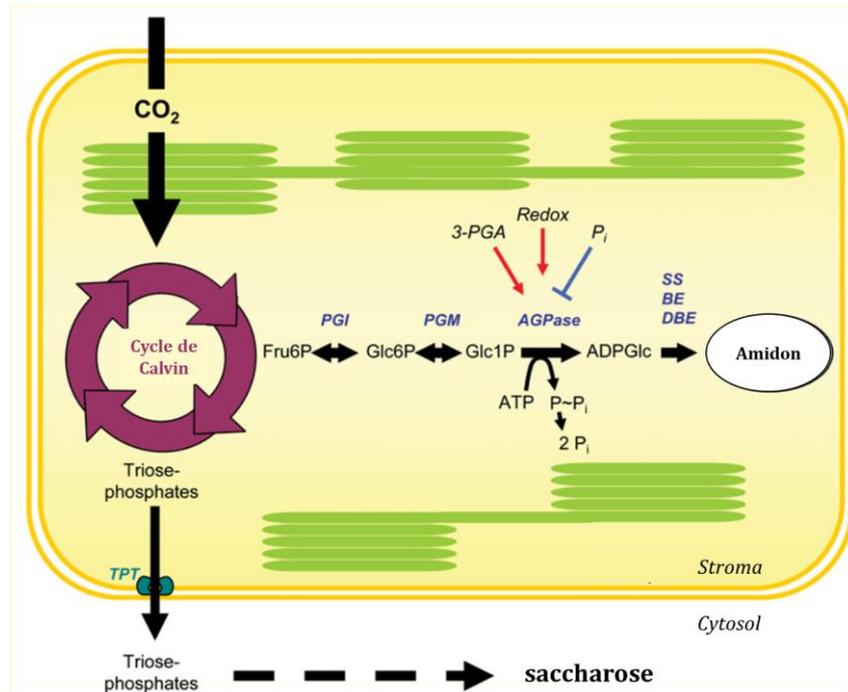


Figure 14 : Représentation schématique de la voie de synthèse de l'ADP-glucose dans les chloroplastes (Zeeman et al., 2007). Le carbone est assimilé par le cycle de Calvin. Une partie est exportée vers le cytosol pour la synthèse de saccharose. L'autre partie est retenue dans le chloroplaste pour la synthèse amidon. La régulation de l'AGPase permet le contrôle de la synthèse d'amidon. Les flèches rouges indiquent les effecteurs qui activent l'enzyme, tandis que la flèche bleue représente une inhibition de l'enzyme. Abréviations : Fru6P, fructose-6-phosphate ; Glc1P, glucose-1-phosphate ; Glc6P, glucose 6-phosphate ; TPT, triose-phosphate/phosphate translocateur.

1.2 L'initiation de la synthèse du polysaccharide

Le mécanisme d'initiation de l'amidon n'est pas compris dans son entièreté. Cependant, ce processus est décrit pour une molécule de réserve similaire, le glycogène. Le glycogène est synthétisé dans les cellules de micro-organismes tels que les bactéries et les levures ainsi que chez les animaux. L'amidon et le glycogène possèdent de nombreux points communs. Ce sont tous deux des polymères de glucose possédant les mêmes types de liaisons osidiques. Ils permettent de stocker l'énergie, de manière inerte pour la cellule du point de vue osmotique, et de restituer l'énergie et le carbone en cas de carence. Seule l'organisation des chaînes de glucose diffère, conférant des propriétés différentes aux deux polymères. L'amidon est insoluble dans l'eau et de taille en théorie illimitée, tandis que le glycogène est soluble dans l'eau et plus petit (figure 15)

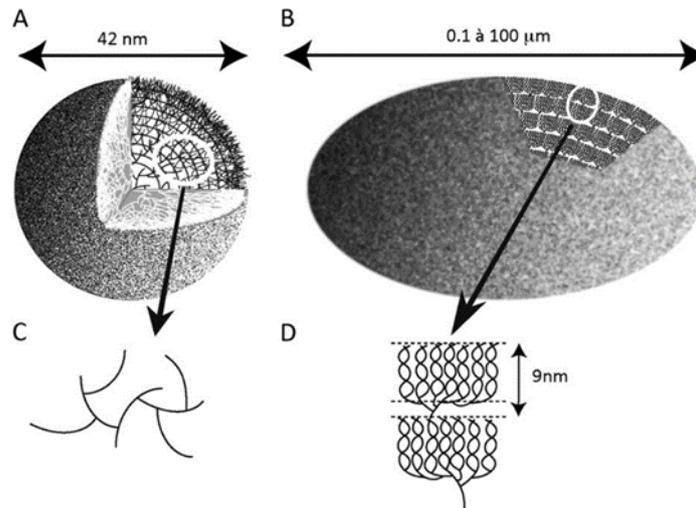


Figure 15 : Représentation schématique du glycogène (A) et de l'amidon (B) (Ball et al., 2011). Les lignes représentent des chaînes de glucoses liés en $\alpha(1\rightarrow4)$ et les intersections de ces lignes symbolisent les points de branchement en $\alpha(1\rightarrow6)$. Sections agrandies des zones entourées pour le glycogène (C) et l'amidon (D). La distribution des branches illustrée en (C), avec deux liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ par glucane, conduit à l'augmentation exponentielle de la densité des chaînes lorsque l'on s'éloigne du centre de la particule. Cela conduit à une taille maximum prévisible de 42 nm pour le granule de glycogène affiché en (A). En effet, l'encombrement stérique empêche les enzymes du métabolisme du glycogène d'accéder à leur substrat. (D) Organisation en grappe de la molécule d'amylopectine (amidon) : avec la distribution asymétrique des points de branchement regroupés dans la lamelle amorphe, et les chaînes linéaires regroupées en double hélice qui définissent la lamelle cristalline. La somme d'une lamelle amorphe et d'une lamelle cristalline d'une grappe d'amylopectine est de 9 nm quelle que soit l'origine botanique de l'amidon. Cette organisation peut en théorie être répétée indéfiniment, mais est cependant limitée par la taille des plastides et le besoin de stockage de la plante.

Pour comprendre l'initiation de l'amidon, faire un parallèle avec la synthèse du glycogène peut se révéler intéressant. En effet, le mécanisme d'initiation du glycogène est connu et fait intervenir un facteur protéique capable de s'auto-glycosyler : la glycogénine (Smythe and Cohen, 1991). Cette auto-glycosylation permet la synthèse du précurseur qui sera allongé par les différentes glycogène-synthases.

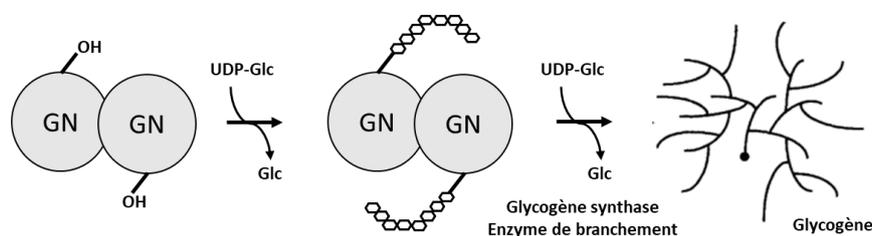


Figure 16 : Représentation schématique de l'initiation de la synthèse du glycogène. La glycogénine s'autoglycosyle à partir de l'UDP-Glc sur la fonction alcool d'une tyrosine spécifique. La glycogène-synthase allonge l'amorce formée par la réaction d'autoglycosylation. L'action des enzymes de branchement introduit les ramifications conduisant à la formation du glycogène. *Abréviation GN : glycogénine ; UDP-Glc : Uridine DiPhosphate-Glucose*

Chez les animaux, levures et champignons la glycogénine utilise de l'UDP-glucose (Lomako et al., 2004) - Les bactéries qui ne possèdent pas de glycogénine ont une glycogène-synthase capable de s'autoglycosyler et utilise de l'ADP-glucose ou de l'UDP-glucose (Torija et al., 2005; Ugalde et al., 2003).

Une approche par homologie de séquences permet d'identifier, chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs glycogénines potentielles. L'analyse de ces protéines a permis de montrer qu'elles étaient impliquées dans la synthèse de polysaccharide de la paroi végétale (Rennie et al., 2012). La piste des amidon-synthases est actuellement privilégiée afin d'expliquer le processus d'initiation de l'amidon. De grands progrès ont été réalisés dans ce domaine grâce à l'analyse d'une lignée d'*Arabidopsis* dépourvue de l'amidon-synthase 4 (SS4). Les résultats obtenus ont permis d'identifier la SS4 comme protéine majoritairement impliquée dans le mécanisme d'amorçage de la synthèse de nouveaux grains d'amidon dans les chloroplastes d'*Arabidopsis* (Roldán et al., 2007).

Les différentes pistes suivies actuellement pour permettre de comprendre le processus d'initiation de l'amidon chez les végétaux seront développées dans la partie IV de cette introduction.

1.3 Elongation du glucane

L'élongation des glucanes est réalisée par les amidon-synthases. Ces enzymes utilisent comme substrat donneur l'ADP-glucose et le transfèrent sur l'extrémité non réductrice du glucane en formation (figure 17). Ainsi, chaque molécule d'amylopectine ou d'amylose ne possède qu'une unique extrémité réductrice.

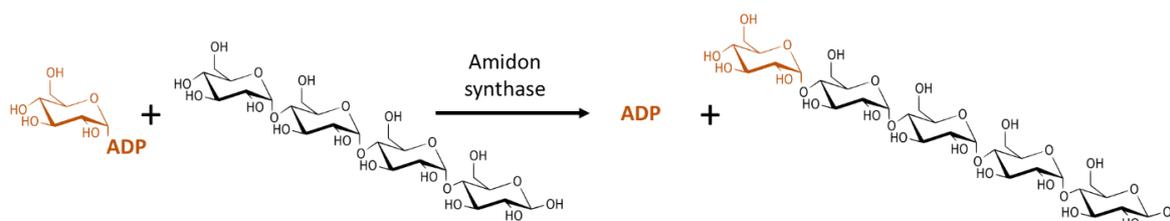


Figure 17 : Représentation schématique de la réaction catalysée par les amidon-synthases. Les enzymes transfèrent le résidu de glucose de l'ADP-glucose (indiqué en orange) sur l'extrémité non réductrice du glucane en élongation.

Plusieurs amidon-synthases génétiquement indépendantes sont identifiées chez les végétaux. Elles appartiennent à la famille GT5 de la classification CAZy (Carbohydrate Active enzyme) et interviennent dans différentes étapes de la synthèse de l'amidon (figure 18). Les analyses phylogénétiques montrent que ces enzymes se répartissent en deux groupes. Avec d'un côté la SS1, SS2 et la GBSS, groupe A, probablement d'origine cyanobactérienne, et d'un autre côté la SS4 et la SS3, groupe B, issues des Chlamydiales (Ball et al., 2013).

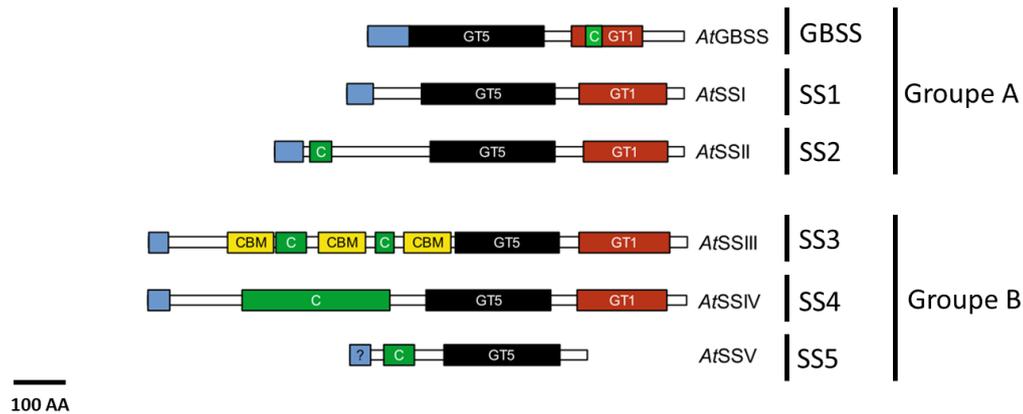


Figure 18 : Représentation des domaines des différentes classes d'amidon-synthase (SS) (adapté de Pfister and Zeeman, 2016). Les différents types d'amidon-synthases forment deux sous-groupes en fonction de leurs origines évolutives (A et B). Les peptides d'adressage au chloroplaste sont surlignés en bleu (en N-terminales). Les modules de liaison aux carbohydrates (CBM) en jaunes, les domaines coiled-coil (C) en vert, les domaines glycosyltransférase-5 (GT5) en noires, domaines de la glycosyltransférase-1 (GT1) en rouge. Les synthases présentées sont des glycosyltransférases de la famille GT5 et utilisent ADP-glucose comme substrat. La régions N-terminale de SS3 contient des motifs C et CBM hautement conservés parmi divers orthologues. AtSSV semble posséder un peptide de transit chloroplastique, mais la confiance de cette prédiction est faible (chloroP). Par ailleurs, AtSSV est dépourvue du domaine GT1 et la fonction de cette protéine reste inconnue. Barre = 100 acides aminés (AA)

- **L'amidon-synthase liée au grain (GBSS) :**

Les lignées dépourvues de l'activité de la GBSS ne sont plus capables de synthétiser de l'amylose. Ceci suggère que la GBSS est responsable de la synthèse de l'amylose et qu'aucune autre synthase ne remplace sa fonction. Néanmoins, l'absence d'amylose n'impacte pas la croissance de la plante ni la structure de l'amylopectine conduisant à des grains d'amidon de morphologie conservée bien que moins dense. L'amidon dépourvu d'amylose est appelé amidon waxy.

La nature de l'initiation de l'amylose n'est pas encore résolue. Chez la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii*, la GBSS se distingue des GBSS des plantes vasculaires notamment par son extension C-terminale. Cette amidon-synthase est capable de se fixer à l'amylopectine, qu'elle allonge. Cette nouvelle chaîne glucanique est ensuite clivée, avant d'être utilisée comme substrat pour la synthèse d'amylose (Ball et al., 1998; Wattedled et al., 2002). Une telle activité n'est pas décrite chez *A. thaliana*. Une possibilité d'initiation du polysaccharide serait l'utilisation de malto-oligosaccharides qui, de plus, augmente l'activité de la GBSS (Zeeman et al., 2002).

La GBSS représente de 70% à 90% de la fraction protéique retrouvée piégée dans le grain d'amidon (Helle et al., 2018). Elle est liée de façon non-covalente au grain. Une étude récente montre que la GBSS est correctement adressée au grain d'amidon via son interaction avec une protéine, PTST1 (protein targeting to starch 1), possédant un domaine de fixation aux carbohydrates (CBM) dans la région N-terminale (Seung et al., 2015). PTST1 est également retrouvé dans le grain d'amidon (Helle et al., 2018).

- **L'amidon synthase soluble (SS) : synthèse de l'amylopectine**

La SS1 est impliquée dans la synthèse des chaînes courtes de l'amylopectine. L'étude du mutant d'*Arabidopsis* dépourvu de cet amidon synthase montre que la distribution en longueur de chaîne de l'amylopectine diminue pour les DP 8-12. La mutation n'entraîne pas de modification de la taille de la plante, ni de la quantité d'amidon accumulée en fin de jour. La morphologie des grains d'amidon est également normale (Delvallé et al., 2005). La SS2, quant à elle, synthétise les chaînes de taille intermédiaire (DP 12-30). Son absence conduit à une augmentation de la quantité d'amylose dans le grain, ainsi qu'à l'augmentation de la fraction de sucre soluble dans la feuille. Ces modifications engendrent un changement de la morphologie des grains d'amidon (Szydlowski et al., 2011; Zhang et al., 2008). SS3 permet la synthèse de chaînes plus longues impliquées dans la liaison inter-grappe (DP 10 à 40). L'absence de cette enzyme modifie la distribution de la longueur des chaînes de l'amylopectine et diminue la proportion de ce polymère, augmentant ainsi le ratio amylose/amylopectine. Elle conduit également à une diminution de la quantité d'amidon accumulée dans la feuille

en fin de jour et à une diminution de la taille des grains d'amidon (Pfister et al., 2014; Szydlowski et al., 2011).

Enfin, l'amidon-synthase de type 4 (SS4), très conservée chez les espèces végétales supérieures, se distingue des trois autres isoformes. Son absence conduit à la présence d'un seul grain par chloroplaste contre 5 à 7 pour les plantes sauvages ; le grain est également 2 à 3 fois plus gros que la normale. Cette mutation conduit également à un phénotype nain de la plante. Cependant, il n'y a pas de modification marquée de la structure de l'amidon, que ce soit concernant la distribution en longueur de chaînes ou le ratio amylose/amylopectine. On observe uniquement une légère réduction de la cinétique de synthèse et de dégradation de l'amidon dans les feuilles (Roldán et al., 2007). L'analyse de lignées dépourvues d'une amidon-synthase a permis de déterminer l'implication de chaque enzyme dans la synthèse d'amylopectine. Néanmoins, une certaine redondance fonctionnelle entre les différentes isoformes a pu être mise en évidence au travers de l'analyse de lignées d'*Arabidopsis* combinant plusieurs mutations. Ainsi la SS3 présente une redondance fonctionnelle avec la SS2, le phénotype du double mutant étant beaucoup plus marqué que la simple addition des phénotypes des deux simples mutants (Zhang et al., 2008). De la même manière, une lignée combinant les mutations pour les amidon-synthases 3 et 4 ne semble plus capable d'initier la synthèse d'amidon (voir chapitre IV ; Szydlowski et al., 2009).

1.4 L'introduction des points de branchement

Les enzymes de branchements appartiennent à la famille des α -amylases. Elles permettent d'introduire des ramifications, aussi appelées points de branchement, caractéristiques du polysaccharide. Les enzymes de branchements utilisent, comme substrat, une chaîne linéaire de glucose. Cette chaîne linéaire, préalablement synthétisée par les amidon-synthases, est clivée puis branchée sur la structure en générant une liaison osidique en $\alpha(1\rightarrow6)$ (figure 19). Cette étape de branchement peut être intra ou inter-moléculaire.

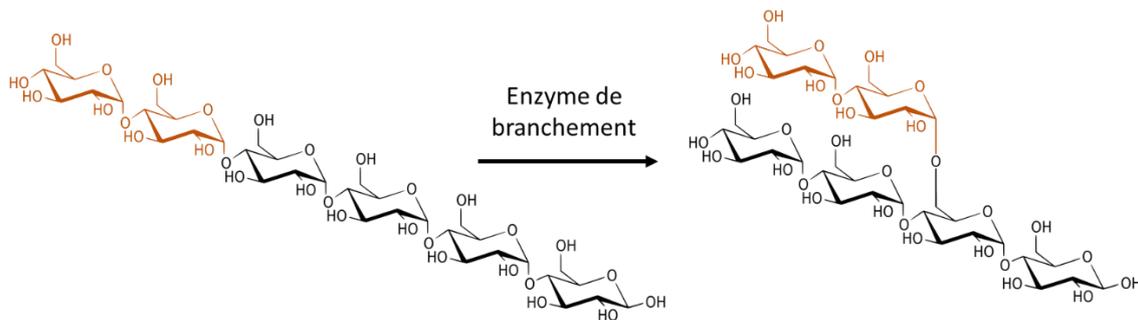


Figure 19: Représentation schématique du mode d'action intramoléculaire des enzymes de branchement. Les résidus de glucose transférés sont représentés en orange. La liaison osidique en $\alpha(1\rightarrow6)$ qui fait la jonction entre les deux chaînes linéaires est bicolore orange et noir.

Chez *Arabidopsis thaliana*, deux isoformes génétiquement indépendantes d'enzyme de branchement ont été identifiées, SBE2.2 et SBE2.1. L'étude de mutant dépourvu de l'une ou l'autre de ces enzymes montre un phénotype semblable à la lignée sauvage de référence. La structure de l'amidon n'est que très légèrement impactée par la mutation. Cette légère modification se caractérise par une diminution des chaînes de glucose d'un degré de polymérisation (DP) compris entre 6-7 pour l'amylopectine du mutant dépourvu de SBE2.2 comparée à celle du sauvage et une diminution des DP 5-9 pour le mutant SBE2.1 par rapport à l'amidon sauvage. Une lignée possédant la double mutation conduisant à l'inactivation des deux enzymes de branchement a été caractérisée. De façon très intéressante, ce double mutant n'est plus capable de synthétiser de l'amidon, mais accumule du maltose. Cette étude démontre dans un premier temps la redondance fonctionnelle de ces deux enzymes de branchement, car l'absence de l'une est compensée par la seconde. Et dans un second temps, montre le caractère indispensable des enzymes de branchement à la synthèse d'amidon (Dumez et al., 2006).

La caractérisation enzymatique des enzymes de branchement d'*Arabidopsis* a également permis de les différencier par leurs spécificités. Les conditions optimales d'activité de ces enzymes ont ainsi été obtenues. Avec notamment une température et un pH optimal de 25°C et pH7 ainsi qu'une taille minimum de substrat de DP 12 nécessaire à l'action de SBE2.2. Concernant SBE2.1, les conditions optimales sont de 20°C et un pH de 6.5. La taille minimale du substrat de cette enzyme est de DP 10 (Wychowski et al., 2017).

1.5 Maturation de la structure.

Il existe deux classes d'enzymes de débranchement capables d'hydrolyser les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ entre 2 résidus de glucose : les isoamylases et les pullulanases. Le clivage de points de branchement est nécessaire lors de la synthèse d'amidon, permettant la formation de structures pouvant cristalliser (Figure 20), ainsi que lors de la dégradation. Chez les plantes, il existe trois isoformes d'isoamylase (ISA1, ISA2 et ISA3) et une isoforme de pullulanase (PU1). Chez Arabidopsis, ISA1 et ISA2 ne fonctionnent que sous la forme d'un hétérocomplexe. L'inactivation du complexe ISA1 et ISA2 conduit à une diminution drastique du contenu en amidon et à l'apparition d'un polysaccharide soluble, fortement branché, appelé phytoglycogène. L'amylopectine de l'amidon résiduel présente une structure modifiée en comparaison à la souche sauvage (Wattebled et al., 2005). Les enzymes ISA3 et PU1 n'ont quant à elles qu'un rôle marginal lors de la synthèse du polysaccharide. L'implication de ISA3 dans la dégradation de l'amidon sera décrite dans la partie 2 de ce chapitre.

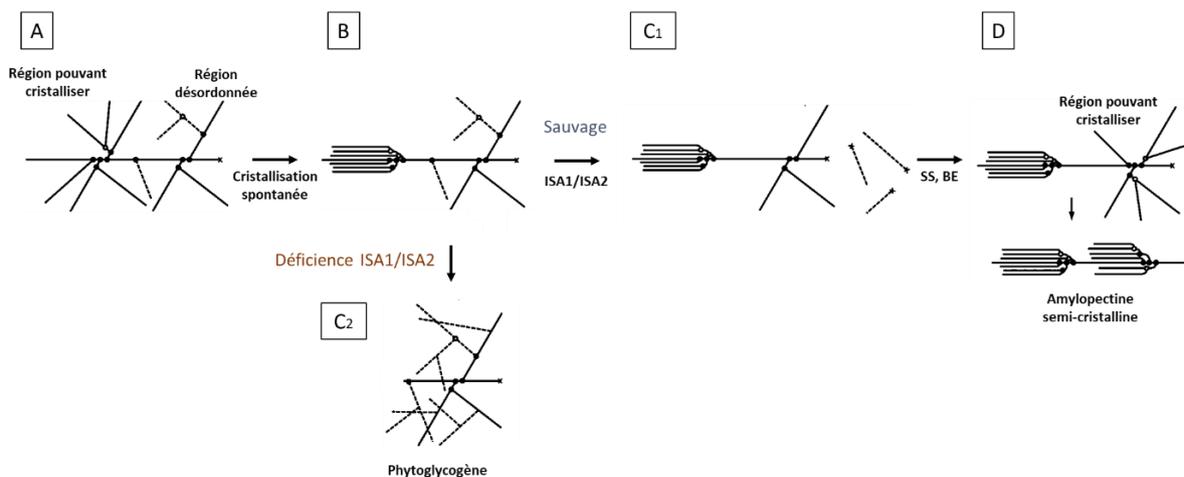


Figure 20 : Modèle de la maturation de l'amylopectine : Rôle d'ISA1/ISA2 (adapté de Hennen-Bierwagen et al., 2012). Les traits pleins et en pointillés indiquent les chaînes de glucose linéaires (liaison $\alpha(1\rightarrow4)$). Les cercles représentent les points de branchement : A : Molécule d'amylopectine en cours de synthèse. Introduction de point de branchement et élongation des chaînes de glucose le long du polysaccharide. B : certaines régions de la molécule auront une répartition des points de branchement et une longueur des chaînes linéaires compatible avec une cristallisation (spontanée). C₁ : l'activité du complexe ISA1/ISA2 permet d'éliminer des points de branchements de régions désordonnées. C₂ : en absence des isoamylases (ISA1/ISA2), l'action continue des enzymes de branchement et amidon-synthèses sur les régions désordonnées aboutira à la production d'une molécule non cristalline semblable à du glycogène, nommé phytoglycogène. D : les amidon-synthases et BE permettent la synthèse de nouvelles régions pouvant cristalliser. Les régions cristallines s'associent les unes aux autres, conduisant à la synthèse d'un grain d'amidon sauvage.

1.6 Ouverture sur la biosynthèse de l'amidon.

La synthèse de l'amidon nécessite une action coordonnée des enzymes qui bâtissent le grain d'amidon. L'existence de complexe protéique permettant aux protéines d'agir simultanément a été démontrée chez plusieurs organismes photosynthétiques. C'est le cas du complexe trimérique formé de l'enzyme de branchement II (SBEII) et des amidon-synthases I et II (SSI et SSII). La formation de ce complexe, identifié chez le blé et le maïs, est dépendante de la phosphorylation de SBEII (Hennen-bierwagen et al., 2008; Tetlow et al., 2008). L'existence de ces complexes est en cours de caractérisation chez *Arabidopsis thaliana*.

La voie principale de la biosynthèse de l'amidon fait l'objet d'une étude récente permettant de conclure cette partie : synthèse d'amidon. Dans cette étude, une souche de levure, *Saccharomyces cerevisiae*, dépourvue d'enzymes endogènes nécessaires à la synthèse du glycogène est utilisée comme modèle hétérologue à la synthèse d'amidon. Des polymères de glucoses denses, insolubles dans l'eau, semi-cristallins de type amidon ont été produits dans ce système non végétal. Ce résultat fournit une preuve directe que les d'amidon-synthases SS4 ou SS3, les enzymes de branchements BE2.1 ou BE2.2, ainsi que les enzymes de débranchement (ISA1/ISA2) sont les facteurs enzymatiques nécessaires et suffisants à la synthèse de l'amidon (Pfister et al., 2016).

2. Dégradation de l'amidon dans les chloroplastes

L'amidon transitoire, présent dans les feuilles, est principalement dégradé en maltose et en glucose, qui peuvent tous deux être exportés du chloroplaste par l'intermédiaire de transporteurs, puis métabolisés dans le cytosol (Weber et al., 2000; Weise et al., 2004 ; figure 21). Ce processus de dégradation est finement régulé permettant de dégrader de façon constante l'amidon synthétisé la journée. La dégradation est accélérée en cas de nuit courte, et ralentie en cas de nuit longue (Sulpice et al., 2014). Les mutations affectant les enzymes clés de dégradation réduisent la capacité de la plante à consommer son amidon pendant la nuit. Un phénotype de suraccumulation d'amidon est alors observé dans les feuilles jour après jour (Streb and Zeeman, 2012). Ces grains d'amidon synthétisés dans les lignées mutées possèdent des grains d'amidon de taille importante puisqu'ils sont peu dégradés pendant la nuit. Cette augmentation de taille et parfois associée à une diminution du nombre de grains d'amidon observé par chloroplastes et/ou à un défaut de croissance des plantes sur-accumulatrice d'amidon (Mahlow et al., 2016; Malinova and Fettke, 2017).

Les principales enzymes intervenant dans la dégradation de l'amidon, chez *Arabidopsis*, sont présentées dans la figure 21. Leurs interventions dans le catabolisme de l'amidon seront détaillées dans les deux points suivants.

2.1 La phosphorylation réversible de l'amidon

La première étape de la dégradation de l'amidon chez *A. thaliana* est la phosphorylation de glucanes de l'amidon, catalysée par la Glucan Water Dikinase (GWD). La dégradation de l'amidon est fortement réduite chez les plantes mutantes *gwd* et présente un phénotype nommé starch excess (*sex1*). La GWD ajoute un groupement phosphate en C6 d'un résidu de glucose de l'amylopectine. Puis la PWD (phosphoglucan water dikinase) transfère un groupement phosphate en C3 d'un glucose présent sur un glucane précédemment phosphorylé par GWD (Kotting et al., 2005). La liaison covalente de ces fonctions phosphates déséquilibre la structure cristalline de l'amylopectine (figure 21).

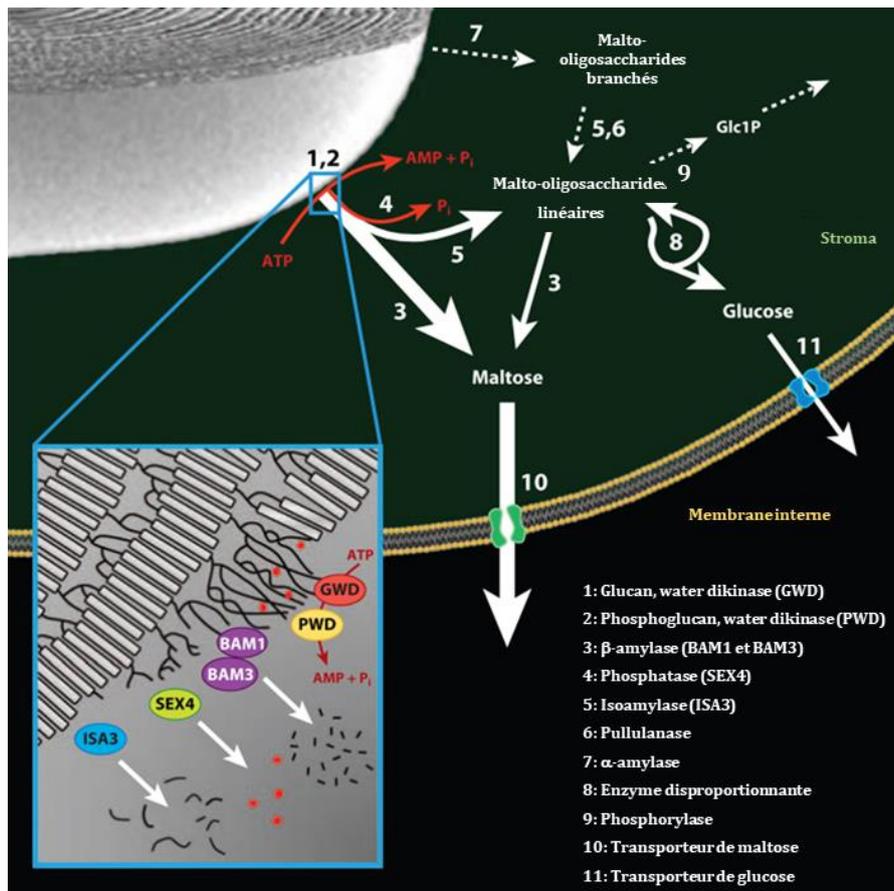


Figure 21: Représentation schématique de la voie de la dégradation de l'amidon dans les chloroplastes (Zeeman et al., 2010). Le maltose et les malto-oligosaccharides sont libérés à la surface du granule d'amidon lors de la dégradation. Les malto-oligosaccharides sont métabolisés dans le stroma. Le maltose et le glucose sont exportés vers le cytosol. Les flux estimés sont indiqués par la taille relative de la flèche. L'encart représente un modèle décrivant le rôle de la phosphorylation par GWD et PWD dans la déstabilisation des doubles hélices d'amylopectine (rectangles gris-clairs). Cela permet la libération de maltose et de malto-oligosaccharides (lignes noires) par les β -amylases (BAM) et enzymes de débranchement: Isoamylase 3 et limite dextrinase (Pullulanase). Le phosphate (points rouges) est simultanément libéré par SEX4 pour permettre une dégradation complète.

Alors que la phosphorylation de l'amidon est nécessaire pour rendre la surface du grain d'amidon accessible aux enzymes de la dégradation, la déphosphorylation de l'amidon est également requise. En effet, les groupements phosphates liés à l'amidon empêchent l'action de la β -amylase, la principale enzyme qui dégrade l'amidon (Kotting et al., 2009).

La phosphatase principalement impliquée dans le clivage de groupements phosphates liés en C6 et C3 de l'amylopectine est la protéine SEX4. LSF2 est également impliqué dans la régulation de la dégradation de l'amidon par déphosphorylation avec

une préférence d'activité sur l'amylose et clive uniquement les groupements phosphates liés en C3 du glucose (Meekins et al., 2016).

2.2 Les enzymes de la dégradation

Une fois les groupements phosphates clivés, l'hydrolyse des chaînes linéaires des glucanes est principalement catalysée par les β -amylases. Elles hydrolysent les glucanes depuis leur extrémité non-réductrice et libèrent du maltose (α -1,4-glucane maltohydrolases). Chez *Arabidopsis*, il existe 4 isoforme de β -amylases chloroplastiques génétiquement indépendantes (BAM1-4). BAM1, BAM2 et BAM3 possèdent une activité catalytique. L'analyse de lignées mutantes indique que BAM1 et BAM3 sont les enzymes majoritairement impliquées dans la dégradation de l'amidon. Les lignées mutées pour ces deux enzymes présentent une suraccumulation d'amidon (Fulton et al., 2008). Le phénotype du double mutant est encore plus marqué que celui des 2 simples mutants. Par ailleurs, bien que BAM4 ne semble pas posséder d'activité catalytique, son absence entraîne une suraccumulation d'amidon (Fulton et al., 2008). Ce résultat indique que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la régulation du processus de dégradation. Les β -amylases ne peuvent pas hydrolyser les points de ramification α (1 \rightarrow 6) ni agir immédiatement à côté de ceux-ci. Ainsi, la dégradation complète de l'amylopectine nécessite également l'hydrolyse de points de branchement par une activité de débranchement. Ce rôle est assuré par l'isoamylase 3 et de manière plus marginale par la pullulanase.

En parallèle de la voie principale de la dégradation, les α -amylases participent également à la dégradation de l'amidon. Elles interviennent, en clivant les liaisons internes de l'amylopectine, produisant ainsi un mélange de malto-oligosaccharides linéaires et ramifiés (DP 8 à 30). Ceux-ci seront ensuite dégradés par les β -amylases en maltose. Chez *A. thaliana*, l'effet lié à l'inhibition de l' α -amylase plastidiale ne conduit pas à un phénotype de suraccumulation d'amidon, ce qui suggère qu'elle n'est pas nécessaire à la dégradation de l'amidon (Yu et al., 2005). Cependant, des études montrent que des produits de la dégradation, témoin de l'activité de cette enzyme, sont accumulés dans la lignée mutante dépourvue d'enzyme de débranchement (*isa3pu1*). Ce qui atteste de

l'activité de dégradation de l'amidon par les α -amylases bien que leur action ne soit pas indispensable (Delatte et al., 2006; Zeeman et al., 2010).

Deux activités enzymatiques supplémentaires interviennent également dans le contrôle de la dégradation de l'amidon, il s'agit de la phosphorylase (PHS) et de l'enzyme disproportionnante (DPE). Chez *Arabidopsis*, il existe 2 isoformes génétiquement indépendantes pour chacune de ces 2 activités. Une isoforme chloroplastique (PHS1 et DPE1) et une cytosolique (PHS2 et DPE2).

La phosphorylase plastidiale PHS1 catalyse la réaction réversible du clivage d'une chaîne glucanique en présence d'orthophosphate (Pi) en libérant du Glucose-1-phosphate. Le rôle de cette enzyme est donc double, pouvant agir dans le sens de la synthèse ainsi que dans celui de la dégradation de l'amidon en fonction du ratio Pi/G1P. Il a été montré que l'activité de PHS1 dans le chloroplaste est en faveur du catabolisme (Rathore et al., 2009). Un lien direct de l'implication de PHS1 dans le relargage de G1P est établi par l'observation d'une légère réduction de la capacité de dégradation générée par la mutation *phs1* (Malinova et al., 2014b). Les enzymes disproportionnantes (DPE) sont, quant à elles, capables de libérer du glucose via leur activité α -4-glucanotransférase permettant le remodelage des malto-oligosaccharide en faisant varier leurs degrés de polymérisation. La DPE1 plastidiale intervient dans le métabolisme des malto-oligosaccharides, issus de la dégradation de l'amidon (Critchley et al., 2001). DPE2, enzyme cytosolique, est nécessaire au catabolisme du maltose exporté du chloroplaste lors de la dégradation de l'amidon. C'est dans le cytosol que sera produit le saccharose produit final de la dégradation de l'amidon, capable de circuler et d'être métabolisé dans l'ensemble de la plante (Chia et al., 2004).

IV. L'initiation de la synthèse de l'amidon et le contrôle de sa formation

1. Le rôle primordial de l'amidon synthase soluble de type 4 (SS4)

- **Description du phénotype associé à l'inhibition de SS4 chez *A. thaliana*.**

La mutation *ss4*, n'a pas d'influence majeure sur la structure, ni sur le ratio entre les principaux polysaccharides constituant l'amidon : l'amylopectine et l'amylose (Roldán et al., 2007; Szydlowski et al., 2009). Le rôle de cette enzyme, dans le métabolisme de l'amidon, se distingue des autres amidon-synthases. Les différents phénotypes détaillés ci-dessous, liés à la mutation, indiquent que l'amidon-synthase de type 4 joue un rôle crucial dans l'initiation de la synthèse de l'amidon :

- Le mutant *ss4* d'*A. thaliana* présente généralement zéro ou un grain d'amidon par chloroplaste (rarement plus) au lieu de cinq à sept grains retrouvés dans la plupart des chloroplastes de type sauvage (Roldán et al., 2007). Le nombre de chloroplastes dépourvus de grain d'amidon est augmenté dans certaines zones de la feuille du mutant *ss4*. Il s'agit des zones de croissance de la feuille comprenant les cellules végétales en division, situées le plus au centre de la rosette (figure 22).

Comparativement à ce qui est observé pour une lignée sauvage, les cinétiques de synthèse et de dégradation de l'amidon sont légèrement ralenties par l'absence de SS4. Une réduction du nombre de grains d'amidon par chloroplaste, associée à une quantité normale d'amidon synthétisé dans les feuilles, est rendue possible par une augmentation du volume des grains d'amidon. La taille des grains d'amidon, synthétisés dans les feuilles du mutant *ss4*, est jusqu'à trois fois supérieure à celle des grains d'amidon sauvages. SS4 apparaît comme ayant un rôle dans le contrôle la taille, mais également de la forme des grains d'amidon : ceux du mutant *ss4* sont plus gros et plus arrondis que les grains d'amidon d'une lignée sauvage, habituellement de forme aplatie et discoïde (Roldán et al., 2007, figure 22).

Le nombre de grains d'amidon synthétisé par chloroplaste, dans le cas du mutant *ss4*, peut être augmenté artificiellement, et peu tripler en cas d'exposition continue des plantes à la lumière (Malinova et al., 2017). Cette augmentation du nombre de grains par

chloroplaste peut également être observée en augmentant de volume des chloroplastes. Ainsi, des lignées combinant la mutation *ss4* à la perte de facteurs protéiques impliqués dans la division de chloroplaste, *arc* ou *fts2*, possèdent des chloroplastes beaucoup plus volumineux laissant place à la synthèse d'un nombre de grains d'amidon plus important (Crumpton-Taylor et al., 2013).

- La mutation *ss4* entraîne également un phénotype « nain » (figure 22) et dépigmentation partielle des feuilles de la plante, qui prennent une coloration vert pâle. L'origine de ces phénotypes n'est pas clairement établie.

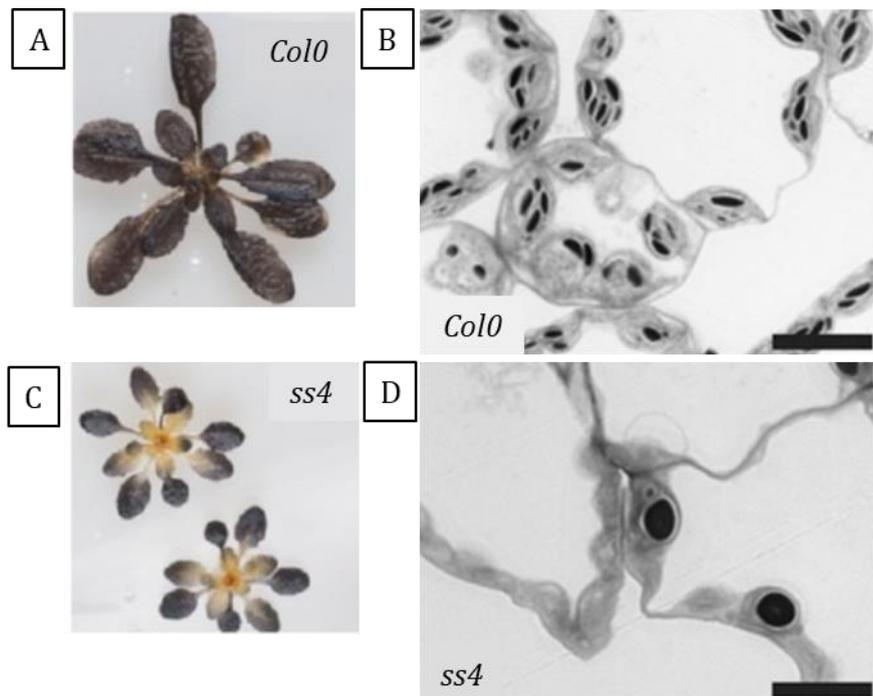


Figure 22 : Caractérisation du phénotype amidon du mutant *ss4* (adapté de Crumpton-Taylor et al., 2013; Seung et al., 2017) : Observation de l'amidon de la lignée sauvage de référence Columbia (*Col0*) A-B et de la lignée mutante *ss4* C-D. Observation de la répartition de l'amidon dans l'ensemble de la rosette par coloration à l'iode de l'amidon A et C. Observation du nombre de grains d'amidon par chloroplaste sur une coupe de feuille colorée au bleu de toluidine observé par microscopie optique B et D. Observations réalisées après 3 semaines de croissance dans de condition de culture de 12h jour/12h nuit. Barre d'échelle = 10 μ m.

Le phénotype « nain » observé dans le mutant *ss4* n'est pas unique parmi les mutants du métabolisme de l'amidon d'*A. thaliana*. On observe, sans distinction, des défauts de croissances sévères chez les mutants du catabolisme (*sex1* : Malinova and Fettke, 2017), de même que pour des mutants de l'anabolisme de l'amidon (*be2.1be2.2* : Dumez et al., 2006). Les causes de ce phénotype sont multiples.

Dans le cas du mutant *ss4*, on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation du volume du grain d'amidon, associé à la diminution du nombre de grains par chloroplaste, perturbe l'efficacité de synthèse et de dégradation par les enzymes du métabolisme de l'amidon. En effet, le mutant *ss4* ne dégrade pas la totalité de son amidon pendant la nuit. Une mauvaise restitution de l'énergie, due à l'accès restreint des enzymes à leur substrat, durant la nuit, peut conduire un défaut de croissance. Ainsi, en condition d'exposition à un régime continu de lumière le mutant *ss4* retrouve une croissance comparable à la lignée sauvage de référence (Roldán et al., 2007).

Il est également intéressant de noter que l'ajout d'une mutation, empêchant la dégradation de l'amidon durant la nuit (*gwd*), ne permet pas au mutant *ss4* d'initier la synthèse d'amidon dans les chloroplastes vides ni d'augmenter leur nombre. Ce qui permet de s'assurer que la réduction du nombre de grains d'amidon n'est pas due à une dégradation accrue des grains synthétisés (Crumpton-Taylor et al., 2013).

Une seconde hypothèse a été testée pour expliquer le phénotype nain du mutant *ss4*. Il s'agit de la présence d'un cycle futile dans le métabolisme de l'amidon, généré par la mutation, conduisant à une perte d'énergie et à un défaut de croissance de la plante mutante. Un dosage des métabolites impliqués dans la voie principale du métabolisme de l'amidon montre une suraccumulation de l'ADP-glucose ainsi qu'une augmentation de la concentration en Glc1P et Glc6P (Crumpton-Taylor et al., 2013; Malinova et al., 2017). La voie de synthèse principale de l'amidon est fonctionnelle, mais l'ADP-glucose synthétisé, mais n'est pas métabolisé en amidon. Ce qui indique que :

- i) La SS4 agit en amont des autres amidon-synthèses, durant l'étape d'initiation de la synthèse d'amidon
- ii) La synthèse d'amidon, dans le mutant *ss4*, n'est pas limitée par la disponibilité en ADP-glucose.

L'ajout d'une mutation bloquant l'approvisionnement en ADP-glucose (*pgm1*, *aps1*), précurseur de la synthèse d'amidon, permet au mutant *ss4* de retrouver une croissance comparable à la lignée sauvage (Ragel et al., 2013).

Il est intéressant de noter que l'ADP-glucose, en forte concentration, n'a pas d'effet toxique pour la plante puisque le mutant *ss4*, en condition de jour continu, pousse comme la lignée sauvage et la quantité d'ADP-glucose accumulée est 200 fois supérieure

à la quantité synthétisée par le témoin sauvage (Malinova et al., 2017; Roldán et al., 2007).

- La mutation *ss4* affecte également la synthèse d'amidon dans les racines. La majorité des racines du mutant *ss4* ne possèdent pas d'amidon visible après coloration à l'iode, ce qui conduit à une altération du gravitropisme (Crumpton-Taylor et al., 2013). *SS4* semble donc être nécessaire à la synthèse d'amidon au niveau de la coiffe racinaire, ce qui suggère qu'elle est impliquée dans le mécanisme d'initiation de la synthèse d'amidon des organes photosynthétiques et non-photosynthétiques.

Une étude fournit des indices supplémentaires allant dans ce sens. Ainsi, des lignées mutantes d'*A. thaliana* et de pomme de terre surexprimant la *SS4* ont été générées. Les résultats montrent une augmentation de la taille des plantes transformées. Elle est associée à une augmentation du rendement de production de l'amidon transitoire ainsi que de l'amidon de réserve présent dans les tubercules de pomme de terre (Gámez-Arjona et al., 2014).

Le rôle de *SS4* dans l'initiation de l'amidon au niveau de l'albumen des céréales n'est pas encore clair. Au niveau de l'endosperme des grains de riz, il existe deux isoformes de *SS4* : *SS4a* et *SS4b* (Ohdan et al., 2005). Le mutant *ss4b* de riz présente un phénotype amidon faiblement marqué. Cette observation peut être en partie expliquée par la présence de *SS4a*, suggérant une redondance fonctionnelle des deux isoformes (Toyosawa et al., 2016). Contrairement au riz, le blé n'a qu'une isoforme *SS4* (Leterrier et al., 2008) et la perte de la copie du gène codant cette isoforme (génom D), entraîne une diminution du nombre de grain d'amidon par chloroplaste au niveau de ses feuilles (Guo et al., 2017). Ceci suggère que le rôle de l'enzyme dans l'initiation du granule dans les feuilles est conservé entre *Arabidopsis* et le blé.

Ces résultats sont encourageants quant à la transposition des résultats obtenus sur l'organisme modèle *A. thaliana* vers des plantes d'intérêt agronomique.

- **Caractérisation enzymatique de SS4**

SS4 est une protéine composée de deux parties distinctes. La partie C-terminale de la protéine rassemble les domaines glycosyltransférases, très conservés entre les différentes isoforme d'amidon synthase et avec la glycogène-synthase (GS) bactérienne. La seconde moitié de la protéine, comprenant l'extrémité N-terminale, spécifique à SS4, est essentiellement composée de motifs en hélice (Gámez-Arjona et al., 2014; Leterrier et al., 2008). Ces deux domaines ont des fonctions spécifiques dans la formation du grain d'amidon (Lu et al., 2018).

L'expression de la région N-terminale de SS4, au sein du mutant *ss4*, ne modifie pas le phénotype du mutant. L'expression de la région C-ter de SS4, de même que l'expression de la GS d'*A. tumefaciens*, permettent de restaurer partiellement le phénotype sauvage. En effet, bien que le nombre de grains d'amidon par chloroplaste augmente, les grains restent plus arrondis et volumineux que ceux d'une lignée sauvage (Lu et al., 2018).

De manière remarquable, la fusion de la partie Nter de SS4 à la GS permet de restaurer le développement de grains d'amidon lenticulaire de type sauvage. La localisation de cette protéine de fusion est similaire à celle de la protéine SS4 complète (Lu et al., 2018). En effet, SS4 n'est pas localisée de manière homogène dans le chloroplaste, mais sous-localisée sous forme de spot. Cette localisation particulière a été décrite comme étant due à l'association entre SS4 et les fibrillines 1 (Gámez-Arjona et al., 2014; Raynaud et al., 2016). Néanmoins, les lignées mutantes dépourvues de fibrillines 1 ne présentent pas d'altération de la localisation de SS4 ni du nombre ou de la forme des grains d'amidon accumulés dans les chloroplastes. Ainsi, la relation entre la localisation de SS4 et les Fibrillines 1 reste à déterminer.

On peut conclure de ces observations, que la partie C-terminale de SS4 détermine le nombre d'événements d'initiation, et que la partie N-terminale est impliquée dans la localisation de la protéine et contrôle la forme des granules (Lu et al., 2018).

Les motifs en faisceau d'hélice, aussi appelés coiled-coil, sont également connus pour intervenir dans les interactions protéine-protéine. Ainsi SS4 est capable de former un dimère avec elle-même (Raynaud et al., 2016). La recherche de partenaire protéique de

SS4 ainsi que la caractérisation de leur implication dans le processus d'initiation et dans le contrôle de la forme des grains d'amidon, font l'objet de mon travail de thèse.

2. Différents facteurs protéiques impliqués dans l'étape d'initiation

Les différents facteurs protéiques impliqués, ou suspectés d'être impliqués, dans le mécanisme d'initiation de l'amidon, permettent de mettre l'accent sur le lien qui existe entre l'initiation de la synthèse de l'amidon et le contrôle de sa forme. Les travaux, ayant conduit à la découverte de ces protéines, sont décrit ci-dessous.

- **L'amidon synthase soluble de type 3**

SS3 semble être responsable de la synthèse de l'amidon résiduel observé dans les chloroplastes des plantes mutantes *ss4* (Szydlowski et al., 2009). Bien que la simple mutation n'entraîne pas de phénotype laissant penser à une implication de la SS3 dans le processus d'initiation de l'amidon, la synthèse d'amidon est considérablement réduite chez le double mutant *ss3ss4*, par rapport à la simple mutation *ss4*. Les événements d'initiation, dans cette lignée double mutante, ont lieu de façon très rare et aléatoire. Cette observation indique une redondance des fonctions de SS4 et de SS3. En revanche, aucune redondance fonctionnelle n'a pu être mise en évidence entre SS4 et SS2 ou SS1 (Szydlowski et al., 2009).

Les amidon-synthases SS3 et SS4, suffisent à promouvoir la synthèse de l'amidon (Pfister et al., 2016; Szydlowski et al., 2009). SS3, dont le domaine glucosyltransférase est le plus proche phylogénétiquement de SS4, possède également une extension en N-terminale qui lui est propre. Des motifs en faisceau d'hélices ainsi que des domaines de liaisons aux carbohydrates (CBM) y sont retrouvés. SS3 est la seule amidon-synthase possédant ces CBM (figure 18). De plus, elle est la seule enzyme du métabolisme de l'amidon capable d'amorcer la synthèse d'un polysaccharide à partir de l'ADP-glucose (Szydlowski et al., 2009). Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les rôles précis de SS3 dans l'initiation de la synthèse d'amidon.

- **Protéine d'adressage à l'amidon de type 2 et 3 (PTST2, PTST3).**

Récemment, trois nouvelles protéines liées aux grains d'amidon ont été découvertes. Elles appartiennent à la famille des Proteine Targeting to Starch (PTST). Il n'y a pas de domaine catalytique chez ces protéines, elles contiennent néanmoins des domaines de fixation au carbohydrate (CBM). Bien que PTST1 joue un rôle essentiel dans la synthèse de l'amylose, en adressant la GBSS au grain d'amidon (Seung et al., 2015), PTST2 et PTST3 sont impliquées dans le contrôle du nombre de grains d'amidon par chloroplaste (Seung et al., 2017). Dans la lignée *ptst2*, le nombre de grains d'amidon par chloroplaste est réduit. Un unique grain d'amidon, de grande taille, est principalement retrouvé par chloroplaste, de la même façon que ce qui est obtenu avec la mutation *ss4*. Cependant, la forme du grain d'amidon est aplatie faisant davantage penser au grain d'amidon de type sauvage. PTST3 a une fonction partiellement redondante par rapport à PTST2, mais la réduction du nombre de grains d'amidon par chloroplaste est moins prononcée dans *ptst3* que pour le mutant *ptst2*.

Par ailleurs, la surexpression de PTST2 entraîne une augmentation du nombre de petits granules démontrant ainsi l'implication de cette protéine dans le contrôle du nombre de grains d'amidon par chloroplaste. Un modèle a été proposé par Seung et al. faisant intervenir PTST2 comme intermédiaire entre un substrat de type malto-oligosaccharide, dont l'origine reste à définir, et la protéine SS4, qui permettrait d'initier la formation du grain d'amidon (Seung et al., 2017).

- **Phs1**

La phosphorylase plastidiale PHS1, a probablement une implication indirecte dans le mécanisme d'initiation de l'amidon chez *A. thaliana*. Son activité enzymatique, réversible, participe probablement à la synthèse de polysaccharides courts, utilisés comme substrat par les amidons synthases.

Le simple mutant *phs1*, d'*A. thaliana*, présente un phénotype similaire à celui de la lignée sauvage de référence, la présence de PHS1 leur permettrait néanmoins de mieux résister au stress abiotique (Zeeman et al., 2004).

La double mutation, avec une enzyme disproportionnante, *dpe2phs1*, conduit à une réduction marquée de la quantité d'amidon, associé à la synthèse d'un unique grain

d'amidon par chloroplaste (Malinova and Fettke, 2017). Un complexe entre l'amidon-phosphorylase et une enzyme disproportionnante est également retrouvé dans l'albumen de céréale (riz). Ce complexe protéique augmente la synthèse de malto-oligosaccharides (Hwang et al., 2016). Chez la pomme de terre, une réduction de l'expression de la phosphorylase plastidiale conduit, à une modification de la quantité et de la structure de l'amidon, à faible température (Orawetz et al., 2016). Malgré ces résultats obtenus en combinant des mutations ou en cultivant les plantes en conditions particulières, un effet direct de la PHS1 sur l'initiation de l'amidon doit encore être démontré.

V. Objectifs de la thèse

Bien que les principales étapes du métabolisme de l'amidon soient connues, une étape cruciale de sa synthèse échappe encore à notre compréhension : l'initiation. C'est lors de ce processus que s'effectue le contrôle du nombre, de la forme et de la taille des grains d'amidon. Comprendre et maîtriser cette étape représente un enjeu scientifique important, car cette étude permettra de mieux comprendre la façon dont les plantes contrôlent le flux de carbone, régulent leur croissance et s'adaptent à leur environnement. L'enjeu est également économique à travers l'utilisation industrielle d'amidons de propriétés physico-chimiques modifiées. De nombreuses avancées dans ce domaine ont été réalisées, après la découverte de l'implication de l'amidon-synthase de type 4 (SS4) dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon. En effet, le mutant *ss4* synthétise un unique grain d'amidon par chloroplaste, contre 5 à 7 grains d'amidon pour la lignée sauvage de référence et ce grain est 2 à 3 fois plus volumineux que les grains d'amidon sauvage (partie IV : introduction).

Chez *A. thaliana*, le gène codant pour SS4 est situé sur le chromosome 4 au locus At4g18240. Une analyse, *in silico*, de la séquence primaire de la protéine permet de différencier deux régions de tailles équivalentes et aux fonctions distinctes. La partie C- terminale de la protéine, contenant les sites catalytiques, est semblable aux autres amidon-synthases, tandis que l'extension N-terminale, spécifique à SS4, contient des

motifs en faisceau d'hélices connus pour être impliqués dans les interactions protéine/protéine.

Afin de mieux comprendre le processus permettant de réguler le nombre et la forme des grains d'amidon produits dans les chloroplastes, une recherche des partenaires protéiques de SS4 a été entreprise. Ainsi, un criblage double hybride mené chez la levure, avec SS4 comme cible, a permis l'identification de plusieurs partenaires potentiels de l'amidon-synthase 4 (Tableau 1).

Gène muté	Fonction de la protéine	Probabilité d'interaction avec SS4
At4g18240	Amidon-synthase soluble 4	Extrêmement forte
At2g39730	Rubisco activase	Extrêmement forte
At4g32190	Homologie avec la myosine	Elevée
At5g23890	Protéine de la membrane des thylacoïdes	Confiance modérée
At1g21060	Fonction inconnue	Confiance modérée
At5g65620	Metalloendopeptidase putative	Confiance modérée

Tableau 1 : Liste des protéines susceptibles d'interagir avec SS4 obtenue à la suite du criblage double hybride (ULTImate Y2H™ Hybrigenics). Les indices de confiance sont répertoriés sur la colonne de droite. Les locus des gènes codant pour les protéines sont à gauche du tableau. Le facteur protéique (encadré vert) inconnu, annoté comme ayant des homologies de séquence avec la myosine, est l'unique protéine de la liste dont l'inhibition conduit à une lignée mutante présentant un phénotype amidon marqué. Cette protéine sera nommée PII1 (protéine impliquée dans l'initiation de l'amidon) par la suite.

Les différentes lignées disponibles ont été sélectionnées en amont de mon travail de thèse et une caractérisation préliminaire du phénotype amidon des différentes lignées a été entreprise lors de mon stage de master. Ces travaux ont permis de supposer l'implication du produit du gène At4g32190 dans le contrôle de l'initiation de la synthèse d'amidon. Cette protéine a été nommée *pii1*, pour protéine impliquée dans l'initiation de l'amidon (Protein Involved in starch Initiation). Mon projet de thèse s'est déroulé en deux temps :

Tout d'abord, démontrer l'implication de ce nouveau facteur protéique dans le processus d'initiation de l'amidon. Pour ce faire, plusieurs points ont été abordés ; i) Confirmer la localisation de PII1 au niveau du chloroplaste ; ii) Confirmer l'interaction entre SS4 et PII1 par une seconde approche (BiFC) ; iii) Décrire le phénotype amidon d'*A. thaliana*, dépourvu de la protéine PII1 ; iv) Réaliser l'analyse biochimique de l'amidon synthétisé dans le mutant *pii1*.

Dans un second temps, des expériences complémentaires ont été réalisées afin d'obtenir des indices supplémentaires sur les mécanismes mis en place lors de l'initiation de la synthèse des grains d'amidon : i) Des lignées doubles mutantes ont été sélectionnées afin d'étudier l'impact de la mutation *pil1* en absence des protéines SS3 ou SS4. Ces combinaisons de mutation permettent d'appréhender l'implication de PII1 dans le contrôle de l'initiation de l'amidon. ii) La phosphorylase chloroplastique, PHS1, est également étudiée au laboratoire et mon projet a rejoint cette étude afin d'observer l'impact de la mutation *phs1* sur l'initiation de l'amidon au niveau des tissus photosynthétiques et non-photosynthétiques d'*A. thaliana*.

Matériels et méthodes

1) Matériel végétal

Les lignées d'*Arabidopsis thaliana* sont obtenues via la collection de mutants NASC (Nottingham Arabidopsis ; <http://Arabidopsis.info> ; Alonso et al., 2003) ou via la collection générée à l'INRA de Versailles : URGV : Samson et al., 2002). Les lignées sauvages de références utilisées sont les lignées Wassilewskija (Ws) et Columbia (Col0).

N° du gène	Protéine	Référence de la lignée	Ecotype	Bibliographie
At4g18240	SS4	GK-290D11 559H08	Col0 Ws	(Roldán et al., 2007)
At4g32190	PII1	N679037 Flag_137A02	Col0 Ws	(Vandromme et al., 2018) (Seung et al., 2018)
At1g11720	SS3	Salk_065732 117H05	Col0 Ws	(Szydlowski et al., 2009) (Zhang et al., 2005)
At3g29320	PHS1	N852684 025G04	Col0 Ws	(Zeeman et al., 2004) (Malinova et al., 2017)

Tableau 2 : Lignées d'*Arabidopsis* utilisées : Dans ce tableau sont répertoriés de gauche à droite ; les locus des gènes étudiés ; les protéines associées à l'expression de ces gènes avec : SS4 : amidon-synthase soluble de type 4 ; PII1 : protéine impliquée dans l'initiation 1 ; SS3 : amidon-synthase soluble de type 3, PHS1, phosphorylase plastidiale 1 ; Référence des lignées mutantes ; écotype de chaque lignée et les articles de référence.

Les croisements chez *A. thaliana*

Les fleurs d'*A. thaliana* ont la capacité de s'autopolliniser. Pour effectuer un croisement entre deux lignées *a-* et *b-* (*chacune homozygote pour une mutation*), il faut utiliser des plantes avec une hampe développée (4 semaines). Un bourgeon, immature, de la plante *a-* est ouvert avec une pince à croisement sous loupe binoculaire. Les sépales, pétales et étamines sont arrachés. Il ne reste que le pistil de la fleur, les autres bourgeons et fleurs présents sur la hampe sont également retirés pour éviter les contaminations. Une fleur mature de la plante *b-* est prélevée et son pollen est frotté contre le pistil de la plante *a-*. Le pistil, ainsi fécondé, donnera une silique. Deux à trois semaines après pollinisation, une fois la silique sèche, les graines peuvent être récoltées et semées. Les plantes issues de ce croisement seront 100% hétérozygotes pour les gènes A et B, aussi il faudra attendre la seconde génération, issue de l'autopollinisation

des plantes hétérozygote, pour obtenir une lignée homozygote pour les deux mutations avec une probabilité de 1/16^{ème}.

Les croisements suivants ont été réalisés : *ss3pii1*, *ss4pii1* et *ss4phs1*. Toutes les lignées simples ou doubles mutantes ont été sélectionnées via la méthode de double PCR décrite ci-dessous.

2) Génotypage des plantes

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

Deux feuilles sont congelées dans l'azote liquide puis broyées en microtube Eppendorf à l'aide d'un pilon. La poudre ainsi obtenue est remise en suspension dans 400 µl d'un tampon d'extraction (Tris-HCl pH8 100 mM - EDTA 20 mM - NaCl 1,4 M - CTAB 2% - β-mercaptoéthanol 0,064%) et incubé à 60°C pendant 30 min. La phase aqueuse est lavée par ajout de 400 µl d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1 v/v). Après agitation au vortex et centrifugation 15 min à 10000g et 4°C, 300 µl de la phase aqueuse (supérieure) sont récupérés et les acides nucléiques sont précipités par ajout de 230 µl d'isopropanol froid. Le culot, obtenu après centrifugation de 30 minutes à 10000g et 4°C, est rincé par une solution d'éthanol à 70% pour éliminer les sels. L'ADN est repris dans 20 µl d'eau ultrapure, stérile, puis conservé à -20°C.

Sélection des lignées mutantes

Pour chaque gène à étudier, une PCR est réalisée avec des oligonucléotides permettant l'amplification de l'allèle sauvage et une seconde réaction est effectuée en utilisant des oligonucléotides permettant l'amplification de l'allèle mutant (Annexe 1 et Figure 23).

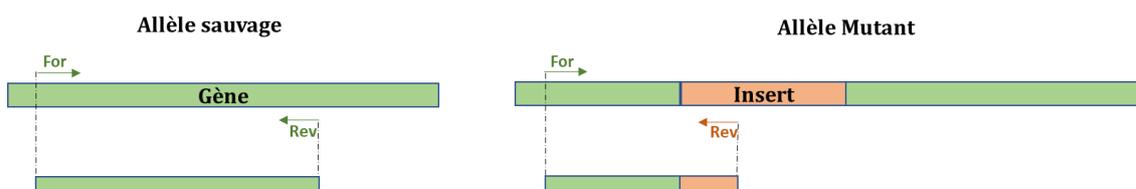


Figure 23 : Schéma représentant le positionnement des amorces Forward (For) et Reverse (Rev) lors des PCR de géotypage : Les couples d'amorces sont définis à l'aide du logiciel Primer3 pour amplifier des fragments entre 700 et 1000 pb (<http://primer3.ut.ee/>).

Les amplifications de l'ADN génomique par PCR suivent une procédure standard (Wattebled et al., 2008). 1 µl d'ADN est déposé dans chaque puits auquel on ajoute 24 µl de mix composé de tampon Green GoTaq® 1X, de MgCl₂ à 2,5 mM, 1 unité de GoTaq® DNA Polymerase, de dNTPs à 0,2 mM et d'amorces sens et antisens à 0,4 µM définis précédemment. Programme de la PCR : Dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min. Un cycle composé de trois étapes est ensuite répété sept fois : dénaturation des deux brins d'ADN à 94°C pendant 45sec ; hybridation d'amorces oligonucléotidiques à 63°C pendant 30 sec en baissant cette température de 1°C par cycle (touch down) ; élongation par une l'ADN polymérase thermostable pendant 1min et 10s à 72°C. La réaction est poursuivie par 34 nouveaux cycles, chaque cycle étant paramétré de la façon suivante : dénaturation à 94°C pendant 45 sec, hybridation des amorces à 56°C pendant 30 sec et élongation à 72°C pendant 1min et 10sec. Le programme se termine par l'élongation finale à 72°C pendant 2 min puis un maintien à 15°C. Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% contenant du SYBR-Safe. Le tampon de migration utilisé est du TAE UltraPure™ 1X. La position des amplicons est révélée sous lampe UV et leurs tailles estimées par comparaison avec des standards commerciaux : « Smart Ladder » (Eurogentec).

Des RT-PCR ont également été réalisées afin d'analyser l'expression des gènes ciblés par la mutation. Des feuilles, de la lignée homozygote sélectionnée, sont récoltées au milieu de la phase lumineuse et l'ARN est extrait en suivant les recommandations du Kit d'extraction d'ARN : Nucleospin RNA plus (Macherey-Nagel). 500 ng de l'ARN, précédemment extrait, est utilisé l'amplification RT-PCR en utilisant le kit RT-PCR one-step Qiagen. Un contrôle négatif est effectué, sans étape de rétro-transcription afin de vérifier l'absence de contamination d'ADN. La séquence des d'amorces utilisées sont répertoriées en annexe 1.

Conditions de culture

Les plantes sont cultivées en serre de type « S2 » ou dans des enceintes à environnement contrôlé (phytotrons/Grobank). Les graines d'*A. thaliana* sont mises en période de vernalisation à 4°C pour une durée minimum de 72h dans une solution de Phytigel 0,1%. Le terreau « Florafleur » (TREFR) est préalablement traité par un larvicide, le Trigard (SyngentaR), selon les recommandations du fabricant. Les conditions standards de culture des plantes d'*A. thaliana* sont les suivantes : 16h de jour à 23°C, l'intensité lumineuse est de 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en serre et de 120 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en phytotron/Grobank. La phase obscure dure 8h et la température est de 20°C.

Les cultures d'*Arabidopsis thaliana* peuvent également être réalisées *in vitro*, de façon stérile, ce qui permet de réaliser les extractions de protoplastes ou de suivre le développement racinaire. Enfin, la culture en hydroponie permet d'observer l'amidon synthétisé au niveau de la coiffe racinaire. Les graines sont mises à vernaliser et sont semées en Grobank dans les conditions décrites précédemment. Avant le semi, les graines sont stérilisées, 5min dans l'éthanol 75%. Elles sont déposées sur un milieu gélosé, Murashige&Skoog contenant 0.8% de plant agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, the Netherlands). Pour la culture en hydroponie, les graines sont déposées sur le système Seedholder (Araponics®). Les racines se développent dans une solution d'hydroponie pH 5.8 (sulfate de magnésium 1.1mM, nitrate de potassium 2 mM, nitrate de calcium 805 μM , KH_2PO_4 695 μM , K_2HPO_4 60 μM , FeSO_4 20 μM , Na_2EDTA 20 μM , H_3BO_3 9.25 μM , MnSO_4 3.6 μM , heptamolybdate d'ammonium 74 nM, sulfate de zinc 3 μM , sulfate de cuivre 785 nM). Après deux semaines de croissances, les racines sont colorées à l'iode, et observées en lumière blanche au microscope ou à la loupe binoculaire.

3) Extraction et dosage d'amidon

Extraction MOPS

Les feuilles sont prélevées en fin de jour et congelées rapidement dans l'azote liquide avant d'être stockées à -80°C. L'extraction d'amidon est réalisée sur 5g à 10g de feuilles broyées dans du tampon d'extraction composé de MOPS 100 mM pH7.2, d'EDTA 5 mM et d'éthylène glycol 10%. Le broyat est filtré à travers deux couches de Miracloth (Calbiochem®). L'échantillon filtré est centrifugé 15min à 4000g à 4°C. Le culot est remis en suspension dans une solution de Percoll 90% et suivi d'une centrifugation à 10000g pendant 30 min (2x) puis trois lavages à l'eau sont effectués. L'amidon est alors stocké à 4°C dans l'éthanol 20%.

Extraction à l'acide perchlorique

0,3 à 0.5 g de feuilles, dont on détermine la masse exacte, sont broyées dans 5 ml d'acide perchlorique 1M. Le broyat est centrifugé 15min à 4000g à 4°C. Le culot, composé de débris de feuilles et d'amidon, est ainsi séparé des molécules solubles qui restent en suspension dans le surnageant. Le surnageant récupéré est neutralisé par ajout de 2,5 ml de tampon de neutralisation (KOH 2M, MES 0,4 M et KCl 0,4M). Une centrifugation de 10 min à 4000g permet d'éliminer le précipité de perchlorate de potassium. Le surnageant contenant les sucres solubles est mis à bouillir 10 min avant d'être congelé. Le culot contenant l'amidon est rincé trois fois par 5ml d'eau. Pour chaque rinçage l'échantillon est centrifugé 5min à 10000g à 4°C.

Dosage des polysaccharides

L'amidon peut alors être dosé à l'aide du kit Enzytec™ Starch. 30 µl d'échantillon sont solubilisés dans l'eau par chauffage à 100°C pendant 10 min. 60 µl d'amyloglucosidase du kit (14U/mL) sont ensuite ajoutés puis le mélange est placé

30 min à 58°C. Cette première digestion enzymatique permet d'hydrolyser les polysaccharides et de libérer des molécules de glucose. L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 5 min à 10000g. 30 µl de chaque échantillon digéré sont déposés dans une plaque 96 puits. On y ajoute 100 µl d'eau et 100µl de la solution I du kit (tampon NADP/ATP). La DOinitiale est mesurée à 340 nm puis 2µl de la solution II du kit (hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase) sont ajoutés. L'hexokinase va utiliser l'ATP et le glucose et produire du glucose-6-phosphate (G6P). La glucose-6-phosphate déshydrogénase va utiliser comme substrat le G6P et le NADP pour produire du gluconate-6-phosphate et du NADPH, H+. C'est l'absorbance du NADPH, H+ à 340 nm qui permet de suivre la réaction enzymatique et de mesurer de la DOfinale. La concentration en polysaccharide de l'échantillon est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$(\Delta DO * \text{volume final} * MW_{\text{glucose}}) / (\epsilon * \text{trajet optique} * \text{volume initial})$$

ΔDO correspond à la différence entre la DOfinale et la DOinitiale

MW représente masse moléculaire du glucose moins une molécule d'eau (162 g/mol)

ϵ désigne le coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm (6220 ml.mmol⁻¹.cm⁻¹).

4) Caractérisation Amylose/Amylopectine

Chromatographie d'exclusion stérique (CL2B)

1,5mg d'amidon sont mis en suspension dans 200 µl de DMSO et placés à 100°C pendant 15min. L'ajout de 800 µl d'éthanol permet de précipiter les glucanes (l'échantillon est placé une nuit à -20°C). Le culot est repris dans 300 µl de soude 10mM. L'échantillon est déposé sur une colonne de Sephasose CL-2B, la colonne utilisée a un diamètre interne de 0,5 cm et une hauteur de 70 cm. L'éluant utilisé est de la soude 10mM. Le débit de la colonne est réglé à 12 ml/h. Des fractions de 300µl sont récupérées en sortie de colonne. 80 µl de chaque fraction sont mélangés à 20 µl d'une solution de lugol (1g/l de diiode, 10g/l d'iodure de potassium). Une lecture spectrophotométrique des différentes fractions permet d'identifier celles contenant l'amylopectine (~550nm) de et celles contenant de l'amylose (~620nm). Les fractions contenant le même type de

polysaccharide sont regroupées, puis dosées (voir ci-dessus) afin de déterminer le rapport amylose/amylopectine des grains d'amidon.

Précipitation de l'amylopectine à la concanavoline A

La proportion d'amylose contenue dans un extrait purifié d'amidon peut également être déterminée à l'aide du kit Megazyme Amylose/Amylopectin Assay (K-AMYL), adapté au petit volume de la façon suivante : 1,5 mg d'amidon sont mis en suspension dans 200 µl de DMSO et placés à 100°C pendant 15min. L'ajout de 800 µl d'éthanol 100% permettent de faire précipiter les glucanes, l'échantillon est placé une nuit à -20°C. Après centrifugation de 5min à 2000g, le culot est remis en suspension dans 120 µl de DMSO et chauffé 15min à 100°C. l'échantillon d'amidon est ensuite mélangé sur vortex doux avec 240 µl de solvant ConA (30%) puis les eppendorf sont complétés jusque 1,5 ml avec le même solvant (solution A). L'amylopectine contenue dans 300 µl de cette solution A, sera précipitée par l'ajout de 150 µl de la solution de concanavoline A (ConA), 1h à température ambiante. Après centrifugation, 10min à 14000g, les fractions contenant l'amylopectine (culot) et l'amylose (surnageant) sont séparées. Le ratio amylose/amylopectine des échantillons d'amidon est obtenu après dosage de la solution A et de la fraction d'amylose. 300 µl de la fraction contenant l'amylose et 300 µl de tampon acétate de sodium 100 mM pH 4.5 et chauffé à 100°C pendant 5 min pour dénaturer la concanavoline A. En parallèle, 100 µl de la solution A est dilué dans 800 µl du tampon acétate. 20 µl de ces échantillons sont digérés, 30min à 40°C, par 20 µl de solution 2 (amyloglucosidase/ α -amylase). Les sucres contenus dans les 40 µl d'échantillons digérés sont dosés en microplaque, par ajout de 160 µl du réactif GODOP (glucose oxydase/péroxydase). Le mélange est incubé 20 min à 40°C. l'absorbance est mesurée à 510 nm et le contenu en amylose de l'amidon (%) est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$(\text{Absorbance de la fraction d'amylose}) / (\text{absorbance de solution A}) * 33,4$$

33.4 = facteur de dilution de la solution d'amylose/facteur de dilution de la solution A*100

5) Analyse des distributions de longueurs des chaînes polysaccharidiques par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD)

1.5 mg d'amidon issus de l'extraction MOPS sont solubilisés dans 200 µl d'eau à 100°C pendant 10 minutes. Un volume équivalent de tampon acétate de sodium pH 3,5 est ajouté puis l'échantillon est incubé 16 heures à 42 °C en présence d'isoamylase (4 U) et de pullulanase (2 U) afin d'hydrolyser les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$. Les échantillons d'amidon débranchés sont ensuite dessalés par passage sur colonne carbographe (Extract Clean Carbo, Grace®) et élués par 2ml d'acétonitrile 25 %. Les échantillons sont lyophilisés puis repris dans 300 µl d'eau avant d'être analysés par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (HPAEC-PAD, Dionex ICS-300, colonne CarboPac PA-200 : 250*3mm). L'éluant A contient 150 mM de NaOH et l'éluant B contient 1 M d'acétate de sodium et 150 mM de NaOH. Les analyses sont réalisées à 25 °C avec un débit de 0,4 ml.min⁻¹. L'injection de l'échantillon est suivie d'un rinçage de 4 min avec du NaOH 150 mM puis l'échantillon est élué par un gradient linéaire d'acétate de sodium (4-53 min, 0-400 mM) dans du NaOH 150 mM. La colonne est régénérée par de l'acétate de sodium 800 mM (53-61 min) dans NaOH 150 mM puis uniquement avec du NaOH 150 mM, (61-67 min) afin d'éliminer l'acétate de sodium et de procéder à l'analyse d'un second échantillon. Le glucose, le maltose, le maltotriose et le Glucidex 19® sont utilisés comme standards (Roussel et al., 2013).

6) Mesure de l'ADP-glucose.

La procédure du dosage d'ADP-glucose est adaptée de la méthode de dosage de l'UDP-GlcNAc (Lefebvre et al., 2013). Des feuilles de 3 semaines sont récoltées à la fin de la phase lumineuse et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Ces feuilles sont broyées dans l'azote liquide et 60 à 100 mg de poudre ont été ajoutés à 1 ml de tampon (Tris-HCl 10 mM, pH 7,2; NaCl 10 mM; β -mercaptoéthanol 15 mM, MgCl₂ 1 mM). 50 µl d'HCl 1 M est alors ajouté à l'échantillon. Le lysat est chargé sur une colonne contenant

1,5 mL de Dowex 50WX2- 400-activé H⁺. La fraction non liée est collectée dans un tube Falcon15 dans lequel est préalablement ajouté 0,5 ml de tampon de neutralisation (Tris-HCl 1 M, pH 8,0). Les échantillons sont collectés sur la glace. La colonne est lavée avec de l'eau ultrapure jusqu'à obtention d'un volume final d'échantillon de 10 ml. La mesure de l'ADP-glucose est réalisée à l'aide d'un système Aktapurifier. 1 mL d'extrait complet purifié est injecté sur une colonne de ProPAC-PA1 (4 x 250 mm; Dionex, Jouy en Josas, France) équilibrée avec 100% de tampon A (Tris / HCl 20 mM, pH 9,2). Le gradient d'élution est le suivant : 0% de tampon B (NaCl à 2 M) pendant 1 minute; suivi d'un gradient linéaire de 0-7% de tampon B pendant 39 minutes; 7-15% de tampon B pendant 3 minutes; 15-100% de tampon B pendant 5 minutes; Tampon B à 100% pendant 5 minutes à un débit de 0,8 ml/min. La colonne a ensuite été rééquilibrée dans 100% de tampon A. Le pic ADP-Glc a été détecté par UV. L'absorption à 256 nm est identifiée par comparaison avec le temps de rétention de l'étalon injecté avant l'analyse. Le temps de rétention d'ADP-glc a également été confirmé par l'addition d'ADP-Glc à un échantillon avant purification. Les niveaux d'ADP-Glc ont été quantifiés à partir des zones de pics intégrées, par rapport aux séries standard de l'ADP-Glc.

7) Caractérisation de la taille des grains d'amidon, de leurs formes et de leur nombre par chloroplaste.

Distribution de la taille des grains d'amidon : Compteur de particules

Les analyses des amidons purifiés sont réalisées avec un COULTER Counter multisizer4. L'échantillon est remis en suspension dans une solution d'Isoton II (2% NaCl refiltré à travers une membrane de 0.05µm). La sonde, utilisée pour l'analyse des grains d'amidon d'*A. thaliana*, possède un pore de 20µm. Les particules traversent individuellement cette ouverture, agissent comme des isolants et modulent ainsi l'intensité du champ électrique mesuré entre les deux électrodes immergées situées de chaque côté de l'ouverture. Les variations de résistance électrique indiquent le nombre de particules détectées, et l'amplitude de l'impulsion électrique produite dépend du volume de la particule. Le programme créé pour l'analyse des grains d'amidon compte

30000 particules sur une échelle de 1 à 6 micromètres. L'appareil est calibré avec des billes en latex de différents diamètres (COULTER CC Size Standard L10, Beckman Coulter).

Microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB permet également d'observer avec précision la taille des grains d'amidon et d'obtenir des images de leur surface. Les analyses ont été réalisées au CERMAV de Grenoble. Des gouttes de suspensions d'amidon purifié sont déposées sur un morceau de ruban de cuivre déchargé par luminescence et laissées à sécher. Les échantillons sont recouverts d'or-palladium et les images d'électrons secondaires sont enregistrées avec un microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 équipé d'un canon à émission de champ et fonctionnant à 2 kV.

Coloration des feuilles au Lugol

On peut estimer la répartition de l'amidon dans la rosette des mutants d'*Arabidopsis* grâce à la coloration spécifique de l'amidon par l'iode. La rosette de feuille est prélevée en fin de jour, puis décolorée dans un bain d'éthanol 80% à 70°C. Après décoloration, les feuilles sont rincées à l'eau puis colorées dans une solution de lugol (1g/l de diiode, 10g/l d'iodure de potassium).

Analyse du nombre de grains d'amidon par chloroplaste : NegFluo.

Au cours de ma thèse, j'ai participé au développement d'une nouvelle méthode de microscopie confocale nommée Negfluo. Elle nous permet d'obtenir des informations sur la morphologie et le nombre de grains d'amidon par chloroplaste *in situ*. Cette méthode permet de distinguer, par contraste de fluorescence, l'amidon (inerte) des chloroplastes (auto-fluorescent). Les grains d'amidon apparaissent comme des objets noirs dans un chloroplaste fluorescent. Negfluo permet également d'observer en un

minimum de temps d'acquisition un maximum d'échantillon, ainsi que d'observer les échantillons en 3D. L'échantillon ne subit qu'une étape de fixation décrite ci-dessous, contrairement aux méthodes de microscopie classique nécessitant des étapes supplémentaires d'inclusion et de découpe des échantillons.

Une feuille est prélevée, en fin de jour, sur une plante cultivée pendant 2 semaines en phytotron (16 h: jour 8 h, nuit). Cette feuille est placée sous vide dans 1 ml de solution de fixation (4% (p / v)) paraformaldéhyde, 4% (p / v) de saccharose, PBS 1X à pH 7,3. Un morceau d'environ 2mm² de cette feuille est découpé. L'échantillon est ensuite déposé entre lame et lamelle. Les échantillons ont été observés au microscope confocal Nikon A1R (Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Pays-Bas) avec un objectif Plan Apo 60x (NA = 1,4). L'autofluorescence a été acquise avec $\lambda_{ex} = 488$ nm et $\lambda_{em} = 500-550$ nm (canal vert) et avec $\lambda_{ex} = 561$ nm et $\lambda_{em} = 570-620$ nm (canal violet).

(NegFluo, a fast and efficient method to determine starch granule size and morphology *in situ* in plant chloroplasts : submitted paper).

8) Expression des protéines de fusion

Transformation de protoplastes d'*A. thaliana*

- Souches d'*Escherichia coli* utilisées

L'amplification des vecteurs et les clonages sont réalisés dans les souches **Top10** : F- mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 lacZ Δ M5 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

La propagation et la conservation des vecteurs de destination porteur d'un gène suicide ccdB, sont réalisées dans la souche **DB3.1** (F- gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara14 galK2 lacY1proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δ leu mtl1).

- Construction des vecteurs d'expression

Les séquences d'ADNc de SS4 ou PII1 sont obtenues auprès de la banque RIKEN (<https://epd.brc.riken.jp/en/>). Les séquences dépourvues de codon STOP sont

amplifiées par PCR en utilisant une Taq polymérase "haute-fidélité", kit KaPa HiFi (Roche diagnostics). L'amorce forward est précédée d'une séquence CACC permettant l'insertion dans le vecteur d'entrée pENTR-D-TOPO. Le produit de PCR est inséré dans le vecteur pENTR-D-TOPO grâce à la topoisomérase associée à ce vecteur (TOPO clonage® ; invitrogen) en suivant les recommandations du fabricant. La souche d'*E. coli* : Top10 est transformée par choc thermique. Pour ce faire 20 à 50 ng de plasmide sont mis en contact 30 min sur glace avec un aliquot de bactéries compétentes. Le choc thermique, 45 sec à 42°C, est appliqué sur l'échantillon, suivi d'un retour sur glace de 2min et d'une régénération d'environ 1h à 37°C dans 250 µl de milieu LB (Luria-Bertani). Les TOP10 transformées sont étalées sur boîtes gélosées 1.2% de LB-kan (LB + kanamycine 50 µg/ml). A ce stade le vecteur est vérifié par restriction enzymatique, la séquence clonée codant pour la protéine d'intérêt est vérifiée par séquençage et les clones sont stockés à -80°C (glycérol 25%).

En utilisant la clonase LR (mélange d'enzymes Gateway® LR clonase™ II, Invitrogen), des ADNc ont été transférés du vecteur d'entrée au vecteur de destination pUBC-GFPDest, permettant ainsi l'expression de la protéine d'intérêt, fusionnée à la protéine fluorescente verte (Annexe 2).

- Purification et transformation des protoplastes.

Les protoplastes d'*Arabidopsis* sont isolés à partir de plantes de 2 semaines cultivées *in vitro*. Les feuilles ont été coupées finement dans 15 ml de mannitol à 500 mM. Après élimination du mannitol, l'échantillon de feuille est incubé avec des enzymes de la dégradation de la paroi cellulaire (cellulase Onozuka R10 à 1%, Macerozyme R10 à 0,25%, mannitol 400 mM, MES 5 mM, chlorure de calcium 1 M à pH 5,6) sans agitation pendant une nuit à température ambiante. Les protoplastes sont filtrés à travers deux couches de Miracloth (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA), centrifugés pendant 5 min à 50 g dans un rotor oscillant à température ambiante. Les protoplastes sont remis en suspension dans 5 ml de solution de W5 (chlorure de sodium 154 mM, chlorure de calcium 125 mM, chlorure de potassium 5 mM, glucose 5 mM, MES 1,5 mM, pH 5,6). 2,5 ml d'échantillon sont déposés sur 6 ml d'une solution de saccharose à 21% et centrifugés 10 min à 50 g. Les protoplastes intacts (figure 24) s'accumulent à la surface du saccharose. Ils sont prélevés et remis en suspension dans 0,3 ml de solution de MaMg (mannitol 0,4 M, MgCl₂ 15 mM, MES 5 mM, pH 5,6).

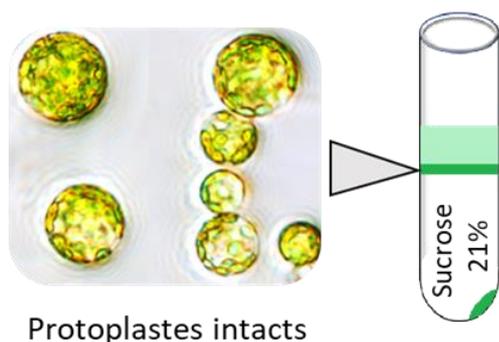


Figure 24 : purification des protoplastes. Le filtrat de protoplastes libérés par les enzymes de dégradation de la paroi est déposé sur un lit de sucrose 21%. Après centrifugation les protoplastes intacts se concentrent à la transition entre les deux phases. Les débris cellulaires se déposent au fond du tube à fond rond ou reste en surface.

La transformation a été réalisée en ajoutant 50 μg d'ADN plasmidique et 50 μg d'ADN de sperme de saumon utilisé comme ADN "entraîneur" au 300 μl de protoplastes. On ajoute immédiatement 325 μl de tampon de transfection (40% de polyéthylène glycol₄₀₀₀, 0,4 M de mannitol, 0,1 M de nitrate de calcium, pH 7–8). L'échantillon est incubé à l'obscurité 30 min, puis est lavé par dilution progressive dans du tampon W5 jusqu'à atteindre 10 ml, centrifugé pendant 5 min à 50 g à température ambiante et remis en suspension dans 2 ml de solution de W5. Les protoplastes sont observés 48 à 72 h après la transformation sous vidéo microscope (Leica AF6000LX) avec un objectif Plan Apo 9100 (NA = 1,4). Nous avons observé l'expression des protéines avec $\lambda_{\text{ex}} = 484\text{--}500$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 514\text{--}554$ nm (canal vert), et l'autofluorescence de protoplastes avec $\lambda_{\text{ex}} = 564\text{--}586$ nm et $\lambda_{\text{em}} = 602\text{--}662$ nm (canal rouge).

Agroinfiltration de feuilles de tabac (BiFC)

Les séquences d'ADNc de SS4 ou PII1 (sans codon stop) ont été clonées dans un vecteur d'entrée pENTRTM / D-TOPO® (Invitrogen). Les ADNc ont ensuite été transférés dans le vecteur BifP1 ou BifP4, en utilisant la LR clonase II (Invitrogen) permettant l'expression des protéines d'Arabidopsis fusionnées au fragment N ou C-terminal de l'EYFP (Annexe 3). Ces constructions permettront, après agroinfiltration, d'observer l'interaction entre les deux protéines par complémentarité bimoléculaire de fluorescence (BiFC) dans les feuilles de tabac (*N. benthamiana*).

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* (GV310::pMP901) est préalablement transformée de la façon suivante : 1 μg du vecteur d'expression est mis en contact avec

un aliquot de 100 μ l d'agrobactéries compétentes, 15 min sur glace. L'échantillon est placé 30 sec dans l'azote liquide puis 5 min à 37°C. 1ml de milieu YEB sans antibiotique est ajouté à l'échantillon qui est ensuite placé 2 h à 30°C pour la régénération. Une centrifugation de 5 min à 4000g permet de retirer l'excédent de surnageant et environ 100 μ l de culture d'agrobactéries sont étalés sur boîte de pétri YEP 1.2% + antibiotiques (rifampicine 50 μ g / ml, gentamycine 50 μ g / ml streptomycine 100 μ g / ml) puis placé 2 jours à 30°C.

L'agroinfiltration se déroule de la façon suivante : les souches d'agrobactéries transformées sont mises en culture dans 5 ml de milieu YEP (5 gL⁻¹ extrait de boeuf, 1 gL⁻¹ extrait de levure, 5 gL⁻¹ peptone, 5 gL⁻¹ saccharose, 2 mM de MgSO₄, pH 7.2) contenant les antibiotiques de sélection pendant une nuit à 30°C. La culture est divisée en aliquot de 1 ml et centrifugée 15 min à 3000g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé trois fois en ajoutant 1 ml de milieu d'infiltration (tampon MES / KOH 10 mM, pH 5,6, MgCl₂ 10 mM, acétosyringone 150 mg-1). Le culot est resuspendu par pipetage et la DO₆₀₀ est ajustée à 0.8-1 avec le milieu d'infiltration. Les différents clones sont mélangés en proportion 1: 1 (v / v) et incubés pendant 2h à la température ambiante. Les plantes de *N. Benthamiana* sont cultivées à 23 ° C avec des cycles de lumière de 16h et de 8h de nuit. Des plantes âgées de 6 semaines sont utilisées pour l'infiltration. Le mélange d'agrobactéries est infiltré à l'aide d'une seringue en dessous de la feuille (JoVE : Tian et al., 2011 ; figure 25).



Figure 25 : Agroinfiltration : photographie montrant l'injection du mélange d'agrobactéries transformées, sous la feuille de *Nicotiana benthamiana*.

Les zones infiltrées sont annotées. Les plantes sont placées dans des conditions de croissance normales pendant 3 jours. Les observations microscopiques sont effectuées sur un segment de tissu de la feuille dans la zone infiltrée par microscopie confocale. Le fond de fluorescence a été déterminé à partir des feuilles soumises à l'injection avec un milieu d'agro-infiltration uniquement (pas de bactéries).

Résultats

Partie 1 : Mise en évidence d'un nouveau facteur protéique impliqué dans l'initiation de la synthèse d'amidon : Caractérisation de la lignée mutante *pil1*.

Les outils d'analyses *in silico*, m'ont permis d'obtenir des informations générales sur la protéine impliquée dans l'initiation de la synthèse de l'amidon (PII1).

La séquence protéique de PII1 est disponible en ligne sur le site « Tair » (<https://www.arabidopsis.org/>; Annexe 4), au même titre que la séquences du gène et que les lignées mutantes disponibles pour le locus (PII1) At4g32190.

Tout d'abord, l'analyse phylogénétique, par la méthode du maximum de vraisemblance, permet d'observer que PII1 est hautement conservée chez les plantes supérieures (figure 26). La répartition de la protéine suit la distribution classique des dicotylédones et monocotylédones. Cela suggère que PII1 joue un rôle important dans ces groupes.

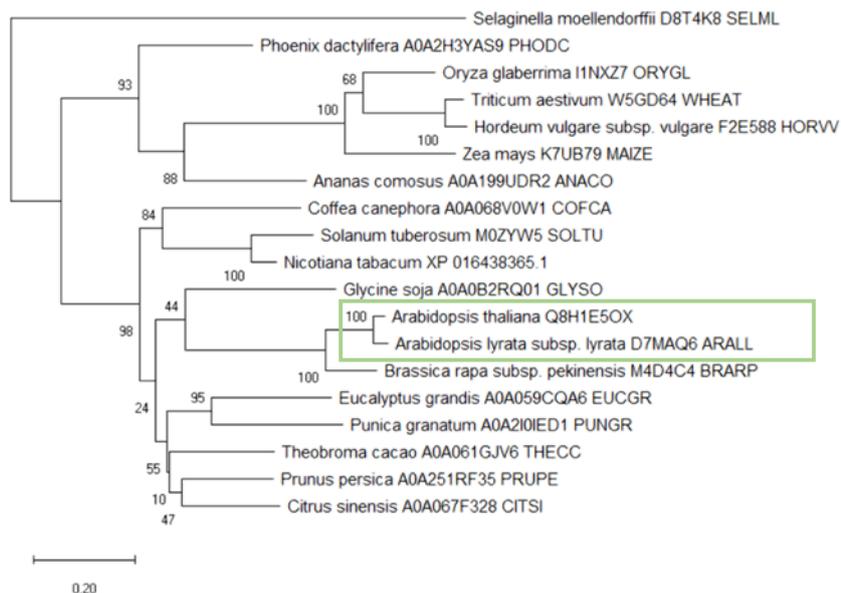


Figure 26 : Analyse phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance. Les analyses évolutives ont été menées à partir de la séquence protéique de PII1 dans MEGA X ; Arabidopsis est encadré en vert, la barre rouge indique les dicotylédones, celle en orange indique les monocotylédones. La séquence retrouvée chez *S. moellendorffii* sert d'ancrage à l'arbre phylogénétique.

Il est intéressant de noter que PII1 n'est pas retrouvée par homologie de séquence chez les algues, ce qui n'exclut pas qu'une protéine de structure tertiaire semblable soit impliquée dans le métabolisme de l'amidon chez ces organismes. En effet, la protéine PII1 apparait comme étant uniquement constituée d'hélices- α de type coiled-coil

(Jpred4, figure 27). Aucun site catalytique ni domaine, tel que les domaines de fixation au carbohydrate particulièrement conservé au cours de l'évolution, ne sont retrouvés à partir de l'analyse de la séquence protéique. Un peptide d'adressage au chloroplaste de 27 acides aminés est également retrouvé sur la base de l'analyse in silico de la séquence de la protéine PII1 (ChloroP).

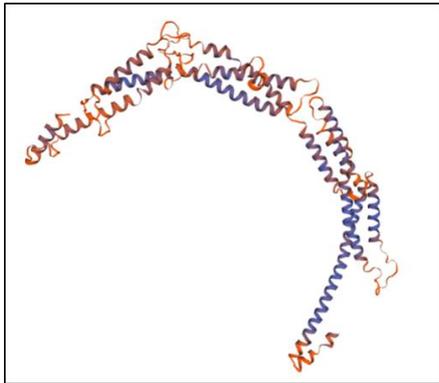


Figure 27 : modélisation de PII1 proposée par SwissModel : prédiction basée sur la séquence protéique de PII1 sans le peptide d'adressage au chloroplaste. Le template choisi conduisant au modèle ci-contre, permet le plus grand recouvrement de la séquence de PII1. Il s'agit du régulateur négatif de la division bactérienne EZRA. Les 13 modèles proposés par swissmodel sont formés d'une succession d'hélice alpha.

L'expression de PII1 dans les différents tissus d'*A. thaliana* est accessible via la banque de données de génomique AtGenExpress eFP : <http://bar.utoronto.ca/eplant>. Les résultats indiquent que PII1 est exprimée dans l'ensemble de la plante et majoritairement au niveau des feuilles. Ce résultat est cohérent avec la distribution de l'amidon au sein de la plante (figure 28).

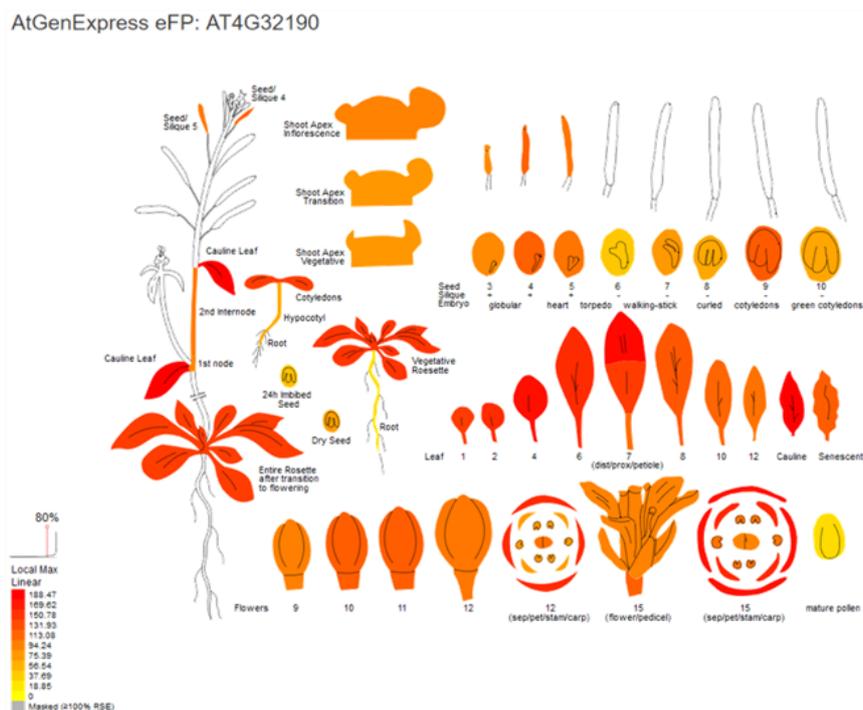


Figure 28 : Expression de PII1 dans les différents tissus d'*A. thaliana*. Cette image a été générée avec AtGenExpress eFP : <http://bar.utoronto.ca/eplant/> ; l'expression de PII1 est la plus élevée dans les tissus représentés en rouge. Le code couleur décroît jusqu'au jaune.

l) Analyse du transcrit du mutant *pii1*.

Pour déterminer l'implication biologique de la protéine PII1, nous avons engagé une analyse phénotypique des lignées altérées dans le gène codant pour la protéine. Deux lignées mutantes d'*Arabidopsis* générées par insertion d'ADN-T dans le gène At4g32190 ont été sélectionnées.

Cette première étape de sélection consiste en la vérification de la présence de l'insert d'ADN de transfert exogène (ADN-T) à l'état homozygote dans la lignée mutante sélectionnée. Pour ce faire une stratégie de double PCR, est réalisée. Un couple d'amorces amplifie un fragment d'ADN « sauvage » et un second couple amplifie un fragment d'ADN « mutant ». La lignée mutante d'*Arabidopsis* sélectionnée ne possède pas de copie sauvage du gène codant pour la protéine PII1, mais possède uniquement deux copies du gène possédant l'insert d'ADN-T. Dans le cas du mutant *pii1-1* (écotype Col0), l'insertion est située dans le 5'-UTR (trois nucléotides avant le codon ATG), tandis que pour le mutant *pii1-2* (écotype WS), l'ADN-T est inséré dans le second exon. Nous avons évalué l'intégrité de l'ARNm At4g32190 par RT-PCR (figure 29). Dans les deux cas, l'intégrité de l'ARN est compromise par l'insertion de l'ADN-T.

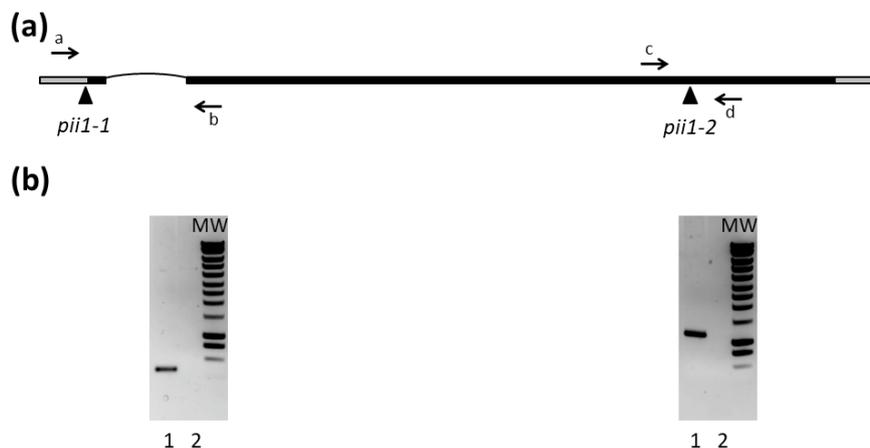


Figure 29 : Sélection du mutant *pii1* : **a)** Représentation schématique du locus At4g32190 codant la protéine PII1. L'UTR est indiqué en gris, les exons en noir et l'intron par un trait fin et noir. Le lieu d'insertion de l'ADN-T correspondant aux allèles *pii1-1* et *pii1-2* est indiqué par des triangles. La position des amorces utilisées pour la sélection est indiquée par des flèches. **b)** le gel d'agarose de gauche contient les produits d'amplification obtenus par RT-PCR en utilisant les amorces a et b (Annexe 1) sur l'ARN total extrait de Col0 (piste 1) et *pii1-1* (piste 2). Le gel de droite : produits d'amplification RT-PCR obtenus en utilisant les amorces c et d sur l'ARN total extrait de Ws (piste 1), *pii1-2* (piste 2). Marqueur de poids moléculaire (MW)

L'allèle *pil1-1* (Col0), bien qu'impacté par la mutation, peut potentiellement conduire à la synthèse d'une protéine fonctionnelle puisque l'ADN-T est situé dans le 5'-UTR. Cependant, la séquence codante est séparée de son promoteur par la séquence de l'ADN- T. Une autre équipe travaillant sur cet allèle a pu montrer, à l'aide d'anticorps, qu'une faible quantité de protéine PII1, estimée à moins de 10% de la quantité sauvage, était effectivement produite dans le mutant *pil1-1* (Seung et al., 2018). Les légères différences phénotypiques observées entre les deux mutants et présentées dans la suite de ce manuscrit peuvent s'expliquer par le fait que la mutation *pil1-1* ne soit pas nulle. On peut donc observer l'effet « dose » de la protéine PII1 sur le métabolisme de l'amidon.

II) Localisation subcellulaire de la protéine PII1

Les prédictions *in silico* indiquent que PII1 est adressée au chloroplaste. Cette information a été vérifiée par transformation de protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* avec un plasmide permettant l'expression de la protéine de fusion PII1-GFP. Cette expérience confirme l'adressage de PII1 au chloroplaste (figure 30). Cette étude nous a également permis de découvrir que PII1 est localisée sous forme de « spot » dans les chloroplastes. Ce résultat fait écho à la localisation de SS4 connue pour être concentrée en différents points associés à la membrane des thylakoïdes (Gámez-Arjona et al., 2014). Nous avons donc exprimé PII1-GFP dans le mutant *ss4* pour voir si l'absence de *ss4* conduit à une localisation sous forme de signal diffus dans les chloroplastes. Et inversement, SS4-GFP a été exprimé dans le mutant *pil1-2*. Dans les deux cas, SS4 et PII1 demeurent localisées sous forme de spots. Nous pouvons affirmer que l'absence de PII1 ne conduit pas à rendre la protéine SS4 soluble dans le stroma des chloroplastes et *vice et versa*.

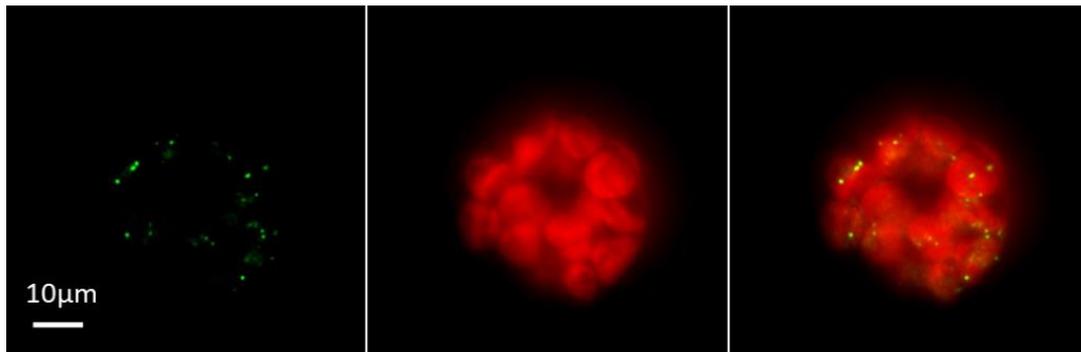


Figure 30 : localisation subcellulaire de PII1 par transformation de protoplaste d'Arabidopsis. Les protoplastes extraits de plante sauvage (Col0) ont été transformés avec une construction permettant l'expression de la protéine de fusion PII1-GFP. L'image de gauche correspond au signal de la GFP de la protéine de fusion. Le signal de la chlorophylle est indiqué dans la seconde image. L'image de droite est la fusion des deux premières. L'acquisition des images est réalisée sur un vidéo microscope.

III) Confirmation de l'interaction entre PII1 et SS4 par BiFC

Nous avons voulu confirmer l'interaction entre SS4 et PII1 observée par le criblage double hybride. Pour ce faire, des agrobactéries ont été transformées avec un plasmide permettant l'expression de SS4 ou PII1 fusionnés avec la partie N- ou C-terminale de la YFP. Des feuilles de tabac ont été infiltrées avec un mélange comprenant deux souches d'agrobactéries permettant l'expression simultanée des protéines de fusion capables de reconstituer la YFP si SS4 et PII1 se trouvent suffisamment proche pour reconstituer le complexe. L'interaction de SS4 avec elle-même est utilisée comme contrôle positif pour cette étude puisque l'existence d'homodimères de SS4 a déjà été décrite dans la littérature (Raynaud et al., 2016). Les résultats obtenus indiquent l'existence d'une interaction entre SS4 et PII1 puisqu'un signal fluorescent jaune est observé en coexprimant les deux protéines de fusion dans les mêmes cellules végétales (Figure 31, annexe 3).

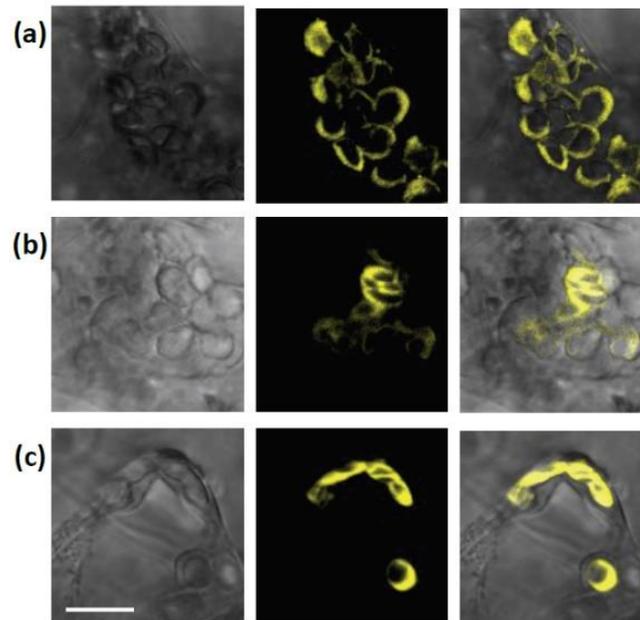


Figure 31 : Interaction entre SS4 et PII1 (BiFC). L'agroinfiltration a été effectuée sur des plants de tabac (*N. benthamiana*) de 6 semaines. *Agrobacterium*: GV310 :: pMP901 est transformée avec les vecteurs d'expression conduisant à la production de protéine de fusion SS4 ou PII1 avec la moitié de la YFP. (a): SS4_N-EYFP exprimé avec SS4_C-EYFP. (b): SS4_N-EYFP exprimé avec PII1_C-EYFP. (c): PII1_N-EYFP et SS4_C-EYFP. Le fond de fluorescence a été déterminé à partir des feuilles infiltrées uniquement avec un milieu d'agro infiltration (pas de bactéries). Dans chaque rangée, de gauche à droite : lumière blanche, fluorescence YFP, image fusionnée. Toutes les images sont à la même échelle. Barre blanche = 10 μ m

IV) Caractérisation de la taille des grains d'amidon et du nombre de grains d'amidon par chloroplaste du mutant *pil1*.

A l'échelle macroscopique, une décoloration des plantes suivie d'une coloration à l'iode permet d'observer la répartition de l'amidon au sein des feuilles de la rosette des lignées étudiées (figure 32).

- On observe une répartition homogène de l'amidon dans les feuilles du mutant *pil1* qui se comporte de la même façon que la lignée sauvage de référence. Une différence flagrante de coloration à l'iode des feuilles du mutant *ss4-2* comparée à celle de *pil1-2* et *Ws*, est également observée. En effet, la répartition de l'amidon au sein de ces feuilles est répartie de façon hétérogène et ne semble se trouver que dans les cellules les plus anciennes. En outre, les cellules végétales les plus jeunes ne semblent pas contenir d'amidon (figure 32).



Figure 32 : Coloration à l'iode des différentes lignées étudiées. Les rosettes ont été prélevées à la fin de la période lumineuse (16h) trois semaines après germination. Les rosettes sont décolorées dans un bain d'éthanol 80% chauffé à 70°C. Les rosettes sont ensuite rincées à l'eau puis colorées dans une solution de Lugol. Une coloration foncée révèle la présence d'amidon.

- Il est également intéressant de noter que les diamètres des rosettes des lignées *pii1-2* et *Ws* sont semblables, tandis que *ss4-2* présente un phénotype nain, déjà décrit. Un suivi de croissance des plantes réalisé pendant 3 semaines sur ces trois lignées, dans les écotypes *Ws* et *Col0*, permet de confirmer cette observation (figure 33).

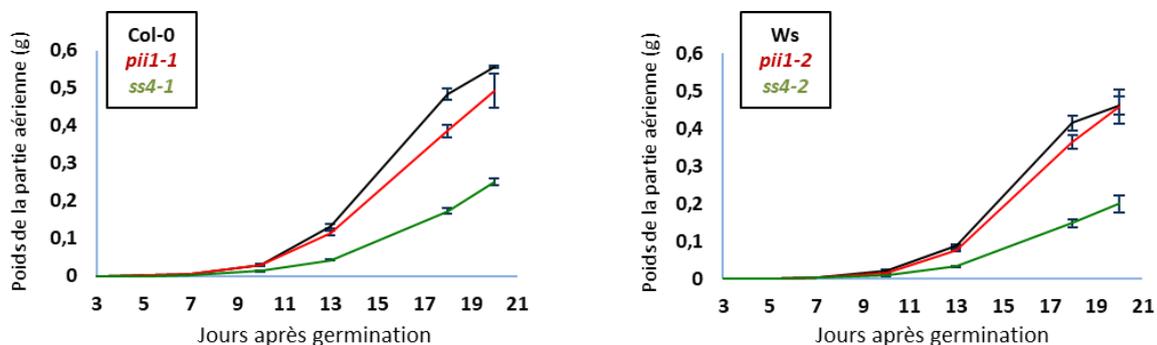


Figure 33 : phénotype de croissance *pii1* par rapport aux plantes *ss4* et sauvage. Les plantes ont été cultivées dans une serre sous 16 h jour : 8 h nuit. Le poids moyen des parties aériennes des plantes est représenté en fonction du nombre de jours après la germination. Les barres noires représentent l'erreur standard.

Une étude à l'échelle microscopique permet d'approfondir ces premières observations. Pour ce faire, des feuilles ont été prélevées pour chaque plante 16 jours après germination et fixées au paraformaldéhyde avant d'être observées par microscopie confocale. Les observations sont réalisées aux deux extrémités des feuilles (figure 34). L'extrémité la plus proche du centre de la rosette ainsi que la zone la plus éloignée du centre. Cette étude permet d'affirmer que la répartition de l'amidon est

hétérogène dans les feuilles du mutant *ss4-2* avec un nombre de chloroplastes dépourvus d'amidon beaucoup plus important à proximité de la tige (cellules jeunes) et homogène pour les lignées *pil1-2* et *Ws*. On observe, à l'intérieur des chloroplastes, plusieurs grains d'amidon plat et de petite taille ($\sim 1\mu\text{m}$) pour la lignée sauvage. Un unique grain d'amidon plus volumineux est synthétisé dans les chloroplastes de la lignée *ss4-2*. Il en est de même pour le mutant *pil1-2*. Cependant l'unique grain d'amidon synthétisé par chloroplaste dans la lignée *pil1-2* semble plus aplati que dans la lignée *ss4-2*.

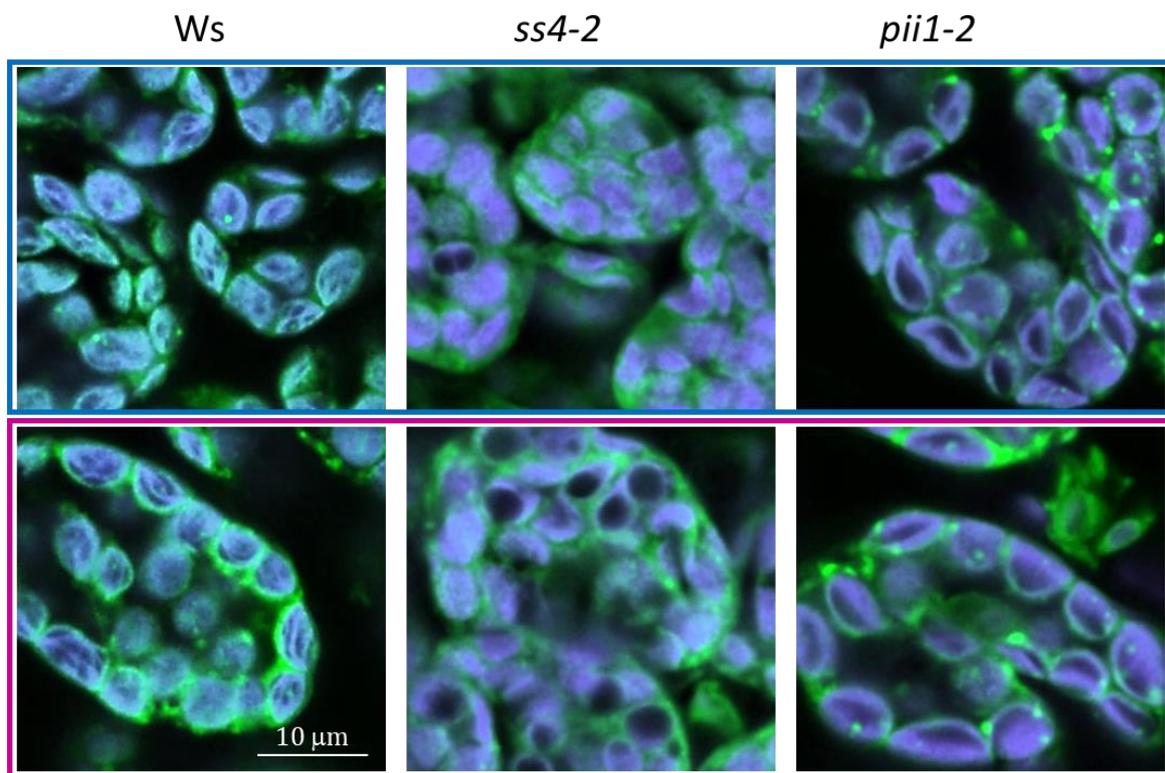


Figure 34 : Images de feuilles d'*Arabidopsis thaliana* obtenues par microscopie confocale. Les feuilles ont été prélevées à la fin de la période lumineuse (16h) deux semaines après germination et immédiatement fixées. Ici on fait la différence entre l'observation du nombre de grains d'amidon par chloroplaste sur la partie de la feuille la plus au centre de la rosette (encadré en bleu) et un morceau prélevé sur la même feuille, mais à l'extrémité la plus éloignée du centre de la rosette (encadré violet). La caractérisation spectrale des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* nous permet d'obtenir des images par contraste de fluorescence des grains d'amidon. L'amidon apparaît en noir à l'intérieur des chloroplastes bleu-vert. Toutes les images présentées sont à la même échelle.

Des analyses au compteur de particules suivies d'analyses par microscopie électronique à balayage (MEB) des échantillons d'amidon purifiés permettent d'obtenir plus d'informations sur la taille et la forme des grains d'amidon. Les valeurs de distribution de la taille des grains d'amidon, obtenues au compteur de particules,

révèlent que les grains purifiés du mutant *pii1* sont d'une taille comparable à ceux synthétisés par le mutant *ss4*, et 2 à 3 fois plus volumineux que les ceux d'une lignée sauvage (figure 35). Les clichés de MEB permettent d'observer la surface des grains d'amidon. Les grains d'amidon *pii1* sont plus grands que les grains sauvages, mais présentent le même type de morphologie aplatie. Les grains *ss4* sont quant à eux plus grands et gonflés.

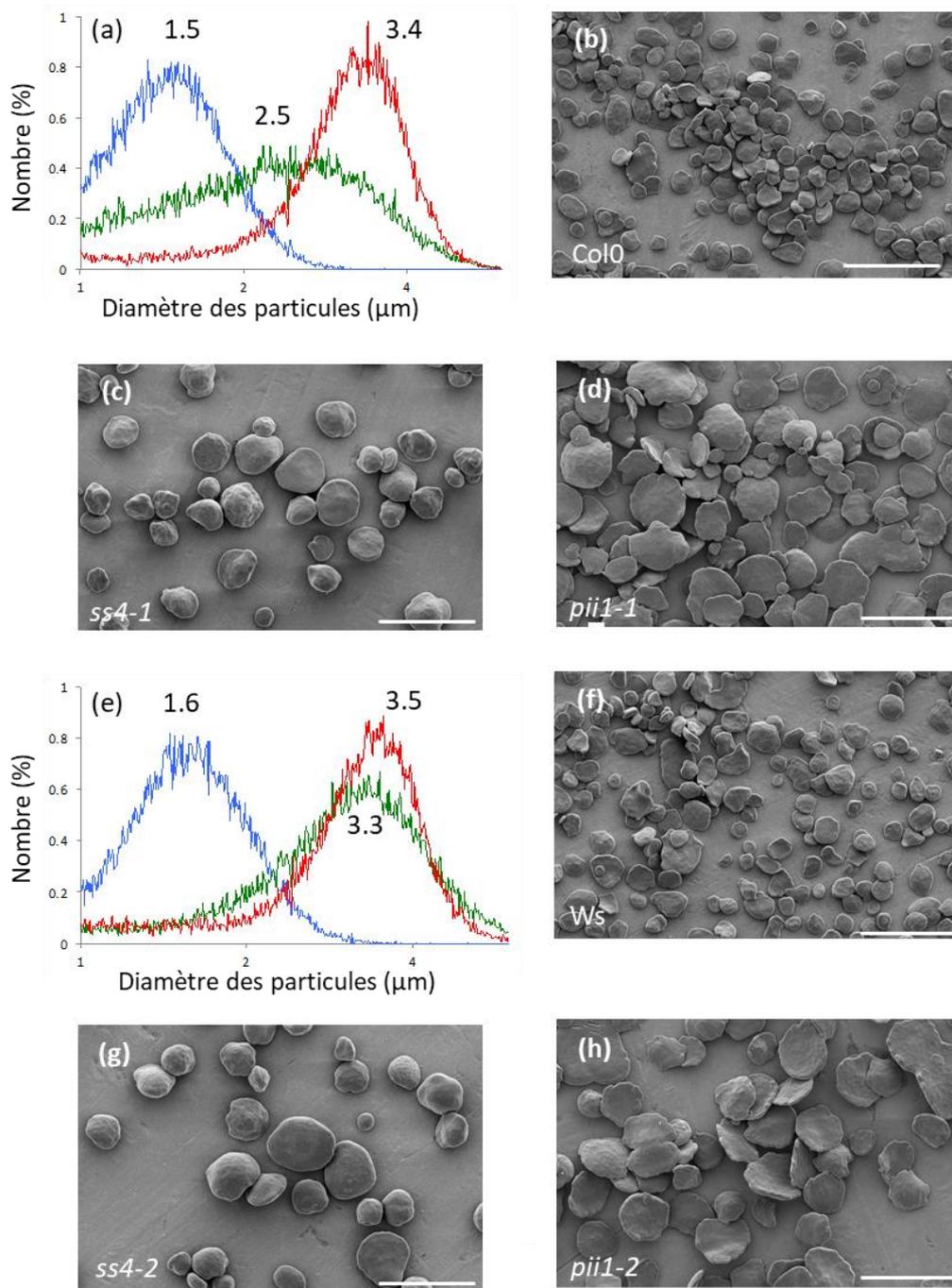


Figure 35 : Caractérisation de la taille et de la forme des grains d'amidon. De (a-d), résultats obtenus pour l'écotype Col0 et (e-h) pour l'écotype WS. Les graphiques en a) et e) montrent la distribution de la

taille des grains d'amidon obtenue au compteur de particules (multiSizer4 ; Beckman). Le résultat obtenu pour la lignée mutante *pil1* (courbe verte) est comparé au témoin sauvage (courbe bleue) et au mutant *ss4* (courbe rouge). L'axe des abscisses représente le diamètre des particules détectées (en μm), et l'axe des ordonnées le pourcentage relatif de chaque taille de particule. En (b-d) et (f-h) sont représentés les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage de grains d'amidon extraits et purifiés issus des lignées WT, *ss4* et *pil1*, barre d'échelle = 10 μm .

V) Dosage de l'amidon et de l'ADP-Glucose

La quantité de polysaccharides insolubles produite dans les différentes lignées d'intérêt a été quantifiée par dosage enzymatique. A la fin de la phase lumineuse, c'est-à-dire au moment où l'accumulation de l'amidon est maximale, les dosages indiquent que la quantité d'amidon synthétisée dans les lignées dépourvues de la protéine PII1 est comparable, voire supérieure, à la quantité d'amidon synthétisée dans la lignée sauvage (figure 36. a). Cette expérience a également été réalisée à la fin des 8h de nuit et les résultats montrent que les plantes dégradent près de 80% de l'amidon accumulé durant la journée indépendamment du génotype (figure 36. b).

Une cinétique de synthèse et de dégradation de l'amidon sur 24h a été réalisée. La légère suraccumulation d'amidon en fin de jour et en fin de nuit du mutant *pil1-2* est confirmée par cette expérience. De plus, on observe que les cinétiques de synthèse et de dégradation du mutant *pil1-2* et *Ws* suivent la même pente. Cela suggère que l'inhibition de PII1, conduisant à la synthèse de grains d'amidon altérés en taille et en nombre, n'a pas d'impact, ou un impact modéré, sur les cinétiques de synthèse et de dégradation de l'amidon. La mutation *ss4* conduit à un ralentissement global du métabolisme de l'amidon sur 24h par comparaison à la référence sauvage (figure 36. c).

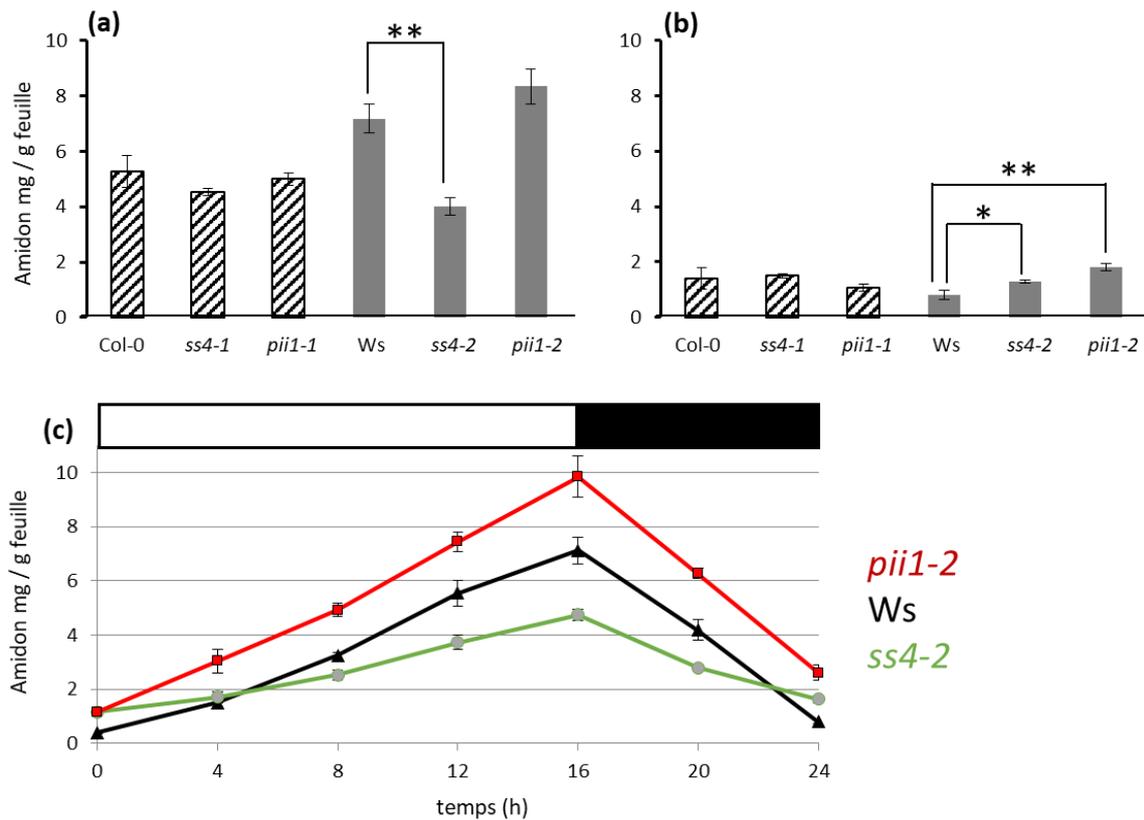


Figure 36 : Dosage d'amidon par quantité de feuilles. Les plantes ont été cultivées dans une salle de culture 16 h : 8 h, lumière: obscurité. Trois semaines après la germination, les feuilles ont été prélevées en fin de jour **(a)**, et en fin de nuit **(b)**. Trois cultures indépendantes ont été réalisées et pour chaque culture, trois extractions indépendantes ont été réalisées. Les barres verticales représentent l'erreur standard. Les valeurs obtenues pour les lignées mutantes ont été comparées au sauvage par un t-test bilatéral. L'astérisque représente une différence statistiquement significative à $p < 0,05$ (*) ou à $p < 0,001$ (**). **(c)** Teneur en amidon mesurée dans le type sauvage (écotype Ws, ligne noire) ; *pii1-2* (ligne rouge) et *ss4-2* (ligne verte) sur un cycle diurne (16 h de lumière, barre blanche ; 8 h d'obscurité, barre noire). Les rosettes ont été récoltées toutes les quatre heures et immédiatement congelées dans de l'azote liquide. Chaque point correspond à la moyenne \pm SE de 3 échantillons indépendants provenant de la même culture.

Afin de compléter cette étude, le niveau d'ADP-Glucose accumulé dans les feuilles de la lignée *pii1*, a été mesuré en fin de jour. La suraccumulation de ce nucléotide sucre, précurseur de la synthèse d'amidon, dans les feuilles du mutant *ss4* est décrit comme étant à l'origine du phénotype nain de cette lignée mutante. Les plantes mutantes *pii1* ayant un développement de type sauvage, on ne s'attend pas à trouver une suraccumulation d'ADP-Glc ce que confirme notre expérience montrant des niveaux d'ADP-Glc comparables entre la lignée sauvage et *pii1* (figure 37).

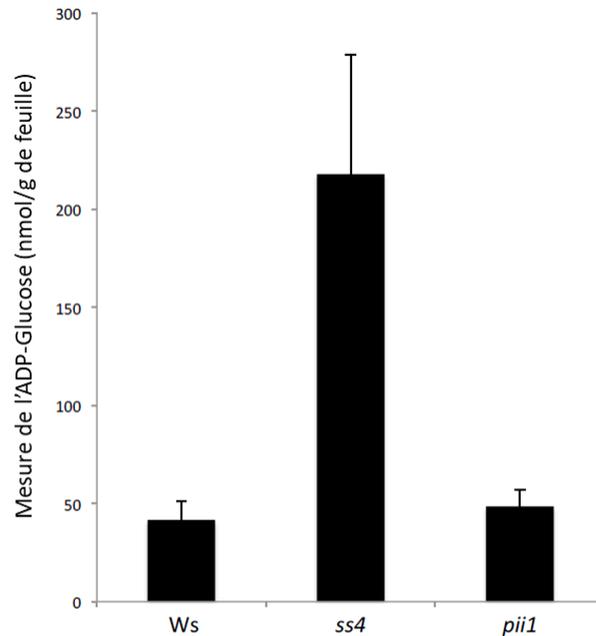


Figure 37 : Dosage de l'ADP-Glucose. Les feuilles de plantes âgées de trois semaines ont été récoltées en fin de jour et immédiatement congelées dans l'azote liquide. Elles sont ensuite broyées dans un tampon Tris et l'extrait est passé à travers une colonne échangeuse de cations Dowex 50WX2-400. La mesure ADP-glucose est effectuée en utilisant un système Aktapurifier équipé d'une colonne échangeuse d'anions ProPAC-PA1. Le pic d'ADP-Glc est détecté par absorption à 256 nm et identifié par comparaison avec le temps de rétention de l'injection standard avant l'analyse. Les niveaux d'ADP-Glc ont été quantifiés à partir de zones de pics intégrés qui sont alors comparés à une série standard d'ADP-Glc. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm écart-type de trois échantillons biologiques indépendants de la même culture.

VI) Analyse de la structure du grain d'amidon du mutant *pii1*

Le fractionnement des polysaccharides insolubles par chromatographie d'exclusion stérique (Sephacrose CL-2B) permet de séparer les deux polysaccharides constitutifs du grain d'amidon : l'amylose de l'amylopectine. Le 1er pic correspond à l'amylopectine et le pic élué dans un second temps, beaucoup plus large, correspond à l'amylose (Figure 38). La longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe formé entre les molécules de diiode et le polysaccharide (λ_{\max}) est un indicateur de la structure des polymères de glucose. Plus les chaînes de la molécule sont longues, plus cette valeur de λ_{\max} est élevée. L'analyse de nos échantillons, sur trois cultures distinctes, montre que

la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe iode amylopectine est d'approximativement 555nm pour la lignée *pii1* et la référence sauvage. Ces résultats suggèrent que la mutation *pii1* ne modifie pas la structure de l'amylopectine.

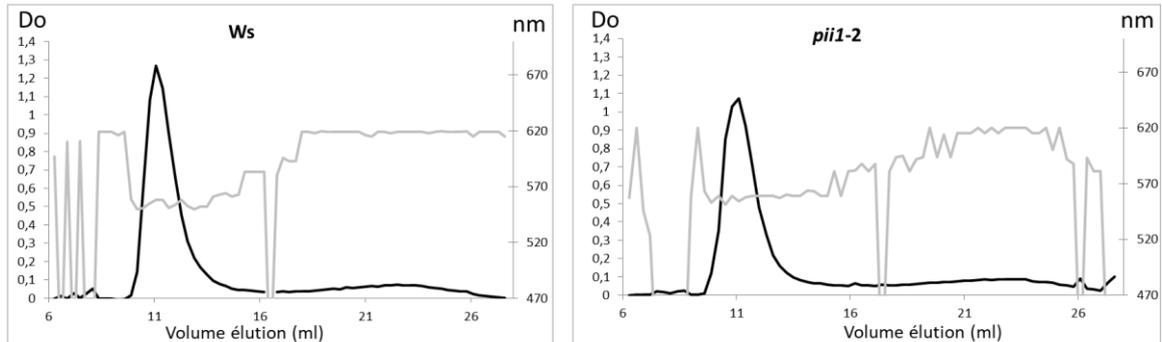


Figure 38: Profils obtenus après chromatographie d'exclusion stérique (CL-2B) des polysaccharides insolubles purifiés du mutant *pii1* et de la lignée sauvage. Pour chaque lignée, 1,5mg d'amidon est resuspendu dans la soude et fractionné par chromatographie d'exclusion stérique sur une matrice de sépharose (matrice CL-2B ; colonne de 70 cm de long et de 0,5 cm de diamètre). 80µl des différentes fractions collectées sont mélangés à 20µl de Lugol et une mesure d'absorbance est réalisée. Pour chaque échantillon, l'axe de gauche représente le maximum d'absorbance du complexe iode/polysaccharide mesuré pour chacune des fractions collectées (courbes noires). L'axe de droite représente la longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode/polysaccharide pour chacune des fractions (courbes grises).

La distribution en longueur de chaîne de l'amylopectine des différentes lignées est également analysée par chromatographie échangeuse d'anions (Figure 39). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de variation significative entre les échantillons d'amidon du mutant *pii1* et du témoin sauvage. En effet, les différences entre le profil du mutant et du sauvage ne dépassent pas 0,5 point, ce qui correspond aux limites de détection de la machine (Figure 39 courbe rose).

Cette caractérisation a été réalisée sur les allèles disponibles dans les deux écotypes et réalisée sur trois cultures indépendantes. Ainsi nous pouvons affirmer que l'inhibition de la protéine PII1 n'a pas d'impact sur la quantité en amylose/amylopectine de l'amidon, ni sur la distribution en longueur de chaînes de l'amylopectine.

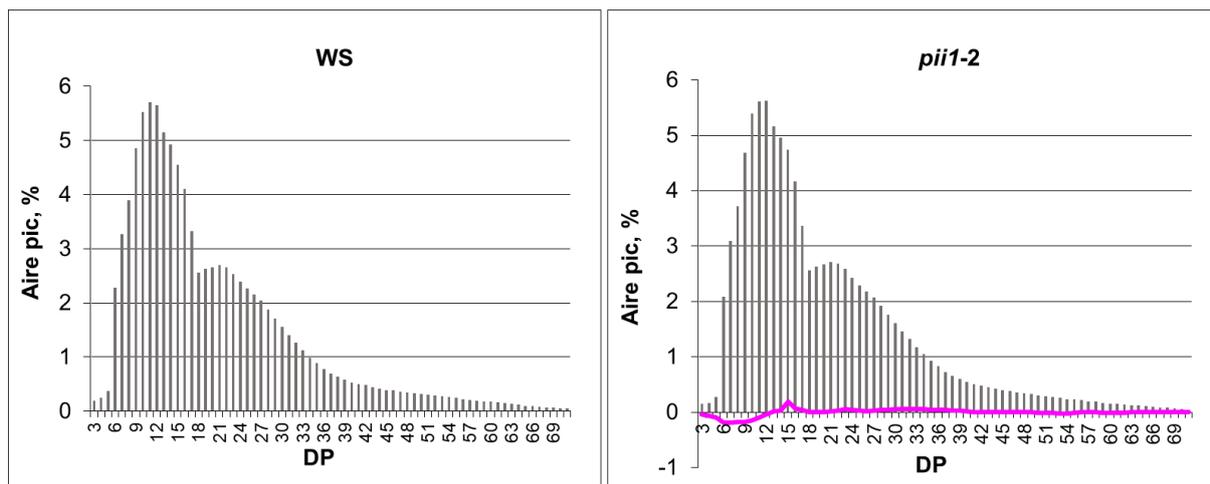


Figure 39 : Analyse de la distribution en longueur de chaînes des polysaccharides purifiés. Les polysaccharides insolubles extraits des différentes lignées (sauvages ou transformées) ont été débranchés en présence de 4 unités d'isoamylase et de 2 unités de pullulanase (enzymes qui hydrolysent les liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ des polysaccharides). Les glucanes linéaires obtenus sont ensuite analysés par chromatographie d'échange d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (Dionex®). Cette technique chromatographique permet de séparer les glucanes en fonction de leurs degrés de polymérisation (DP). La proportion relative de chaque glucane est exprimée en pourcents du nombre total de chaînes. La courbe rose représente la différence entre la distribution de longueur de chaînes du mutant *pii1* et celle du sauvage.

VII) Analyse de l'amidon racinaire mutant *pii1*

L'étude de l'amidon racinaire permet de faire le lien entre le métabolisme de l'amidon transitoire, chloroplastique, et l'amidon de réserve des tissus non photosynthétiques des différentes lignées étudiées dans ce travail.

A l'échelle macroscopique, le développement racinaire peut être observé en culture *in vitro*, après avoir déposé les graines sur des boîtes de milieu gélosé, positionnées à la verticale, après germination des graines. Ainsi, on observe un développement classique des racines de la plante sauvage. La racine principale, ainsi que les racines latérales issues de cette dernière, se développant suivant la gravité. On observe une orientation aléatoire des racines du mutant *ss4* avec des exemples de racines se développant vers le bas et d'autres s'orientant vers le haut de la boîte. Le mutant *pii1* présente une architecture racinaire comparable à celle du sauvage (figure 40.a).

A l'échelle microscopique, il est possible d'observer l'amidon racinaire après coloration à l'iode des racines issues de culture hydroponique. On observe ainsi la présence d'amidon dans les deux types de racines, la principale et les latérales, au

niveau de la coiffe racinaire d'une lignée sauvage. Le mutant *ss4* ne synthétise pas d'amidon dans ses racines latérales. Le mutant *pii1*, quant à lui, est capable de synthétiser de l'amidon dans les différents types racinaires (figure 40.b et c).

Le comportement aléatoire du développement racinaire du mutant *ss4* s'explique par l'absence d'amidon dans la quasi-totalité de ses racines, l'amidon permettant la perception de la gravité au niveau des racines. Cette étude creuse l'écart entre le phénotype résultant de l'inhibition de SS4 et celui résultant de l'inhibition de la protéine PII1. En effet, SS4 semble être nécessaire à l'initiation de la synthèse de l'amidon dans les amyloplastes contrairement au facteur protéique PII1.

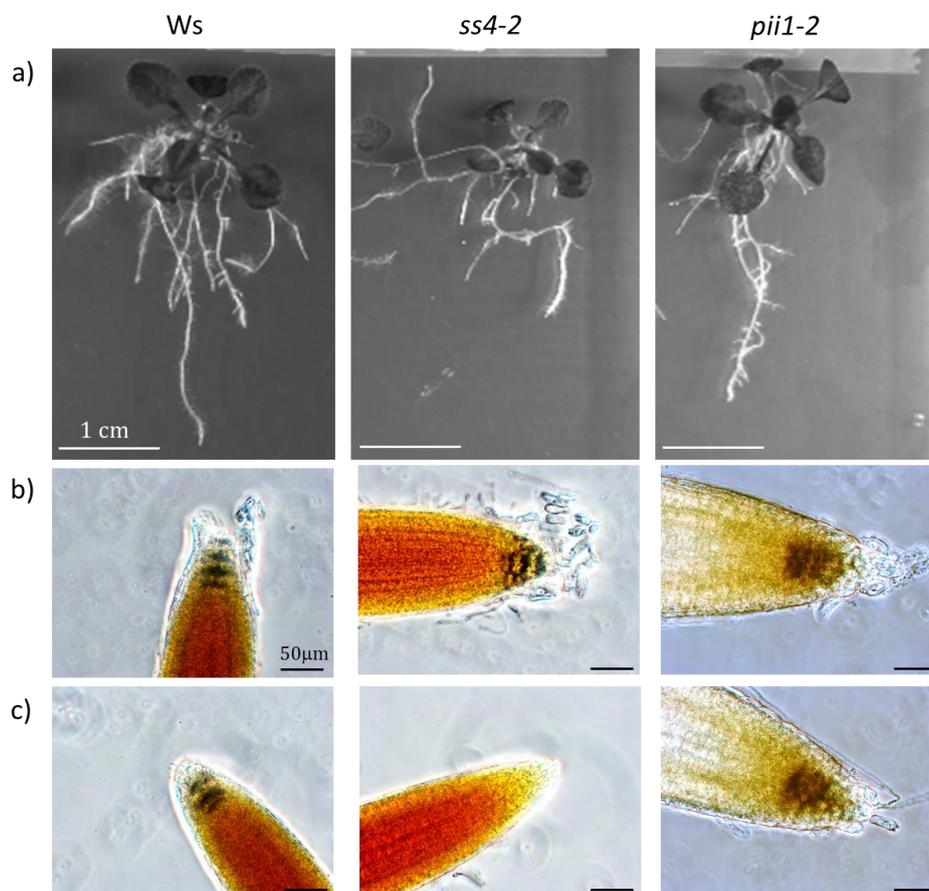


Figure 40 : observation des racines des différentes lignées d'*A. thaliana*. Les plantes ont été cultivées pendant 2 semaines avec un rythme 16 h, jour : 8 h, nuit. De gauche à droite sont représentés la lignée sauvage Ws, le mutant *ss4* et le mutant *pii1*. a) Les graines ont été semées sur des boîtes de milieu MS contenant de l'agar. Les boîtes sont maintenues verticalement après la germination des graines. b) et c) Les racines de plantes âgées de 2 semaines cultivées avec des systèmes hydroponiques ont été trempées dans du lugol, rincées à l'eau et observées sous microscope. b) racine primaire. c) racine latérale.

VIII) Conclusion

Les travaux répertoriés dans cette première partie montrent que le facteur protéique PII1, hautement conservé chez les végétaux supérieurs, interagit dans les chloroplastes avec SS4. La lignée *pil1* a été sélectionnée et son phénotype amidon caractérisé.

L'élément principal ayant permis la découverte de l'implication de PII1 dans le processus d'initiation et du contrôle de la taille des grains d'amidon est l'observation d'un unique grain d'amidon synthétisé par chloroplaste dans la lignée *pil1*, contre 5 à 7 pour la lignée sauvage de référence. Cette diminution du nombre de grains d'amidon par chloroplaste est associée à une augmentation de leur surface qui est jusque 3 fois supérieure à celle d'un grain d'amidon sauvage. Ces deux points sont également observés pour le mutant *ss4*. Les différents résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Lignée	Sauvage	<i>ss4</i>	<i>pil1</i>
Croissance de la plante	Normale	Phénotype nain	Normale
Présence d'amidon dans l'ensemble de la feuille	Oui	Non	Oui
Nombre moyen de grains d'amidon par chloroplaste	5 à 7	<1	1
Diamètre des grains d'amidon	~1,5µm	~3,5µm	~3,5µm
Forme des grains d'amidon	Plats	Gonflés	Plats
Cinétique de synthèse/dégradation d'amidon par feuille	Normale	Légèrement ralentie	Normale
Structure de l'amylopectine	Normale	Normale	Normale
Ratio amylose/amylopectine	Normal	Normal	Normal
Quantité d'ADP-Glucose par feuille	Normale	Suraccumulation	Normale
Présence d'amidon dans toutes les racines	Oui	Non	Oui

Tableau 3 : Récapitulatif du phénotype caractérisé pour la lignée *pil1* comparé à la lignée *ss4* et à la lignée sauvage.

La suraccumulation d'ADP-Glucose, le phénotype nain, l'absence d'amidon dans les zones les plus jeunes des feuilles ainsi que dans la coiffe des racines latérales caractérisant le mutant *ss4* ne sont pas retrouvés dans la lignée mutante *pil1*. Les liens métaboliques entre ces différentes observations, cycle futile et/ou rupture en approvisionnement du substrat permettant la synthèse d'amidon, restent à être déterminés.

Une étude récente ayant mis en avant le rôle distinct des deux domaines protéiques de SS4 (Lu et al., 2018), nous permet d'émettre l'hypothèse que la protéine PII1 soit nécessaire au bon fonctionnement de la partie catalytique (C-ter) de SS4, responsable du contrôle du nombre de grains dans les chloroplastes. La partie N-ter de SS4, responsable du contrôle de la forme des grains d'amidon, restant fonctionnelle en absence de PII1.

Afin de mieux comprendre les liens qui existent entre la protéine PII1 et la SS4 des lignées doubles mutantes *ss4pil1* et *ss3pil1* ont été sélectionnées et caractérisées. Les résultats obtenus sont détaillés dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Partie 2 : Caractérisation des doubles mutants *ss4pii1* et *ss3pii1*.

Les connaissances sur l'implication de PII1 dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon peuvent être améliorées par combinaison de mutations, inhibant différentes protéines impliquées dans l'initiation de la synthèse d'amidon. Ainsi la caractérisation du phénotype amidon de ces lignées doubles mutantes permettra :

- D'observer par comparaison avec les lignées simples mutantes d'éventuelles redondances fonctionnelles.
- D'observer l'action en amont dans le métabolisme de l'amidon d'un facteur protéique sur l'autre.

Le choix des lignées doubles mutantes à analyser, *ss4pii1* et *ss3pii1*, repose sur plusieurs critères :

- Tout d'abord, on sait que PII1 interagit avec SS4. La double mutation pourra nous donner des indications quant au lien métabolique qui existe entre ces deux protéines.
- Ensuite, l'amidon synthase de type 3 a été caractérisée comme étant responsable de la synthèse d'amidon en absence de SS4. L'étude du mutant *ss3pii1* permettrait de vérifier si SS3 est également responsable de la synthèse de l'unique grain d'amidon synthétisé par chloroplaste dans la lignée mutante *pii1*.

Les lignées doubles mutantes sélectionnées ainsi que les différentes références (la lignée sauvage ou les simples mutants) sont représentées dans la figure 41.



Figure 41 : Croissance des différentes lignées doubles mutantes sélectionnées et des témoins correspondants. La photographie a été prise 3 semaines après semis. Les plantes ont été cultivées dans une enceinte de culture 16 h: 8 h, lumière: obscurité. Tous les mutants étudiés ont été obtenus dans le fond génétique Ws.

Les lignées *p11-2*, *ss3-2* ont des profils de croissance semblables à la lignée sauvage de référence. *ss3p11-2* présente une croissance légèrement réduite, mais également comparable au sauvage. Le double mutant *ss4p11-2* présente un phénotype nain légèrement plus marqué que pour le mutant *ss4-2*. Des cinétiques de croissance permettent de confirmer ces observations (figure 41-42).

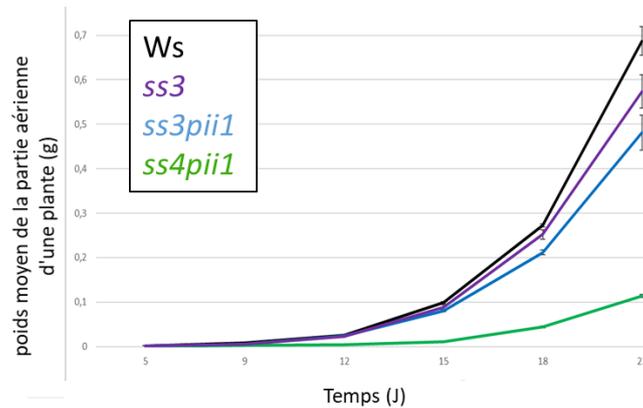


Figure 42 : Cinétique de croissances des lignées double mutantes. Les plantes ont été cultivées dans un phytotron sous 16 h lumière : 8 h obscurité. Le poids moyen des parties aériennes des plantes est représenté en fonction du nombre de jours après la germination. Les barres noires représentent l'erreur standard.

I) Caractérisation de la forme des grains d'amidon et de leur nombre par chloroplaste.

A l'échelle macroscopique, la coloration à l'iode des rosettes permet d'observer la répartition de l'amidon dans les feuilles des différentes lignées étudiées. Aussi, on observe en figure 43, une répartition homogène de l'amidon dans l'ensemble des feuilles de la rosette des lignées *p11-2*, *ss3-2* et *ss3p11-2* de la même façon que pour la lignée sauvage de référence. Comme précédemment décrit, la répartition de l'amidon est hétérogène dans les feuilles du mutant *ss4*. La même distribution, hétérogène, est observée pour la lignée double mutante *ss4p11-2*. On observe que l'ajout de l'inhibition de SS4 à la lignée *p11*, conduit à un phénotype nain encore plus marqué que pour le simple mutant *ss4* ainsi qu'à une répartition hétérogène de l'amidon dans la rosette caractéristique de la lignée *ss4*.



Figure 43 : Coloration à l'iode des différentes lignées étudiées. Les rosettes ont été prélevées à la fin de la période lumineuse (16h) trois semaines après semis. Les rosettes sont décolorées dans un bain d'éthanol 80% chauffé à 70°C. Les rosettes sont ensuite rincées à l'eau puis colorées dans une solution de Lugol. a) Rosettes d'*A. thaliana* colorées à l'iode b) zoom sur *ss4-2* et *ss4pii1-2*. Barre d'échelle = 1cm

Le phénotype amidon des lignées simples mutantes ss4 et pii1 étant décrit en partie 1, seuls les résultats obtenus sur la lignée ss3 seront ajoutés dans la suite de ce manuscrit afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus sur les lignées doubles mutantes ss3pii1 et ss4pii1.

A l'échelle microscopique, la méthode d'analyse par microscopie confocale NegFluo permet l'observation de l'amidon à l'intérieur des chloroplastes (figure 44). Plusieurs grains d'amidon de petite taille sont observés dans les chloroplastes de la lignée *ss3-2* et *Ws*. Un unique grain d'amidon volumineux est accumulé dans la lignée *ss4pii1-2* comparable à ce qui est observé pour *ss4-2*. Ce résultat confirme les observations précédentes, indiquant que la double mutation *ss4pii1* conduit à un phénotype similaire au mutant *ss4*.

La double mutation *ss3pii1-2* présente un phénotype amidon original, distinct de ce qui est observé chez les lignées simples mutantes *ss3* et *pii1*. En effet, il est difficile de décrire la forme des grains observés et également leur répartition dans les chloroplastes. La méthode d'observation des échantillons permet de visualiser les grains d'amidon dans le chloroplaste en trois dimensions (axe Z). Aussi la croix noire entre les deux chloroplastes présentés en figure 44 correspond à un seul grain d'amidon (figure 44). Suivant l'axe Z, on observe une orientation horizontale du grain suivi d'une

orientation verticale. On pourrait décrire sa forme comme celle d'un grain d'amidon type *pii1*, dont les deux extrémités opposées sont repliées vers le centre du grain.

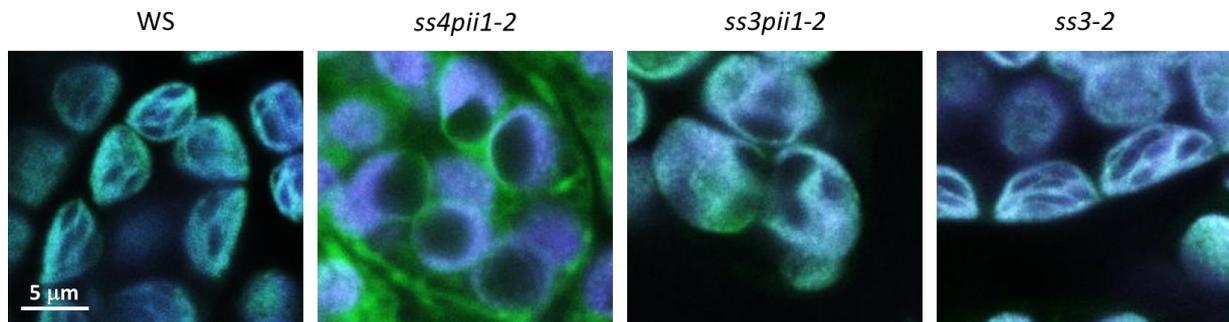


Figure 44 : Images de feuille d'*Arabidopsis thaliana* obtenues par microscopie confocale. Les feuilles ont été prélevées à la fin de la période lumineuse (16h) deux semaines après germination et immédiatement fixées. La caractérisation spectrale des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* nous permet d'obtenir des images par contraste de fluorescence des grains d'amidon. L'amidon apparaît en noir à l'intérieur des chloroplastes bleu-vert. Toutes les images sont à la même échelle.

Les analyses en MEB indiquent que les grains d'amidon extraits des feuilles de la lignée double mutante *ss4pii1* sont de taille et de forme comparables aux grains extraits de la lignée *ss4* (~4µm de diamètre et grain ovoïde). Cette observation est vérifiée avec les deux allèles mutants disponibles, *ss4pii1-1* (fond génétique Col0) et *ss4pii1-2* (fond génétique Ws). La forme caractéristique des grains d'amidon *ss3pii1* précédemment observée par Negfluo est confirmée par la MEB (figure 45).

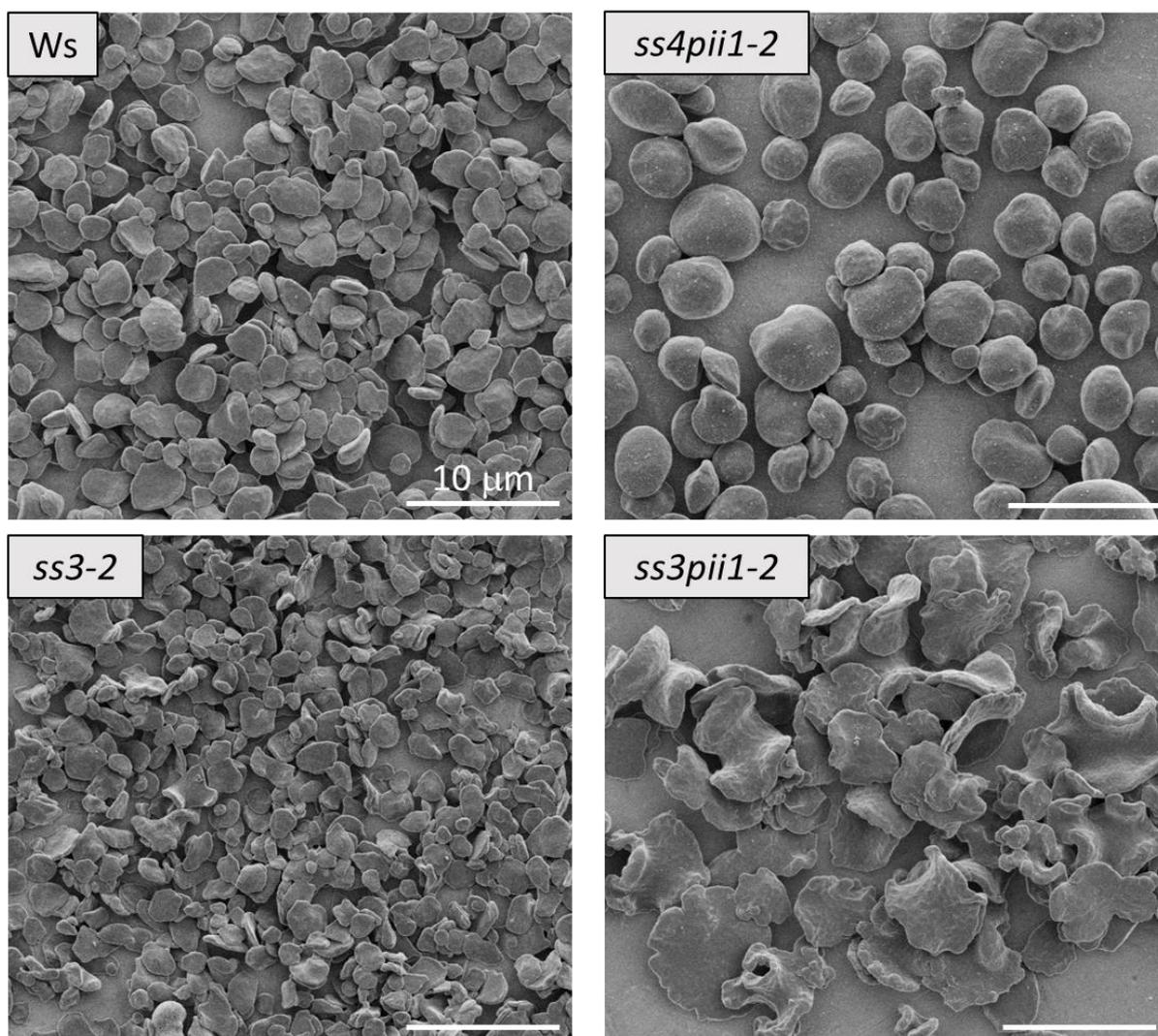


Figure 45 : Caractérisation de la taille et de la forme des grains d'amidon. les clichés obtenus par microscopie électronique à balayage de grains d'amidon extraits et purifiés issus des lignées Ws, ss3-2, ss3pii1-2 et ss4pii1-2. barre d'échelle = 10µm.

II) Détermination de la quantité d'amidon présent dans les feuilles

Les dosages d'amidon réalisés, en fin de jour et en fin de nuit, sur la lignée double mutante *ss4pii1-2* indiquent qu'il y a moins d'amidon en fin de jour et qu'il en reste plus en fin de nuit ce qui est également décrit pour la lignée *ss4-2* (figure 46).

La même expérience, réalisée sur la lignée double mutante *ss3pii1-2*, montre que la lignée double mutante accumule moins d'amidon en fin de jour que la lignée sauvage de référence. Cependant cet amidon est presque entièrement dégradé la nuit ce qui indique

que la lignée *ss3pii1* n'a pas de défaut de dégradation. Ce résultat est comparable à ce qui est décrit pour la lignée simple mutante *ss3*.

En conclusion, les cinétiques de synthèse et de dégradation des lignées double mutante *ss4pii1* et *ss3pii1* suivent celle des lignées simples mutantes dépourvues des amidon-synthases correspondantes.

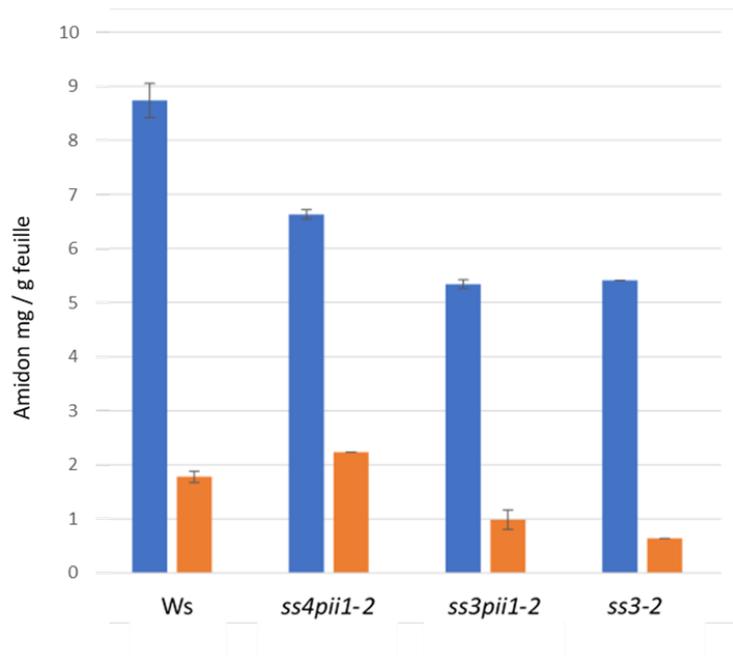


Figure 46 : Dosage d'amidon par quantité de feuilles. Les plantes ont été cultivées dans une enceinte de culture (16 h, jour / 8 h, nuit). Trois semaines après la germination, les feuilles ont été prélevées et l'amidon dosé, en fin de jour (barre bleue), et en fin de nuit (barre orange). Deux cultures indépendantes ont été réalisées et pour chaque culture, trois extractions indépendantes ont été réalisées. Les barres verticales représentent l'erreur standard.

III) Analyse de la composition des grains d'amidon

La séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie d'exclusion stérique, suivie de la coloration à l'iode des différentes fractions obtenues, permet d'obtenir une vue d'ensemble sur le ratio entre ces deux polysaccharides et également sur la structure de l'amylopectine. Ainsi les longueurs d'onde au maximum d'absorption du complexe iode-amylopectine, indiqué en rouge figure 47, sont semblables (~556nm)

pour l'amylopectine extraite des feuilles des mutants *ss4pii1*, *ss3pii1* ou de la lignée sauvage.

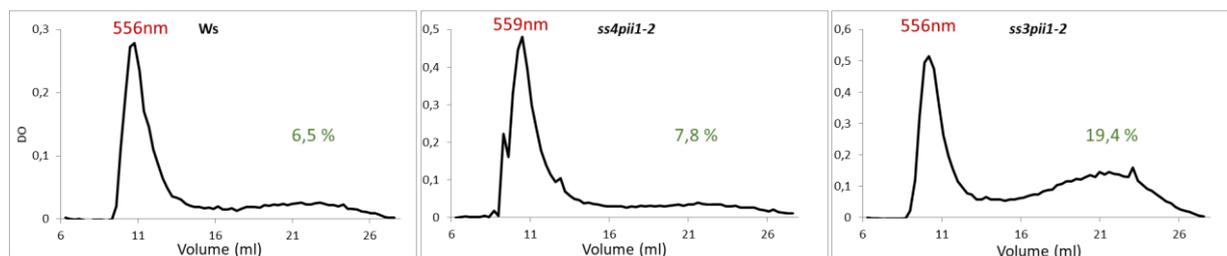


Figure 47 : Profils obtenus après séparation de l'amylose et de l'amylopectine des échantillons d'amidon. La chromatographie d'exclusion stérique est effectuée sur une matrice de sépharose (matrice CL-2B ; colonne de 70 cm de long et de 0,5 cm de diamètre). La courbe noire représente le maximum d'absorbance du complexe iode/polysaccharide mesuré pour chacune des fractions collectées en fonction du volume d'élution. Les fractions, contenant l'amylopectine, sont regroupées et la longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode/amylopectine est indiquée en rouge. Le pourcentage d'amylose, représenté en vert, a été mesuré avec la méthode de précipitation de l'amylopectine à la concanavine A sur trois échantillons d'amidon purifié issus de cultures indépendantes.

Ainsi on ne s'attend pas à un changement important de la structure de l'amylopectine. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse de la distribution en longueur de chaîne des différentes amylopectines réalisée par chromatographie échangeuse d'anion haute performance (figure 48). Les différences observées entre les profils obtenus à partir des amidons des doubles mutants et de la référence sauvage ne sont pas significatives (courbes roses, figure 48). Il est intéressant de noter que les légères variations de profils (>1 point) décrites pour le simple mutant *ss3* ne sont pas observées sur cette analyse.

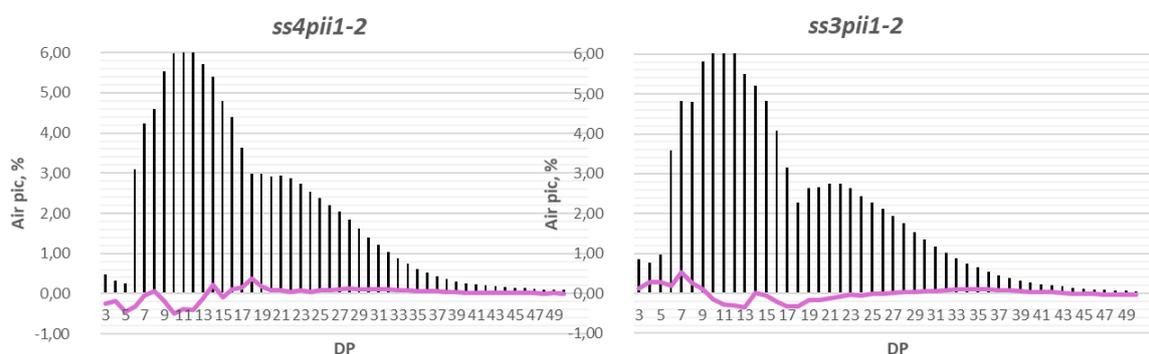


Figure 48 : Analyse de la distribution en longueur de chaînes des polysaccharides purifiés. Les polysaccharides insolubles extraits des différentes lignées (sauvages ou transformées) ont été débranchés. Les glucanes linéaires obtenus sont ensuite analysés par chromatographie d'échange d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée (Dionex®). Cette technique chromatographique permet de séparer les glucanes en fonction de leurs degrés de polymérisation (DP). La

proportion relative de chaque glucane est exprimée en pourcents du nombre total de chaînes. La courbe rose représente la différence entre la distribution de longueur de chaînes du mutant et celle du sauvage.

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique, indique également, un enrichissement en amylose de l'amidon synthétisé par le double mutant *ss3pii1-2*. Les ratios amylose/amylopectine sont déterminés par la méthode de précipitation de l'amylopectine à la concanavaleine A (% vert, figure 47). Trois échantillons d'amidon issus de trois cultures indépendantes ont été dosés par cette méthode. L'efficacité de l'analyse a été vérifiée en utilisant de l'amidon *waxy* (sans amylose), de l'amidon riche en amylose 60%, ainsi que de l'amidon extrait de la lignée sauvage de référence. Bien que, dans les conditions de culture utilisées pour ces expériences, la production d'amylose soit plus faible que ce qui est indiqué dans la littérature, on retrouve l'augmentation d'amylose d'écrite pour la lignée simple mutante *ss3* (% amylose = 11,5%). L'augmentation est encore plus marquée dans le double mutant *ss3pii1*. En effet, dans cette lignée, la quantité d'amylose triple par comparaison à la référence sauvage, avec un pourcentage d'amylose de 19,4% dans l'amidon *ss3pii1-2* contre 6.5% d'amylose contenu dans l'amidon sauvage (figure 47). Les pourcentages d'amylose des amidons produits dans la lignée double mutante *ss4pii1-2* et dans le sauvage *Ws* sont équivalents (~7%).

IV) Etude de l'amidon racinaire

L'étude de l'amidon racinaire permet de faire le lien entre le métabolisme de l'amidon transitoire synthétisé dans les chloroplastes, et l'amidon de réserve des tissus non-photosynthétiques.

L'observation de l'amidon racinaire de la lignée double mutante *ss4pii1* (figure 49), est similaire aux observations faites sur le simple mutant *ss4*. En effet, le phénotype amidon racinaire de *ss4* est très marqué puisque l'amidon n'est pas synthétisé dans les racines latérales. Le mutant *pii1* synthétise de l'amidon dans l'ensemble de ses racines, de la même façon que la lignée sauvage. Le double mutant *ss4pii1* se comporte comme le simple mutant *ss4*, on n'observe pas d'amidon au niveau de ses racines latérales.

L'observation de l'amidon racinaire montre que le double mutant *ss4pii1* à un phénotype similaire au simple mutant *ss4*. Ce phénomène est également démontré précédemment pour l'amidon transitoire synthétisé au niveau de la rosette de la plante. Ce qui constitue un indice allant une faveur d'un mécanisme commun entre l'initiation de l'amidon transitoire et de réserve.

Le double mutant *ss3pii1*, synthétise de l'amidon dans l'ensemble de ses racines ce qui est également le cas des lignées simples mutantes correspondantes (figure 49).

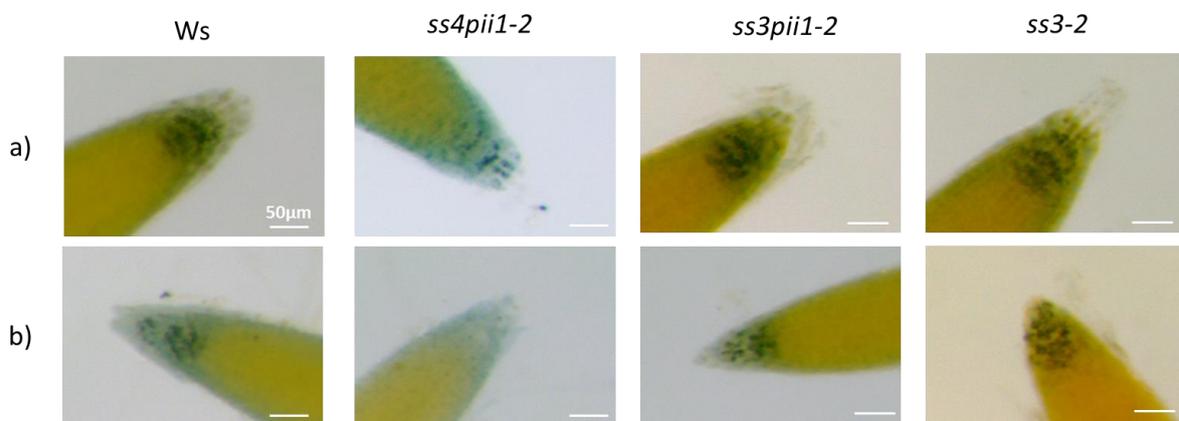


Figure 49 : Coloration à l'iode des racines de plantes cultivées en hydroponie. Les racines de plantes âgées de 2 semaines cultivées avec des systèmes hydroponiques, colorées au lugol et observées sous loupe binoculaire. a) racine primaire. b) racine latérale.

V) Etude complémentaire

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'occasion d'étudier le rôle de PHS1 dans l'initiation de la synthèse d'amidon. Bien que l'analyse des simples mutants dépourvus de PHS1 ne montre pas de phénotype amidon particulier (Zeeman et al, 2004), l'étude de doubles mutants nous renseigne sur un rôle potentiel de PHS1 dans ce processus. Les études menées sur l'amidon transitoire du double mutant *ss4phs1* (au laboratoire ; Malinova et al., 2017), semblent indiquer que la synthèse d'amidon n'est pas restaurée dans l'ensemble des chloroplastes de la rosette bien que la plante ait un phénotype de croissance plus proche du type sauvage que du phénotype nain de *ss4*.

Le mutant *phs1* est capable de synthétiser de l'amidon dans l'ensemble de ses racines. Le mutant *ss4*, de la même façon que décrit précédemment, n'est pas capable de synthétiser de l'amidon dans ses racines latérales. Cependant, la perte de la phosphorylase permet au mutant *ss4* de restaurer la synthèse de son amidon racinaire (figure 50). Ces analyses préliminaires nous permettent d'émettre plusieurs hypothèses :

- PHS1 pourrait dégrader le substrat nécessaire à l'initiation de la synthèse d'amidon dans les racines en absence de SS4.
- PHS1 ne joue peut-être pas le même rôle dans l'initiation de la synthèse de l'amidon au niveau des chloroplastes et des amyloplast.

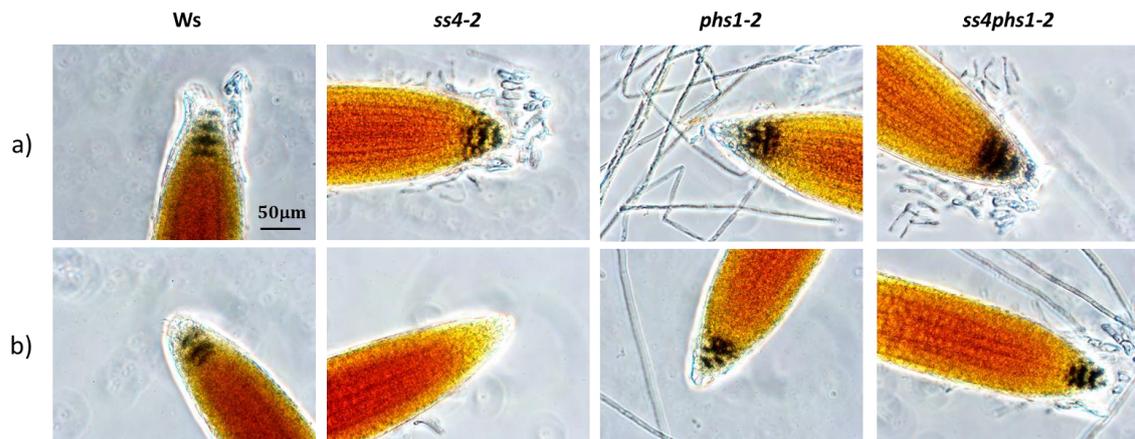


Figure 50 : Coloration à l'iode des racines de plantes cultivées en hydroponie. Les racines de plantes âgées de 2 semaines cultivées avec des systèmes hydroponiques ont été trempées dans du lugol, rincées à l'eau et observées au microscope optique. a) racine primaire. b) racine latérale.

VI) Conclusion

Le tableau suivant résume les phénotypes observés pour les lignées sauvages, *ss3pii1* et *ss4pii1* :

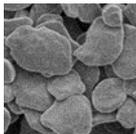
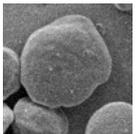
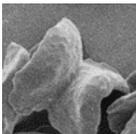
Lignée	Sauvage	<i>ss4pii1</i>	<i>ss3pii1</i>
Croissance de la plante	Normale	Phénotype nain	Normale
Présence d'amidon dans l'ensemble de la feuille	Oui	Non	Oui
Nombre moyen de grains d'amidon par chloroplaste	5 à 7	<1	Variable
Diamètre des grains d'amidon	~1,5µm	~3,5µm	~3,5µm
Forme des grains d'amidon	Plats 	Gonflés 	Atypiques 
Cinétique de synthèse/dégradation d'amidon par feuille	Normale	Type <i>ss4</i>	Type <i>ss3</i>
Structure de l'amylopectine	Normale	Normale	Normale
Ratio amylose/amylopectine	Normale	Normal	Suraccumulation d'amylose
Présence d'amidon dans toutes les racines	Oui	Non	Oui

Tableau 4 : Récapitulatif des phénotypes caractérisés pour les lignées *ss4pii1*, *ss3pii1* comparés à la lignée sauvage.

La lignée *ss4pii1* a été sélectionnée et caractérisée. Les résultats montrent que la double mutation conduit à un phénotype proche du simple mutant *ss4*.

Le phénotype du double mutant *ss3pii1*, quant à lui, est étonnant. En effet, le croisement a été réalisé afin de comparer ces résultats à ceux du mutant *ss3ss4* déjà caractérisé. Le double mutant *ss3ss4* conduit à l'abolition quasi totale de la synthèse d'amidon. *SS3* est donc décrite pour être responsable de la synthèse des grains d'amidon

restant, en absence de SS4. Comme dans la lignée *ss4*, le mutant *p111* n'accumule qu'un grain par chloroplaste. On aurait donc pu s'attendre à ce que les grains résiduels accumulés dans la lignée *p111* soient dépendants de la présence de SS3. Or le mutant *ss3p111* se développe très bien et synthétise de l'amidon de façon homogène dans ses feuilles comme la lignée sauvage, bien que ces grains soient difformes et enrichis en amylose. Cette étude permet d'affirmer que SS3 n'est pas responsable de la synthèse de l'unique grain d'amidon synthétisé par chloroplaste en absence de P111.

L'étude complémentaire réalisée sur le double mutant *ss4p111* permet de montrer l'implication de la phosphorylase dans le processus d'initiation de l'amidon au niveau des racines latérales. Il semble en effet, qu'en absence de SS4, la présence de la phosphorylase inhibe la synthèse d'amidon dans les racines latérales. Il est possible qu'en absence de SS4 (ou de partenaire de SS4), P111 dégrade les précurseurs nécessaires à la synthèse d'amidon dans les racines. Combiner les mutations *ss4* et *p111* permettrait d'empêcher la dégradation de ces précurseurs et ainsi restaurer la synthèse d'amidon dans les racines. Cette hypothèse est consolidée par la description récente de PTST2, une protéine qui interagit avec SS4 et dont la fonction serait de protéger de la dégradation les malto- oligosaccharides impliqués dans l'initiation de la synthèse de nouveaux grains d'amidon (Seung et al., 2017). P111 étant capable de dégrader les malto-oligosaccharides pour libérer du Glc1P (Tickle et al., 2009), on peut formuler l'hypothèse qu'en absence de SS4, PTST2 ne protégerait plus le substrat nécessaire à l'initiation. Ce substrat serait alors dégradé par la phosphorylase. Si dans ce mutant on enlève également la phosphorylase, le substrat n'est plus dégradé et la synthèse d'amidon peut se faire via l'intervention des amidon-synthases.

Discussion et perspectives

1. Le rôle de PII1 dans l'initiation de la synthèse d'amidon

La protéine PII1 est hautement conservée chez les végétaux supérieurs. Elle possède un peptide d'adressage au chloroplaste de 27 acides aminés, prédit sur chloroP. Sa localisation chloroplastique sous forme de « spots » est observée par transformation transitoire de protoplaste avec une séquence permettant la synthèse d'une protéine de fusion PII1-GFP. Cette localisation a également été observée après transformation stable de lignées d'*Arabidopsis* (Seung et al., 2018). L'interaction entre PII1 et SS4, l'amidon-synthase principalement impliquée dans l'initiation, est mise en évidence par un test d'interaction double hybride (hybrigenic) et par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) sur feuilles de tabac. L'implication de PII1 dans le contrôle du nombre et de la taille des grains d'amidon a été clairement établie dans la première partie des résultats de ce manuscrit.

PII1 a été trouvée par co-immunoprécipitation au côté de SS4 et d'autres protéines impliquées dans l'initiation de la synthèse d'amidon (Seung et al., 2018). Parmi celles-ci, on peut citer les protéines d'adressage au grain d'amidon PTST2 et PTST3, possédant un domaine de liaison aux carbohydrates. PII1 (également appelée MRC) et MFP1 y sont également retrouvées. Ces deux protéines se distinguent des enzymes habituellement retrouvées dans le métabolisme de l'amidon. En effet, elles ne possèdent ni site catalytique ni CBM, et sont principalement formées de faisceau d'hélices qui suggèrent davantage un rôle structural/mécanique dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon. MFP1 contrôle la localisation de PTST2 mais un rôle semblable pour PII1 n'a pas été montré. En effet elle n'est ni responsable de la localisation de SS4 ni de celle de PTST2, cependant il est possible qu'elle serve à la sous-localisation d'un autre facteur protéique. La recherche de partenaire protéique de SS4 a permis de mettre en évidence un « complexe d'initiation » dont les différents membres déterminent la morphologie et le nombre de grains d'amidon synthétisés dans les chloroplastes.

Une recherche de nouveaux facteurs protéiques impliqués dans ce processus d'initiation de la synthèse d'amidon, par criblage double hybride ou par co-immunoprécipitation en utilisant la protéine PII1 comme cible, pourrait nous permettre de comprendre plus spécifiquement le rôle de PII1. Elle pourrait également mettre en évidence son implication dans une seconde voie métabolique comme la division

chloroplastique. Cette possibilité permettrait de faire le lien entre le contrôle du nombre de grain d'amidon et la division des chloroplastes (Crumpton-Taylor et al., 2013).

La transcription des gènes codants pour les protéines PTST2 et 3 a été vérifiée dans le mutant *pii1*, du fait de la ressemblance phénotypique de ces lignées mutantes (Seung et al., 2017). Les résultats de RT-PCR montrent que l'absence de PII1 n'a pas d'impact sur la transcription de PTST2 et 3. L'ARNm de SS4 est également présent dans les lignées *pii1-1* et *pii1-2*. On peut conclure de ces résultats que la protéine PII1 n'est pas un régulateur de l'expression de PTST2/3 ni de SS4. Bien qu'une fonction de PII1 dans le processus d'initiation ait été démontrée, la fonction précise de cette protéine n'est pour l'instant pas clairement définie.

L'étude des lignées doubles mutantes *ss3pii1* et *ss4pii1* nous a permis d'obtenir des indices supplémentaires quant au rôle de PII1 dans le processus d'initiation de la synthèse d'amidon :

- Lien métabolique entre SS3 et PII1

L'amidon-synthase soluble de type 3 (SS3) est décrite comme étant principalement responsable de la synthèse de l'amidon en absence de SS4. Or l'analyse de mutant *ss3pii1* nous permet d'affirmer que SS3 n'est pas responsable de la synthèse de l'unique grain d'amidon par chloroplaste présent dans la lignée *pii1*.

Par ailleurs, le mutant *ss3pii1* présente une répartition homogène de son amidon dans l'ensemble de la plante. Une suraccumulation d'amylose davantage marquée que celle décrite dans la lignée simple mutante *ss3* est observée. Cette suraccumulation, combinée à la taille des grains qui augmente due à la mutation *pii1*, peut être responsable de la forme des grains d'amidon observée dans la lignée double mutant *ss3pii1*. Ces travaux peuvent être approfondis notamment par la caractérisation de l'activité de la GBSS en absence de SS3 et PII1.

- Lien métabolique entre SS4 et PII1

L'implication de SS4 dans le processus d'initiation de la synthèse des grains d'amidon est double. De récentes études ont permis de montrer que l'expression de la partie catalytique de SS4 (Cter) ou de son homologue GS d'agrobactéries, dans la lignée mutante *ss4*, permet d'augmenter le nombre de grains synthétisé par chloroplaste mais

ne restaure pas la forme aplatie du type sauvage (Crumpton-Taylor al., 2013 ; Lu et al., 2018). Seul l'ajout de la partie Nter à la partie catalytique de SS4, permet la synthèse de grains de morphologie aplatis. Cependant, sans la fonction catalytique, l'expression dans la lignée *ss4* de la partie Nter de SS4 seule n'a pas d'impact sur le phénotype *ss4*. La localisation de la partie Cter de SS4 est diffuse dans les chloroplastes tandis que la partie Nter est sous localisée dans les chloroplastes sous forme de « spots » (Lu et al., 2018). Un lien entre la localisation de SS4 et le contrôle de la forme des grains d'amidon est ainsi proposé.

Dans la lignée mutante *pil1* on sait que SS4 est toujours sous localisée dans les chloroplastes sous forme de « spots » et que le grain d'amidon synthétisé par chloroplaste est plat. On sait également que l'initiation de l'amidon dans *pil1* est probablement due à SS4 puisque SS3 n'est pas responsable de la synthèse du grain restant chez *pil1*.

Aussi SS4 semble être fonctionnelle dans la lignée dépourvue de la protéine PII1. La partie catalytique de SS4 est cependant capable d'amorcer la synthèse d'un unique grain d'amidon dans l'ensemble des plastides de la plante.

Le facteur protéique PII1 à un champ d'action plus spécifique que l'amidon-synthase de type 4. En effet, il est impliqué dans le contrôle du nombre de grain d'amidon par chloroplastes et de leur taille. Cependant l'absence de PII1 ne compromet pas la synthèse d'amidon qui est réparti de façon homogène dans l'ensemble des feuilles et des coiffes racinaires. Plusieurs caractéristiques dues à la mutation *ss4* telles que le phénotype nain, la suraccumulation d'ADP-Glc, la répartition hétérogène de l'amidon dans l'ensemble de la plante, ne sont pas retrouvées dans le mutant *pil1* qui en ces points se comporte comme la lignée sauvage de référence.

Ainsi, PII1 semble agir spécifiquement sur la capacité de SS4 à contrôler le nombre d'événement d'initiation de l'amidon. On peut émettre l'hypothèse que le facteur protéique PII1 modifie la stabilité d'un complexe protéique incluant PII1, SS4 et d'autres facteurs protéiques impliqués dans ce processus ; ou qu'il modifie la conformation de l'amidon-synthase. La production de PII1 recombinante a été entreprise pendant ma thèse. L'obtention d'information sur la structure de PII1 pourra peut-être nous donner une indication sur sa fonction.

L'hypothèse formulée quant au rôle de PII1, ayant une action ciblée sur la partie catalytique de SS4 sans pour autant la rendre inactive, est renforcée par la caractérisation de la lignée double mutant *ss4pii1* puisque le phénotype amidon de la lignée double mutante est semblable au phénotype *ss4*.

2. Transposition à un nouveau modèle végétal

Le mutant *pii1* présente un intérêt industriel. En effet, la plante possède un rendement équivalent à une lignée sauvage et une taille de grain d'amidon modifiée. Une des thématiques de l'équipe est de créer des lignées mutantes de pomme de terre pour transposer les différents résultats obtenus chez *A. thaliana* vers une plante d'intérêt agronomique. Étudier une lignée mutante *pii1* de pomme de terre permettrait de :

- Savoir si le phénotype *pii1* observé chez *A. thaliana* est transposable chez la pomme de terre (feuille et tubercule).
- Définir le rôle de *pii1* chez un second modèle végétal.
- Evaluer le rôle de PII1 dans la synthèse d'amidon de réserve
- Générer une nouvelle variété de pomme de terre avec des grains d'amidon de taille modifié (méthode de Tilling), ouvrant la voie à de nouvelles applications industrielles.

Bibliographie

- Andriotis, V. M. E., Pike, M. J., Kular, B., Rawsthorne, S., and Smith, A. M. (2010). Starch turnover in developing oilseed embryos. *New Phytol.* 187, 791–804. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03311.x.
- Andriotis, V. M. E., Pike, M. J., Schwarz, S. L., Rawsthorne, S., Wang, T. L., and Smith, A. M. (2012). Altered Starch Turnover in the Maternal Plant Has Major Effects on Arabidopsis Fruit Growth and Seed Composition. *Plant Physiol.* 160, 1175–1186. doi:10.1104/pp.112.205062.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., et al. (2008). Arabidopsis TONNEAU1 Proteins Are Essential for Preprophase Band Formation and Interact with Centrin. *Plant Cell Online* 20, 2146–2159. doi:10.1105/tpc.107.056812.
- Ball, S., Colleoni, C., Cenci, U., Raj, J. N., and 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. doi:10.1093/jxb/erq411.
- Ball, S. G., Subtil, A., Bhattacharya, D., Moustafa, A., Weber, A. P. M., Gehre, L., et al. (2013). Metabolic Effectors Secreted by Bacterial Pathogens: Essential Facilitators of Plastid Endosymbiosis? *Plant Cell* 25, 7–21. doi:10.1105/tpc.112.101329.
- Ball, S. G., Wal, M. H. B. J. Van De, and Visser, R. G. F. (1998). Progress in understanding the biosynthesis of amylose. 3.
- Bertoft, E. (2004). On the nature of categories of chains in amylopectin and their connection to the super helix model. *Carbohydr. Polym.* 57, 211–224. doi:10.1016/j.carbpol.2004.04.015.
- Bertoft, E. (2013). On the Building Block and Backbone Concepts of Amylopectin Structure.
- Bertoft, E. (2017). Understanding {Starch} {Structure}: {Recent} {Progress}. *Agronomy* 7, 56. doi:10.3390/agronomy7030056.
- Blennow, A., Hansen, M., Schulz, A., Jørgensen, K., Donald, A. M., and Sanderson, J. (2003). The molecular deposition of transgenically modified starch in the starch granule as imaged by functional microscopy. *J. Struct. Biol.* 143, 229–241. doi:10.1016/j.jsb.2003.08.009.
- Brewer, L. R., Cai, L., and Shi, Y. C. (2012). Mechanism and enzymatic contribution to in vitro test method of digestion for maize starches differing in amylose content. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4379–4387. doi:10.1021/jf300393m.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* 23, 85–112. doi:10.1016/S0141-8130(98)00040-3.

- Buléon, A., Gallant, D. J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J., et al. (1997). *Starches from A to C. Chlamydomonas reinhardtii as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.* 115, 949–957. doi:10.1104/pp.115.3.949.
- Cai, C., and Wei, C. (2013). In situ observation of crystallinity disruption patterns during starch gelatinization. *Carbohydr. Polym.* 92, 469–478. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.073.
- Cai, C., Zhao, L., Huang, J., Chen, Y., and Wei, C. (2014a). Morphology, structure and gelatinization properties of heterogeneous starch granules from high-amylose maize. *Carbohydr. Polym.* 102, 606–614. doi:10.1016/j.carbpol.2013.12.010.
- Cai, J., Cai, C., Man, J., Zhou, W., and Wei, C. (2014b). Structural and functional properties of C-type starches. *Carbohydr. Polym.* 101, 289–300. doi:10.1016/j.carbpol.2013.09.058.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., et al. (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J.* 37, 853–863. doi:10.1111/j.1365-313X.2003.02012.x.
- Critchley, J. H., Zeeman, S. C., Takaha, T., Smith, A. M., and Smith, S. M. (2001). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 26, 89–100. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01012.x.
- Crumpton-Taylor, M., Pike, M., Lu, K. J., Hylton, C. M., Feil, R., Eicke, S., et al. (2013). Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during *Arabidopsis* leaf expansion. *New Phytol.* 200, 1064–1075. doi:10.1111/nph.12455.
- David L. Topping, Michihiro Fukushima, A. R. B. (2018). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic : state of art.
- Delatte, T., Smith, S. M., Zeeman, S. C., Eicke, S., Umhang, M., Thorneycroft, D., et al. (2006). Evidence for Distinct Mechanisms of Starch Granule Breakdown in Plants. *J. Biol. Chem.* 281, 12050–12059. doi:10.1074/jbc.m513661200.
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., et al. (2005). Soluble starch synthase I: A major determinant for the synthesis of amylopectin in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 43, 398–412. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02462.x.
- Dumez, S., Wattebled, F., Dauvillee, D., Delvalle, D., and Hulst, C. D. (2006). Mutants of *Arabidopsis* Lacking Starch Branching Enzyme II Substitute Plastidial Starch Synthesis by Cytoplasmic Maltose Accumulation. 18, 2694–2709. doi:10.1105/tpc.105.037671.
- Egli, B., Kolling, K., Kohler, C., Zeeman, S. C., and Streb, S. (2010). Loss of Cytosolic Phosphoglucosyltransferase Compromises Gametophyte Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154, 1659–1671. doi:10.1104/pp.110.165027.

- Fernandez, O., Ishihara, H., George, G. M., Mengin, V., Flis, A., Sumner, D., et al. (2017). Leaf Starch Turnover Occurs in Long Days and in Falling Light at the End of the Day. *Plant Physiol.* 174, 2199–2212. doi:10.1104/pp.17.00601.
- Fulton, D. C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C. K., Li, J., Francisco, P., et al. (2008). b-AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active b-Amylases in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell Online* 20, 1040–1058. doi:10.1105/tpc.107.056507.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., and Baldwin, P. M. (1997). Microscopy of starch: Evidence of a new level of granule organization. *Carbohydr. Polym.* 32, 177–191. doi:10.1016/S0144-8617(97)00008-8.
- Gómez-Arjona, F. M., Raynaud, S., Ragel, P., and 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. doi:10.1111/tpj.12633.
- Geigenberger, P. (2011). Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. *Plant Physiol.* 155, 1566–1577. doi:10.1104/pp.110.170399.
- Glaring, M. A., Koch, C. B., and Blennow, A. (2006). Genotype-specific spatial distribution of starch molecules in the starch granule: A combined CLSM and SEM approach. *Biomacromolecules* 7, 2310–2320. doi:10.1021/bm060216e.
- Goren, A., Ashlock, D., and Tetlow, I. J. (2018). Starch formation inside plastids of higher plants. *Protoplasma*, 1–22. doi:10.1007/s00709-018-1259-4.
- Graf, A., Schlereth, A., Stitt, M., and Smith, A. M. (2010). Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night. doi:10.1073/pnas.0914299107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914299107.
- Graf, A., and Smith, A. M. (2011). Starch and the clock: the dark side of plant productivity. *Plant Sci.* 16, 144–146. doi:10.1016/j.tplants.2010.12.003.
- Guo, H., Liu, Y., Li, X., Yan, Z., Xie, Y., Xiong, H., et al. (2017). Novel mutant alleles of the starch synthesis gene TaSSIVb-D result in the reduction of starch granule number per chloroplast in wheat. *BMC Genomics* 18, 1–10. doi:10.1186/s12864-017-3724-4.
- Guyomarc'h, S., Léran, S., Auzon-Cape, M., Perrine-Walker, F., Lucas, M., and Laplaze, L. (2012). Early development and gravitropic response of lateral roots in Arabidopsis thaliana. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367, 1509–1516. doi:10.1098/rstb.2011.0231.
- Hedhly, A., Vogler, H., Schmid, M. W., Pazmino, D., Gagliardini, V., Santelia, D., et al. (2016). Starch Turnover and Metabolism during Flower and Early Embryo Development. *Plant Physiol.* 172, 2388–2402. doi:10.1104/pp.16.00916.
- Helle, S., Bray, F., Verbeke, J., Devassine, S., Szydlowski, N., and Emes, M. J. (2018). Proteome Analysis of Potato Starch Reveals the Presence of New Starch Metabolic Proteins as Well as Multiple Protease Inhibitors. 9, 1–14. doi:10.3389/fpls.2018.00746.

- Hendriks, J. H. M., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., and Geigenberger, P. (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 1 [w]. 133, 838–849. doi:10.1104/pp.103.024513.This.
- Hennen-bierwagen, T. A., James, M. G., and Myers, A. M. (2012). Involvement of debranching enzymes in starch biosynthesis.
- Hennen-bierwagen, T. A., Liu, F., Marsh, R. S., Kim, S., Gan, Q., Tetlow, I. J., et al. (2008). Starch Biosynthetic Enzymes from Developing Maize Endosperm Associate in Multisubunit Complexes 1 [OA]. 146, 1892–1908. doi:10.1104/pp.108.116285.
- Hizukuri, S. (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* 147, 342–347.
- Hwang, S.-K., Koper, K., Satoh, H., and Okita, T. W. (2016). Rice Endosperm Starch Phosphorylase (Pho1) Assembles with Disproportionating Enzyme (Dpe1) to Form a Protein Complex That Enhances Synthesis of Malto-oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M116.735449.
- Jenkins, P. J., Cameron, R. E., and Donald, A. M. (1993). A Universal Feature in the Structure of Starch Granules from Different Botanical Sources. *Starch - Stärke* 45, 417–420. doi:10.1002/star.19930451202.
- Jenkins, P. J., and Donald, A. M. (1995). The influence of amylose on starch granule structure. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 315–321. doi:10.1016/0141-8130(96)81838-1.
- Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 210–218. doi:10.1016/j.pbi.2003.12.001.
- Koornneef, M., Meinke, D., Linne, C., and West, R. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant. 909–921. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04086.x.
- Kotting, O., Pusch, K., Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M., and Ritte, G. (2005). Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase. *Plant Physiol.* 137, 242–252. doi:10.1104/pp.104.055954.
- Kotting, O., Santelia, D., Edner, C., Eicke, S., Marthaler, T., Gentry, M. S., et al. (2009). STARCH-EXCESS4 Is a Laforin-Like Phosphoglucan Phosphatase Required for Starch Degradation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Online* 21, 334–346. doi:10.1105/tpc.108.064360.
- Kunz, H.-H., Zamani-Nour, S., Hausler, R. E., Ludewig, K., Schroeder, J. I., Malinova, I., et al. (2014). Loss of Cytosolic Phosphoglucose Isomerase Affects Carbohydrate Metabolism in Leaves and Is Essential for Fertility of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 166, 753–765. doi:10.1104/pp.114.241091.
- Lefebvre, T., Drougat, L., Stichelen, S. O., and Michalski, J. (2013). Antibodies and Activity Measurements for the Detection of O -GlcNAc Transferase and Assay of its Substrate, UDP-GlcNAc. *Methods Mol. Biol.* 1022, 147–159. doi:10.1007/978-1-62703-465-4.

- Leitz, G., Kang, B.-H., Schoenwaelder, M. E. A., and Staehelin, L. A. (2009). Statolith Sedimentation Kinetics and Force Transduction to the Cortical Endoplasmic Reticulum in Gravity-Sensing Arabidopsis Columella Cells. *Plant Cell Online* 21, 843–860. doi:10.1105/tpc.108.065052.
- Leterrier, M., Holappa, L. D., Broglie, K. E., and Beckles, D. M. (2008). Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: Functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol.* 8, 1–21. doi:10.1186/1471-2229-8-98.
- Liu, F., Zhao, Q., Mano, N., Ahmed, Z., Nitschke, F., Cai, Y., et al. (2016). Modification of starch metabolism in transgenic Arabidopsis thaliana increases plant biomass and triples oilseed production. *Plant Biotechnol. J.* 14, 976–985. doi:10.1111/pbi.12453.
- Lomako, J., Lomako, W. M., and Whelan, W. J. (2004). Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. 1673, 45–55. doi:10.1016/j.bbagen.2004.03.017.
- Lu, K.-J., Pfister, B., Jenny, C., Eicke, S., and Zeeman, S. C. (2018). Distinct Functions of STARCH SYNTHASE 4 Domains in Starch Granule Formation. *Plant Physiol.* doi:10.1104/pp.17.01008.
- Mahlow, S., Orzechowski, S., and Fettke, J. (2016). Starch phosphorylation: insights and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2753–2764. doi:10.1007/s00018-016-2248-4.
- Malinova, I., Alseekh, S., Feil, R., Fernie, A. R., Baumann, O., Schöttler, M. A., et al. (2017). Starch Synthase 4 and Plastidal Phosphorylase Differentially Affect Starch Granule Number and Morphology. *Plant Physiol.* 174, 73–85. doi:10.1104/pp.16.01859.
- Malinova, I., and Fettke, J. (2017). Reduced starch granule number per chloroplast in the dpe2/phs1 mutant is dependent on initiation of starch degradation. *PLoS One* 12, 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0187985.
- Malinova, I., Kunz, H. H., Alseekh, S., Herbst, K., Fernie, A. R., Gierth, M., et al. (2014a). Reduction of the cytosolic phosphoglucosyltransferase in Arabidopsis reveals impact on plant growth, seed and root development, and carbohydrate partitioning. *PLoS One* 9, 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0112468.
- Malinova, I., Mahlow, S., Alseekh, S., Orawetz, T., Fernie, A. R., Baumann, O., et al. (2014b). Double Knockout Mutants of Arabidopsis Grown under Normal Conditions Reveal that the Plastidal Phosphorylase Isozyme Participates in Transitory Starch Metabolism. *Plant Physiol.* 164, 907–921. doi:10.1104/pp.113.227843.
- Meekins, D. A., Vander Kooi, C. W., and Gentry, M. S. (2016). Structural mechanisms of plant glucan phosphatases in starch metabolism. *FEBS J.* 283, 2427–2447. doi:10.1111/febs.13703.
- Neill, C. M. O., Gill, S., Hobbs, D., Morgan, C., and Bancroft, I. (2003). Natural variation for seed oil composition in Arabidopsis thaliana. 64, 1077–1090. doi:10.1016/S0031-9422(03)00351-0.
- Ohdan, T., Francisco, P. B., Nakamura, Y., Satoh, H., Hirose, T., Sawada, T., et al. (2005). Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J. Exp. Bot.* 56, 3229–3244. doi:10.1093/jxb/eri292.

- Orawetz, T., Malinova, I., Orzechowski, S., and Fettke, J. (2016). Reduction of the plastidial phosphorylase in potato (*Solanum tuberosum* L.) reveals impact on storage starch structure during growth at low temperature. *Plant Physiol. Biochem.* 100, 141–149. doi:10.1016/j.plaphy.2016.01.013.
- Palm, C. J., Federspiel, N. A., and Davis, R. W. (2000). DAtA: Database of Arabidopsis thaliana Annotation. 28, 102–103.
- Parker, M. L., Kirby, A. R., and Morris, V. J. (2008). In situ imaging of pea starch in seeds. *Food Biophys.* 3, 66–76. doi:10.1007/s11483-007-9050-7.
- Pfister, B., Lu, K.-J., Eicke, S., Feil, R., Lunn, J. E., Streb, S., et al. (2014). Genetic Evidence That Chain Length and Branch Point Distributions Are Linked Determinants of Starch Granule Formation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 165, 1457–1474. doi:10.1104/pp.114.241455.
- Pfister, B., Sanchez-Ferrer, A., Diaz, A., Lu, K., Otto, C., Sa, A., et al. (2016). Recreating the synthesis of starch granules in yeast. 1–29. doi:10.7554/eLife.15552.
- Pfister, B., and Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2781–2807. doi:10.1007/s00018-016-2250-x.
- Ragel, P., Streb, S., Feil, R., Sahrawy, M., Annunziata, M. G., Lunn, J. E., et al. (2013). Loss of Starch Granule Initiation Has a Deleterious Effect on the Growth of Arabidopsis Plants Due to an Accumulation of ADP-Glucose. *Plant Physiol.* 163, 75–85. doi:10.1104/pp.113.223420.
- Ral, J.-P., Colleoni, C., Wattedled, F., Dauvillée, D., Nempont, C., and Philippe Deschamps, Zhongyi Li, Matthew K. Morell, Ravindra Chibbar, Saul Purton, Christophe d’Hulst, and S. G. B. (2006). Circadian Clock Regulation of Starch Metabolism Establishes GBSSI as a Major Contributor to Amylopectin Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 142, 305–317. doi:10.1104/pp.106.081885.
- Rathore, R. S., Garg, N., Garg, S., and Kumar, A. (2009). Starch phosphorylase: Role in starch metabolism and biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29, 214–224. doi:10.1080/07388550902926063.
- Raynaud, S., Ragel, P., Rojas, T., and Míguez, I. (2016). The N-terminal part of Arabidopsis thaliana starch synthase 4 determines the localization and activity of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 291, 10759–10771. doi:10.1074/jbc.M115.698332.
- Rennie, E. A., Hansen, S. F., Baidoo, E. E. K., Hadi, M. Z., Keasling, J. D., Scheller, H. V., et al. (2012). Three Members of the Arabidopsis Glycosyltransferase. 159, 1408–1417. doi:10.1104/pp.112.200964.
- Roldán, I., Wattedled, F., Mercedes Lucas, M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., et al. (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of Arabidopsis thaliana suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* 49, 492–504. doi:10.1111/j.1365-3113.2006.02968.x.

- Roussel, X., Lancelon-Pin, C., Vikso-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Grimaud, F., Potocki-Véronèse, G., et al. (2013). Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 2167–2177. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.022.
- Scialdone, A., Mugford, S. T., Feike, D., Skeffington, A., Borrill, P., Graf, A., et al. (2013). Arabidopsis plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *Elife* 2013, 1–24. doi:10.7554/eLife.00669.
- Seki, M., Ohara, T., Hearn, T. J., Frank, A., Da Silva, V. C. H., Caldana, C., et al. (2017). Adjustment of the Arabidopsis circadian oscillator by sugar signalling dictates the regulation of starch metabolism. *Sci. Rep.* 7, 1–11. doi:10.1038/s41598-017-08325-y.
- Seung, D., Boudet, J., Monroe, J., Schreier, T. B., David, L. C., Abt, M., et al. (2017). Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH Control Starch Granule Initiation in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell* 29, 1657–1677. doi:10.1105/tpc.17.00222.
- Seung, D., Schreier, T. B., Bürgy, L., Eicke, S., and Zeeman, S. C. (2018). Two plastidial coiled-coil proteins are essential for normal starch granule initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 30, tpc.00219.2018. doi:10.1105/tpc.18.00219.
- Seung, D., Soyk, S., Coiro, M., Maier, B. A., Eicke, S., and 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, 1–29. doi:10.1371/journal.pbio.1002080.
- Slade, A. J., Mcguire, C., Loeffler, D., Mullenberg, J., Skinner, W., Fazio, G., et al. (2012). Development of high amylose wheat through TILLING.
- Smythe, C., and Cohen, P. (1991). The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 200, 625–631. doi:10.1007/BF02307703.
- Stitt, M., and Zeeman, S. C. (2012). Starch turnover: pathways, regulation and role in growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 282–292. doi:10.1016/j.pbi.2012.03.016.
- Streb, S., and Zeeman, S. C. (2012). Starch Metabolism in Arabidopsis. *Arab. B.*, e0160. doi:10.1199/tab.0160.
- Su, S. H., Gibbs, N. M., Jancewicz, A. L., and Masson, P. H. (2017). Molecular Mechanisms of Root Gravitropism. *Curr. Biol.* 27, R964–R972. doi:10.1016/j.cub.2017.07.015.
- Sulpice, R., Flis, A., Ivakov, A. A., Apelt, F., Krohn, N., Encke, B., et al. (2014). Arabidopsis coordinates the diurnal regulation of carbon allocation and growth across a wide range of Photoperiods. *Mol. Plant* 7, 137–155. doi:10.1093/mp/sst127.
- Szydlowski, N., Ragel, P., Hennen-Bierwagen, T. A., Planchot, V., Myers, A. M., Mérida, A., et al. (2011). Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in Arabidopsis leaf starch. *J. Exp. Bot.* 62, 4547–4559. doi:10.1093/jxb/err172.

- Szydlowski, N., Ragel, P., Raynaud, S., Lucas, M. M., Roldan, I., Montero, M., 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. doi:10.1105/tpc.109.066522.
- Takeda, Y., and Hizukuri, S. (1987). Structures of branched molecules of amyloses of various origins, and molar fractions of branched and unbranched molecules. *Carbohydr. Res.* 165, 139–145.
- Tetlow, I. J., Beisel, K. G., Cameron, S., Makhmoudova, A., Liu, F., Bresolin, N. S., et al. (2008). Analysis of Protein Complexes in Wheat Amyloplasts Reveals Functional Interactions among Starch. *Plant Physiol.* 146, 1878–1891. doi:10.1104/pp.108.116244.
- Tian, G., Lu, Q., Zhang, L., Kohalmi, S. E., and Cui, Y. (2011). Detection of Protein Interactions in Plant using a Gateway Compatible Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) System. *J. Vis. Exp.*, 17–19. doi:10.3791/3473.
- Tickle, P., Burrell, M. M., Coates, S. A., Emes, M. J., Tetlow, I. J., and Bowsher, C. G. (2009). Characterization of plastidial starch phosphorylase in *Triticum aestivum* L. endosperm. *J. Plant Physiol.* 166, 1465–1478. doi:10.1016/j.jplph.2009.05.004.
- Toriya, M.-J., Novo, M., Lemassu, A., Wilson, W., Roach, P. J., Franc, J., et al. (2005). Glycogen synthesis in the absence of glycogenin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 579, 3999–4004. doi:10.1016/j.febslet.2005.06.007.
- Toyosawa, Y., Fujita, N., Kumamaru, T., Okazaki, Y., Fukuda, M., Saito, K., et al. (2016). Deficiency of Starch Synthase IIIa and IVb Alters Starch Granule Morphology from Polyhedral to Spherical in Rice Endosperm. *Plant Physiol.* 170, pp.01232.2015. doi:10.1104/pp.15.01232.
- Ugalde, J. E., Parodi, A. J., and A. Ugalde, R. (2003). De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. *pnas* 100, 10659–10663. doi:10.1073/pnas.1534787100.
- Vandromme, C., Spriet, C., Dauvillée, D., Courseaux, A., Putaux, J. L., Wychowski, A., et al. (2018). PIII1: A protein involved in starch initiation that determines granule number and size in Arabidopsis chloroplast. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.15356.
- Wattebled, F., Buléon, A., Bouchet, B., Ral, J., Lienard, L., Ball, S., et al. (2002). Granule-bound starch synthase I A major enzyme involved in the biogenesis of B-crystallites in starch granules. *J. Biochem.* 3820, 3810–3820. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03072.x.
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., et al. (2005). Mutants of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytoglycogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiol.* 138, 184–195. doi:10.1104/pp.105.059295.
- Wattebled, F., Planchot, V., Dong, Y., Szydlowski, N., Pontoire, B., D'Hulst, C., et al. (2008). Further Evidence for the Mandatory Nature of Polysaccharide Debranching for the Aggregation of Semicrystalline Starch and for Overlapping Functions of Debranching Enzymes in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiol.* 148, 1309–1323. doi:10.1104/pp.108.129379.

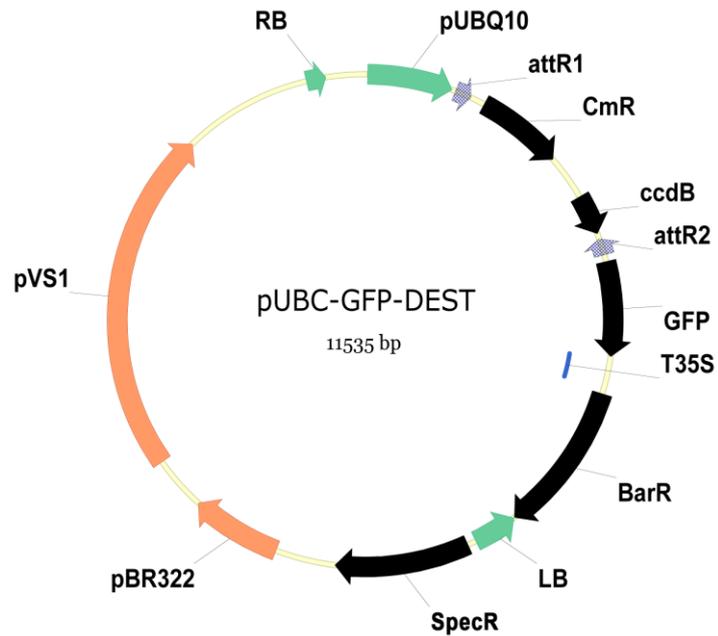
- Weber, A., Servaites, J. C., Geiger, D. R., Kofler, H., Hille, D., Gröner, F., et al. (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12, 787–802. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=139927&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Weise, S. E., Weber, A. P. M., and Sharkey, T. D. (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* 218, 474–482. doi:10.1007/s00425-003-1128-y.
- Wychowski, A., Bompard, C., Grimaud, F., Potocki-Véronèse, G., D’Hulst, C., Wattedled, F., et al. (2017). Biochemical characterization of Arabidopsis thaliana starch branching enzyme 2.2 reveals an enzymatic positive cooperativity. *Biochimie* 140, 146–158. doi:10.1016/j.biochi.2017.07.013.
- Yu, T.-S., Zeeman, S. C., Dunstan, H., Thorncroft, D., Hegemann, B., Smith, A. M., et al. (2005). α -Amylase Is Not Required for Breakdown of Transitory Starch in Arabidopsis Leaves. *J. Biol. Chem.* 280, 9773–9779. doi:10.1074/jbc.m413638200.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., and Smith, A. M. (2002). The priming of amylose synthesis in Arabidopsis leaves. *Plant Physiol* 128, 1069–1076. doi:10.1104/pp.010640.
- Zeeman, S. C., Smith, S. M., and Smith, A. M. (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.* 401, 13–28. doi:10.1042/BJ20061393.
- Zeeman, S. C., Thorncroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., et al. (2004). Plastidial α -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in Arabidopsis Leaves But Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress. *Plant Physiol.* 135, 849–858. doi:10.1104/pp.103.032631.
- Zeeman, S., Kossmann, J., and Smith, A. M. (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 209–234. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112301.
- Zhang, X., Myers, A. M., and James, M. G. (2005). Mutations Affecting Starch Synthase III in Arabidopsis Alter Leaf Starch Structure and Increase the Rate of Starch Synthesis. *Plant Physiol.* 138, 663–674. doi:10.1104/pp.105.060319.
- Zhang, X., Szydlowski, N., Delvallé, D., Hulst, C. D., James, M. G., and Myers, A. M. (2008). Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in Arabidopsis. 18, 1–18. doi:10.1186/1471-2229-8-96.

Annexes

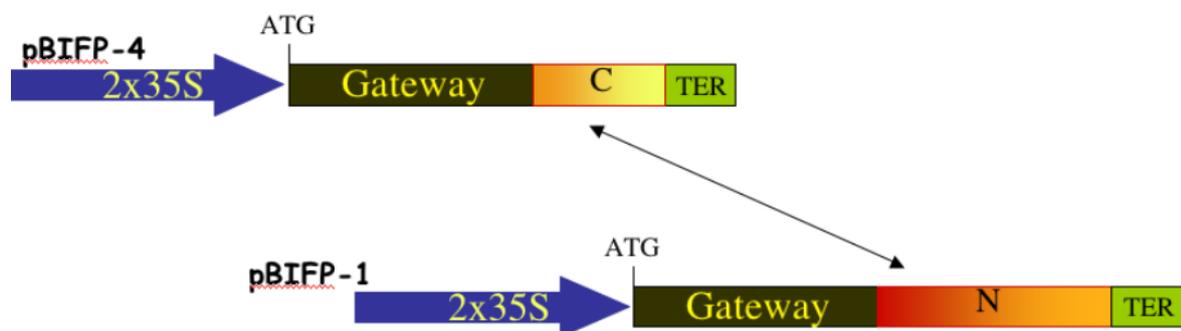
Annexe 1 : Liste les amorces utilisées pour sélectionner les lignées mutantes et pour les RT-PCR : définies sur <http://primer3.ut.ee/>

Protéine	Allèle Amplifié	Amorce a	Amorce b
PII1	WT	PII1-For1: TCTTCCTTGATTTGTTCTCGT	PII1-Rev1 : CAAGCACGCCAAGGTTTGAA
	<i>pii1-1</i>	Lba1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	PII1-Rev1: CAAGCACGCCAAGGTTTGAA
	WT	PII1-For2: TCCAGGGAGCAAATGGAAGA	PII1-Rev2: GGCCTCAATGCTCATGTCAG
	<i>pii1-2</i>	PII1-For2: TCCAGGGAGCAAATGGAAGA	TAG5: CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
SS4	WT	SS4-For1: GTTGTTC AATACCTTCAAATTC C C C	SS4-Rev1: CATTGTAACAACCGTGTC C C C
	<i>ss4-1</i>	SS4-For1: GTTGTTC AATACCTTCAAATTC C C C	GABI1: CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC
	WT	SS4-For2: TGTCGATTTCTGTGTTGGGGTTTG	SS4-Rev2: AATCTGCTCGCCTTCACTTTTG
	<i>ss4-2</i>	SS4-For2: TGTCGATTTCTGTGTTGGGGTTTG	TAG5: CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
SS3	WT	SA 325 CATCACATCCTCTCCTTTCTCGT	SA 350 TCTTGCTCCATCACCGTCTT
	<i>ss3-1</i>	SA 325 CATCACATCCTCTCCTTTCTCGT	Lba1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
	WT	SS3 FOR1 GTTCCTTTATTTGCTGTGCGTATT	SS3 REV1 CTTGAGCTTGTGCCCTTTCTTTAT
	<i>ss3-2</i>	TAG5: CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	SS3 REV1 CTTGAGCTTGTGCCCTTTCTTTAT
PHS1	WT	Pho1-For1-Wisc GGAGTAACACCAAGGCGATG	Pho1 Rev2 TACTCTGAAACAATTGTGCGAACT
	<i>Phs1-1</i>	Pho1-For1-Wisc GGAGTAACACCAAGGCGATG	Wisc-LB2 CCAGTACTAAAATCCAGATCCCC
	WT	Pho1 For1 TTAGATTGCTTCGTGCTTTACCC	Pho1 Rev2 TACTCTGAAACAATTGTGCGAACT
	<i>Phs1-2</i>	Pho1 For1 TTAGATTGCTTCGTGCTTTACCC	TAG5: CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
PTST2	WT	PTST2-for: GCAGTAGAGGCTCAGGTGAA	PTST2-rev: CAACCGTCAAATGAACCCGT
PTST3	WT	PTST3-for: GGAGACAGTCTTGAGGTCC	PTST3-rev: GTTATCCATTGCCGTCAC

Annexe 2 : Carte du vecteur utilisé pour l'expression de PII1-GFP et SS4-GFP



Annexe 3 : Vecteurs utilisé pour la BiFC



(Azimzadeh et al., 2008).

Annexe 4 : Séquence de PII1 avec les 27 acides aminés de peptide d'adressage au chloroplaste prédit par ChloroP (en vert).

MGFSQAIRLNLASFSSPSPCDYCLTRVNVNHKQKSLVAFPSITRRKRHLLLSVQSVLHNTRPNIND
NGSAESANVLFDKLFARTHRLERQTNQHSVYPDDDDLPYSNLGVLESLEAALVALLKREEDL
HDAERKLLSDKNKLNRAKEELEKREKTISEASLKHESLQEELKRANVELASQAREIEELKHKLR
ERDEERAALQSSLTLKEEELEKMRQEIANRSKEVSMAlSEFESKSQLLSKANEVVKRQEGEiyAL
QRALEEKEEELEISKATKKLEQEKLRETEANLKKQTEEWLIAQDEVNKLKEETVKRLGEANET
MEDFMKVKLLTDVRFELISSREALVFSREQMEEKELLEKQLEEELEQRKSVLSYMQSLRDA
HTEVESERVKLRVVEAKNFALEREISVQKELLEDLREELQKEKPLLELAMHDISVIQDELYKKA
NAFQVSQNLQEKESLVEAKLEIQHLKSEQASLELLLQEKDEELAEARNKLGEVNQEVTELKA
LMISREDQLMEATEMLKEKDVHLHRIEGELGSSKLVTEAEMVVERIAELTNRLLMSTTNGQN
QNAMRINNEISIDSMQPLEKPHDDYGMENKRLVMELSFTRENLRMKEMEVLAVQRALTFK
DEEINVVMGRLEAKEQELKKLKEETINDSEDLKVLYALAQERVGEKTMGDLAIEMLQLEAANL
EVEAATSALQKLAKMSTELLTQADMSIEADTTHTVMPERGYSEGSNECLGEVKTEVVRLWSLT
EKLEENAGIVAGTSTCMEGVIL

PII1: a protein involved in starch initiation that determines granule number and size in *Arabidopsis* chloroplast

Camille Vandromme¹, Corentin Spriet¹, David Dauvillée¹, Adeline Courseaux¹, Jean-Luc Putaux², Adeline Wychowski¹, Frédéric Krzewinski¹, Maud Facon¹, Christophe D'Hulst¹  and Fabrice Wattebled¹ 

¹Univ. Lille, CNRS, UMR8576 – UGSF – Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France; ²Université Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV,

F-38000 Grenoble, France

Summary

Author for correspondence:

Fabrice Wattebled

Tel: +33 320434881

Email: fabrice.wattebled@univ-lille.fr

Received: 30 May 2018

Accepted: 17 June 2018

New Phytologist (2018)

doi: 10.1111/nph.15356

Key words: *Arabidopsis*, PII1, SS4, starch, starch granule size, starch initiation, starch priming.

- The initiation of starch granule formation is still poorly understood. However, the soluble starch synthase 4 (SS4) appears to be a major component of this process since it is required to synthesize the correct number of starch granules in the chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* plants.
- A yeast two-hybrid screen allowed the identification of several putative SS4 interacting partners. We identified the product of *At4g32190* locus as a chloroplast-targeted PROTEIN INVOLVED IN STARCH INITIATION (named PII1).
- *Arabidopsis* mutants devoid of PII1 display an alteration of the starch initiation process and accumulate, on average, one starch granule per plastid instead of the five to seven granules found in plastids of wild-type plants. These granules are larger than in wild-type, and they remain flat and lenticular. *pri1* mutants display wild-type growth rates and accumulate standard starch amounts. Moreover, starch characteristics, such as amylopectin chain length distribution, remain unchanged.
- Our results reveal the involvement of PII1 in the starch priming process in *Arabidopsis* leaves through interaction with SS4.

Introduction

Starch is the main storage polysaccharide produced by plants. It accumulates as water-insoluble semi-crystalline granules in the chloroplast of photosynthetic organ cells or in the amyloplasts of storage organ cells (potato tubers, endosperm of cereal seeds). Starch is a mix of two structurally distinct α -glucan polymers, amylose and amylopectin, in which glucose residues are linked in $\alpha(1\rightarrow4)$ and branched in $\alpha(1\rightarrow6)$. Amylopectin, the major fraction of starch, is moderately branched, containing up to 6% of $\alpha(1\rightarrow6)$ linkages, whereas the frequency of branching of amylose is much below 1% (Hizukuri *et al.*, 1981; Manners, 1989; Buléon *et al.*, 1998).

Starch synthesis is a complex process that implies tens of proteins, enzymatically active or not, and each step is catalyzed by several genetically independent isoforms (D'Hulst *et al.*, 2015). For instance, up to five starch-synthases catalyze the elongation of the α -glucan polymers by transferring the glucose residue from adenosine diphosphate (ADP)-glucose to the nonreducing end of the molecules (Abel *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1999; Delvallé *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005, 2008; Crofts *et al.*, 2017). The formation of the branch points and the control of their distribution in amylopectin is monitored by up to three branching enzymes that create $\alpha(1\rightarrow6)$ bonds (Schwall *et al.*, 2000; Blauth *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2004; Dumez *et al.*,

2006; Nakamura *et al.*, 2010; Regina *et al.*, 2010; Tetlow, 2012) and by debranching enzymes (isoamylases and pullulanase) that hydrolyze some of them (Mouille *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 2000; Delatte *et al.*, 2005; Wattebled *et al.*, 2005, 2008; Streb *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2017). This process induces the formation of a cluster-like structure of amylopectin responsible for its specific physicochemical properties (Pfister & Zeeman, 2016).

A major current challenge is to understand how the activity of these enzymes is controlled to generate new starch granules. It is now well established that enzymes such as branching enzymes and starch synthases are engaged in hetero-multimeric complexes (Tetlow *et al.*, 2004, 2008; Hennen-Bierwagen *et al.*, 2008, 2009; Ahmed *et al.*, 2015; Crofts *et al.*, 2015). However, the regulation of the formation of these complexes remains to be elucidated, even if it is strongly suspected that the protein phosphorylation state is a key factor controlling protein–protein interaction (Liu *et al.*, 2009, 2012; Makhmoudova *et al.*, 2014; Subasinghe *et al.*, 2014). Moreover, an increasing number of noncatalytic proteins have been described as being involved in starch metabolism, with functions that are essential for correct starch synthesis or degradation (Seung *et al.*, 2015, 2017; Feike *et al.*, 2016).

One step of starch synthesis that remains poorly understood is the initiation of granule formation. This process is of prime importance, since it defines, *in fine*, the number, the size, and the

morphology of the starch granules. *Arabidopsis* accumulates on average five to seven starch granules per plastid in mature leaves. This number is rather constant, implying a finely tuned regulation *in planta*, and depends on the chloroplast volume (Crumpton-Taylor *et al.*, 2012, 2013). It has been shown that starch synthase 4 (SS4) is a major factor affecting the priming of starch synthesis. *Arabidopsis ss4* mutants accumulate one (sometimes none, rarely two) starch granule(s) per chloroplast (Roldán *et al.*, 2007). Interestingly, this reduction in the number of starch granules per plastid is accompanied by a modification of their shape. Wild-type (WT) granules are generally flat and lenticular, with a diameter of 1–2 μm . Starch granules in the *ss4* mutant are larger (3–5 μm) and spheroidal (Roldán *et al.*, 2007). The synthesis of the unique granule in the *ss4* mutant depends on the presence of another starch synthase: SS3. Indeed, starch synthesis collapses in the *ss3 ss4* double mutant (Szydłowski *et al.*, 2009) and the synthesis of one starch granule observed in a few chloroplasts is probably due to stochastic initiation events (Crumpton-Taylor *et al.*, 2013).

SS4 is a protein composed of two distinct domains. The C-terminal moiety of the protein corresponds to the glycosyltransferase 5 (GT5) domain of the CAZy classification that is shared by all starch synthases (Coutinho *et al.*, 2003). The N-terminal half of the protein is specific to SS4 and is essentially composed of coiled-coil motifs (Leterrier *et al.*, 2008; Gámez-Arjona *et al.*, 2014). These two domains have specific functions in granule formation. While the C-terminal part of the protein determines the number of initiation events, the N-terminal moiety is involved in protein localization and controls granule shape (Lu *et al.*, 2018). Indeed, SS4 is not evenly distributed within the chloroplast but is associated with plastoglobules, where it has been described as interacting with fibrillins 1 (Gámez-Arjona *et al.*, 2014; Raynaud *et al.*, 2016). It was also reported that SS4 interacts with itself and with PTST2, a noncatalytic protein that, together with PTST3, was proposed to deliver a substrate allowing SS4 to initiate starch granule formation (Seung *et al.*, 2017).

In this article, we report on the identification of a new protein that physically interacts with SS4 and is involved in starch priming. This protein was named PIII for 'Protein Involved in starch Initiation' (*At4g32190*). Mutants lacking PIII have a smaller number, however larger, starch granules compared with the WT. The observed phenotype is not a strict phenocopy of that of the *ss4* mutant, because plant growth and starch granule morphology are unaltered in the *pii1* mutant compared with the WT. Our results indicate that PIII interacts with SS4 and is required for proper starch priming. The significance of the interaction between PIII and SS4 in the regulation of the initiation event is discussed.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

The ULTimate Y2H™ was carried out by Hybrigenics-services (Paris, France) using SS4 as bait (amino acids 43–1040) against a library prepared from 1-wk-old seedlings. Among 125 million

interactions tested, 369, corresponding to 80 different proteins, were positive. Using the CHLOROP algorithm prediction (Emanuelsson *et al.*, 1999), we were able to select proteins with predicted chloroplast-targeting peptides. We ended-up with six candidates, among which PIII (*At4g32190*) was selected (Supporting Information Table S1). Hybrigenics-services provides interaction results associated with a predicted biological score (PBS). This score indicates the interaction reliability and is divided into six different classes (A–F): A, very high confidence in the interaction; B, high confidence in the interaction; C, good confidence of interaction; D, moderate confidence of interaction; E, interaction involving highly connected prey domains (this class is subjected to nonspecific interactions); and F, experimentally proven artifacts.

Arabidopsis thaliana lines were obtained from NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre; <http://Arabidopsis.info>; Alonso *et al.*, 2003) or from the collection generated at URGV (INRA of Versailles; Samson *et al.*, 2002). Wassilewskija (Ws) and Columbia (Col-0) lines were used as WT references. The transfer DNA (T-DNA) insertion lines used are *pii1-1* (SALK_122445), *pii1-2* (FLAG_137A02), *ss4-1* (GABI_290D11), and *ss4-2* (FLAG_559H08). Both *pii1-1* and *ss4-1* are in Columbia genetic background, whereas *pii1-2* and *ss4-2* were generated in Ws genetic background. The *ss4* alleles were already described in Roldán *et al.* (2007). The oligonucleotides used for selection and reverse transcription (RT)-PCR experiments are described in Table S2. Following homozygous plant selection, self-pollination was applied to obtain sufficient seeds for experimentation.

Depending on experiments, plants were grown either in a glasshouse (16 h : 8 h, light : dark photoperiod at 23°C during the day and 20°C during the night, 150 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$) or in a growth chamber (16 h : 8 h, light : dark photoperiod at 23°C during the day and 20°C during the night, 120 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Seeds were incubated at 4°C in 0.1% Phytigel™ solution (w/v) for 3 d before being sown on peat-based compost.

The selection of homozygous mutant lines was performed by PCR amplification on genomic DNA according to standard procedures described in Wattedled *et al.* (2008). RNA was extracted from leaves harvested at the middle of the light phase using a Nucleospin RNA plant kit from Macherey–Nagel following the manufacturer's instructions. A 500 ng sample of RNA was used to complete RT-PCR amplification using the One-Step RT-PCR kit from Qiagen. To ensure that RNA extraction was correctly performed and devoid of DNA, we amplified, as a negative control, template without the step of retro transcription. Detailed primer sequences are listed in Table S2.

The analysis of starch accumulation in roots was performed on plants grown under hydroponic conditions. The seeds were sterilized in 75% ethanol and stratified at 4°C for 3 d. Seeds were then deposited on the Seedholder (Araponics®) completed with Murashige and Skoog medium and 0.8% plant agar (Duchefa Biochemie, Haarlem, the Netherlands). Roots develop in a culture solution (1.1 mM magnesium sulfate, 2 mM potassium nitrate, 805 μM calcium nitrate, 695 μM monopotassium phosphate, 60 μM dipotassium phosphate, 20 μM iron(II) sulfate,

20 μM disodium EDTA, 9.25 μM boric acid, 3.6 μM manganese chloride, 74 nM ammonium heptamolybdate, 3 μM zinc sulfate, 785 nM copper sulfate), and pH is adjusted to 5.8. After 2 wk of growth, plant roots were collected and stained with iodine. Roots were observed under a phase-contrast microscope ($\times 20$ Plan fluor, NA = 0.45, objective) and subsequently photographed.

Protoplasts preparation and transformation

SS4 and PII1 complementary DNAs (cDNAs) were cloned in a Gateway entry vector following the manufacturer's instructions (pENTRTM directional TOPO[®] cloning kit, Invitrogen). Using LR clonase (Gateway[®] LR clonaseTM II enzyme mix, Invitrogen), cDNAs were transferred in the destination vector pUBC-GFP-Dest allowing expression of the protein fused to green fluorescent protein (GFP; Grefen *et al.*, 2010).

Arabidopsis protoplasts were isolated from 2-wk-old plants grown on Murashige and Skoog agar (1.2%) medium. Leaves were cut in 15 ml of 500 mM mannitol. After mannitol removal, preparations were incubated without shaking overnight in darkness at room temperature in enzyme solution (400 mM mannitol, 5 mM MES, 1 M calcium chloride, 1% (w/v) cellulase Onozuka R10, 0.25% (w/v) Macerozyme R10 at pH 5.6). Protoplasts were filtered through two layers of Miracloth (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA), centrifuged during 5 min at 50 g in a swing-out rotor at room temperature. Protoplasts were resuspended in 5 ml of W5 solution (154 mM sodium chloride, 125 mM calcium chloride, 5 mM potassium chloride, 5 mM glucose, 1.5 mM MES, pH 5.6). A 2.5 ml sample of protoplasts was deposited on 6 ml 21% sucrose solution and centrifuged 10 min at 50 g . The intact protoplasts that accumulated on the sucrose surface were resuspended in 0.3 ml of MaMg solution (0.4 M mannitol, 15 mM MgCl_2 , 5 mM MES, pH 5.6). Transformation was performed using 50 μg of plasmid DNA and 50 μg salmon sperm DNA used as sheared carrier DNA. Transfection buffer, 325 μl , was immediately added (40% (w/v) polyethylene glycol 4000, 0.4 M mannitol, 0.1 M calcium nitrate, pH 7–8). Protoplasts were incubated for 30 min in darkness, washed in 10 ml of W5 solution, centrifuged 5 min at 50 g at room temperature, and resuspended in 2 ml of W5 solution. Protoplasts were observed, 48–72 h after transformation, under a video microscope (Leica AF6000LX) with a Plan Apo $\times 100$ oil (NA = 1.4) objective. We have observed protein expression with $\lambda_{\text{ex}} = 484\text{--}500$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 514\text{--}554$ nm (green channel), and protoplasts autofluorescence with $\lambda_{\text{ex}} = 564\text{--}586$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 602\text{--}662$ nm (red channel).

Determination of starch granule number per chloroplast

One leaf of 2-wk-old plants grown under 16 h : 8 h, light : dark photoperiod in a growth chamber was harvested at the end of the light phase and placed under vacuum in 1 ml fixating solution (4% (w/v) paraformaldehyde, 4% (w/v) sucrose, 1 \times phosphate-buffered saline at pH 7.3). The leaf was then deposited between a microscope slide and coverslip. Samples were observed under an A1 Nikon confocal microscope (Nikon Instruments Europe BV,

Amsterdam, Netherlands) with a Plan Apo $\times 60$ oil (NA = 1.4) objective. Autofluorescence was acquired with $\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 500\text{--}550$ nm (green channel), and with $\lambda_{\text{ex}} = 561$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 570\text{--}620$ nm (purple channel).

Polysaccharide extraction and purification

After 3 wk of culture in a growth chamber, Arabidopsis leaves were harvested at the end of the day or at the end of the night. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Depending on the subsequent analysis, two different extraction methods were performed.

For polysaccharide quantification we used a perchloric acid method (adapted from Delatte *et al.*, 2005): *c.* 0.3 g of leaves was homogenized with a Polytron blender in 5 ml of 1 M perchloric acid. The crude lysate was centrifuged at 4500 g for 10 min at 4°C to separate the pellet, which contains starch, and the supernatant containing the glucose and water-soluble polysaccharides. The pellet was rinsed three times with sterile deionized water and resuspended in 1 ml water before quantification.

To determine starch granule size, polysaccharides chain length distribution (CLD) profile, and to perform scanning electron microscopy, starch was extracted as follows. Approximately 5 g of fresh material was homogenized using a Polytron blender in 30 ml of the following buffer: 100 mM 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid, pH 7.2; 5 mM EDTA; 10% (v/v) ethylene glycol. The homogenate was filtered through two layers of Miracloth (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA) and centrifuged for 15 min at 4°C and 4000 g . The pellet was resuspended in 2 ml Percoll 90% (v/v) and centrifuged for 40 min at 4°C and 10 000 g . The starch pellet was washed with sterile distilled water (10 min at 4°C and 10 000 g) and one time with 80% ethanol. Starch was finally stored at 4°C in 20% ethanol.

Granule size distribution and scanning electron microscopy

Purified starch granules were dispersed in 20 ml of IsoFlow Sheath (Beckman Coulter) and analyzed in a Multisizer 4 Coulter counter (Beckman Coulter Life Science, Indianapolis, IN, USA) with a 20 μm aperture tube. The MULTISIZER software was set to determine the size of 30 000 particles ranging from 1 to 6 μm . Three hundred bins are logarithmically spaced between 1 and 6 μm (*x*-axis) and the size frequency distribution was expressed as a relative percentage of total amount (*y*-axis).

For scanning electron microscopy observation, drops of dilute aqueous suspensions of purified starch granules were deposited on a piece of glow-discharged copper tape and allowed to dry. The specimens were coated with gold–palladium, and secondary electron images were recorded with an FEI Quanta 250 scanning electron microscope equipped with a field emission gun and operating at 2 kV.

Starch content and ultrastructure

Leaves of 3-wk-old plants were collected at the end of the day or at the end of the night and immediately frozen. Starch was

extracted from 0.3 to 0.5 g of leaves by the perchloric acid method described earlier. Starch content was determined by a spectrophotometric method following the manufacturer's instructions (Enzytec™; R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). For each genotype, three independent cultures were performed. For each culture, three different samples were collected (each sample contains leaves from three plants).

Therefore, for each genotype, a mean and a standard error were calculated from nine different values (eight values for Col-0). A two-tailed *t*-test was applied to compare mutant lines with their respective WT.

The polysaccharide CLD profile was determined on purified starch granules as described in Boyer *et al.* (2016). A 1 mg sample of purified starch was debranched with a mix of 4 U isoamylase (*Pseudomonas* sp., megazyme) and 2 U pullulanase (*Klebsiella planticola*, megazyme) in sodium acetate buffer (55 mM, pH 3.5) for 12 h at 42°C. After desalting (Grace™ Alltech™ Extract-Clean™ CarboGraph columns) and lyophilization, samples were suspended in 300 µl of deionized water. CLD was determined by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection analysis (Dionex® ICS-300 – PA200 CarboPac column 250 mm × 3 mm, Thermo Fisher, Sunnyvale, CA, USA) as fully described in Roussel *et al.* (2013).

Additional material and methods

Methods S1 describes the methods used for bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and ADP-glucose measurement.

Results

Selection of *pii1* lines

SS4 is a major protein involved in starch initiation. To identify other members of the starch-priming complex, proteins that potentially interact with SS4 were identified by a yeast two-hybrid screen. An ULTIMate Y2H™ was carried out by Hybrigenics-services (Paris, France) using SS4 as bait (amino acids 43–1040) against a library prepared from 1-wk-old seedlings. Among 125 million interactions tested, 369, corresponding to 80 different proteins, were positive. During this screen, SS4 was identified in the prey proteins, confirming that it is able to interact with itself and validating the approach. Using CHLOROP algorithm prediction (Emanuelsson *et al.*, 1999) on SS4-interacting candidates, we have selected proteins with predicted chloroplast-targeting peptides. Among six SS4-interacting selected candidates having a predicted chloroplast-targeting peptide (Table S1), we have identified the PII1 protein (*At4g32190*). For each interaction identified during the screen a PBS was given. This score indicates the reliability of the identified interaction and ranges from A (very high confidence of the interaction) to F (experimentally proven artifacts). The protein encoded by the gene *At4g32190* displayed a PBS of 'C' corresponding to a 'good confidence of interaction'. Indeed, SS4 used as bait was found to interact with five yeast clones expressing different fragments of the prey protein. An *in vivo* interaction between SS4 and PII1 was also observed by BiFC

experiments. Tobacco plants were transformed to allow the transient coexpression of SS4 and PII1. Each protein was fused to a moiety of yellow fluorescent protein. The fluorescence corresponding to yellow fluorescent protein reconstitution reveals the proximity of SS4 and PII1 in tobacco chloroplasts (Fig. S1).

To determine the biological significance of the potential interaction between this protein and SS4, we have engaged a phenotypic analysis of lines impaired in the corresponding gene. Two Arabidopsis lines with T-DNA insertion within *At4g32190* gene were obtained from the NASC resource center. Lines N679037 and 137A02 were in Col-0 and Ws genetic backgrounds respectively. After selection of homozygous lines, we have evaluated *At4g32190* messenger RNA integrity by RT-PCR (Fig. 1). In both cases the RNA integrity is compromised by the T-DNA insertion. In line N679037, the insertion is located within the 5' untranslated region (three nucleotides before the ATG codon), whereas in line 137A02 the T-DNA is inserted in the second exon. The two mutant alleles were named *pii1-1* (Col-0 background) and *pii1-2* (Ws background) respectively.

Even if PII1 is annotated as a 'myosin heavy chain-related protein' in databases, no function has been reported for this protein. Analysis performed using the MARCOIL server (Delorenzi & Speed, 2002; Zimmermann *et al.*, 2017) indicates that PII1 is composed of several coiled-coil domains. Considering only the amino acids that have a probability above 50% to be involved in a coiled-coil motif, four distinct domains are identified (regions 106–331, 340–426, 448–529 and 629–723). Altogether, these motifs represent > 60% of the protein sequence. The coiled-coil motifs are known to favor protein–protein interaction (Adamson *et al.*, 1993), and interestingly, it has already been reported that SS4 also contains such motifs (Leterrier *et al.*, 2008). The expression of PII1 in the different plant tissues was followed using the Arabidopsis eFP browser (http://bar.utoronto.ca/efp_arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi; Winter *et al.*, 2007). The gene is expressed at high level in all photosynthetic tissues (Schmid *et al.*, 2005), and preferentially at the transition between dark to light, when starch synthesis is initiated (Smith *et al.*, 2004; Blasing *et al.*, 2005). The expression of PII1 in roots is very low whatever the cell type, the highest value being recorded for columella cells (Brady *et al.*, 2007).

The Phytozome server allowed the identification of Arabidopsis PII1 homologs in other dicots, such as *Solanum tuberosum* (XP_006344374), and in monocots (e.g. *Brachypodium distachyon* XP_010233922; *Oryza sativa*: XP_015627751; *Zea mays*: XP_008679905). Homologs can also be found in lycopodiophytes (*Selaginella moellendorffii*: XP_002983651), but no protein similar to PII1 was identified in bryophytes (*Physcomitrella patens*) or green algae, such as *Chlamydomonas reinhardtii* or *Ostreococcus lucimarinus*. Interestingly, no clear homologs of SS4 can be found in these green algae, indicating that a coevolution of PII1 and SS4 may have occurred.

Intracellular localization of the PII1 protein

At4g32190 encodes a protein of 783 amino acids. Use of CHLOROP software (Emanuelsson *et al.*, 1999) predicts a

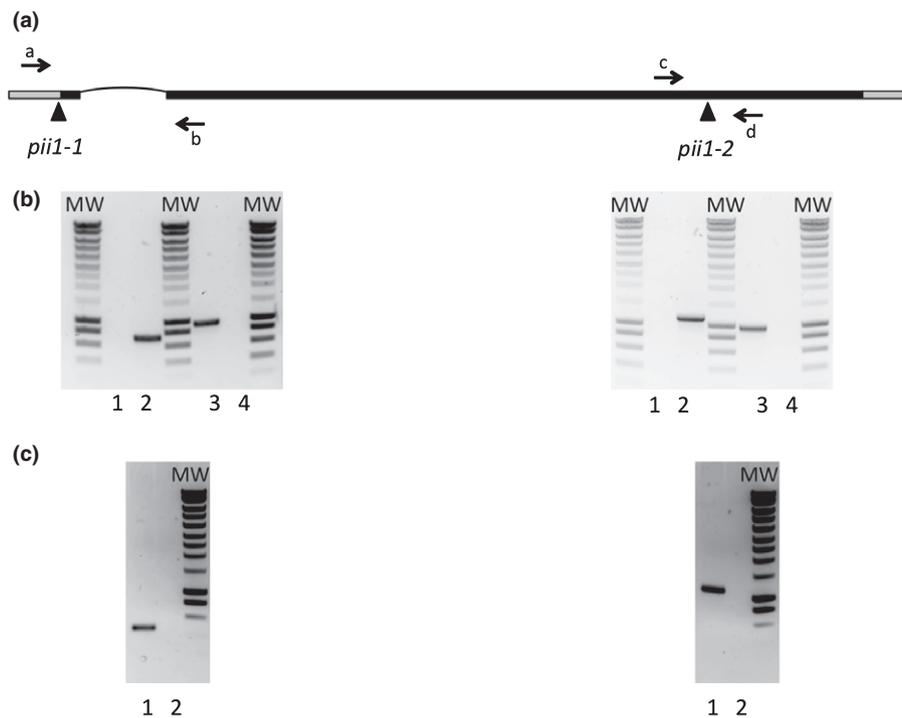


Fig. 1 Selection of *Arabidopsis pii1* mutants. (a) Structure of the *At4g32190* locus encoding PROTEIN INVOLVED IN STARCH INITIATION (PII1). Untranslated regions are indicated by gray boxes, whereas introns and exons are depicted as black lines and black boxes respectively. Transfer DNA (T-DNA) insertions corresponding to *pii1-1* and *pii1-2* alleles are indicated by triangles. Primer positions used for selection is indicated by arrows (not in scale). (b) Left panel: the selection of the *pii1-1* homozygote mutant. Genomic DNA (gDNA) from one mutant plant (lanes 1 and 3) and one wild-type control (lanes 2 and 4) was used. Amplification products of wild-type allele (using primers 'a' and 'b') are in lanes 1 and 2. Amplification products of mutant allele (using T-DNA primer and primer 'b') are in lanes 3 and 4. Right panel: the selection of the *pii1-2* homozygote mutant. gDNA from one mutant plant (lanes 1 and 3) and one wild-type control (lanes 2 and 4) was used. Amplification products of wild-type allele (using primers 'c' and 'd') are in lanes 1 and 2. Amplification products of mutant allele (using T-DNA primer and primer 'c') are in lanes 3 and 4. (c) Left panel: reverse transcription (RT)-PCR amplification products obtained using primers a and b on total RNA extracted from Col-0 (lane 1) and *pii1-1* (lane 2). Right panel: RT-PCR amplification products obtained using primers c and d on total RNA extracted from Ws (lane 1) and *pii1-2* (lane 2). Molecular weight (MW): SmartLadder, Eurogentec.

chloroplast-targeting peptide of 27 amino acids in length. Even if the size of this predicted targeting peptide is relatively small, it is not incompatible with the predicted subcellular localization (Bionda *et al.*, 2010). Nevertheless, PII1 localization was experimentally determined by protoplast transient transformation. Protoplasts were prepared from *Arabidopsis* WT or *pii1* plants and transformed with a construct allowing the transient expression of PII1 fused in its C-terminus to the GFP. Images obtained using a fluorescence microscope confirm the chloroplastic localization of the protein. Moreover, fluorescence appears as dots (Fig. 2), a pattern that is similar to that already reported for SS4 (Raynaud *et al.*, 2016). Protoplasts of the *ss4* mutant were also transformed with the PII1-GFP fused chimeric construct. Again, the PII1-GFP protein was located within chloroplasts and the same dot-like distribution pattern of the protein was maintained, indicating that SS4 is not required for proper PII1 localization inside the chloroplast.

Moreover, SS4 was reported to be located in specific regions of the chloroplast. SS4 is preferentially distributed near the thylakoid membranes (Gámez-Arjona *et al.*, 2014). The N-terminal moiety of SS4, containing several coiled-coil domains known to be involved in protein-protein interactions, is responsible for the proper location of SS4 (Lu *et al.*, 2018). To determine whether

PII1 has an impact on SS4 subchloroplastic location, we expressed the SS4-GFP fused protein in the *pii1* mutant. The SS4 distribution was not modified in the presence or absence of PII1 (Fig. 2).

Starch granule number and morphology are altered in *pii1* lines

The starch granule number per chloroplast was determined from light microscopy observations of *Arabidopsis* leaf cells. This technique allows the visualization of starch granules without the need to produce sections of the leaf tissue. While several granules were observed in the chloroplasts of WT cells (typically five to seven granules per chloroplast), most plastids of *pii1* leaf cells contained only one large starch granule (Fig. S2). This observation was made whatever the genetic background of *pii1* lines (i.e. Ws or Col-0) indicating a reduction of starch-granule priming efficiency in these mutants. The reduction of starch granule number per chloroplast can be associated with the alteration of starch distribution within leaves, as already reported in *ss4* and *ptst2* (Crump-ton-Taylor *et al.*, 2013; Seung *et al.*, 2017). Rosettes from Ws, *ss4-2*, and *pii1-2* were collected at the end of the day and stained with iodine solution. Although the alteration of starch distribution in *ss4* is clear, the phenotype obtained in *pii1* is very similar to the WT and the starch distribution seems homogeneous

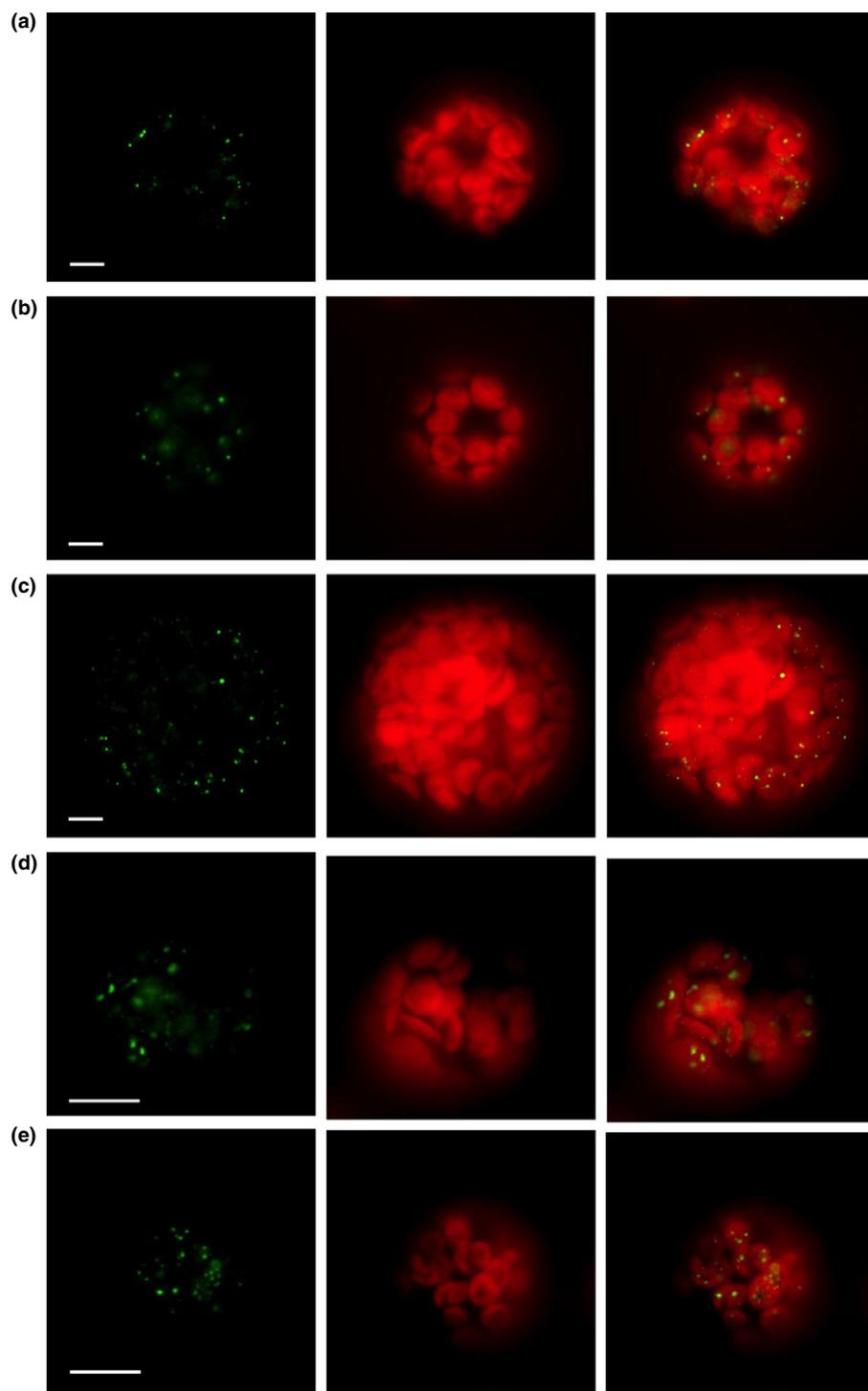


Fig. 2 Subcellular localization of PROTEIN INVOLVED IN STARCH INITIATION (PII1) and starch synthase 4 (SS4) in Arabidopsis protoplasts. Protoplasts were prepared from (a) Col-0, (b) *pii1-1*, (c) *ss4-1 pii1-1*, (d) *ss4-2*, and (e) *ss4-2 pii1-2*. In (a–c), protoplasts were transformed with a construct allowing the expression of the PII1–green fluorescent protein (GFP) fusion protein. In (d, e), protoplasts were transformed with a construct allowing the expression of the SS4–GFP fusion protein. In each row, the first image corresponds to the GFP signal of the fusion protein. Chl fluorescence is displayed in the central panels. The merged images are displayed on the right. Image acquisition was performed using a video microscope. Bars, 10 μm .

throughout rosette leaves. In *ss4*, young leaves remain unstained upon iodine staining except at their extremity, where a darker coloration indicates starch accumulation. To determine whether the number of starch granules per chloroplast remains homogeneous within *pii1* leaves, we observed proximal or distal parts of young leaves from a different genotype by confocal microscopy. All chloroplasts from WT lines contain several starch granules whatever the position of the cell in the leaf. In *ss4-2*, most chloroplasts from the proximal region are devoid of starch, whereas

numerous chloroplasts accumulate one granule in the distal section of the leaf. In *pii1-2*, all chloroplasts contain at least one granule, explaining the homogeneous staining of the leaves when the iodine solution is applied (Fig. 3). Moreover, the presence of starch-free chloroplasts in *ss4* is associated with a massive accumulation of unused ADP-glucose. The ADP-glucose content was also estimated in *pii1*, and no massive accumulation was recorded in correlation with the absence of starch-free chloroplasts (Fig. S3).

The granule size was determined from starch extracted at the end of the day from the rosette leaves of 3-wk-old plants. The use of a Coulter counter allows the determination of 30 000 particle size within a few seconds. In our growth conditions (16 h : 8 h, light : dark photoperiod), WT starch displays a unimodal distribution of granule size with a maximum at 1.5 μm and 1.6 μm for Col-0 and Ws ecotypes respectively. As already reported, starch granules of *ss4* lines are larger, with a maximum

of the Gaussian distribution between 3.4 and 3.5 μm (Fig. 4). Starch granules extracted from *pil1* lines are also larger than the WT counterpart. Distributions of granule size remain unimodal in both mutant lines, with a peak of the Gaussian distribution at 2.5 μm and 3.3 μm in Col-0 and Ws backgrounds respectively (Fig. 4).

The morphology of purified starch granules was also examined using scanning electron microscopy. The granules extracted from

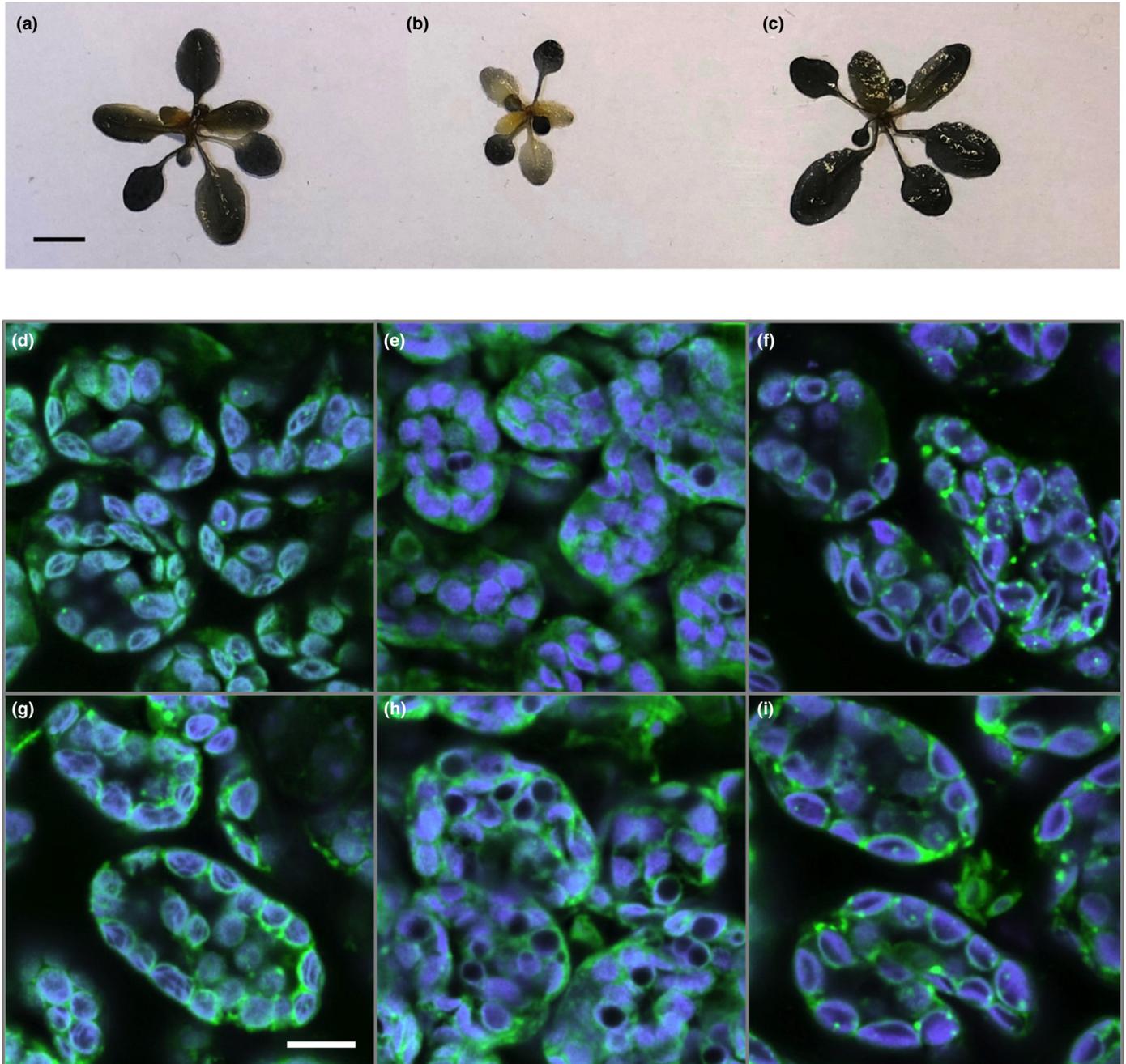


Fig. 3 Starch distribution in Arabidopsis leaf and granule number per chloroplast. At 18 d old, plants were collected at the end of the day. Pigments were removed by hot ethanol, and leaves were stained with iodine solution. Leaves coloration in (a) wild-type (Ws ecotype) and (c) *pil1-2* is homogeneous, whereas it is heterogeneous in (b) *ss4-2*. One leaf of each genotype (17-d-old plants) was collected at the end of the day, and (d–f) the proximal or (g–i) the distal part of the leaf was analyzed by confocal microscopy. Isolated leaf cells were prepared from (d, g) Ws, (e, h) *ss4-2*, and (f, i) *pil1-2*. Tissues were fixed in paraformaldehyde before disruption. Pictures were collected using a confocal microscope. Chl fluorescence in purple delimits the chloroplast volume; starch granules are black. All images are at the same scale. Bars: (a) 1 cm; (g) 10 μm .

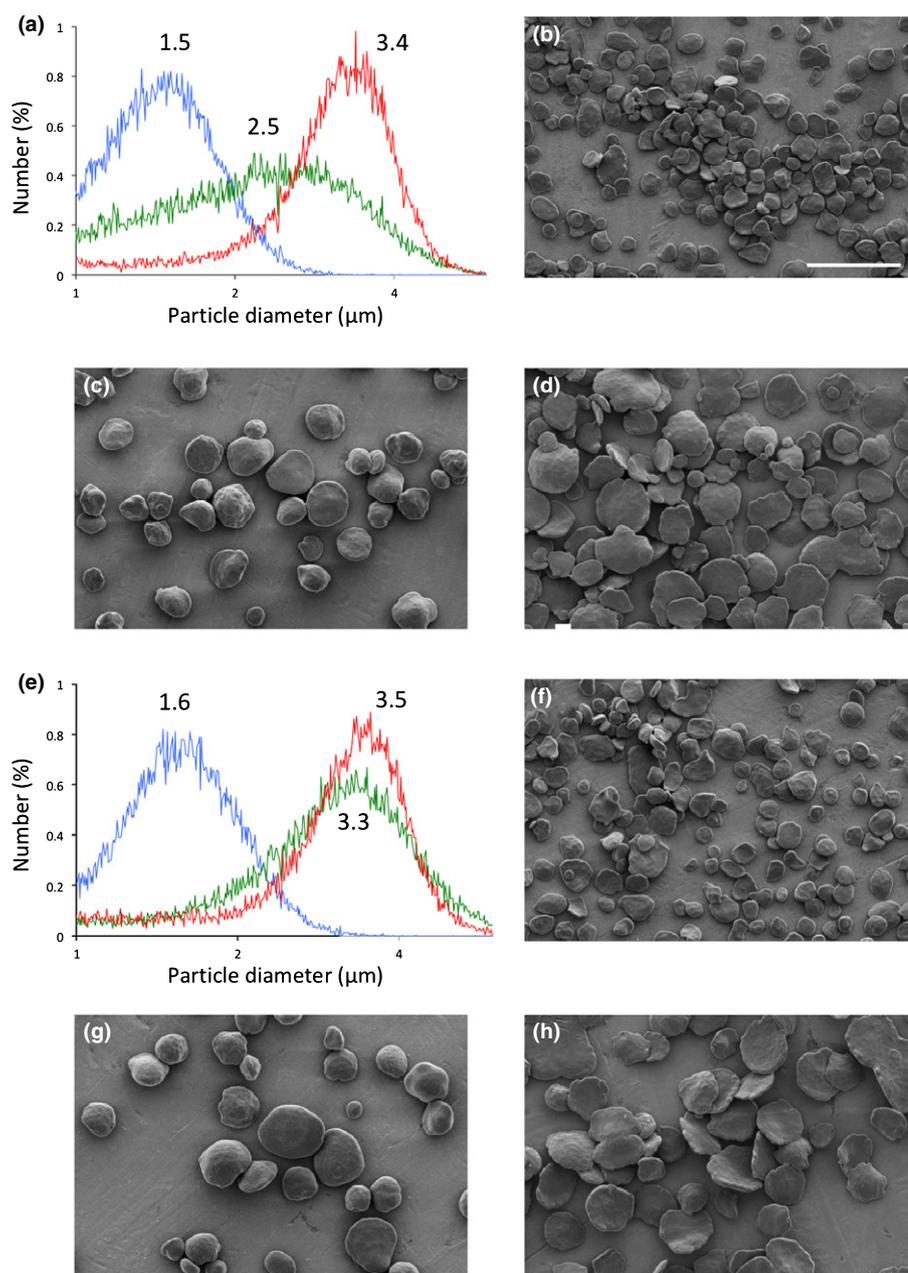


Fig. 4 Starch granule size and morphology. Starch granules were extracted and purified from leaves of 3-wk-old plants harvested at the end of the day. The plants were grown in a 16 h : 8 h, light : dark photoperiod. (a–d) Plants of the Col-0 genetic background. (e–h) Plants of the Ws genetic background. The starch granule size distribution was determined by analyzing 30 000 particles extracted for each genotype. The results are expressed in relative percentage (y-axis) of particles of a diameter ranging from 1 to 6 μm (x-axis, logarithmic scale). In (a, e), starch from wild-type, *ss4*, and *pii1* lines are in blue, red, and green respectively. The value at the peak of the Gaussian distribution is indicated in micrometers. (b–d, f–h) Starch granules were observed using scanning electron microscopy. (b, f) Wild-type (Col-0 and Ws respectively); (c, g) *ss4-1* and *ss4-2*; (d, h) *pii1-1* and *pii1-2*. Bar, 10 μm ; all images are at the same scale.

WT *Arabidopsis* leaves were lenticular in shape with a smooth surface. Several mutations affecting *Arabidopsis* starch-metabolizing enzymes were reported to affect starch granule morphology (Szydłowski *et al.*, 2011; Malinova & Fettke, 2017). This is also the case of the *ss4* mutants that accumulate large and spherical granules with a smooth surface. While similar in size to granules extracted from *ss4* mutants, those purified from *pii1* remain lenticular but display an indented surface (Fig. 4).

Impact of PII1 deficiency on plant growth and root development

ss4 mutants display a growth retardation and a pale green leaf phenotype. These characteristics were proposed to be caused by the reduction of initiation events leading to accumulation of

unused ADP-glucose, especially in starch-free chloroplasts (Ragel *et al.*, 2013). Since *pii1* mutant lines also display a reduction of initiation events, the growth kinetics of these lines were analyzed and compared with WT and *ss4* lines. Plants were grown in a glasshouse under 16 h light and 8 h dark cycling conditions for 3 wk. Even if *pii1* plants can appear lighter than their respective WTs, there is no statistical difference recorded at the end-points (Fig. 5). Moreover, plant morphologies can be evaluated after 2 or 3 wk of growth in a glasshouse or in a growth chamber (Figs 3, 5) and no obvious differences between *pii1* and WT lines were observed. A pale green leaf phenotype was noticed only in *SS4* deficient lines. All these data indicate that the development of *pii1* lines is similar to that of the WT plants, whereas the growth retardation of *ss4* lines was confirmed whatever the genetic background.

The starch accumulation in roots and root development were also evaluated in *pil1* mutants (Fig. 6). Plants were cultivated in a growth chamber using a hydroponic systems and the starch accumulation in the columella of primary and lateral roots was visualized under a microscope after iodine staining. The alteration of starch synthesis at the apex of *ss4* roots was previously described, and this alteration was associated with a modification of root architecture and response to gravity (Crumpton-Taylor *et al.*, 2013). After iodine staining of 2-wk-old *pil1* seedlings, the apexes of both primary and lateral roots appear dark blue, indicating that *pil1* mutants accumulate starch granules in the columella. The intensity of the coloration and number of stained cells in *pil1* appear to be similar to that observed in WT roots (Figs 6, S4). Moreover, the architecture of root development was visualized on agar plates that were placed vertically after seed germination. Again, the *pil1* line behaves like WT plants and the roots of 2-wk-old seedlings respond correctly to gravity and no aberrant development was observed (Fig. 6).

Impact of PII1 deficiency on starch amount and ultrastructure

The mutation at the *PII1* locus led to the increase of starch granule size associated with a reduction of granule number. To determine whether these phenotypes are associated with a modification of total starch amount, we also assayed the starch content in these lines and compared data with WT and *ss4* lines. Leaves of 3-wk-old plants, grown in a growth chamber under 16 h : 8 h, light : dark photoperiod, were harvested at the end of the illuminated or dark periods and the starch content was enzymatically assayed. It was similar to the amount already reported for WT and *SS4*-deficient lines (Roldán *et al.*, 2007). The loss of *SS4* led to a slight reduction of starch content at the end of the day but a higher amount at the end of the night (Fig. 7). This effect is exacerbated in a *Ws* background. In *pil1* mutants, no reduction of the starch content was recorded at the end of the day. Moreover, in a *Ws* genetic background, the residual starch accumulated at the end of the night was significantly higher in *pil1* or *ss4* mutants than in the corresponding WT line (Fig. 7). To determine whether the higher content of residual starch at the end of the night in *pil1* lines may result from a modification of starch turnover, the starch accumulation was monitored over 24 h in *Ws*, *ss4-2*, and *pil1-2*. The alteration of *ss4* starch turnover pattern was confirmed with a reduction of both starch synthesis and degradation rates. However, this is not the case for the *pil1* line, for which starch synthesis and degradation rates appear similar to the WT line with a higher content at the end of the day and at the end of the night. The increase in starch accumulation at the end of the day was also detected in the end-point experiment, although the difference between the WT line and *pil1-2* did not appear statistically significant (Fig. 7a). No significant accumulation of water-soluble glucans could be detected at the end of the day or at the end of the night in *pil1* lines compared with their corresponding WT's (Fig. S5).

Starch fractionation was carried out by size exclusion chromatography on a Sepharose CL-2b matrix. No modification of the amylose : amylopectin ratio was recorded in *pil1-1* or *pil1-2* lines when compared with their respective WT's (Fig. S6). The starch ultrastructure was also analyzed by determining the CLD profile of the glucans. The purified starch was enzymatically debranched and linear glucans were then separated using high-performance anion-exchange chromatography and detected by pulsed amperometric detection. The CLD profile determined for starch extracted from *PII1*-deficient lines was identical to that of the corresponding WT's (Fig. 8).

PII1 deficiency does not alter other starch-metabolizing enzymes

The activity levels of several enzymes were estimated by zymogram analysis. All activities tested (starch synthases *SS1* and *SS3*, branching enzymes, debranching enzymes, phosphorylases) remained unaffected in the *pil1* mutant (Fig. S7).

Since the reduction of granules number without alteration of starch structure observed in the *pil1* line was similar to that observed in *ss4*, *ptst2*, or *ptst3* lines, we verified that these genes were still correctly expressed in the absence of *PII1*. Total RNAs of *pil1* lines were extracted and purified from leaves harvested in the middle of the day. RT-PCR performed to amplify RNA signal of *SS4*, *PTST2* and *PTST3* gave signals in *pil1* lines indicating that these genes are expressed (Supporting information Fig. S8). In the same manner, the RNAs were extracted and purified from *ss4* lines, and RT-PCR revealed that *PII1* is expressed in this mutant (Supporting information Fig. S8).

Discussion

PII1 and *SS4* interact *in planta*

In this study, we describe a new protein involved in starch priming. *PII1* was identified by yeast two-hybrid screen as physically interacting with *SS4*. The number of positive clones with different *PII1* fragments gave a good confidence of the interaction between the two proteins. This result was reinforced by other observations, such as subcellular protein localization or BiFC experiments.

The *in silico* analysis of the *PII1* coding sequence predicts the presence of a small transit peptide allowing the targeting of the protein to the chloroplast (Table S1). The chloroplastic localization of *PII1* was confirmed by the expression of the recombinant *PII1*-GFP fluorescent chimeric protein. Moreover, this approach also revealed a dotted distribution of the protein in the plastid (Fig. 2) similar to what was previously described for *SS4* (Raynaud *et al.*, 2016). Although the formation of aggregates of *PII1* could not be totally excluded, it is unlikely that such a dotted distribution of *PII1* arises from the overexpression of the protein, since we have made use of the moderate expression 'ubiquitin promoter-10' for the expression of the transgene (Grefen *et al.*, 2010). In addition, the transformations were carried out with protoplasts prepared from cells of the *pil1* mutant lacking the endogenous protein, limiting the overaccumulation of the

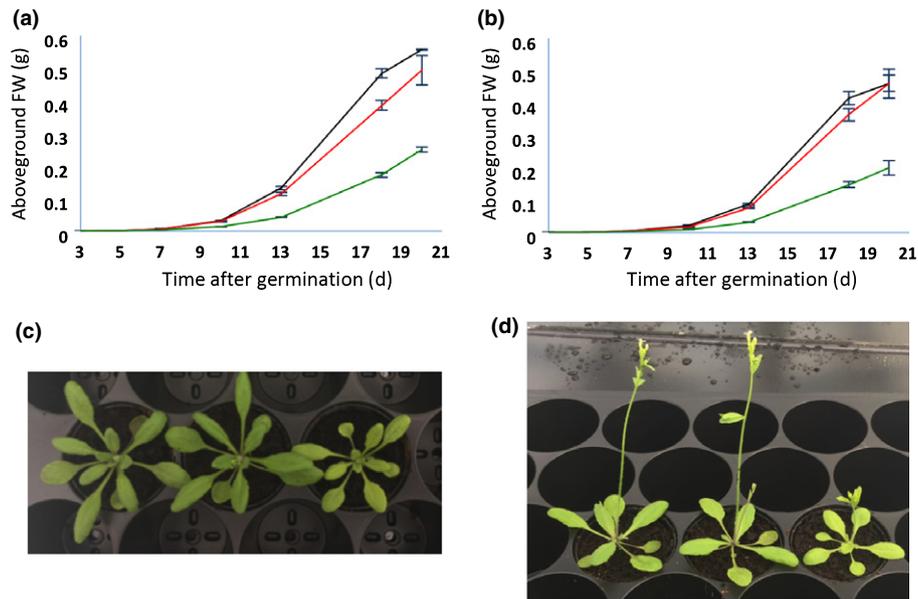


Fig. 5 The *pii1* growth phenotype compared with the *ss4* and wild-type *Arabidopsis* plants. Plants were grown in a glasshouse under a 16 h : 8 h, light : dark photoperiod. (a, b) The fresh weight (FW) of aboveground organs (grams per plant) is plotted against the number of days after germination. Black lines, wild-type plants (a, Col-0; b, Ws); red lines, (a) *pii1-1*, (b) *pii1-2*; green lines, (a) *ss4-1*, (b) *ss4-2*. Each value corresponds to the mean of three samplings (each sample being composed of several plants). Thin vertical bars represent the plus/minus SE. (c, d) Pictures of 3-wk-old plants grown in the same conditions as noted earlier. (c) From left to right: Col-0, *pii1-1*, *ss4-1*. (d) From left to right: Ws, *pii1-2*, *ss4-2*.

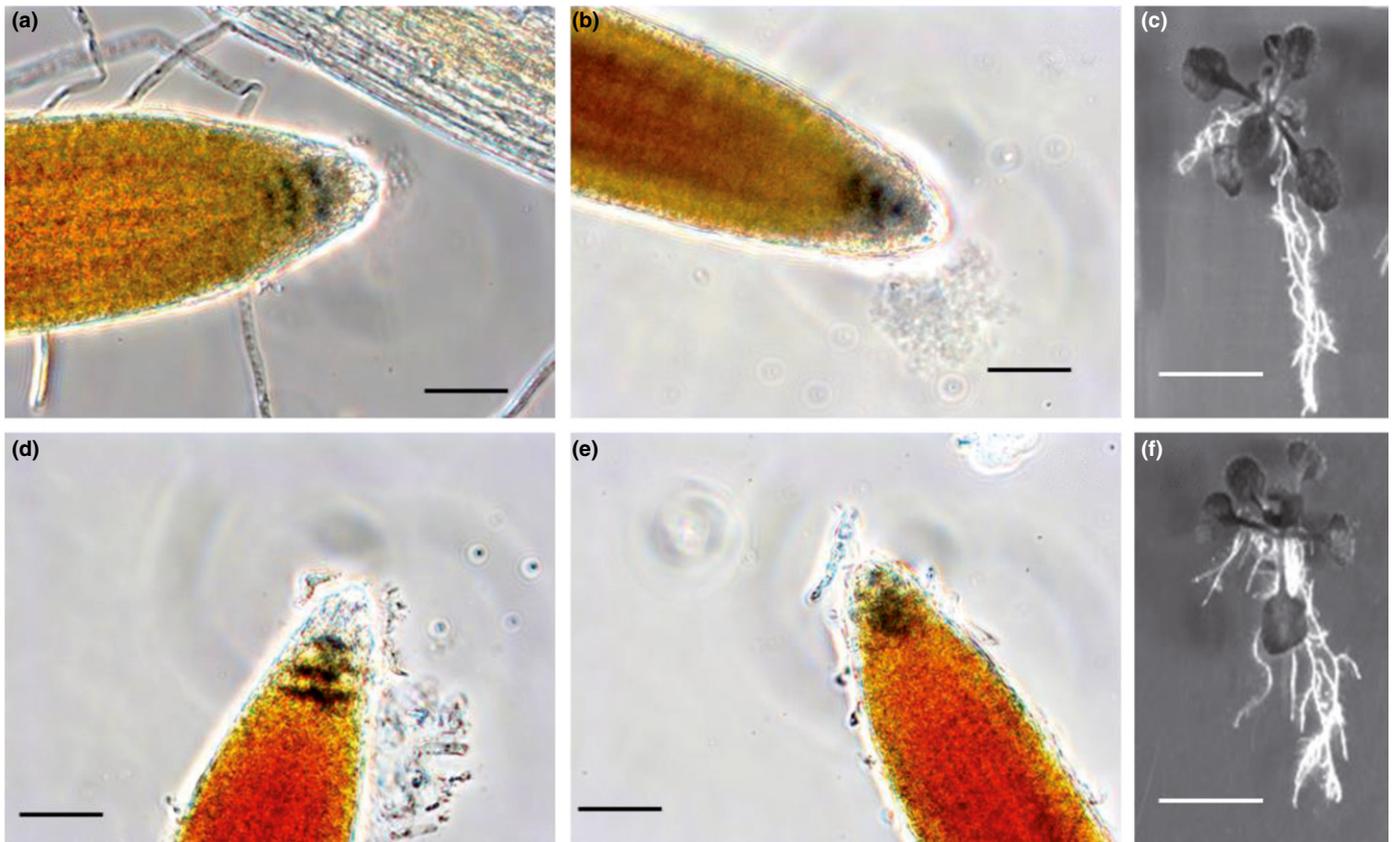
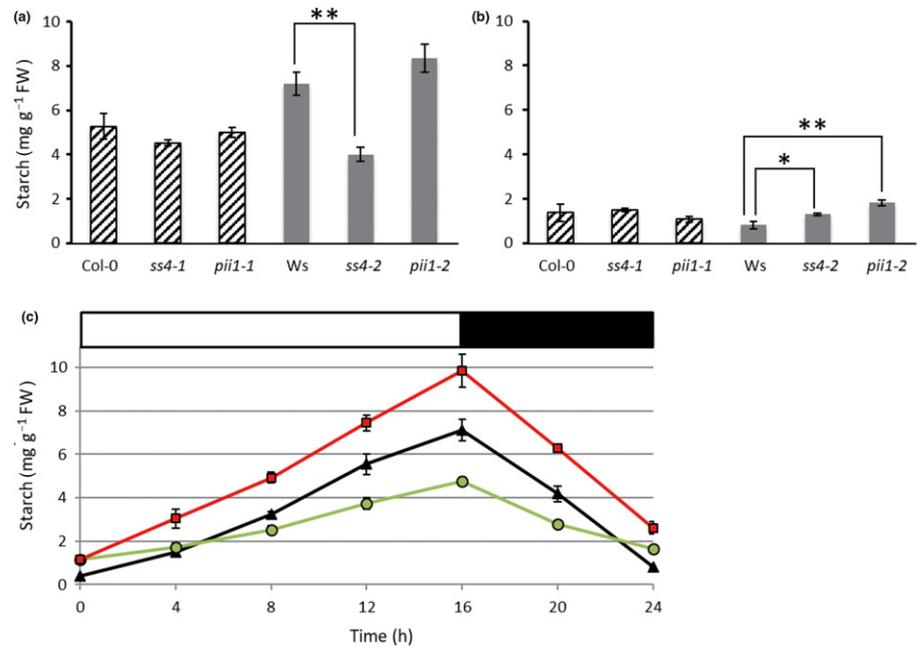


Fig. 6 Starch accumulation in *Arabidopsis* root and root development. Plants were grown for 2 wk under a 16 h : 8 h, light : dark photoperiod. (a–c) Ws. (d–f) *pii1-2*. (a, b, d, e) Roots of 2-wk-old plants cultured with hydroponic systems were soaked in lugol, rinsed with water, and observed under microscope. (a, d) Primary root. (b, e) Lateral root. (c, f) Seeds were sown on agar plates that were maintained vertically after seed germination. Pictures were taken after 2 wk of growth. Bars: (a, b, d, e) 50 μm; (c, f) 1 cm.

Fig. 7 Starch content in *Arabidopsis* leaves. Plants were grown in a culture room under a 16 h : 8 h, light : dark photoperiod. Three weeks after germination the leaves were harvested either (a) at the end of the day or (b) at the end of the dark phase. Three independent cultures were performed, and for each culture three independent extractions were realized. Values correspond to the mean of nine assays (except for Col-0 end of dark phase, corresponding to eight assays). Thin vertical bars represent the plus/minus SE. Values obtained for mutant lines were compared with their respective wild-type by a two-tailed *t*-test. Asterisks indicate statistically significant differences: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$. (c) Starch content measured in wild-type (*Ws* ecotype, black line); *pii1-2* (red line), and *ss4-2* (green line) over one diurnal cycle (16 h : 8 h, light : dark). Rosettes were harvested every 4 h and immediately frozen in liquid nitrogen. Each point corresponds to the mean plus/minus SE of three independent samples from the same culture.



protein. Finally, the spatial proximity of PII1 and SS4 has also been confirmed *in planta* by a BiFC approach (Fig. S1).

As a whole, these results (yeast two-hybrid, distribution within the chloroplast and BiFC) provide good evidence for the direct physical interaction between SS4 and PII1 in the chloroplast.

PII1 is required in the determination of starch granule number in *Arabidopsis* chloroplast

In this study, we have phenotypically characterized two independent mutant alleles of the PII1 gene: the *pii1-1* in the Col-0 background and *pii1-2* in the *Ws* background. T-DNA insertion lies in the 5' untranslated region, only four nucleotides upstream of the START codon in *pii1-1*, whereas it is localized in exon 2 in *pii1-2*. Although these two lines were confirmed mutant by RT-PCR (Fig. 1), we cannot exclude that a small amount of active PII1 is still produced at a low level in the *pii1-1* mutant, whereas it is completely abolished in *pii1-2*.

Nevertheless, the phenotypes of the two mutants are very similar. Both lines have less (typically one) but bigger starch granules per chloroplast. Although the effect is more pronounced in *pii1-2* (*pii1-1* is probably not a null allele), starch granules of PII1-deficient lines are two to three -times larger than WT granules, and of a size similar to those of the *ss4* mutant. However, while *ss4* starch is spherical in shape, the starch extracted from *pii1* mutants remains lenticular, a form comparable to that of WT starch.

Another difference observed between the *pii1* and the *ss4* mutants is related to plant growth. Indeed, while the *ss4* mutants show significant growth retardation, the *pii1* behave like their corresponding WTs. The stunting growth of *ss4* seems related, at least partly, to the accumulation of higher ADP-glucose content in the leaves (Ragel *et al.*, 2013), probably because a significant fraction of chloroplasts are starch free in these mutants (Roldán *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2018). Although the absence of PII1 leads

to a reduction in the number of starch granules per chloroplast, none or very few organelles are completely free of starch (a much smaller fraction than *ss4*). Moreover, contrary to what was recorded for *ss4*, the starch turnover is not impacted by the absence of PII1. These observations are correlated with the low amount of ADP-glucose recorded in *pii1*. In addition, the *ss4* mutants exhibit a root growth defect related to the perturbation of starch accumulation in the columella (Crumpton-Taylor *et al.*, 2013). Starch accumulation in roots and root development of *pii1* lines are similar to WT plants. The combination of these factors, absence of starch-free chloroplast, no massive accumulation of ADP-glucose, and normal root development, may explain the correct growth of plants lacking PII1.

Significance of SS4 and PII1 interaction

SS4 is a major component involved in starch priming. This protein is composed of two distinct parts. The C-terminal part of the protein corresponds to the catalytic domain that is shared by all starch-syntheses of the GT5 family. The N-terminal part of SS4, essentially composed of coiled-coil domains, is unique (Raynaud *et al.*, 2016). Both parts have specific function in determination of starch granule size and morphology. Expression in *ss4* mutants of a truncated protein lacking the N-terminal part or a chimeric protein composed of N-terminal part of SS4 fused to the glycogen-synthase demonstrates that the catalytic domain (C-terminal) of SS4 determines the number of starch granules, whereas the N-terminal moiety controls the shape of the granule (Lu *et al.*, 2018). In the present work, PII1 was identified as an SS4-interacting partner. When PII1 was knocked down, the major phenotype was the reduction of starch granule number per chloroplast without alteration of granule shape. This phenotype can be interpreted as the inactivation of the SS4 catalytic part (C-terminal) without alteration

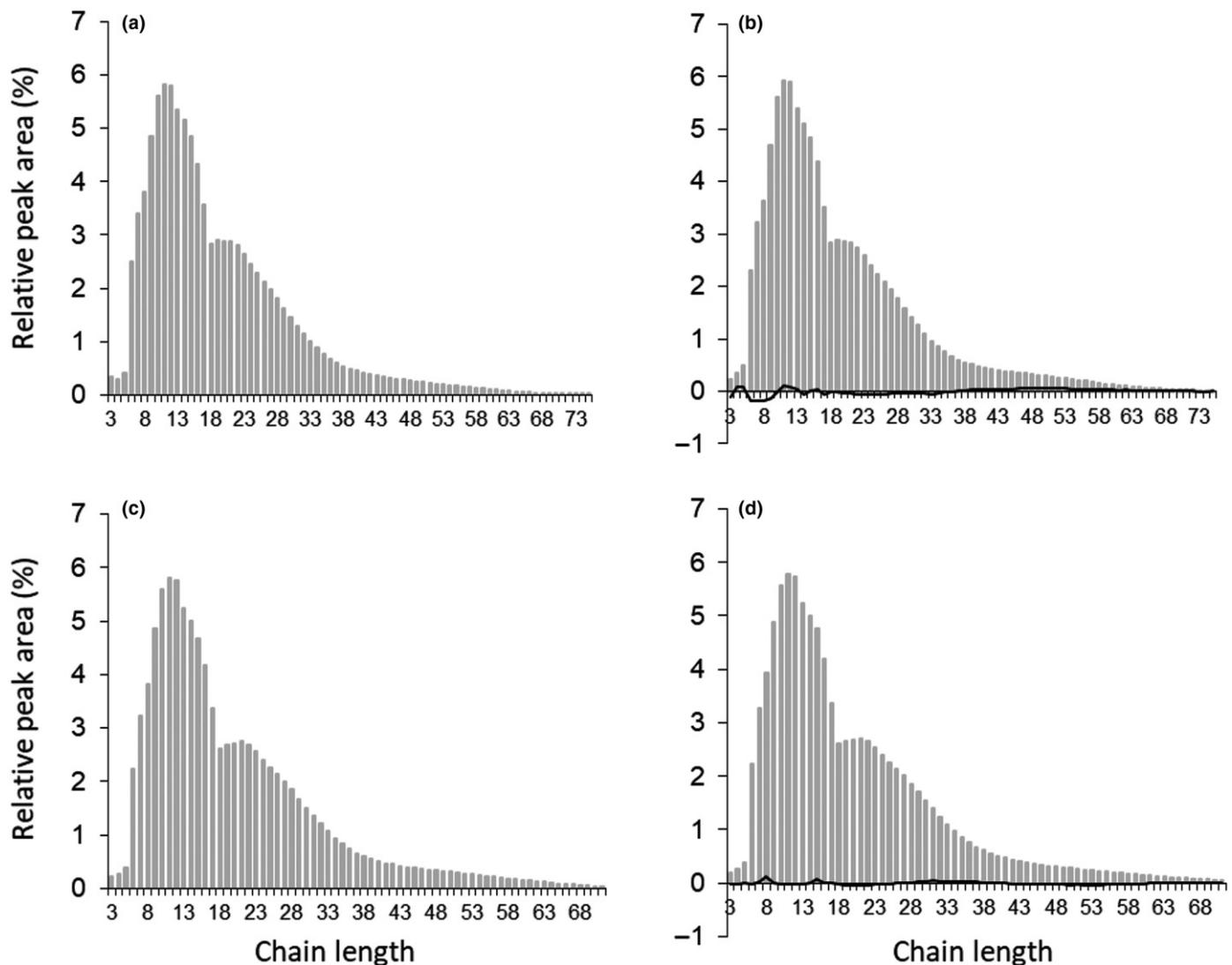


Fig. 8 Chain length distribution of purified starches. Purified starches were enzymatically debranched. Linear glucans were then separated and detected using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. Gray bars represent the proportion of each degree of polymerization expressed as a percentage of the total amount presented in the figure. The black line (b, d) corresponds to the differential plot between the mutant and wild-type profiles. (a) Col-0; (b) *pii1-1*; (c) *Ws*; (d) *pii1-2*. Each profile is the mean of two analyses carried out with starch extracted from two independent cultures.

of the function of the SS4 N-terminal moiety. PII1 could be needed to provide an adequate substrate to SS4 and/or to prevent the degradation of the substrate presented to SS4 to prime granule formation. A similar function was already proposed for PTST2, another SS4-interacting protein (Seung *et al.*, 2017). However, unlike PTST2, PII1 is devoid of carbohydrate binding module and is probably not directly interacting with glucans. Alternatively, PII1 could be required for the correct folding of SS4 or its association with any other factor requested in the starch-priming machinery. The phenotype resulting from the absence of PII1 is not, however, as severe as that described for the *ss4* mutant. All chloroplasts appear to contain at least one starch granule and the plants grow properly.

Leaves are submitted to diurnal fluctuations of the starch content. The precise control of the starch content is crucial in

leaves to prevent starvation at night (Scialdone *et al.*, 2013). Such a precise control could only be achieved if the priming of starch synthesis (number, size, and morphology of the granules) is itself highly controlled. Consequently, the starch granule initiation is a complex mechanism involving enzymes and noncatalytic proteins. To date, several components of this machinery have been identified; these include SS4, SS3, PTST2, PTST3, and the new PII1 protein described in this work. Furthermore, PII1 (also called MRC1 for Myosin-Resembling Chloroplast protein) was recently identified, through immunoprecipitation experiments, as interacting with PTST2 (Seung *et al.*, 2018). Further investigations are needed to determine the precise function of each protein within the starch-priming complex and understand how plants control the number and the size of the starch granules.

Acknowledgements

We thank Christine Lancelon-Pin (CERMAV, Grenoble) for the scanning electron microscopy observations, the NanoBio-ICMG platform (FR 2607, Grenoble) for granting access to the electron microscopy facility, and the Plateforme d'Analyse des Glycoconjugués (PAGés, <http://plateforme-pages.univ-lille1.fr/>) for providing the technical environment conducive to achieving measurements of ADP-glucose. We are indebted to the Research Federation FRABio (Université de Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We thank the Agence Nationale de la Recherche for funding ('CaSta-DivA' Project, grant no. ANR-11-BSV6-0003).

Author contributions

C.V. performed most of the experiments. A.C., D.D., M.F. and F.W. participated in the experiments. A.W. performed CLD analysis. J.-L.P. supervised the electron microscopy observations, and C.S. performed the optical microscopy observations. F.K. performed ADP-glucose measurements. F.W. and C.D'H. designed experiments and wrote the manuscript.

ORCID

Christophe D'Hulst  <http://orcid.org/0000-0002-5556-9099>
Fabrice Wattebled  <http://orcid.org/0000-0003-0041-8557>

References

- Abel GJW, Springer F, Willmitzer L, Kossmann J. 1996. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Journal* 10: 981–991.
- Adamson JG, Zhou NE, Hodges RS. 1993. Structure, function and application of the coiled-coil protein folding motif. *Current Opinion in Biotechnology* 4: 428–437.
- Ahmed Z, Tetlow IJ, Ahmed R, Morell MK, Emes MJ. 2015. Protein–protein interactions among enzymes of starch biosynthesis in high-amylose barley genotypes reveal differential roles of heteromeric enzyme complexes in the synthesis of A and B granules. *Plant Science* 233: 95–106.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R *et al.* 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657.
- Bionda T, Tillmann B, Simm S, Beilstein K, Ruprecht M, Schleiff E. 2010. Chloroplast import signals: the length requirement for translocation *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Molecular Biology* 402: 510–523.
- Blasing OE, Gibon Y, Gunther M, Hohne M, Morcuende R, Osuna D, Thimm O, Usadel B, Scheible W-R, Stitt M. 2005. Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3257–3281.
- Blauth SL, Yao Y, Klucinec JD, Shannon JC, Thompson DB, Guiltinan MJ. 2001. Identification of mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn. *Plant Physiology* 125: 1396–1405.
- Boyer L, Roussel X, Courseaux A, Ndjindji OM, Lancelon-Pin C, Pataux JL, Tetlow IJ, Emes MJ, Pontoire B, D'Hulst C *et al.* 2016. Expression of *Escherichia coli* glycogen branching enzyme in an *Arabidopsis* mutant devoid of endogenous starch branching enzymes induces the synthesis of starch-like polyglucans. *Plant, Cell & Environment* 39: 1432–1447.
- Brady SM, Orlando DA, Lee J-Y, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN. 2007. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* 318: 801–806.
- Buléon A, Colonna P, Planchot V, Ball S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23: 85–112.
- Coutinho PM, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. 2003. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology* 328: 307–317.
- Crofts N, Abe N, Oitome NF, Matsushima R, Hayashi M, Tetlow IJ, Emes MJ, Nakamura Y, Fujita N. 2015. Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes. *Journal of Experimental Botany* 66: 4469–4482.
- Crofts N, Sugimoto K, Oitome NF, Nakamura Y, Fujita N. 2017. Differences in specificity and compensatory functions among three major starch synthases determine the structure of amylopectin in rice endosperm. *Plant Molecular Biology* 94: 399–417.
- Crumpton-Taylor M, Grandison S, Png KMY, Bushby AJ, Smith AM. 2012. Control of starch granule numbers in *Arabidopsis* chloroplasts. *Plant Physiology* 158: 905–916.
- Crumpton-Taylor M, Pike M, Lu K-J, Hylton CM, Feil R, Eicke S, Lunn JE, Zeeman SC, Smith AM. 2013. Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during *Arabidopsis* leaf expansion. *New Phytologist* 200: 1064–1075.
- Delatte T, Trevisan M, Parker ML, Zeeman SC. 2005. *Arabidopsis* mutants *Atisa1* and *Atisa2* have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant Journal* 41: 815–830.
- Delorenzi M, Speed T. 2002. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* 18: 617–625.
- Delvallé D, Dumez S, Wattebled F, Roldán I, Planchot V, Berbezzy 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 Journal* 43: 398–412.
- D'Hulst C, Wattebled F, Szydłowski N. 2015. Starch biosynthesis in leaves and its regulation. In: Nakamura Y, ed. *Starch: metabolism and structure*. Tokyo, Japan: Springer Japan, 211–237.
- Dumez S, Wattebled F, Dauville D, Delvalle D, Planchot V, Ball SG, D'Hulst C. 2006. Mutants of *Arabidopsis* lacking starch branching enzyme II substitute plastidial starch synthesis by cytoplasmic maltose accumulation. *Plant Cell* 18: 2694–2709.
- Edwards A, Borthakur A, Bornemann S, Venail J, Denyer K, Waite D, Fulton D, Smith A, Martin C. 1999. Specificity of starch synthase isoforms from potato. *European Journal of Biochemistry* 266: 724–736.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G. 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978–984.
- Feike D, Seung D, Graf A, Bischof S, Ellick T, Coiro M, Soyk S, Eicke S, Mettler-Altmann T, Lu K-J *et al.* 2016. The starch granule-associated protein EARLY STARVATION1 (ESV1) is required for the control of starch degradation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell* 28: 1472–1489.
- Ferreira SJ, Senning M, Fischer-Stettler M, Streb S, Ast M, Neuhaus HE, Zeeman SC, Sonnewald S, Sonnewald U. 2017. Simultaneous silencing of isoamylases ISA1, ISA2 and ISA3 by multi-target RNAi in potato tubers leads to decreased starch content and an early sprouting phenotype. *PLoS ONE* 12: e0181444.
- Gómez-Arjona FM, Raynaud S, Ragel P, Mérida Á. 2014. Starch synthase 4 is located in the thylakoid membrane and interacts with plastoglobule-associated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 80: 305–316.
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR. 2010. A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant Journal* 64: 355–365.
- Hennen-Bierwagen TA, Lin Q, Grimaud F, Planchot V, Keeling PL, James MG, Myers AM. 2009. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts. *Plant Physiology* 149: 1541–1559.

- Hennen-Bierwagen TA, Liu F, Marsh RS, Kim S, Gan Q, Tetlow IJ, Emes MJ, James MG, Myers AM. 2008. Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes. *Plant Physiology* 146: 1892–1908.
- Hizukuri S, Takeda Y, Yasuda M, Suzuki A. 1981. Multi-branched nature of amylose and the action of debranching enzymes. *Carbohydrate Research* 94: 205–213.
- Letierrier M, Holappa LD, Broglie KE, Beckles DM. 2008. Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biology* 8: e98.
- Liu F, Ahmed Z, Lee EA, Donner E, Liu Q, Ahmed R, Morell MK, Emes MJ, Tetlow IJ. 2012. Allelic variants of the amylose extender mutation of maize demonstrate phenotypic variation in starch structure resulting from modified protein–protein interactions. *Journal of Experimental Botany* 63: 1167–1183.
- Liu F, Makhmoudova A, Lee EA, Wait R, Emes MJ, Tetlow IJ. 2009. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein–protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Journal of Experimental Botany* 60: 4423–4440.
- Lu K-J, Pfister B, Jenny C, Eicke S, Zeeman SC. 2018. Distinct functions of STARCH SYNTHASE 4 domains in starch granule formation. *Plant Physiology* 176: 566–581.
- Makhmoudova A, Williams D, Brewer D, Massey S, Patterson J, Silva A, Vassall KA, Liu F, Subedi S, Harauz G *et al.* 2014. Identification of multiple phosphorylation sites on maize endosperm starch branching enzyme IIb, a key enzyme in amylopectin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 289: 9233–9246.
- Malinova I, 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.
- Manners DJ. 1989. Recent developments in our understanding of amylopectin structure. *Carbohydrate Polymers* 11: 87–112.
- Mouille G, Maddelein ML, Libessart N, Talaga P, Decq A, Delrue B, Ball S. 1996. Preamylopectin processing: a mandatory step for starch biosynthesis in plants. *Plant Cell* 8: 1353–1366.
- Myers AM, Morell MK, James MG, Ball SG. 2000. Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal. *Plant Physiology* 122: 989–998.
- Nakamura Y, Utsumi Y, Sawada T, Aihara S, Utsumi C, Yoshida M, Kitamura S. 2010. Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant and Cell Physiology* 51: 776–794.
- Pfister B, Zeeman SC. 2016. Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 73: 2781–2807.
- Ragel P, Streb S, Feil R, Sahrway M, Annunziata MG, Lunn JE, Zeeman S, Mérida Á. 2013. Loss of starch granule initiation has a deleterious effect on the growth of *Arabidopsis* plants due to an accumulation of ADP-glucose. *Plant Physiology* 163: 75–85.
- Raynaud S, Ragel P, Rojas T, Mérida Á. 2016. The N-terminal part of *Arabidopsis thaliana* starch synthase 4 determines the localization and activity of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 291: 10759–10771.
- Regina A, Kosar-Hashemi B, Ling S, Li Z, Rahman S, Morell M. 2010. Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany* 61: 1469–1482.
- Roldán I, Wattedled F, Lucas MM, Delvallé D, Planchot V, Jiménez S, Pérez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida Á. 2007. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant Journal* 49: 492–504.
- Roussel X, Lancelon-Pin C, Vikso-Nielsen A, Rolland-Sabate A, Grimaud F, Potocki-Veronese G, Buleon A, Putaux JL, D'Hulst C. 2013. Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830: 2167–2177.
- Samson F, Brunaud V, Balzergue S, Dubreucq B, Lepiniec L, Pelletier G, Caboche M, Lecharny A. 2002. FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Research* 30: 94–97.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics* 37: 501.
- Schwall GP, Safford R, Westcott RJ, Jeffcoat R, Tayal A, Shi Y-C, Gidley MJ, Jobling SA. 2000. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nature Biotechnology* 18: 551–554.
- Scialdone A, Mugford ST, Feike D, Skeffington A, Borrill P, Graf A, Smith AM, Howard M. 2013. *Arabidopsis* plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *eLife* 2: e00669.
- Seung D, Boudet J, Monroe JD, Schreier TB, David LC, Abt M, Lu K-J, Zanella M, Zeeman SC. 2017. Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH control starch granule initiation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell* 29: 1657–1677.
- Seung D, Schreier TB, Bürgy L, Eicke S, Zeeman SC. 2018. Two plastidial coiled-coil proteins are essential for normal starch granule initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* doi: 10.1105/tpc.18.00219.
- Seung D, Soyk S, Coiro M, Maier BA, Eicke S, Zeeman SC. 2015. PROTEIN TARGETING TO STARCH is required for localising GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE to starch granules and for normal amylose synthesis in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 13: e1002080.
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC, Smith AM. 2004. Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 136: 2687–2699.
- Streb S, Delatte T, Umhang M, Eicke S, Schorderet M, Reinhardt D, Zeeman SC. 2008. Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. *Plant Cell* 20: 3448–3466.
- Subasinghe RM, Liu F, Polack UC, Lee EA, Emes MJ, Tetlow IJ. 2014. Multimeric states of starch phosphorylase determine protein–protein interactions with starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 168–179.
- Szydlowski N, Ragel P, Hennen-Bierwagen TA, Planchot V, Myers AM, Mérida Á, d'Hulst C, Wattedled F. 2011. Integrated functions among multiple starch synthases determine both amylopectin chain length and branch linkage location in *Arabidopsis* leaf starch. *Journal of Experimental Botany* 62: 4547–4559.
- Szydlowski N, Ragel P, Raynaud S, Lucas MM, Roldán I, Montero M, Munoz FJ, 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* 21: 2443–2457.
- Tanaka N, Fujita N, Nishi A, Satoh H, Hosaka Y, Ugaki M, Kawasaki S, Nakamura Y. 2004. The structure of starch can be manipulated by changing the expression levels of starch branching enzyme IIb in rice endosperm. *Plant Biotechnology Journal* 2: 507–516.
- Tetlow IJ. 2012. Branching enzymes and their role in determining structural and functional properties of polyglucans. In: Tetlow IJ, ed. *Starch: origins, structure and metabolism*. London, UK: Society for Experimental Biology, 141–178.
- Tetlow IJ, Beisel KG, Cameron S, Makhmoudova A, Liu F, Bresolin NS, Wait R, Morell MK, Emes MJ. 2008. Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes. *Plant Physiology* 146: 1878–1891.
- Tetlow IJ, Wait R, Lu Z, Akkasaeng R, Bowsher CG, Esposito S, Kosar-Hashemi B, Morell MK, Emes MJ. 2004. Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein–protein interactions. *Plant Cell* 16: 694–708.
- Wattedled F, Dong Y, Dumez S, Delvalle D, Planchot V, Berbezzy P, Vyas D, Colonna P, Chatterjee M, Ball S *et al.* 2005. Mutants of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulate phytylglucogen and an abnormal form of amylopectin. *Plant Physiology* 138: 184–195.
- Wattedled F, Planchot V, Dong Y, Szydlowski N, Pontoire B, Devin A, Ball S, D'Hulst C. 2008. Further evidence for the mandatory nature of polysaccharide debranching for the aggregation of semicrystalline starch and for overlapping functions of debranching enzymes in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* 148: 1309–1323.

- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ. 2007. An “electronic fluorescent pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2: e718.
- Yao Y, Thompson DB, Guiltinan MJ. 2004. Maize starch-branching enzyme isoforms and amylopectin structure. In the absence of starch-branching enzyme IIb, the further absence of starch-branching enzyme Ia leads to increased branching. *Plant Physiology* 136: 3515–3523.
- Zhang X, Myers AM, James MG. 2005. Mutations affecting starch synthase III in *Arabidopsis* alter leaf starch structure and increase the rate of starch synthesis. *Plant Physiology* 138: 663–674.
- Zhang X, Szydlowski N, Delvalle D, D’Hulst C, James M, Myers A. 2008. Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 8: e96.
- Zimmermann L, Stephens A, Nam S-Z, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V. 2017. A completely reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a new HHpred server at its core. *Journal of Molecular Biology* 430: 2237–2243.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1 SS4 and PIII1 interaction (BiFC).

Fig. S2 Starch granule number per chloroplast.

Fig. S3 ADP-Glucose content.

Fig. S4 Starch accumulation in roots.

Fig. S5 Glucose and water-soluble polysaccharides contents in leaves

Fig. S6 Starch fractionation.

Fig. S7 Zymograms of starch metabolizing enzymes.

Fig. S8 Expression of *SS4*, *PTST2*, *PTST3* and *PIII1*.

Table S1 Proteins identified during the yeast-2-hybrid screen, that are predicted to be targeted to the chloroplast

Table S2 Information on T-DNA lines and primers used for selection and RT-PCR experiments

Methods S1 Supporting information materials and methods: description of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and ADP-Glucose measurement methods.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



About *New Phytologist*

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews and Tansley insights.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication ‘as ready’ via *Early View* – our average time to decision is <26 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit **www.newphytologist.com** to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit **www.newphytologist.com**

NegFluo, a fast and efficient method to determine starch granule size and morphology *in situ* in plant chloroplasts.

short title:

NegFluo: quantifying starch granule morphology.

Camille Vandromme¹, Angelina Kasprowicz¹, Adeline Courseaux¹, Dave Trinel¹, Maud Facon¹, Jean-Luc Putaux², Christophe D'Hulst¹, Fabrice Wattebled^{1*} and Corentin Spriet^{1*}

¹ Univ. Lille, CNRS, UMR8576 – UGSF – Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France.

² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV, F-38000 Grenoble, France

* Correspondence:

Fabrice Wattebled: fabrice.wattebled@univ-lille.fr

Corentin Spriet: corentin.spriet@univ-lille.fr

Keywords: Starch; confocal fluorescence imaging; machine learning; Arabidopsis; starch granule morphology; autofluorescence.

Number of words: 3203

Number of figures: 4

Abstract

Starch granules that accumulate in the plastids of plants vary in size, shape, phosphate or protein content according to their botanical origin. Depending on their size, the applications in food and non-food industries differ. Being able to master starch granule size for a specific plant, without alteration of other characteristics (phosphate content, protein content, etc.) is challenging. The development of a simple and effective screening method to determine the size and shape of starch granules in a plant population is therefore of prime interest. In this study, we propose a new method, NegFluo, that combines negative confocal autofluorescence imaging in leaf and machine learning-based image analysis. It provides a fast, automated and easy-to-use pipeline for both *in situ* starch granule imaging and its morphological analysis. NegFluo was applied to *Arabidopsis* leaves of wild-type and *ss4* mutant plants. We validated its accuracy by comparing morphological quantifications using NegFluo and state-of-the-art methods relying either on starch granule purification or on preparation-intensive electron microscopy combined with manual image analysis. NegFluo thus opens the way to high-throughput *in situ* analysis of starch granules.

Introduction

Starch is a polysaccharide that accumulates in plants and is synthesized either in photosynthetic or storage organs. In leaves, starch accumulates during the day and is degraded at night to provide carbon and energy for the plant in the absence of photosynthetic activity (Pfister & Zeeman, 2016).

This polysaccharide represents the main source of caloric intake of human nutrition. Millions tons of starch are extracted each year in the world from three main species: maize, wheat and potato (Burrell, 2003). Depending on the plant source, the shape, size and composition of the starch granule (amylose/amylopectin ratio, but also lipid, protein or phosphate content) vary greatly (Jane et al., 1994). This is why the biological origin of starch strongly influences the properties and use of the polymer (Singh et al., 2003; Singh et al., 2007; Alcazar-Alay & Meireles, 2015). A large part of the starch extracted is enzymatically digested to produce sweeteners. It is also often chemically or physically modified to impart new properties. The starch granule size is one of the parameters that influence its digestibility (Dhital et al., 2010; Abebe et al., 2015) and the effectiveness of chemical and physical transformations (Zhao et al., 2015; Wang et al., 2016; Farooq et al., 2018). In this context, controlling the factors conditioning starch granule size *in planta* without impairing neither the ultrastructure nor the composition of the granules would represent a decisive advantage. Understanding the initial steps of starch synthesis would open the route to control the number of starch granules produced in each plastid and consequently their size for a given carbon flux: the fewer initiation events, the larger the granules.

In recent years, various factors involved in new starch granule initiation and influencing the size and / or shape of these granules have been identified in *Arabidopsis thaliana* (Malinova et al., 2018). These proteins include specific isoforms of starch synthases, SS4 and SS3 (Roldán et al., 2007; Szydlowski et al., 2009) as well as non-catalytic proteins such as PTST2, and PTST3 (Seung et al., 2017), PII1/MRC and MFP1 (Seung et al., 2018; Vandromme et al., 2018).

Starch synthesis in the photosynthetic organs is very similar to that in the storage organs and requires the same set of proteins (Pfister and Zeeman, 2016). Moreover, genes coding proteins involved in the starch initiation process in *Arabidopsis* are also conserved in crops. Therefore, increasing our knowledge of the factors influencing the

size and / or shape of starch granules on a model species will provide new possibilities for varietal improvement.

Nevertheless, the acquisition of this knowledge requires the establishment of a simple and rapid screening procedure. Current tools for the detection of change in size and shape of starch granules require the extraction and purification of the granules, followed by a particle counter analysis (Vandromme et al., 2018), or by sample observations under a light or electron microscope (Roldán et al., 2007; Lappe et al., 2017). In addition, variations in the number of starch granules per plastid are generally evaluated from leaf sections observed under a light or electron microscope. This technique, however, depends on the section plane and a large number of analyzes must be carried out to obtain statistically reliable data (Seung et al., 2017). While these different techniques are suitable to characterize a specific mutant line, they are cumbersome, expensive and ultimately incompatible for screening large collection of individuals.

In this paper, we describe an image acquisition and analysis method that requires only a minimum of preparation and yet sufficiently resolutive to identify a variation in the size and shape of starch granules in plant tissues. We focused our study on starch accumulated in the chloroplasts of leaf cells of the model species *Arabidopsis thaliana*. In a wild-type line, chloroplasts contain on average 5 to 7 starch granules having a size between 0.8 and 1 μm (Malinova et al., 2018; Vandromme et al., 2019). Our technique was also applied to a mutant line impaired for the soluble starch synthase 4 (SS4). This line exhibits a reduced number of starch granules per chloroplast. Moreover the remaining granules are modified in size and shape compared to the wild type, conferring a good validation of the new screening method (Roldán et al., 2007).

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana lines were obtained from NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre; <http://arabidopsis.info> (Alonso et al., 2003)). Columbia (Col-0) line was used as wild-type reference and SS4 deficient line corresponds to *ss4-1* (GABI_290D11) already described in (Roldán et al., 2007). In all cases, plants were grown in a growth chamber (GroBank, BB-XXL.3+). Conditions used were 16 h : 8 h, light : dark photoperiod at 23 °C during the day and 20 °C during the night, 120 $\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Seeds were

incubated at 4 °C in 0.1 % Phytigel solution (w/v) during 3 days before being sown on peat-based compost.

Sample preparation

Sample preparation was adapted from the protocol described in Vandromme et al (2019). For each genotype, one leaf of 2-week-old plants was harvested at the end of the light phase and placed under vacuum in 1 mL fixating solution (4% (w/v) paraformaldehyde, 4% (w/v) sucrose, phosphate buffered saline (PBS 1X) at pH 7.3). Fixed leaves were washed in water. A section of 2x2 mm was then placed between a slide and a coverslip. To ensure optimal acquisition, the leaves midrib was excluded from the selected samples from which the lower epidermis is placed in front of the objective.

Confocal acquisition

The prepared samples were observed under A1 Nikon confocal microscope (Nikon Instruments Europe B.V.) with a Plan Apo 60x Oil (NA = 1.4) objective. The autofluorescence was acquired with $\lambda_{ex} = 488$ nm and $\lambda_{em} = 500-550$ nm (green channel), and with $\lambda_{ex} = 561$ nm and $\lambda_{em} = 570-620$ nm (red channel). To further increase the contrast between leaf autofluorescence and starch darkness, median filtering and contrast-limited adaptative histogram equalization (blocksize 20, histogram bins, 50, maximum slope 2.5) was applied using an ImageJ macro before the machine learning step (Majunder and Kumar, 2014).

Machine learning

The machine learning approach is based on the “Waikato Environment for Knowledge Analysis” (WEKA), implementation in ImageJ (Witten et al., 2016). We first defined a classification between four categories: starch granule, plastid, membranes and background. These training features thus provided more than 300 parameters for each pixel and allowed unambiguous discrimination between the four classes after appropriate training. Manual labeling was performed in a pixel-by-pixel basis between the four classes. To avoid overlearning, training was performed on confocal images of leaves from the wild type and a mutant line affected for the starch metabolism. Once an accuracy of 80% was reached, a classifier was applied to new sets of imaging to validate

the training step. Then, for each initial image, a probability map was obtained for each category and was used for segmentation.

Segmentation

Automated analysis allows screening through a high number of images. Thus, we chose to analyze starch granules with the highest confidence level possible. Probability maps were first thresholded to an 80% confidence interval for both starch granules and plastids. To reinforce the accuracy, we developed an ImageJ macro combining i) various binary operations to ensure that detected starch granules were completely embedded into plastids, ii) watershed operations to separate adjacent granules (Beucher, 1992), iii) automated particle detection. This additional pipeline ensures that starch granules that are out of focus or at the edge of the image are excluded from statistical analysis. Extracted parameters were then plotted and statistical analysis was performed using Excel (Microsoft).

Granule size distribution

The starch purification and granule size determination using a Multisizer 4 Coulter counter (Beckman Coulter Life Science, Indianapolis, IN, USA) equipped with a 20 μm aperture tube are fully described in Vandromme et al. (2019).

Scanning electron microscopy

Leaf fragments were fixed with glutaraldehyde, post-fixed with osmium tetroxide (OsO_4) and embedded in Epon resin. The blocks were cut with a diamond knife in a Leica UC6 ultramicrotome. Backscattered electron images of the non-conductive surface were recorded under a low pressure of air (100 Pa) in a FEI Quanta 250 FEG environmental scanning electron microscope (ESEM) operating at 7 kV. SEM images are used in Figure 2.

Transmission electron microscopy

Samples were prepared as described in Boyer et al (2016). Leaves from 3-week-old plants were harvested at the end of the day and fixed with glutaraldehyde. Samples were post-fixed with OsO_4 and embedded in Epon resin. About 70 nm-thin sections were cut with a diamond knife in a Leica UC6 ultramicrotome and post-stained with periodic acid

thiosemicarbazide silver proteinate (PATAg) (Gallant and Guilbot 1969). Samples were observed with a Philips CM200 transmission electron microscope (TEM) operating at 80 kV. Images were recorded on Kodak SO163 films. TEM images are used to determine the starch granule areas presented in Figure 4.

Results

1. *In situ* confocal starch imaging

In situ starch granule imaging performed on fresh leaves is quite challenging. Indeed, most plastid components generate a high autofluorescence with a global broad excitation and emission spectrum. Thus, traditional strategies involving tagging, like iodine staining (Ovecka et al., 2012), are not enough contrasted and thus not efficient. In this study, we decided to invert the problem. Indeed, starch granules, contrary to all the other leaf cell components present a low autofluorescence. Thus, we decided to develop an approach based on inverse fluorescence imaging of starch granule (NegFluo). The first step was to perform the spectral characterization of the leaves.

Our spectral observations of *A. thaliana* leaves allowed us, according to the literature (Roshchina, 2012), to determine three main spectral emission bands of autofluorescence i) in blue for a maximum emission at 450 nm (azulenes and phenols), ii) in green, for a maximum at 550 nm (carotenoids), and in red, for a maximum at 680 nm (chlorophyll). A more precise analysis of the differential between the "non-signal" of the starch granules and the surrounding signals allowed us to limit the procedure to a two-channel focusing on carotenoids and chlorophyll.

Two color images were then processed using a homemade ImageJ macro in order to reduce the noise and to increase local contrast. This macro further improves contrast between starch granules and the surrounding plastids. In order to validate this new visualization method, we first chose two well-described and contrasted samples: a wild-type reference (Col-0) and the *ss4* mutant. *A. thaliana* leaves were collected at the end of the illuminated period (when the starch amount is maximum) and for practical reasons, fixed with paraformaldehyde (Figure 1).

These samples were then observed through NegFluo and compared to traditional electron microscopy imaging. As shown in Figure 2, both methods provide equivalent

visual estimate of starch granule phenotype. We have recently applied NegFluo to decipher phenotypes of *pii1* mutant as described by Vandromme et al. (2019).

2. Machine learning for automated starch granule segmentation

To characterize the starch granules in more details, one needs to measure their size and shape. However, manual segmentation is time-consuming and not adapted to analyze a large number of starch granules. While NegFluo provides ease to visually analyze images, extracting robust parameters to automatically discriminate between the different structures of the leaf is not trivial using parametric approaches. We thus developed a machine learning (ML) based pipeline to circumvent this technical limitation.

We developed the procedure based on Trainable Weka Segmentation module, since it combines the benefits of i) Fiji (Schindelin et al., 2015) for image processing, and simplicity of the manipulation of microscopy files by biologists, and ii) WEKA for ML (Hall et al., 2008).

Moreover, its implementation is modular and transparent, which allowed us to control the different steps as well as the possibility of customizing the algorithms and their evaluation (Arganda-Carreras et al., 2017). The NegFluo-ML algorithm follows two main steps: the extraction of images characteristics and the semantic segmentation by classification of pixels.

i) The initial image (Figure 3a) was first modified to highlight different characteristics of the objects. At first glance, we could classify them into four broad categories (Arganda-Carreras et al., 2017): edge detection, texture filters, noise reduction, and cytosol detection (Figure 3b). The set of these filters, and the different parameters that we could adjust, make it possible to obtain more than 300 images (Figure 3c) starting from the initial image. To achieve the best compromise between accuracy and training speed, we selected training features based on Gaussian blur, Sobel filter, hessian, difference of Gaussians, membrane projections, variance, mean, anisotropic diffusion, bilateral, Lipschitz, Kuwahara, Gabor, entropy and neighbors. The algorithm could then analyze each original pixel through 300 parameters that will be used to determine its belonging to the appropriate class (Figure 3d). The converted

image was then generated based on attribution of each pixel to one of the different classes (Figure 3e).

ii) Dozens of Arabidopsis leaf images were manually labelled in several classes. We tested configuration ranging from two classes (starch granules/non-starch granules) to five classes (starch granules, plastids, membranes, background, and vacuole). The optimal configuration consisted of defining four classes: the starch granule, the plastid, the cytosol delimited by cell membrane and the background. Below four classes, the algorithm could not properly discriminate between starch granules and background while five classes increased the number of pixels inaccurately attributed between these two dark-pixel structures. Different classifiers were also available. We selected the fast random forest (200 initial trees). It required a relatively low number of images for training (20 labelled images), was polyvalent, avoided overfitting and its computational cost for training was low. Part of the image pixels were then used for training, while the remaining pixels were subject to the algorithm to validate its accuracy (Figure 3b).

iii) Once the classifier was trained, it was applied to new images and provided four probability maps. Thus, each pixel was assigned with a probability to be part of each category. Pixel color corresponds to the higher probability between the starch granule (red), the plastid (green), the membranes (blue) and the background (white) (Figure 3d and e).

iv) From the probability maps, one could apply a traditional segmentation algorithm. To ensure optimal quality of starch detection, we developed an ImageJ macro i) segmenting pixels with a probability higher than 80%, ii) segmenting starch granule with starch pixels embedded in plastids pixels, iii) separating adjacent starch granules based on the watershed algorithm. Morphological properties of starch granules were then extracted from the segmented images (Figure 3e).

3. Automated morphological characterization of starch granules

While visual inspection of segmented images was perfectly consistent, NegFluo-ML allowed morphological characterization of starch granules and various parameters such as area, perimeter or diameter could be extracted (Figure 4a). In all cases, extracted parameters are significantly higher for *ss4* starch granules compared to wild type, which is in complete agreement with already published data (Roldan et al, 2007; Crumpton-

Taylor et al., 2013). Furthermore, since the method was automated, a large number of granules could be measured, giving access to the global size distribution such as illustrated on the granules area in Figure 4b. In both Col-0 and *ss4* lines, starch granule size distribution behave like a Gaussian curve. The curve is shifted toward higher size in the *ss4* line.

To ensure the relevance of these measurements, it was required to compare morphological parameters extracted from NegFluo-ML to state-of-the-art starch analysis methods. We thus analyzed images from Col-0 and *ss4* and compared them to both manual analysis of electron microscopy images (area, Figure 4c) and to extracted starch granules analyzed with a Coulter counter (diameter, Figure 4d). For electron microscopy analyses, we used images previously acquired from transmission electron microscopy (TEM) and manually determined starch granule size using ImageJ software. Several tens of starch granule areas were determined for Col-0 and *ss4* (61 and 70 respectively). While the average starch granule areas are significantly different between Col-0 and *ss4* using both methods ($p < 0.001$ with both technics). Starch granules size was also determined using a Coulter counter and the results were compared to those obtained by NegFluo-ML. Again, the results are consistent between the two methods and the differences between the diameters of the Col-0 and *ss4* starch granules can be highlighted by both technics.

Measurements performed using NegFluo-ML were in perfect agreement with those obtained with previously used methods without the need to embedded the samples in a resin for electron microscopy or to extract starch granules for coulter analysis.

Discussion

With this work, we propose a complete new pipeline for *in situ* starch granule morphological characterization. Previous works using confocal imaging for *in situ* starch granule observation (Ovecka et al., 2012) required several steps of sample preparation and iodine staining. In this example, starch granule is anti-correlated to chlorophyll autofluorescence signal. However, because of leaf autofluorescence heterogeneity, taking into account of chlorophyll autofluorescence alone does not allow precise discrimination of starch granule size and shape. The new proposed approach, combining imaging of several leaf autofluorescence signals, allows performing a negative

fluorescence image providing the same morphological information without the need of starch granule staining or extensive sample preparation. It can be applied to both fresh and fixed leaf slices.

Although NegFluo provides an instant overview of starch granule phenotype, quantification of starch granule shape and size *in situ* remains challenging whatever the acquisition technique. We thus developed NegFluo-ML, a procedure combining state of the art machine learning methods with segmentation methods from the traditional signal-processing field. While both methods are highly complementary, it overcomes their individual limitation with a faster training, requiring only dozens of images and maintaining a high detection accuracy.

We validated these methods compared to either high throughput purified granule methods or to manual analysis of SEM images. While the results are highly comparable, NegFluo-ML presents several advantages. Compared to the first, morphological information can be associated to local information such as the number of granule per plastid and granule morphology, which are lost in a particle counter. Compared to manual analysis of leaf images, it provides two main advantages. The most obvious is the time gained through the process. Indeed, manual segmentation of images showing hundreds of starch granules is time consuming and reduces therefore the overall number of analyzed structures. Furthermore, human segmentation is often highly impacted by user-biased analysis. Indeed, humans have their individual ways to select objects boundaries or to discard objects that seems non-representative. Thus, different experimenters cannot perform such studies with a good reproducibility and NegFluo-ML overcomes this limitation.

This manuscript focuses on the complete NegFluo/NegFluo-ML package applied to starch granule study in *Arabidopsis* leaf, but it can easily be extended. While both modules provides a complete acquisition and analysis pipeline, they are independent and thus NegFluo-ML can easily be transferred to other imaging methods such as SEM by adapting training features. Transposition to other plants can also be easily done by autofluorescence characterization adaptation. It thus opens the way to *in situ*, reliable, fast and easy to implement high-throughput morphological characterization of starch granules.

Author Contributions

Camille Vandromme	Investigation, Formal Analysis
Angelina Kasprowicz	Formal Analysis
Adeline Courseaux	Investigation
Dave Trinel	Formal Analysis
Maud Facon	Formal Analysis
Jean-Luc Putaux	Investigation
Christophe D'Hulst	Project Administration, Writing – Review & Editing
Fabrice Wattebled	Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing
Corentin Spriet	Conceptualization, Methodology, Writing – Review & Editing, Formal Analysis

Acknowledgements:

The authors would like to thank Ofilia Mvundza Ndjindji (CERMAV) for the preparation of ultrathin sections, Christine Lancelon-Pin (CERMAV) for the ESEM observations, and the NanoBio-ICMG Platform (FR 2607) for granting access to the Electron Microscopy facility. We are indebted to the Research Federation FRABio (University of Lille, CNRS) for providing the technical environment conducive to achieving this work. We thank Agence Nationale de la Recherche for funding ('CaSta-DivA' Project, grant no. ANR-11-BSV6-0003)

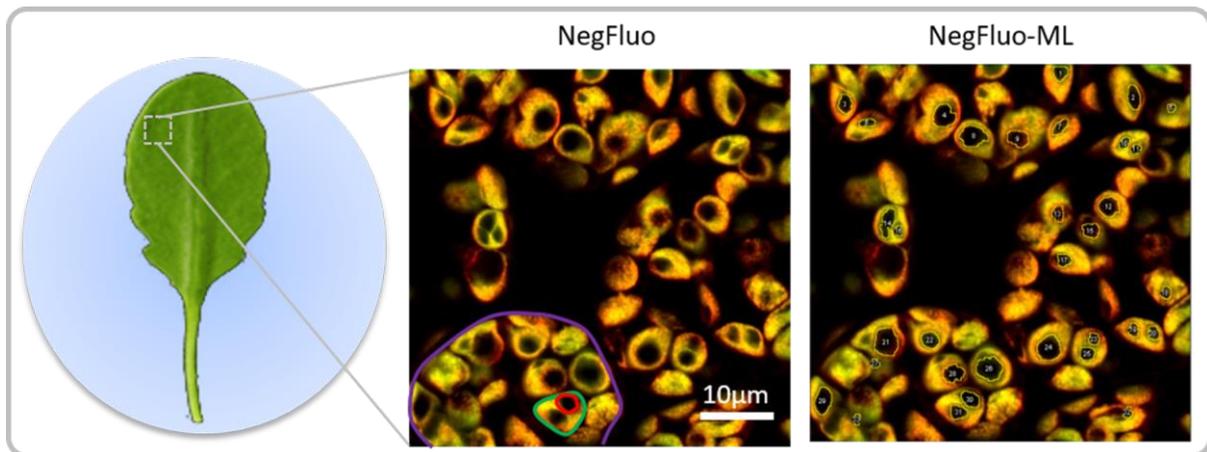


Figure 1:

NegFluo starch analysis pipeline.

Leaves of 2-week-old *Arabidopsis thaliana* were collected at the end of the illuminated period and fixed. A 2 mm x 2 mm fragment was placed between slide and coverslip before autofluorescence confocal imaging. In-focus cells, plastids and starch granules can easily be observed as respectively highlighted in violet, green and red through NegFluo. A local enhancement step is then applied to ease the machine-learning based segmentation step, NegFluo-ML. Starch granules size and morphology can then be measured.

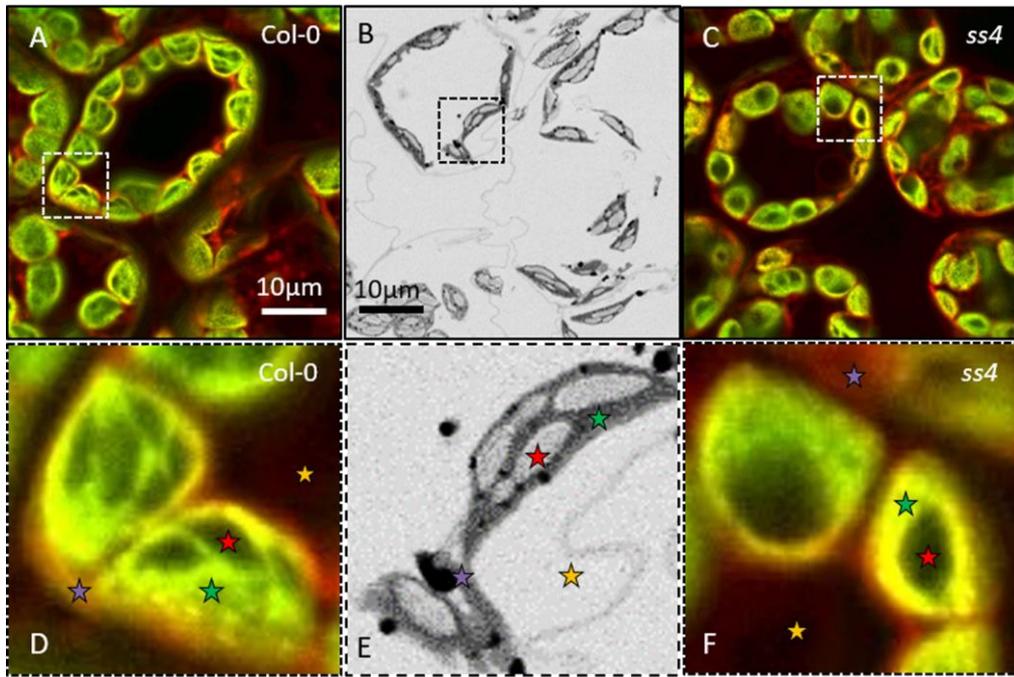


Figure 2:

NegFluo applied to reference samples.

To validate the procedure, we acquired NegFluo of Col-0 (A and D) and *ss4* (C and F) and ESEM images of Col-0 (B and E). Both techniques provide the same morphological information. Representative leaf components are highlighted with colored stars (red, starch; green, plastid stroma; violet, cell membranes and cytosol; yellow, background).

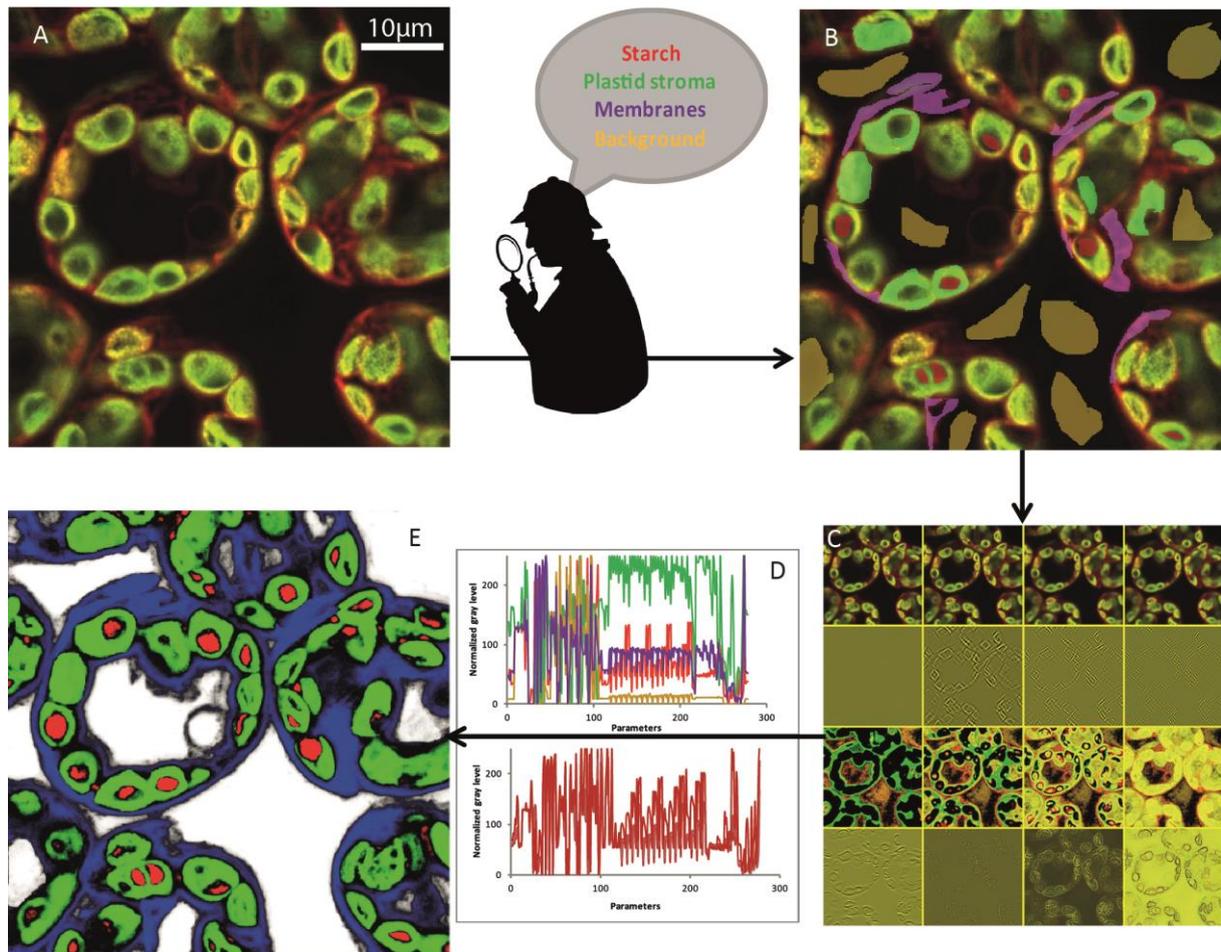


Figure 3:

NegFluo-ML machine learning based segmentation step.

A set of NegFluo images (A), was manually and partially labeled in four classes (B) that were used for training (red, starch; green, plastid stroma; violet, membranes; yellow, background). The algorithm then created from each image a stack of hundreds of its transformed versions (12 examples of the transformed image from (A) is presented in (C), see text for parameters details). Thus, each pixel can now be described by hundreds of parameters than are used to discriminate between the four classes. In (D), upper graph, four pixels from different regions were compared (red, starch; green, plastid stroma; violet, cell membranes and cytosol; yellow, background) while the bottom graph compares four pixels from starch region. The machine-learning algorithm is then trained, using several images taken from different samples, to find the best sets of parameters allowing pixels classification between the four classes. Once the training reaches the desired accuracy level, it provides for each pixel a probability to be part of each class. It thus convert the original image in four probability maps (E) (red, starch; green, plastid stroma; blue, cell membranes and cytosol; white, background). Finally, the

trained algorithm is applied to a new set of images to validate its accuracy and ensure its applicability to any samples. Traditional segmentation algorithms can then be used for morphometric analysis.

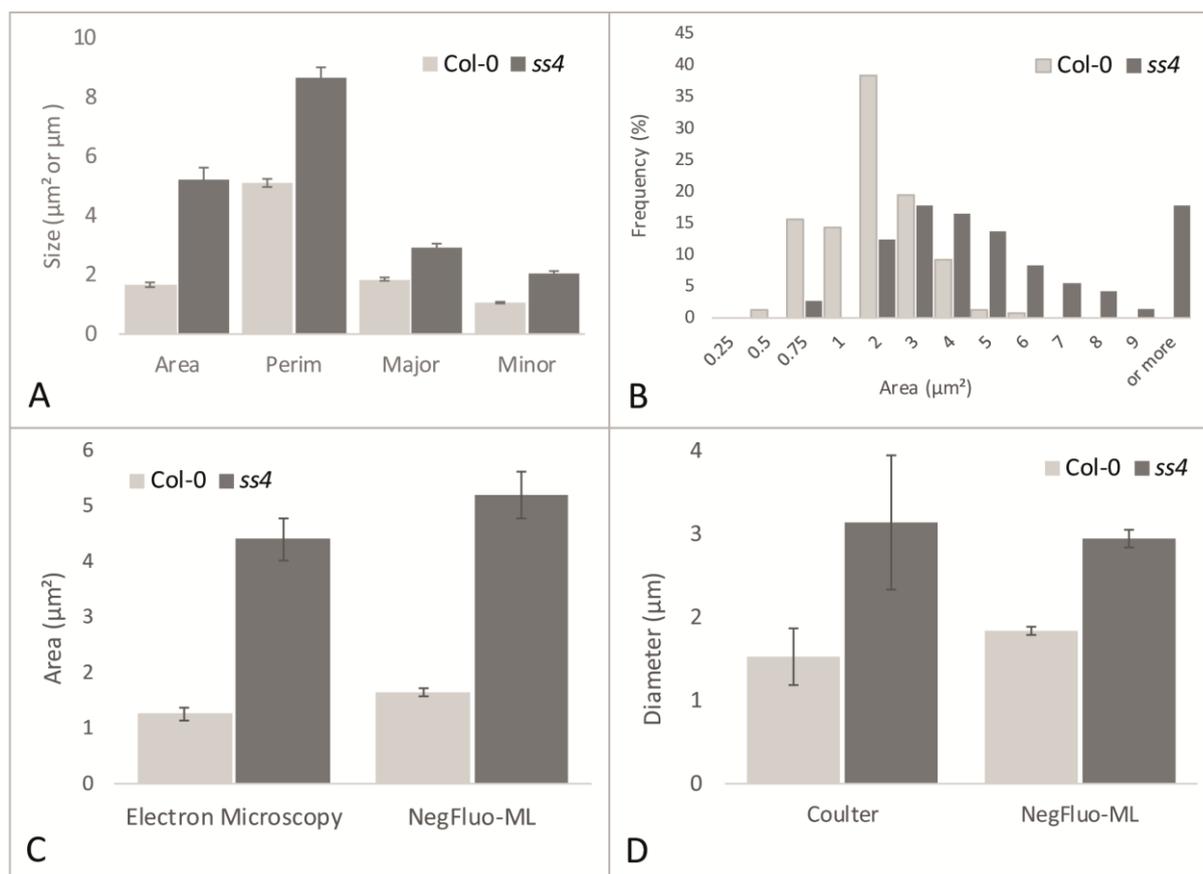


Figure 4:

NegFluo-ML morphological analysis of Col-0 and *ss4* starch granules. Several parameters can be measured from segmented starch granules. In (A), four parameters are represented: area (μm^2), perimeter (Perim, μm), major and minor axis (Major, Minor, μm). Beyond this traditional representation of means and standard error, this automated procedure ensures the analysis of hundreds of granules allowing distribution analysis as depicted for granules area in (B). NegFluo-ML thus allows unambiguous discrimination between Col-0 and *ss4* phenotypes. Furthermore, NegFluo-ML provides equivalent estimates for both area and diameters quantification compared to two state of the art methods: manual quantification determined from transmission electron microscopy images (C) and Coulter counter (D). For Coulter-counter measurement, the values correspond to the average size of 30,000 particles determined from purified starch. The manual analysis of TEM images corresponds to a total of 61 and 70 granules, while NegFluo-ML automatically analyzed 153 and 74 granules for Col-0 and *ss4* respectively. Vertical error bars represent a standard error. This value doesn't represent a measurement error but reflect the diversity of the starch granules sizes as illustrated in panel B.

References:

- Abebe W, Collar C, Ronda F. 2015.** Impact of variety type and particle size distribution on starch enzymatic hydrolysis and functional properties of tef flours. *Carbohydrate Polymers* **115** (Supplement C): 260-268.
- Alcazar-Alay SC, Meireles MAA. 2015.** Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology* **35**(2): 215-236.
- Beucher S. 1992.** The watershed transformation applied to image segmentation. 10th Pfefferkorn conference, Signal and image processing in microscopy and microanalysis (1991; Cambridge). *Scanning Microscopy -supplement-* (6): 299-314.
- Boyer L, Roussel X, Courseaux A, Ndjindji OM, Lancelon-Pin C, Putaux JL, Tetlow IJ, Emes MJ, Pontoire B, D'Hulst C, Wattebled F. 2016.** Expression of Escherichia coli glycogen branching enzyme in an Arabidopsis mutant devoid of endogenous starch branching enzymes induces the synthesis of starch-like polyglucans. *Plant, Cell & Environment* **39**(7): 1432-1447.
- Burrell MM. 2003.** Starch: the need for improved quality or quantity-an overview. *Journal of Experimental. Botany.* **54**(382): 451-456.
- Crumpton-Taylor M, Pike M, Lu K-J, Hylton CM, Feil R, Eicke S, Lunn JE, Zeeman SC, Smith AM. 2013.** Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during Arabidopsis leaf expansion. *New Phytologist* **200**(4): 1064-1075.
- Dhital S, Shrestha AK, Gidley MJ. 2010.** Relationship between granule size and in vitro digestibility of maize and potato starches. *Carbohydrate Polymers* **82**(2): 480-488.
- Farooq AM, Li C, Chen S, Fu X, Zhang B, Huang Q. 2018.** Particle size affects structural and in vitro digestion properties of cooked rice flours. *International Journal of Biological Macromolecules* **118** (Pt A): 160-167
- Gallant D, Guilbot A. 1969.** Etude de l'ultrastructure du grain d'amidon à l'aide de nouvelles méthodes de préparation en microscopie électronique. *Starch - Stärke* **21**(6): 156-163.
- Jane J-L, Kasemsuwan T, Leas S, Zobel H, Robyt JF. 1994.** Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch - Stärke* **46**(4): 121-129.

- Lappe RR, Baier JW, Boehlein SK, Huffman R, Lin Q, Wattedled F, Settles AM, Hannah LC, Borisjuk L, Rolletschek H, et al. 2017.** Functions of maize genes encoding pyruvate phosphate dikinase in developing endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**(1): E24-E33.
- Majumdar J, Kumar S. 2014.** Modified clahe: an adaptative algorithm for contrast enhancement of aerial, medical and underwater images. *International journal of computer engineering & technology (IJCET)* **5**(11): 32-47.
- Malinova I, Qasim HM, Brust H, Fettke J. 2018.** Parameters of Starch Granule Genesis in Chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* **9**: 761.
- Ovecka M, Bahaji A, Muñoz FJ, Almagro G, Ezquer I, Baroja-Fernández E, Li J, Pozueta-Romero J. 2012.** A sensitive method for confocal fluorescence microscopic visualization of starch granules in iodine stained samples AU - Ovecka, Miroslav. *Plant Signaling & Behavior* **7**(9): 1146-1150.
- Pfister B, Zeeman SC. 2016.** Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**(14): 2781-2807.
- Roldán I, Wattedled F, Lucas MM, Delvallé D, Planchot V, Jiménez S, Pérez R, Ball S, D'Hulst C, Mérida Á. 2007.** The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *The Plant Journal* **49**(3): 492-504.
- Seung D, Boudet J, Monroe JD, Schreier TB, David LC, Abt M, Lu K-J, Zanella M, Zeeman SC. 2017.** Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH Control Starch Granule Initiation in *Arabidopsis* Leaves. *The Plant Cell* **29**(7): 1657-1677.
- Seung D, Schreier TB, Bürgy L, Eicke S, Zeeman SC. 2018.** Two plastidial coiled-coil proteins are essential for normal starch granule initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **30**(7): 1523-1542
- Singh J, Kaur L, McCarthy OJ. 2007.** Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications—A review. *Food Hydrocolloids* **21**(1): 1-22.
- Singh N, Singh J, Kaur L, Singh Sodhi N, Singh Gill B. 2003.** Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry* **81**(2): 219-231.
- Szydłowski N, Ragel P, Raynaud S, Lucas MM, Roldan I, Montero M, Munoz FJ, 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. *The Plant Cell* **21**(8): 2443-2457.

Vandromme C, Spriet C, Dauvillée D, Courseaux A, Putaux J-L, Wychowski A, Krzewinski F, Facon M, D'Hulst C, Wattebled F. 2019. PII1: a protein involved in starch initiation that determines granule number and size in Arabidopsis chloroplast. *New Phytologist* **221**: 356-370.

Wang C, Tang C-H, Fu X, Huang Q, Zhang B. 2016. Granular size of potato starch affects structural properties, octenylsuccinic anhydride modification and flowability. *Food Chemistry* **212**(Supplement C): 453-459.

Witten I, Frank E, Hall M. 2016. Data Mining 4th edition: Practical machine learning tools and techniques. **Appendix B - The WEKA workbench**: 553-571.

Zhao J, Chen Z, Jin Z, Buwalda P, Gruppen H, Schols HA. 2015. Effects of granule size of cross-linked and hydroxypropylated sweet potato starches on their physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**(18): 4646-4654.