

Université de Lille, Faculté des sciences et technologies

École doctorale Biologie Santé

THÈSE DE DOCTORAT

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

François SEVESTRE

En vue de l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille

**Mise en œuvre de l'édition génomique par CRISPR/Cas9
pour l'étude fonctionnelle des amidon-synthases chez la
pomme de terre (*Solanum tuberosum*).**

Présentée le 14 décembre 2020 devant la commission d'examen :

Président :	Dr. Fabien NOGUÉ	<i>INRAE Versailles</i>
Rapporteurs :	Pr. Hervé VANDERSCHUREN	<i>KU Leuven</i>
	Dr. Yonghua LI-BEISSON	<i>CEA Cadarache</i>
Examineurs :	Dr. Caroline RAMBAUD	<i>Université de Lille</i>
Directeur de thèse :	Dr. Fabrice WATTEBLED	<i>Université de Lille</i>
Encadrant de thèse :	Dr. Nicolas SZYDLOWSKI	<i>Université de Lille</i>

Résumé

La pomme de terre est une plante de la famille des solanacées qui est cultivée pour ses tubercules. Cet organe de réserve constitue un aliment de base pour de nombreuses populations dans le monde. Il est riche en amidon, un polysaccharide stocké sous forme de grains insolubles dans des organites spécialisés : les amyloplastés. Le métabolisme de l'amidon est complexe et finement régulé par de nombreuses enzymes dont les amidon-synthases. Ces enzymes sont responsables de la création de nouvelles liaisons O-glucosidiques de type α -1,4. Plusieurs isoformes d'amidon-synthases ont déjà été caractérisées chez les plantes (GBSS, SS1, SS2, SS3, SS4 et SS5). De plus, une nouvelle isoforme nommée SS6 (Starch Synthase 6) a récemment été identifiée au laboratoire par analyse protéomique chez la pomme de terre. La génomique fonctionnelle chez la pomme de terre était, jusqu'à récemment, limitée par le caractère tétraploïde et le mode de reproduction uniquement végétatif des variétés cultivées. L'émergence récente de la mutagenèse dirigée et en particulier du système CRISPR/Cas9 lève cette barrière en permettant notamment l'inactivation ciblée de gènes.

Dans un premier temps, nous avons séquencé le génome de la variété de pomme de terre tétraploïde Désirée. Cette analyse a révélé un fort polymorphisme intrinsèque. J'ai utilisé ces données pour établir la cartographie des polymorphismes et mettre au point un outil d'assistance au design des cibles lors de l'édition génomique de la pomme de terre. J'ai ensuite caractérisé l'amidon issu de plantes préalablement mutées au locus GBSS par CRISPR/Cas9 et mis en évidence une accumulation de SS2 et GWD dans l'amidon. En conséquence, les contenus en phosphate, notamment en position C6 des résidus de glucose, sont augmentés. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du métabolisme et de l'assemblage des enzymes avec les polysaccharides de l'amidon.

Nous avons par ailleurs montré que SS6 est présente chez les dicotylédones à l'exception des Brassicaceae. La version recombinante de la protéine de pomme de terre exprimée chez *E.coli* est active sur le glycogène et permet l'allongement des glucanes de DP2 à DP5. De plus, la protéine fusionnée avec la GFP et exprimée *in planta* est localisée dans l'amyloplaste, confirmant les observations initialement faites au laboratoire lors de la caractérisation du protéome associé à l'amidon de pomme de terre. J'ai étudié la fonction de SS6 *in planta* en produisant des lignées KO pour le gène correspondant par CRISPR/Cas9 et en surexprimant la protéine native sous contrôle du promoteur 35S. La surexpression du gène provoque une diminution du diamètre moyen des grains d'amidon au stade tardif du développement des tubercules suggérant que l'enzyme intervient dans la régulation de la taille et donc supposément du nombre de grains d'amidon. Nous avons de plus observé de légères modifications de la structure de l'amidon dans les lignées knock-out ss6-. En effet, l'amylopectine des lignées mutantes présente une diminution des glucanes de DP6 à DP14 et une augmentation des glucanes de DP15 à DP21. Bien que subtiles, ces modifications corroborent l'activité observée avec la protéine recombinante *in vitro*. L'inactivation de SS6 pourrait être partiellement compensée par l'activité d'autres amidon-synthases redondantes, comme ceci fut observé dans de nombreux cas et chez de nombreuses espèces. La production de combinaisons de mutations pour SS6 et les autres gènes amidon-synthases permettra de mieux comprendre le rôle de cette enzyme dans le métabolisme de l'amidon de réserve.

Abstract

The potato is a plant of the solanaceae family that is cultivated for its tubers. This reserve organ is a staple food for many populations around the world. It is rich in starch, a polysaccharide stored in the form of insoluble granules in specialized organelles: the amyloplasts. Starch metabolism is complex and finely regulated by many enzymes including starch synthases. These enzymes are responsible for creating new α -1,4-type O-glycosidic bonds. Several isoforms of starch synthases have already been characterized in plants (GBSS, SS1, SS2, SS3, SS4 and SS5). In addition, a new isoform called SS6 (Starch Synthase 6) has recently been identified in the laboratory by proteomic analysis in potato. Functional genomics in potato were, until recently, limited by the tetraploid character and the uniquely vegetative mode of reproduction of cultivated varieties. The recent emergence of site-directed mutagenesis and in particular of the CRISPR/Cas9 system removes this barrier, in particular allowing the targeted inactivation of genes.

First, we sequenced the genome of the tetraploid potato variety Désirée. This analysis revealed a strong intrinsic polymorphism. I used this data to map polymorphisms and to develop a target design assistance tool in potato genomic editing. I then characterized the starch from plants previously mutated at the GBSS locus by CRISPR/Cas9 and demonstrated an accumulation of SS2 and GWD in the starch. Consequently, the phosphate contents, in particular at the C6 position of the glucose residues, are increased. These results open new perspectives in understanding the metabolism and assembly of enzymes with starch polysaccharides.

We have also shown that SS6 is present in dicotyledons except Brassicaceae. The recombinant version of the potato protein expressed in *E.coli* is active on glycogen and allows the elongation of glucans from DP2 to DP5. In addition, the protein fused with GFP and expressed in planta is localized in the amyloplast, confirming the observations initially made in the laboratory during the characterization of the proteome associated with potato starch. I studied the function of SS6 in planta by producing KO lines for the corresponding gene by CRISPR/Cas9 and by overexpressing the native protein under the control of the 35S promoter. Overexpression of the gene causes a decrease in the mean diameter of the starch grains at the late stage of tuber development suggesting that the enzyme is involved in the regulation of the size and therefore supposedly the number of starch granules. We also observed slight changes in starch structure in the *ss6*-knockout lines. Indeed, the amylopectin of the mutant lines shows a decrease in glucans from DP6 to DP14 and an increase in glucans from DP15 to DP21. Although subtle, these changes corroborate the activity observed with the recombinant protein *in vitro*. Inactivation of SS6 may be partially offset by the activity of other redundant starch synthases, as has been observed in many cases and in many species. The generation of combinations of mutations for SS6 and other starch synthase genes will provide insight into the role of this enzyme in the metabolism of starch storage.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse, le Dr Fabien Nogué, Pr Hervé Vanderschuren, Dr Caroline Rambaud, Dr Yonghua Li.

Un grand Merci également à mon directeur de thèse le Dr Fabrice Wattebled et à toute l'équipe de PlaStoPol de l'UGSF. Je ne peux pas non plus oublier le Dr Nicolas Szydlowski qui m'a permis de rejoindre l'équipe et que je remercie grandement pour tous ses conseils. Merci aussi pour tous les moments passés ensemble, devant un kebab ou une bière!

Merci à Stan, Mara, Claudine, Océane et Camille, la team'patate du moment. Vous m'avez tous beaucoup aidé et vous contribuez à la bonne ambiance au laboratoire. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à Corentin Spriet pour son superbe travail de microscopie.

Je n'oublie pas non plus mes amis du C9 avec qui j'ai, pour certains, d'intéressantes discussions scientifiques, Matthieu, Ugo et Malika.

Je remercie tout le personnel de l'UGSF et celui du MSAP qui a toujours répondu présent quand j'en avais besoin !

Merci à ma famille, éloignée géographiquement mais toujours là pour me soutenir. Merci à ma sœur Tifenn, mon frère Maël, mam'Catherine et à toi aussi Kelenn!

Enfin je terminerai par remercier celle sans qui rien ne serait possible, celle qui m'a accueilli au laboratoire, celle avec qui j'ai tout partagé, mes moments de doutes, mes manip' réussies et tellement plus aussi. Merci Maud, merci de m'aimer, de me supporter au quotidien et merci de m'avoir fait le plus beau cadeau que l'on puisse souhaiter... Notre fils Léo.

Abréviations

3GPA : Acide 3-phosphoglycérique

ADNc : ADN complémentaire

ADPGlc : ADP glucose

AIA : Acide indole-3-acétique

AMY3 : Isoamylase3

ANOVA : Analyse de variance

BE : Enzyme de branchement

Cef : Céfotaxime

CRISPR/Cas9 : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated 9*

CBM48 : *Carbohydrate Binding Module 48*

DBE : Enzymes de débranchement

DO₆₀₀ : Densité optique à 600 nm

DP : Degré de polymérisation

DPE1 : Enzyme disproportionnante 1

DPE2 : Enzyme disproportionnante 1

DSB : Cassure double brin

DTT : Dithiothréitol

G1P : Glucose-1-Phosphate

G3P : Glucose-3-Phosphate

G6P : Glucose-6-Phosphate

GA3 : gibbérelline A3

GBSS : *Granule-bound starch synthase*

Gen : Gentamycine

GFP : *Green fluorescent protein*

GWD : *α-Glucan Water Dikinase*

HDR : *Homology-directed repair*

Indel : Insertion/déletion

IPTG : Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside

Kan: Kanamycine

K.O. : *knock-out* (extinction de gène)

LSF2 : *Like-sex four 2*

MEX1 : *Maltose exporter 1*

MOS : Malto-oligosaccharide

MRC : *Myosin-Resembling Chloroplast protein*

NBT : *New breeding techniques*

NGS : *Next-generation sequencing*

NHEJ : Jonction des extrémités non-homologues

NUE : *Nitrogen use efficiency*
Pi : Phosphate inorganique
PII1 : *Protein Involved in starch Initiation*
Ppi : Pyrophosphate
PHS1 : amidon-phosphorylase 1
PTST1 : *Protein targeting to starch 1*
PWD : Phosphoglucan Water Dikinase
Rif : Rifampicine
SBD : *Starch binding domain*
SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamid Gel Electrophoresis*
SNP : *Single nucléotide polymorphism*
Spe : Spectinomycine
SS1 : Amidon-synthase 1
SS2 : *Amidon-synthase 2*
SS3 : *Amidon-synthase 3*
SS4 : *Amidon-synthase 4*
SS5 : *Amidon-synthase 5*
SS6 : *Amidon-synthase 6*
SEX4 : Stach EXces 4
SuSy : *Sucrose synthase*
TALE : *Transcription Activator-Like Effector*
TALEN : *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*
timentin : Ticarcilline/acide clavulanique
WAXS : Analyse de diffusion aux rayons X grand-angles
ZR : Zéatine-riboside

Sommaire

I. Introduction.....	1
A. La pomme de terre.....	1
1. Historique et aspect botanique de <i>Solanum tuberosum</i>	1
2. Culture et aspect économique.....	3
B. L'Amidon.....	6
1. Une molécule de réserve ubiquitaire dans le monde végétal.....	6
2. Le glucose à la base d'une structure complexe.....	9
C. Le métabolisme de l'amidon : une machinerie enzymatique finement régulée.....	17
1. La synthèse.....	17
a. Les amidon-synthases.....	18
b. Les enzymes de branchement.....	28
c. Les enzymes de débranchement.....	32
d. Les facteurs de régulation de la synthèse.....	35
2. La dégradation.....	38
a. Le rôle des phosphorylations de l'amidon dans la dégradation.....	38
b. Les β -amylases.....	39
c. Les autres enzymes de la dégradation.....	39
d. L'export des produits de dégradation.....	41
3. L'initiation du grain d'amidon.....	43
D. Étude de gènes chez la pomme de terre.....	47
E. Problématiques.....	52
II. Matériel et méthodes.....	53
A. Biologie moléculaire.....	53
1. Conservation et multiplication des plasmides utilisés.....	53
2. Reséquençage du génome de pomme de terre cv. Désirée.....	53
3. Analyse des variations génétiques.....	53
4. Analyse des cibles potentielles pour CRISPR/Cas9.....	53
5. Construction des vecteurs CRISPR/Cas9 anti-SS6.....	54
6. Construction des vecteurs de surexpression de SS6 et de fusion de SS6 avec la GFP.....	54
7. Criblages des plantes pour la transformation génétique par PCR.....	54
8. Criblage des plantes transformées pour la détection de mutations.....	55
9. Génotypage par clonage et séquençage de plantes prédites mutées.....	56
10. Construction du vecteur d'expression de SS6 recombinante.....	56
B. Culture et transformation génétique de la pomme de terre.....	57
1. Matériel bactérien.....	57
2. Matériel végétal.....	57
3. Acquisition de la thermocompétence par <i>A.tumefaciens</i>	57
4. Transformation d' <i>A.tumefaciens</i>	57
5. Transformation de la <i>S.tuberosum</i> cv. Désirée.....	58
C. Analyses physiques et biochimiques de l'amidon.....	58
1. Extraction et purification de l'amidon de tubercules.....	58
2. Séparation des composants de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique.....	59
3. Production des β -limite dextrines de l'amylopectine.....	59
4. Hydrolyse des liaisons (1 \rightarrow 6)- α -D-osidiques.....	59
5. Analyse de la distribution des louangeurs de chaînes par électrophorèse capillaire.....	60
6. Dosage des résidus glucoses phosphorylé dans l'amidon.....	60
7. Détermination de l'aspect et de la taille des grains d'amidons.....	60
D. Production de la protéine SS6 recombinante.....	61
1. Matériel bactérien.....	61
2. Transformation de la souche <i>E.coli</i>	61

3. Analyse par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamid Gel Electrophoresis).....	61
4. Production de la protéine SS6.....	62
5. Purification de la protéine SS6.....	62
6. Analyse de l'activité de la protéine purifiée par zymmogramme.....	63
III. Résultats.....	64
A. Reséquençage du génome de la variété de pomme de terre utilisée au laboratoire.....	64
1. Génération des données de séquençage et détection des variations.....	65
2. Le génome du cv. Désirée comparé au génome de référence.....	66
a. Principaux chiffres.....	67
b. Répartition sur les chromosomes.....	67
c. Validation par comparaison à une puce SNPs dédiée à la sélection.....	70
3. Analyse des variations intrinsèques au cv. Désirée.....	71
B. Analyse biochimique de l'amidon de pomme de terre de mutants <i>gbss</i> -.....	72
1. Origine du matériel et confirmation de l'absence d'amylose dans l'amidon.....	72
2. Contenus en protéines dans l'amidon.....	75
3. Analyse structurale de l'amylopectine.....	79
4. Contenu en résidus phosphatés de l'amidon.....	81
5. Morphologie des grains d'amidon.....	82
C. Caractérisation d'une nouvelle amidon-synthase, SS6, chez la pomme de terre.....	85
1. Analyse génétique et phylogénétique.....	85
2. Activité <i>in vitro</i> de la protéine recombinante.....	88
3. Production des plantes mutantes.....	94
a. Génération de lignées K. O. pour SS6.....	94
b. Génération de lignées surexprimant la protéine native.....	95
c. Génération de lignées exprimant une protéine SS6 de fusion avec une GFP.....	95
d. Transformation génétique et géotypage.....	96
e. Caractérisation des mutations induites par CRISPR/Cas9.....	99
f. Validation de la surexpression de SS6.....	103
4. Localisation de SS6 <i>in situ</i>	104
5. Analyse phénotypique des lignées KO ou surexprimant SS6.....	106
a. À l'échelle de la plante.....	106
b. Morphologie des grains d'amidon.....	107
c. Structure et composition de l'amidon.....	116
IV. Discussion et perspectives.....	122
A. Le séquençage du génome de Désirée pour la validation des cibles CRISPR/Cas9.....	122
1. La connaissance des nombreuses variations génétiques entre Désirée et Phureja permet l'établissement d'un outil pour la sélection de cibles pour CRISPR/Cas9.....	122
2. Les variations de séquences identifiées sont intrinsèques au cv. Désirée.....	124
B. L'analyse biochimique de l'amidon de pomme de terre chez des mutants <i>gbss</i> -.....	125
C. L'amidon synthase 6 est une enzyme plastidiale active <i>in vitro</i>	129
1. La séquence protéique de SS6 est informative quant à sa fonction.....	129
2. La protéine SS6 recombinante est active <i>in vitro</i>	130
3. SS6 est localisée dans le stroma des plastes.....	131
4. Modulation de l'expression de SS6 et phénotype associé.....	131
a. Les mutants présentent des modifications de l'expression de SS6.....	132
b. Des modifications phénotypiques subtiles de l'amidon de tubercule.....	133
c. SS6 pourrait avoir une fonction majeure dans d'autres organes.....	136

Annexes

Références bibliographiques

I. Introduction

A. La pomme de terre

1. Historique et aspect botanique de *Solanum tuberosum*

Cultivée depuis des milliers d'années en Amérique du Sud, la pomme de terre est aujourd'hui l'une des plantes les plus cultivées dans le monde (Spooner et al., 2014). Cette appellation regroupe plusieurs espèces, sauvages ou cultivées. Parmi celles-ci, l'espèce *Solanum tuberosum* est la plus largement consommée, en particulier en Amérique du Nord et en Europe (Singh and Kaur, 2016). Elle aurait été introduite en France en 1574 (Singh and Kaur, 2016). Sa culture aurait permis, par sa rapidité et la grande quantité de nourriture qu'elle fournit, une augmentation de la population en Europe, permettant ainsi la révolution industrielle (Singh and Kaur, 2016).



Illustration 1: Saison d'octobre, récolte de pommes de terre, huile sur toile, Jules Bastien Lepage, 1879, National Gallery of Victoria, Melbourne

La pomme de terre est une plante de la famille des Solanacées qui regroupe plus de 3000 espèces (Wu and Tanksley, 2010). De nombreuses espèces d'intérêt économique telles que la tomate, le tabac, le piment et l'aubergine font partie de cette famille (Mueller et al., 2005) La spéciation de la pomme de terre et de la tomate (l'espèce la plus proche génétiquement) à partir de leur ancêtre commun, eut lieu il y a seulement 7,3 millions d'années (Figure 1) (Wu and Tanksley, 2010).

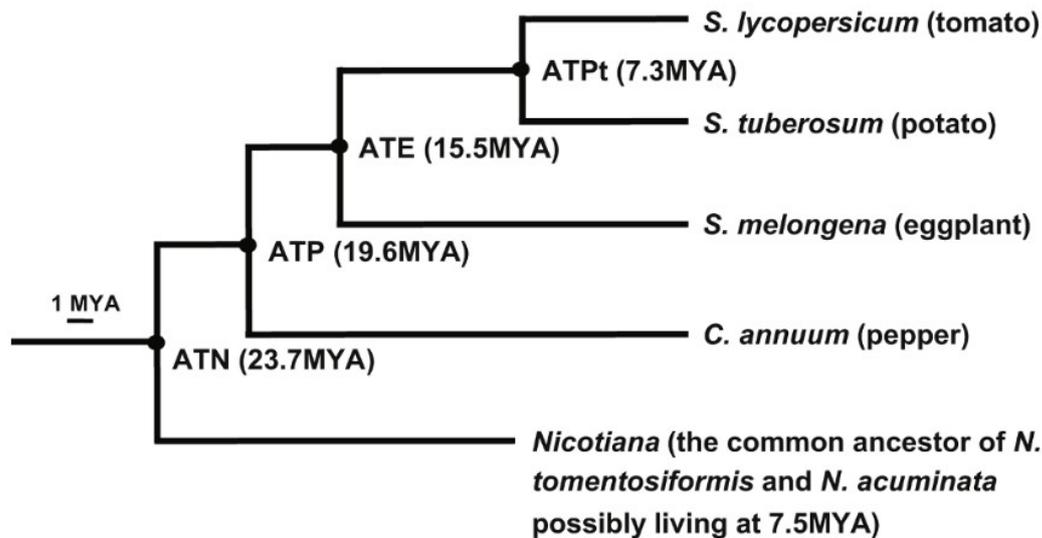


Figure 1: Relation phylogénique entre plusieurs espèces de Solanacées. Le temps écoulé depuis leurs divergences est indiqué à chaque nœud. La tomate est l'espèce la plus proche phylogénétiquement de la pomme de terre. Figure adaptée de Wu and Tanksley, 2010.

De nombreuses espèces apparentées à *S. tuberosum* sont cultivées en Amérique du Sud, notamment *S. curtilobum*, *S. ajanhuiri*, et *S. juzepczukii*. Celles-ci et les autres espèces apparentées sont conservées *ex situ* par des organismes nationaux d'Amérique du Sud mais aussi *in situ* par les fermiers locaux qui continuent à les cultiver à des fins de consommations (Singh and Kaur, 2016). La pomme de terre est une plante herbacée vivace mesurant de 30 à 80 cm qui peut se reproduire de manière sexuée et/ou (selon le génotype) de manière végétative par production de bourgeons tubérisés (Singh and Kaur, 2016; Spooner, D.M. and Knapp, 2013; Struik, 2007).

Le tubercule est souterrain et permet la survie de la plante face aux conditions biotiques rencontrées à de fortes altitudes dans les Andes sud-américaines mais permet aussi sa multiplication en absence de reproduction sexuée (Hardigan et al., 2017; Zimmerer, 1998; Camadro et al., 2012). L'induction de la formation de tubercules est consécutive au

raccourcissement de la durée du jour et à la baisse des températures qui entraînent la production de molécules de signalisation dans les feuilles. Ces molécules sont ensuite transloquées via le phloème vers les parties inférieures de la plante (Hannapel et al., 2017). Ces molécules peuvent être de nature protéique comme c'est le cas pour le facteur de transcription SP6A ou ribonucléique pouvant être long, comme c'est le cas pour StBEL5, StBEL11 et StBEL29, ou de type micro-ARN comme mi172 (Hannapel et al., 2017)

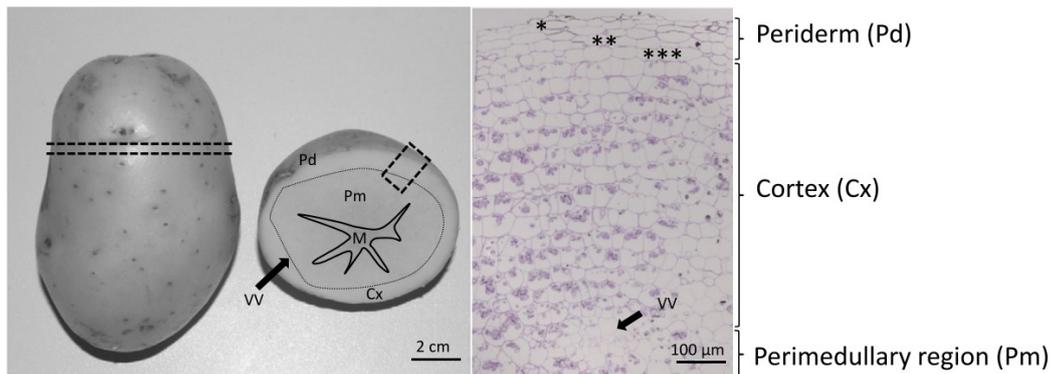


Figure 2: Histologie du tubercule de pomme de terre. Le suber (*), le phellogène (**), et le phelloderme (***) sont les couches périphériques qui constituent le périderme (Pd). Le cortex (Cx) est les tissus situé entre la peau et les tissus vasculaires (VV). La région périmédullaire (Pm) se situe entre l'anneau vasculaire et la médulla (M). (Adapté de Singh et Kaur, 2016).

Le tubercule va alors se développer à partir du stolon par une forte activité de division des cellules du parenchyme péri-médullaire et du cortex (Figure 2) (Singh and Kaur, 2016; Struik, 2007). Celles-ci vont ensuite être le siège de l'accumulation de protéines et de polysaccharides de réserve (Singh and Kaur, 2016; Struik, 2007).

2. Culture et aspect économique

Le tubercule de pomme de terre est comestible et présente le meilleur rapport calories par hectare parmi toutes les plantes cultivées pour l'alimentation humaine (Singh and Kaur, 2016). Cette caractéristique serait à l'origine du succès de la culture de pomme de terre qui est aujourd'hui la 4^e plante cultivée dans le monde, après le maïs, le riz et le blé. Les cultures de pomme de terre recouvraient près de 17,6 millions d'hectares en 2018 pour une production de plus de 368 millions de tonnes de tubercules. La pomme de terre est par ailleurs un aliment de base pour plus d'un milliard de personnes sur la planète (Barrell et al., 2013; Kärenlampi and White, 2009). Les principaux pays producteurs sont la Chine,

l'Inde et l'Ukraine. La Chine totalise à elle seule plus du tiers de la production mondiale, la France arrivant en 8^e position avec environ 3 % de celle-ci (Figure 3) (FAO, 2018).

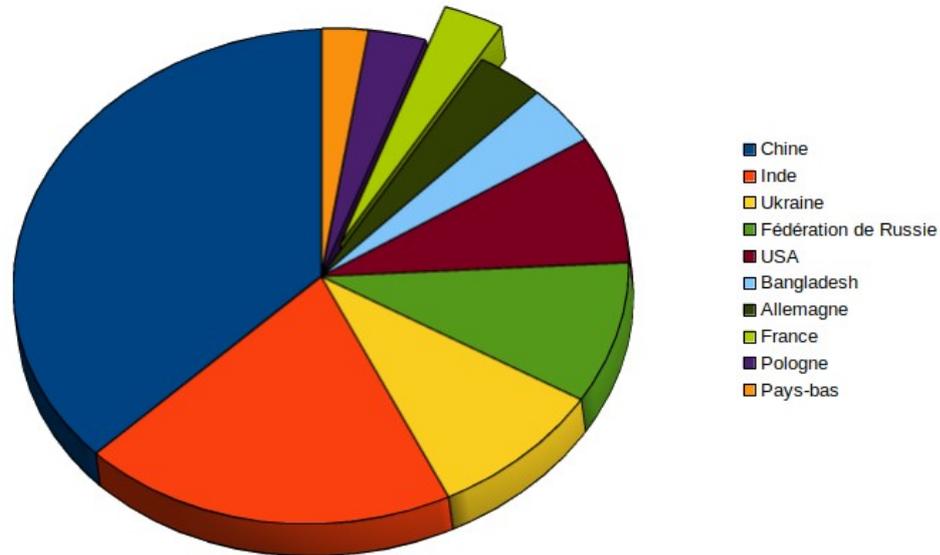


Figure 3: Répartition de la production de pomme de terre des dix premiers pays producteurs.

La production française représente 7,8 millions de tonnes avec un rendement de près de 40 tonnes par hectare bien supérieur au rendement mondial moyen qui est de moins de 21 tonnes par hectare (FAO, 2018). Ce rendement a fortement augmenté depuis les années soixante, notamment grâce à la sélection variétale et aux changements de méthodes culturales (Figure 4) (FAO, 2018).

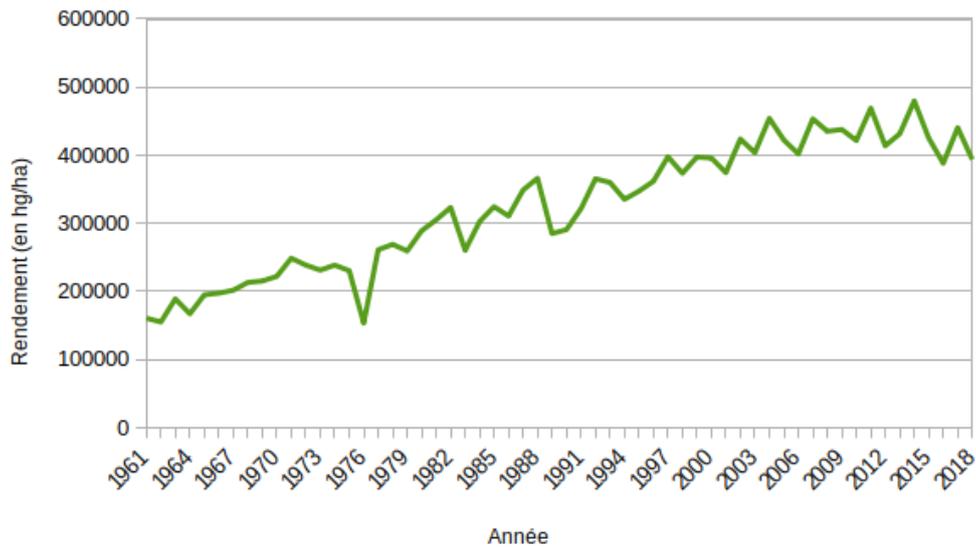


Figure 4: Evolution du rendement de la culture de pomme de terre en France entre 1961 et 2018

La culture de la pomme de terre s'étale sur plusieurs mois et est décomposée en plusieurs étapes, la première étant la germination du tubercule. La plante entre ensuite dans une phase végétative qui prend fin au début de la tubérisation. Une dernière étape de maturation est nécessaire avant la récolte des tubercules (Alva, 2004).

Les pratiques culturales et notamment l'apport en engrais azotés et l'irrigation sont des facteurs décisifs pour l'obtention de rendements élevés. En effet la pomme de terre est dotée d'une mauvaise efficacité d'utilisation de l'azote (« nitrogen use efficiency », NUE) et est très sensible au stress hydrique, ce qui s'explique en partie par un système racinaire restreint (Alva, 2004; Zotarelli et al., 2014; Vayda, 1994). Cependant, l'espèce peut être cultivée à des altitudes très diverses et sur une grande variété de sols avec une gamme de pH très large (Vayda, 1994; Condori et al., 2010).

En conséquence, il existe de nombreuses variétés adaptées à des environnements très différents. Cependant, le processus de création variétale devant faire face aux problématiques actuelles comme la diminution de l'utilisation de produit phytopharmaceutiques est compliqué par la génétique des variétés de pommes de terre cultivées. En effet, la plupart de ces génotypes sont autotétraploïdes ($2n=4x=48$), même s'il existe des génotypes diploïdes ($2n=2x=24$), triploïdes ($2n=3x=36$) et pentaploïdes ($2n=5x=60$). De plus, celles-ci possèdent souvent une forte hétérozygotie qui leur confère leurs caractéristiques agronomiques et certaines variétés présentent une stérilité mâle ou, dans le cas de certaines espèces diploïdes, une auto-incompatibilité (Spooner et al., 2014; Enciso-Rodriguez et al., 2019). Ceci allonge significativement le processus de production d'une variété par croisement (Barrell et al., 2013; Condori et al., 2010; Hameed et al., 2018).

Le recours aux biotechnologies permet d'accélérer le processus en permettant, par exemple, d'introduire un gène de résistance à un pathogène sans modifier le fond génétique d'une variété élite (variété commercialisée par les sélectionneurs) par transformation génétique ou encore en permettant la création de nouveaux traits agronomiques par mutagenèse aléatoire sur des protoplastes (Barrell et al., 2013). Cependant, certaines de ces techniques, notamment la transformation génétique, sont soumises aux limitations législatives sur les organismes génétiquement modifiés et seulement quelques variétés sont autorisées en Union Européenne (Hameed et al., 2018; Mathur et al., 2017). De nouvelles biotechnologies, regroupées sous le nom de NBTs (New breeding technologies), ont fait leur apparition ces dernières années.

Elles comprennent notamment les TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) et CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated 9) et ont largement été développées pour la pomme de terre (ces NBTs sont décrites dans une section spécifique de ce manuscrit) (Hameed et al., 2018; Yamamoto, 2014). Ces techniques permettent des modifications précises du génome, faisant de celles-ci des outils très efficaces pour l'amélioration variétale (Hameed et al., 2018). De plus, certaines applications de celles-ci n'impliquent pas de transfert d'ADN, comme l'utilisation du système CRISPR/Cas 9 sous forme de ribonucléoprotéines, réduisant ainsi la contrainte législative à leur utilisation pour la production de nouvelles variétés (Andersson et al., 2018).

La pomme de terre est cultivée à des fins alimentaires, notamment en raison de ses propriétés nutritives. En effet, c'est un aliment qui est très riche en amidon, en protéines de très bonne qualité (contient un mélange équilibré d'acides aminés dont des acides aminés essentiels comme la méthionine), en antioxydant et vitamines (Hameed et al., 2018; Singh and Kaur, 2016; Burlingame et al., 2009).

Elle peut être consommée telle quelle comme légume, frites ou purée, mais aussi être utilisée dans l'industrie agro-alimentaire après transformation comme agent épaississant, gélifiant ou agglomérant ou encore pour l'alimentation animale (Singh and Kaur, 2016). Des utilisations non-alimentaires existent aussi, notamment la production de bioplastiques, de papier ou encore de produit pharmaceutiques (Singh and Kaur, 2016; Zeeman et al., 2010; Friedniece et al., 2017; Ellis et al., 1998).

L'existence, chez la pomme de terre, d'un organe de réserve riche en amidon, de méthodes permettant sa conservation, sa multiplication végétative et sa transformation

génétique, le tout associé à un fort enjeu économique au niveau mondial, font de cette plante un modèle incontournable pour l'étude du métabolisme l'amidon. Ce constat est renforcé par la publication en 2011 de la séquence complète de son génome par un consortium international et par l'explosion de l'utilisation des NBTs, notamment CRISPR/Cas9, dans la recherche scientifique (Hameed et al., 2018; Xu et al., 2011; Mathur et al., 2017).

B. L'Amidon

1. Une molécule de réserve ubiquitaire dans le monde végétal

L'amidon est la molécule de réserve la plus abondante chez les plantes et le deuxième polysaccharide le plus répandu sur Terre après la cellulose (Blennow et al., 2002). Il est synthétisé à partir des produits de la photosynthèse dans les feuilles durant la journée, et est alors qualifié d'amidon transitoire. Il est remobilisé par conversion en saccharose servant à la nutrition de la plante pendant la nuit, en particulier des organes non-photosynthétiques ou en croissance (Thalmann and Santelia, 2017; Smith and Zeeman, 2020). La dynamique d'accumulation de l'amidon est dépendante de la plante. En effet, certaines plantes accumulent l'amidon proportionnellement à la quantité de sucre disponible dans la cellule et d'autres, comme l'épinard, ne commencent à accumuler l'amidon que lorsqu'une certaine concentration de sucre est dépassée (Stitt and Heldt, 1981; Hashida et al., 2016). L'amidon est aussi synthétisé dans des organes spécialisés dans le stockage à plus ou moins long terme comme les graines, les racines, les rhizomes, les tubercules, le bois et le pollen, il est alors qualifié d'amidon de réserve (Thalmann and Santelia, 2017; Pérez and Bertoft, 2010; De García and Martínez, 1995). Les tubercules de pomme de terre contiennent ainsi 15 à 20 % de leur masse fraîche en amidon (Singh and Kaur, 2016). On le retrouve aussi dans d'autres organes comme la columelle des racines où il est impliqué dans la perception de la gravité par la plante (Caspar and Pickard, 1989; Weise and Kiss, 1999). L'amidon de réserve est remobilisé au cours de la germination des graines, après une défoliation ou encore une période de dormance (comme c'est le cas chez la pomme de terre) pour fournir l'énergie nécessaire au développement de la plante (Smith and Zeeman, 2020). Le stockage et le déstockage de l'amidon, et donc le transport de sucres (précurseurs ou produits de la synthèse ou de la dégradation de l'amidon), font intervenir un gradient de saccharose dans les tissus phloémiens de la plante entre les organes sources et les organes puits (MacNeill et al., 2017; Braun et al., 2014) Ce gradient est entretenu par la dégradation de l'amidon au niveau des organes sources et par sa synthèse au niveau des organes puits. Il implique

notamment l'action d'invertases et de sucrose-synthases (SuSy) (Figure 5) (Braun et al., 2014; Roitsch et al., 2003).

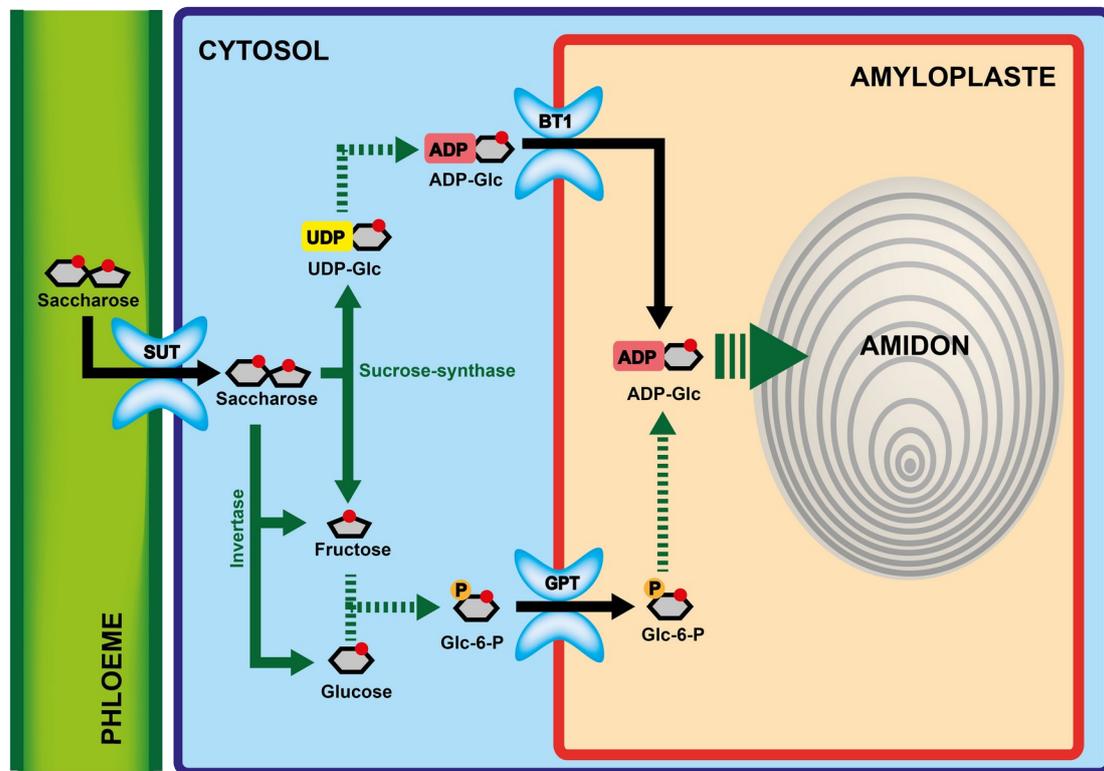


Figure 5: La biosynthèse de l'amidon dans un organe puit (ici une graine). Le saccharose est déchargé du phloème par un transporteur SUT (SUcrose Transporter) puis métabolisé en hexose et hexose-phosphate par les invertases (INV) et les sucrose-synthases (SuSy) qui vont ensuite rejoindre une voie de synthèse de l'amidon après transport par le GPT (glucose-6-phosphate transporter) et le transporteur d'ADP-glc BT1 (BRITTLE1).

Au niveau cellulaire, chez la pomme de terre comme chez toutes les plantes, l'amidon est stocké dans des plastes spécialisés, les chloroplastes dans le cas de l'amidon transitoire issue de la photosynthèse et les amyloplastes dans le cas d'une mise en réserve à plus long terme dans les tissus non-photosynthétiques (Naeem et al., 1997).

La localisation de l'amidon chez d'autres organismes est plus variée. En effet, l'amidon est présent chez les cyanobactéries, les algues vertes (chloroplastidia), les algues rouges (rhodophyceae) et les glaucophytes (glaucophyta) ainsi qu'au sein de la famille des algues brunes (Ball et al., 2011). Chez les algues vertes, de la lignée des plantes, il est situé dans les chloroplastes. Ce n'est pas le cas chez les algues rouges, les glaucophytes et les micro-algues dinoflagellées où il est situé dans le cytoplasme. Chez d'autres micro-algues encore comme les cryptophytes, il est situé au niveau de l'espace périplastidial (Ball et al., 2011).

L'amidon est donc une molécule de réserve centrale dans le métabolisme des plantes et plus largement chez les organismes photosynthétiques.

2. Le glucose à la base d'une structure complexe

L'amidon est présent dans les plastes des plantes vertes sous forme de grains. Dans les chloroplastes on observe généralement la présence de plusieurs grains, comme chez *Arabidopsis thaliana* où 5 à 7 grains sont présents (Zeeman et al., 2007). Ce constat n'est pas le même dans les amyloplastides où on observe parfois un unique grain d'amidon, comme chez la pomme de terre (Smith, 2001). La taille et la forme de ces grains varient largement en fonction des espèces étudiées (Figure 6).

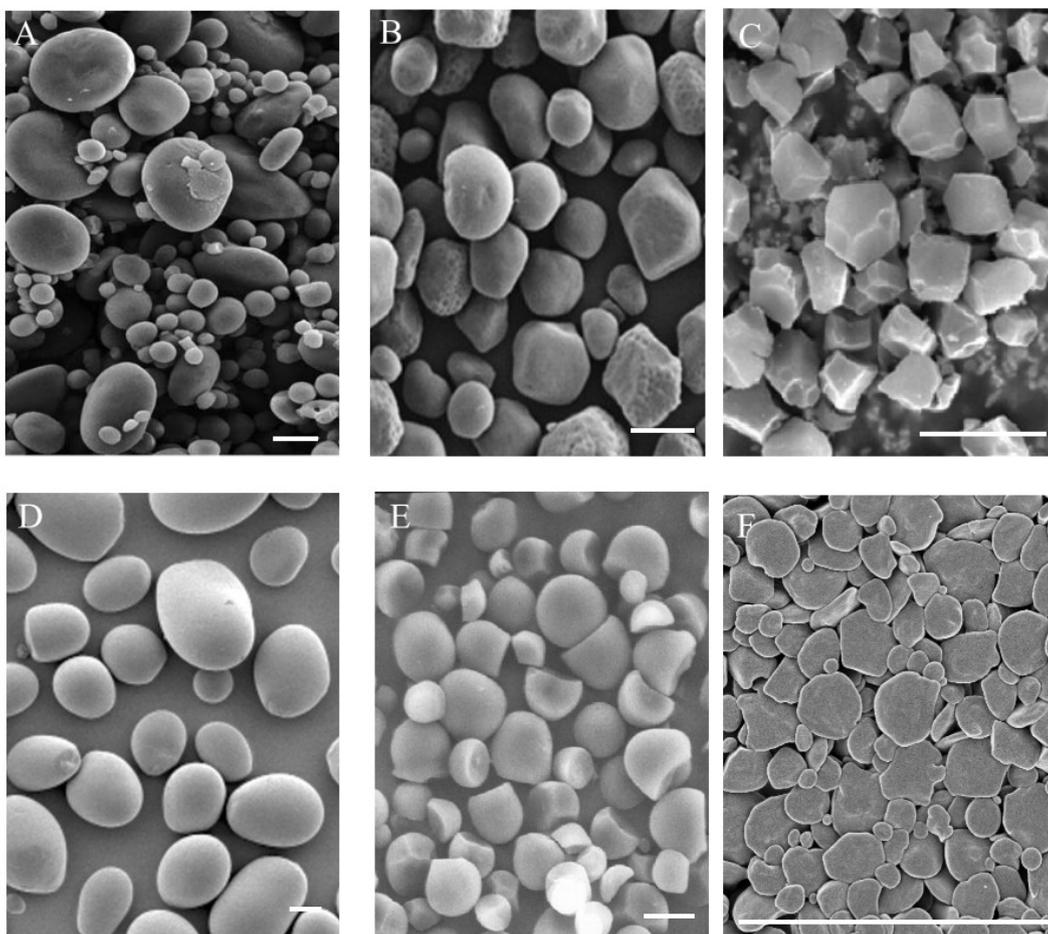


Figure 6: Morphologie des grains d'amidon issus de différents tissus de plusieurs espèces. Les photos ont été produites par microscopie électronique à balayage. A) Albumen de blé B) Albumen de maïs C) Albumen de riz D) Tubercule de pomme de terre E) Racine de manioc F) Feuilles d' *A.thaliana*. Bar = 10 μ m (adapté de Streb et Zeeman, 2012)

Les différentes formes observées varient de rondes à plates en passant par des formes polyédriques. La taille des grains peut être inférieure au micron comme chez l'amarante ou, à l'inverse, dépasser les 100 μm chez le canna (Jane et al., 1994). Les grains d'amidon du tubercule de pomme de terre sont aussi très larges, allant généralement de 15 à 75 μm de diamètre, et ont une forme ovale à ronde, les petits grains étant les plus ronds (Jane et al., 1994; Helle et al., 2019).

Les grains d'amidon sont semi-cristallins comme l'indique l'observation d'une « croix de Malte » en microscopie photonique à lumière polarisée (Figure 7) (Cai and Wei, 2013).

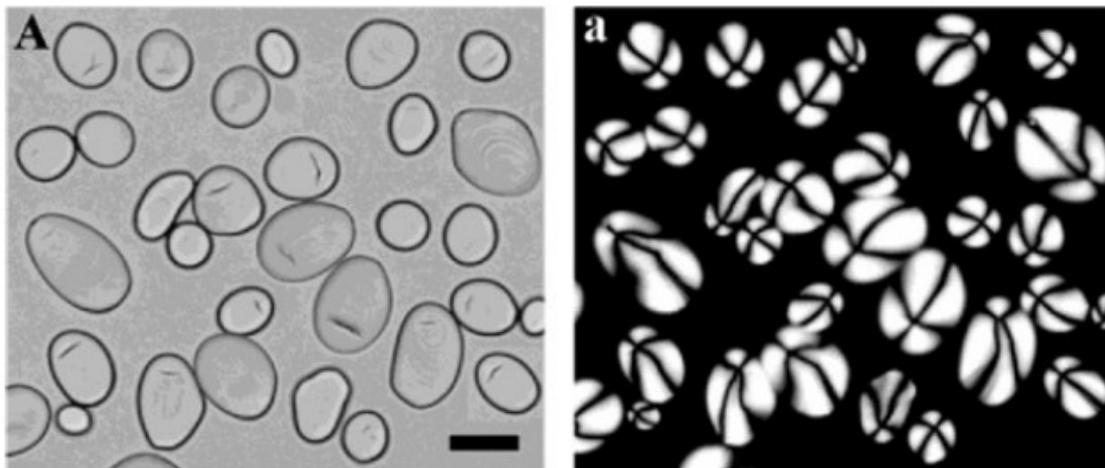


Figure 7: Morphologie de grains d'amidons de pomme de terre observés par microscopie optique A) sous lumière blanche et a) sous lumière polarisée. (Adapté de Cai et Wei, 2013)

L'observation en microscopie électronique de grains d'amidon partiellement digérés par hydrolyse acide ou enzymatique à l'aide d' α -amylases révèle la présence d'anneaux concentriques prenant naissance autour d'une structure appelée « hile ». Ces anneaux semi-cristallins, aussi nommés anneaux de croissance et d'une épaisseur allant de 100 à 400 nm, alternent avec une matrice amorphe (Figure 8) (Pilling and Smith, 2003).

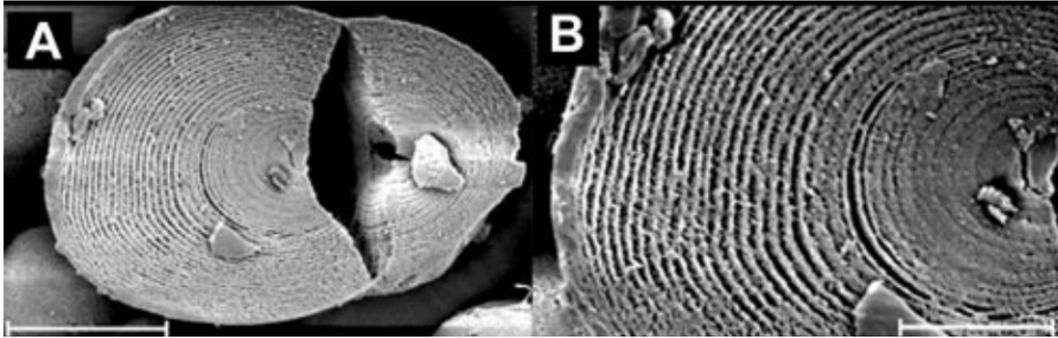


Figure 8: Grain d'amidon extrait de tubercules de pomme de terre cultivés avec une photopériode de 16 h de jour à 18°C et 8 h de nuit à 15 °C. La digestion par des α -amylases révèle les anneaux de croissance. B) est le zoom de A). A) bar =10 μ m B) bar = 5 μ m. (Adapté de Pilling et Smith, 2003)

À un niveau d'organisation inférieur, les anneaux de croissance seraient composés d'un ensemble de micro-structures visibles en microscopie électronique à balayage et appelées blocklets (Gallant et al., 1997). Ces blocklets mesurent de 10 à 50 nm de diamètre et sont plus gros chez la pomme de terre que chez d'autres espèces comme le maïs (Figure 9).

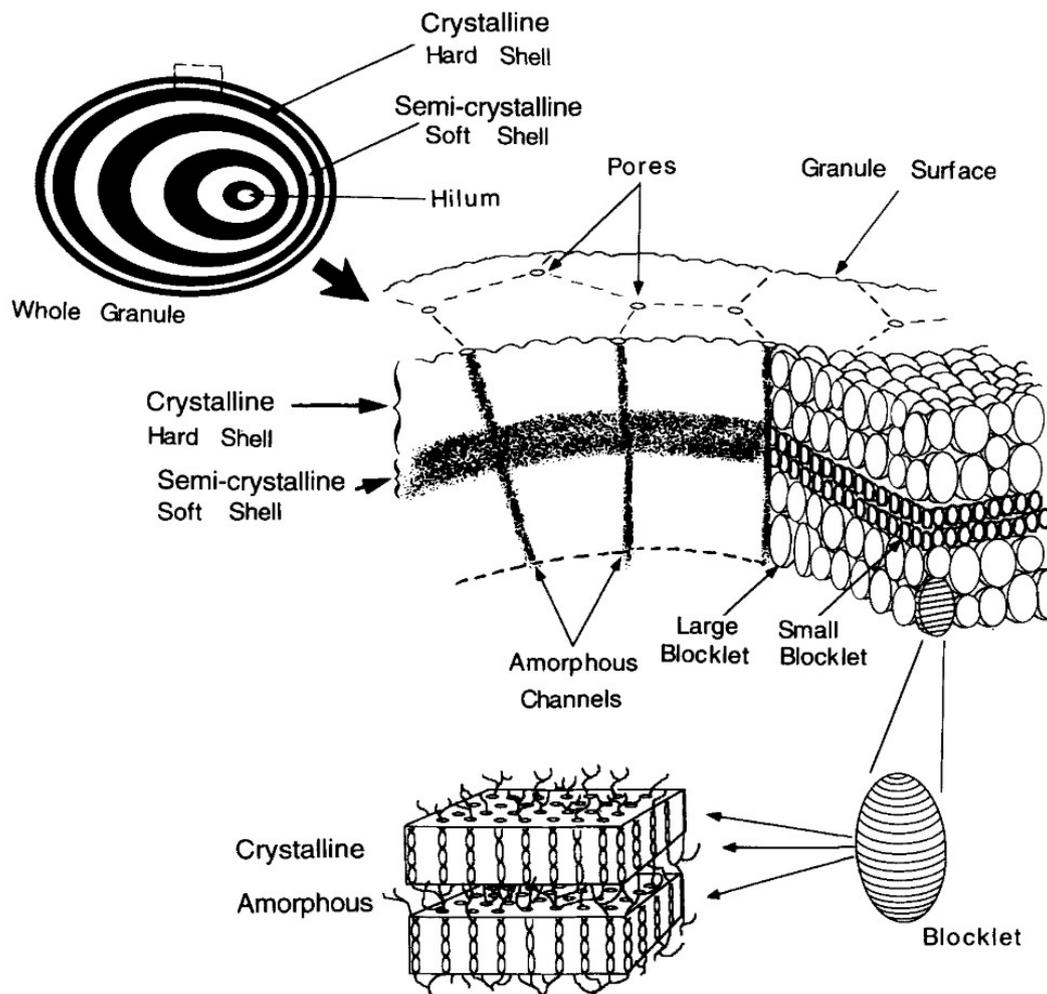


Figure 9: Organisation structurale d'un grain d'amidon montrant l'implication de blocklets. Les différents niveaux d'organisation du grain d'amidon sont représentés : l'alternance d'anneaux de croissance semi-cristallin et de matrice amorphe, les blocklets qui composent les anneaux de croissance et l'alternance de lamelles cristallines et amorphes dans ces blocklets. (adapté de Gallant *et al.* (1997))

L'amidon est un polymère de glucose de formule chimique très simple. Il est constitué de chaînes de résidus de glucose liés en α -1,4. Celles-ci sont ramifiées par des liaisons α -1,6 et possèdent une seule extrémité réductrice, faisant de ce polymère une réserve énergétique importante et quasiment neutre sur le plan osmotique (Figure 10).

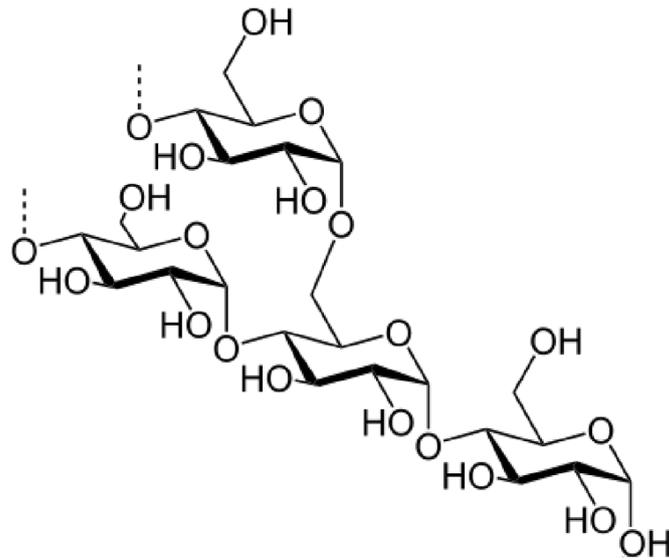


Figure 10: Formule semi-développée d'un α -glucane ramifié montrant des liaisons O-glycosidiques α -1,4 et α -1,6 entre les résidus de glucose.

L'amidon contient deux macromolécules très proches, l'amylose et l'amylopectine. Celles-ci diffèrent principalement par leur niveau de ramification, l'amylose étant faiblement branchée avec environ 1 % de points de branchement, tandis que l'amylopectine est modérément branchée avec environ 5 % de points de branchement (Singh and Kaur, 2016; Bertoft, 2017). Les ramifications de l'amylopectine (ou points de branchements), ne sont pas distribuées de manière régulière et leur localisation est finement régulée, ce qui entraîne la cristallisation partielle de l'amidon et son insolubilité dans l'eau (Figure 11) (Buléon et al., 1998).

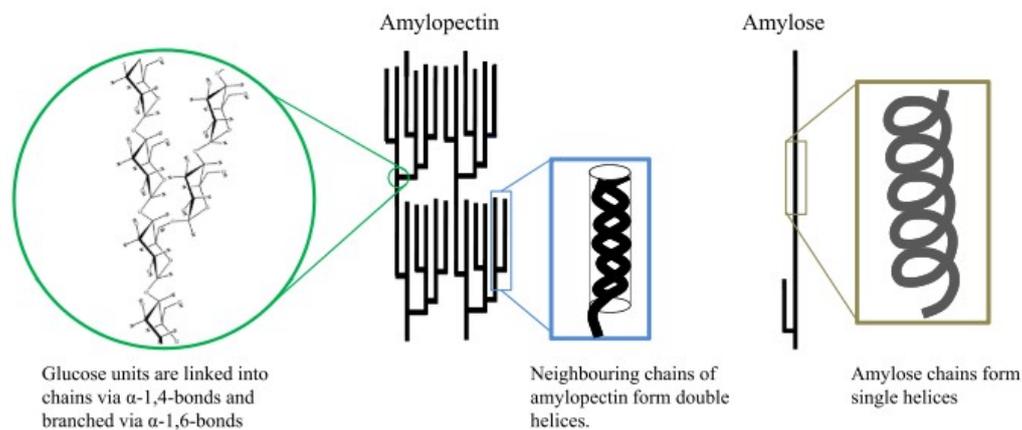


Figure 11: Modèle simplifié de la structure de l'amylopectine et de l'amylose. La formation d'une hélice gauche par deux chaînes de l'amylopectine est représentée ainsi qu'une hélice formé par une chaîne d'amylose seule. (Adapté de Zeeman, 2010)

La molécule d'amylopectine possède une taille de l'ordre de 10^7 Da chez la pomme de terre et est principalement composée de chaînes courtes allant d'un degré de polymérisation (DP) de 21 à 28 résidus de glucose. L'amylose, principalement linéaire, est formée de chaînes de DP840 à DP21800 (Hizukuri and Takagi, 1984). Du fait de l'existence de quelques points de branchement dans l'amylose, on parle parfois d'amylose branchée ou d'amylose linéaire (Singh and Kaur, 2016).

Il existe des niveaux d'organisation de l'amylopectine intermédiaires.

En effet, le modèle structural prédominant définit une organisation des chaînes de l'amylopectine en grappe ou en « cluster ». Ces clusters sont des zones très denses en points de branchement et où l'on retrouve des chaînes interconnectées par des chaînes courtes contenant généralement moins de 9 résidus (Bertoft, 2007). Les chaînes portant les points de branchement des clusters sont appelées « building blocks » et les clusters sont regroupés en domaines (Figure 12) (Singh and Kaur, 2016).

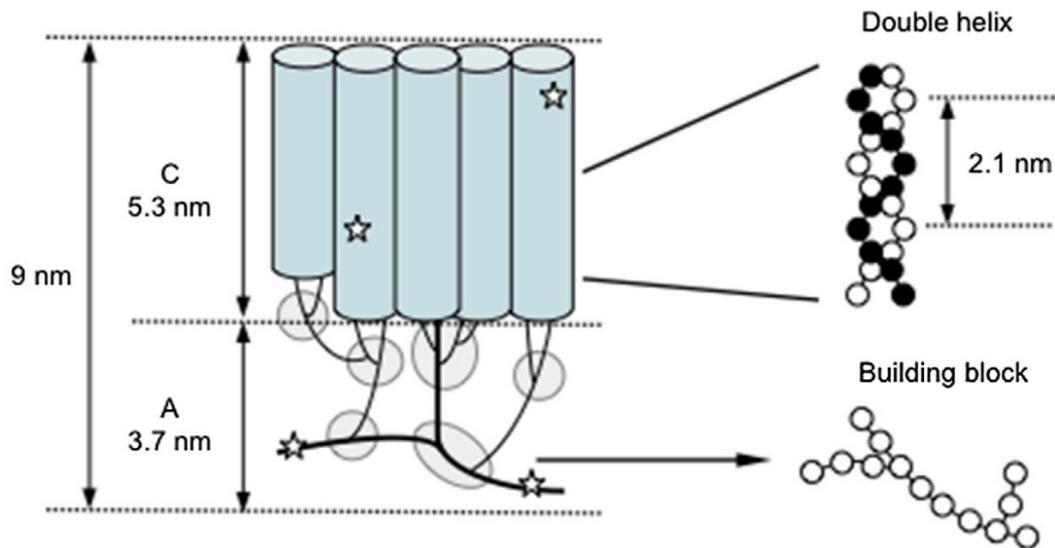


Figure 12: Structure d'un cluster d'amylopectine de pomme de terre. Les building block branchés (entourés) sont principalement présents dans la lamelle amorphe. Les doubles hélices d'amylopectine (symbolisées par les cylindres bleus) émergent des building block. (Adapté de Sing et Kaur, 2016)

Les chaînes de l'amylopectine ont été catégorisées par Peat et al. (1952) en trois catégories. Les chaînes de type A correspondent aux chaînes ne montrant pas de ramifications. À l'inverse, les chaînes de type B correspondent aux chaînes en possédant, et l'unique chaîne de type C de chaque molécule porte l'extrémité réductrice.

Cette classification a été affinée par Hizukuri (1986) qui a remarqué une périodicité dans la longueur des chaînes de l'amylopectine et a donc subdivisé le type B en quatre sous-types en fonction de leur taille. Le type B1 correspond aux chaînes les plus courtes, celles portant les chaînes de type A. Les types B2 et B3 correspondant à des chaînes de taille intermédiaire et longue, respectivement deux et trois fois plus longues que les chaînes de type B1. Enfin, les chaînes B4 sont les plus longues.

Il existe deux modèles d'assemblage des clusters. Dans le premier, décrit par Hizukuri (1986), les clusters se succèdent de manière linéaire. Dans le second, les clusters sont placés côte à côte (Figure 13) (Bertoft, 2007).

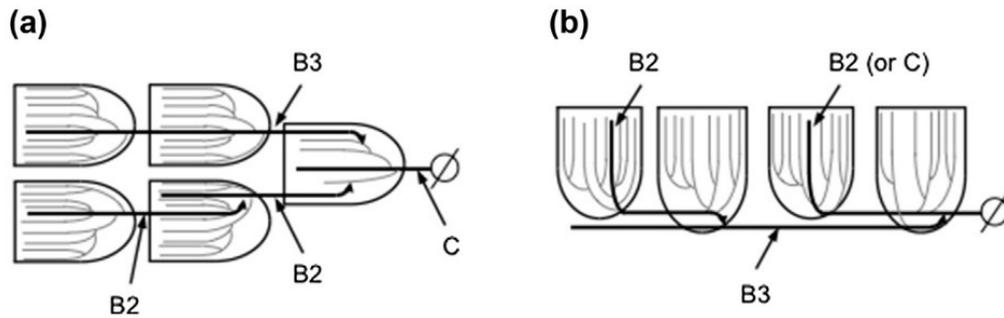


Figure 13: Deux modèle d'interconnexion des clusters de l'amylopectine. La structure du squelette de l'amylopectine est unidirectionnelle dans le modèle (a) et bidirectionnelle dans le modèle (b). Les encadrés symbolisent les clusters de chaînes courtes (lignes grises). Les lignes noires représentent les chaînes B2 et B3, impliquées dans l'interconnexion des clusters. La chaîne C ne diffère des chaînes B que par la présence d'une unité réductrice représenté par le symbole \emptyset . (Adapté de Singh et Kaur 2016)

L'amylopectine est le constituant majoritaire des anneaux semi-cristallins et confère cette semi-cristallinité à la structure. L'amylose, quant à elle, serait majoritairement présente dans la matrice amorphe (Jane et al., 1992).

En effet, les chaînes courtes de l'amylopectine forment des doubles hélices assemblées en réseaux ordonnés parallèles à l'origine de lamelles cristallines. Les chaînes plus longues portant ces chaînes courtes forment alors des lamelles amorphes au niveau de leurs points de branchement (Figure 12).

Un anneau de croissance contient une alternance de lamelles cristallines et amorphes qui lui confère son caractère semi-cristallin.

L'épaisseur moyenne de la lamelle cristalline est comprise entre 5,3 nm et 5,5 nm alors que celle de la lamelle amorphe est comprise entre 3,7 et 3,9 nm. Ceci conduit à une taille de clusters très conservée d'environ 9-10 nm (Kozlov et al., 2007).

L'agencement des doubles hélices d'amylopectine peut varier selon les espèces et conférer des propriétés cristallines différentes mesurables par analyse de diffusion aux rayons X grand-angles (WAXS). Deux types de cristallinités sont observables : le type A qui correspond à un agencement en unités monocliniques des doubles hélices, que l'on retrouve principalement dans l'amidon des céréales, et le type B correspondant à un agencement hexagonal des hélices et que l'on retrouve notamment dans l'amidon de tubercules de pomme de terre. Certaines espèces de la famille des fabacées montrent des agencements mixtes correspondant au type C (Pérez and Bertoft, 2010) (Figure 14). Le type B est moins dense et plus hydraté que le type A (Buléon et al., 1997)

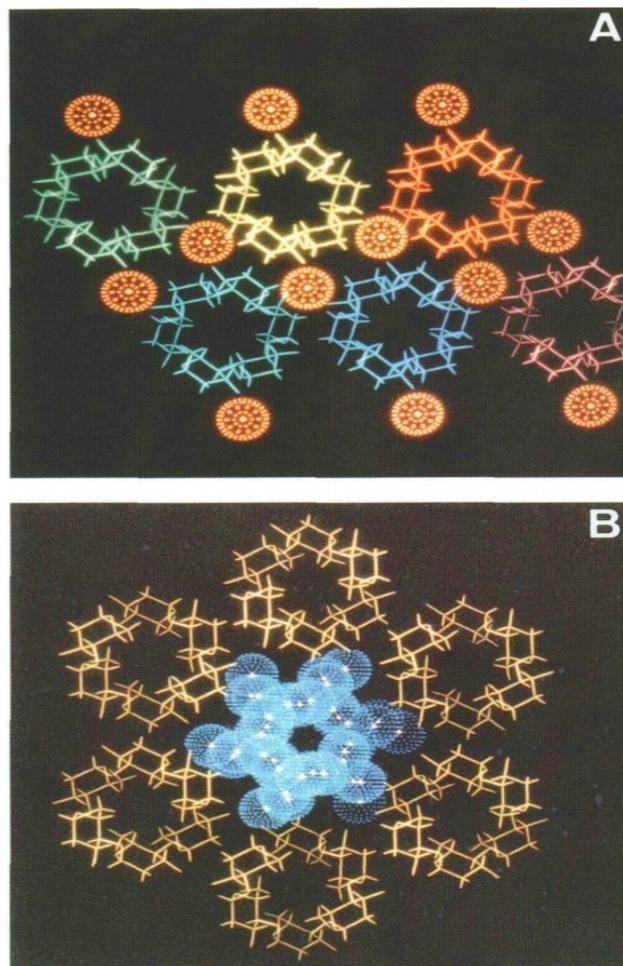


Figure 14: Types de cristallinité de l'amylopectine. Représentation planaire de la cristallinité A) de type A de l'amylopectine et de la disposition des molécules d'eau à l'intérieur de celle-ci (sphère orange) B) de type B avec une disposition centrale des molécules d'eau (sphère bleue) . (Adapté de Buléon *et al.*, 1997)

Certains résidus de glucose de l'amidon sont liés de manière covalente à un groupement phosphate. Ces liaisons sont positionnées sur le carbone 3 ou le carbone 6 de certains résidus glucose de l'amylopectine. L'amidon de la plupart des espèces de plantes est légèrement phosphorylé. L'amidon de pomme de terre, quant à lui, est parmi les plus phosphorylés avec environ 1 résidu phosphorylé sur 1000 (Verbeke *et al.*, 2016). La phosphorylation est nécessaire à la dégradation complète de l'amidon (Singh and Kaur, 2016). Par ailleurs, elle semble avoir un impact important sur la structure de l'amidon en influençant la taille et la cristallinité des chaînes de l'amylopectine (Singh and Kaur, 2016).

La remarquable complexité de la structure de l'amylopectine est en contraste très fort avec la simplicité de sa composition chimique et nécessite donc une machinerie métabolique finement régulée.

C. Le métabolisme de l'amidon : une machinerie enzymatique finement régulée

1. La synthèse

Les α -glucanes de l'amidon sont allongés par l'ajout d'un résidu glucose sur l'extrémité non-réductrice des chaînes pré-existantes (Xie et al., 2018). La brique élémentaire portant ce résidu est un nucléotide-sucre : l'ADPGlc (ADP glucose). Ce métabolite est l'unique précurseur des α -glucanes de réserve chez les plantes supérieures et les bactéries (Ballicora et al., 2004). La synthèse d'ADPGlc est catalysée par l'ADP glucose pyrophosphorylase (E.C. 2.7.7.27 (Lombard et al., 2014)) à partir d'ATP et de G1P (Glucose-1-phosphate) en présence de Mg^{2+} , et avec la libération de PPi (Pyrophosphate). Cette réaction est rendue irréversible *in vivo* par l'hydrolyse du PPi par des pyrophosphatases, poussant ainsi le métabolisme dans le sens de la synthèse (Ballicora et al., 2004; Solis-Badillo et al., 2020; Tiessen et al., 2002). L'ADP glucose pyrophosphorylase est un hétérotétramère de type $\alpha 2\beta 2$. Les grandes sous-unités ont un rôle régulateur et les petites sous-unités ont un double rôle catalytique et régulateur (Solis-Badillo et al., 2020). Son activité est régulée de manière allostérique, par l'action activatrice du 3GPA (Acide 3-phosphoglycérique) et par l'action inhibitrice du Pi (Phosphate inorganique) (Tiessen et al., 2002). De plus, sa transcription est aussi régulée, positivement par de fortes concentrations cellulaires en sucres, et négativement par de fortes concentrations en azote et en phosphate (Tiessen et al., 2002). L'ADP glucose pyrophosphorylase a donc un rôle de senseur nutritif important pour la régulation de la synthèse de l'amidon. Deux isoformes de cette enzyme sont présentes chez les céréales. L'une est localisée dans le cytosol et contribue à la très grande majorité de l'activité. L'autre est localisée dans les plastides. Chez la pomme de terre et les autres dicotylédones, on observe une seule isoforme (Tiessen et al., 2002; Solis-Badillo et al., 2020). Cette dernière est plastidiale.

a. Les amidon-synthases

L'allongement des glucanes de l'amidon est réalisé par les amidon-synthases (EC 2.4.1.21). Il en existe plusieurs isoformes qui possèdent une base structurale commune composée de deux domaines glycosyl-transférase (GT5 et GT1). Ces domaines de la classification CAZy (Lombard et al., 2014; Edwards et al., 1999a) sont aussi retrouvés chez les glycogène-synthases bactériennes (Figure 15).

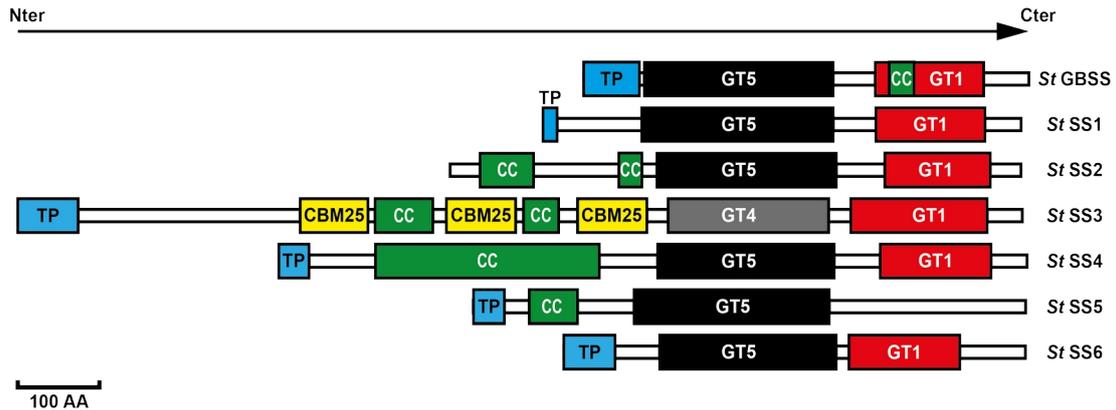


Figure 15: Structure protéique des différentes classes d'amidon-synthases de pomme de terre. Les encadrés noirs et rouges représentent respectivement les domaines glycosyltransférase 5 et 1, responsables de l'activité catalytique des amidons synthases. Les encadrés bleus représentent les peptides de transit responsables de l'adressage aux plastes. Les encadrés verts représentent les domaines « coiled-coil ». Les encadrés jaunes représentent les domaines de liaison aux carbohydrates de la famille des CBM25.

Ces domaines catalysent le transfert du résidu glucose de l'ADPGlc sur un glucane préexistant en créant une liaison entre l'extrémité réductrice de celui-ci et le carbone 4 d'un résidu glucose créant ainsi une liaison α -1,4 (Figure 16).

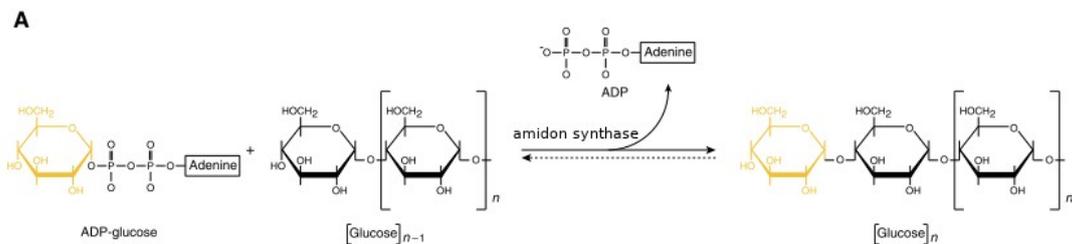


Figure 16: Réaction de transfert du résidu glucose de l'ADPGlc sur un glucane catalysée par les amidon-synthases.

Un motif « KTGGL-like » est retrouvé dans chacun des domaines glycosyl-transférases et serait essentiel à la fixation de l'ADPGlc (Edwards et al., 1999a; Buschiazzo et al., 2004). Plusieurs amidon-synthases ont été identifiées et classées en fonction de leurs homologies de séquence. Ces classes d'amidon-synthases possèdent des caractéristiques structurales différentes, en particulier au niveau de leur extrémité N-terminale (Pfister and Zeeman, 2016).

La première amidon-synthase ayant été caractérisée est la GBSS (Granule-Bound Starch Synthase) (Rongine De Fekete et al., 1960). Celle-ci catalyse la synthèse d'amylose. Les plantes mutantes exemptes de GBSS fonctionnelle présentent toutes le même phénotype, initialement qualifié de « waxy » chez le maïs (les grains de maïs *gbss* ont un aspect cireux), et consiste en l'absence d'amylose. Cette mutation a été observée chez de nombreuses espèces comme la pomme de terre, *Arabidopsis thaliana*, le pois, le manioc, le blé, le riz, l'orge et l'amarante (Pfister and Zeeman, 2016).

Il existe deux isoformes de GBSS chez certaines espèces, majoritairement chez les céréales où une sous-fonctionnalisation tissulaire existe. En effet, chez ces plantes, l'isoforme GBSSI est particulièrement active dans la synthèse d'amidon de réserve au niveau des tissus de la graine alors que l'isoforme GBSSII ou GBSSIb est préférentiellement active dans les feuilles pour la synthèse d'amidon transitoire (Cheng et al., 2012). Cependant, plusieurs isoformes furent observées chez certaines dicotylédones telles que le pois, et plus récemment chez l'amarante (Figure 17) (Park et al., 2017).

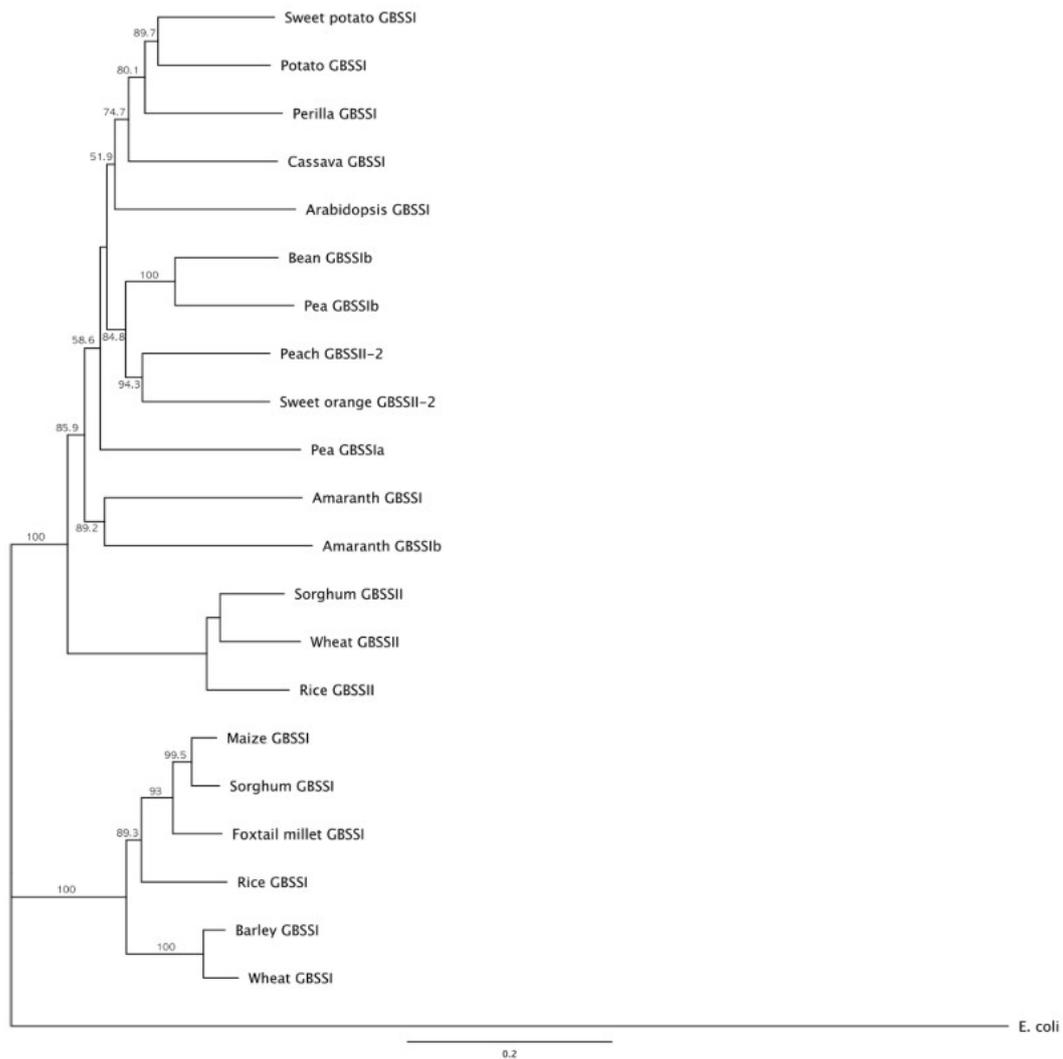


Figure 17: Relation phylogénétique entre les isoformes de GBSS de plusieurs espèces. La barre d'échelle représente la distance évolutive (Adapté de Park *et al.*, 2017)

Cette protéine d'environ 60 KDa chez la pomme de terre (Nazarian-Firouzabadi and Visser, 2017) tire son nom du fait qu'elle est active uniquement lorsqu'elle est associée physiquement avec le grain d'amidon. Elle est d'ailleurs, de loin, la protéine la plus représentée dans le grain d'amidon, représentant jusqu'à 87 % des protéines associées à l'amidon de pomme de terre (Helle et al., 2018).

Cependant, la séquence de GBSS ne contient pas de domaines connus de liaison aux carbohydrates (Pfister and Zeeman, 2016). En effet, l'adressage de GBSS au grain d'amidon est réalisé par une autre protéine, PTST1 (Protein Targeting to STarch 1) qui possède un domaine CBM48 (Carbohydrate Binding Module 48) (Seung et al., 2015). L'inactivation de *PTST1* chez *Arabidopsis thaliana*, provoque un phénotype similaire à celui des mutants *gbss* (Figure 18) (Seung et al., 2015).

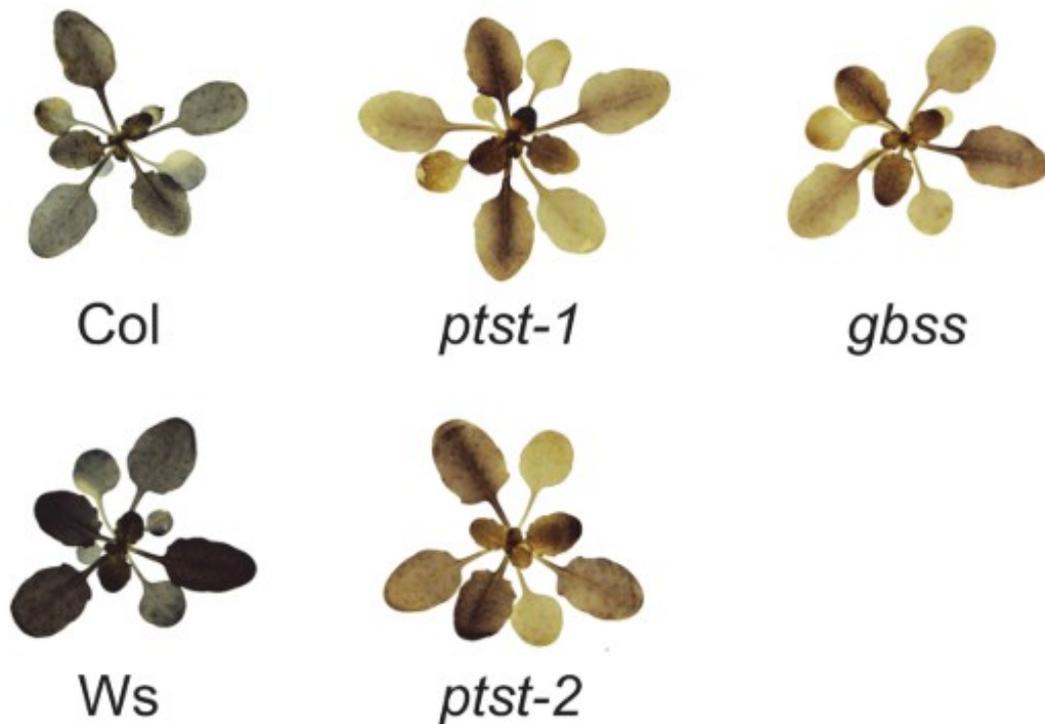


Figure 18: Phénotype d'accumulation d'amylose de mutants *ptst1*- et *gbss*-. Des plantules d'*A.thaliana* âgées de 4 semaines ont été colorées à l'iode afin de visualiser l'amidon accumulé dans leurs feuilles. L'iode de complexe à l'amidon présent dans les feuilles et se colore en bleu-nuit en présence d'amylose. La couleur rouge-orangé indique l'absence d'amylose (adapté de Seung *et al.* (2015))

L'interaction de ces deux protéines se fait par l'intermédiaire de domaines structurés en « coiled-coil » et présents chez les deux protéines.

Chez le riz, la mutation de *PTST1* entraîne une forte diminution du contenu en amidon dans les feuilles et les graines (Wang *et al.*, 2019). Chez l'orge, *PTST1* serait même essentielle à la synthèse d'amidon de réserve de l'albumen et conditionnerait la survie de la graine (Zhong *et al.*, 2019).

L'impact de la mutation de *PTST1* montre l'importance de la localisation de la GBSS pour la production d'amylose et conforte le fait que l'amylose est synthétisée au sein du grain d'amidon (Tatge *et al.*, 1999).

Par ailleurs, l'activité de GBSS est dépendante de la présence d'amylopectine et se trouve fortement augmentée en présence de concentrations élevées en Malto-OligoSaccharides (MOS). Ceci entraîne une synthèse importante d'amylose dans ces conditions (Edwards *et*

al., 1999a; Denyer et al., 1996). In vivo, les MOS pourraient résulter de l'activité d'enzymes de débranchement (DBEs) (une autre classe d'enzymes impliquée dans le métabolisme de l'amidon dont les rôles seront développés plus bas) et être allongés par la GBSS. Ils seraient ensuite piégés dans la matrice d'amylopectine du fait de leur taille importante. L'insolubilité de la matrice d'amylopectine rendrait quasi inaccessibles ces chaînes d'amylose aux enzymes responsables de la mise en place de ramifications, celles-ci restant donc très majoritairement linéaires (Nazarian-Firouzabadi and Visser, 2017; Denyer et al., 1996).

Le caractère linéaire des produits de la GBSS serait renforcé par une particularité de son activité enzymatique. En effet et contrairement aux autres synthases, GBSS est processive, c'est-à-dire qu'elle ajoute les résidus glucose les uns après les autres sur le substrat accepteur sans s'en dissocier (Edwards et al., 1999a).

L'amidon-synthase 1 (SS1) est active en phase soluble, à l'instar des autres SSs (et avec l'exception de GBSS).

D'une taille d'environ 57 KDa chez la pomme de terre, son inactivation n'entraîne peu ou pas de modifications de la structure de l'amidon de réserve. En effet, la protéine est principalement exprimée dans les feuilles chez cette espèce (Kossmann et al., 1999).

Chez d'autres espèces comme *A. thaliana*, le blé et le riz, l'absence de SS1 entraîne une diminution de l'abondance des très courtes chaînes d'amylopectine, de taille comprise entre DP8 et DP12. Ces dernières correspondent aux chaînes de type A et B1 (Delvallé et al., 2005; McMaugh et al., 2014; Fujita et al., 2006).

Elles sont les constituants des clusters, montrant que SS1 intervient dans la régulation fine de la structure de l'amylopectine.

in vitro, l'activité de l'isoforme de maïs permet l'allongement des chaînes de DP6-7 jusqu'à DP8-12. Or, c'est précisément l'abondance de ces chaînes qui diminue *in vivo* dans les mutants *ss1* (Commuri and Keeling, 2001). Dans ces lignées, la diminution de la proportion des chaînes de DP8-12 s'accompagne d'une augmentation des chaînes de DP6-7, qui sont substrats de l'enzyme, mais aussi des chaînes de DP12-20, des DP supérieurs à ceux synthétisés par SS1. Ceci indique une redondance fonctionnelle avec d'autres isoformes.

L'analyse de la structure protéique de SS1 révèle la présence d'une région N-terminale absente chez GBSS, la fonction potentielle de cette région n'est pas encore connue mais Commuri and Keeling (2001) ont montré qu'elle n'est responsable ni de l'activité de l'enzyme, ni de son affinité pour le substrat.

L'amidon-synthase 2 (SS2) est retrouvée à la fois en phase soluble et associée au grain d'amidon chez la pomme de terre (Edwards et al., 1995).

Cette protéine d'environ 77KDa, possède une région N-terminale prédite comme désordonnée ou flexible (Edwards et al., 1995).

Cette caractéristique est retrouvée chez les céréales où cette région est aussi très variable selon l'espèce ou l'isoforme (Patterson et al., 2018). En effet, comme pour GBSS, il existe deux isoformes de SS2 chez les céréales. SS2a est exprimée préférentiellement dans l'albumen, alors que SS2b l'est dans les feuilles (Patterson et al., 2018).

Chez ces espèces, SS2a forme des complexes avec les enzymes de branchement (Patterson et al., 2018). La version recombinante de la SS2 d'*A.thaliana* forme des homodimères impliquant la région N-terminale de l'enzyme (Patterson et al., 2018).

La mutation du gène codant cette enzyme entraîne un phénotype qui est retrouvé chez de nombreuses espèces, notamment *A.thaliana*, le maïs, le riz, le blé, l'orge, le pois et la pomme de terre (Kossmann et al., 1999).

Ainsi, en absence de SS2, on observe une augmentation des chaînes courtes de DP6-10, accompagnée d'une diminution des chaînes de tailles intermédiaires (DP12-28) ainsi qu'une augmentation du ratio amylose/amylopectine (Zhang et al., 2008). Cette mutation affecte aussi fortement la morphologie des grains d'amidon. Chez la pomme de terre, ceux-ci sont craquelés au niveau du hile (Zhang et al., 2008; Edwards et al., 1999b).

La fonction de SS2 est donc importante dans la structuration fine de l'amylopectine et du grain d'amidon. SS2 serait responsable de la synthèse des chaînes de DP12-28, à partir de chaînes courtes (DP6-10), elles-mêmes issues de l'activité de SS1.

L'amidon-synthase 3 présente des redondances fonctionnelles avec SS2. En effet, SS3 est à l'origine de la compensation partielle du phénotype induit par la mutation au locus SS2. Les doubles mutants *ss2-/ss3-* d'*A.thaliana* ont un phénotype similaire au simple mutant *ss2-*, mais celui-ci est exacerbé (Zhang et al., 2008).

SS3 est caractérisée par une taille d'environ 130 KDa, la plus importante pour les SSs. Ceci est dû à la présence d'une longue région N-terminale contenant des modules de liaison aux carbohydrates (« carbohydrate binding module », CBM) appelés « starch binding domains » (SBDs) (Senoura et al., 2007; Mishra et al., 2017). L'extension N-terminale de SS3 n'est pas catalytique mais les domaines qu'elle contient jouent un rôle majeur dans l'affinité de l'enzyme pour l'amylopectine (Senoura et al., 2007).

La mutation du gène codant SS3 où la diminution de son expression ont été réalisées chez plusieurs espèces comme le maïs, le riz, *Chlamydomonas reinhardtii*, *A.thaliana* et la pomme de terre (Pfister and Zeeman, 2016).

On observe chez ces mutants, une diminution plus ou moins marquée des longues et très longues chaînes. Cette diminution est accompagnée d'une augmentation du contenu en amylose et de l'abondance relative des petites chaînes. Cependant, ces deux derniers points semblent être liés aux activités respectives de GBSS et SS1 (Szydłowski et al., 2011). En effet, la double mutation des gènes codants SS3 et GBSS supprime la sur-accumulation de l'amylose (Fulton et al., 2002).

L'activité de SS3 représente 80 % de l'activité des amidon-synthases dans le tubercule de pomme de terre où elle semble préférentiellement synthétiser des chaînes B1 et B2 (allant respectivement de DP13 à DP24 et de DP25 à DP36) de l'amylopectine (Nazarian-Firouzabadi and Visser, 2017).

Dans les tubercules, la diminution de l'activité de SS3 entraîne un changement très important de la morphologie du grain d'amidon. En effet, on observe l'apparition de craquelures partant du centre des grains, et la présence d'agglomérats de très petits grains (Figure 19) (Edwards et al., 1999b).

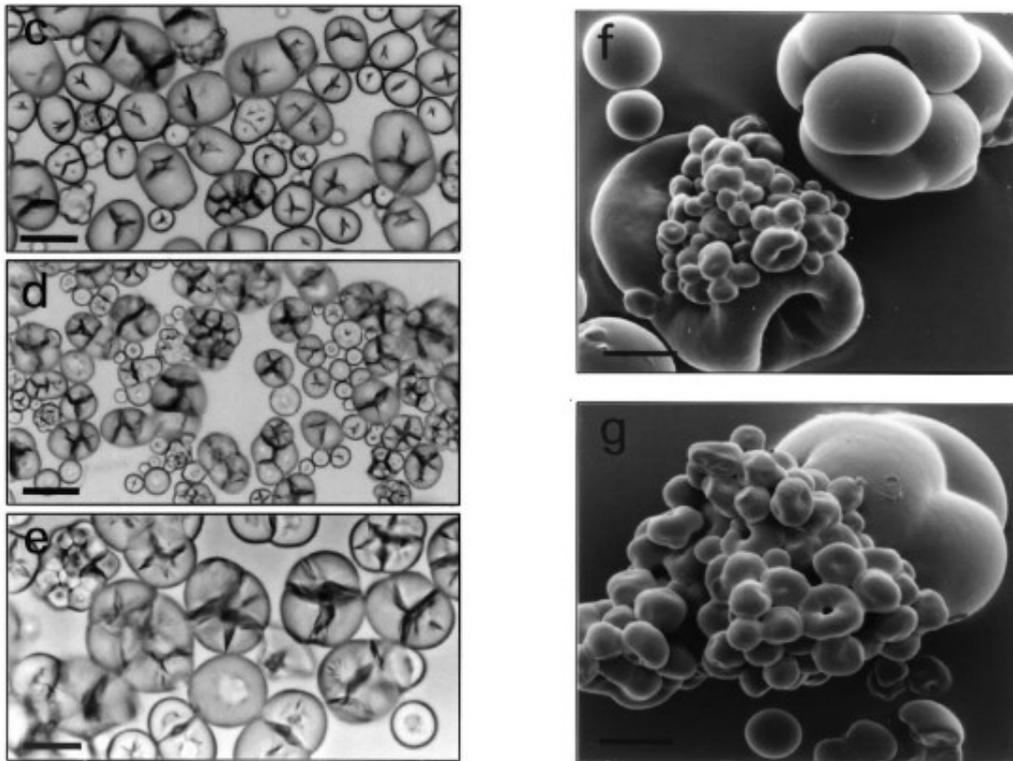


Figure 19: Grains d'amidon de lignées antisens ciblant SS3 ou SS2 et SS3 chez la pomme de terre observés en microscopie électronique à balayage. C) Amidon de la lignée antisens *ss3*. L'apparition de craquelures est visible sur les grains. D-G) Photos de grains d'amidon du double antisens *ss2/ss3* montrant l'agglomération de petits grains. (Adapté de Edwards *et al.*, 1996b)

Ce phénotype est accentué dans les doubles antisens *ss2/ss3*, mais il est cependant moins marqué lorsque l'activité de GBSS est également réduite (Lloyd *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1999b; Fulton *et al.*, 2002).

La détermination de l'activité de SS3 *in vivo* est complexe du fait de la compensation possible de son activité par d'autres isoformes d'amidon-synthases.

De manière similaire à GBSS et SS2, deux isoformes de SS3 coexistent chez les céréales. SS3a étant exprimée dans les tissus de réserve de la graine et SS3b dans les feuilles (Seung *et al.*, 2016).

D'autres isoformes d'amidon-synthases ont été identifiées, parmi lesquelles l'amidon-synthase 4 (SS4) et l'amidon-synthase 5 (SS5) qui ne semblent pas jouer un rôle direct dans la synthèse de l'amidon mais qui sont impliquées le processus d'initiation du grain. Cette partie du métabolisme de l'amidon est développée dans un paragraphe spécifique (Liu *et al.*, 2015). L'existence d'une SS6 (Starch Synthase 6) a récemment été décrite à

partir d'analyses protéomiques réalisées chez la pomme de terre (Helle et al., 2018). Cette protéine possède deux motifs catalytiques « KTGGL-like » dans sa séquence et est très similaire à SS4 (Helle et al., 2018). Van Harsselaar et al., (2017) ont montré que SS6 est exprimé à des niveaux similaires dans les feuilles et dans les tubercules et que cette expression varie peut entre le début et la fin du développement du tubercule. Cependant, (Yu et al., 2012) ont montré un profil d'expression biphasique de SS6 pendant le développement du tubercule avec une expression plus forte au début et à la fin de celui-ci.

Chez les plantes, les amidon-synthases auraient deux origines phylogénétiques distinctes permettant de les classer en deux groupes (Leterrier et al., 2008). Les amidon-synthases du groupe A, qui comprennent GBSS, SS1 et SS2, ont évolué à partir des amidon-synthases du plaste ancestral alors que celles du groupe B, comprenant SS3, SS4, SS5 et SS6, ont évolué à partir des amidon-synthases présentes chez une bactérie parasite du genre *Chlamydia* impliquée dans l'endosymbiose primaire à l'origine de l'émergence des végétaux (Figure 20) (Ball et al., 2011).

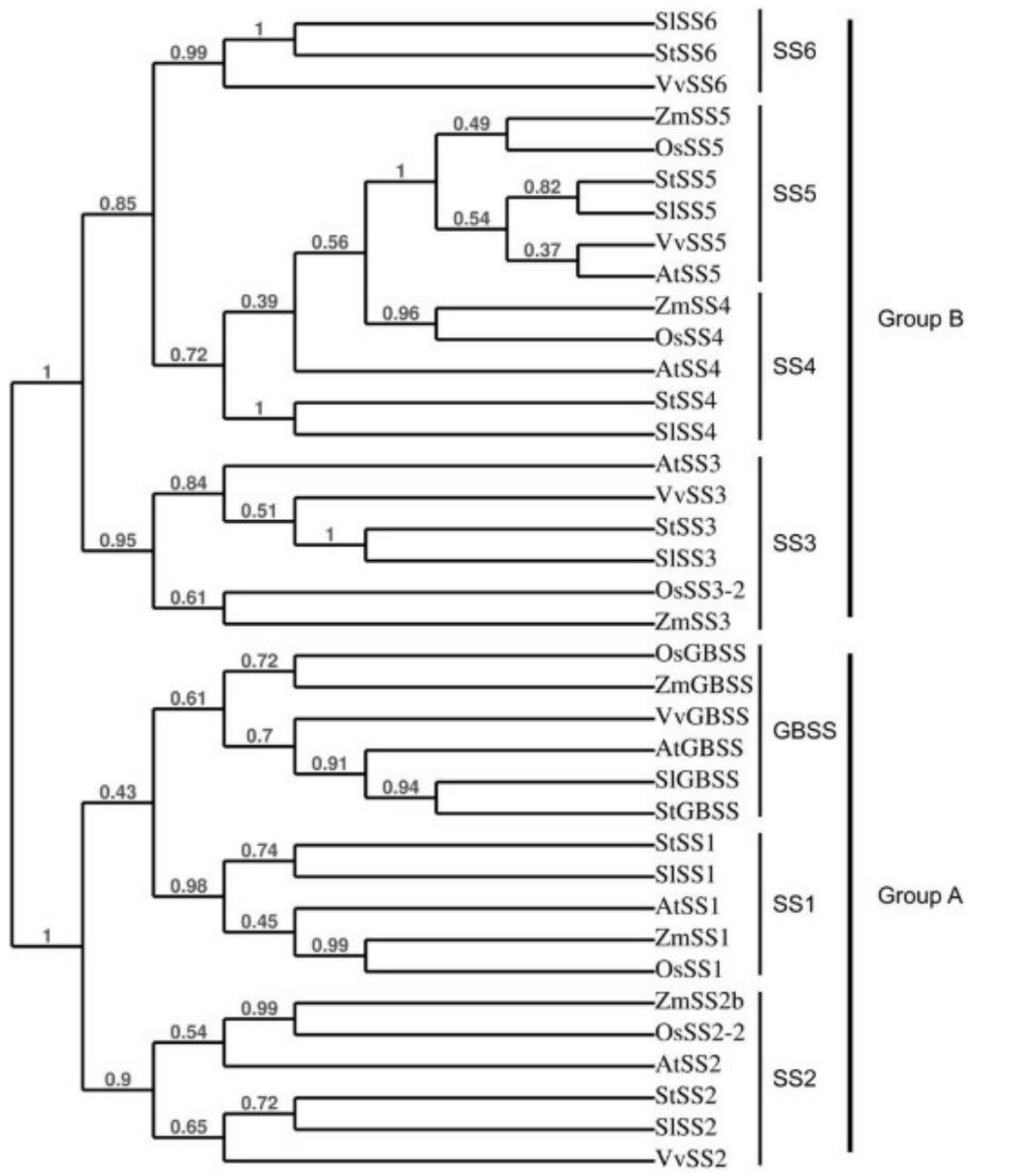


Figure 20: Relation phylogénétique entre les amidon-synthases de plusieurs espèces montrant l'existence de deux groupes A et B. L'arbre a été construit à l'aide de PhyML (basé sur le maximum de vraisemblance), les intervalles de confiance ont été attribués par bootstrap (100 répétitions). At) *Arabidopsis thaliana*; St) *Solanum tuberosum*; Zm) *Zea mays*; Os) *Oryza sativa*; Vv) *Vitis vinifera*; Sl) *Solanum lycopersicum* (adapté de Helle *et al.* (2018))

b. Les enzymes de branchement

L'acquisition du caractère ramifié de l'amidon nécessite l'intervention d'enzymes spécialisées dans la création de points de branchements : les enzymes de branchements (BEs). Ce processus est à la base de la structuration de l'amidon. Il permet en particulier de multiplier les extrémités non-réductrices et donc les substrats potentiels pour les amidon-synthases.

Les enzymes de branchements sont des α -amylases appartenant aux familles 13 et 57 des glycoside-hydrolases d'après la classification CAZy et qui catalysent des réactions de trans-glycosylation inter ou intramoléculaires (Lombard et al., 2014).

La création d'une nouvelle ramification passe par l'hydrolyse d'une liaison α -1,4 d'un glucane pré-existant. Le transfert de cette chaîne sur le carbone 6 d'un résidu de glucose d'une autre chaîne par la formation d'une nouvelle liaison α -1,6 génère un nouveau point de branchement. On parle alors d'une réaction intermoléculaire. Si le glucane est transféré sur un résidu glucose de la même chaîne, la réaction est dite intramoléculaire (Figure 21) (Tetlow and Emes, 2014).

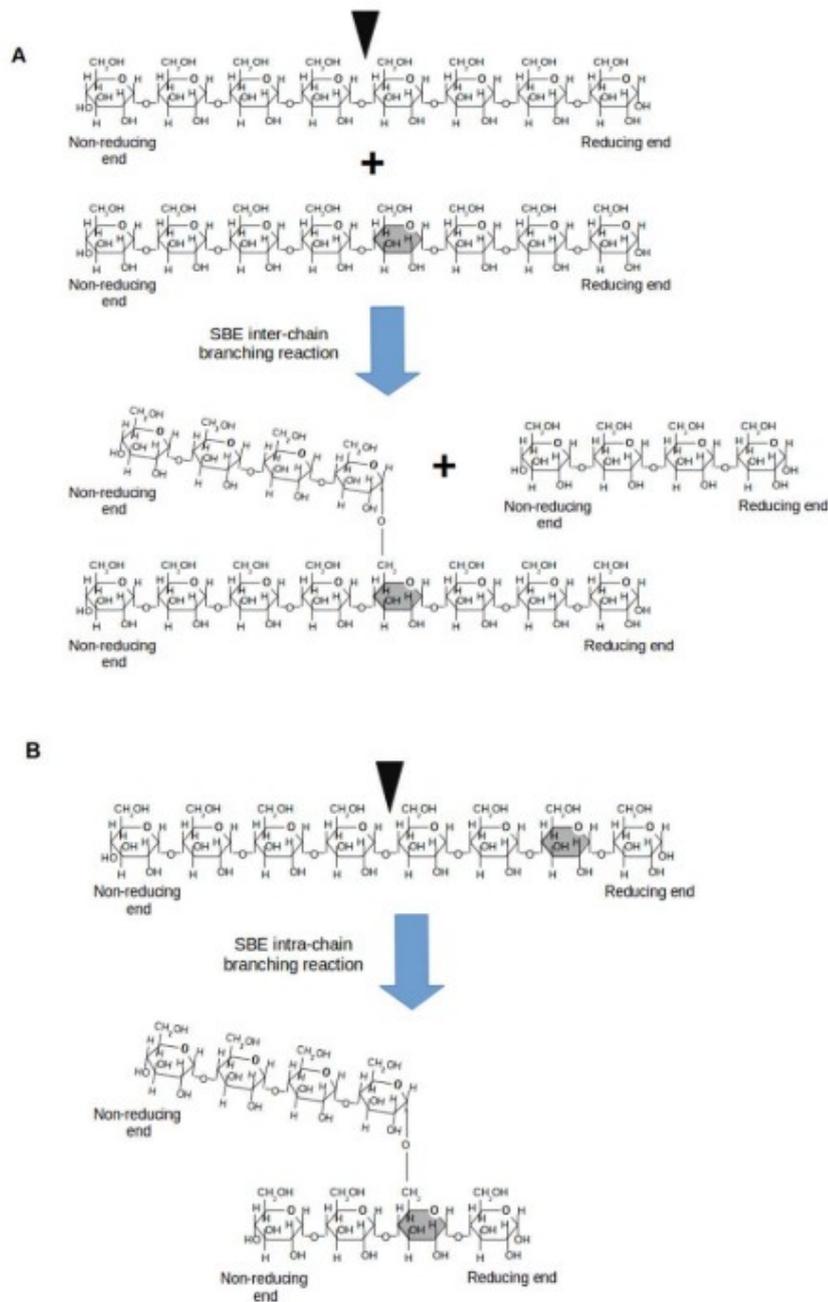


Figure 21: Réactions de transfert Intermoléculaire et intramolécule catalyser par les enzymes de branchement. A) ramification Intermoléculaire: clivage d'une liaison α -1,4 dans une chaîne donneuse et transfert du fragment terminal non-réducteur à la position hydroxyle C-6 d'un résidu glucose sur une chaîne accepteur adjacente pour créer une liaison α -1,6-glucosidique (ramification). La réaction de ramification Intermoléculaire prédomine probablement dans les BE végétales. B) transfert intramolécule: clivage d'une liaison α -1,4-glucosidique suivi du transfert du fragment terminal non réducteur à la position hydroxyle C-6 d'un résidu glucose sur la même chaîne. Différentes isoformes BE ont des préférences distinctes pour le transfert de longueur de chaîne. Le résidu glucose utilisé comme accepteur pour la synthèse de la liaison α -1,6-glucosidique (ramification) est ombré en gris. (Adapté de Tetlow et Emes, 2014)

Les BEs possèdent des caractéristiques structurales communes.

En effet, on y retrouve un domaine catalytique central et un domaine C-terminal typique de la famille des α -amylases. De plus, les BE1 et BE2 possèdent dans leur région N-terminale, un motif de liaison aux carbohydrates de type CBM48 (Figure 22).

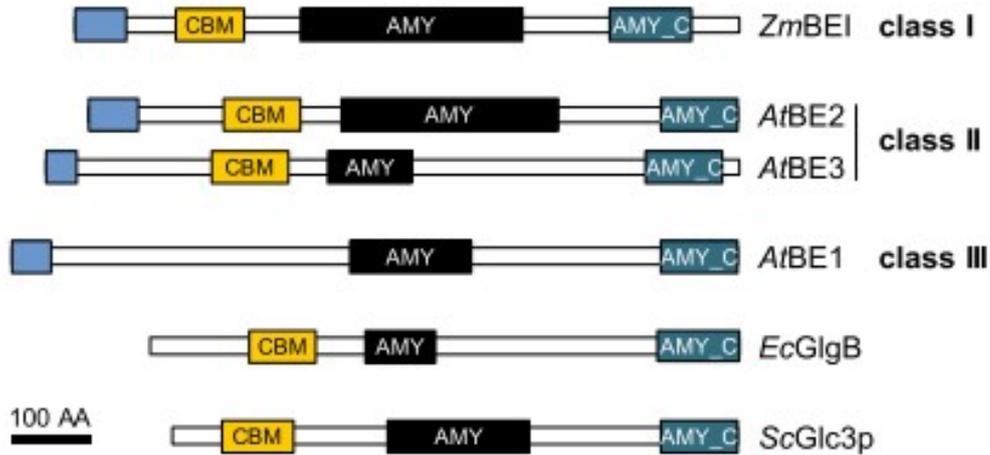


Figure 22: Structure protéique des enzymes de branchement. Les encadrés bleu clair en position N-terminale représentent les peptides de transit permettant l'adressage au plaste. Les encadrés jaunes représentent les modules de liaison aux carbohydrates de la famille des CBM48. Les encadrés noirs et bleus en position C-terminale représentent des domaines très conservés chez les enzymes de la famille des α -amylases. (Adapté de Pfister et Zeeman, 2016a)

Il existe trois classes (ou familles) de BEs.

La classe I qui correspond à la famille B est présente sous une seule isoforme chez de nombreuses espèces. *A.thaliana* fait figure d'exception et ne possède pas cette isoforme (Dumez et al., 2006). Le phénotype induit par la mutation du gène responsable de la synthèse de cette enzyme n'entraîne chez les plantes étudiées qu'un changement léger dans la structure de l'amylopectine. Cette observation a été faite chez plusieurs plantes, notamment chez la pomme de terre (Safford et al., 1998). Cette isoforme serait responsable du transfert de chaînes de DP supérieur à 10 et aurait comme substrat préférentiel l'amylose (Nakamura et al., 2010).

Chez le riz, elle est capable de transférer des chaînes ramifiées (Sawada et al., 2014).

La classe II ou famille A, est quant à elle présente sous deux isoformes chez les céréales et chez *A.thaliana* alors qu'une seule isoforme est observée chez la pomme de terre et le pois.

Chez les céréales, l'isoforme BE2b étant principalement exprimée dans les graines alors que l'isoforme BE2a est exprimée dans l'ensemble des tissus de la plante bien qu'elle le soit beaucoup plus faiblement que BE2b.

Chez *A.thaliana*, les deux isoformes BE2.1 et BE2.2 sont exprimées dans les feuilles et sont fonctionnellement redondantes (Ball et al., 1996). Cette classe d'enzymes de branchement transfère des chaînes plus courtes que la précédente, de longueurs allant de DP6 à DP15 (Singh and Kaur, 2016) et elle est plus active sur l'amylopectine (Pfister and Zeeman, 2016).

La mutation du gène correspondant entraîne un enrichissement en amylose ainsi qu'une forte augmentation de l'abondance des longues chaînes de l'amylopectine, qu'elles soient internes ou externes. Ce phénotype est connu sous le nom d'"amylose extender" et confère à l'amidon une résistance à la digestion. Cet amidon présente de fait un fort intérêt en nutrition humaine et animale (Tetlow and Emes, 2014).

Chez la pomme de terre, la mutation de cette isoforme entraîne une augmentation de l'abondance des longues chaînes. Le mutant ne présente pas d'augmentation de la teneur en amylose (Safford et al., 1998).

De plus, la sur-expression de BE2 entraîne une augmentation de l'abondance des chaînes de DP6 de l'amylopectine et une diminution du contenu en phosphate (Brummell et al., 2015).

La troisième classe de BE a été identifiée chez *A.thaliana*, le riz, le peuplier et le maïs (Han et al., 2007).

Aucune activité catalytique n'a été montrée pour cette isoforme chez *A.thaliana* et la mutation du gène correspondant est embryoléthale (Dumez et al., 2006; Wang et al., 2010).

L'activité des BEs est conditionnée par la longueur minimale du substrat donneur. Ainsi, chez le maïs, BE1 est capable d'agir sur des chaînes de longueur supérieure ou égale à DP16 alors que BE2 est active sur des chaînes plus courtes, à partir de DP12 (Wychowski and Hawkins, 2017).

c. Les enzymes de débranchement

L'activité des différentes isoformes de BEs n'explique pas la distribution hétérogène des points de branchements dans l'amylopectine.

Cette caractéristique spécifique à l'amidon résulte d'un élagage de certains points de branchements par un groupe d'enzymes spécialisées: les enzymes de débranchement (DBEs).

Un modèle montrant l'importance de ces enzymes dans la synthèse de l'amidon a été formulé par Ball et al. (1996) (Figure 23).

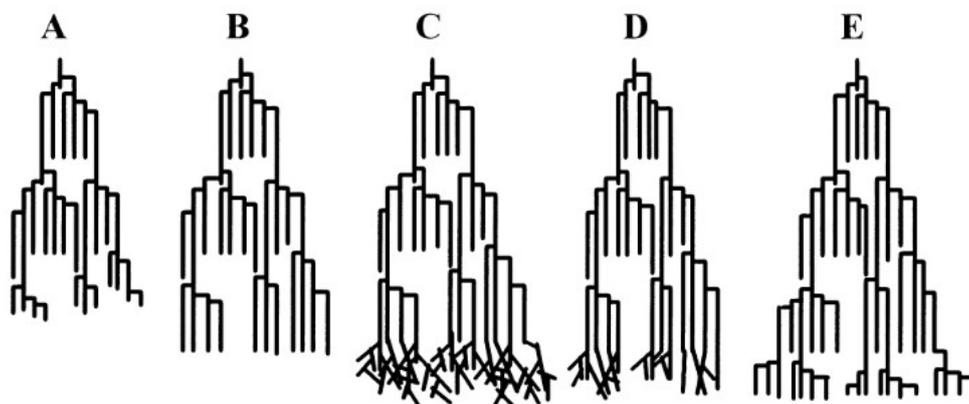


Figure 23: Modèle de synthèse discontinue de l'amylopectine. B) L'élongation des chaînes les plus externes du grain à lieu jusqu'à la taille requise pour permettre l'activité des enzymes de branchement. C) Un branchement aléatoire à alors lieu, D) les enzymes de débranchement vont alors hydrolyser certains point de branchement et E) permettre la cristallisation des doubles hélices. (Adapté de Ball *et al.*, 1996)

Ces enzymes hydrolysent les liaisons α -1,6 de l'amylopectine, permettant l'élimination des points de branchement en excès et facilitant la cristallisation des chaînes d'amylopectine nouvellement synthétisées (Ball et al., 1996).

Les DBEs présentent des points communs avec les enzymes de branchement dans leur structure protéique. En particulier, la présence d'un domaine central de la famille des α -amylases et d'un site de liaison aux carbohydrates de type CBM 48 (Figure 24) (Pfister and Zeeman, 2016).

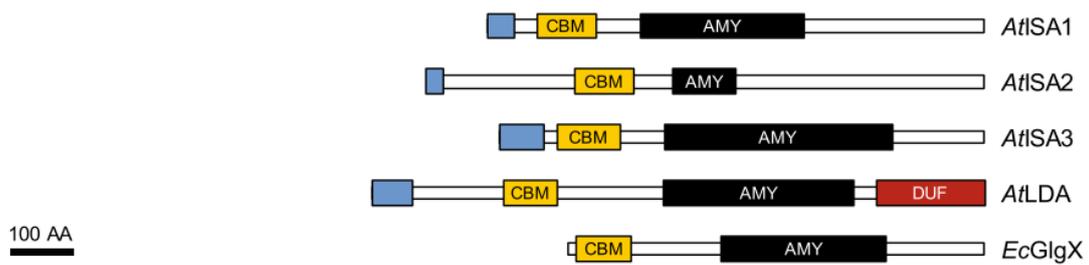


Figure 24: Structure protéique des enzymes de débranchement. Les encadrés bleus clairs en position N-terminale représentent les peptides de transit permettant l'adressage au plaste. Les encadrés jaunes représentent les modules de liaison aux carbohydrates de la famille des CBM48. Les encadrés noirs représentent des domaines très conservés chez les enzymes de la famille des α -amylases. L'encadré rouge représente un domaine protéique DUF3372 (Adapté de Pfister et Zeeman, 2016a)

Les DBEs sont impliquées dans la synthèse de l'amidon par l'intermédiaire de deux isoformes d'isoamylases : ISA1 et ISA2 (E.C.3.2.1.68).

Une seule de ces deux isoformes comporte un site catalytique fonctionnel, ISA1. Cependant, chez *A.thaliana*, la mutation de l'une des deux isoformes entraîne une diminution de 80 % de la quantité d'amidon, accompagnée d'une forte modification de la structure de l'amylopectine et de l'accumulation d'un polymère de glucose soluble appelé phyto-glycogène (Delatte et al., 2005).

Facon et al. (2013) ont montré que la présence d'un hétérocomplexe formé de ISA1 et ISA2 était indispensable à la synthèse de l'amidon chez *A.thaliana*. En revanche, chez le maïs comme pour les autres céréales, ISA1 peut être active sous la forme d'un homomultimère (Hussain, 2003; Lin et al., 2013). Ainsi, le phénotype d'un mutant *isa2-* est beaucoup moins sévère chez le maïs que chez Arabidopsis.

De plus, l'expression de l'isoamylase 1 de maïs chez un double mutant *isa1-isa2-* d'*A.thaliana* entraîne la restauration du phénotype sauvage. Ce résultat indique que la formation d'homomultimères ISA1 de maïs est due à une propriété intrinsèque de la protéine (Facon et al., 2013).

Chez la pomme de terre la sous-expression de ISA1 et ISA2 entraîne également l'accumulation de phyto-glycogène mais aussi une multiplication du nombre de grains de petite taille et d'agglomérats de grains (Figure 25) (Bustos et al., 2004).

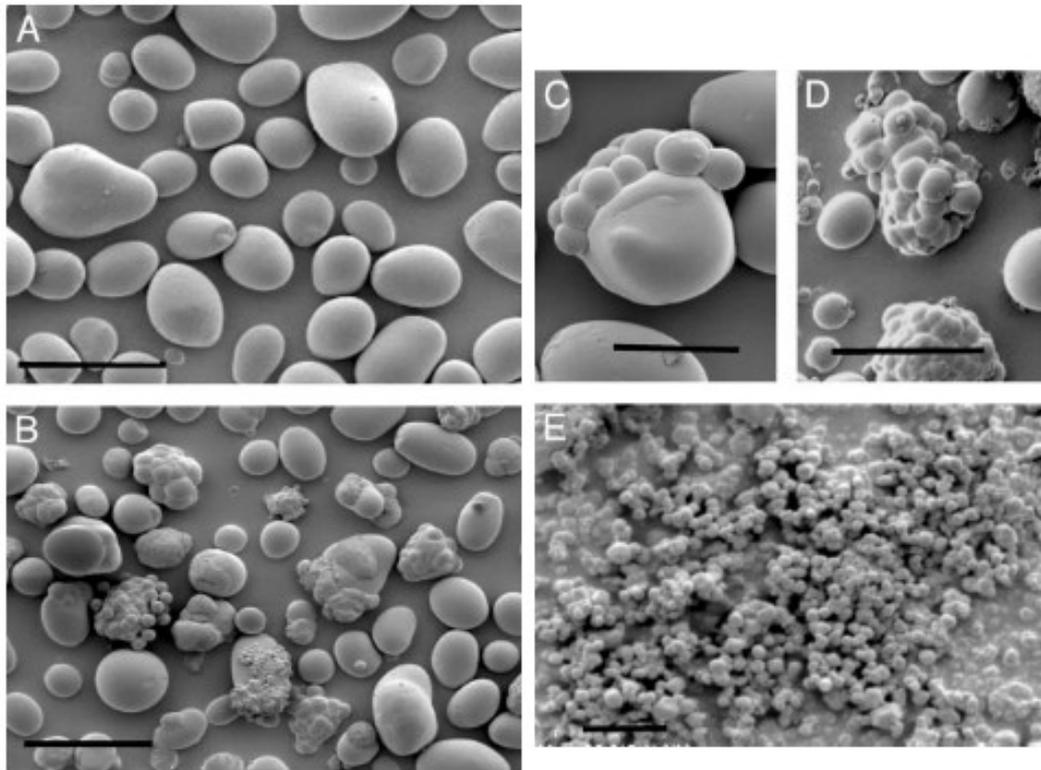


Figure 25: Grains d'amidon isolés de tubercules de pomme de terre A) issus de plantes sauvages, B, D, E) de plantes sous-exprimant ISA1, C) de plantes sous-exprimant ISA2.

On retrouve chez cette espèce la formation d'hétérodimères où ISA1 semble être la seule isoforme active (Hussain et al., 2003)

Une troisième isoforme d'isoamylase, ISA3 et une pullulanase (ou limite-dextrinase) sont principalement impliquées dans la dégradation de l'amidon qui sera discutée plus bas. Les deux enzymes ont toutefois une influence sur la synthèse de l'amidon. En effet, alors que le double mutant *isa1-isa2-* contient encore 20 % d'amidon, le quadruple mutant *isa1-isa2-isa3-lda-* en est totalement dépourvu (Streb et al., 2008). Ce résultat suggère que l'isoamylase 3 et la pullulanase peuvent en partie compenser la perte de l'activité du complexe ISA1/ISA2.

L'action des DBEs entraîne le relargage de chaînes linéaires de glucose pouvant potentiellement être de nouveau impliquées dans le métabolisme de l'amidon.

Ces chaînes plus ou moins courtes peuvent servir de substrat à GBSS et augmenter son activité de synthèse de l'amylose ou encore devenir substrats des enzymes de la voie de dégradation de l'amidon (Denyer et al., 1996; Critchley et al., 2001a).

Certains malto-oligosaccharides (MOS) pourraient aussi être impliqués dans l'initiation du grain d'amidon en servant d'amorces pour les grains nouvellement synthétisés (Seung et al., 2017).

d. Les facteurs de régulation de la synthèse

La synthèse de l'amidon est donc finement régulée par de nombreuses enzymes jouant des rôles complémentaires et parfois redondants. D'autres facteurs accentuent encore un peu plus la régulation de cette synthèse.

Des interactions entre protéines et des complexes protéiques impliquant plusieurs enzymes du métabolisme de l'amidon existent mais leur régulation et leur mécanisme d'action restent majoritairement inconnus.

L'interaction de GBSS avec PTST1, ou encore la formation du complexe ISA1/ISA2 chez *A.thaliana*, sont des mécanismes essentiels pour le fonctionnement correct de ces protéines (Seung et al., 2015; Delatte et al., 2005). Certains autres complexes identifiés chez les céréales impliquent des enzymes de branchement et des amidon-synthases. Les mécanismes régulant la formation de ces complexes ne sont cependant pas encore complètement élucidés. La stabilité de ces complexes est en partie dépendante de la présence de phosphorylations. C'est le cas du complexe formé de BE1, BE2b et d'une amidon-phosphorylase nommée PHS1 (Tetlow et al., 2004; Hennen-Bierwagen et al., 2009) ou encore du complexe SSI/SSII/BEIIa/BEIIb chez le blé (Liu et al., 2009; Ahmed et al., 2015; Crofts et al., 2015).

L'amidon-phosphorylase 1 ou PHS1 (EC.2.4.1.1) est une enzyme plastidiale ayant un rôle encore mal défini dans le métabolisme de l'amidon.

Cette enzyme se démarque de son homologue cytosolique par la présence d'une région constituée de 78 acides aminés et ayant une affinité importante pour les malto-oligosaccharides (Shimomura et al., 1982; Yu et al., 2001b).

in vitro, elle possède la capacité d'allonger les chaînes de glucose en y transférant un résidu supplémentaire à partir du glucose-1-phosphate ou au contraire de catalyser la réaction inverse et de libérer du G1P en agissant sur de l'amidon (Sato et al., 2008).

Au départ désignée comme intervenant dans la dégradation de l'amidon, PHS1, quand elle est mutée, n'entraîne pas de changement dans le processus de dégradation chez *A.thaliana* (Sonnewald et al., 1995).

La pomme de terre possède deux isoformes de PHS1 (Sonnewald et al., 1995).

L'inhibition de l'une ou l'autre n'entraîne pas de changement remarquable dans la capacité de dégradation de l'amidon (Sonnewald et al., 1995).

Cependant, elle conduit à un léger changement de la structure de l'amidon chez le riz (Sato et al., 2008).

Une des pistes importantes pour la compréhension de la fonction de PHS1 dans la régulation de la synthèse de l'amidon résiderait dans les complexes protéiques auxquels elle prend part, notamment chez les céréales, mais aussi dans sa capacité à dégrader des MOS en relarguant du G1P qui est un précurseur de l'ADPG (Dauvillée et al., 2006; Subasinghe et al., 2014; Tetlow et al., 2004).

La régulation de la synthèse de l'amidon est aussi pilotée au niveau du plaste par le niveau énergétique de la cellule et la disponibilité en nutriments.

En effet, certaines enzymes impliquées dans le métabolisme de l'amidon montrent des niveaux d'activité différents selon le niveau d'oxydoréduction de la cellule.

C'est le cas de l'AGPase chez la pomme de terre ou de SS1 chez *A.thaliana* dont les niveaux d'activité augmentent lorsque ces enzymes sont à l'état réduit (Skryhan et al., 2015; Ballicora et al., 2000).

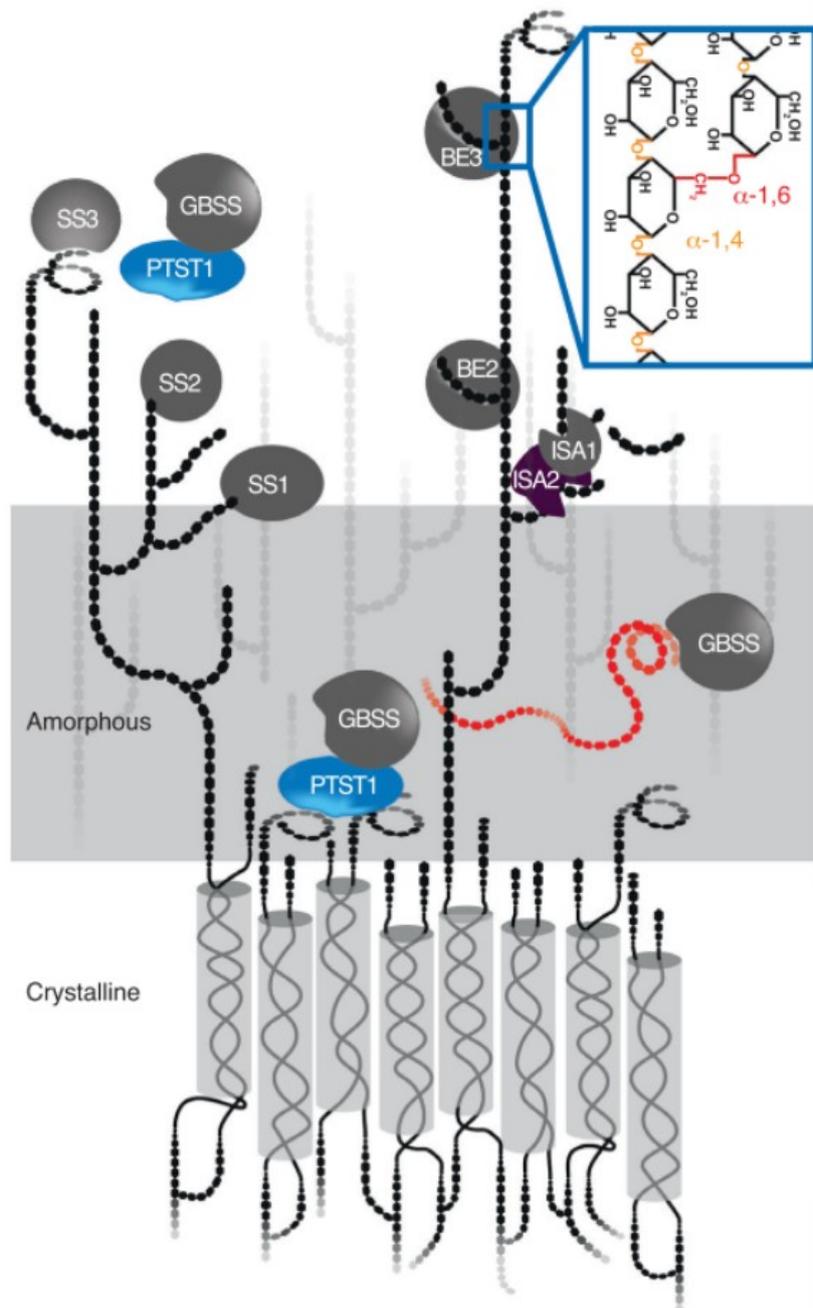


Figure 26: La synthèse de l'amylose et de l'amylopectine. Les SS1-3 allongent les chaînes linéaires de glucose, les BE2-3 introduisent des points de branchements et les ISA1-2 en hétéromultimères hydrolysent certains points de branchements afin de permettre la cristallisation de l'amylopectine. L'action coordonnée de ces enzymes entraîne la formation de clusters où les chaînes d'amylopectines linéaires forment des hélices doubles regroupées pour former une lamelle cristalline. GBSS interagit avec PTST1 qui l'adresse au grain d'amidon, où elle est synthétisée l'amylose. (adapté de Abt *et al.* (2020))

2. La dégradation

L'amidon synthétisé est une forme de stockage d'énergie et de métabolites, qui a pour but d'être remobilisé à plus ou moins long terme pour permettre le développement et la reproduction de la plante. La structure de l'amidon permet sa cristallisation et donc son accumulation sous une forme insoluble et osmotiquement neutre dans les plastes (Ball et al., 1996). Cependant, cette caractéristique rend difficile la dégradation de l'amidon et ce processus complexe nécessite là encore l'action de plusieurs enzymes.

a. Le rôle des phosphorylations de l'amidon dans la dégradation

La première étape de ce processus est la déstabilisation de la structure en double hélice de l'amylopectine par la phosphorylation de certains résidus glucose de l'amidon. Deux enzymes sont responsables de cette phosphorylation et ont des fonctions complémentaires (Kötting et al., 2005; Ritte et al., 2006). La GWD (α -Glucan Water Dikinase) est responsable de la phosphorylation de résidus glucose sur leur carbone 6 uniquement (Ritte et al., 2006). Chez la pomme de terre, elle fonctionne en homodimère et uniquement sur des substrats branchés (Mikkelsen et al., 2004). La mutation de cette enzyme chez *A.thaliana* entraîne une forte baisse du contenu en phosphate accompagnée d'une baisse du taux de dégradation la nuit (Zeeman and Rees, 1999; Yu et al., 2001a). Contrairement à GWD, PWD (Phosphoglucan Water Dikinase) n'est active que sur des glucanes préalablement phosphorylés par GWD. PWD phosphoryle les résidus de glucose en position 3 (Mikkelsen et al., 2004). Son action est donc complémentaire de celle de GWD.

La déstabilisation de la structure de l'amylopectine par l'introduction de groupements phosphates rend les chaînes de glucose accessibles pour les enzymes hydrolytiques. Néanmoins, certaines enzymes de dégradation sont inhibées par la présence de glucoses phosphorylés. Une fois les glucanes de l'amylopectine déstructurés, il est indispensable d'éliminer les groupements phosphates afin que la dégradation de l'amidon puisse se poursuivre. C'est le rôle des enzymes SEX4 et LSF2 initialement identifiées chez *Arabidopsis*.

L'enzyme SEX4 (Stach EXces 4) permet d'éliminer les phosphates en positions C3 et C6 des résidus de glucose (Kötting et al., 2009; Santelia et al., 2011; Silver et al., 2014) .

Contrairement à SEX4, LSF2 (Like-Sex Four 2) déphosphoryle l'amidon en position C3 des résidus de glucose uniquement. Cette enzyme est active pendant la journée, prévenant ainsi une dégradation précoce de l'amidon (Santelia et al., 2011).

b. Les β -amylases

Les β -amylases représentent la principale voie de dégradation de l'amidon.

Cette famille d'enzyme hydrolyse les liaisons α -1,4 à partir de l'extrémité non-réductrice d'une chaîne d'amylopectine en libérant du maltose (Scheidig et al., 2002). La famille des β -amylases comporte neuf isoformes chez *A.thaliana*. Cependant, seulement quatre d'entre elles, BAM1, BAM2, BAM3 et BAM4, sont adressées au chloroplaste : (Fulton et al., 2008).

BAM1 et BAM3 possèdent toutes deux un site catalytique actif et sont responsables de la majeure partie de l'activité β -amylasique (Sparla et al., 2006). Contrairement à l'inactivation de *BAM1*, la mutation de *BAM3* altère la dégradation de l'amidon (Sparla et al., 2006; Kaplan et al., 2006). Cependant, la combinaison de ces deux mutations entraîne un phénotype plus marqué que la mutation de *BAM3* seule, indiquant une redondance fonctionnelle entre les deux enzymes (Fulton et al., 2008).

BAM4 ne possède pas de site catalytique actif, mais son inactivation affecte la dégradation de l'amidon. La mécanique moléculaire sous-jacente reste à élucider. Il a toutefois été suggéré que BAM4 régule l'activité de dégradation (Fulton et al., 2008).

Enfin, la fonction de BAM2 est inconnue. Cette isoforme possède un site catalytique actif mais sa mutation n'entraîne aucun phénotype, même en combinaison avec les mutations des autres isoformes (Fulton et al., 2008).

La dégradation de l'amidon par les BAMs est limitée par la présence de points de branchement qui bloque leur activité. De ce fait, l'activité des β -amylases entraîne la production de β -limite-dextrines.

c. Les autres enzymes de la dégradation

Les β -limite-dextrines sont dégradées par l'action d'enzymes de débranchement spécialisées dans le processus de dégradation de l'amidon, ISA3 et PU1 qui sont respectivement une isoamylase et une limite-dextrinase. Ces deux enzymes montrent une forte activité sur les β -limite-dextrines et la mutation de *ISA3* entraîne un phénotype de

suraccumulation de l'amidon (causé par une baisse du niveau de dégradation) contrairement à l'inactivation de *PU1* (Delatte et al., 2006).

Ce phénotype est encore plus prononcé dans un double mutant *isa3-/pu1-*, ce qui indique une redondance fonctionnelle entre ces 2 enzymes.

Certains produits de la dégradation de l'amidon sont trop petits pour être dégradés par les BAMs, en particulier le maltotriose (Streb and Zeeman, 2012).

L'activité des enzymes disproportionnantes consiste au transfert de ces produits sur des glucanes ou du glucose pour former un produit susceptible d'être dégradé par les BAMs et ainsi empêcher l'accumulation de maltotriose dans les plastes.

Il existe deux isoformes d'enzymes disproportionnantes chez *A.thaliana* et chez la pomme de terre.

La première isoforme identifiée, DPE1 (DisProportionating Enzyme 1), est impliquée dans la dégradation de l'amidon chez *A.thaliana*. La dégradation de l'amidon est altérée chez les mutants *dpe1-* (Critchley et al., 2001b).

Cependant, la réduction de 99 % de l'activité de cette isoforme chez la pomme de terre n'induit pas de phénotype remarquable (Lloyd et al., 2004).

La seconde isoforme, DPE2 (DisProportionating Enzyme 2) est localisée dans le cytosol chez *A.thaliana* dans les plastes chez la pomme de terre (Lloyd et al., 2004).

Cette deuxième isoforme aurait une activité différente de celle de DPE1, en transférant un résidu glucose d'une molécule de maltose sur un autre glucane. La mutation du gène correspondant conduit à une importante accumulation de maltose (Lloyd et al., 2004).

D'autres enzymes sont impliquées dans la dégradation de l'amidon mais de manière plus marginale.

Les α -amylases hydrolysent les liaisons α -1,4 internes aux chaînes de glucose, libérant ainsi des chaînes linéaires ou branchées (Streb and Zeeman, 2012). Une seule isoforme (AMY3) sur les trois présentes chez *A.thaliana* est adressée au chloroplaste. Le mutant *amy3-* d'*Arabidopsis*, ainsi que le triple mutant *amy1-/amy2-/amy3-*, ne présentent pas de phénotype dans les conditions étudiées (Yu et al., 2005).

Cependant, les α -amylases jouent un rôle majeur dans la dégradation de l'amidon de réserve de l'albumen des céréales. Leur inactivation provoque un ralentissement de la germination (Asatsuma et al., 2005).

d. L'export des produits de dégradation

La dernière étape de la dégradation de l'amidon consiste en l'export des produits d'hydrolyse (en particulier du maltose et du glucose) vers le cytosol pour alimenter le métabolisme de la cellule et synthétiser le saccharose qui sera transloqué vers les organes puits.

Le transport de maltose à travers l'enveloppe plastidiale est réalisé par le transporteur MEX1 (Maltose EXporter 1) qui est responsable de la très grande majorité du transport des sucres vers le cytosol (Niittyla, 2004).

En effet, le mutant *mex1*- sur-accumule fortement le maltose ainsi que l'amidon.

La dégradation de l'amidon par les β -amylases est très probablement inhibée par la forte concentration en maltose (Niittyla, 2004). Le transporteur de glucose, pGlcT, est responsable du transport du glucose vers le cytosol (Niittyla, 2004). Contrairement à *MEX1*, sa mutation n'entraîne pas de phénotype remarquable (Niittyla, 2004).

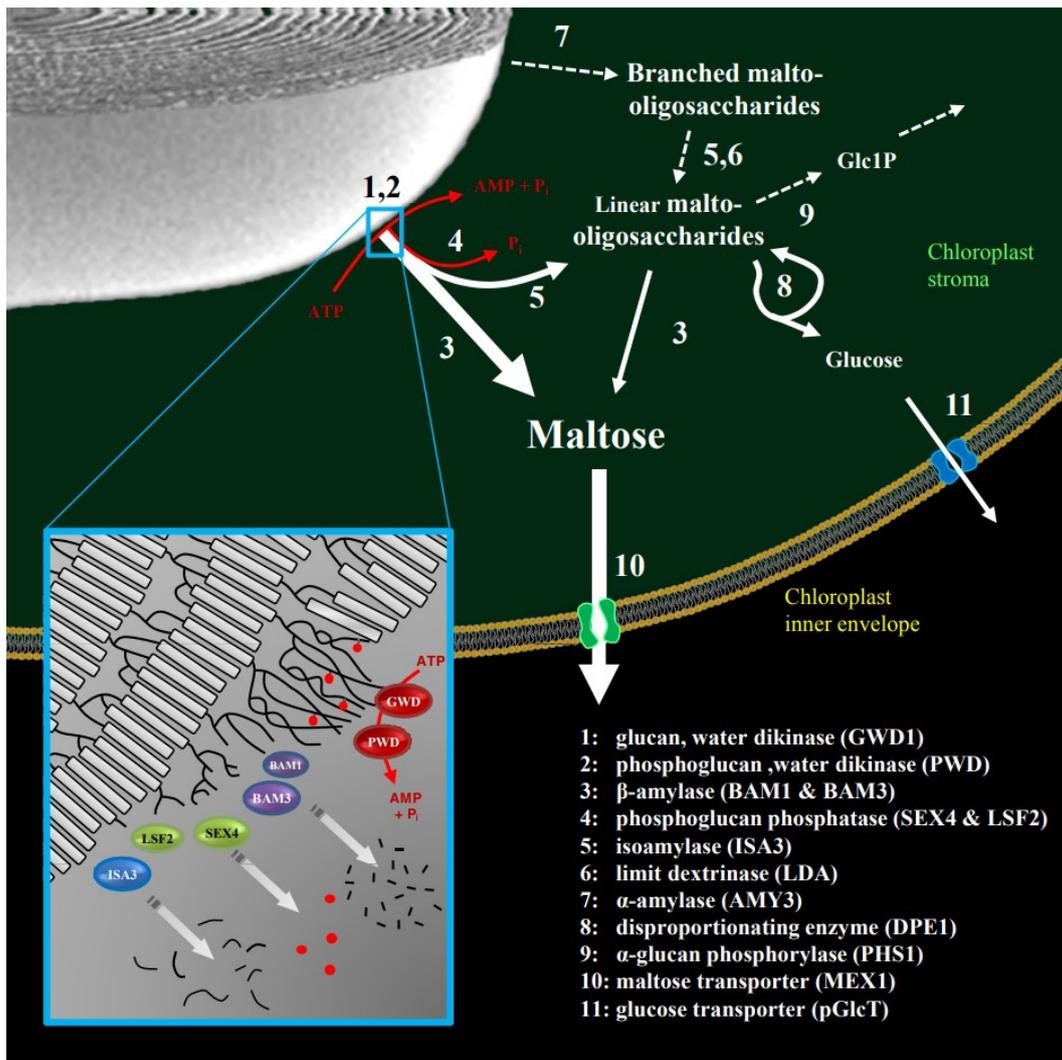


Figure 27: La dégradation de l'amidon dans les chloroplastes. Le maltose et les malto-oligosaccharides sont libérés de la surface du grain d'amidon pendant la dégradation. Les malto-oligosaccharides sont métabolisés dans le stroma. Le maltose et le glucose sont exportés vers le cytosol. Les flux estimés sont indiqués par la taille relative des flèches. Les flèches pointillées représentent les étapes mineures chez *Arabidopsis*. L'encart est un modèle illustrant le rôle de la phosphorylation par GWD1 et PWD dans la perturbation de la structure des doubles hélices d'amylopectine (boîtes grises). Ceci permet la libération de maltose et de malto-oligosaccharides (lignes noires) par les β -amylases (BAM) et DBE (ISA3). Le phosphate (points rouges) est libéré de manière concomitante par SEX4 et LSF2 pour permettre une dégradation complète. (adapté de Streb et Zeeman (2012))

3. L'initiation du grain d'amidon

Une étape essentielle à la formation du grain d'amidon, qui reste néanmoins en grande partie méconnue, est le processus permettant son initiation. Cette étape comprend la formation mais aussi le contrôle du nombre de grains maintenus dans chaque chloroplaste (Ball and Morell, 2003).

Chez les animaux comme chez d'autres organismes synthétisant du glycogène, la glycogénine amorce la formation d'une molécule de glycogène par autoglycosylation (Ball and Morell, 2003). Un mécanisme similaire a proposé chez les plantes (Chatterjee et al., 2005). La réduction de l'expression de cette protéine chez *A.thaliana* entraîne une diminution du contenu en amidon des feuilles (Chatterjee et al., 2005). Cependant, cette enzyme s'est révélée jouer un rôle dans la synthèse de l'hémicellulose (Rennie et al., 2012).

Cependant, le phénotype induit par la mutation d'une amidon-synthase chez *A.thaliana* a montré l'implication de celle-ci dans ce processus.

Les plantes dépourvues de l'amidon-synthase 4, (SS4) présentent une forte diminution du nombre de grains présents dans chaque chloroplaste (Roldán et al., 2007). Ce nombre est généralement compris entre 5 et 7 grains par chloroplaste chez les plantes sauvages. Il est fortement réduit dans le mutant *ss4-*, la plupart des chloroplastes ne comportant qu'un unique grain, voire aucun grain (Crumpton-Taylor et al., 2012). De plus, ces grains ont une forme arrondie très différente de la forme lenticulaire des grains d'amidon des plantes sauvages. Enfin, les plantes dépourvues de SS4 montrent un fort retard de croissance quand on les compare aux plantes sauvages, cette caractéristique étant due à l'accumulation délétère d'ADPGlc dans les chloroplastes (Crumpton-Taylor et al., 2013).

SS4 est donc un acteur majeur de l'initiation du grain d'amidon. La formation du grain résiduel est attribuée à une redondance fonctionnelle avec SS3 (Szydlowski et al., 2009). En effet, une déficience combinée de SS3 et SS4 conduit à l'absence quasi complète de grains d'amidon dans les chloroplastes. De plus, SS3 est capable d'amorcer la synthèse de glucanes *in vitro* en présence d'ADPGlc uniquement (Szydlowski et al., 2009).

Le contrôle du nombre de grains par plaste et de la modification de leur forme ont été attribués à des domaines à différents domaines de SS4. La région N-terminale de SS4 est liée à la localisation de l'enzyme et au déterminisme de la forme des grains (Lu et al., 2018). En effet, SS4 est associée à la membrane des thylakoïdes et présente une

localisation restreinte sous forme de « spots » dans les chloroplastes (Lu et al., 2018). L'interaction de SS4 avec des protéines plastidiales, les fibrillines pourrait être responsable de sa localisation aux membranes des thylakoïdes (Gámez-Arjona et al., 2014). La région C-terminale est quant à elle associée au contrôle du nombre de grains par plaste (Lu et al., 2018).

Cependant, les récentes avancées sur les protéines impliquées dans le métabolisme de l'amidon montrent que ce contrôle du nombre de grains fait intervenir un grand nombre de protéines, qui interagissent entre elles et pourraient fonctionner en complexes (Abt and Zeeman, 2020).

Deux de ces protéines ont été découvertes grâce à leurs homologues de séquence avec PTST1. Respectivement nommées PTST2 (Protein Targeting to STarch 2) et PTST3 (Protein Targeting to STarch 3), leur mutation induit une réduction du nombre de grains d'amidon par chloroplaste chez *A.thaliana* (Seung et al., 2017). Ce phénotype est très marqué chez les mutants *ptst2-* qui présentent un seul grain par plaste, au plus. La morphologie de ces grains n'est toutefois pas affectée. Le phénotype est plus nuancé pour les mutants *ptst3-*. Cependant, la mutation conjointe des deux gènes entraîne un phénotype encore plus marqué que celui des mutants *ptst2-*. PTST2 interagit avec SS4 et PTST3 et possède le même profil de localisation subcellulaire que SS4 (Seung et al., 2017). PTST2 et PTST3 comportent des domaines de liaison à l'amidon. La fonction proposée pour ces protéines serait la fixation et la mise à disposition de MOS pour permettre à SS4 d'initier la synthèse de nouveaux grains.

Deux autres protéines ayant une structure en « coiled-coil » interagissent avec PTST2 et sont impliquées dans le contrôle du nombre de grains. Leur inactivation chez *A.thaliana* conduit généralement à la présence d'un seul grain de forme normale par chloroplaste (Seung et al., 2018).

La première, MFP1, a une localisation subcellulaire similaire à celle de SS4 et PTST2 (Seung et al., 2017). Cependant, la protéine PTST2 fusionnée à la CFP (« cyan fluorescent protein ») et exprimée dans le fond génétique mutant *mfp1-* ne présente plus ce profil de localisation particulier (Seung et al., 2018). La fonction de MFP1 serait donc de garantir la bonne localisation de PTST2 aux membranes des thylakoïdes .

La seconde protéine interagissant avec PTST2 est PII1 (Protein Involved in starch Initiation) aussi nommée MRC (Myosin-Resembling Chloroplast protein) (Seung et al., 2018). Cette protéine présente une localisation subcellulaire similaire à celles de SS4,

PTST2 et MFP1, et interagit directement avec SS4 comme l'indiquent des expériences de double hybride chez la levure et de colocalisation *in planta* (Vandromme et al., 2019).

Cependant, le rôle de PII1 serait fortement lié à celui d'une autre amidon-synthase, SS5. L'amidon-synthase 5 a été identifiée chez le maïs mais n'a pour l'instant été étudiée que chez *A.thaliana*, chez qui elle ne présente qu'un seul des deux domaines glycosyltransférase caractéristiques des amidons synthases (Abt et al., 2020; Liu et al., 2015).

La mutation de SS5, très faiblement exprimé dans les feuilles, entraîne un phénotype très similaire à celui du mutant PII1 en termes de distribution du nombre de grains d'amidon par chloroplastes (Abt et al., 2020). En plus d'une interaction avec elle-même, SS5 interagit avec PII1, indiquant une fonction coordonnée de ces deux protéines (Abt et al., 2020). De plus, l'inactivation de SS5 dans un fond génétique double mutant *pst2-/pst3-* exacerbe le phénotype *ss5-*. Ceci indique une complémentarité de ces protéines dans le contrôle de l'initiation du grain d'amidon.

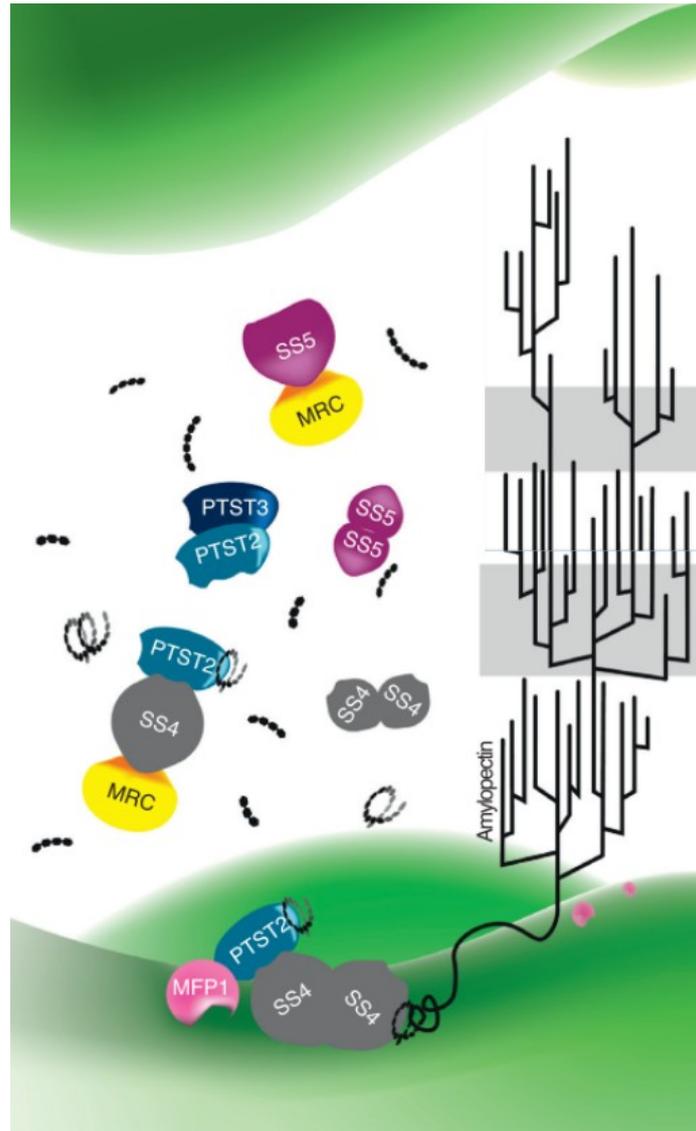


Figure 28: Initiation du grain d'amidon. Des découvertes récentes concernant l'initiation de l'amidon de feuille d'*Arabidopsis* suggèrent que l'initiation peut se produire dans des emplacements spécifiques du chloroplaste, probablement dans des poches stromales formées entre les membranes thylacoïdes (vertes), et qu'une multitude de protéines en interaction sont impliquées. Des interactions protéine-protéine par paires ont été observées, mais le ou les complexes exacts qui initient les granules ne sont pas encore connues. Le rôle de SS4 en tant que principale entité enzymatique dans le processus est incontesté. (adapté de Abt *et al.* (2020))

D. Étude de gènes chez la pomme de terre

La compréhension du métabolisme de l'amidon chez la pomme de terre requiert l'identification de la fonction de nombreux gènes. Cependant, l'étude de ces gènes, par des approches de génétique inverse, est limitée par la difficulté d'obtention de mutants. En effet, contrairement à *A.thaliana*, il n'existe aucune banque de mutants d'insertion pour la pomme de terre. Ceci étant principalement dû au caractère tétraploïde et très hétérozygote de la pomme de terre combiné à un mode de reproduction principalement végétatif (Bhaskar et al., 2009). Il en résulte une très grande difficulté à créer des lignées mutantes par des techniques de transformation des bourgeons floraux et une impossibilité d'obtenir des mutants d'insertion hétérozygote sans bouleverser le patrimoine génétique des variétés étudiées.

Cependant, de nombreuses données sont disponibles pour faciliter l'étude des gènes chez la pomme de terre. En particulier, le génome d'une variété dihaploïde (diploïde issue d'un doublement chromosomique) de *Solanum tuberosum* du groupe Phureja a été séquencé et assemblé (Xu et al., 2011). Concernant le métabolisme de l'amidon, Van Harselaar et al., (2017) ont identifié le locus de 77 enzymes et réalisé une analyse de leur expression dans les tubercules.

De plus, la transformation génétique de la pomme de terre est depuis longtemps maîtrisée. À défaut de pouvoir obtenir des mutants pour les gènes étudiés, les premières approches de génétique inverse se sont contentées d'en réduire l'expression en utilisant des ARN interférents. Cette méthode a été utilisée dans de multiples études, y compris pour l'étude de l'amidon (Andersson et al., 2006; Ferreira et al., 2017; Lloyd et al., 2004). Cependant, elles ne garantissent pas l'absence totale d'expression du gène étudié.

D'autres méthodes, permettant cette fois-ci l'induction de mutations ciblées dans le génome ont donc été adaptées à la pomme de terre. Ces méthodes de mutagenèse dirigées impliquent l'action d'endonucléases capables de réaliser des cassures double-brin, au niveau des séquences ciblées de l'ADN génomique.

Ces cassures double-brin ou « DSBs » (Double-Strand Breaks) peuvent ensuite être réparées par deux voies distinctes : 1) la voie de la recombinaison homologue ou « HDR » (Homology-directed repair) est une voie de réparation nécessitant un brin d'ADN modèle (chromatide sœur ou séquence volontairement introduite), la réparation donnant une

séquence identique à un brin d'ADN modèle. 2) la voie de la jonction d'extrémités non-homologue (NHEJ) permet une réparation bout à bout des extrémités libres des deux brins d'ADN.

Ce dernier type de réparation est donc très propice à la création de mutations. Celles-ci pourront induire un changement d'acide aminé dans la protéine correspondante dans le cas d'une substitution, ou un changement de cadre ouvert de lecture dans le cas d'une insertion ou d'une délétion d'un nombre de nucléotides non-multiple de 3 et ainsi induire l'apparition d'un codon STOP prématuré dans la séquence protéique.

Deux types de systèmes à endonucléases ont été utilisés dans ce but chez la pomme de terre : les TALENs et CRISPR/Cas9, le premier étant antérieur au second.

Les TALENs sont des protéines artificielles dérivées de TALE (Transcription Activator-Like Effector), des facteurs protéiques sécrétés par des bactéries pathogènes des plantes, du genre *Xanthomona* (Yamamoto, 2014). Ces effecteurs sont injectés dans la cellule hôte par un système de sécrétion de type III. Ils vont alors se fixer de manière ciblée à l'ADN de la cellule hôte et augmenter l'expression de certains gènes, favorisant ainsi l'infection par le pathogène (Bogdanove et al., 2010). La liaison à la séquence cible se fait par l'intermédiaire d'une répétition de motifs protéiques quasiment identiques de 34 acides aminés. Chacun de ces motifs est capable de se lier à un nucléotide de manière spécifique et la nature de ce nucléotide dépend des deux acides aminés en position 12 et 13 sur le motif: un couple asparagine et isoleucine correspond à une adénosine, un couple asparagine et glycine correspond à une thymine, un couple histidine et acide aspartique correspond à une cytosine et couple constitué de deux asparagines correspond à une guanine (Figure 29).

nécessite la présence d'un ARN guide (gRNA) pour catalyser la réaction de cassure double brin au niveau de la séquence cible. La séquence du gRNA est partiellement complémentaire de la séquence cible, le reste de sa séquence étant indépendant de celle-ci. La séquence cible est longue d'environ 20pb et est obligatoirement accolée à un motif NGG en 3' appelé PAM (Protospacer Adjacent Motif). Le complexe gRNA/Cas9 induit une cassure de l'ADN sur les deux brins trois bases en amont du PAM (Figure 30) (Yamamoto, 2014). L'utilisation de CRISPR/Cas9 pour la mutagenèse dirigée est beaucoup plus simple à mettre en œuvre que l'utilisation de TALENs, car elle ne requiert que la synthèse de séquence codant l'ARN guide.

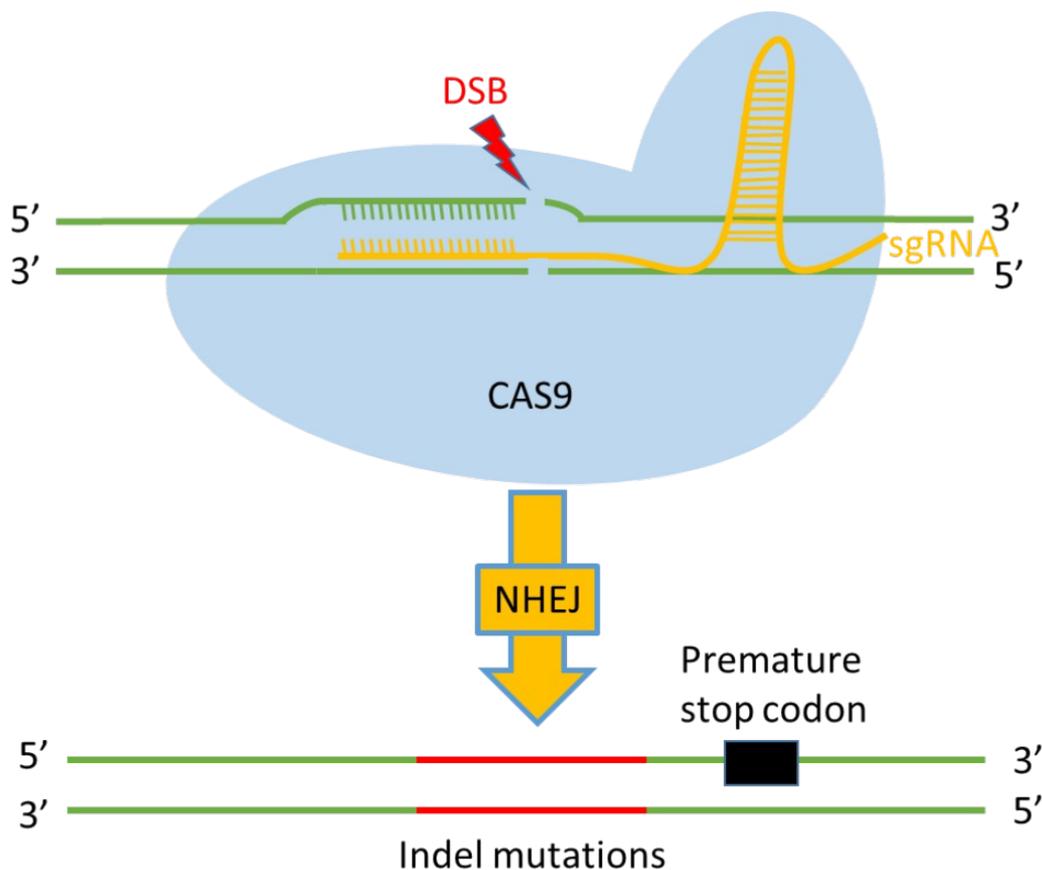


Figure 30: Le complexe CRISPR/Cas9 permet d'induire des cassures double-brin dans l'ADN au niveau d'une séquence ciblée qui peuvent être réparées par jonction des extrémités non-homologues et entraîner la création de mutations.

De nombreuses publications rapportent l'utilisation fructueuse du système CRISPR/Cas9 sur la pomme de terre avec là encore ALS1 et GBSS comme cibles génétiques (Butler et al.,

2015, 2016; Veillet et al., 2019a; Andersson et al., 2017, 2018; Johansen et al., 2019; Veillet et al., 2019b; Kusano et al., 2018).

Ces publications regroupent plusieurs méthodes de délivrance de l'endonucléase dont la transformation stable via *A.tumefaciens*, la transfection de protoplastes avec un vecteur nucléotidique et la transfection de protoplaste avec l'endonucléase sous forme de complexe nucléoprotéique.

Cependant, d'autres publications rapportent aussi la modification de caractère agronomique de la pomme de terre par ces méthodes (Tuncel et al., 2019; González et al., 2020; Nakayasu et al., 2018; Ye et al., 2018).

Les caractères ciblés comprennent des modifications des propriétés organoleptiques des tubercules, des modifications des propriétés de l'amidon ou encore l'abolition de l'auto-incompatibilité d'une espèce diploïde.

D'autres publications encore portent sur l'étude de voies métaboliques, illustrant ainsi l'avancée majeure qu'est la découverte de ce système enzymatique pour l'étude fonctionnelle de gènes chez la pomme de terre, comme chez d'autres espèces (Hua et al., 2020; Zhou et al., 2017).

E. Problématiques

Comme nous avons pu le montrer dans cette introduction, le métabolisme de l'amidon est complexe et finement régulé. De nombreuses études ont permis de révéler les fonctions complémentaires d'une multitude de protéines dans ce métabolisme. Cependant, une grande partie du fonctionnement de celui-ci reste inconnue. Pourtant, la compréhension des mécanismes sous-jacents au processus de synthèse, de dégradation et de régulations de celles-ci représentent un enjeu fort dans l'amélioration des plantes, dans la nutrition humaine ou encore dans la production de nouveaux matériaux pour l'industrie.

Les travaux de doctorat présentés dans ce manuscrit portent sur l'étude d'une partie de ce métabolisme chez la pomme de terre. Cette plante tubérisée s'avère être un bon modèle, depuis longtemps utilisé en laboratoire pour ce type d'étude. Nous avons cherché à comprendre la fonction de l'amidon-synthase 6, récemment identifiée chez la pomme de terre. L'existence de cette protéine, potentiellement active et très similaire aux amidon-synthases 4 et 5, pose la question de sa fonction et de l'apport d'une 7^e amidon-synthase à la machinerie complexe de la synthèse de l'amidon. Pour répondre à cette question, nous avons entrepris de moduler l'expression de SS6 la pomme de terre. Cette modulation, en particulier l'inactivation du gène codant SS6, a nécessité la mise en œuvre d'une technique de mutagenèse dirigée utilisant l'endonucléase CRISPR/Cas9.

Pour permettre l'utilisation efficace de cette technique sur ce gène, mais aussi sur les autres gènes étudiés au laboratoire, nous avons entrepris le séquençage et l'identification des variations de séquence face au génome de référence de la variété de pomme de terre utilisée. L'objectif de ce travail est de fournir un outil facilitant le choix des séquences cible de l'endonucléase.

Nous avons parallèlement analysé des plantes issues de ce même processus de mutagenèse, cette fois, dirigée contre le gène codant une autre amidon-synthase : la GBSS. La mutation de ce gène entraînant un phénotype caractérisé par l'absence de synthèse d'amylose, nous avons réalisé la caractérisation biochimique de l'amidon produit par des lignées présentant d'importantes modifications du niveau d'activité GBSS.

Nous avons finalement entrepris la mutation du gène codant la protéine SS6 ainsi que sa surexpression avec pour objectif l'analyse phénotypique des plantes obtenues. En parallèle, la localisation subcellulaire de l'enzyme et la nature de son activité *in vitro* ont été étudiées.

II. Matériel et méthodes

A. Biologie moléculaire

1. Conservation et multiplication des plasmides utilisés

La souche utilisée pour la conservation et la multiplication des plasmides contenant un gène suicide *ccdB* est *ccdB Survival™ 2 T1^R* (génotype: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2).

Pour tous les autres plasmides la souche utilisée est *Escherichia coli* TOP10 (génotype: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG).

2. Reséquençage du génome de pomme de terre cv. Désirée

Le reséquençage du génome du cultivar Désirée a été réalisé par l'entreprise Genoscreen. L'ADN d'une plante cultivée *in vitro* a été extrait et une banque de fragments de 550 pb a été préparée avant séquençage en « paired-end reads » 2x150 pb dans un appareil Illumina HiSeq 4000. Environ 100 millions de fragments ont ainsi été séquencés.

3. Analyse des variations génétiques

L'analyse des variations génétique a été réalisée en utilisant l'outil informatique Geneious 11.1.2. Les données de mauvaise qualité aux extrémités des reads (probabilité d'erreur supérieure à 0,05) ont été rognées avant de les aligner sur le génome de référence en utilisant l'outil Bowtie mapper. Une détection des variants a ensuite été réalisée sur les contigs obtenus avec les paramètres suivants: la position des variations détectées doit être couverte par au moins 8 reads et la variation doit avoir une fréquence supérieure à 0,05 ; la P-value du variant et la P-value du « biais de brin » doivent être inférieurs à 10^{-5} .

4. Analyse des cibles potentielles pour CRISPR/Cas9

La définition des cibles potentielles pour CRISPR/Cas9 a été réalisée à l'aide des outils Geneious et CRISPR-P (disponible à l'adresse <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) (Liu et al., 2017). Les paramètres retenus pour la sélection des cibles sont l'efficacité prédite, la spécificité, la probabilité d'induire un changement de cadre de lecture, et la structure

secondaire de l'ARNGuide (Liu et al., 2017; Lorenz et al., 2015; Fu et al., 2014; Doench et al., 2016; Liang et al., 2016).

5. Construction des vecteurs CRISPR/Cas9 anti-SS6

Les vecteurs utilisés pour la mutagenèse dirigée contre le gène SS6 sont issus de la modification du plasmide pDIRECT_22A offert par Daniel Voytas (Addgene plasmid #91133 ; <http://n2t.net/addgene:91133> ; RRID:Addgene_91133) en suivant les instructions fournies dans la publication de Čermák et al. (2017). Brièvement, deux oligonucléotides partiellement complémentaires ont été synthétisés et hybridés créant ainsi un fragment d'ADN double-brin avec des extrémités débordantes, celui-ci comprend la séquence codant l'ARN guide. Une digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction AarI a permis l'ouverture du plasmide avant la ligation du fragment d'ADN précédemment généré. La carte du vecteur est présentée en Annexe 1.

6. Construction des vecteurs de surexpression de SS6 et de fusion de SS6 avec la GFP

Une séquence correspondant au cDNA du gène codant SS6, sans codon STOP, bordé par deux séquences attL1 et attL2 du système de clonage Gateway™, a été synthétisée par l'entreprise Genscript®. Cette séquence a ensuite été clonée dans le vecteur pK7FWG2 par réaction LR donnant ainsi le plasmide pK7FWG2-SS6::GFP (Karimi et al., 2002). Une réaction supplémentaire de mutagenèse sur ce plasmide a permis la création d'un codon STOP à la fin du cDNA du gène codant SS6, abolissant ainsi la fusion avec la GFP et donnant le plasmide pK7FWG2-SS6::STOP. La carte du vecteur est présentée en Annexe 2

7. Criblages des plantes pour la transformation génétique par PCR

Les plantes isolées à l'issue des expérimentations de transformation génétique via *A.tumefaciens* ont fait l'objet d'une validation de leur transformation. Cette validation a été réalisée via l'amplification d'ADN génomique par PCR d'une séquence présente sur le vecteur utilisé dans l'expérimentation et ne pouvant être acquise que par celle-ci.

L'ADN génomique des plantes testées a été obtenu en utilisant la méthode standard au centimonium bromide (CTAB) sur deux feuilles de plantes cultivées *in vitro* (Porebski et al., 1997).

Dans le cas de vecteurs CRISPR/Cas9 anti-SS6, la séquence amplifiée correspond à une fraction de la séquence codant l'endonucléase CAS9. Les amorces utilisées dans ce cas

sont CGCATCTCTCGGAACCTACC (Forward) et GTCCTCCCCTCTCAGCCTTA (Reverse).

Dans le cas de vecteurs de surexpression de SS6 et de fusion de SS6 avec la GFP, la séquence amplifiée correspond à une fraction de la séquence codant GFP (présente dans les deux cas même après mutagenèse sur le vecteur). Les amorces utilisées dans ce cas sont AAGTTCATCTGCACCACCGG (Forward) et TCTCGTTGGGGTCTTTGCTC (Reverse).

La Taq polymérase utilisée est la DreamTaq (Thermo Scientific™) avec les paramètres de la PCR sont les suivants: 95 °C, 2 min + (95 °C, 30 sec + 60 °C, 30 sec + 72 °C, 25 sec)x30 cycles + 72 °C, 5 min.

Pour chaque amplification, un témoin de manipulation ne comprenant pas d'ADN, un témoin comprenant la séquence recherchée et un témoin comprenant de l'ADN de plante sauvage ont été utilisés.

8. Criblage des plantes transformées pour la détection de mutations par PCR et séquençage Sanger

Les plantes montrant l'incorporation des gènes d'intérêt ont été criblées afin d'identifier celles présentant des mutations dans la séquence ciblée la Cas9.

Pour ce faire une amplification par PCR de la séquence ciblée a été réalisée en utilisant une Taq polymérase de haute fidélité présentant une activité de relecture, la Taq KAPPA HIFI (Sigma-Aldrich).

La séquence amplifiée comprend une partie du deuxième, le troisième et le quatrième exons. Les amorces utilisées sont TTCGGGCGTTCCAGTGATAC (Forward) et TATGGTGTGCAACGGTCTCC (Reverse).

Les paramètres de la PCR sont les suivants: 95 °C, 5 min + (98 °C, 20 sec + 60 °C, 15 sec + 72 °C, 25 sec)x30 cycles + 72 °C, 5 min.

Pour chaque amplification, un témoin de manipulation ne comprenant pas d'ADN et un témoin comprenant de l'ADN de plante sauvage ont été utilisés.

Les séquences amplifiées ont ensuite été séquencées par la technique Sanger dans les deux sens, en utilisant les amorces utilisées pour leur amplification. Les signaux de séquençages obtenus ont ensuite été analysés en utilisant l'outil ICE de synthego disponible à l'adresse ice.synthego.com.

Cet outil permet l'identification de mutations de la séquence ciblée même en présence d'insertion et délétions sur des chromosomes différents.

9. Génotypage par clonage et séquençage de plantes prédites mutées

Un clonage de la séquence ciblée pour la mutagenèse dirigée a été réalisé chez les plantes présentant des mutations afin d'éliminer l'effet de superposition des signaux, lors du séquençage de produits PCR différents en tailles.

Les produits PCR obtenus par la méthode précédente ont d'abord été purifiés grâce au kit de purification Purelink™ (Thermo Scientific™) avant de réaliser un « A-tailing » sur ceux-ci. Cette étape consiste à l'ajout d'une désoxyadénosine simple à l'extrémité 3' du produit PCR par incubation de celui-ci en présence de 0,2 mM d'ATP et d'une unité de Taq polymérase Dreamtaq (Thermo Scientific™) pendant 5 min à 72 °C et dans un tampon prévu à cet effet.

Les produits de réaction obtenus ont ensuite été clonés dans le vecteur pCR™2.1 grâce au kit de clonage TA™ (Thermo Scientific™) avant d'être utilisés pour la transformation de bactérie *E.coli* TOP10.

Pour chaque plante analysée, les plasmides de 12 colonies issues de cette transformation ont été extraits en utilisant un kit Miniprep pour plasmides PureLink™ HiPure (Thermo Scientific™).

Ces plasmides ont ensuite été séquencés par séquençage Sanger dans les deux sens, en utilisant les amorces standards M13F et M13R.

10. Construction du vecteur d'expression de SS6 recombinante

La séquence permettant la production de SS6 de manière recombinante dans *Escherichia coli* est constituée de l'ADNc (ADN complémentaire) de SS6 dépourvu de son peptide de transit. L'identification du peptide de transit a été réalisée à l'aide de l'outil ChloroP disponible à l'adresse <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>. De plus, une séquence codant une étiquette poly-histidine a été ajoutée à l'extrémité 5' de la séquence afin de permettre la purification de la protéine par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés. Cette séquence a été optimisée pour l'expression dans *E.coli* et intégrée dans le plasmide d'expression pET28-a(+), donnant ainsi le plasmide pET28-a(+)-SS6.

B. Culture et transformation génétique de la pomme de terre

1. Matériel bactérien

La souche bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour les expériences de transformation de la pomme de terre est GV3101 qui possède le vecteur pMP90. Elle présente une résistance génomique à la rifampicine une résistance plasmidique à la gentamicine.

2. Matériel végétal

Le cultivar de pomme de terre utilisé dans les expérimentations de transformation génétique est *Solanum tuberosum* cv. Désirée. Celui-ci a été fourni par le centre de ressources BrACySol (INRA IGEPP). Les plantes sont cultivées sur milieu Murashige et Skoog (MS) (Murashige, 1974) incluant des vitamines, 2 % de saccharose et 8 g/L de Plant Agar (Duchefa®) en chambre de culture avec une photopériode de 16 H jour (80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) / 8 H nuit à 20 °C constant. Les plantes sont maintenues *in vitro* par transplantation des bourgeons terminaux toutes les 3 semaines.

3. Acquisition de la thermocompétence par *A.tumefaciens*

5 mL de milieu de culture LB (Lysogeny broth) contenant 50 mg/L de Rifampicine (Rif) et 25 mg/L de gentamicine (Gen) sont inoculés avec une colonie d'*A.tumefaciens* GV3101::pMP90 et placés à 28 °C sous agitation pendant 48 H. 1 mL de cette culture est utilisé pour ensemer 100 mL de milieu LB qui sont ensuite placés à 28 °C sous agitation pendant 5 H environ (Densité optique à 600 nm (DO_{600}) = 0,6), avant d'être placés sur glace pendant 10 min puis centrifugés à 3 000 g pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 400 μL de CaCl_2 20 mM préalablement refroidis. Des aliquotes de 100 μL /tube sont réalisés dans des Eppendorf 1,5 mL pré-refroidis avant d'être extemporanément placés à -80 °C.

4. Transformation d'*A.tumefaciens*

Environ 1 μg d'ADN plasmidique est ajouté à un aliquote d'*A.tumefaciens* thermo-compétentes sur glace et légèrement mélangé avant d'être plongé dans de l'azote liquide. Un choc thermique est ensuite induit en plaçant l'aliquote à 37 °C pendant 5 min. 1 mL de milieu LB est ensuite ajouté et la culture est incubée à 28 °C pendant 2 H. 200 μL de cette culture sont finalement étalés sur une boîte de Petri contenant un milieu LB gélosé à

50 mg/L de Rif, 25 mg/L de Gen et une concentration adaptée d'antibiotique de sélection correspondant au plasmide utilisé, avant d'être placé 48H à 28 °C.

5. Transformation de la *S.tuberosum* cv. Désirée

Une culture d'*A.tumefaciens* transformées par un plasmide portant le(s) gène(s) d'intérêts dans un milieu LB contenant 50 mg/L de Rif, 25 mg/L de Gen et 50 mg/L de spectinomycine (Spe) ou kanamycine (Kan) (selon le vecteur utilisé) à 28 °C, pendant 48 H et avec agitation est réalisée. Des explants de tiges et de pétioles sont prélevés sur des plantes cultivées *in vitro* âgées d'environ 3 semaines et placés sur des boîtes de Petri contenant un milieu MS incluant des vitamines, 2 % de saccharose et 8 g/L de Plant Agar supplémenté de 1 mg/L d'acide indole-3-acétique (AIA) (Sigma-Aldrich), 1 mg/L de zéatine-riboside (ZR) (Sigma-Aldrich) et 1 mg/L de gibbérelline A3 (GA3) (Sigma-Aldrich) pendant 24 H dans les conditions précédentes de culture. Les explants sont ensuite plongés dans la culture d'*A.tumefaciens* dont la DO₆₀₀ est préalablement ajustée à environ 0.2, avant d'être replacés sur la même boîte de Petri, aux mêmes emplacements pour une co-culture à 25 °C durant 48 H. A l'issue de la co-culture, les explants sont débarrassés des bactéries par des lavages successifs dans l'eau dés-ionisée stérile avant d'être mis en agitation dans du milieu MS liquide à 2 % de saccharose, 500 mg/L de céfotaxime (Cef) et 500 mg/L de ticarcilline/acide clavulanique (timentin) pendant 15 min. Les explants sont ensuite placés sur des boîtes de Petri contenant un milieu MS incluant des vitamines, 2 % de saccharose et 8 g/L de Plant Agar supplémenté de 1 mg/L d'AIA, 1 mg/L de ZR, 1 mg/L de GA3, 500 mg/L de Cef, 500 mg/L de timentin et 50 mg/L de Spe ou Kan (selon le vecteur utilisé) pendant 2 semaines afin d'induire l'apparition de masses de cellules indifférenciées nommées « cals ». Finalement, les explants sont repiqués sur le même milieu toutes les 2 semaines avec une diminution de 90 % de l'AIA jusqu'à apparition de tiges nouvellement formées. Ces tiges peuvent alors être isolées et sont potentiellement transformées génétiquement.

C. Analyses physiques et biochimiques de l'amidon

1. Extraction et purification de l'amidon de tubercules

Après récolte, les tubercules sont lavés à l'eau, découpés finement et broyés au pilon dans un mortier contenant au minimum 10 mL d'une solution d'éthanol à 20 %. Le broyat est filtré sur un filtre en nylon avec un maillage de 100 µm. Le filtrat est centrifugé et lavé

dans la solution d'éthanol à 20 % à trois reprises au minimum afin d'éliminer les éventuels débris cellulaires. L'amidon purifié est ensuite séché dans une étuve à 37 °C.

2. Séparation des composants de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique

1,5 mg d'amidon purifié sont dissous dans 200 µL de DMSO par chauffage à 99 °C avant d'être refroidis et précipités par ajout de 800 µL d'éthanol absolu. La suspension est centrifugée à 15 000 g pendant 10 min, le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 300 µL de NaOH à 10mM avant d'être déposé sur une colonne de 70 cm de hauteur et 5 mm de diamètre interne contenant de la sepharose® CL-2B en suspension dans du NaOH 10 mM. Un débit de 12 mL/H est appliqué à la colonne et des fractions de 300 µL sont collectées. Une lecture spectrophotométrique des différentes fractions est réalisée afin de déterminer pour chaque fraction, la longueur d'onde au maximum d'absorption (λ_{max}) et la valeur d'absorbance à cette longueur d'onde. Pour ce faire, 80 µL de chaque fraction sont mis en présence de 20 µL de solution d'iode (KI 1 %, I₂ 0,1 %) avant lecture. Cette mesure se base sur les propriétés d'absorption du complexe diiode-polysaccharide (Knutson, 2000).

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

L'activité des β -amylases entraîne une hydrolyse des chaînes de glucanes depuis leurs extrémités non-réductrices en libérant des résidus maltose et cela jusqu'aux points de branchement de l'amylopectine. Une quantité équivalente à 1 mg d'amylopectine purifiée sèche est reprise dans 500 µL d'une solution d'acétate de sodium à 55mM pH 3-5. 17 unités de β -amylase de patate douce (Sigma-Aldrich, France) y sont ajoutées avant incubation à 30 °C pendant 4H. 17 unités supplémentaires y sont ajoutées avant une incubation sur la nuit.

4. Hydrolyse des liaisons (1→6)- α -D-osidiques

Une quantité équivalant à 1 mg d'amidon ou d'amylopectine (avec ou sans digestion préalable par des β -amylases) en solution dans 500 µL d'acétate de sodium à 55mM pH 3-5 est portée à 100 °C pendant 10 min afin d'en dénaturer les protéines contenues. Après refroidissement, 16 unités d'isoamylase et 8 unités de pullulanase (Megazyme) sont ajoutées avant incubation à 42 °C pendant une nuit. L'hydrolysate est ensuite déssalé sur colonne carbograph par passage de 5 mL d'eau ultra-pure consécutivement au passage de l'échantillon et avant élution dans 2mL d'acétonitrile à 25 %. L'éluat est finalement lyophilisé.

5. Analyse de la distribution des louangeurs de chaînes par électrophorèse capillaire

L'équivalent d'1 mg de glucanes débranchés est incubé en présence de 2 µL de cyanoborohydrure de sodium (Sigma-Aldrich, France) et 2 µL de solution d'APTS (104,17 mg d'acide 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonique trisodique (Sigma-Aldrich, France) /mL d'acide acétique à 15 %) à 42 °C durant une nuit, ce qui permet le marquage des chaînes de glucose. Le produit de la réaction est ensuite repris dans 46 µL d'H₂O, avant d'être dilué au moins au 5^e dépendamment de l'échantillon et des longueurs de chaînes analysées. Le produit dilué est ensuite séparé par électrophorèse capillaire en utilisant un instrument Beckman Coulter PA 800+ équipé d'un détecteur de fluorescence, dans un capillaire de silice ayant un diamètre interne de 50 µm et un diamètre externe de 375 µm. Une injection de 10 sec à 5 psi précède la séparation des glucanes par un courant de 30 kV dans du gel de séparation pour carbohydrates (Sciex Separations, Les Ulis, France) dilué au tiers (Morell et al., 1998).

6. Dosage des résidus glucoses phosphorylé dans l'amidon

1 mg d'amidon purifié sec est mis en présence de 100 µL d'une solution de trifluoroacétate de sodium (TFA)(Sigma-Aldrich, France) à 2M et est homogénéisés avant incubation à 95 °C pendant 1H20, ce qui entraîne l'hydrolyse de toutes les liaisons glycosidiques. 20 µL de solution sont prélevés et dilués par ajout de 200µL d'H₂O avant d'être évaporés dans un concentrateur sous vide pendant une nuit afin d'éliminer le TFA. L'ajout de 200 µL d'eau est répété avant une deuxième évaporation de 5H. L'hydrolysate est ensuite marqué par réaction avec l'APTS avant que les produits de réaction soient séparés par électrophorèse capillaire comme décrit précédemment mais sans dilution préalable du gel de séparation pour carbohydrates (Verbeke et al., 2016).

7. Détermination de l'aspect et de la taille des grains d'amidons

300 µL d'une suspension d'amidon purifié sédimentée dont l'excès d'eau a été éliminé sont dilués dans un volume final de 2 mL d'eau. Après homogénéisation, 300 µL de cette suspension sont immédiatement injectés dans l'appareil Ipac 1 granulomorphometer (Occhio, Angleur, Belgium) qui va effectuer des mesures de taille et de forme des granules. Les paramètres mesurés sont « ISO area diameter » et « Ellipsoïd roundness ». Un filtre est ensuite appliqué aux données récoltées afin d'exclure les particules ayant un diamètre inférieur à 4 µm ou supérieur à 100 µm, ainsi que les particules de 4 à 18 µm

ayant une rondeur inférieure à 45 %. L'objectif étant d'analyser 3000 grains d'amidon par mesure (Helle et al., 2019).

D. Production de la protéine SS6 recombinante

1. Matériel bactérien

Le système hétérologue utilisé pour produire la protéine SS6 est *E.coli* BL21-AI™ (génotype: F⁻ ompT hsdSB(rB⁻, mB⁻) gal dcm araB::T7RNAP⁻ tetA). La souche a été choisie pour sa faible expression de la protéine en absence de facteurs d'induction. Ces facteurs sont l'Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) qui induit l'expression de la protéine par la T7RNA polymérase et le L-arabinose qui permet l'expression de la T7RNA polymérase.

2. Transformation de la souche *E.coli*

Un aliquote d'*E.coli* BL21-AI conservé à -80 °C est mis en contact avec environ 50 ng d'ADN du plasmide pET28-a(+)-SS6 et légèrement mélangé avant une incubation de 30 min sur glace. Un choc thermique est ensuite réalisé par transfert sur un bloc thermorégulé à 42 °C pendant 30 sec. 1 mL de milieu LB est immédiatement ajouté à la suspension bactérienne qui est placée à 37 °C pendant 1 H. Finalement, 200 µL de cette suspension sont étalés sur une boîte de Petri contenant du milieu LB gélosé contenant un antibiotique de sélection adapté au plasmide utilisé et placé à 37 °C pendant 24 H. Les colonies s'étant développées sont théoriquement transformées.

3. Analyse par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamid Gel Electrophoresis)

Cette analyse permet la séparation sur gel de polyacrylamide des protéines dénaturées en fonction de leur masse moléculaire. La première partie du gel (gel de concentration) est composée de 4 % de polyacrylamide tamponné par 125 mM de Tris-HCl, 0,5 % de SDS à pH 6,8. La seconde partie (gel de séparation) est composée de 8 % de polyacrylamide tamponné par 375 mM de Tris-HCl et contenant 0,1 de SDS à pH 8,8. La migration s'effectue dans un tampon composé de Tris à 25 mM, de glycine à 192 mM, de Dithiothréitol (DTT) à 0,15 g/L et de SDS à 0,1 %. Une tension constante de 150 V est appliquée pendant 1H30 afin d'induire la migration des protéines et donc leur séparation avant leur révélation par passage dans un bain de InstantBlue® Coomassie (Sigma-

Aldrich, France) pendant 30 min. Le marqueur de taille utilisé est Page Ruler Protein Ladder (Biorad).

4. Production de la protéine SS6

Une pré-culture d'*E.coli* BL21-AI transformée est réalisée par prélèvement d'une colonie sur boîte et ensemencement de 5 mL de milieu LB liquide contenant 50 mg/L de Kan et incubation durant une nuit à 37 °C avec agitation. 1 mL de cette culture est ensuite utilisé pour ensemencer 300 mL de milieu LB contenant 50 mg/L de Kan dans un Erlenmeyer de 1 L. La culture est ensuite placée en agitation à 37 °C et des mesures de DO₆₀₀ sont réalisées jusqu'à induction de l'expression de la protéine quand celle-ci atteint 0,6. 25 mL de la culture sont prélevés et serviront de témoins avant l'induction de l'expression. Celle-ci s'effectue par ajout de L-arabinose et d'IPTG afin d'obtenir des concentrations finales dans le milieu de 0,1 mM et 0,2 % respectivement. La température d'incubation est immédiatement réduite à 20 °C pour une incubation sur la nuit. La culture est placée sur glace pendant 15 min avant d'être centrifugée à 4 000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 7 mL de tampon de lyse (tampon phosphate, 30 mM imidazole). La lyse des cellules est réalisée en utilisant une Presse de French; les bactéries resuspendues sont mises sous pression dans l'appareil à 14 000 psi avant décompression et récupération du lysat (2 passages dans l'appareil sont réalisés). L'ensemble de ces étapes sont exécutées en maintenant le matériel à froid. Finalement le lysat est centrifugé à 4 000 g pendant 30 min à 4 °C et les fractions solubles (surnageant) et insolubles (culot) sont récupérées.

5. Purification de la protéine SS6

L'extrait protéique soluble contenant la protéine SS6 recombinante est placé dans une colonne en plastique de 10 mL en présence de micro-billes de chélate métallique de nickel-NTA (acide nitrilotriacétique) (Ni-NTA HisPur™, Thermo Scientific™) et placé en agitation pendant 1 H à 4 °C. À l'issue de l'agitation, la colonne est placée verticalement pour sédimentation et le surplus de liquide est éliminé. Celui-ci correspond à la fraction non-retenue. Un lavage de la résine est réalisé afin d'éliminer les protéines n'ayant pas d'étiquette poly-histidine en passant un volume de 100 mL de tampon phosphate à 60 mM d'imidazole. Un volume de 2,5 mL de tampon phosphate à 500 mM d'imidazole est passé sur la colonne afin d'éluer la protéine recombinante. L'éluât correspond à une fraction d'élution. Cette étape est répétée 4 fois. Après analyse sur gel SDS-PAGE, la fraction contenant la protéine recombinante pure est dialysée sur la nuit dans 5 L de tampon phosphate avant d'être aliquotée dans des tubes en présence de glycérol pour une

concentration finale de 5 %. Ces tubes sont ensuite plongés dans l'azote liquide et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour une utilisation ultérieure.

6. Analyse de l'activité de la protéine purifiée par zymmogramme

Cette analyse repose sur la séparation de protéines en conditions non-dénaturantes et permet de révéler l'activité enzymatique de celles-ci sur un substrat présent dans le gel. Le gel est similaire à celui décrit précédemment sans agent dénaturant. De plus, le gel de séparation contient un substrat potentiel de l'enzyme testée (ou non), ici 0,3 % de glycogène. La migration s'effectue par application d'une tension constante de 70 V pendant 2 H 30 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un tampon de migration identique au précédent dépourvu de SDS. À l'issue de la migration, le gel est incubé dans un tampon favorable à l'activité des amidon-synthases (citrate de trisodium 50 mM, pH 6, Na_2HPO_4 50 mM, DTT 5 mM) (Wattebled et al., 2005) pendant une nuit à température ambiante sous agitation rotative comme décrit dans Wattebled et al. (2005). Finalement, l'activité est révélée par passage du gel dans un bain de lugol (I₂ 0,1 %, KI 1 %).

III. Résultats

A. Reséquençage du génome de la variété de pomme de terre utilisée au laboratoire

La génomique est basée sur deux aspects complémentaires, l'aspect structural qui correspond à la séquence ADN de l'organisme étudié et l'aspect fonctionnel qui correspond à l'expression de cette séquence, le premier aspect conditionnant très fortement le second. La connaissance du génome constitue un outil essentiel pour l'étude des gènes de la pomme de terre. Le séquençage et l'assemblage du génome d'une variété de pomme de terre par Xu et al. (2011) a donc représenté une avancée majeure. Cependant, la variété séquencée correspond à une lignée double monoploïde du groupe *Phureja*, différente du groupe *Tuberosum* comprenant les pommes de terre cultivées en Europe. Ces dernières sont très hétérozygotes et le plus souvent tétraploïdes. La séquence du génome de référence peut donc présenter des variations importantes par comparaison aux séquences de ces variétés.

Ces différences peuvent paraître négligeables quand on s'intéresse à la fonction d'un gène mais la connaissance précise de la séquence est indispensable à l'utilisation des techniques d'édition génomique qui reposent sur la mutagenèse de séquences cibles comme CRISPR/Cas9. En effet, cette technique permet d'induire des cassures double-brin au niveau d'une séquence cible par l'intermédiaire d'un ARN guide partiellement complémentaire de celle-ci, cette séquence étant le plus souvent située dans la séquence codante d'un gène. L'efficacité de la technique est cependant très dépendante de l'exactitude de la séquence ciblée et celle-ci sera très largement réduite si une variation de séquence, même d'un nucléotide, est présente dans la séquence cible.

Pour pallier au manque d'informations fournies par la séquence du génome de référence, nous avons entrepris de séquencer le génome de la variété Désirée, utilisée dans notre laboratoire (de nombreuses études publiées portent également sur cette variété, car son efficacité de transformation est très bonne). Le séquençage a été réalisé avec une profondeur suffisante pour en déterminer la variabilité génétique, en particulier les SNPs (polymorphisme d'un seul nucléotide) qui pourraient interférer avec le bon fonctionnement du système CRISPR/Cas9, et créer ainsi un outil permettant la mutagenèse de n'importe quel gène.

1. Génération des données de séquençage et détection des variations

L'objectif des travaux présentés dans cette section était d'identifier de manière quasi exhaustive le polymorphisme présent chez la variété Désirée quand on la compare avec le génome de référence (variabilité extrinsèque) ou en comparant entre eux les quatre haplotypes du génome de Désirée (variabilité intrinsèque). Pour atteindre cet objectif, l'ADN génomique de la variété Désirée d'une taille d'environ 840 Mpb a été séquencé avec une profondeur de 30 X. Cette profondeur permet d'obtenir suffisamment de fragments provenant des quatre haplotypes pour identifier toutes les variations de séquence. Environ 100 millions de fragments d'ADN ont été produits par NGS (Next-Generation Sequencing) en utilisant la technologie Illumina® à partir d'ADN génomique extrait de feuilles de vitoplants. Ces fragments ont ensuite été positionnés sur le génome de référence. Pour ce faire, les données de mauvaise qualité ont été rognées aux extrémités des fragments positionnés avec une limite de probabilité d'erreur de 0,05. Les fragments positionnés ont ensuite été cartographiés sur le génome de référence en utilisant bowtie2 mapper²¹ avec comme réglage de sensibilité : élevée. Une analyse bio-informatique en « variant calling » a ensuite permis de déterminer les variabilités intrinsèque et extrinsèque à l'aide de l'outil de recherche de variantes Geneious avec les paramètres suivants : les positions des variations doivent être couvertes par au moins 8 lectures avec une fréquence supérieure à 0,05. La p-value de la variabilité et les limites de la p-value du biais de brin ont été fixées à 10^{-5} .

Parmi les 99 713 534 fragments de 2×150 pb séquencés, environ 84 % des fragments étaient correctement positionnés, correspondant à une couverture moyenne d'environ 30X. Cette profondeur de séquençage est similaire à celles publiées par ailleurs et permet une identification fiable des polymorphismes chez la pomme de terre (Uitdewilligen et al., 2013).

2. Le génome du cv. Désirée comparé au génome de référence

a. Principaux chiffres

L'analyse en « variant calling » a identifié 11 939 720 SNP, 707 507 insertions et 470 182 délétions en comparant les haplotypes du génome de Désirée entre eux et au génome de référence (variabilité intrinsèque + variabilité extrinsèque). L'occurrence et la distribution de ces variations ainsi que les différents types de substitutions nucléotidiques sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Variations génétiques dans le génome de *S.tuberosum* cv. Désirée identifiées par comparaison avec le génome de Phureja (DM). Les variants correspondent à la somme des divergences entre cv. Désirée et Phureja et des divergences interchromosomiques de Désirée.

					Occurrence (nb/bp)		
	Chromosome length (Mbp)	Deletions	Insertions	SNPs	Deletion	Insertion	SNP
Ch00	48,012,048	13,194	19449	426908	3639	2469	112
Ch01	88,663,952	57,427	88,370	1,541,312	1544	1003	58
Ch02	48,614,681	34,589	52,865	756,027	1405	920	64
Ch03	62,290,286	37,547	59,237	811,542	1659	1052	77
Ch04	72,208,621	44,063	61,917	1,089,325	1639	1166	66
Ch05	52,070,158	34,988	50,794	920,998	1488	1025	57
Ch06	59,532,096	42,176	65,729	1,008,413	1412	906	59
Ch07	56,760,843	35,827	53,346	880,487	1584	1064	64
Ch08	56,938,457	36,378	55,110	961,271	1565	1033	59
Ch09	61,540,751	37,856	55,536	1,020,000	1626	1108	60
Ch10	59,756,223	28,785	40,510	649,220	2076	1475	92
Ch11	45,475,667	31,574	49,776	822,217	1440	914	55
Ch12	61,165,649	35,778	54,868	1,052,000	1710	1115	58
Total	773,029,432	470,182	707,507	11,939,720	1753	1173	68
	Transition		Transversion				
	A/G	C/T	A/C	T/A	C/G	G/T	
Ch00	124,265 (29.9%)	125,239 (30.1%)	44,168 (10.6%)	54,178 (13.0%)	24484 (5.9%)	43681 (10.5%)	
Ch01	458,504 (30.6%)	459,233 (30.7%)	145,797 (9.7%)	207,069 (13.8%)	80,531 (5.4%)	145,258 (9.7%)	
Ch02	223,952 (30.6%)	223,808 (30.6%)	68,087 (9.3%)	108,617 (14.9%)	38,255 (5.2%)	68,489 (9.4%)	
Ch03	241,589 (30.8%)	240,680 (30.7%)	72,951 (9.3%)	116,763 (14.9%)	40,263 (5.1%)	72,989 (9.3%)	
Ch04	325,072 (30.8%)	323,821 (30.7%)	103,310 (9.8%)	141,941 (13.4%)	57,996 (5.5%)	103,636 (9.8%)	
Ch05	277,313 (31.1%)	275,880 (31.0%)	85,192 (9.6%)	119,421 (13.4%)	46,925 (5.3%)	85,859 (9.6%)	
Ch06	303,836 (31.0%)	302,651 (30.8%)	92,649 (9.4%)	138,366 (14.1%)	51,404 (5.2%)	92,783 (9.5%)	
Ch07	262,797 (30.7%)	263,627 (30.8%)	83,058 (9.7%)	118,261 (13.8%)	45,261 (5.3%)	82,357 (9.6%)	
Ch08	288,083 (30.9%)	289,812 (31.1%)	89,489 (9.6%)	127,602 (13.7%)	48,198 (5.2%)	89,661 (9.6%)	
Ch09	304,203 (30.7%)	303,888 (30.6%)	98,053 (9.9%)	133,370 (13.4%)	53,481 (5.4%)	98,773 (10.0%)	
Ch10	195,481 (31.1%)	194,222 (30.9%)	59,943 (9.5%)	85,473 (13.6%)	33,620 (5.3%)	59,798 (9.5%)	
Ch11	248,611 (31.2%)	247,285 (31.0%)	74,917 (9.4%)	111,633 (14.0%)	40,400 (5.1%)	75,111 (9.4%)	
Ch12	315,281 (30.8%)	315,028 (30.8%)	100,479 (9.8%)	135,438 (13.3%)	55,857 (5.5%)	100,083 (9.8%)	
Total	3,568,987 (30.8%)	3,565,174 (30.8%)	1,118,093 (9.7%)	1,598,132 (13.8%)	616,675 (5.3%)	1,118,478 (9.7%)	

Ces données montrent que les variations de séquence se produisent tous les 59 pb en moyenne, les SNPs étant le type de variation prédominant (Tableau 1).

Au niveau du génome entier, une occurrence moyenne d'un SNP toutes les 68 pb peut être observée tandis que les indels (Insertion/délétions) sont moins fréquents, avec une insertion pour 1173 pb et une délétion pour 1753 pb (Tableau 1). En outre, l'occurrence de

SNPs est plus fréquente sur le chromosome 11 comparé aux autres chromosomes avec un SNP pour 55 pb, alors qu'un seul SNP pour 92 pb peut être observé sur le chromosome 10 (Tableau 1).

(Remarque : Le chromosome 0 correspond à un contig artificiel de la séquence de référence constitué des séquences n'ayant pas pu être associées à un chromosome en particulier.)

Concernant le type de SNPs observés, le rapport moyen de transition (A/G ou T/C) sur transversion (A/C, T/A, C/G ou G/T) est de 1,603 à l'échelle du génome.

Les deux types de transitions (30,8 % du total des SNPs) apparaissent à une fréquence similaire, avec 3 568 987 transitions A/G et 3 565 174 C/T à l'échelle du génome.

À l'inverse, l'occurrence des différents types de transversion varie selon la nature de la substitution. T/A est la modification la plus fréquente avec 1 598 132 événements à l'échelle du génome (13,8 % des SNPs totaux), tandis que les transversions G/C apparaissent 616 675 fois (5,3 % des SNP totaux).

Les transversions A/C et G/T sont présentes à des fréquences intermédiaires et très similaires avec 1 118 093 et 1 118 478 événements à l'échelle du génome respectivement, soit 9,65 % du total des SNPs.

b. Répartition sur les chromosomes

Pour étudier la distribution locale des polymorphismes, nous avons construit une carte des 12 chromosomes de la pomme de terre sur la base du génome de référence (Figure 31).

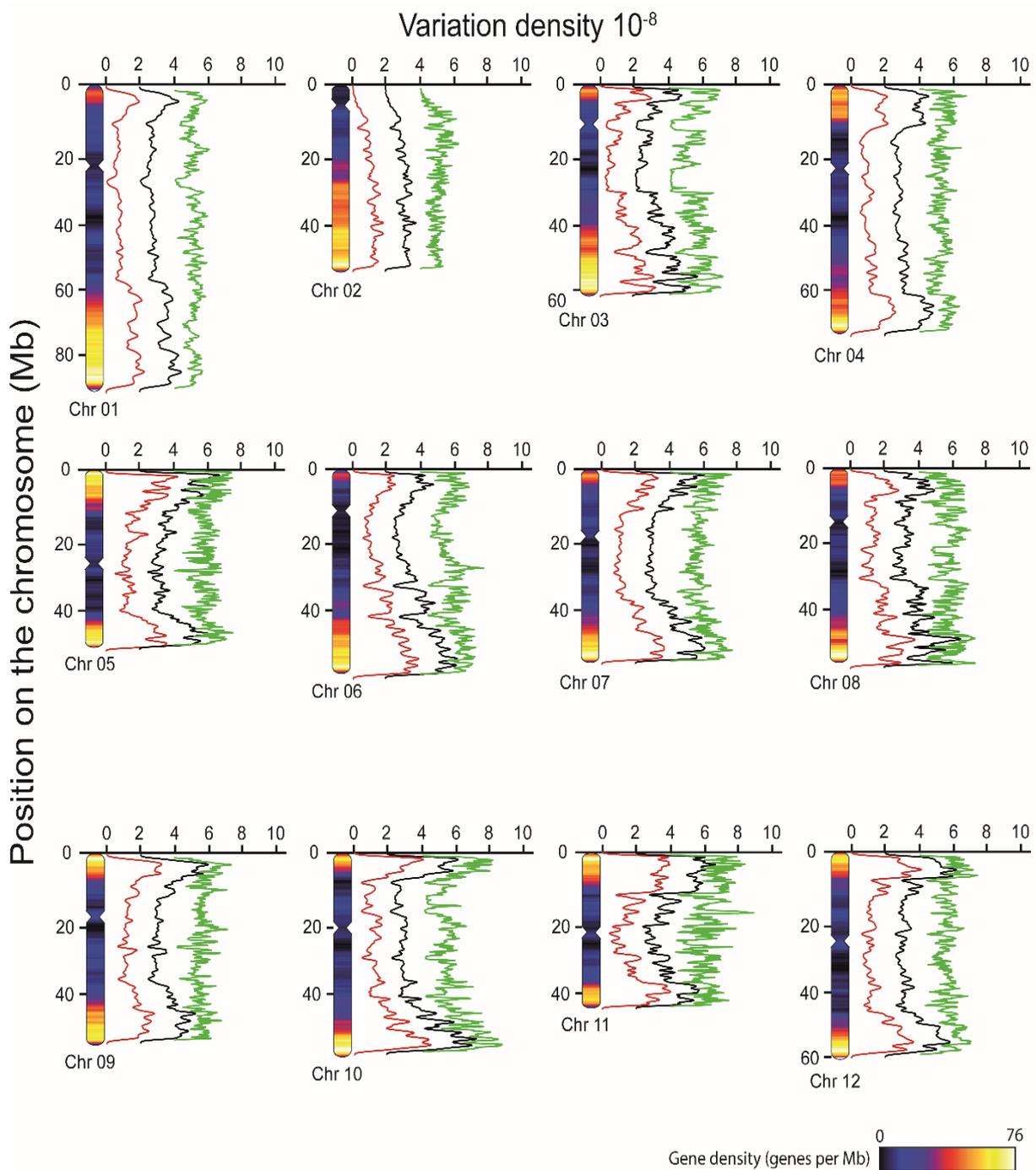


Figure 31: Répartition du polymorphisme sur les chromosomes de la pomme de terre cv. Désirée. Les idéogrammes des 12 chromosomes de la pomme de terre cv Désirée ont été schématisés à partir du génome de référence. Les cartes thermiques de la densité des gènes (gènes.Mb⁻¹) ont été construites à l'aide des packages R "lattice" (densityplot) et "Sushi" (plotbed) et sont affichées dans chaque chromosome. Les SNPs, insertions et délétions ont été identifiés par « variant calling » en utilisant l'alignement de séquence de la variété Désirée reséquencée et du génome de référence DM. La densité des polymorphismes a été estimée à l'aide des packages R «lattice» (densityplot) et «Sushi» (plotbed) et tracée à côté de chaque chromosome. L'axe des abscisses correspond aux densités des SNPs (ligne verte), insertions (ligne noire) et délétions (ligne rouge) exprimés en nombre de variations.bp⁻¹. Les densités d'insertions et de délétions ont été tracées avec des décalages de respectivement 2,10⁻⁸ et 4,10⁻⁸. L'axe y représente la longueur de chaque chromosome en Mb.

Les données de « variant calling » ont été traitées à l'aide des packages « lattice » et « Sushi » R pour illustrer le polymorphisme et les densités de gènes (Figure 31). Comme attendu, la densité génétique est plus élevée aux bords du chromosome par rapport aux régions centromériques (Figure 31). Bien qu'elles ne soient pas corrélées à l'échelle des chromosomes individuels, les densités de SNPs et indels présentent des distributions locales similaires (Figure 31). De plus, la densité de polymorphismes est très faible dans certaines régions telles que les parties centrales des chromosomes 7 et 12 ainsi que dans les régions allant de 10 à 60 Mb et 15 à 30 Mb des chromosomes 1 et 3 (Figure 31). En revanche, un enrichissement en SNPs peut être observé dans certaines régions, en particulier aux extrémités des chromosomes 7 et 10 (Figure 31). Enfin, la densité globale des variations semble corrélée à la densité des gènes, en particulier sur les chromosomes 1, 4 et 12.

c. Validation par comparaison à une puce SNPs dédiée à la sélection

Afin de valider les données produites, les SNPs identifiés dans notre étude ont été comparés aux SNPs de la puce « SolCAP Infinium High Confidence » disponibles sur le site web (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml).

La puce à SNPs correspondante a été produite par séquençage de l'ARN des cultivars Atlantic, Premier Russet et Snowden. Nos résultats corroborent 40 501 des 70 326 SNP présents dans la base de données SolCAP (Tableau 2).

Tableau 2: SNP confirmés par comparaison au SNP précédemment identifiés dans 3 cultivars différents (Atlantic, Premier Russet et Snowden)

	SolCAP SNPs	Confirmed SNPs	Percentage
Ch00	777	276	35.52
Ch01	8562	5279	61.66
Ch02	8217	3708	45.13
Ch03	7092	4294	60.55
Ch04	6168	3168	51.36
Ch05	5706	2868	50.26
Ch06	5178	3764	72.69
Ch07	5610	2988	53.26
Ch08	4829	2850	59.02
Ch09	4905	3118	63.57
Ch10	4001	2875	71.86
Ch11	4615	2806	60.8
Ch12	4666	2507	53.73
Total	70,326	40,501	57.59

À l'échelle de chaque chromosome, les pourcentages de SNPs récupérés varient de 45 à 72 % pour les chromosomes 2 et 6, respectivement.

3. Analyse des variations intrinsèques au cv. Désirée

Les variations intrinsèques au génome de Désirée ont été obtenues par analyse en « variant calling » avec les paramètres précédents en excluant la séquence de référence. Le Tableau 3 présente la répartition de ces variations (notées « Désirée vs. Désirée ») sur les différents chromosomes et la comparaison avec l'ensemble des variations (variations intrinsèques + variations extrinsèques, notées « Désirée vs. DM + Désirée vs Désirée »).

7 768 568 SNPs et 713 986 indels intrinsèques ont été identifiés à l'échelle du génome. Les proportions de polymorphismes retrouvés par rapport à l'analyse globale sont respectivement de 70 % et 67 % pour les SNPs et les indels confirmant ainsi la forte hétérozygotie intrinsèque de la variété (Tableau 3). À l'échelle chromosomique, les proportions de SNPs retrouvés varient de 51 % à 81 % sur les chromosomes 5 et 3, respectivement, tandis que les indels retrouvés vont de 57 % à 74 % sur ces mêmes chromosomes.

Tableau 3: Analyse des polymorphismes intrinsèques à *Solanum tuberosum* cv. Désirée. Les variations incluant à la fois les divergences avec le génome de référence (Désirée vs DM) et la variabilité intrinsèque au génome Désirée (Désirée vs Désirée) ont été comparées à la variabilité intrinsèque seule (Désirée vs Désirée). Les pourcentages de variations retrouvées dans Désirée vs. Désirée sont indiqués pour l'ensemble du génome et pour chaque chromosome.

	Desiree vs. DM + Desiree vs. Desiree		Desiree vs. Desiree		% of retrieved polymorphisms	
	SNPs	Indels	SNPs	Indels	SNPs	Indels
Ch00	403,649	30,646	241,562	13,993	60	46
Ch01	1,439,553	131,669	959,934	88,741	67	67
Ch02	702,731	78,552	461,731	54,650	66	70
Ch03	758,724	88,096	614,303	65,406	81	74
Ch04	1,024,125	96,289	672,615	60,591	66	63
Ch05	863,455	78,184	444,273	44,901	51	57
Ch06	941,865	95,635	665,626	66,587	71	70
Ch07	827,253	80,630	657,147	57,404	79	71
Ch08	884,154	82,726	598,200	54,822	68	66
Ch09	957,817	84,646	728,418	60,030	76	71
Ch10	612,064	63,440	398,627	39,301	65	62
Ch11	765,122	73,019	537,495	50,106	70	69
Ch12	986,050	82,875	788,637	57,454	80	69
Total	11,166,562	1,066,407	7,768,568	713,986	70	67

B. Analyse biochimique de l'amidon de pomme de terre de mutants *gbss*-

1. Origine du matériel et confirmation de l'absence d'amylose dans l'amidon

L'IGEPP de l'INRA de Ploudaniel (Bretagne) fut l'un des premiers laboratoires à mettre en œuvre CRISPR/Cas9 chez la pomme de terre. J'ai participé directement à l'obtention de ces lignées lors de mon stage de Master 2 dans cette unité. Au cours de ces travaux, l'outil CRISPR/Cas9 a été utilisé pour inactiver le gène de structure de GBSS. Ce dernier est un candidat idéal pour la mise au point de la méthode chez la pomme de terre. En effet, les plantes mutantes ont un défaut d'accumulation d'amylose. Ce phénotype est facilement détecté par coloration des plantes à l'iode. Les molécules de diiode interagissent avec les glucanes de l'amylopectine et de l'amylose. La coloration obtenue dépend de la taille et du degré de ramification des chaînes. L'amidon de pomme de terre sauvage se colore en bleu nuit et l'amidon *gbss*- se colore en rouge-orangé. De plus, le gène codant GBSS n'est présent que sur un seul locus chromosomique, ce qui simplifie le ciblage et la production de lignées K.O. Celles-ci ont été obtenues par transformation transitoire ou stable avec une construction génétique permettant l'expression du système CRISPR/Cas9 dirigé contre une séquence du deuxième exon du gène. La stratégie employée pour définir la séquence cible visait à induire un décalage du cadre de lecture très tôt dans la séquence codante ou à défaut de muter un site catalytique connu de l'enzyme (Veillet et al., 2019a).

J'ai pu poursuivre la caractérisation des amidons de ces plantes mutantes dans le cadre d'une collaboration entre l'IGEPP de l'INRA de Ploudaniel (Bretagne) et l'équipe PlaStoPol de l'UGSF de Lille dans laquelle j'ai réalisé mon doctorat. Le matériel végétal utilisé comprend une lignée sauvage de la variété Désirée et deux lignées mutantes respectivement nommées 17T.701.010 et 17T.716.146. La lignée 17T.701.010 présente une mutation partielle du gène codant la GBSS. Trois allèles parmi les quatre ont subi des délétions de respectivement 1, 7 et 31 pb. La lignée 17T.701.010 est une lignée KO avec des délétions de 142 bp et insertions de 116 et 211 bp touchant chacun des quatre allèles (Veillet et al., 2019a).

La Figure 32 présente les colorations à l'iode de tranches de tubercules et le fractionnement en chromatographie d'exclusion stérique des glucanes des amidons

sauvage et mutants. La coloration bleu-nuit observée pour le sauvage est typique d'un amidon avec une quantité normale d'amylose (Figure 32).

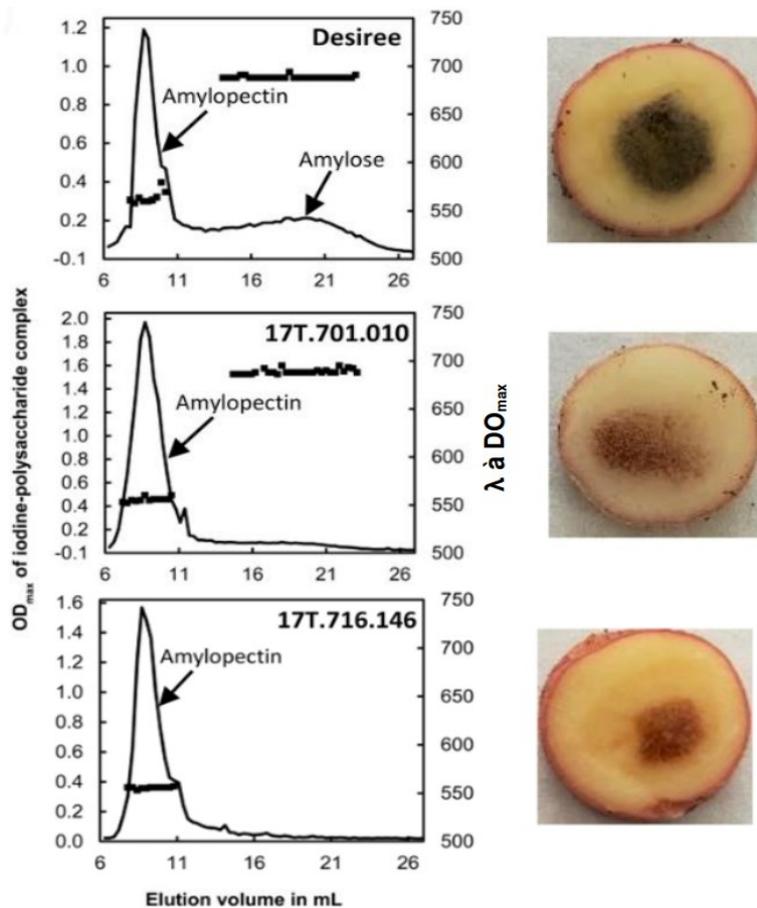


Figure 32: Estimation de la proportion d'amylose par chromatographie d'exclusion stérique (à gauche) et coloration à l'iode (à droite) de plantes sauvages ou mutées par CRISPR/Cas9. Les chromatographies d'exclusion stérique ont été réalisées avec 1,5 mg d'amidon purifié. L'absorbance maximale (axe principal) et la longueur d'onde au maximum d'absorption (axe secondaire) du complexe iode-polysaccharides sont représentées en ordonnée. Les coupes de tubercules colorés à l'iode et correspondant à chaque lignée sont présentées à droite de la figure. « Desiree » correspond à un tubercule issu d'une plante sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles de *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante K.O.. (adapté de Veillet *et al.* (2019a))

La séparation de l'amylose et de l'amylopectine a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne de sépharose CL-2B. Cette séparation permet de mettre en évidence deux pics d'absorption, le premier présente une longueur d'onde au maximum d'absorbance du complexe iode/polysaccharide d'environ 560 nm et correspond à l'amylopectine. Le deuxième pic correspond à l'amylose. Ce résultat confirme l'observation faite par coloration à l'iode de tranche de tubercule sauvage qui indiquait la présence de deux polysaccharides (Figure 32). Le tubercule de la lignée 17T.716.146 se colore en rouge-orangé. Ceci corrobore l'analyse chromatographique dans laquelle le pic

d'amylose disparaît et confirme l'absence totale d'amylose. L'amidon de la lignée 17T.701.010 présente un phénotype intermédiaire et la séparation des polymères de l'amidon par chromatographie d'exclusion stérique révèle la présence d'amylose bien qu'en quantité beaucoup plus faible que dans l'amidon sauvage (Figure 32).

La mutation K.O. de 17T.716.146 a donc permis d'abolir la synthèse d'amylose alors que la mutation de 3 des 4 allèles *GBSS* de 17T.701.010 a seulement induit une forte diminution du contenu en amylose.

Afin d'évaluer l'impact des mutations sur les protéines associées au grain d'amidon, les protéines ont été extraites de l'amidon purifié et analysées en gel de poly-acrylamide en conditions dénaturantes (Figure 33).

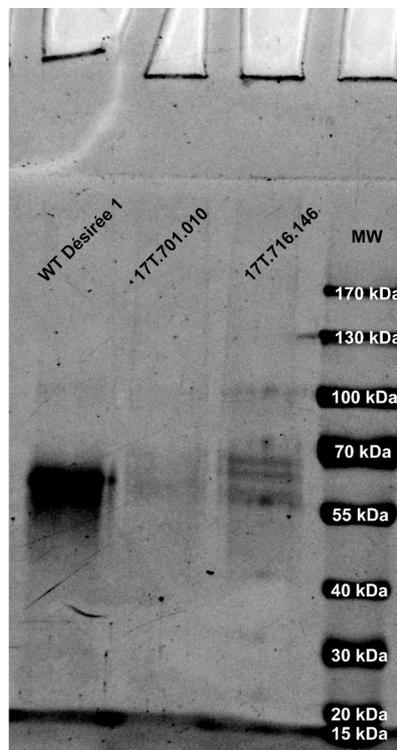


Figure 33: Analyse SDS-PAGE d'extraits protéiques d'amidon de tubercules de pommes de terres issus de plantes sauvages ou mutées. Les protéines ont été extraites d'une même quantité d'amidon (30 µg) et le volume déposé sur gel est identique pour les trois échantillons. « Désirée » correspond à un tubercule issu d'une plante sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles du gène *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée K.O..

Les extraits protéiques ont été réalisés à partir d'1,5 mg d'amidon et le volume déposé sur le gel est identique pour les trois échantillons étudiés. L'extrait protéique de l'amidon sauvage présente une bande de forte intensité d'une taille estimée d'environ 65 kDa. Cette bande correspond à GBSS qui est la protéine la plus fortement représentée dans le grain d'amidon et dont la taille théorique est de 67 kDa.

Cette bande n'est que peu ou pas discernable dans les deux autres lignées. On observe cependant l'apparition d'autres bandes (environ 100kDa, environ 70kDa) de tailles supérieures à celle de GBSS, en particulier dans la lignée 17T.716.146 (Figure 33). L'abondance de ces protéines est donc supérieure chez la plante mutée K.O. par rapport à la plante sauvage.

2. Contenus en protéines dans l'amidon

Les contenus en protéines dans les amidons ont été déterminés par dosage Bradford (Figure 34).

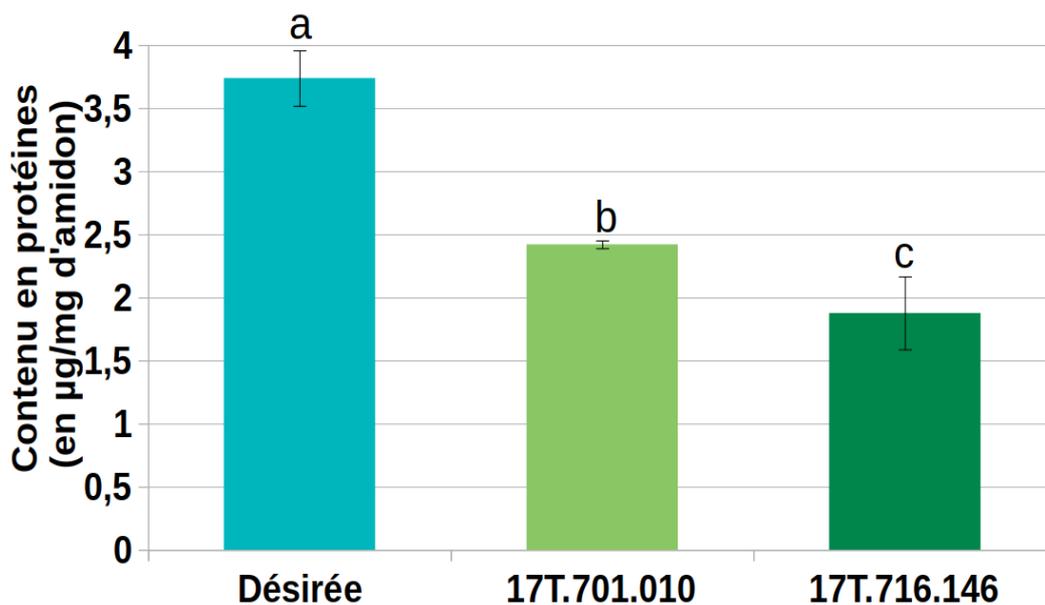


Figure 34: Contenus en protéines dans les amidons sauvages et mutants. Les mesures ont été réalisées par selon la technique de Bradford, en triplicata, les barres d'erreur représente l'écart-type des résultats obtenus. Des lettres différentes au dessus des barres d'erreur correspondent à des moyennes significativement différentes au risque 5 % (calculées par ANOVA). « Désirée » correspond à un tubercule issu d'une plante sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles du gène *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée K.O..

Les concentrations en protéines dans les lignées mutantes sont significativement inférieures à celle mesurée chez le sauvage. Ce résultat confirme l'observation faite par séparation des extraits protéiques sur SDS-PAGE quant à la présence d'une bande de très forte intensité chez la plante sauvage uniquement (Figure 33).

On remarque que la lignée 17T.701.010 contient significativement plus de protéines que la lignée 17T.716.146 (Figure 34).

De manière à étudier plus précisément les modifications du protéome de l'amidon, les extraits protéiques ont été digérés par la trypsine. Les peptides obtenus ont été analysés par protéomique « shotgun » en spectrométrie de masse. Cette analyse a été réalisée par le personnel de l'unité MSAP de l'université de Lille. La quantification sans marquage de chacune des protéines détectées est présentée dans la Figure 35.

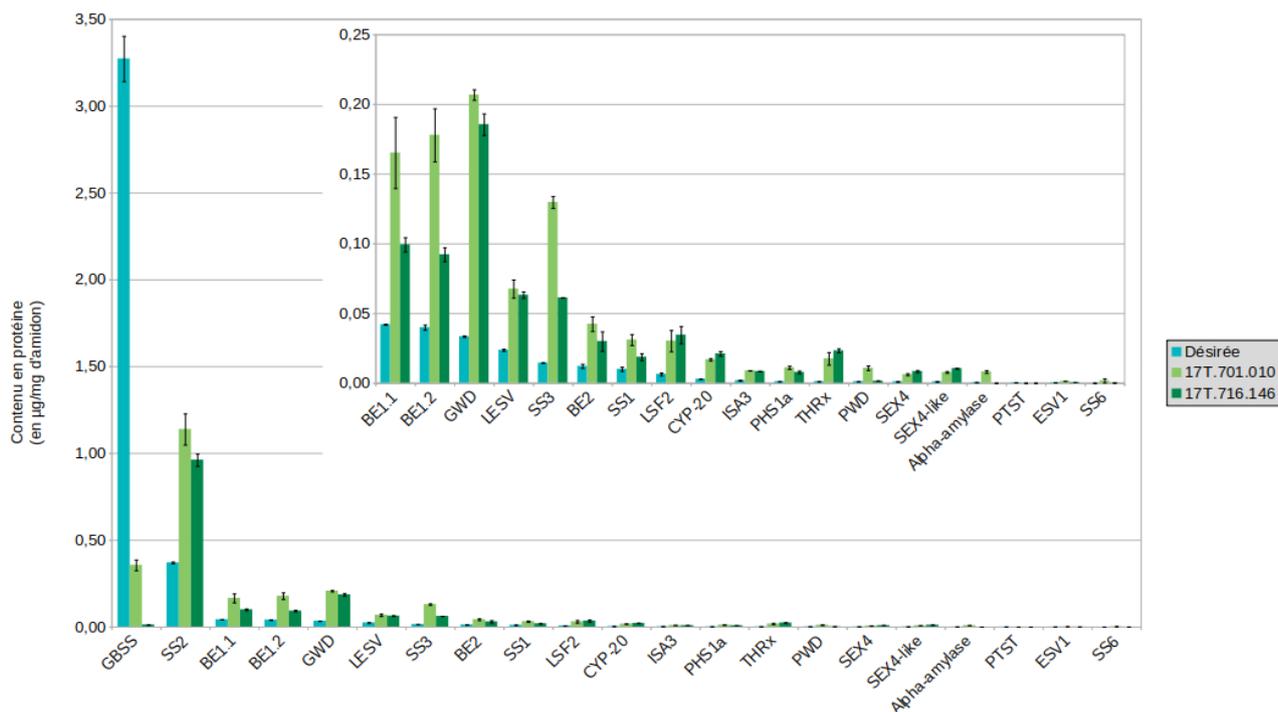


Figure 35: Concentrations des protéines dans l'amidon de plantes sauvages ou mutées. Les extraits protéiques ont été digérés par la trypsine grâce à la méthode eFASP (« enhanced filter aided sample préparation ») avant d'être analysés en nanoLC-nanoESI-MS/MS. L'abondance de chaque protéine a été déterminée à l'aide des programmes Maxquant et Perseus. Les concentrations ont été obtenues en normalisant les quantités de protéines calculées par l'algorithme Perseus avec les concentrations en protéines totales présentées dans la figure 31. Les mesures ont été réalisées en triplicata, les barres d'erreur représentent l'écart-type. « Désirée » correspond à la référence sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles du gène *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante K.O..

Cette analyse permet d'établir les proportions relatives des protéines et de calculer leurs concentrations dans l'amidon en normalisant à l'aide des dosages protéiques effectués précédemment.

Chez la plante sauvage, GBSS représente environ 87 % des protéines dans l'amidon soit 3,27 µg/mg d'amidon. Ceci confirme l'observation faite précédemment par séparation sur gel de poly-acrylamide (Figure 36). Les protéines les plus présentes sont ensuite SS2 qui constitue environ 10 % des protéines du grain soit 0,37 µg/mg d'amidon et les suivantes : BE1.1, BE1.2, GWD, LESV et SS3 avec des valeurs comprises entre 42 et 14 ng/mg d'amidon (Erreur : source de la référence non trouvée).

On observe une diminution de la concentration en GBSS dans la lignée 17T.701.010, celle-ci passant de 3,27 à moins de 0,36 µg/mg. Dans la lignée 17T.716.146, on observe une

concentration en GBSS quasi nulle. La détection de cette protéine dans l'amidon de cette plante étant très probablement due à une contamination de l'échantillon lors de l'analyse en spectrométrie de masse. En effet, les séquences protéiques détectées n'ont pas pu être synthétisées par la plante mutante au regard des mutations créées.

De manière attendue, les proportions de toutes les autres protéines présentes dans l'amidon sont augmentées chez les plantes mutantes, comme SS2 qui représente alors environ 50 % des protéines de l'amidon dans les lignées mutantes. Cependant, l'abondance de SS2 dans l'amidon est bien plus grande chez les plantes mutées que chez la plante sauvage, avec respectivement 1,14 et 0,96 µg/mg d'amidon chez 17T.701.010 et 17T.716.146 contre 0,37 µg/mg d'amidon chez la plante sauvage.

De la même manière, on observe une forte augmentation de l'abondance de la plupart des protéines étudiées. La concentration de certaines protéines est très fortement augmentée. En particulier, GWD est présente respectivement à hauteur de 6,19 et 5,55 µg/mg dans les lignées 17T.701.010 et 17T.716.146 contre 0,03 µg/mg dans l'amidon sauvage.

Ces augmentations concordent avec l'observation faite par séparation de l'extrait protéique sur gel, où l'on observe la présence de plusieurs bandes absentes pour la plante sauvage (Figure 36).

De manière intéressante, la concentration de PTST1, relativement faible dans l'amidon sauvage (0,37 ng/mg d'amidon), est nulle chez la plante mutante K. O., confirmant ainsi une interaction fonctionnelle de cette protéine avec la GBSS.

3. Analyse structurale de l'amylopectine

La structure de l'amylopectine des plantes étudiées a été analysée afin de détecter une éventuelle perturbation induite indirectement (augmentation des quantités des autres enzymes du métabolisme associées au grain d'amidon) par l'absence de la GBSS.

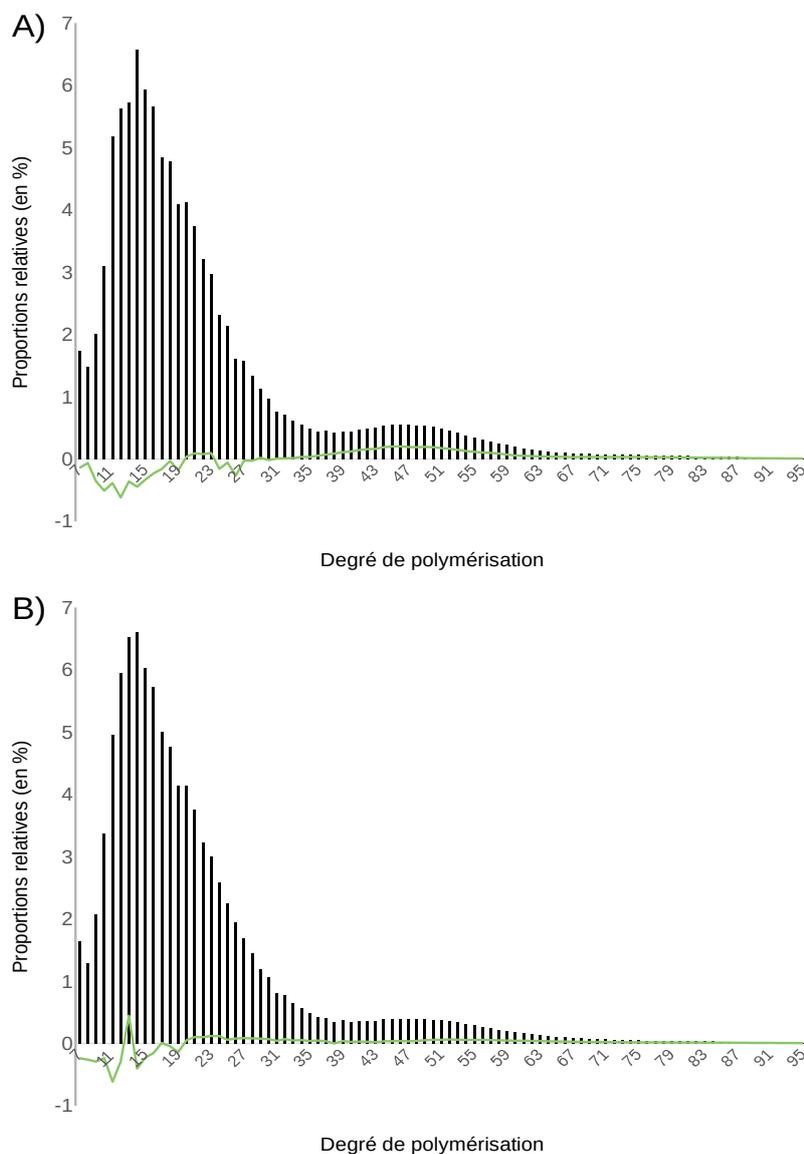


Figure 36: Distribution de longueur des chaînes d'amylopectine issue de tubercules de plantes mutantes A) 17T.701.010 et B) 17T.716.146. L'amylopectine analysée est issue des chromatographies d'exclusion stérique présentées précédemment. Environ 1 mg d'amylopectine a été débranché par incubation avec 20 unités d'isoamylases et 1 unités de pullulanases et les glucanes ont été séparés par électrophorèse capillaire après marquage à l'APTS. Les proportions relatives des glucanes de différents degrés de polymérisation sont représentées par les histogrammes. La différence de longueurs de chaînes par rapport à la distribution dans l'amidon sauvage est représentée par une ligne verte. Un seul réplicat a été réalisé.

La Figure 36 montre la distribution de longueurs de chaînes de l'amylopectine des deux lignées mutantes en comparaison avec l'amylopectine de plante sauvage. L'amylopectine a été débranchée par l'isoamylase et la pullulanase suite à sa purification par chromatographie d'exclusion stérique. Les glucanes obtenus ont été marqués par un fluorophore avant d'être séparés par électrophorèse capillaire et détectée par fluorescence.

Les modifications observées n'indiquent pas de bouleversement structural chez les mutants, les plus fortes variations de proportions relatives avoisinant 0,5 points. Les légères modifications observées portent sur les chaînes courtes dont le degré de polymérisation (DP) est compris entre 7 et 17 chez les deux mutants. On observe aussi une faible augmentation de l'abondance des chaînes dont le DP est compris entre 35 et 65 dans la lignée 17T.701.010.

4. Contenu en résidus phosphatés de l'amidon

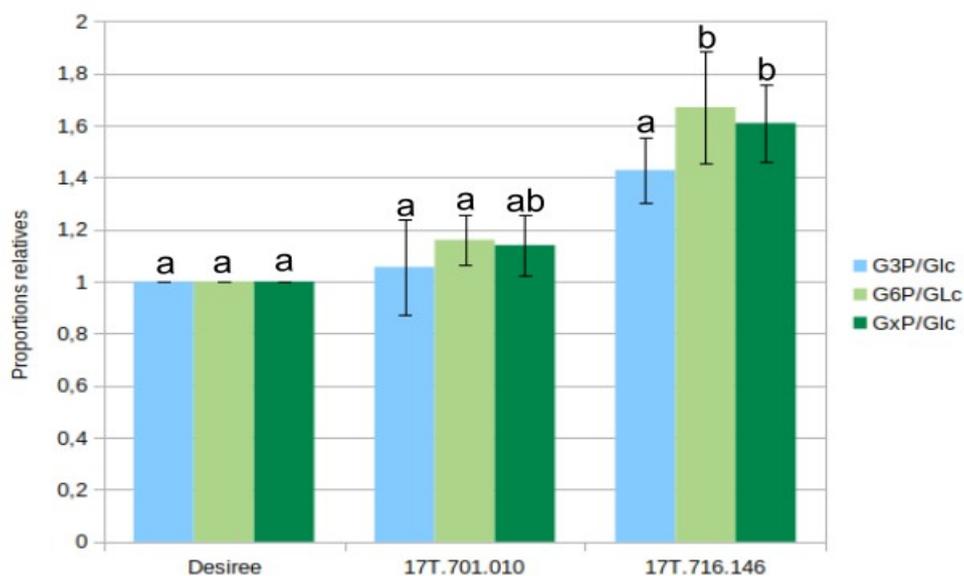


Figure 37: Contenu en phosphate de l'amidon de plantes sauvages et mutées mesuré par électrophorèse capillaire après hydrolyse acide. Le contenu en glucose-phosphate total (GxP/Glc), le contenu en glucose-3-phosphate (G3P/Glc) et le contenu en glucose-6-phosphate (G6P/Glc) sont représentés pour chacune des plantes en proportions relatives à la plantes sauvage. Les analyses ont été réalisées en triplicata. Les barres d'erreur correspondent aux écarts-types des moyennes obtenues. Les valeurs moyennes ne présentant pas de différences significatives portent la même lettre (risque 5 %, calculées par ANOVA). « Désirée » correspond à un tubercule issu d'une plante sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles du gène *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée K.O..

GWD est responsable de la phosphorylation des résidus de glucose en position C6 et est active lorsqu'elle est physiquement associée à l'amidon (Mikkelsen et al., 2004). L'augmentation de la concentration en GWD dans les amidons mutants pourrait donc induire une augmentation de la teneur en phosphate dans l'amidon, une caractéristique importante, à la fois du point de vue applicatif et sur le plan fondamental (impact sur la structure et la dégradation des grains d'amidon). Une analyse quantitative des résidus de glucose phosphorylés a été réalisée par électrophorèse capillaire après hydrolyse acide de l'amidon et marquage à l'APTS. Cette technique permet de quantifier de manière relative l'abondance de résidus G3P (glucose-3-phosphate) et G6P (glucose-6-phosphate) par rapport au glucose non phosphorylé (Verbeke et al., 2016). Ces proportions, présentées en

Figure 37, sont calculées pour les trois plantes étudiées par rapport aux valeurs de la plante sauvage.

On observe, chez 17T.716.146, une forte augmentation des résidus de glucose phosphorylés.

Les groupements phosphates sont, en moyenne, 1,6 fois plus nombreux dans l'amidon de cette lignée par rapport à la référence sauvage.

Cette augmentation s'explique principalement par l'augmentation de l'abondance de résidus G6P qui sont 1,67 fois plus abondants en moyenne que chez la plante sauvage.

Chez le mutant partiel, on observe une augmentation de l'abondance de résidus G6P mais l'augmentation relative de résidus glucose phosphorylés totaux observée dans l'amidon n'est pas statistiquement significative.

5. Morphologie des grains d'amidon

L'effet des mutations de *GBSS* sur la morphologie des grains d'amidon a été étudié à l'aide d'un granulomorphomètre. Cet appareil permet la prise d'image d'une suspension de grains d'amidon lors de son passage dans une cellule transparente. Les images sont ensuite traitées par un logiciel permettant la reconnaissance des grains et le filtrage d'éventuelles autres particules (débris cellulaires). Chaque passage permet l'analyse de plusieurs milliers de grains. L'analyse réalisée porte en particulier sur deux critères : la taille des grains (représentée par leur diamètre) et leur forme (représentée par leur rondeur).

La Figure 40 montre la distribution de la taille des grains d'amidon d'une population d'environ 3000 grains issus des plantes étudiées.

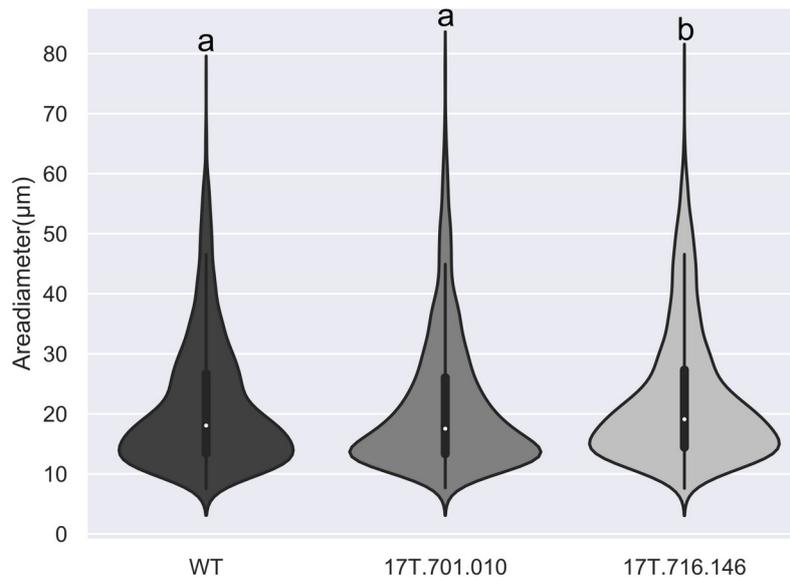


Figure 38: Distribution des diamètres d'une population de grains d'amidon issus de tubercules de plantes sauvages ou mutées pour le gène *GBSS*. Le diamètre des grains est exprimé en μm . Une population de d'environ 3000 grains à été analysée pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin. Les valeurs moyennes ne présentant pas de différences significatives portent la même lettre (risque 5 %, calculées par ANOVA). « Désirée » correspond à un tubercule issu d'une plante sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles du gène *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée K.O..

Le diamètre médian observé est d'environ $20 \mu\text{m}$ dans les tubercules des trois lignées étudiées. Parmi les grains de ces populations, 90 % ont une taille comprise entre 10 et $30 \mu\text{m}$.

Les populations de grains issus des tubercules de ces trois plantes semblent similaires dans leur distribution. Cependant, les grains issus de la lignée KO 17T.716.146 présentent une taille moyenne significativement supérieure à celle observée dans les autres lignées (ANOVA au risque 5 %) (Figure 38).

La Figure 39 représente la distribution de la rondeur des grains des populations précédentes. La rondeur est comprise entre 0 et 1, la valeur 1 représentant une sphère parfaite.

La rondeur médiane observée dans ces populations est d'environ 0,87 et 90 % des grains possèdent une rondeur comprise entre 0,8 et 0,95.

La répartition de la rondeur des grains dans les populations étudiées semble ici encore similaire chez les trois génotypes étudiés. Cependant, la plante 17T.701.010, qui présente une mutation partielle produit des grains d'amidons significativement plus ronds en moyenne que la plante sauvage. La lignée K. O. ne présente, quant à elle, pas de différences significatives avec les autres plantes.

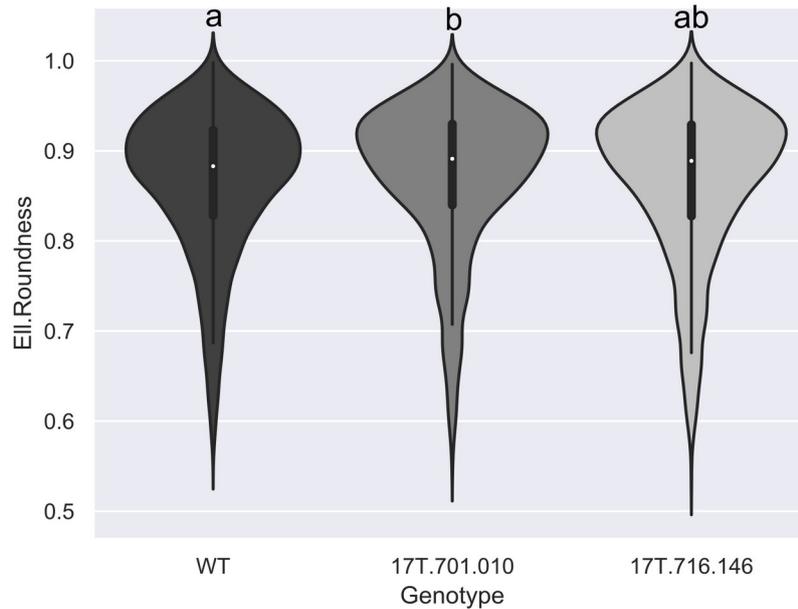


Figure 39: Distribution de la rondeur d'une population de grains d'amidon issus de tubercules de plantes sauvages ou mutées pour le gène *GBSS*. La rondeur des grains est comprise entre 0 et 1, la valeur 1 correspondant à un grain parfaitement rond. Une population d'environ 3000 grains a été analysée pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin. Les valeurs moyennes ne présentant pas de différences significatives portent la même lettre (risque 5 %, calculées par ANOVA). « Désirée » correspond à un tubercule issu d'une plante sauvage, « 17T.701.010 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée sur trois des quatre allèles du gène *GBSS* et « 17T.716.146 » correspond à un tubercule issu d'une plante mutée K.O..

C. Caractérisation d'une nouvelle amidon-synthase, SS6, chez la pomme de terre : Activité *in vitro* et impact de la modulation de l'expression du gène *in vivo*

Une analyse de protéomique sur amidon de tubercule de pomme de terre a été réalisée au laboratoire et a permis l'identification d'une protéine dont la séquence est similaire à celles des autres amidon-synthases de pomme de terre.

Cette protéine présente dans les grains d'amidon et n'ayant pas encore été caractérisée représente donc une nouvelle clé de compréhension potentielle du métabolisme de l'amidon.

1. Analyse génétique et phylogénétique

Le gène codant SS6 a pu être identifié en utilisant les séquences obtenues par protéomique. Ce gène est positionné sur le génome de référence de la pomme de terre sur le chromosome 7. Cependant, celui-ci souffre d'une mauvaise annotation et est incomplet, de même qu'un deuxième gène, lui aussi correspondant à une partie de la séquence codant la protéine.

La Figure 40 montre la séquence codante du gène SS6, reconstruit à partir de la séquence codante de SS6 du génome de la tomate et de la séquence protéique observée. Cette séquence codante s'étale sur environ 15 kpb et possède 15 exons (Figure 40).

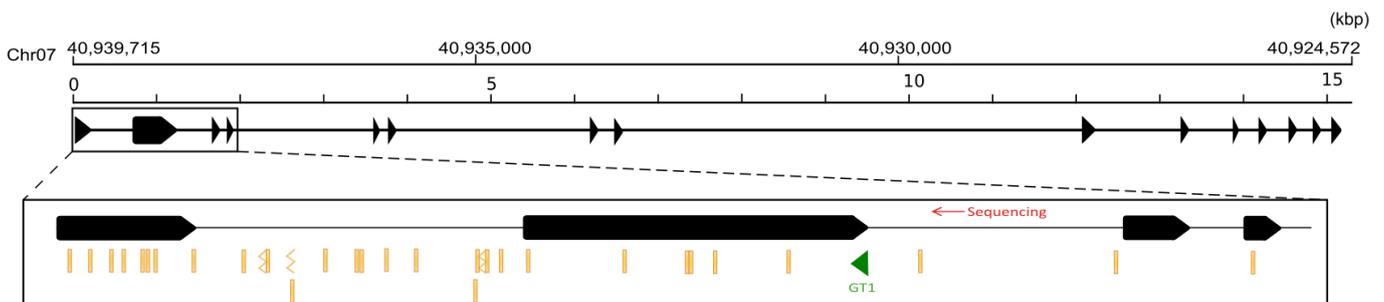


Figure 40: Structure du gène codant SS6 et variabilité de séquence associée. La séquence codante composée de 15 exons est représentée par les boîtes noires liées entre elles. Les traits oranges représentent le polymorphisme (intrinsèque Désirée et extrinsèque) présent dans la séquence (les traits brisés correspondent à des insertions). Ces variations dans la séquence ont été identifiées par l'analyse en « variant calling » présentée précédemment. Le triangle vert représente la cible génétique utilisée. La flèche rouge représente la séquence d'appariement de l'amorce utilisée pour le séquençage. La position sur le chromosome et la taille du gène sont affichés au dessus de celui-ci.

La protéine correspondante est constituée de 621 acides aminés pour une masse théorique d'environ 69 kDa.

La protéine contient les deux domaines glycosyltransférases présents chez la majorité des autres amidon-synthases caractérisées, qui comportent tous les deux un motif KTGGL-like, KVGGL pour le domaine GT5 et KTGGL pour le domaine GT1 (Figure 41).

L'utilisation de l'outil ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) révèle que la protéine possède aussi un peptide de transit prédit d'une longueur de 69 acides aminés en position N-terminale permettant théoriquement l'adressage de la protéine au chloroplaste. Enfin, la taille des régions N et C-terminales sont comparables à celles de StSS1 et on n'observe pas la présence de régions structurées en « coiled-oil » (Figure 41).



Figure 41: Structure de la protéine SS6. Les encadrés noir et rouges représentent respectivement les domaines glycosyltransférase 5 et 1. L'encadré bleu représente le peptide de transit. Les encadrés oranges représentent les domaines KTGGL-like , très conservés chez les amidon-synthases.

La distribution de la protéine chez les différentes espèces de plantes a été analysée par recherche de protéines présentant une homologie de séquence (BLASTP) avec StSS6 chez les grandes classes de plantes. Les protéines les plus semblables (parmi celles dont la séquence est disponible) à StSS6 chez les mousses, les fougères, les gymnospermes, les monocotylédones et les eudicotylédones, ont été sélectionnées et leur proximité phylogénétique a été analysée. Un cladogramme représentant la proximité des séquences sélectionnées a été réalisé en incluant les séquences des amidon-synthases de pomme de terre et de l'amidon-synthase 4 d'*A.thaliana* (Figure 42).

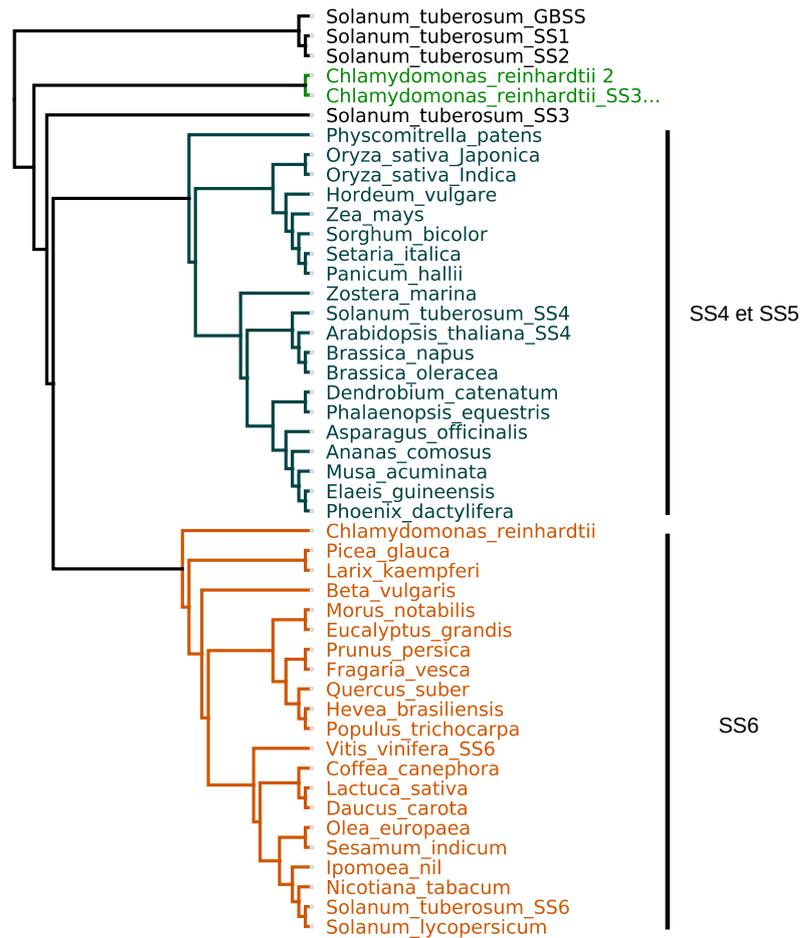


Figure 42: Cladogramme des protéines dont la séquence est la plus proche de SS6 de pomme de terre chez les grandes classes de plantes. Les séquences les plus semblables à StSS6 ont été obtenues par BLASTP en utilisant sa séquence protéique (listées en Annexes 4 et 5). Les séquences d'autres amidon-synthases de pomme de terre et d'*A.thaliana* ont été ajoutées. Le cladogramme a été construit à l'aide du logiciel Geneious en utilisant la méthode du « neighbor-joining ». Certains groupes ont été colorés pour faciliter la lecture de la figure.

On observe deux grands groupes de protéines. Le premier contient les séquences de StSS4 et de AtSS4 et le second contient la séquence de StSS6.

Les séquences du premier groupe ne semblent donc pas correspondre à des amidon-synthases 6 mais plutôt à des amidon-synthases 4 ou 5, contrairement à celles du deuxième groupe.

Étonnamment, on observe dans le deuxième groupe, l'absence de séquences provenant de certaines plantes alors que d'autres séquences provenant de ces mêmes plantes sont présentes dans le premier groupe.

C'est le cas de séquences provenant d'*A.thaliana*, d'autres brassicacées dont le chou, de la mousse *Physcomitrella patens* ou encore de monocotylédones comme le riz et la banane.

Ces plantes ne semblent donc pas posséder l'isoforme SS6. Or, on observe la présence de séquences proches de celle de SS6 de pomme de terre chez des gymnospermes comme *Picea glauca* ou encore de la micro-algues *Chlamydomonas reinhardtii*. La présence de SS6 dans la lignée des plantes est donc ancienne, mais celle-ci a disparu plusieurs fois dans l'histoire de leur évolution comme on peut le constater chez les monocotylédones et chez brassicacées.

2. Activité *in vitro* de la protéine recombinante

La protéine SS6 a été produite de manière recombinante chez *E.coli* afin d'en analyser l'activité *in vitro* et ainsi de comprendre sa fonction dans le métabolisme de l'amidon. Pour ce faire, la séquence transcrite du gène SS6, dépourvue de son peptide de transit (soit les 69 premiers acides aminés) et optimisée pour l'expression dans la bactérie, a été synthétisée et clonée dans un vecteur d'expression. Une séquence codant une étiquette poly-histidine a été ajoutée en position N-terminale de la séquence afin de permettre la purification de la protéine. La masse prédite de la protéine est d'environ 64 kDa. Son expression chez les bactéries utilisées dans les expérimentations présentées plus bas est verrouillée et nécessite l'ajout de molécules d'induction dans le milieu culture.

La Figure 43 présente l'analyse en SDS-PAGE des extraits protéiques d'une culture induite par l'IPTG et d'une culture non-induite.

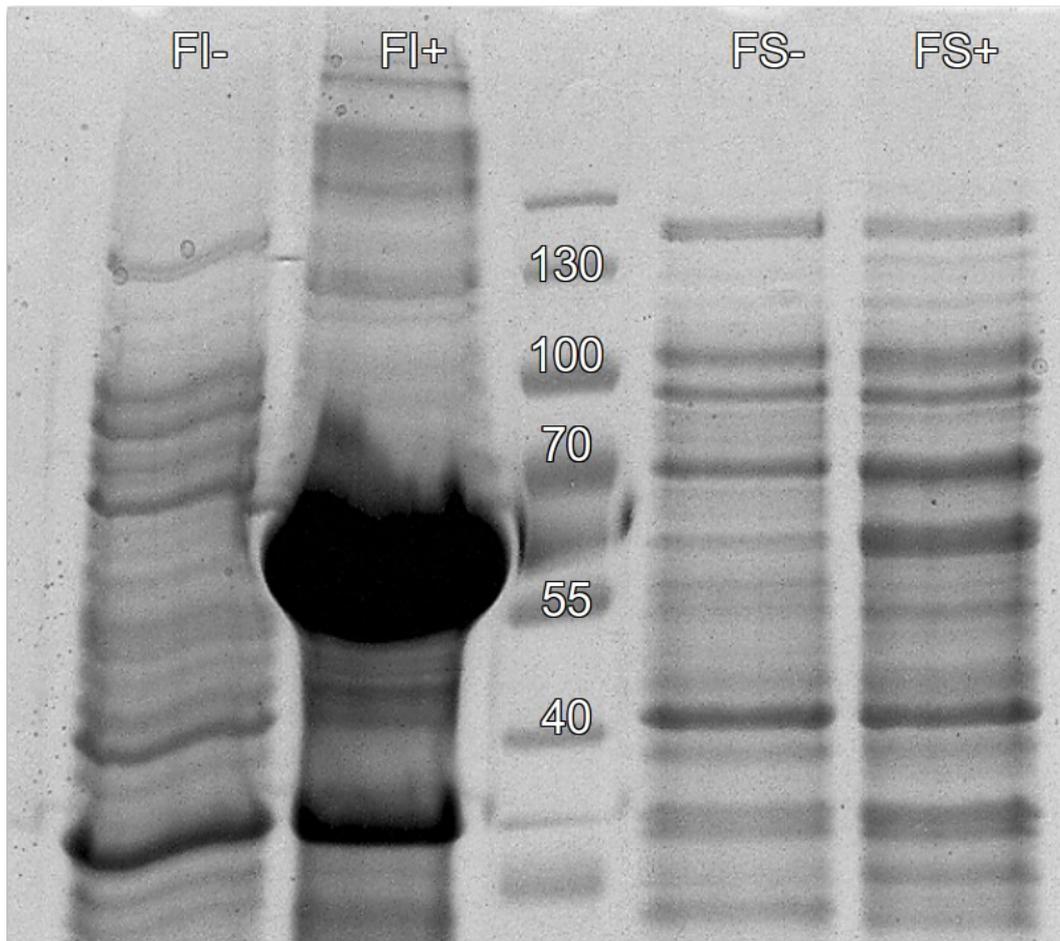


Figure 43: Migration des extraits protéiques obtenus par la culture d'*E.coli* transformée avec le vecteur pET28a(+)-SS6. Les cellules ont été lysées et les fractions solubles et insolubles ont été séparées par centrifugation. FI+) et FI-) Fraction insoluble respectivement avec et sans induction à l'IPTG. FS+) et FS-) Fraction soluble respectivement avec et sans induction à l'IPTG.

On observe la très forte accumulation d'une protéine dont la taille est proche de la taille prédite dans la fraction insoluble. Cette bande est absente de l'extrait protéique en absence d'induction de l'expression et correspond donc à la protéine SS6 recombinante. Une bande beaucoup moins intense est présente dans la fraction soluble de l'extrait protéique après induction et elle est également absente de l'extrait protéique sans induction. Une partie de la protéine recombinante accumulée dans la fraction insoluble semble donc présente dans la fraction soluble.

La protéine a ensuite été purifiée en utilisant l'affinité de l'étiquette poly-histidine pour le nickel. Pour ce faire, l'extrait protéique a été placé sur une colonne Ni-NTA qui a ensuite

été lavée par une solution contenant 50 mM d'imidazole. Enfin, SS6 a été éluée à l'aide d'une solution contenant 500 mM d'imidazole.

Les fractions récoltées au cours de cette purification ont été analysées en gel de polyacrylamide en condition dénaturante (Figure 44).

On observe la disparition dans la fraction non retenue par la colonne, d'une bande dont la masse est comprise entre 55 et 70 kDa présente dans l'extrait brute. Cette bande correspond à la protéine recombinante qui est fixée sur la colonne.

On observe ensuite l'éluion de cette protéine dans la deuxième fraction d'éluion. On note l'absence d'autre bande dans cette fraction, montrant ainsi la pureté de la protéine purifiée.

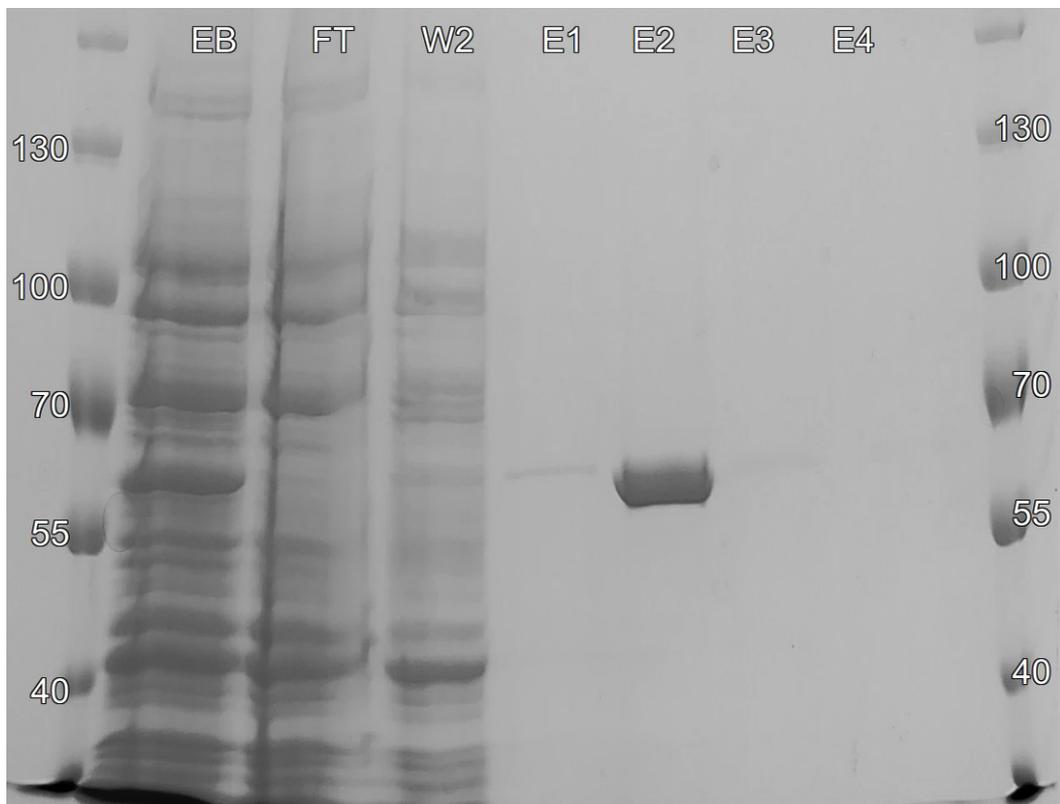


Figure 44: Séparation des fractions obtenues par purification sur colonne Ni-NTA de l'extrait protéique produit précédemment. EB) extrait protéique non purifié. FT) fraction de l'extrait protéique non retenu par la colonne, W2) fraction de lavage, E1-4) Fraction d'éluion.

Cette fraction a ensuite été dialysée avant d'être surgelée dans l'azote liquide en présence de 5 % de glycérol. L'activité de la protéine purifiée a ensuite été testée par zymogramme. Les protéines ont été séparées en conditions non-dénaturantes sur un gel de polyacrylamide contenant du glycogène. Le gel a ensuite été incubé à 25 °C pendant une

nuit en présence d'un tampon contenant de l'ADPGlc. L'activité des enzymes présentes dans les échantillons déposés a ensuite pu être mise en évidence par coloration du gel à l'iode. Le glycogène contenu dans le gel se colore en orange au contact des molécules de diiode. Les chaînes de glucose ayant été modifiées par une activité enzymatique (allongement ou raccourcissement des chaînes de glucose) sont identifiées par une modification de la coloration lors de l'interaction avec l'iode.

La Figure 45 montre le gel résultant de cette expérimentation. L'extrait protéique non purifié, la protéine purifiée et la protéine purifiée après 24 H de congélation ont été déposés sur un gel de polyacrylamide contenant du glycogène.

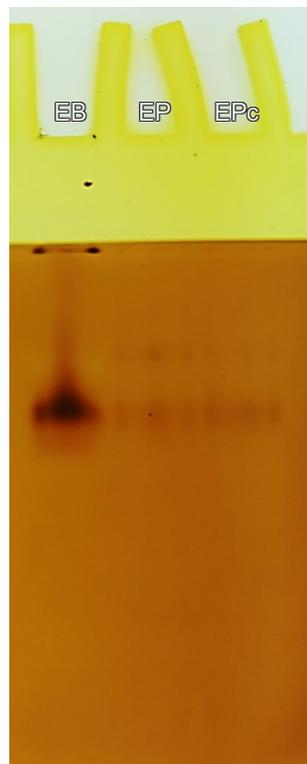


Figure 45: Zymogramme de l'activité synthase de SS6 recombinante sur glycogène. EB) extrait protéique non purifié EP) extrait protéique purifié EPc) Extrait protéique purifié ayant subi 24 H congélation.

Dans l'extrait protéique brut, on observe deux bandes très foncées. L'une de ces bandes (haute) est fortement retenue sur le gel indiquant une forte affinité pour le glycogène. Cette bande correspond très certainement à la glycogène synthase endogène de la souche

d'*E.coli* utilisée connue pour sa forte affinité pour le glycogène et sa faible migration dans le gel en condition native (Gehre et al., 2016).

L'autre bande est plus basse dans le gel et est très intense et de couleur rouge-orangé. Cette bande ainsi qu'une autre (plus haute, de couleur bleue), sont également observables dans l'extrait purifié et correspondent très probablement à l'activité de la protéine recombinante. On n'observe pas de modification notable de l'activité de l'enzyme après 24 H de congélation, validant que celle-ci résiste à au moins un cycle de congélation/décongélation.

Afin de caractériser plus finement l'activité de l'enzyme recombinante, celle-ci a été incubée en présence de glycogène et d'ADPGlc pendant 16 H. Deux concentrations d'enzyme, 1,25 mg/mL et 125 µg/mL, ont été utilisées pour ces incubations. Les structures du glycogène avant ou après l'action de l'enzyme ont été déterminées par FACE (Fluorescence assisted capillary electrophoresis) et comparées à celle du glycogène incubé en absence d'enzyme. Cette comparaison permet d'identifier les produits de réaction de l'enzyme.

La Figure 46 montre la différence d'abondance des longueurs de chaîne entre les produits incubés en présence de SS6 et le contrôle négatif. On observe une forte diminution de l'abondance des chaînes de DP2 à DP4 dans ces conditions. Cette diminution est la plus forte pour les chaînes de DP2 et est encore plus marquée pour la concentration en enzyme la plus élevée.

Parallèlement, on observe une augmentation marquée des chaînes de DP6 à DP20. Les chaînes de DP6 présentent la plus forte augmentation en abondance, ce constat étant encore une fois plus marqué pour la concentration en enzyme la plus élevée. Enfin, on observe que la diminution de l'abondance des chaînes courtes n'est pas inversement proportionnelle à leur longueur, ainsi cette diminution est moins importante pour le DP3 que pour le DP4.

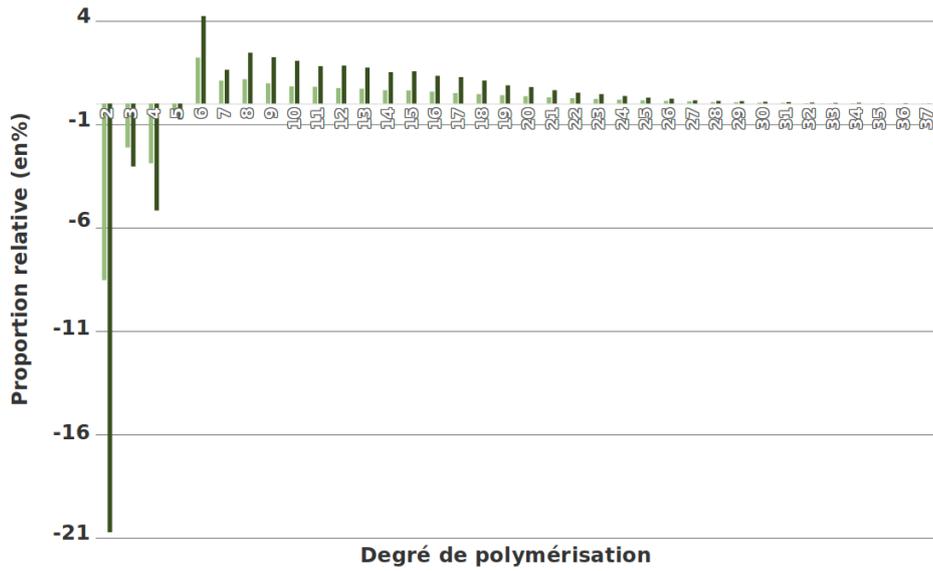


Figure 46: Modification de la structure fine du glycogène d’huître par l’activité de la SS6 recombinante. Vert-clair) Différence d’abondance des longueurs de chaînes entre du glycogène incubé avec SS6 recombinante concentrée à 125 µg/mL et glycogène incubé sans enzyme. Vert-foncé) idem avec une concentration en enzyme de 1,25mg/mL.

3. Production des plantes mutantes

La découverte d'une isoforme d'amidon-synthase jusqu'alors inconnue est particulièrement intéressante. De nombreux aspects du métabolisme de l'amidon restent irrésolus à ce jour. Ceux-ci comprennent par exemple l'initiation de la synthèse d'un nouveau grain dans laquelle les amidon-synthases SS4 et SS5 sont impliquées chez *Arabidopsis*. Par ailleurs, la modulation de l'expression des amidon synthases chez de nombreuses espèces conduit à des modifications de structure ou de morphologie des amidons mutants, ouvrant des pistes d'amélioration variétales. Afin d'étudier la fonction de SS6 *in planta*, j'ai produit une série de lignées mutantes, soit knock-out (par édition génomique à l'aide de CRISPR/Cas9), soit sur-exprimant SS6 (sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou fleur) sous sa forme native ou en fusion avec la GFP (« green fluorescent protein »). Nous avons pour cela utilisé la variété Désirée, qui se prête bien à la transformation par *A.tumefaciens*, et en utilisant l'outil d'aide au design des ARN guides que j'ai développé après avoir fait reséquencer cette variété.

a. Génération de lignées K. O. pour SS6

La première modification vise à éteindre le gène codant SS6, afin d'observer les effets de l'absence de la protéine sur le phénotype de la plante. Le système CRISPR/Cas9 a été utilisé dans des expérimentations de transformation stable d'explants par agroinfection. La cible que nous avons choisie se situe à l'extrémité 5'-OH du deuxième exon du gène SS6 (Figure 40). La séquence cible a été choisie parmi un grand nombre de cibles potentielles, car elle rassemble tous les paramètres essentiels au bon fonctionnement de l'endonucléase, notamment une bonne prédiction d'efficacité et de spécificité, ainsi qu'une forte probabilité d'induction de décalage du cadre de lecture. De plus, elle se situe au début de la séquence codante et à proximité du premier motif KTGGL-Like essentiel à l'activité de l'enzyme. L'absence de polymorphismes dans cette zone a été vérifiée à l'aide de notre carte des variations.

Le vecteur utilisé est une version modifiée de pDIRECT_22A qui possède un gène de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* sous contrôle du promoteur fort et constitutif 35S, un gène codant l'ARN guide ciblant la séquence GCATCCATTCAAGGCAAGCACGG sous le contrôle d'un promoteur U6 provenant d'*A.thaliana* ainsi qu'un gène de résistance constitutive à la Kanamycine permettant la sélection des plantes transformées (Annexe 1).

b. Génération de lignées surexprimant la protéine native

La seconde modification vise, contrairement à la première, à observer l'effet d'une surexpression du gène. Des transformations génétiques stables via *A.tumefaciens* ont là aussi été réalisées. Cependant, le vecteur utilisé vise cette fois à l'intégration d'un ADNc de SS6 dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif. Nous avons choisi le vecteur pK7FWG2 qui permet l'expression du gène sous le contrôle d'un promoteur 35S et contient un gène de résistance à la Kanamycine pour la sélection des transformants (Annexe 2). Ce plasmide permet également la fusion d'un gène codant la GFP en aval du gène d'intérêt. Pour des raisons pratiques, nous avons d'abord cloné la séquence de SS6 comprenant le codon STOP dans pK7FWG2 afin de surexprimer la protéine native, puis retiré ce codon STOP par mutagenèse dirigée pour exprimer une fusion SS6-GFP (voir le paragraphe suivant).

c. Génération de lignées exprimant une protéine SS6 de fusion avec une GFP

Enfin la dernière approche vise à l'expression d'une version modifiée de la protéine étudiée. La modification porte sur la fusion de celle-ci avec la GFP, permettant ainsi la localisation subcellulaire de la protéine. Le vecteur précédemment utilisé pour la surexpression a donc été modifié afin de supprimer le codon STOP à la fin de la séquence de SS6. Le vecteur obtenu a ensuite été utilisé pour des expérimentations de transformation génétique (Annexe 2).

d. Transformation génétique et génotypage

Les transformations ont été réalisées par agroinfection sur des explants internodaux de vitroplants préalablement cultivés et âgés de 4 semaines environ. Cette méthode repose sur la capacité naturelle d'*A.tumefaciens* à intégrer une portion de son génome dans des cellules végétales. La souche d'*A.tumefaciens* utilisée est GV3101:pMP90. Elle permet l'intégration dans le génome de la cellule végétale d'une séquence bordée par deux motifs « RB » (Right Border) et « LB » (Left Border) présente sur le vecteur avec lequel elle est transformée. La technique permettant la régénération des plantules transformées se base sur la capacité de la pomme de terre à produire des tissus méristématiques à partir de tissus somatiques, le type de tissu produit pouvant être contrôlé de manière exogène par l'apport d'hormones végétales en faisant varier la balance des concentrations en auxines et en cytokinines.

La première étape de l'expérimentation consiste à extraire des explants de tiges et de pétioles de plantules sauvages cultivées *in vitro*. Ces explants sont mis en contact et co-cultivés avec *A.tumefaciens* pendant deux jours avant d'en être débarrassés et placés sur un milieu de culture riche en auxines et cytokinines, induisant ainsi la formation de « cales », des amas de cellules désorganisées. Les milieux de culture nécessaires à cette étape et à toutes les suivantes contiennent de la kanamycine, inhibant ainsi la croissance des tissus non-transformés.

L'étape suivante consiste à modifier la balance hormonale en faveur des cytokinines. La forte réduction des auxines va induire la régénération de méristèmes apicaux et donc la formation de tiges. Cette étape s'étale sur plusieurs semaines et comprend plusieurs repiquages sur le même milieu de culture avant l'apparition de tiges pouvant être isolées.

Les plantules isolées ont été cultivées individuellement dans des tubes permettant le développement de leurs feuilles. Quand ces feuilles ont atteint une taille suffisante, elles ont été prélevées et leur ADN génomique a été extrait. Celui-ci a ensuite été utilisé pour la confirmation de la transformation mais aussi pour la caractérisation des mutations.

La confirmation de la transformation génétique a été réalisée par amplification d'une séquence présente sur le transgène et absente du génome de la pomme de terre.

Cette séquence correspond pour la construction CRISPR/Cas9 à une portion de la séquence codant la Cas9 et pour les constructions de surexpression et de fusion avec la GFP à une portion de la séquence codant la GFP (celle-ci est présente dans la construction de surexpression sans fusion même si elle n'est pas exprimée).

Un exemple d'amplification de la Cas9 pour 6 des transformants identifiés est présenté dans la Figure 47. Ce crible a permis d'amplifier la séquence de la Cas9 dans 29 plantes parmi 34 testées, confirmant ainsi leur transformation.

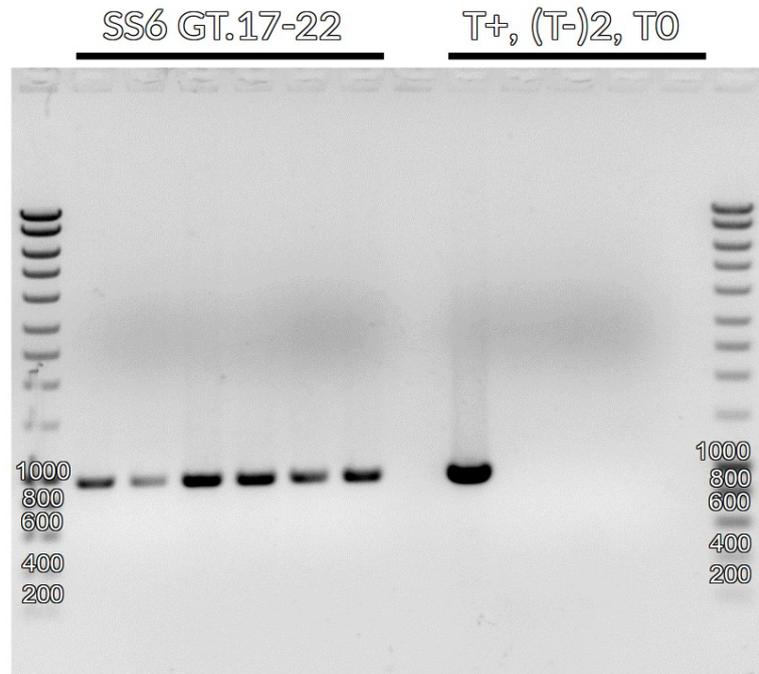


Figure 47: Amplification PCR d'une partie de la séquence codant la Cas9 chez plusieurs plantes issues de l'expérimentation de transformation génétique (SS6 GT-17-22). T+) ADN plasmidique du pDIRECT_22A, T-) ADN génomique d'une plante sauvage et T0) pas d'ADN. Les amorces utilisées sont Cas9-F et Cas9-R (séquences en Annexe 6)

De la même manière, les résultats concernant l'amplification de la séquence GFP sont affichés en Figure 48. Parmi les 10 plantes testées pour chacune des 2 constructions génétiques, 8 se sont avérées transformées pour la surexpression simple et 10 pour l'expression de la protéine de fusion SS6::GFP.

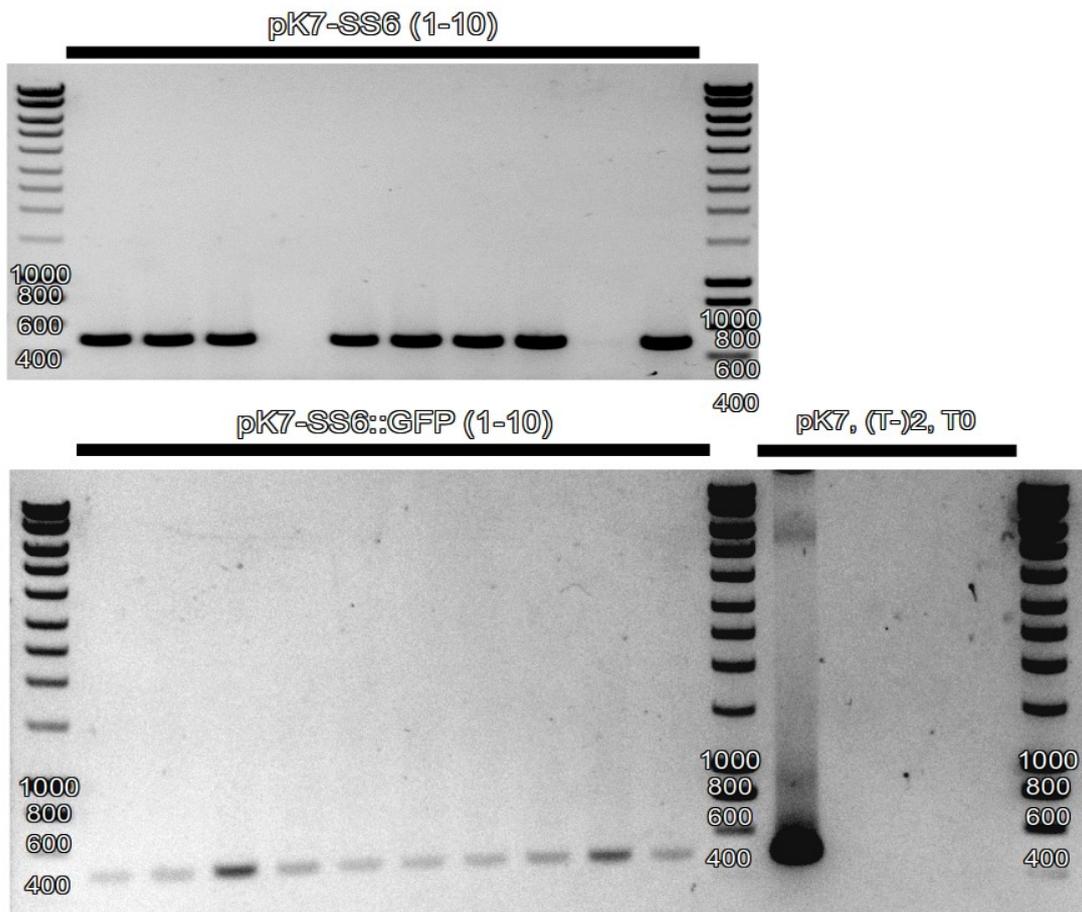


Figure 48: Amplification PCR d'une partie de la séquence codant la GFP chez des plantes issues des expérimentations de transformation génétique pour la surexpression de SS6 (pK7-SS6 (1-10)) ou pour l'expression de la protéine de fusion SS6::GFP (pK7-SS6::GFP(1-10)). pK7) ADN plasmidique du pK7FWG2 comportant la séquence à amplifier, T-) ADN génomique d'une plante sauvage et T0) pas d'ADN. La taille des bandes est indiquée sur le marqueur de taille. Les amorces utilisées sont GFP-F et GFP-R (séquences en Annexe 6)

e. Caractérisation des mutations induites par CRISPR/Cas9

Afin d'identifier les plantes mutées, un premier crible a été mis en œuvre par amplification et séquençage de la zone ciblée. Pour ce faire, une ADN polymérase de haute fidélité a été utilisée et un séquençage de type Sanger a été réalisé. Le résultat de l'amplification est présenté en Figure 49. La séparation des fragments amplifiés montre une taille homogène de ceux-ci pour toutes les plantes étudiées sauf pour la dernière où on observe un fragment supplémentaire plus court d'environ 200 pb pouvant ainsi indiquer une large délétion.

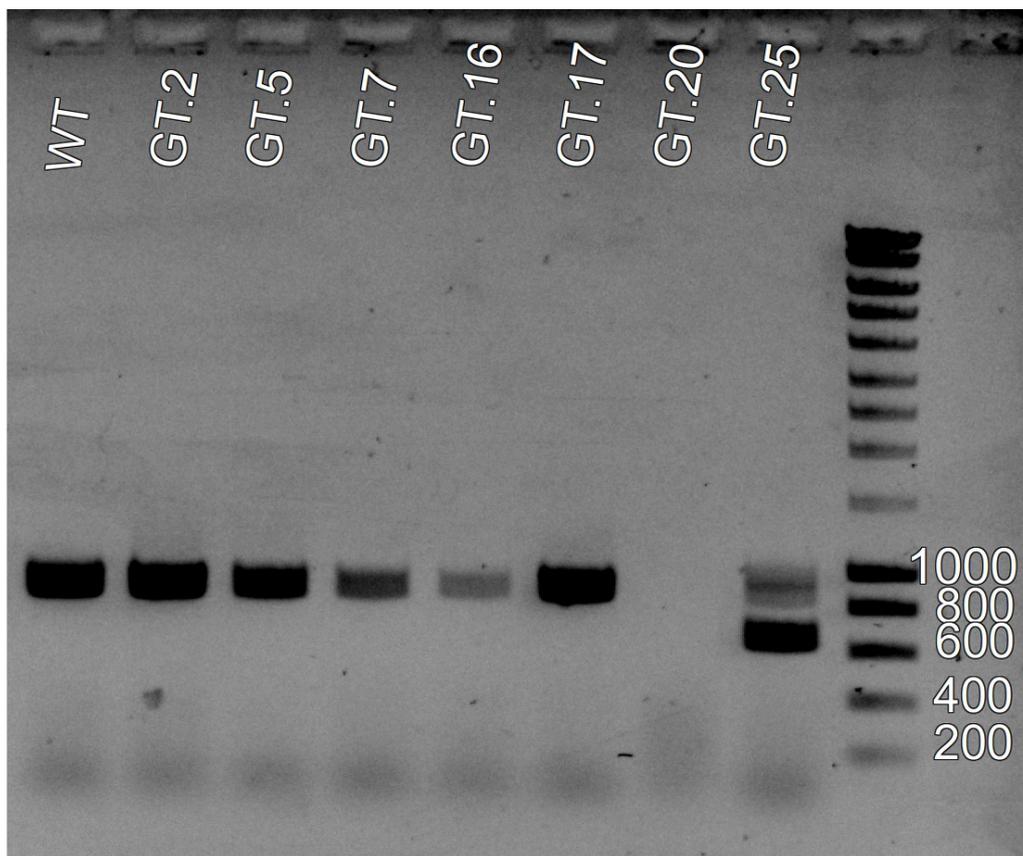


Figure 49: Amplification PCR réalisée à l'aide d'une polymérase de haute fidélité de la séquence ciblée chez plusieurs plantes transformées avec le vecteur pDIRECT_22A modifié. La taille attendue pour l'amplicon sauvage est 908 pb. Les amorces utilisées sont SS6-GT-F et SS6-GT-R (séquences en Annexe 6) Le marqueur de taille utilisé est le « BioMarker ® 10KB DNA ladder » (Eurogentec).

Les produits de PCR ont été directement séquencés afin d'observer les mutations potentielles. Cependant, les mutations peuvent être différentes sur chacun des 4 allèles du génome de la pomme de terre rendant impossible l'interprétation visuelle des électrophorogrammes de séquençage. Nous avons utilisé l'algorithme disponible à

l'adresse <https://ice.synthego.com/> qui permet de transcrire une superposition de signaux de séquençage différents en probabilités de mutation. L'algorithme fournit un ensemble de séquences probables expliquant le signal de séquençage obtenu. Le pourcentage d'Indels parmi ces séquences, la façon dont celles-ci expliquent le signal de séquençage (R^2) ainsi que la probabilité de créer un K.O. de gène (K.O. score) sont également calculés.

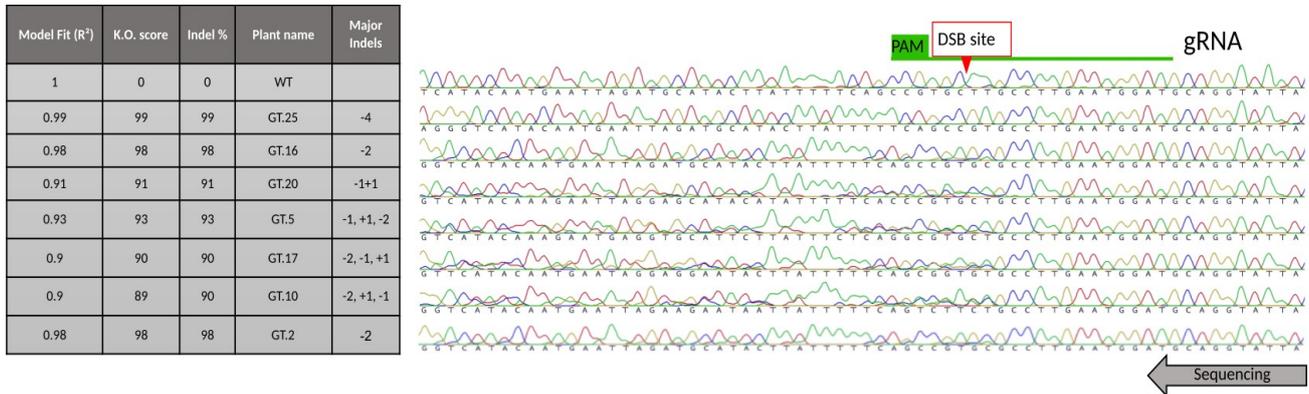


Figure 50: Données issues de l'analyse d'électrophorogrammes de séquençages Sanger par l'algorithme ICE. Le tableau présente les différents scores (voir texte) associées à l'analyse réalisée sur les les électroencéphalogrammes (présentés à droite). Les principales Indels prédites (ayant une probabilité supérieure à 0,1) sont également indiquées dans le tableau. La séquence cible de CRISPR/Cas9 (gRNA), le PAM (motif NGG associé à l'ARN guide) et le site de coupure de l'ADN (DSB) sont positionnés au dessus des signaux de séquençage.

Cette analyse nous a permis de sélectionner 7 lignées potentiellement mutées sur chacun des 4 allèles de SS6 et présentant une probabilité de mutation K.O. allant de 0,90 à 0,99 (Figure 50).

Ces lignées ont ensuite été caractérisées plus finement afin de valider les résultats obtenus à l'aide de ICE.

La séquence amplifiée dans chacune des lignées a été clonée dans le vecteur pCRTM 2.1-TOPO[®] par « TA cloning » et transformée dans *E.coli* afin d'obtenir des colonies ne comportant qu'un seul « allèle » de la séquence amplifiée. Afin de minimiser le risque d'omission d'un allèle, l'ADN plasmidique de 12 colonies bactériennes a ensuite été extrait et séquençé pour chacune des lignées.

Le séquençage a permis de valider l'absence de séquence sauvage dans les plantes testées mais aussi de prédire des décalages de cadre de lecture menant à une protéine exprimée tronquée. Le Tableau 4 rassemble l'ensemble des séquences observées chez ces différentes plantes en mettant en évidence les mutations au niveau de la séquence cible.

Plante	Nombre de séquences	mutation	Séquence résultante	Nombre de vue	KO
Sauvage			CCGTGCTTGCCTTGAATGGATGC		
GT.16	12	-2	CCGTGC--GCCTTGAATGGATGC	7	Oui
GT.16	12	-1	CCGTGCT-GCCTTGAATGGATGC	5	Oui
GT.17	11	-1	CCGTGC-TGCCTTGAATGGATGC	2	Oui
GT.17	11	+1	CCGTGCTTGCCTTGAATGGATGC	3	Oui
GT.17	11	-2	CCGTGC--GCCTTGAATGGATGC	6	Oui
GT.2	12	-1	CCGTGC-TGCCTTGAATGGATGC	6	Oui
GT.2	12	+1	CCGTGCTTGCCTTGAATGGATGC	4	Oui
GT.2	12	-2	CCGTGC--GCCTTGAATGGATGC	2	Oui
GT.5	12	-1	CCGTGC-TGCCTTGAATGGATGC	8	Oui
GT.5	12	+1	CCGTGCTTGCCTTGAATGGATGC	3	Oui
GT.5	12	-2	CCGTGC--GCCTTGAATGGATGC	1	Oui
GT.7	12	-1	CCGTGC-TGCCTTGAATGGATGC	6	Oui
GT.7	12	+1	CCGTGCTTGCCTTGAATGGATGC	1	Oui
GT.7	12	-2	CCGTGC--GCCTTGAATGGATGC	5	Oui
GT.20	10	-1	CCGTGC-TGCCTTGAATGGATGC	2	Oui
GT.20	10	+1	CCGTGCTTGCCTTGAATGGATGC	5	Oui
GT.20	10	-2	CCGTGC--GCCTTGAATGGATGC	3	Oui
GT.25	10	-4	CCGTG----CCTTGAATGGATGC	2	Oui
GT.25	10	-224, 23 substitutions	-----	8	Oui

Tableau 4: Inventaire des séquences différentes obtenues par séquençage de 10 à 12 colonies issues de clonage de la séquence ciblée chez différentes plantes mutantes. Pour chaque plante, le nombre de séquençages réussis de colonie, le type de mutation observée, la séquence résultant de cette mutation, le nombre de fois où cette mutation a été observée et si elle induit un K.O. du gène sont affichés. La séquence sauvage est également affichée.

Pour chaque plante, au moins 10 colonies ont été séquencées avec succès. Aucune des séquences obtenues ne correspond à un allèle sauvage.

Le séquençage a permis de valider l'absence de séquence sauvage dans les plantes testées mais aussi de prédire des décalages de cadre de lecture menant à une protéine exprimée tronquée. Le Tableau 4 rassemble l'ensemble des séquences observées chez ces différentes plantes en mettant en évidence les mutations au niveau de la séquence cible.

On observe des mutations très semblables chez toutes les plantes à l'exception de GT.25. Ces mutations sont des insertions d'un nucléotide ou des délétions d'un ou deux nucléotides à une base de distance du site théorique de DSB. Étonnamment, ces mutations très semblables sont pourtant issues d'événements de mutations indépendants. Les mutations concernant la plante GT.25 sont très différentes des autres mutations observées. En effet, chez cette plante, on observe d'une part, une délétion de 4 pb sur deux des huit colonies et une délétion de 224 bp accompagnée d'une substitution de 23 nucléotides consécutifs (Ces 23 nucléotides correspondent potentiellement à une insertion d'une séquence exogène qui n'a pas pu être identifiée) (Tableau 4).

f. Validation de la surexpression de SS6

La validation de la surexpression de SS6 a été réalisée par mesure de l'abondance de l'ARN messager de SS6 dans les feuilles par PCR quantitative.

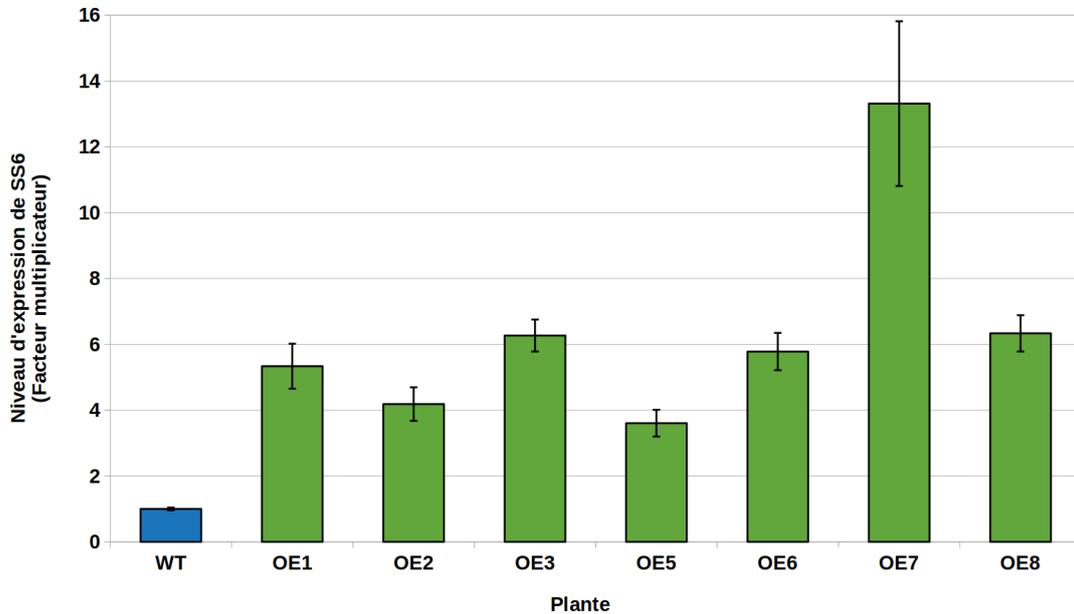


Figure 51: Niveaux d'expression de SS6 chez les plantes transformées avec le vecteur pK7FWG2-SS6. L'abondance de l'ADNc codant SS6 a été mesurée par PCR quantitative après transcription inverse des ARNm extraits de 50 mg de feuilles de plantules en comparaison avec le gène homéotique EF1 α (Elongation Factor 1 alpha). Les mesures ont été réalisées six fois et les résultats obtenus ont été moyennés. Les barres d'erreur correspondent aux erreurs standard de ces moyennes.

La Figure 51 montre le niveau d'expression de SS6 chez les plantes transformées relativement au niveau d'expression dans les plantes sauvages. On observe une forte augmentation de l'expression chez toutes les plantes testées. L'expression de SS6 chez ces plantes est 3,6 à 13 fois supérieure à celle des plantes sauvages. L'analyse statistique n'a montré de différence significative qu'entre la plante OE.5 et la plante OE.7 (ANOVA).

4. Localisation de SS6 *in situ*

Les plantes ayant incorporé un gène d'expression de la protéine de fusion SS6::GFP par transformation génétique ont été analysées afin de définir le ou les compartiments dans lesquels elle s'accumule. Pour ce faire, des tranches de tubercules issus de ces plantes ont été observées en microscopie confocale à balayage laser.

Les dix plantes dont la transformation génétique a été précédemment confirmée par PCR, ont été analysées et présentent des niveaux de fluorescence variables, trois de ces plantes n'émettant pas ou peu de fluorescence.

Cependant, toutes les observations réalisées sur les 7 autres plantes ont montré une localisation de la fluorescence dans les amyloplastes et en particulier autour des grains. Cette répartition est typique d'une protéine localisée dans le stroma de l'amyloplaste dont la membrane suit les contours de l'unique grain d'amidon accumulé dans ce compartiment subcellulaire (Figure 52) (Pasare et al., 2013).

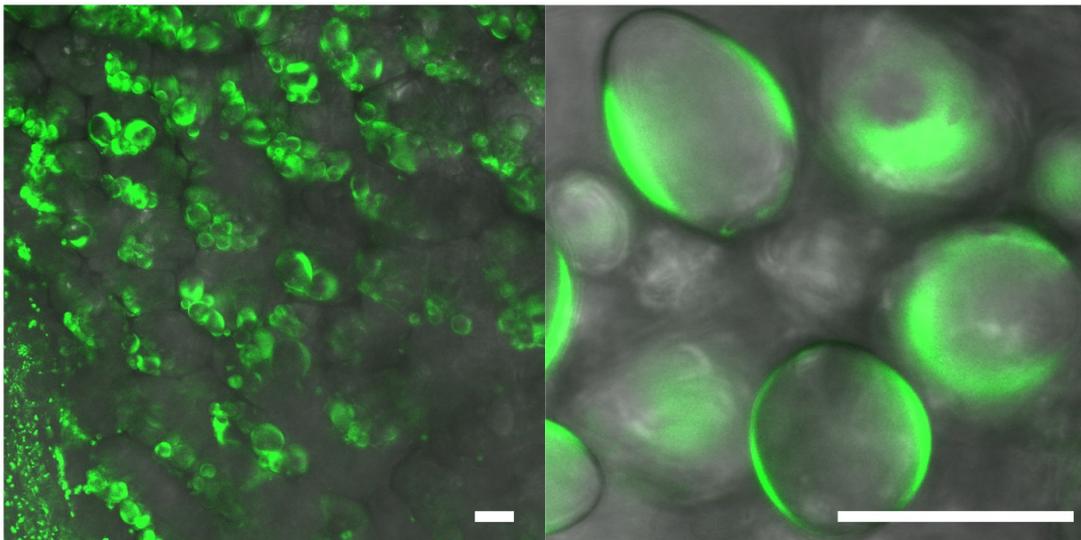


Figure 52: Tranches de tubercules de plantes exprimant la protéine de fusion SS6::GFP observées en microscopie confocale à balayage laser. La barre d'échelle correspond à 20µm.

La Figure 53 présente une série de clichés pris à différentes profondeurs dans le tissu permettant de visualiser la répartition diffuse et contenue de la protéine autour du grain et confirmant sa localisation dans le stroma de l'amyloplaste.

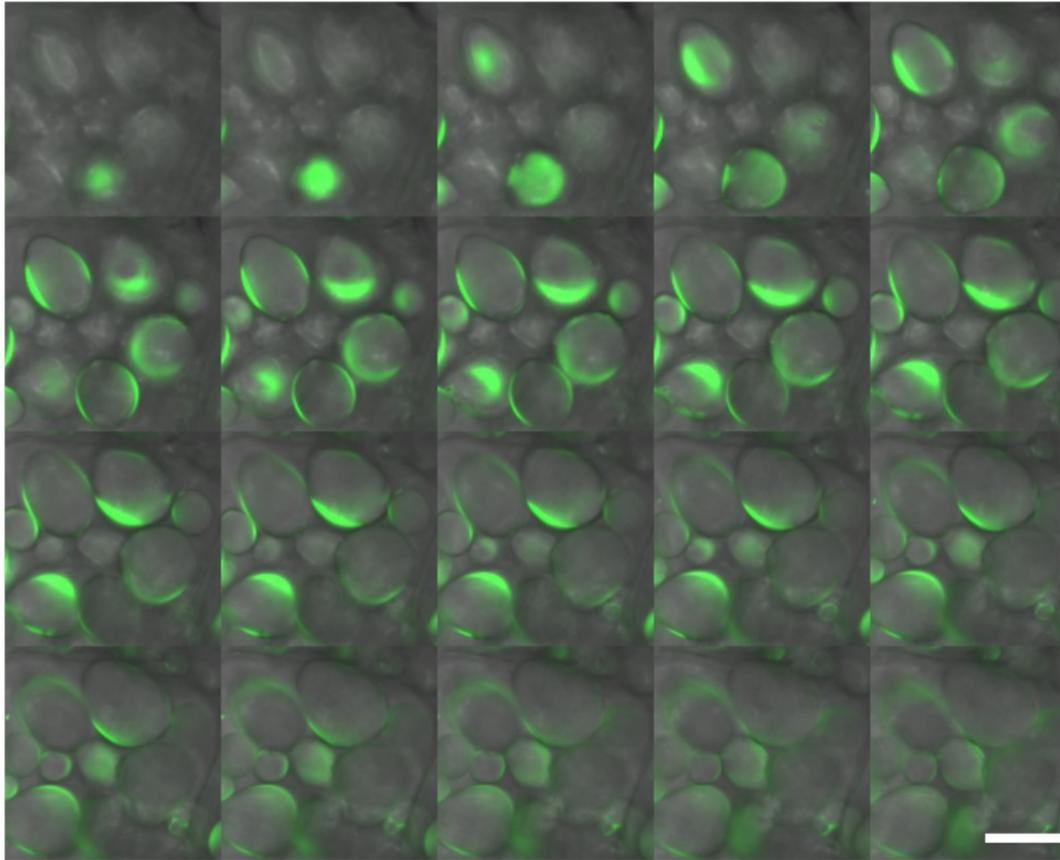


Figure 53: Distribution de la protéine de fusion SS6::GFP dans l'amyloplaste. Chaque cliché correspond à la même zone d'une tranche de tubercule d'une plante surexprimant SS6::GFP à des profondeurs croissantes observée par microscopie confocale à balayage. La barre d'échelle correspond à 20 μ m.

5. Analyse phénotypique des lignées KO ou surexprimant SS6

3 plantes sauvages, 7 lignées K.O. (GT.2, GT.5, GT.7, GT.17, GT.20 et GT.25) et 7 lignées surexprimant SS6 (OE.1, OE.2, OE.5, OE.6, OE.7 et OE.8) ont été cultivées en pots dans un terreau commercial et en conditions contrôlées (photopériode de 16 H jour ($80 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$)/ 8 H nuit à 20 °C constants) jusqu'à la production de tubercules. Les plantes ont été arrosées pendant 10 semaines et les tubercules ont été récoltés 2 semaines après l'arrêt des arrosages. Trois essais biologiques (cultures) indépendants ont été réalisés pour l'ensemble de ces plantes. Pour la majorité des plantes étudiées, les analyses ont été effectuées sur trois cultures indépendantes.

a. À l'échelle de la plante

Des photographies ont été réalisées 1 mois après le début de la culture. Une photo représentative de chaque type de lignée (sauvage, surexprimeur, K.O.) est présentée en Figure 54. L'analyse macroscopique (hauteur et largeur de la plante, nombre de feuilles, couleur des feuilles, nombre de folioles) des plantes tout au long de leur croissance n'a pas révélé de différences notables entre les lignées, indiquant que les mutations n'altèrent pas le développement de la plante dans les conditions de culture testées.



Figure 54: Photographie de plantes sauvages (WT), surexprimeur (OE.7) et K. O. (GT.25), 1 mois après culture en terreau. Des plantules *in vitro* ont été plantées dans des pots de terreau et placées en chambre de culture ayant une photopériode de 16 H de jour et 8 H de nuit à 22°C constant.

Les photos des tubercules obtenus lors du premier réplicat biologique sont présentés en Figure 55. Le nombre de tubercules récolté pour chaque plante varie de 3 à 8 avec une disparité dans le stade de développement de chacun des tubercules. Cependant, nous n'avons pas observé de modifications majeures de l'aspect des tubercules (taille, forme,

nombre) n'a pu être mise en évidence entre les différents phénotypes entre les différentes lignées.

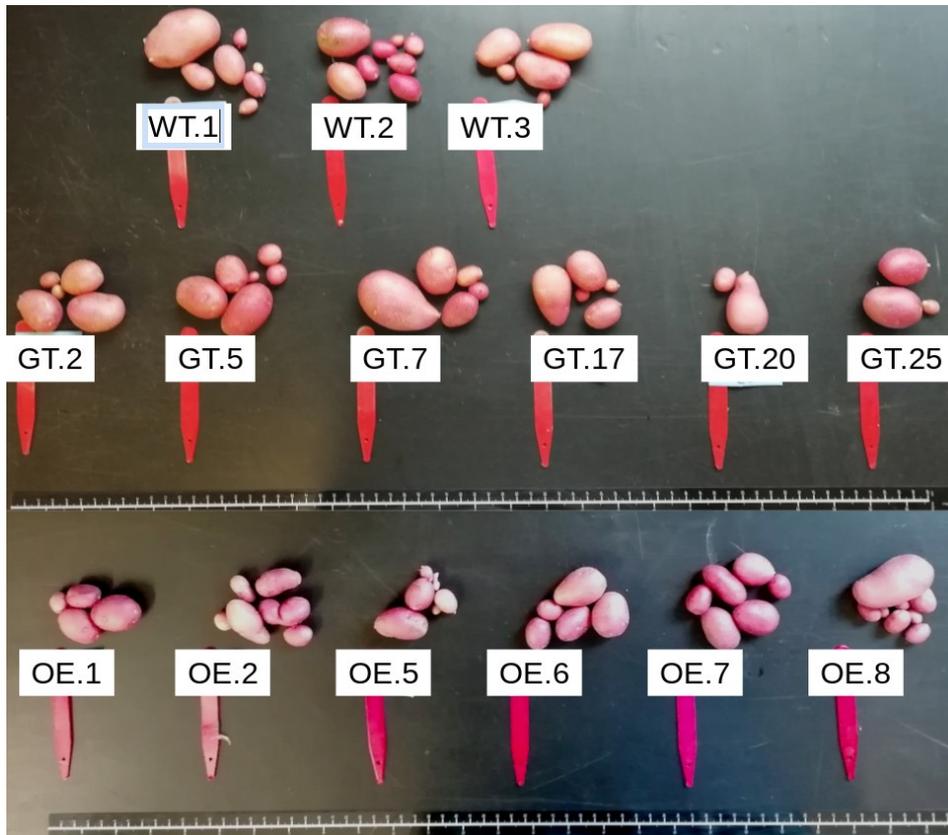


Figure 55: Tubercules issues des plantes cultivées en terreau pendant 3 mois.

b. Morphologie des grains d'amidon

Dans un premier temps, l'ensemble des tubercules d'une même plante ont été poolés afin d'en extraire et de purifier l'amidon. La morphologie des grains a ensuite été analysée à l'aide d'un granulomorphomètre. La distribution du diamètre des grains est représentée en Figure 56 pour les plantes *ss6-* et en Figure 57 pour les lignées surexprimant *SS6*.

Dans les plantes sauvages, on observe un diamètre médian d'environ 15 μm , 50 % des grains ayant une taille comprise entre 10,5 et 21,8 μm . Dans les lignées mutantes, le diamètre moyen varie de 16,8 à 18,1 μm . Toutefois, l'analyse de variance avec comparaison multiple des moyennes (ANOVA) indique qu'aucune des lignées *ss6-* ne présente de modification de diamètre moyen des grains comparé à l'amidon sauvage.

De plus, la distribution du diamètre des grains dans les populations analysées ne semble pas différente de celle des plantes sauvages (Figure 56).

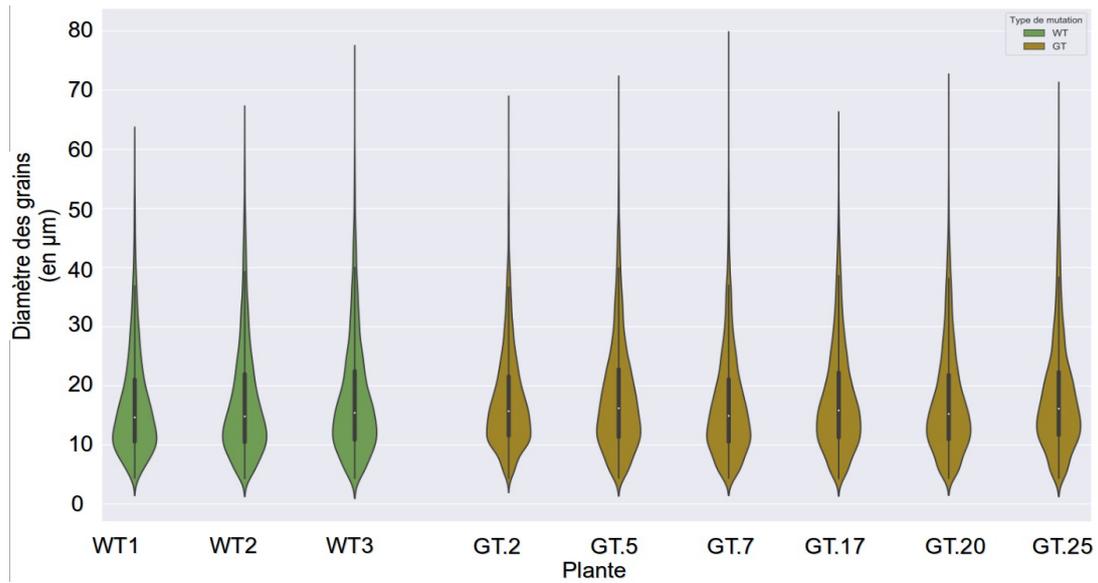


Figure 56: Distribution des diamètres de grains d'amidon issus de tubercules de plantes sauvages et *ss6*-. Le diamètre des grains est exprimé en μm . Trois populations d'environ 3000 grains issus d'un triplicat biologique ont été analysées pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

Concernant les plantes surexprimant l'enzyme, on observe une légère augmentation du diamètre médian des grains chez certaines plantes quand on les compare aux plantes sauvages (Figure 57).

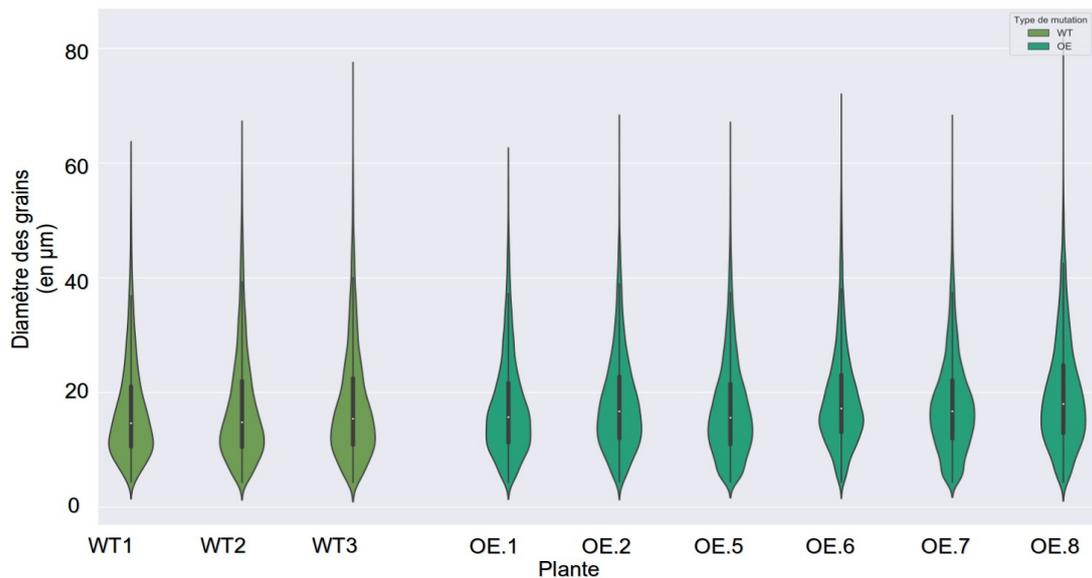


Figure 57: Distribution des diamètres de grains d'amidon issus de tubercules de plantes sauvages et surexprimant SS6. Le diamètre des grains est exprimé en μm . Trois populations d'environ 3000 grains issus d'un triplicat biologique ont été analysées pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

L'augmentation la plus marquée peut être observée dans la lignée OE.8, dont le diamètre médian des grains est d'environ 20 μm , 1,3 fois supérieur à celui de la référence sauvage. On observe par ailleurs dans cette lignée une augmentation marquée du nombre de grains ayant un diamètre d'environ 30 μm . De plus, l'ANOVA montre que le diamètre moyen des grains d'amidon des plantes OE.6 et OE.8 est significativement supérieur à celui de l'ensemble des plantes sauvages ($p\text{-value} < 0,01$). Cependant, l'allure générale de la distribution de la taille des grains reste semblable à celle des amidons issus de plantes sauvages.

Les distributions de rondeur des grains d'amidon ont également été déterminées à l'aide d'un outil d'imagerie pour les lignées *ss6*- (Figure 58) et les surexprimeurs (Figure 59). La rondeur médiane observée dans les échantillons sauvages se situe autour de 0,84, et la moitié des grains ont une rondeur comprise entre 0,75 et 0,91. Les populations de grains issus des lignées GT.5, GT.7 et GT.17 ont une rondeur moyenne statistiquement plus faible que celle des grains des plantes trois individus sauvages ($p\text{-value} < 0,01$) (Figure 58).

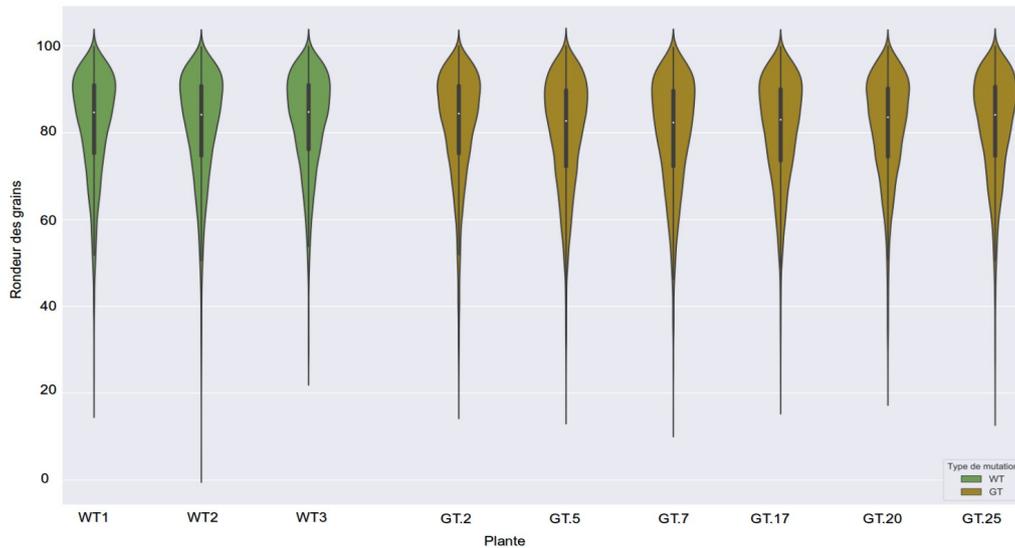


Figure 58: Distribution de la rondeur d'une population de grains d'amidon issu de tubercules de plantes sauvages et mutées *ss6*-. La rondeur est comprise en 0 et 1, la valeur 1 représentant une sphère parfaite. Trois populations d'environ 3000 grains issus d'un triplicat biologique ont été analysées pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

La même observation peut être faite pour les surexpressesurs. En moyenne, les grains de chacune de ces lignées sont moins ronds que ceux de la référence sauvage (p -value < 0,01) (Figure 61). Les grains les moins ronds sont observés dans les lignées OE.5, OE.6 et OE.8 possédant des grains moins ronds que les autres plantes étudiées avec une rondeur moyenne de respectivement 0,798, 0,795 et 0,796.

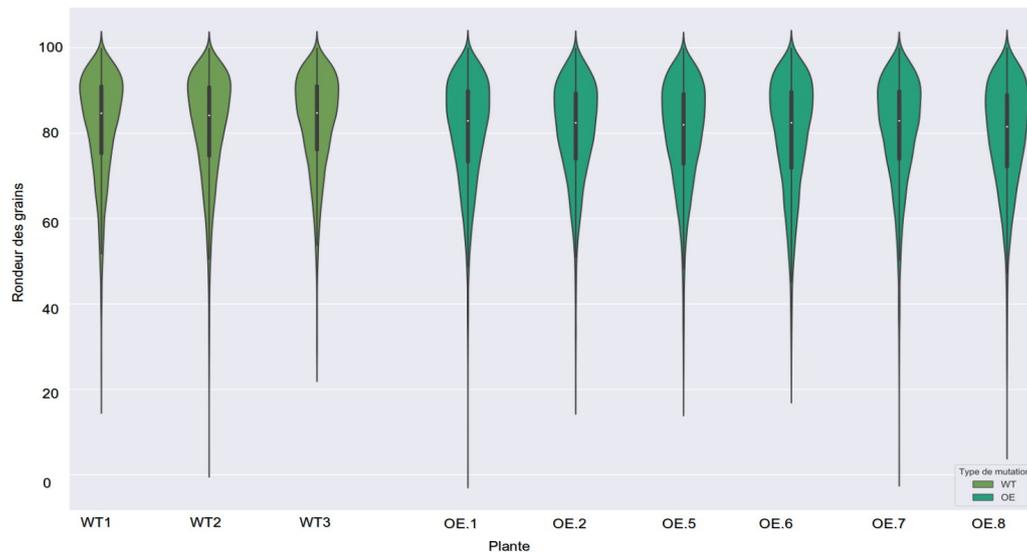


Figure 59: Distribution de la rondeur d'une population de grains d'amidon issu de tubercules de plantes sauvages et surexprimant SS6. La rondeur est comprise en 0 et 1, la valeur 1 représentant une sphère. Trois populations d'environ 3000 grains issus d'un triplicat biologique ont été analysées pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

Une analyse transcriptomique du tubercule de pomme de terre à différents stades de croissance a révélé que l'expression de *SS6* suit un profil spécifique au cours de la croissance du tubercule (Yu et al., 2012). De plus, la morphologie des grains d'amidon sauvages varie manifestement avec l'âge et le stade de développement du tubercule (N. Szydłowski, communication personnelle). Afin de vérifier si l'analyse en batch de l'ensemble des tubercules de la plante pourrait masquer un phénotype exprimé à un stade de croissance donné, nous avons sélectionné un unique tubercule, au stade le plus mature, pour chacune des lignées. L'amidon de ces tubercules a été extrait et analysé de la même façon que précédemment. Les distributions de diamètres des grains KO *ss6*⁻ sont présentées dans la Figure 60. Les résultats correspondants obtenus pour les surexprimeurs sont présentés dans la Figure 61.

Le diamètre médian va de 37 μm à 42 μm pour les grains d'amidon extraits de plantes sauvages. Ces grains semblent divisés en deux sous-populations, l'une ayant un diamètre proche de 40 μm et l'autre un diamètre proche de 10 μm (Figure 60).

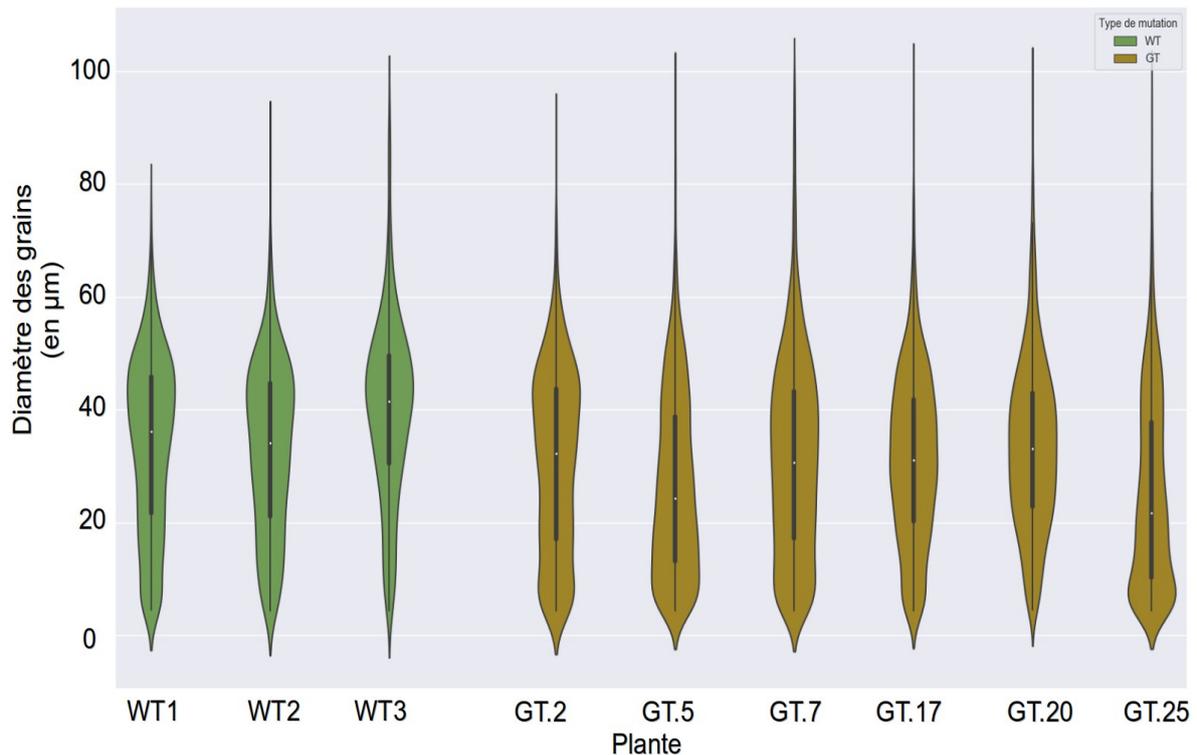


Figure 60: Distribution des diamètres d'une population de grains d'amidon issu de tubercules de plantes sauvages et mutées *ss6-*. Le diamètre des grains est exprimé en μm . Une population issue d'un seul tubercule et d'environ 3000 grains a été analysée pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

On note que les grains de la plante sauvage WT3 présentent un diamètre médian supérieur aux deux autres individus qui s'explique par une plus faible proportion de petits grains (d'environ $10 \mu\text{m}$ de diamètre).

Chez toutes lignées *ss6-*, le diamètre médian est plus faible que celui des plantes sauvages, associé à une proportion plus importante de grains d'environ $10 \mu\text{m}$ (Figure 60). La diminution du diamètre médian est la plus marquée dans les lignées GT.5 et GT.25 où le diamètre médian est de $23 \mu\text{m}$ et $20 \mu\text{m}$ respectivement. Chez ces deux plantes, on observe une forte population de grains d'environ $10 \mu\text{m}$ de diamètre.

Bien que toutes les plantes *ss6-* montrent un diamètre moyen plus faible que celui des plantes sauvages, seules les populations de grains des lignées GT.5 et GT.25 ont un diamètre significativement inférieur à celui des trois plantes sauvages. Celui-ci est de $26,7 \mu\text{m}$ pour GT.5 et de $25,1 \mu\text{m}$ pour GT.25 contre des diamètres moyens allant de 33 à $39,8 \mu\text{m}$ chez les plantes sauvages.

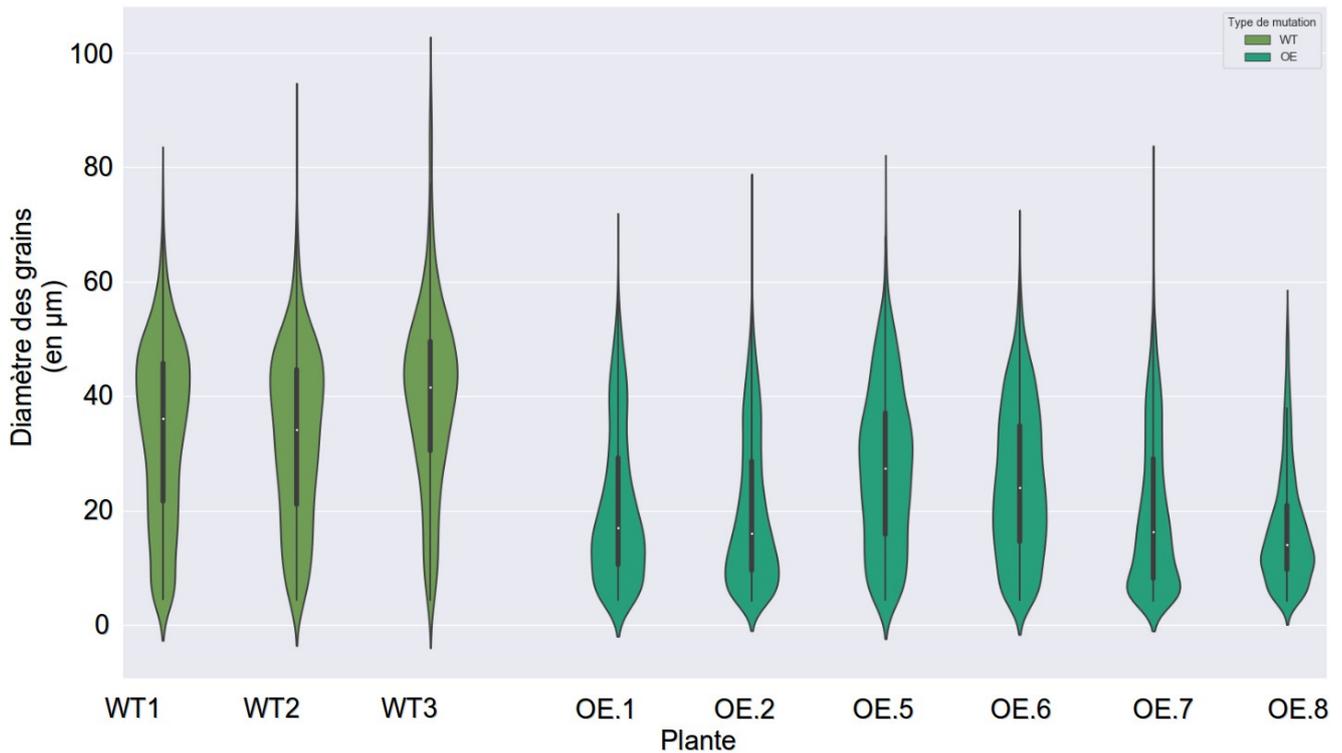


Figure 61: Distribution des diamètres d'une population de grains d'amidon issu de tubercules de plantes sauvages et surexprimant SS6. Le diamètre des grains est exprimé en μm . Une population issue d'un seul tubercule et d'environ 3000 grains a été analysée pour chaque plante. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

Dans les lignées surexprimant SS6, on observe une forte modification de la distribution de diamètre des grains avec une médiane de loin inférieure à celle observée dans les plantes sauvages (Figure 61). Les lignées OE.1, OE.2, OE.7 et OE.8 présentent un diamètre médian inférieur à 20 μm et la proportion des plus gros grains (diamètre d'environ 40 μm) est très faible. Par ailleurs, la proportion en petits grains est fortement augmentée dans les lignées OE.5 et OE.6.

On observe également une différence très nette entre les plantes sauvages et les surexprimeurs. L'ANOVA indique que le diamètre moyen des grains des surexprimeurs (16,7 μm à 27,3 μm) est inférieur à celui des plantes sauvages (33 μm à 39,8 μm) (p -value < 0,01).

Les distributions de la rondeur sont présentées en Figure 62 et Figure 63.

La rondeur médiane des grains d'amidon sauvages est d'environ 0,75. Les grains des lignées GT.2, GT.5, GT.7 et GT.25 sont plus ronds avec des valeurs médianes de

respectivement 0,764, 0,775, 0,774 et 0,787 issus de certaines plantes *ss6-* sont globalement plus rond (Figure 62).

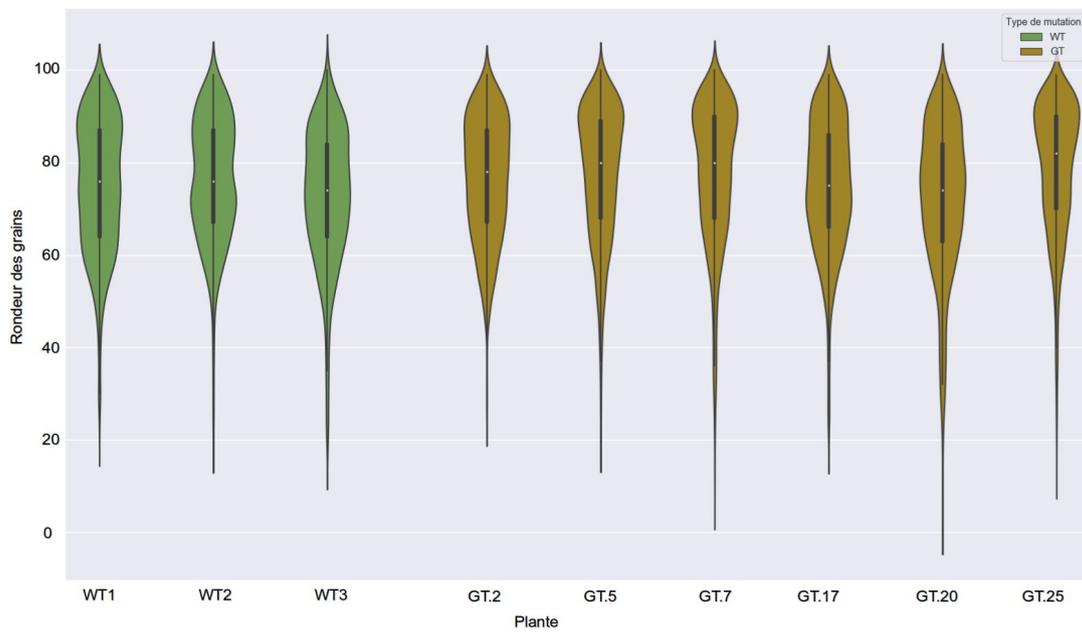


Figure 62: Distribution de la rondeur d'une population de grains d'amidon issu de tubercules de plantes sauvages et mutées *ss6-*. La rondeur est comprise en 0 et 1, la valeur 1 représentant une sphère. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

Cependant, ces différences ne sont significatives que pour la lignée GT.25 selon l'analyse ANOVA de ce jeu de données.

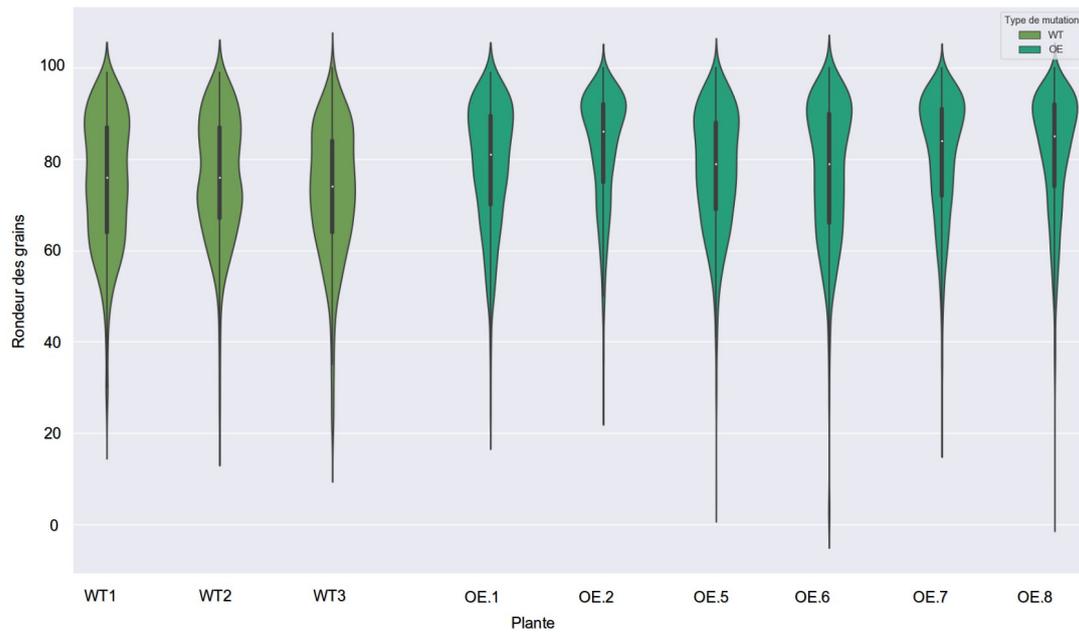


Figure 63: Distribution de la rondeur d'une population de grains d'amidon issu de tubercules de plantes sauvages et surexprimant SS6. La rondeur est comprise en 0 et 1, la valeur 1 représentant une sphère. La médiane de la population est représentée par un point blanc, les 25^e et 75^e centiles sont représentés par un trait noir épais et les 5^e et 95^e centiles sont représentés par un trait noir fin.

L'ensemble des surexprimeurs accumulent des grains plus ronds avec des valeurs médianes comprises entre 0,8 et 0,85. Cette différence est plus marquée dans les lignées OE.2, OE.7 et OE.8 qui possèdent une très faible proportion de grains dont la rondeur est inférieure à 0,7. Ces modifications sont significatives pour les lignées OE.1, OE.2, OE.7 et OE.8 sont significativement plus ronds que ceux des plantes sauvages (p -value < 0,01). Les valeurs moyennes de rondeur pour ces grains vont de 0,79 à 0,82 contre des valeurs allant de 0,73 à 0,76 chez les plantes sauvages.

c. Structure et composition de l'amidon

L'amidon a été analysé afin d'observer une éventuelle variation de la structure de l'amylopectine, ainsi qu'un éventuel changement du ratio des deux composantes de l'amidon : l'amylose et l'amylopectine.

Une séparation de ces deux composantes a été réalisée par chromatographie d'exclusion stérique. L'analyse de l'absorbance du complexe formé par les glucanes dans chacune des fractions recueillies avec le diiode permet de visualiser le profil de séparation des glucanes. Des profils représentatifs de chaque groupe de plantes sont présentés en Figure 63. On observe un pic d'amylose d'apparence plus important pour les plantes surexprimant SS6 (Figure 63 : OE.1) ou ne l'exprimant plus (Figure 63: GT.17). Cependant, cette différence n'est pas constante entre toutes les lignées analysées (Annexe 7). On observe également une légère différence de la longueur d'onde au maximum d'absorption du complexe iode/polysaccharide au niveau du pic d'amylopectine (c'est-à-dire la fraction de la colonne contenant le plus d'amylopectine). Cette longueur d'onde est comprise entre 559 et 563 nm chez les plantes sauvages, entre 558 et 568 nm chez les plantes surexprimant SS6 et entre 561 et 568 nm chez les plantes K.O. pour SS6. Cette valeur diffère selon la longueur des chaînes de la molécule étudiée. Cependant les variations observées ici n'indiquent pas de modifications majeures de la structure de l'amylopectine chez les plantes surexprimeurs et *ss6*-.

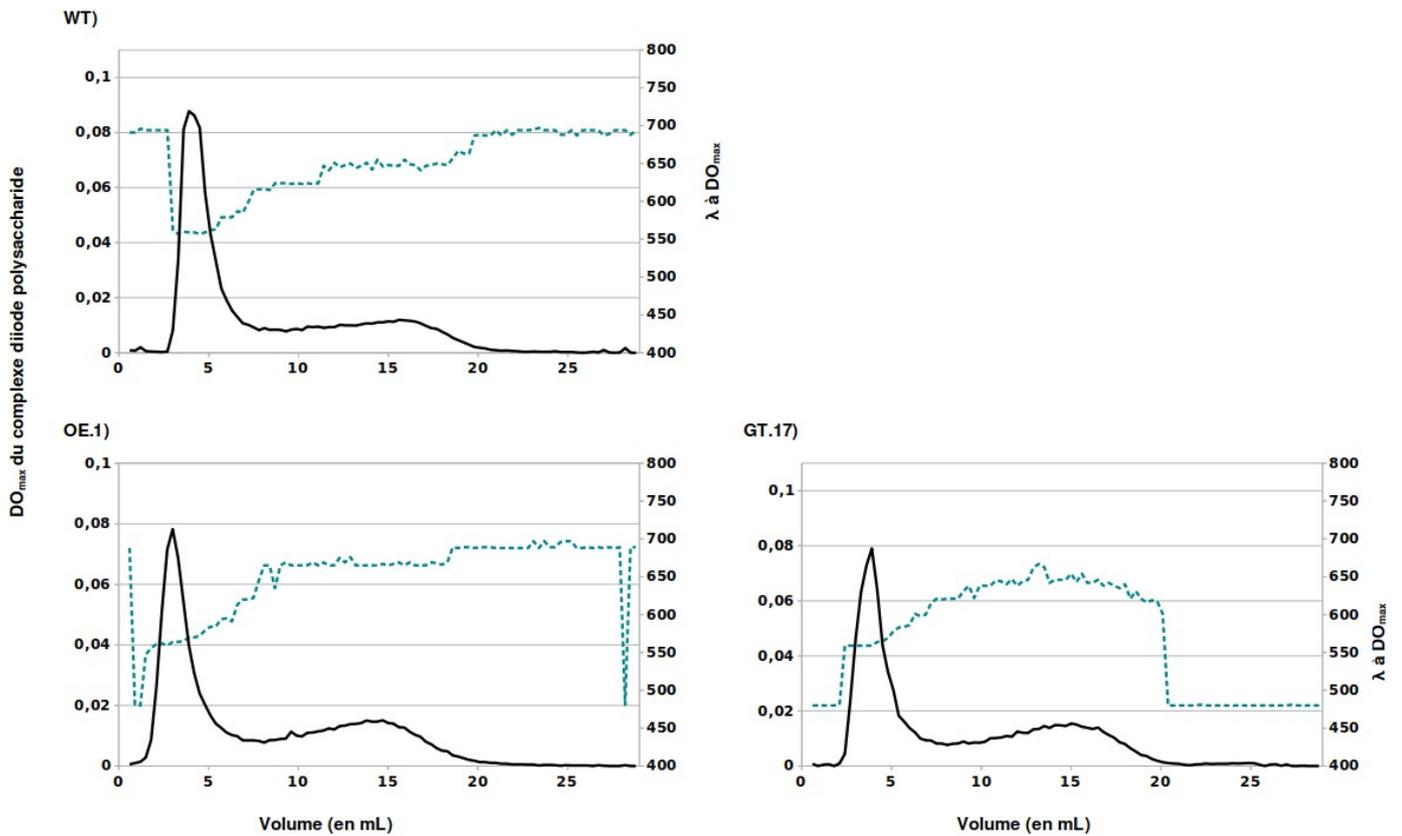


Figure 64: Chromatographie d'exclusion stérique de l'amidon de plantes sauvages et mutantes. Courbe noire : Densité optique maximale après coloration à l'iode de chaque fraction de séparation d'1,5 mg d'amidon. Points verts : Longueur d'onde associée à la densité optique maximale. La longueur d'onde au maximum d'absorption pour le pic d'amylopectine est indiquée au dessus de celui-ci.

Afin de déterminer les proportions d'amylose et d'amylopectine dans l'amidon, une quantification de ces deux polysaccharides a été réalisée (Tableau 5). Les proportions observées varient entre 15,4 % et 21,7 % chez les plantes sauvages, entre 14,2 % et 19,5 % chez les plantes *ss6-* et entre 15,6 % et 21,9 % chez les plantes surexprimant SS6. Aucune de ses valeurs ne s'est révélée statistiquement différente des valeurs obtenues pour les plantes sauvages (ANOVA, risque 5 %).

Tableau 5: Contenus en amylose dans les amidons sauvages et mutants.

	Proportion d'amylose moyen dans l'amidon (en %)	Ecart-Type
WT.1	15,4	0,5
WT.2	16,2	2,8
WT.3	21,7	7,7
GT2.2	19,5	3,8
GT2.5	16,4	3,8
GT2.7	14,2	1,1
GT2.17	15,0	1,4
GT2.20	18,0	2,7
GT2.25	16,7	8,6
STOP.1	16,7	9,9
STOP.2	17,5	10,1
STOP.5	15,8	3,0
STOP.6	15,6	0,9
STOP.7	18,5	8,7
STOP.8	21,9	9,4

L'analyse de la distribution des longueurs de chaînes a été réalisée sur de l'amidon extrait d'une série de tubercules présentant le même stade de développement. Les points de branchement (liaisons α -1,6) des polysaccharides ont été hydrolysés et l'abondance de chaque type d' α -1,4 glucanes a été quantifiée de manière relative après analyse en électrophorèse capillaire.

Les figures 65 et 66 montrent le profil moyen de la distribution de ces abondances relatives pour trois plantes sauvages ainsi que les modifications observées chez les plantes mutantes par rapport au profil moyen.

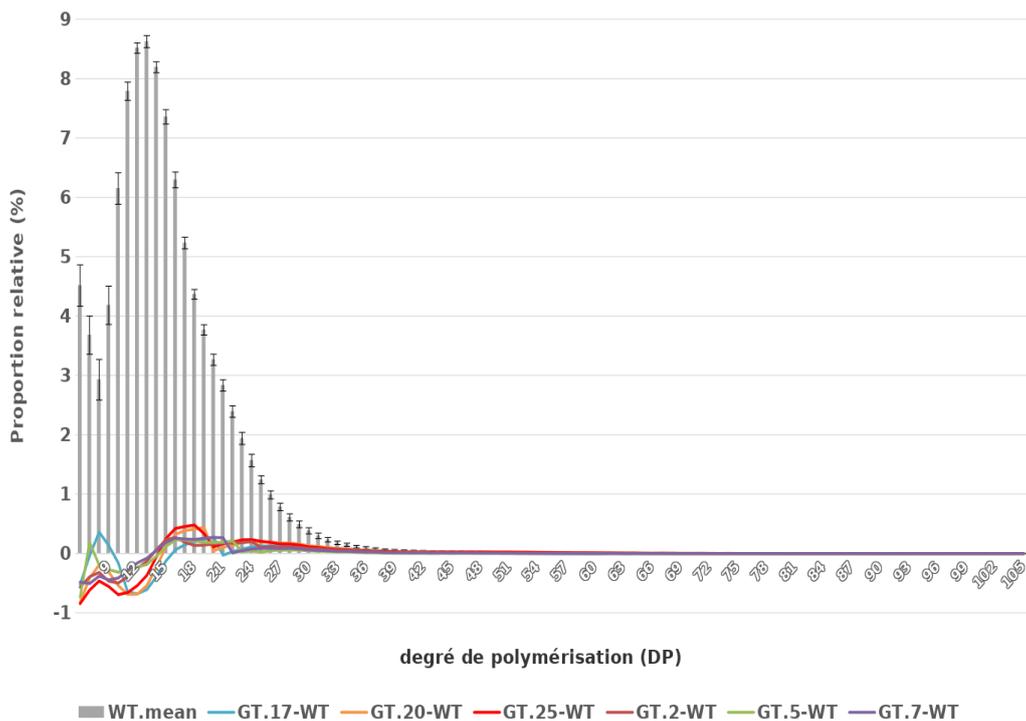


Figure 65: Modifications de la distribution des longueurs de chaînes de l'amidon chez les plantes *ss6-*. L'amidon de trois plantes sauvages et des plantes mutées *ss6-* a été débranché avant d'être séparé par électrophorèse capillaire. Les proportions relatives des différentes longueurs de chaînes de l'amidon des plantes sauvages ont été moyennés et sont représentées en gris. La différences de longueurs de chaînes des plantes mutées par rapport aux plantes sauvages sont représentées par les lignes colorées. WT.mean) Profil moyen de l'amidon de trois plantes sauvages. La barre d'erreur correspond à l'écart-type des valeurs moyennées. GT.x-WT) différence calculée entre le profil moyen des plantes sauvages et le profil de la plante K.O. concernée.

On observe une diminution relative des chaînes de DP6 à DP14 de l'ordre de 0,5 points dans l'ensemble des lignées mutantes. L'abondance des chaînes de DP 7 à 9 n'est toutefois pas diminuée dans les lignées GT.5 et GT.17 (Figure 65). On observe également une augmentation des chaînes de DP15 et supérieurs, particulièrement marquée pour les glucanes de DP15 à 20.

De la même manière, les modifications observées chez les plantes surexprimant SS6 ne sont pas identiques entre toutes les plantes (Figure 66).

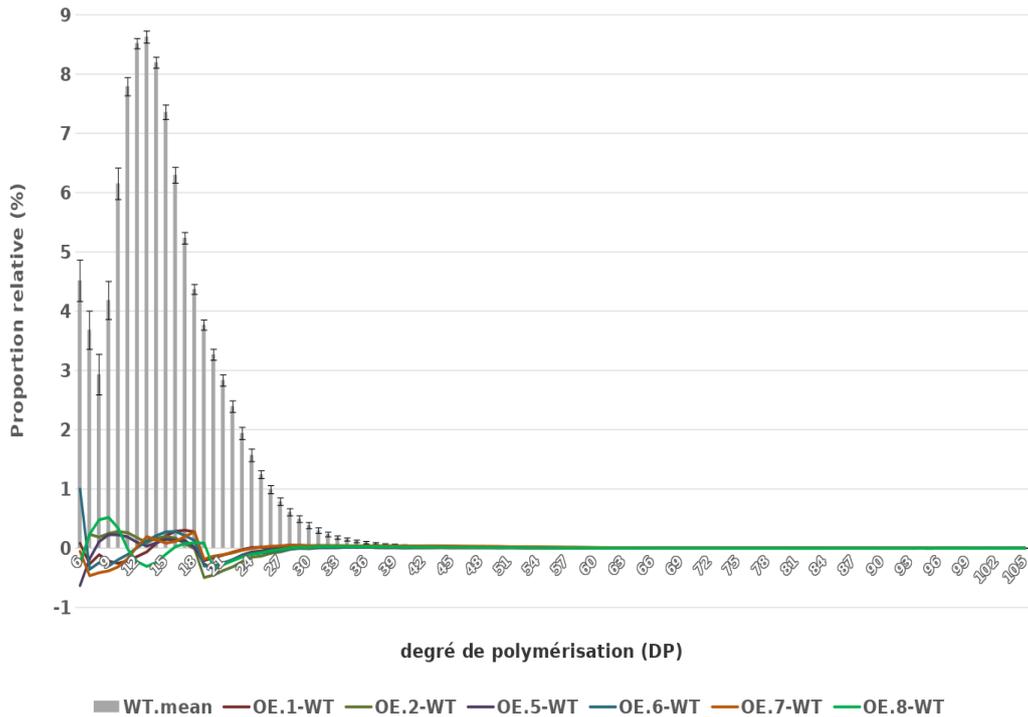


Figure 66: Modifications de la distribution des longueurs de chaînes de l'amidon chez les plantes surexprimant SS6. L'amidon de trois plantes sauvages et des plantes surexpressseurs a été débranché avant d'être séparé par électrophorèse capillaire. Les proportions relatives des différentes longueurs de chaînes de l'amidon des plantes sauvages ont été moyennés et sont représentées en gris. La différences de longueurs de chaînes des plantes surexpressseurs par rapport aux plantes sauvages sont représentées par les lignes colorées. WT.mean) Profil moyen de l'amidon de trois plantes sauvages. La barre d'erreur correspond à l'écart-type des valeurs moyennées. OE.x-WT) différence calculée entre le profil moyen des plantes sauvages et le profil de la plante surexpressseur concernée.

Ainsi, on observe des modifications de l'abondance des chaînes de DP6 à DP11 de l'ordre de 0,5 points, certaines d'entre elles étant positives et d'autres négatives.

Cependant, on observe une augmentation récurrente de l'abondance des chaînes de DP13 à DP18 associée à une diminution de l'abondance de celles de DP19 à DP27.

Une étude de Kossmann et al. (1999) a montré des modifications importantes de l'état de phosphorylation de l'amidon chez des plantes sous-exprimant SS2. L'abondance de résidus phosphorylés a donc été mesurée chez les plantes mutantes surexprimant ou n'exprimant plus SS6 en FACE après hydrolyse totale de l'amidon.

L'abondance des résidus G3P et G6P ainsi que le ratio de le de la première sur la seconde ont été analysés et sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6: Abondance des résidus phosphorylés dans l'amidon de plantes sauvages ou mutantes. L'analyse a été réalisée sur l'ensemble des tubercules d'un réplicat pour chaque plante.

	Abondance des résidus G3P (en %)	Abondance des résidus G6P (en %)	Abondance des résidus phosphorylés (en %)	Ratio G3P/G6P
WT1	0,0197	0,1048	0,1245	0,1881
WT2	0,0197	0,0810	0,1007	0,2431
WT3	0,0206	0,0972	0,1178	0,2115
G2	0,0185	0,0608	0,0792	0,3038
G5	0,0281	0,1283	0,1564	0,2187
G7	0,0408	0,1245	0,1653	0,3274
G17	0,0227	0,0921	0,1147	0,2461
G20	0,0281	0,0603	0,0884	0,4654
G25	0,0277	0,0989	0,1266	0,2795
S1	0,0216	0,0569	0,0784	0,3795
S2	0,0178	0,0715	0,0893	0,2489
S3	0,0238	0,0907	0,1145	0,2627
S5	0,0164	0,0446	0,0611	0,3683
S6	0,0216	0,0769	0,0985	0,2808
S7	0,0229	0,0864	0,1094	0,2655
S8	0,0190	0,0492	0,0683	0,3867

On observe chez les plantes sauvages entre 0,1 et 0,12 % de résidus phosphorylés et ceux-ci sont majoritairement phosphorylés sur le carbone 6, le G6P étant environ 5 fois plus abondant que le G3P.

Chez les plantes mutantes *ss6-*, le pourcentage de résidus phosphorylés varie entre 0,08 et 0,17 %, les plantes GT.5 et GT.7 montrant un pourcentage de résidus phosphorylés bien supérieur à celui des plantes sauvages.

Cette abondance élevée en résidus phosphorylés s'explique principalement par une l'augmentation de l'abondance en G6P et dans une moindre mesure, de G3P.

On observe aussi que tous les amidons de plantes *ss6-* présentent un pourcentage de G3P supérieur aux plantes sauvages.

Les plantes surexprimant SS6 présentent, quant à elles, un taux de phosphorylation compris entre 0,06 et 0,11 %, soit des taux inférieurs ou égaux à ceux des plantes sauvages. Les plantes présentant les taux de phosphorylations les plus bas présentent également les ratios d'abondance de G3P/G6P les plus élevés.

IV. Discussion et perspectives

A. Le séquençage du génome de Désirée pour la validation des cibles CRISPR/Cas9 révèle un fort polymorphisme intrinsèque

La publication du génome assemblé de la pomme de terre en 2011 par *Xu et al.* a métamorphosé la génomique fonctionnelle chez cette espèce, en donnant accès à la séquence de tous ses chromosomes et des gènes qu'ils portent.

Cependant, la séquence produite est celle d'une plante diploïde parfaitement homozygote appartenant à un groupe de pomme de terre éloigné des variétés tétraploïdes et très hétérozygotes cultivées en Europe (Hardigan et al., 2017). Cette distance évolutive se traduit généralement par une distance génétique.

La génomique fonctionnelle a récemment connu une révolution avec le développement très rapide de la mutagenèse dirigée, notamment grâce à l'endonucléase CRISPR/Cas9. L'étude de gène chez la pomme de terre s'en trouve donc très largement facilité mais souffre toujours de limitations. En effet, le système CRISPR/Cas9 est très sensible à la présence de variations dans la séquence ciblée, la présence d'un ou plusieurs SNPs dans cette séquence pouvant réduire très fortement l'efficacité de la mutagenèse (Andersson et al., 2017).

Au laboratoire, nous avons donc entrepris de séquencer la variété Désirée et d'identifier avec une quasi-exhaustivité les variations de séquence génomique par rapport au génome de référence.

1. La connaissance des nombreuses variations génétiques entre Désirée et Phureja permet l'établissement d'un outil pour la sélection de cibles pour CRISPR/Cas9

Le séquençage du génome de Désirée a produit près de 100 millions de séquences. Ces séquences ont été cartographiées sur le génome de référence et ont permis l'analyse des variations génétiques et ainsi l'identification de près de 12 000 000 de SNP, 707 000 insertions et 470 000 délétions.

En plus de la distance évolutive entre ces deux génotypes, cette grande variabilité génétique pourrait s'expliquer par la sélection de traits agronomiques pour la production de la variété Désirée et notamment la recherche de variabilité génétique entre ces quatre haplotypes contrairement au génotype de référence du groupe Phureja qui est issu d'une

« race naturelle » c'est-à-dire d'une variété traditionnelle. Cette sélection pourrait également expliquer l'écart entre le nombre d'insertions et de délétions observées. En effet, la prolifération d'éléments transposables est souvent associée à des modifications phénotypiques qui constituent des caractères sujets à la sélection variétale (Olsen and Wendel, 2013).

La densité des variations observée semble plus forte dans les régions riches en gènes. Ce biais pourrait aussi s'expliquer par la sélection positive de variations d'expression de gène chez Désirée. Ce résultat renforce le constat de la nécessité de l'identification de ces variations de séquence dans les gènes pour la mutagenèse dirigée.

Nous avons cherché à évaluer la qualité et l'exhaustivité des données produites. La profondeur de séquençage d'environ 30 X obtenue nous a permis d'identifier avec confiance les variations de séquence sur l'ensemble du génome. En effet, cette profondeur est similaire à celle utilisée dans d'autres études en analyse de variants (Uitdewilligen et al., 2013; Das et al., 2015).

L'étude de Uitdewilligen et al. (2013) qui porte sur le séquençage partiel du génome de 83 cultivars montre des résultats similaires à ceux que nous avons produits. On retrouve notamment une répartition inégale de la variabilité génétique sur les chromosomes avec la plus forte densité de variations sur le chromosome 11 et la plus faible sur le chromosome 10. Les auteurs constatent également un ratio transition/transversion de 1,55 pour les SNPs, là où nous avons constaté un ratio de 1,60.

Nous avons également confronté les données produites concernant les SNPs identifiés à une puce regroupant le polymorphisme de trois variétés de pomme de terre cultivées. Malgré l'utilisation d'une variété différente, nous avons pu retrouver près de 58 % des SNPs présents sur la puce.

Notre étude a donc permis d'identifier une très grande quantité de variations de séquence chez la variété Désirée, de manière fiable et quasi exhaustive sur l'intégralité du génome. Les données produites représentent un outil très puissant pour l'utilisation de techniques de mutagenèse dirigée qui deviennent de plus en plus prépondérantes dans l'étude de gène. Celles-ci s'avèrent particulièrement utiles lors de la définition des cibles génétiques pour le système CRISPR/Cas9.

2. Les variations de séquences identifiées sont intrinsèques au cv. Désirée

De manière exploratoire, nous avons quantifié les variations de séquences présentes au sein du génome de Désirée. Ces variations représentent le polymorphisme qui existe entre les haplotypes chez cette variété.

Dans le cadre d'expériences de mutagenèse dirigée contre un gène, la méconnaissance de ce polymorphisme peut empêcher la mutation de tous les allèles de ce gène en limitant l'efficacité de l'endonucléase sur une séquence cible comportant une variation de séquence.

Les résultats obtenus ont montré qu'une majorité de la variabilité de séquence précédemment observée était liée à la variabilité intrinsèque à Désirée. Celle-ci représentant 70 % des SNP et 61 % des Indels identifiés.

Ce résultat s'explique par le caractère tétraploïde de Désirée mais aussi par sa forte hétérozygotie en comparaison avec la variété di-haploïde du groupe Phureja.

B. L'analyse biochimique de l'amidon de pomme de terre chez des mutants *gbss*- montre un bouleversement de son contenu en protéines et en phosphates

Des plantes issues d'expérimentations de mutagenèse dirigée visant à muter le gène codant la GBSS ont été obtenues dans le cadre de la mise au point méthodologique de CRISPR/Cas9 sur la pomme de terre (variété Désirée). La caractérisation génotypique de ces plantes a mis en évidence la présence de mutations sur le gène ciblé (Veillet et al., 2019a). Nous avons choisi de réaliser l'analyse biochimique de deux de ces plantes. La première présente des mutations entraînant l'inactivation de trois des quatre allèles de *GBSS* (17T.701.010) et l'autre une inactivation totale de ce gène (17T.716.146).

La première étape de l'analyse biochimique a été la confirmation de la diminution de la quantité d'amylose dans l'amidon des tubercules des plantes mutantes, la GBSS étant seule responsable de sa synthèse. Une analyse en chromatographie d'exclusion stérique a mis en évidence l'absence d'amylose chez la plante 17T.716.146 alors qu'une fraction de la quantité d'amylose présente chez la plante sauvage était présente chez la plante 17T.701.010. Ce résultat s'appuie sur la présence d'un pic secondaire sur les chromatogrammes d'absorption du complexe iode-polysaccharide correspondant à l'amylose. Le résultat obtenu concernant la lignée 17T.716.146 est similaire à celui publié par Fulton et al. (2002) qui a montré une absence de ce pic d'absorption chez des lignées anti-sens contre GBSS, en comparaison avec des plantes sauvages de la variété Désirée. Ce constat est donc cohérent avec l'analyse génotypique pour cette plante.

Le résultat obtenu concernant la plante 17T.701.010 montre que la présence d'un seul allèle de *GBSS* non-muté est suffisante pour la synthèse d'amylose dans le tubercule, confirmant ainsi les observations d'Andersson et al. (2017) dans un cas de figure similaire.

La seconde étape a été l'analyse du contenu en protéine de l'amidon des tubercules de ces plantes. Une caractérisation visuelle de ce contenu a d'abord été entreprise par séparation des extraits protéiques issus d'une quantité constante d'amidon par SDS-PAGE. Malgré l'imprécision de cette technique, les résultats ont montré la disparition d'une bande de forte intensité associée à GBSS chez les plantes mutantes. D'autre part, nous avons montré une baisse de la quantité de protéines chez ces mêmes plantes, cette baisse étant plus prononcée chez la plante K. O. pour le gène *GBSS*. Ces deux observations semblent

concordantes avec la diminution de l'abondance de GBSS suite aux mutations induites. Cependant, la diminution du contenu en protéines observée chez la plante K. O. n'est pas égale à la proportion de GBSS dans l'amidon de la plante sauvage. Ainsi, le contenu en protéines de la plante K. O. représente environ 50 % de celui de la plante sauvage alors que la GBSS représente 87 % des protéines dans l'amidon de la plante sauvage. L'abondance d'autres protéines associées au grain est donc augmentée.

Une analyse protéomique des extraits protéiques de l'amidon des tubercules des plantes étudiées a été réalisée afin de caractériser les changements intervenus et l'évolution du contenu de chaque protéine dans l'amidon.

Cette analyse a mis en évidence une forte augmentation du contenu en SS2 dans l'amidon qui devient la protéine majoritaire chez la plante K. O. mais aussi chez la plante possédant un seul allèle sauvage de *GBSS*. Les autres protéines de l'amidon ont elles aussi vu leurs abondances augmenter. On remarque en particulier une forte augmentation de l'abondance de GWD à la fois chez 17T.701.010 et chez 17T.716.146. Une exception existe cependant, en effet, on observe la disparition de PTST1 chez la plante K.O.. Cette observation est en accord avec la fonction de PTST1 qui est de se complexer à la GBSS et de l'adresser au grain d'amidon (Seung et al., 2015).

Cette modification de l'abondance de chaque protéine est probablement le résultat de rétrocontrôles complexes de l'expression des protéines du métabolisme de l'amidon. Il est probable que la modification de la disponibilité des substrats de la GBSS induite par sa disparition ait entraîné une modification de l'expression des autres gènes du métabolisme comme SS2 et GWD mais aussi potentiellement de leur activité. Ce type de modification a été observé par Pérez et al. (2019) dans l'albumen de riz après la mutation des deux isoformes de la GBSS par CRISPR/Cas9. Les auteurs ont notamment observé une compensation partielle de l'activité de la GBSSI par la surexpression de l'isoforme GBSSII mais n'ont pas fourni d'hypothèse quant à la présence des facteurs régulateurs impliqués. On pourrait émettre l'hypothèse de l'existence de senseurs de substrat de la GBSS comme l'ADP-glc ou les MOS qui réguleraient positivement l'expression d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de l'amidon.

Dans cette même publication, les auteurs ont montré des variations phénotypiques comme l'augmentation de l'accumulation de sucres solubles.

Des expérimentations supplémentaires pourraient également être menées sur des génotypes présentant une GBSS dont le site actif est muté mais toujours présente dans les plastes. Des plantes présentant cette caractéristique ont été produites par Veillet et al.

(2019a) et l'analyse protéomique des amidons issus de tubercules de ces plantes permettrait d'identifier si le bouleversement du contenu en protéique observé est dû à l'absence de GBSS dans le grain ou à l'absence de son activité.

Nous avons cherché à caractériser phénotypiquement l'amidon des tubercules issus des plantes mutées afin de mettre en évidence des modifications autres que la simple diminution du contenu en amylose.

La structure fine de l'amylopectine a donc été analysée chez ces plantes par séparation et quantification des chaînes après débranchement. Cette analyse a montré une légère diminution de l'abondance de certaines chaînes courtes (d'une taille comprise entre 7 et 17 résidus) accompagnée d'une augmentation de chaînes plus longues (de taille comprise entre 35 et 65 résidus) chez 17T.701.010 et dans une moindre mesure chez 17T.716.146. Cette légère modification de la structure de l'amylopectine pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'activité d'autres amidon-synthases et en particulier de SS2. En effet, la mutation de ce gène chez *A.thaliana* entraîne une augmentation de l'abondance de chaînes courtes d'amylopectine accompagnée d'une diminution de celle des chaînes plus longues (Zhang et al., 2008).

La teneur en résidus phosphorylés a également été analysée dans l'amidon des plantes mutées et une forte augmentation a été observée chez les plantes K.O..

Les résidus phosphorylés dans l'amidon de cette plante sont 1,6 fois plus abondants que chez la plante sauvage. Cette augmentation peut s'expliquer par l'augmentation de l'abondance de GWD observée dans les protéines associées aux grains d'amidon. En effet, cette enzyme est responsable des phosphorylations sur le carbone 6 des résidus glucose et l'augmentation de l'abondance de résidus phosphorylés observée chez 17T.716.146 concerne majoritairement le G6P (Ritte et al., 2006).

La plus forte abondance de SS2 dans l'amidon de cette plante pourrait également participer à l'explication de cette augmentation. En effet, les pommes de terre dont l'expression de SS2 a été réduite par ARN anti-sens montre diminution de 50 % de l'abondance de résidus phosphorylés sur le carbone 6 (Kossmann et al., 1999).

Enfin, l'analyse de la morphologie des grains d'amidon de tubercules produits par les plantes 17T.701.010 et 17T.716.146 a montré une augmentation de la taille moyenne de ceux-ci chez la plante K. O. ainsi qu'une augmentation de la rondeur des grains d'amidon chez la plante présentant trois des quatre allèles de *GBSS* mutés. L'augmentation de la taille des grains d'amidon en absence de *GBSS* pourrait indiquer que la synthèse

d'amylose vise à rendre les grains d'amidon plus compact ce qui aurait potentiellement un effet sur la capacité d'accumulation de réserves sous forme de polysaccharides ou encore sur la rapidité de remobilisation de ces réserves. Cette hypothèse pourrait également expliquer l'enchevêtrement de l'amylose dans l'amylopectine montré par Jane et al. (1992).

C. L'amidon synthase 6 est une enzyme plastidiale active *in vitro* et dont l'inactivation induit un phénotype nuancé sur l'amidon du tubercule de pomme de terre.

L'amidon-synthase 6 est une protéine dont la séquence est très similaire à celle des amidon-synthases connues mais qui constitue cependant une classe distincte de celles précédemment identifiées (Helle et al., 2018). La présence de cette nouvelle classe d'amidon-synthases a été observée dans l'amidon de pomme de terre par spectrométrie de masse. La compréhension du rôle de cette 7^e isoforme constitue le principal objectif des travaux discutés ici.

1. La séquence protéique de SS6 est informative quant à sa fonction

Le gène codant SS6 a été identifié à partir de sa séquence protéique sur le génome de référence de la pomme de terre. Cependant, il s'est avéré mal annoté. L'annotation de la séquence codante a donc été rectifiée en prenant en compte la séquence protéique observée, l'annotation du gène orthologue chez la tomate, ainsi que la présence des motifs d'épissage présent au début et à la fin de chaque exon. La séquence codante résultant de cette ré-annotation a ensuite été utilisée dans la suite des travaux.

La structure de la protéine a été analysée par recherche de domaines conservés dans la séquence protéique. Les résultats ont montré la présence d'un peptide de transit potentiel, indiquant ainsi un adressage de cette protéine au plaste. Deux motifs glycosyltransférase 5 et 1 sont également présents comme chez toutes les amidon-synthases à l'exception de SS5 qui est majoritairement impliquée dans l'initiation du grain d'amidon (Abt et al., 2020). Ces deux domaines contiennent, comme chez SS4, respectivement un motif KVGGL et KTGGL. Ces domaines indiquent donc une activité enzymatique potentielle de la protéine. Cependant, aucun domaine de liaison à l'amidon n'a été identifié dans la séquence de SS6 contrairement à celle de SS3 où ce domaine est impliqué dans la liaison de l'enzyme à son substrat (Wayllace et al., 2010). Il en va de même pour les domaines organisés en « coiled-coil » alors que ceux-ci sont présents dans la séquence de SS2, SS3, SS4 et SS5. Ces domaines sont souvent impliqués dans des interactions avec d'autres protéines comme c'est le cas pour SS5 (Abt et al., 2020). La structure de SS6 indique donc une fonction probable de synthèse d'amidon dans les plastes, cependant aucune

hypothèse ne peut être privilégiée quant à d'éventuelles régulations du métabolisme de l'amidon.

Une analyse phylogénétique a été réalisée à partir de la séquence protéique de StSS6. Une recherche non-exhaustive de protéines similaires a été réalisée chez les grandes classes de plantes. Cette analyse a montré la présence de SS6 chez un grand nombre d'espèces dont certaines très éloignées de la pomme de terre. Ainsi, la micro-algue *C.reinhardtii*, des gymnospermes et des dicotylédones présentent une isoforme SS6. À l'inverse, cette isoforme s'est avérée absente chez les monocotylédones, les brassicacées et la mousse *P.patens*, indiquant la perte de cette isoforme au cours de l'évolution de ces plantes. La disparition de cette isoforme pourrait être liée à des réarrangements chromosomiques à l'origine de la création de ces espèces. En effet, l'émergence des monocotylédones et des brassicacées a eu lieu suite à des événements de polyploïdisation (Kagale et al., 2014; Tang et al., 2010). Ces événements ont dû être suivis de remaniements chromosomiques importants, les gènes codants SS6 ont ainsi pu être inactivés ou pseudogenisés et la fonction remplie par cette enzyme remplacée par une autre isoforme d'amidon-synthase néo-fonctionnalisée.

Cependant, la persistance de cette isoforme chez la grande partie des dicotylédones analysées indique une fonction donnant un avantage évolutif à la plante.

2. La protéine SS6 recombinante est active *in vitro*

La protéine SS6, dépourvue de son peptide de transit, a été produite de manière recombinante chez *E.coli*. Bien que majoritairement insoluble dans les extraits protéiques de la bactérie, la protéine a pu être purifiée sous sa forme soluble. Son activité enzymatique a ensuite été mise en évidence sur un gel contenant du glycogène. Après migration dans ce gel en condition native, celui-ci a été incubé sur la nuit en présence d'ADPGlc dans des conditions déjà publiées pour l'étude de l'activité *in vitro* d'amidon-synthases (Delvallé et al., 2005). Le zymogramme obtenu a mis en évidence deux bandes d'activité présentant des colorations différentes, et correspondant à des activités d'élongation. La présence de ces deux bandes pourrait être due à des conformations différentes de l'enzyme purifiée, comme la formation de dimères ou encore la présence de modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations, pouvant modifier l'affinité de l'enzyme au substrat. Afin de caractériser plus finement l'activité de SS6, le produit d'incubation de celle-ci en présence de glycogène et d'ADPGlc a été analysé par

séparation des chaînes après hydrolyse des points de branchements. Le résultat de cette analyse a montré que SS6 allonge les chaînes les plus courtes, de DP2 à DP5.

3. SS6 est localisée dans le stroma des plastes

Des plantes ont été transformées génétiquement en vue d'exprimer une protéine SS6 fluorescente et ainsi d'en déduire la localisation de la protéine native. Toutes les plantes transformées n'ont pas montré le même niveau d'accumulation de la protéine de fusion, certains échantillons analysés ne montrant que peu ou pas de fluorescence. Un phénomène de « silencing » est probablement à l'origine de cette faible accumulation chez certaines plantes. Cependant, la majorité des plantes ont montré l'accumulation de SS6::GFP. De manière attendue, cette accumulation s'est faite dans un seul compartiment cellulaire : l'amyloplaste. Cette localisation confirme la présence d'un peptide de transit dans la séquence protéique de SS6 ainsi que son implication probable dans le métabolisme de l'amidon. L'accumulation de la protéine s'est avérée diffuse dans le stroma, la protéine entourant les grains, contrairement à d'autres amidon-synthases comme SS4 qui présentent une distribution sous forme de « spots » dans les chloroplastes (Gámez-Arjona et al., 2014). Cependant, la nature du promoteur contrôlant l'expression de SS6::GFP pourrait masquer une distribution restreinte dans l'espace. En effet, la surexpression de la protéine pourrait empêcher sa localisation correcte dans l'amyloplaste. L'expression de cette même protéine cette fois-ci sous le contrôle d'un promoteur moins fort comme celui de la GBSS pourrait lever cette réserve.

4. Modulation de l'expression de SS6 et phénotype associé

Nous avons cherché à moduler l'expression de SS6 chez la pomme de terre afin de mettre en avant son effet sur le phénotype de la plante et en particulier sur celui de l'amidon des tubercules. Pour ce faire, la transformation génétique de plantes a été entreprise avec pour objectif l'obtention de plantes n'exprimant plus la protéine et d'autres la surexprimant.

La génération des plantes n'exprimant plus SS6 a fait intervenir l'endonucléase CRISPR/Cas9. Les gènes codant ce complexe ribonucléoprotéique ont été introgressés de manière stable dans le génome de plantes sauvages *via A.tumefaciens*. Chez les plantes transformées, ce complexe induit des cassures double-brin au niveau d'une séquence cible spécialement sélectionnée. Nous avons choisi une cible se situant en début de séquence codante, dans la séquence codant le domaine glycosyltransférase 5 et à proximité du motif

KVGGL. Ce positionnement vise à maximiser les chances d'inactivation de l'enzyme, par l'induction d'une mutation non-synonyme ou à l'expression d'une protéine tronquée. L'ARN guide correspondant à la cible sélectionnée entraîne en théorie une bonne efficacité du complexe Cas9-ARN guide dans la création de cassures double-brin de l'ADN, et à une forte probabilité de mener à un décalage du cadre de lecture. L'absence de variations dans la séquence cible, pouvant diminuer fortement cette efficacité, a été vérifiée grâce aux données produites précédemment. De plus, la spécificité prédite de cet ARN guide est également très bonne. Cette dernière caractéristique a été particulièrement observée dans le choix de la séquence cible, afin de limiter les mutations sur des séquences non désirées qui pourraient avoir des effets sur le phénotype de la plante et interférer avec l'éventuel phénotype induit par la mutation recherchée.

La génération des plantes surexprimant SS6 a, quant à elle, été réalisée par l'introgession stable *via A.tumefaciens* d'un gène comportant la séquence codante de la protéine, sous le contrôle d'un promoteur menant à une expression forte et constitutive.

Les multiples expérimentations de transformations génétiques ont mené à la production d'un grand nombre de plantes. La confirmation de la transformation de ces plantes a été vérifiée par PCR. Une majorité des plantes isolées se sont avérées transformées génétiquement, ce qui valide la méthode de sélection utilisée. Ces plantes ont ensuite fait l'objet d'un génotypage plus précis afin d'identifier les plantes présentant les modifications génétiques recherchées.

a. Les mutants présentent des modifications de l'expression de SS6

Les plantes transformées ayant fait l'objet de mutagenèse dirigée ont été criblées afin d'identifier des plantes susceptibles d'être mutées sur les quatre allèles de SS6. La séquence comprenant la cible a donc été séquencée chez ces plantes. Cependant, le caractère tétraploïde de la pomme de terre rend très difficile d'affirmer avec certitude l'absence d'allèle sauvage chez une plante par séquençage de la zone du génome concernée. Les séquences de SS6 des plantes montrant la plus grande probabilité d'être mutées sur les quatre allèles ont donc été clonées dans des bactéries avant d'être séquencées. Entre 10 et 12 colonies bactériennes ont pu être séquencées pour chaque plante. Ce nombre est suffisant pour espérer séquencer au moins une fois chaque allèle et est comparable à celui d'autres études (Andersson et al., 2017).

Les mutations observées chez les plantes analysées se sont révélées très redondantes entre les plantes. En effet, parmi les plantes analysées, 5 présentent deux délétions de 1 et 2

nucléotides ainsi qu'une insertion d'un nucléotide. L'hypothèse d'une origine clonale de ces plantes est écartée par les conditions expérimentales et le polymorphisme présent sur les allèles sauvages. Ce phénomène a été observé par Butler et al. (2015) dans le cadre de la mutagenèse d'un gène par CRISPR/Cas9 chez la pomme de terre. Les auteurs ont expliqué cette redondance dans le type de mutations induites par la présence de micro-homologies de séquence à proximité de la séquence cible. Il est très probable qu'un phénomène similaire soit à l'origine du type de mutations produites dans notre cas. Un groupe de 7 plantes montrant de manière fiable des mutations induisant un K. O. du gène a donc pu être utilisé dans la suite des analyses.

Les plantes transformées génétiquement et ayant incorporé le gène synthétique visant à la surexpression de SS6 ont fait l'objet d'analyses du niveau d'expression de ce gène. Les ARN messager des feuilles de 7 plantes ont été extraits et quantifiés par analyse RT-qPCR. Le gène de référence sélectionné a montré un niveau d'expression stable chez la pomme de terre dans diverses conditions de stress par Tang et al. (2017). Les analyses ont montré la surexpression de SS6 par un facteur compris entre 3 et 7 selon les plantes à l'exception d'une plante présentant une expression de SS6 13 fois plus importante que chez la plante sauvage. L'étude de Van Harsselaar et al. (2017) n'a pas montré de différence significative dans l'expression de SS6 entre les feuilles et les tubercules. Les plantes ayant montré une surexpression dans les feuilles ont donc été utilisées dans la suite des analyses.

b. Des modifications phénotypiques subtiles de l'amidon de tubercule sont observées chez les plantes mutantes

Les plantes sélectionnées ont été cultivées en terreau afin de produire des tubercules. Deux plantes ont montré un retard de croissance associé pour l'une d'elles à une décoloration partielle des feuilles. Ces phénotypes aberrants ont été associés à des variations somaclonales, celles-ci étant fréquentes dans les expérimentations de transformation génétique. Aucune autre plante transformée n'a montré de retard de croissance ni de variation phénotypique remarquable lors de sa croissance en chambre de culture. L'absence de SS6 chez la plante n'est donc pas délétère dans les conditions testées. Un constat similaire a été fait concernant l'aspect des tubercules produits par ces plantes.

Le phénotype des grains d'amidon de ces tubercules a donc été étudié.

Dans un premier temps, l'amidon de la totalité des tubercules produits a été extrait, « poolé » et analysé pour chaque plante.

Ces analyses ont pu mettre en évidence une légère augmentation de la taille moyenne des grains issus de deux plantes surexprimant SS6 ainsi qu'une forme moins ronde des grains d'amidon chez toutes les plantes surexprimant l'enzyme. Trois de ces plantes ont montré un phénotype plus marqué qui n'a cependant pas pu être mis en lien avec le niveau d'expression de SS6 dans ces plantes. De manière opposée, une augmentation significative de la rondeur a été observée chez trois plantes K. O. pour SS6 sans changement de la taille moyenne des grains d'amidon. Helle et al. (2019) ont montré une corrélation entre la taille des grains d'amidon et leur rondeur, les plus petits grains étant généralement plus ronds. Cette corrélation est uniquement partiellement vérifiée dans les échantillons que nous avons testés.

Cette analyse n'ayant montré que de faibles modifications de la morphologie des grains d'amidon, nous avons émis l'hypothèse d'un biais induit par la méthode d'extraction de l'amidon. En effet, tous les tubercules de chaque plante ont vu leur amidon extrait sans prendre en compte leur stade de développement. Les extraits analysés sont donc constitués de grains provenant de gros tubercules que l'on peut considérer comme étant matures mais aussi de petits tubercules qui sont probablement encore en développement. Or, Woong et al. (2012) ont montré des différences dans l'expression des enzymes du métabolisme de l'amidon, dont SS6, selon le stade de développement du tubercule de pomme de terre.

L'analyse de l'amidon extrait d'un seul tubercule mature pour chaque plante a donc été réalisée afin de pallier au biais potentiellement induit.

Des différences beaucoup plus marquées ont été observées, en particulier chez les plantes surexprimant SS6. En effet, toutes ces plantes ont montré une taille des grains d'amidon significativement plus faible avec une très forte diminution de l'abondance des plus gros grains associée à une rondeur plus importante chez quatre des 6 lignées testées. Ce résultat tend à montrer chez une fonction de SS6 en lien avec la régulation de la taille des grains d'amidon et donc potentiellement dans la régulation de leur nombre. De plus, les deux protéines qui lui sont les plus similaires (en termes de séquence protéique), SS4 et SS5, jouent un rôle dans la régulation du nombre de grains présents dans les chloroplastes d'*A.thaliana* (Abt et al., 2020; Roldán et al., 2007). Cependant, les amidons issus de tubercules de deux plantes K. O. pour SS6 ont également montré une diminution de la taille des grains d'amidon associée pour l'une des deux à une augmentation de la rondeur des grains. Ce résultat semble contredire le premier, mais pourrait être consécutif à une compensation de l'activité de SS6 par une autre enzyme du métabolisme de l'amidon. Le

phénotype de l'amidon des mutants K. O. ne permet donc pas d'identifier clairement le rôle de l'enzyme dans la régulation de la taille des grains d'amidon. Une analyse similaire réalisée à chaque stade de développement du tubercule pourrait cependant s'avérer informative. De plus, cette analyse pourrait être complétée par le dénombrement des grains d'amidon dans les amyloplastés par observation en microscopie électronique.

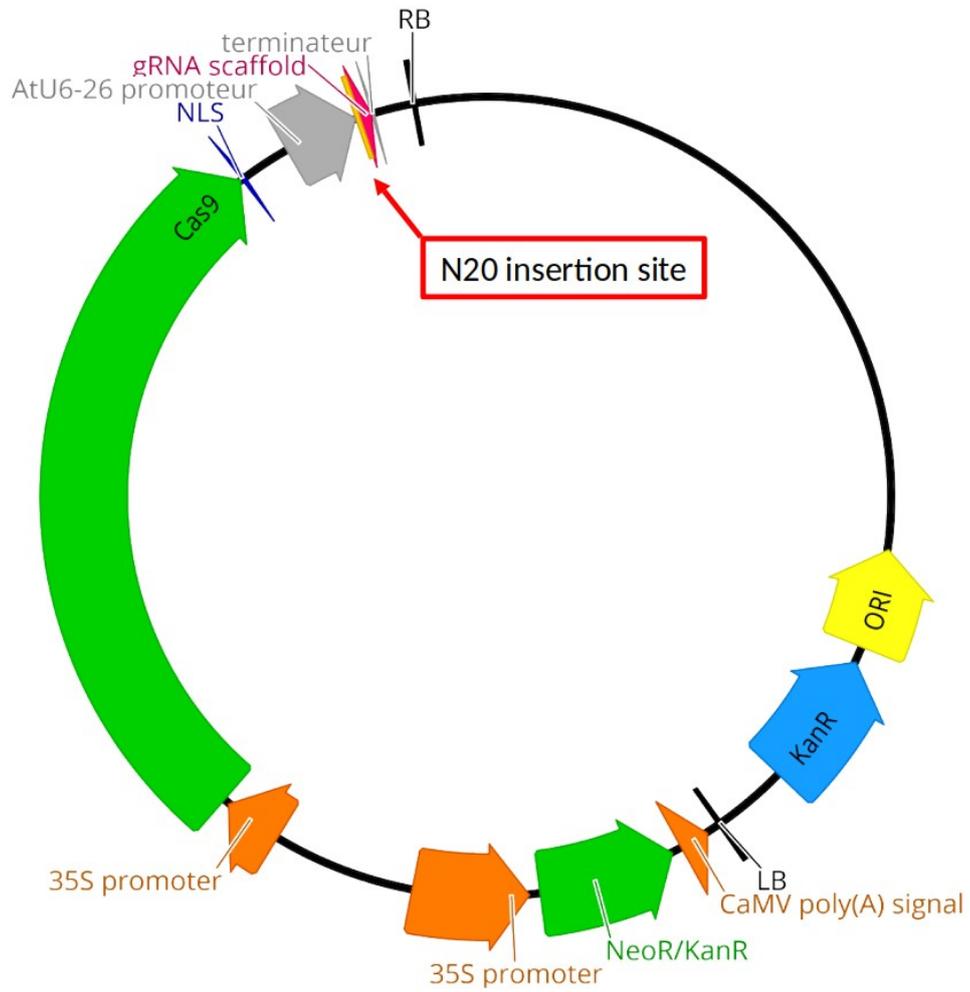
Les modifications de la composition de l'amidon ainsi que de la structure de l'amylopectine ont été analysées afin de mettre en évidence une action plus directe de l'enzyme sur l'amidon. La séparation des deux macromolécules composant l'amidon a donc été réalisée. Les profils de séparation de l'amylose et de l'amylopectine par chromatographie d'exclusion stérique ont montré un léger changement de la longueur d'onde du complexe iode/polysaccharide pour la fraction de séparation la plus concentrée en amylopectine. En effet, certaines plantes mutantes, K. O. et surexprimeurs, ont vu une augmentation de cette longueur d'onde. Ce résultat pourrait indiquer une augmentation de la longueur moyenne des chaînes d'amylopectine. Concernant les plantes surexprimant *SS6*, ce résultat est cohérent avec les observations faites quant à l'activité de la protéine recombinante, celle-ci étant capable d'allonger les chaînes courtes de glycogène. Cependant, celui-ci reste contre intuitif chez les plantes mutantes *ss6*-, qui montre une modification semblable. Des compensations de l'activité de *SS6* par d'autres amidon-synthases pourraient dans ce cas expliquer cette modification.

Les modifications de la structure de l'amylopectine ont été caractérisées plus finement par séparation des chaînes débranchées en électrophorèse capillaire. Malgré la présence de variations entre les plantes K. O., des variations de l'abondance de certaines chaînes se sont révélées fréquentes. Ainsi, une faible diminution des chaînes courtes allant de DP6 à DP15 accompagnée d'une augmentation des chaînes de DP15 et plus a été observée. Cette observation n'est, une fois de plus, pas cohérente avec l'activité de la protéine recombinante observée *in vitro*. Cependant, *SS6* pourrait jouer un rôle de régulateur de l'activité d'autres enzymes du métabolisme de l'amidon et ainsi avoir une action indirecte sur la structure de l'amylopectine. Les modifications observées sur l'abondance des chaînes chez les plantes surexprimant *SS6* sont très différentes selon la lignée considérée mais ne se sont pas corrélées aux niveaux de surexpression. Cependant, toutes ces plantes montrent une diminution de l'abondance des chaînes de DP19-20 qui s'atténue sur les chaînes suivantes. Ces chaînes pourraient être le substrat d'une enzyme dont l'activité est modifiée par la présence plus forte de *SS6*.

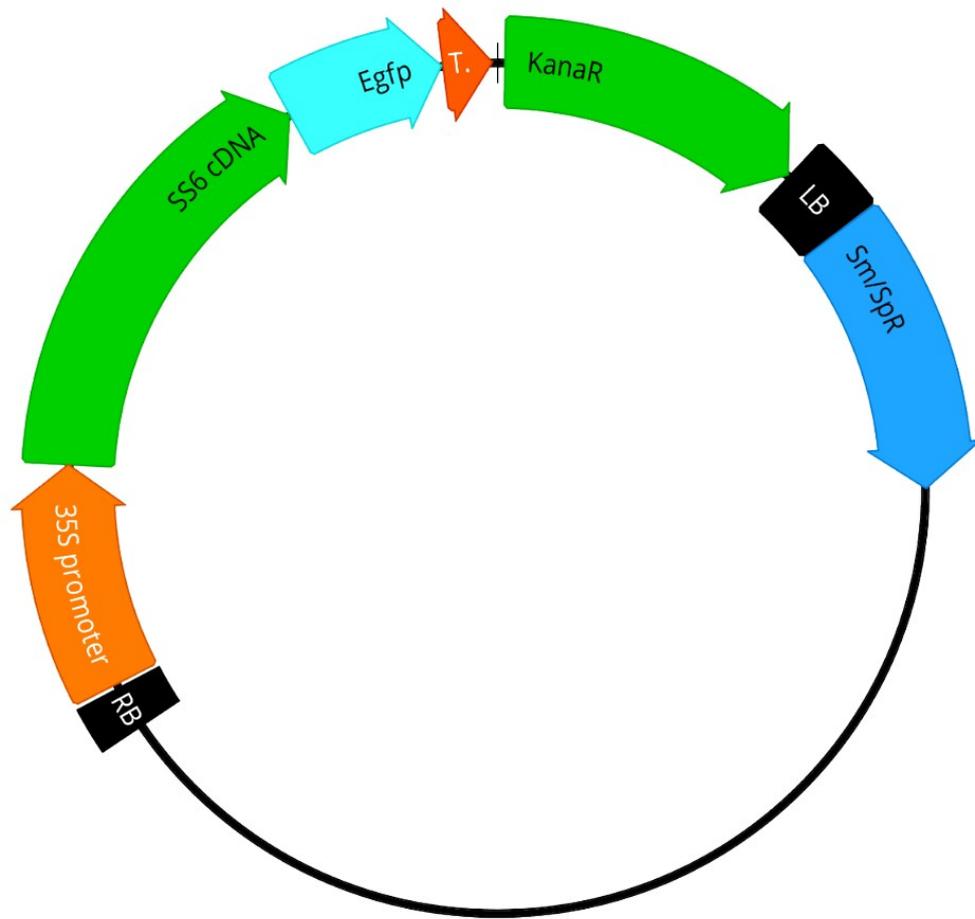
c. SS6 pourrait avoir une fonction majeure dans d'autres organes

La modulation de l'expression de SS6 n'a pas montré de changements conséquents du phénotype de l'amidon. Les légères modifications de la taille des grains d'amidon qui ont cependant été observées pourraient indiquer un rôle dans la régulation de la formation de nouveaux grains dans les plastides des tubercules. De plus, cette nouvelle isoforme d'amidon-synthase pourrait avoir une fonction majeure dans d'autres organes que le tubercule ou encore dans des conditions de stress abiotiques. Des résultats publiés mais n'ayant pas fait l'objet d'une revue semblent montrer que SS6 est l'amidon-synthase la plus exprimée dans les racines chez le manioc (Zhang, 2020). Les auteurs ont également observé une augmentation de la taille des grains d'amidons produits chez des plantes dont l'expression de SS6 est réduite par RNAi, en particulier par l'augmentation de l'abondance de gros grains. Ce résultat conforte l'observation que nous avons faite concernant la diminution du nombre de gros grains chez les plantes surexprimant SS6. Il serait donc très intéressant de confirmer la forte expression de SS6 dans les racines chez la pomme de terre, d'observer le phénotype de l'amidon qui y est accumulé et en particulier le nombre de grains d'amidon présent dans les amyloplastes. Dans cet organe, SS6 pourrait être impliquée dans la perception de la gravité en influant sur le métabolisme de l'amidon des cellules de la columelle (Weise and Kiss, 1999).

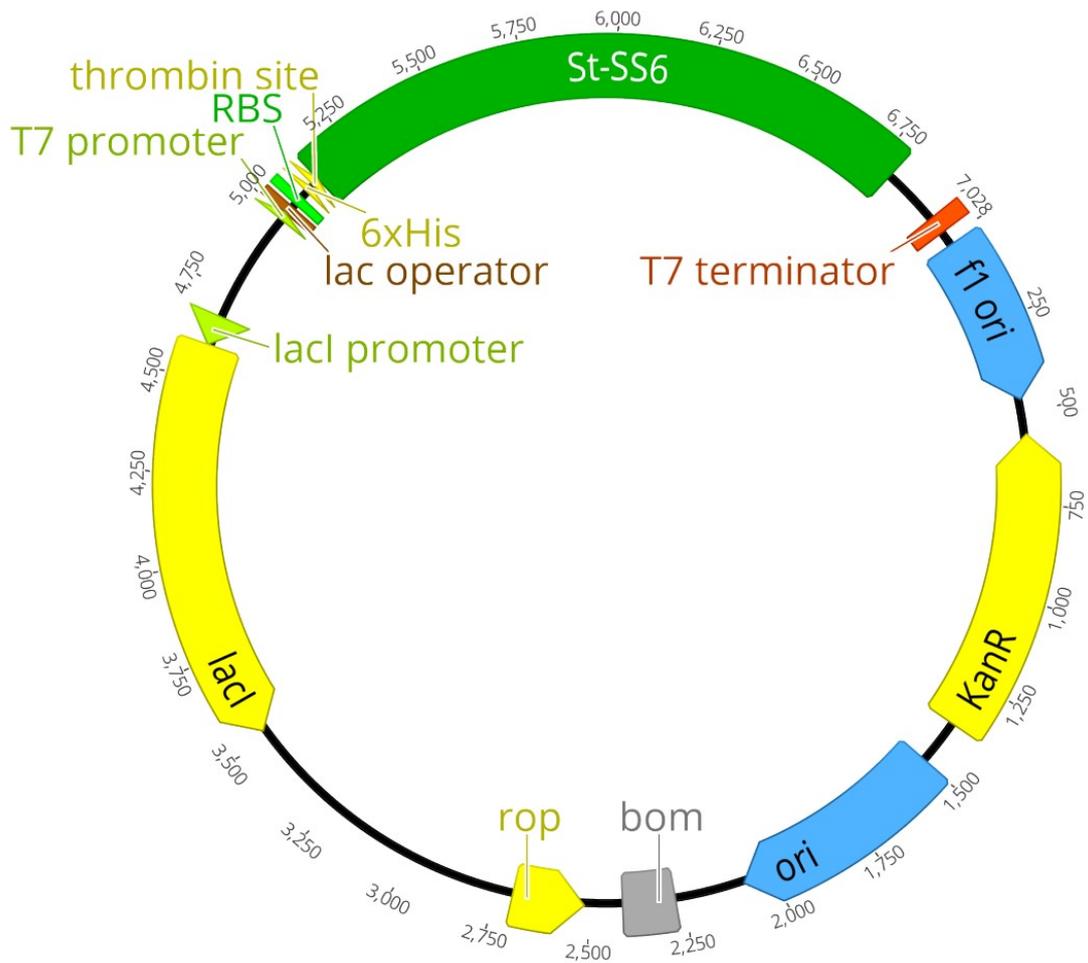
Annexes



Annexe 1: Carte du vecteur pDIRECT_22A utilisé dans la mutagenèse dirigée du gène *StSS6*.



Annexe 2: Carte du vecteur pK7FWG2 utilisé dans pour les transformations génétiques de surexpressions de SS6 et d'expression de SS6::GFP.



*Annexe 3: Carte du vecteur pET28a(+)
utilisé pour la production de la protéine SS6
recombinante.*

N° Acession	Description
ACL36485	starch synthase VI precursor [Picea glauca]
AHA44516	starch synthase VI precursor [Larix kaempferi]
CBI24047	unnamedProtein duct partial [Vitis vinifera]
CDP14243	unnamedProtein duct [Coffea canephora]
ERN12576	hypothetical Protein AMTR_s00025p00214840 [Amborella trichopoda]
ESR66397	hypothetical Protein CICLE_v10007868mg [Citrus clementina]
EXB58676	gly glycogen synthase [Morus notabilis]
EYU25772	hypothetical Protein MIMGU_mgv1a020828mg [Eryanthe guttata]
GAV91110	cos_transf_1 domain-containingProtein/co_transf_5 domain-containingProtein [Cephalotus follicularis]
GAY37346	hypothetical Protein CUMW_028340 [Citrus unshiu]
KCW80781	hypothetical Protein EUGRSUZ_C02159 [Eucalyptus grandis]
KNA07060	hypothetical Protein SOVF_175410 [Spinacia oleracea]
KVH93685	hypothetical Protein Ccdr_004260 partial [Cynara cardunculus var. scolymus]
KZM92185	putative starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic-like [Daucus carota subsp. sativus]
KZV26815	putative starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic-like [Dorcoceras hygroricum]
NP_001234387	starch synthase VI [Solanum lycopersicum]
NP_001268021	starch synthase VI [Vitis vinifera]
ONI01533	hypothetical Protein PRUPE_6G144700 [Prunus persica]
ONI01534	hypothetical Protein PRUPE_6G144700 [Prunus persica]
OWM86872	hypothetical Protein CDL15_Pgr015908 [Punica granatum]
PIN02883	Starch synthase [Handroanthus impetiginosus]
PKI34602	hypothetical Protein CRG98_044996 [Punica granatum]
PNS94476	hypothetical Protein POPTR_018G149500v3 [Populus trichocarpa]
POE83885	putative starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Quercus suber]
POE83886	putative starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Quercus suber]
POE83888	putative starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Quercus suber]
XP_004296633	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Fragaria vesca subsp. vesca]
XP_006353746	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X1 [Solanum tuberosum]
XP_006372249	hypothetical Protein POPTR_0018s14640g [Populus trichocarpa]
XP_006474352	PREDICTED: glycogen synthase-like [Citrus sinensis]
XP_007208471	uncharacterizedProtein LOC18773945 isoform X2 [Prunus persica]
XP_008230278	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X1 [Prunus mume]
XP_008230284	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X2 [Prunus mume]
XP_009345336	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC103937152 isoform X1 [Pyrus x bretschneideri]
XP_009345337	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC103937152 isoform X2 [Pyrus x bretschneideri]
XP_009620144	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104112024 isoform X1 [Nicotiana tomentosiformis]
XP_009620150	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104112024 isoform X2 [Nicotiana tomentosiformis]
XP_009787229	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X1 [Nicotiana sylvestris]
XP_009787230	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X2 [Nicotiana sylvestris]
XP_010048513	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104437291 isoform X1 [Eucalyptus grandis]
XP_010048514	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104437291 isoform X2 [Eucalyptus grandis]
XP_010278489	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104612665 isoform X1 [Nelumbo nucifera]
XP_010323593	PREDICTED: starch synthase VI isoform X1 [Solanum lycopersicum]
XP_010656687	PREDICTED: starch synthase VI isoform X1 [Vitis vinifera]
XP_010656688	PREDICTED: starch synthase VI isoform X2 [Vitis vinifera]
XP_010669623	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104886802 isoform X1 [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
XP_010669624	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104886802 isoform X2 [Beta vulgaris subsp. vulgaris]
XP_011014595	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X1 [Populus euphratica]
XP_011014596	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X2 [Populus euphratica]
XP_011017584	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Populus euphratica]

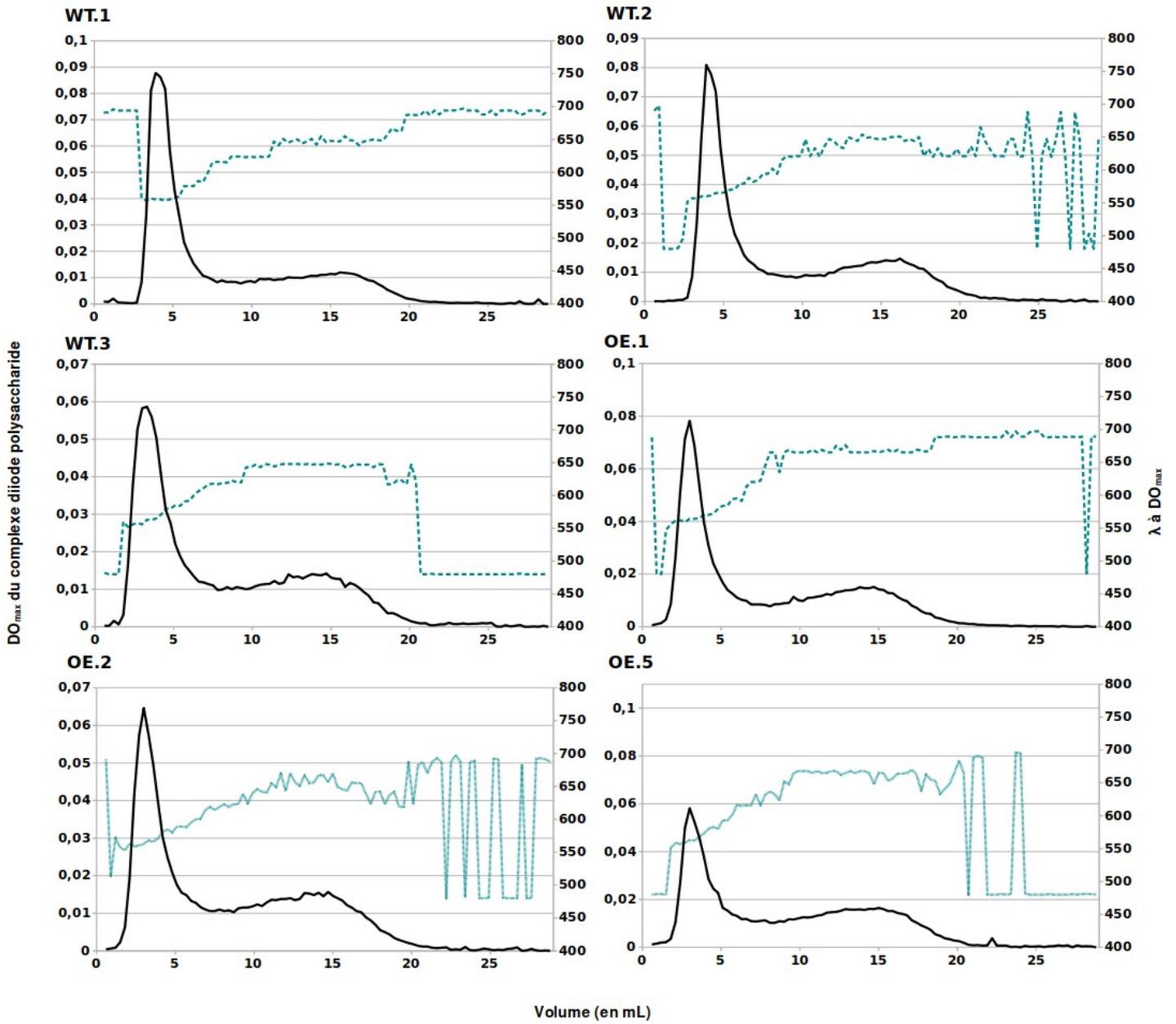
Annexe 4: Liste des accessions utilisées pour la construction du cladogramme des protéines similaires à SS6 (1/2)

N° Acession	Description
XP_011017584	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Populus euphratica]
XP_011093938	uncharacterizedProtein LOC105173754 isoform X1 [Sesamum indicum]
XP_011093939	uncharacterizedProtein LOC105173754 isoform X2 [Sesamum indicum]
XP_012082476	uncharacterizedProtein LOC105642270 isoform X3 [Jatropha curcas]
XP_012082557	uncharacterizedProtein LOC105642270 isoform X4 [Jatropha curcas]
XP_012851079	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic partial [Eryranthe guttata]
XP_015082242	PREDICTED: glycogen synthase-like [Solanum pennellii]
XP_015166940	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X2 [Solanum tuberosum]
XP_015881763	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X1 [Ziziphus jujuba]
XP_015881764	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X2 [Ziziphus jujuba]
XP_016433871	PREDICTED: glycogen synthase-like [Nicotiana tabacum]
XP_017257960	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X1 [Daucus carota subsp. sativus]
XP_017257962	PREDICTED: glycogen synthase-like isoform X2 [Daucus carota subsp. sativus]
XP_018631691	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104112024 isoform X3 [Nicotiana tomentosiformis]
XP_018726474	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104437291 isoform X3 [Eucalyptus grandis]
XP_018726475	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC104437291 isoform X4 [Eucalyptus grandis]
XP_018833558	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC109000940 [Juglans regia]
XP_019174918	PREDICTED: probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic [Ipomoea nil]
XP_019249226	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC109228554 isoform X1 [Nicotiana attenuata]
XP_019249227	PREDICTED: uncharacterizedProtein LOC109228554 isoform X2 [Nicotiana attenuata]
XP_020422310	uncharacterizedProtein LOC18773945 isoform X1 [Prunus persica]
XP_020527023	uncharacterizedProtein LOC18440794 [Amborella trichopoda]
XP_020537842	uncharacterizedProtein LOC105642270 isoform X1 [Jatropha curcas]
XP_020537864	uncharacterizedProtein LOC105642270 isoform X2 [Jatropha curcas]
XP_021604565	uncharacterizedProtein LOC110609353 isoform X1 [Manihot esculenta]
XP_021604567	uncharacterizedProtein LOC110609353 isoform X2 [Manihot esculenta]
XP_021683252	glycogen synthase-like isoform X1 [Hevea brasiliensis]
XP_021683255	glycogen synthase-like isoform X4 [Hevea brasiliensis]
XP_021683256	glycogen synthase-like isoform X5 [Hevea brasiliensis]
XP_021683257	glycogen synthase-like isoform X6 [Hevea brasiliensis]
XP_021683259	probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X8 [Hevea brasiliensis]
XP_021715851	uncharacterizedProtein LOC110683757 [Chenopodium quinoa]
XP_021744112	uncharacterizedProtein LOC110710157 [Chenopodium quinoa]
XP_021817904	uncharacterizedProtein LOC110760037 isoform X1 [Prunus avium]
XP_021817905	uncharacterizedProtein LOC110760037 isoform X2 [Prunus avium]
XP_021838164	uncharacterizedProtein LOC110777890 [Spinacia oleracea]
XP_021989684	uncharacterizedProtein LOC110886217 [Helianthus annuus]
XP_022850830	glycogen synthase-like isoform X1 [Olea europaea var. sylvestris]
XP_022850831	glycogen synthase-like isoform X2 [Olea europaea var. sylvestris]
XP_022850832	probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X3 [Olea europaea var. sylvestris]
XP_023737101	glycogen synthase-like isoform X1 [Lactuca sativa]
XP_023737102	probable starch synthase 4 chloroplastic/amyloplastic isoform X2 [Lactuca sativa]
XP_023874061	uncharacterizedProtein LOC111986618 isoform X1 [Quercus suber]
XP_023874063	uncharacterizedProtein LOC111986618 isoform X2 [Quercus suber]
XP_023874064	uncharacterizedProtein LOC111986619 [Quercus suber]
XP_024020588	uncharacterizedProtein LOC21387448 isoform X1 [Morus notabilis]
XP_024020589	uncharacterizedProtein LOC21387448 isoform X2 [Morus notabilis]
XP_024020590	uncharacterizedProtein LOC21387448 isoform X3 [Morus notabilis]
XP_024048107	glycogen synthase isoform X1 [Citrus clementina]
XP_024192371	uncharacterizedProtein LOC112196289 isoform X1 [Rosa chinensis]
XP_024192372	uncharacterizedProtein LOC112196289 isoform X2 [Rosa chinensis]

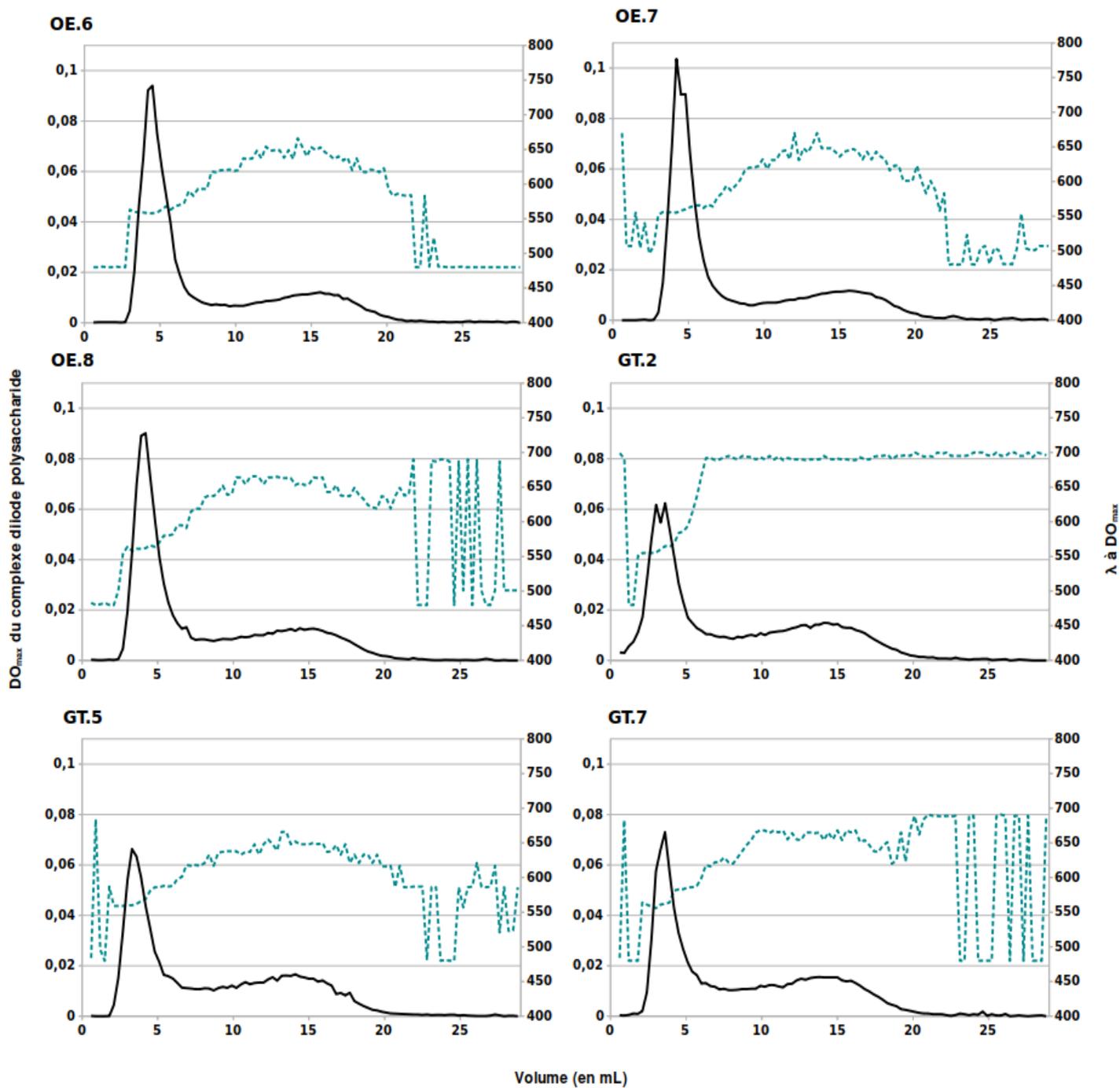
Annexe 5: Liste des accessions utilisées pour la construction du cladogramme des protéines similaires à SS6(2/2)

Nom	Séquence
Cas9-F	CGCATCTCTCGGAACCTACC
Cas9-R	GTCCTCCCCTCTCAGCCTTA
GFP-F	AAGTTCATCTGCACCACCGG
GFP-R	AAGTATCACTGGAACGCCCG
SS6-GT-F	TTCGGGCGTTCCAGTGATAC
SS6-GT-R	TATGGTGTGCAACGGTCTCC

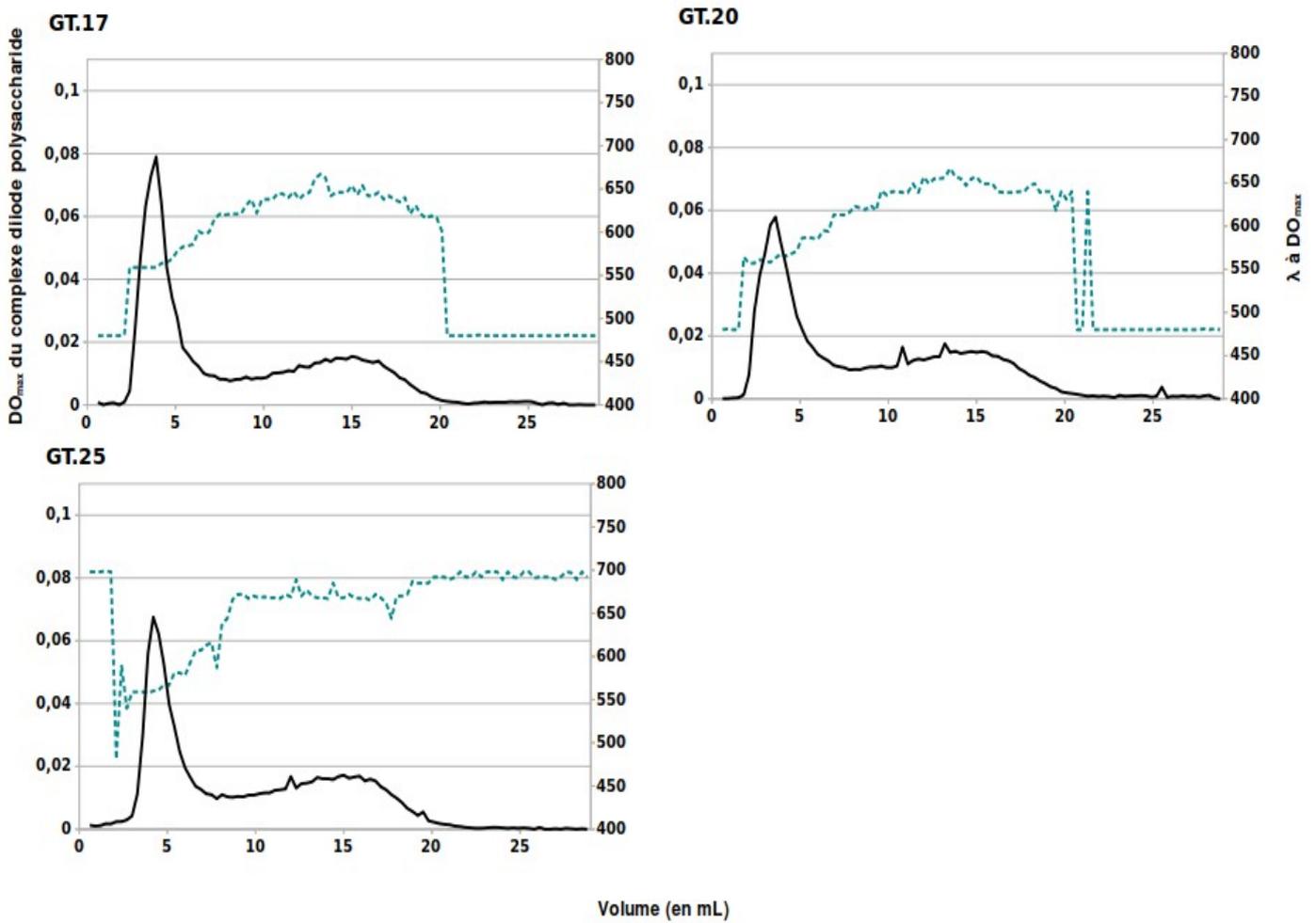
*Annexe 6: Tableau des amorces utilisées pour les amplifications
PCR*



Annexe 7: Chromatographies d'exclusion stériques d'amidon de plantes sauvages, surexprimeur ou K.O. pour le gène SS6 (1/3)



Annexe 8: Chromatographies d'exclusion stérique d'amidon de plantes sauvages, surexprimeur ou K.O. pour le gène SS6 (2/3)



Annexe 9: Chromatographies d'exclusion stérique d'amidon de plantes sauvages, surexprimeur ou K.O. pour le gène SS6 (3/3)

Références bibliographiques

- Abt, M., Pfister, B., Sharma, M., Eicke, S., Bürgy, L., Neale, I., Seung, D., and Zeeman, S.C.** (2020). STARCH SYNTHASE 5, a Noncanonical Starch Synthase-Like Protein, Promotes Starch Granule Initiation in Arabidopsis. *Plant Cell*: tpc.00946.2019.
- Abt, M.R. and Zeeman, S.C.** (2020). Evolutionary innovations in starch metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **55**: 109–117.
- Ahmed, Z., Tetlow, I.J., Ahmed, R., Morell, M.K., and Emes, M.J.** (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 Sci.* **233**: 95–106.
- Alva, L.** (2004). Potato Nitrogen Management. *J. Veg. Crop Prod.* **10**: 97–132.
- Andersson, M., Melander, M., Pojmark, P., Larsson, H., Bülow, L., and Hofvander, P.** (2006). Targeted gene suppression by RNA interference: An efficient method for production of high-amylose potato lines. *J. Biotechnol.* **123**: 137–148.
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., F??lt, A.S., Samuelsson, M., and Hofvander, P.** (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* **36**: 117–128.
- Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.-S., Ohlsson, P., Gonzalez, M.N., Samuelsson, M., and Hofvander, P.** (2018). Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plant.* **164**: 378–384.
- Asatsuma, S., Sawada, C., Itoh, K., Okito, M., Kitajima, A., and Mitsui, T.** (2005). Involvement of α -amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **46**: 858–869.
- 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.
- Ball, S., Guan, H., James, M., Myers, A., Keeling, P., Mouille, G., Buléon, A., Colonna, P., and Preiss, J.** (1996). From Glycogen to Amylopectin: A Model for the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Cell* **86**: 349–352.
- Ball, S.G. and Morell, M.K.** (2003). FROM BACTERIAL GLYCOGEN TO STARCH: Understanding the Biogenesis of the Plant Starch Granule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 207–233.
- Ballicora, M.A., Frueauf, J.B., Fu, Y., Schurmann, P., and Preiss, J.** (2000). Activation of the Potato Tuber ADP-glucose Pyrophosphorylase by Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **275**: 1315–1320.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A., and Preiss, J.** (2004). ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis. *Photosynth. Res.* **79**: 1–24.
- Barrell, P.J., Meiyalaghan, S., Jacobs, J.M.E., and Conner, A.J.** (2013). Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. *Plant Biotechnol. J.* **11**: 907–920.

- Bertoft, E.** (2007). Composition of building blocks in clusters from potato amylopectin. *Carbohydr. Polym.* **70**: 123–136.
- Bertoft, E.** (2017). Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy* **7**: 56.
- Bhaskar, P.B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ané, J.-M., and Jiang, J.** (2009). Agrobacterium-Mediated Transient Gene Expression and Silencing: A Rapid Tool for Functional Gene Assay in Potato. *PLoS One* **4**: e5812.
- Blennow, A., Nielsen, T.H., Baunsgaard, L., Mikkelsen, R., and Engelsen, S.B.** (2002). Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci.* **7**: 445–450.
- Bogdanove, A.J., Schornack, S., and Lahaye, T.** (2010). TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 394–401.
- Braun, D.M., Wang, L., and Ruan, Y.L.** (2014). Understanding and manipulating sucrose phloem loading, unloading, metabolism, and signalling to enhance crop yield and food security. *J. Exp. Bot.* **65**: 1713–1735.
- Brummell, D.A., Watson, L.M., Zhou, J., McKenzie, M.J., Hallett, I.C., Simmons, L., Carpenter, M., and Timmerman-Vaughan, G.M.** (2015). Overexpression of STARCH BRANCHING ENZYME II increases short-chain branching of amylopectin and alters the physicochemical properties of starch from potato tuber. *BMC Biotechnol.* **15**: 1–14.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S.** (1998). Starch granules: Structure and biosynthesis. *Int. J. Biol. Macromol.* **23**: 85–112.
- Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J., and Ball, S.** (1997). Starches from A to C: *Chlamydomonas reinhardtii* as a model microbial system to investigate the biosynthesis of the plant amylopectin crystal. *Plant Physiol.* **115**: 949–957.
- Burlingame, B., Mouillé, B., and Charrondière, R.** (2009). Nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *J. Food Compos. Anal.* **22**: 494–502.
- Buschiazzo, A., Ugalde, J.E., Guerin, M.E., Shepard, W., Ugalde, R.A., and Alzari, P.M.** (2004). Crystal structure of glycogen synthase: homologous enzymes catalyze glycogen synthesis and degradation. *EMBO J.* **23**: 3196–3205.
- Bustos, R., Fahy, B., Hylton, C.M., Seale, R., Nebane, N.M., Edwards, A., Martin, C., and Smith, A.M.** (2004). Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 2215–2220.
- Butler, N.M., Atkins, P.A., Voytas, D.F., and Douches, D.S.** (2015). Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) Using the CRISPR/Cas System. *PLoS One* **10**: 1–12.
- Butler, N.M., Baltes, N.J., Voytas, D.F., and Douches, D.S.** (2016). Geminivirus-Mediated Genome Editing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Using Sequence-Specific Nucleases. *Front. Plant Sci.* **7**: 1–13.
- Cai, C. and Wei, C.** (2013). In situ observation of crystallinity disruption patterns during starch gelatinization. *Carbohydr. Polym.* **92**: 469–478.

- Camadro, E.L., Erazzú, L.E., Maune, J.F., and Bedogni, M.C.** (2012). A genetic approach to the species problem in wild potato. *Plant Biol.* **14**: 543–554.
- Caspar, T. and Pickard, B.G.** (1989). Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*. *Planta* **177**: 185–197.
- Čermák, T., Curtin, S.J., Gil-Humanes, J., Čegan, R., Kono, T.J.Y., Konečná, E., Belanto, J.J., Starker, C.G., Mathre, J.W., Greenstein, R.L., and Voytas, D.F.** (2017). A Multipurpose Toolkit to Enable Advanced Genome Engineering in Plants. *Plant Cell* **29**: 1196–1217.
- Chatterjee, M., Berbezy, P., Vyas, D., Coates, S., and Barsby, T.** (2005). Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in *Arabidopsis* leaves. *Plant Sci.* **168**: 501–509.
- Cheng, J. et al.** (2012). Diversification of genes encoding granule-bound starch synthase in monocots and dicots is marked by multiple genome-wide duplication events. *PLoS One* **7**.
- Clasen, B.M. et al.** (2016). Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.* **14**: 169–176.
- Commuri, P.D. and Keeling, P.L.** (2001). Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: studies of glucan affinity and catalytic properties. *Plant J.* **25**: 475–486.
- Condori, B., Hijmans, R.J., Quiroz, R., and Ledent, J.-F.** (2010). Quantifying the expression of potato genetic diversity in the high Andes through growth analysis and modeling. *F. Crop. Res.* **119**: 135–144.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., and Smith, S.M.** (2001a). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**: 89–100.
- Critchley, J.H., Zeeman, S.C., Takaha, T., Smith, A.M., and Smith, S.M.** (2001b). A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**: 89–100.
- Crofts, N., Abe, N., Oitome, N.F., Matsushima, R., Hayashi, M., Tetlow, I.J., Emes, M.J., Nakamura, Y., and Fujita, N.** (2015). Amylopectin biosynthetic enzymes from developing rice seed form enzymatically active protein complexes. *J. Exp. Bot.* **66**: 4469–4482.
- Crumpton-Taylor, M., Grandison, S., Png, K.M.Y., Bushby, A.J., and Smith, A.M.** (2012). Control of Starch Granule Numbers in *Arabidopsis* Chloroplasts. *Plant Physiol.* **158**: 905–916.
- Crumpton-Taylor, M., Pike, M., Lu, K.J., Hylton, C.M., Feil, R., Eicke, S., Lunn, J.E., Zeeman, S.C., and Smith, A.M.** (2013). Starch synthase 4 is essential for coordination of starch granule formation with chloroplast division during *Arabidopsis* leaf expansion. *New Phytol.* **200**: 1064–1075.
- Das, A., Panitz, F., Gregersen, V.R., Bendixen, C., and Holm, L.E.** (2015). Deep sequencing of Danish Holstein dairy cattle for variant detection and insight into potential loss-of-function variants in protein coding genes. *BMC Genomics* **16**: 1–12.
- Dauvillée, D. et al.** (2006). Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* **48**: 274–285.

- Delatte, T., Trevisan, M., Parker, M.L., and Zeeman, S.C.** (2005). Arabidopsis mutants Atisa1 and Atisa2 have identical phenotypes and lack the same multimeric isoamylase, which influences the branch point distribution of amylopectin during starch synthesis. *Plant J.* **41**: 815–830.
- Delatte, T., Umhang, M., Trevisan, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, S.M., and Zeeman, S.C.** (2006). Evidence for Distinct Mechanisms of Starch Granule Breakdown in Plants. *J. Biol. Chem.* **281**: 12050–12059.
- Delvallé, D., Dumez, S., Wattebled, F., Roldán, I., Planchot, V., Berbezy, P., Colonna, P., Vyas, D., Chatterjee, M., Ball, S., Mérida, Á., and D'Hulst, C.** (2005). Soluble starch synthase I: a major determinant for the synthesis of amylopectin in Arabidopsis thaliana leaves. *Plant J.* **43**: 398–412.
- Denyer, K., Clarke, B., Hylton, C., Tatge, H., and Smith, A.M.** (1996). The elongation of amylose and amylopectin chains in isolated starch granules. *Plant J.* **10**: 1135–1143.
- Doench, J.G. et al.** (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**: 184–191.
- Dumez, S., Wattebled, F., Dauvillee, D., Delvalle, D., Planchot, V., Ball, S.G., and 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., and Martin, C.** (1999a). Specificity of starch synthase isoforms from potato. *Eur. J. Biochem.* **266**: 724–736.
- Edwards, A., Fulton, D.C., Hylton, C.M., Jobling, S.A., Gidley, M., Rossner, U., Martin, C., Smith, A.M., Rössner, U., Martin, C., and Smith, A.M.** (1999b). A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *Plant J.* **17**: 251–261.
- Edwards, A., Marshall, J., Sidebottom, C., Visser, R.G.F., Smith, A.M., and Martin, C.** (1995). Biochemical and molecular characterization of a novel starch synthase from potato tubers. *Plant J.* **8**: 283–294.
- Ellis, R.P., Cochrane, M.P., Dale, M.F.B., Duffus, C.M., Lynn, A., Morrison, I.M., Prentice, R.D.M., Swanston, J.S., and Tiller, S.** (1998). Starch production and industrial use. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 289–311.
- Enciso-Rodriguez, F., Manrique-Carpintero, N.C., Nadakuduti, S.S., Buell, C.R., Zarka, D., and Douches, D.** (2019). Overcoming Self-Incompatibility in Diploid Potato Using CRISPR-Cas9. *Front. Plant Sci.* **10**.
- Facon, M., Lin, Q., Azzaz, A.M., Hennen-Bierwagen, T.A., Myers, A.M., Putaux, J.L., Roussel, X., D'Hulst, C., and Wattebled, F.** (2013). Distinct functional properties of Isoamylase-type starch debranching enzymes in monocot and dicot leaves. *Plant Physiol.* **163**: 1363–1375.
- FAO, F. and A.O. of the U.N.** (2018). FAOSTAT Database.
- Ferreira, S.J., Senning, M., Fischer-Stettler, M., Streb, S., Ast, M., Neuhaus, H.E., Zeeman, S.C., Sonnewald, S., and 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**: 1–21.

- Fu, Y., Sander, J.D., Reyon, D., Cascio, V.M., and Joung, J.K.** (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**: 279–284.
- Fujita, N., Yoshida, M., Asakura, N., Ohdan, T., Miyao, A., Hirochika, H., and Nakamura, Y.** (2006). Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.* **140**: 1070–1084.
- Fulton, D.C. et al.** (2008). β -Amylase4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* **20**: 1040–1058.
- Fulton, D.C., Edwards, A., Pilling, E., Robinson, H.L., Fahy, B., Seale, R., Kato, L., Donald, A.M., Geigenberger, P., Martin, C., and Smith, A.M.** (2002). Role of Granule-bound Starch Synthase in Determination of Amylopectin Structure and Starch Granule Morphology in Potato. *J. Biol. Chem.* **277**: 10834–10841.
- 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.
- 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.
- De García, E. and Martínez, S.** (1995). Somatic Embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée from Stem Nodal Sections. *J. Plant Physiol.* **145**: 526–530.
- Gehre, L., Gorgette, O., Perrinet, S., Prevost, M.C., Ducatez, M., Giebel, A.M., Nelson, D.E., Ball, S.G., and Subtil, A.** (2016). Sequestration of host metabolism by an intracellular pathogen. *Elife* **5**: 1–22.
- González, M.N., Massa, G.A., Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.S., Storani, L., Décima Oneto, C.A., Hofvander, P., and Feingold, S.E.** (2020). Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleoprotein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. *Front. Plant Sci.* **10**: 1–12.
- Hameed, A., Zaidi, S.S.-A., Shakir, S., and Mansoor, S.** (2018). Applications of New Breeding Technologies for Potato Improvement. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–15.
- Han, Y., Sun, F.J., Rosales-Mendoza, S., and Korban, S.S.** (2007). Three orthologs in rice, Arabidopsis, and Populus encoding starch branching enzymes (SBEs) are different from other SBE gene families in plants. *Gene* **401**: 123–130.
- Hannapel, D.J., Sharma, P., Lin, T., and Banerjee, A.K.** (2017). The multiple signals that control tuber formation. *Plant Physiol.* **174**: 845–856.
- Hardigan, M.A., Laimbeer, F.P.E., Newton, L., Crisovan, E., Hamilton, J.P., Vaillancourt, B., Wiegert-Rininger, K., Wood, J.C., Douches, D.S., Farré, E.M., Veilleux, R.E., and Buell, C.R.** (2017). Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**: E9999–E10008.

- Van Harsselaar, J.K., Lorenz, J., Senning, M., Sonnewald, U., and Sonnewald, S.** (2017). Genome-wide analysis of starch metabolism genes in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genomics* **18**: 37.
- Hashida, Y., Hirose, T., Okamura, M., Hibara, K. ichiro, Ohsugi, R., and Aoki, N.** (2016). A reduction of sucrose phosphate synthase (SPS) activity affects sucrose/starch ratio in leaves but does not inhibit normal plant growth in rice. *Plant Sci.* **253**: 40–49.
- Helle, S., Bray, F., Putaux, J.-L., Verbeke, J., Flament, S., Rolando, C., D'Hulst, C., and Szydlowski, N.** (2019). Intra-Sample Heterogeneity of Potato Starch Reveals Fluctuation of Starch-Binding Proteins According to Granule Morphology. *Plants* **8**: 324.
- Helle, S., Bray, F., Verbeke, J., Devassine, S., Courseaux, A., Facon, M., Tokarski, C., Rolando, C., and Szydlowski, N.** (2018). Proteome Analysis of Potato Starch Reveals the Presence of New Starch Metabolic Proteins as Well as Multiple Protease Inhibitors. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–14.
- Hennen-Bierwagen, T.A., Lin, Q., Grimaud, F., Planchot, V., Keeling, P.L., James, M.G., and Myers, A.M.** (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 Physiol.* **149**: 1541–1559.
- Hizukuri, S.** (1986). Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydr. Res.* **147**: 342–347.
- Hizukuri, S. and Takagi, T.** (1984). Estimation of the distribution of molecular weight for amylose by the low-angle laser-light-scattering technique combined with high-performance gel chromatography. *Carbohydr. Res.* **134**: 1–10.
- Hua, D., Ma, M., Ge, G., Suleman, M., and Li, H.** (2020). The role of cyanide-resistant respiration in *Solanum tuberosum* L. against high light stress. *Plant Biol.* **22**: 425–432.
- Hussain, H.** (2003). Three Isoforms of Isoamylase Contribute Different Catalytic Properties for the Debranching of Potato Glucans. *Plant Cell Online* **15**: 133–149.
- Hussain, H., Mant, A., Seale, R., Zeeman, S., Hinchliffe, E., Edwards, A., Hylton, C., Bornemann, S., Smith, A.M., Martin, C., and Bustos, R.** (2003). Three Isoforms of Isoamylase Contribute Different Catalytic Properties for the Debranching of Potato Glucans. *Plant Cell Online* **15**: 133–149.
- Jane, J.-L., Kasemsuwan, T., Leas, S., Zobel, H., and Robyt, J.F.** (1994). Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron Microscopy. *Starch - Stärke* **46**: 121–129.
- Jane, J., Xu, A., Radosavljevic, M., and Seib, P.A.** (1992). Location of amylose in normal starch granules. I. Susceptibility of amylose and amylopectin to cross-linkin reagents. *Cereal Chem.* **69**: 405–409.
- Johansen, I.E., Liu, Y., Jørgensen, B., Bennett, E.P., Andreasson, E., Nielsen, K.L., Blennow, A., and Petersen, B.L.** (2019). High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato. *Sci. Rep.* **9**: 1–7.

- Kagale, S., Robinson, S.J., Nixon, J., Xiao, R., Huebert, T., Condie, J., Kessler, D., Clarke, W.E., Edger, P.P., Links, M.G., Sharpe, A.G., and Parkin, I.A.P.** (2014). Polyploid evolution of the Brassicaceae during the Cenozoic era. *Plant Cell* **26**: 2777–2791.
- Kaplan, F., Sung, D.Y., and Guy, C.L.** (2006). Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiol. Plant.* **126**: 120–128.
- Kärenlampi, S.O. and White, P.J.** (2009). Potato Proteins, Lipids, and Minerals. In *Advances in Potato Chemistry and Technology*, pp. 99–125.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**: 193–195.
- Knutson, C.A.** (2000). Evaluation of variations in amylose–iodine absorbance spectra. *Carbohydr. Polym.* **42**: 65–72.
- Kossmann, J., Abel, G.J.W., Springer, F., Lloyd, J.R., and Willmitzer, L.** (1999). Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.) that is predominantly expressed in leaf tissue. *Planta* **208**: 503–511.
- Kötting, O., 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.
- Kötting, O., Santelia, D., Edner, C., Eicke, S., Marthaler, T., Gentry, M.S., Comparot-Moss, S., Chen, J., Smith, A.M., Steup, M., Ritte, G., and Zeeman, S.C.** (2009). STARCH-EXCESS4 is a laforin-like phosphoglucan phosphatase required for starch degradation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **21**: 334–346.
- Kozlov, S.S., Blennow, A., Krivandin, A. V., and Yuryev, V.P.** (2007). Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines. *Int. J. Biol. Macromol.* **40**: 449–460.
- Kusano, H. et al.** (2018). Establishment of a modified CRISPR/Cas9 system with increased mutagenesis frequency using the translational enhancer dMac3 and multiple guide RNAs in potato. *Sci. Rep.* **8**: 1–9.
- Kusano, H., Onodera, H., Kihira, M., Aoki, H., Matsuzaki, H., and Shimada, H.** (2016). A simple Gateway-assisted construction system of TALEN genes for plant genome editing. *Sci. Rep.* **6**: 1–7.
- 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**: 98.
- Liang, G., Zhang, H., Lou, D., and Yu, D.** (2016). Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci. Rep.* **6**: 1–8.
- Lin, Q., Facon, M., Putaux, J.L., Dinges, J.R., Wattebled, F., D'Hulst, C., Hennen-Bierwagen, T.A., and Myers, A.M.** (2013). Function of isoamylase-type starch debranching enzymes ISA1 and ISA2 in the *Zea mays* leaf. *New Phytol.* **200**: 1009–1021.

- Liu, F., Makhmoudova, A., Lee, E.A., Wait, R., Emes, M.J., and Tetlow, I.J.** (2009). The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *J. Exp. Bot.* **60**: 4423–4440.
- Liu, H., Ding, Y., Zhou, Y., Jin, W., Xie, K., and Chen, L.-L.** (2017). CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol. Plant* **10**: 530–532.
- Liu, H., Yu, G., Wei, B., Wang, Y., Zhang, J., Hu, Y., Liu, Y., Yu, G., Zhang, H., and Huang, Y.** (2015). Identification and Phylogenetic Analysis of a Novel Starch Synthase in Maize. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Lloyd, J.R., Blennow, A., Burhenne, K., and Kossmann, J.** (2004). Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol.* **134**: 1347–1354.
- Lloyd, J.R., Landschütze, V., and Kossmann, J.** (1999). Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopectin. *Biochem. J.* **338**: 515–521.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B.** (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **42**: D490–D495.
- Lorenz, R., Luntzer, D., Hofacker, I.L., Stadler, P.F., and Wolfinger, M.T.** (2015). SHAPE directed RNA folding. *Bioinformatics* **32**: btv523.
- 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.* **176**: 566–581.
- MacNeill, G.J., Mehrpouyan, S., Minow, M.A.A., Patterson, J.A., Tetlow, I.J., and Emes, M.J.** (2017). Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* **68**: 4433–4453.
- Mathur, V., Javid, L., Kulshrestha, S., Mandal, A., and Reddy, A.A.** (2017). World Cultivation of Genetically Modified Crops: Opportunities and Risks. In, pp. 45–87.
- McMaugh, S.J., Thistleton, J.L., Anschaw, E., Luo, J., Konik-Rose, C., Wang, H., Huang, M., Larroque, O., Regina, A., Jobling, S.A., Morell, M.K., and Li, Z.** (2014). Suppression of starch synthase I expression affects the granule morphology and granule size and fine structure of starch in wheat endosperm. *J. Exp. Bot.* **65**: 2189–2201.
- Mikkelsen, R., Baunsgaard, L., and Blennow, A.** (2004). Functional characterization of α -glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem. J.* **377**: 525–532.
- Mishra, B.P., Kumar, R., Mohan, A., and Gill, K.S.** (2017). Conservation and divergence of Starch Synthase III genes of monocots and dicots. *PLoS One* **12**: 1–19.
- Morell, M.K., Samuel, M.S., and O'Shea, M.G.** (1998). Analysis of starch structure using fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. In *Electrophoresis*, pp. 2603–2611.
- Mueller, L.A. et al.** (2005). *Solanaceae Biology and Beyond.pdf.* **138**: 1310–1317.
- Murashige, T.** (1974). Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **25**: 135–166.

- Naeem, M., Tetlow, I.J., and Emes, M.J.** (1997). Starch synthesis in amyloplasts purified from developing potato tubers. *Plant J.* **11**: 1095–1103.
- Nakamura, Y., Utsumi, Y., Sawada, T., Aihara, S., Utsumi, C., Yoshida, M., and Kitamura, S.** (2010). Characterization of the reactions of starch branching enzymes from rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* **51**: 776–794.
- Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H.J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., Sugimoto, Y., Umemoto, N., Saito, K., Muranaka, T., and Mizutani, M.** (2018). Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiol. Biochem.* **131**: 70–77.
- Nazarian-Firouzabadi, F. and Visser, R.G.F.** (2017). Potato starch synthases: Functions and relationships. *Biochem. Biophys. Reports* **10**: 7–16.
- Nicolia, A., Proux-Wéra, E., Åhman, I., Onkokesung, N., Andersson, M., Andreasson, E., and Zhu, L.H.** (2015). Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *J. Biotechnol.* **204**: 17–24.
- Niittyla, T.** (2004). A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves. *Science* (80-.). **303**: 87–89.
- Olsen, K.M. and Wendel, J.F.** (2013). Crop plants as models for understanding plant adaptation and diversification. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Park, Y.J., Nishikawa, T., Matsushima, K., and Nemoto, K.** (2017). Characterization of a new granule-bound starch synthase gene found in amaranth grains (*Amaranthus cruentus* L.). *Mol. Breed.* **37**.
- Pasare, S., Wright, K., Campbell, R., Morris, W., Ducreux, L., Chapman, S., Bramley, P., Fraser, P., Roberts, A., and Taylor, M.** (2013). The sub-cellular localisation of the potato (*Solanum tuberosum* L.) carotenoid biosynthetic enzymes, CrtRb2 and PSY2. *Protoplasma* **250**: 1381–1392.
- Patterson, J.A., Tetlow, I.J., and Emes, M.J.** (2018). Bioinformatic and in vitro Analyses of Arabidopsis Starch Synthase 2 Reveal Post-translational Regulatory Mechanisms. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–15.
- Peat, S., Whelan, W.J., and Thomas, G.J.** (1952). Evidence of multiple branching in waxy maize starch. *J. Chem. Soc.*: 4536–4538.
- Pérez, L. et al.** (2019). CRISPR/Cas9 mutations in the rice Waxy/GBSSI gene induce allele-specific and zygosity-dependent feedback effects on endosperm starch biosynthesis. *Plant Cell Rep.* **38**: 417–433.
- Pérez, S. and Bertoft, E.** (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch - Stärke* **62**: 389–420.
- Pfister, B. and Zeeman, S.C.** (2016). Formation of starch in plant cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**: 2781–2807.
- Pilling, E. and Smith, A.M.** (2003). Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant Physiol.* **132**: 365–371.

- Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R.** (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Report.* **15**: 8–15.
- Priedniece, V., Spalvins, K., Ivanovs, K., Pubule, J., and Blumberga, D.** (2017). Bioproducts from potatoes. A review. *Environ. Clim. Technol.* **21**: 18–27.
- Rennie, E.A., Hansen, S.F., Baidoo, E.E.K., Hadi, M.Z., Keasling, J.D., and Scheller, H.V.** (2012). Three members of the Arabidopsis glycosyltransferase family 8 are xylan glucuronosyltransferases. *Plant Physiol.* **159**: 1408–1417.
- Ritte, G., Heydenreich, M., Mahlow, S., Haebel, S., Kötting, O., and Steup, M.** (2006). Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *FEBS Lett.* **580**: 4872–4876.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A.K.** (2003). Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* **54**: 513–524.
- Roldán, I., Wattedled, F., Mercedes Lucas, M., Delvallé, D., Planchot, V., Jiménez, S., Pérez, R., Ball, S., D'Hulst, C., and Mérida, Á.** (2007). The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of Arabidopsis thaliana suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J.* **49**: 492–504.
- Rongine De Fekete, M.A., Leloir, L.F., and Cardini, C.E.** (1960). Mechanism of starch biosynthesis. *Nature* **187**: 918–919.
- Safford, R., Jobling, S.A., Sidebottom, C.M., Westcott, R.J., Cooke, D., Tober, K.J., Strongitharm, B.H., Russell, A.L., and Gidley, M.J.** (1998). Consequences of antisense RNA inhibition of starch branching enzyme activity on properties of potato starch. *Carbohydr. Polym.* **35**: 155–168.
- Santelia, D., Kötting, O., Seung, D., Schubert, M., Thalmann, M., Bischof, S., Meekins, D.A., Lutz, A., Patron, N., Gentry, M.S., Allain, F.H.T., and Zeeman, S.C.** (2011). The phosphoglucan phosphatase like sex four2 dephosphorylates starch at the C3-position in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 4096–4111.
- Satoh, H. et al.** (2008). Mutation of the plastidial α -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell* **20**: 1833–1849.
- Sawada, T., Nakamura, Y., Ohdan, T., Saitoh, A., Francisco, P.B., Suzuki, E., Fujita, N., Shimonaga, T., Fujiwara, S., Tsuzuki, M., Colleoni, C., and Ball, S.** (2014). Diversity of reaction characteristics of glucan branching enzymes and the fine structure of α -glucan from various sources. *Arch. Biochem. Biophys.* **562**: 9–21.
- Scheidig, A., Fröhlich, A., Schulze, S., Lloyd, J.R., and Kossmann, J.** (2002). Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.* **30**: 581–591.
- Senoura, T., Asao, A., Takashima, Y., Isono, N., Hamada, S., Ito, H., and Matsui, H.** (2007). Enzymatic characterization of starch synthase III from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *FEBS J.* **274**: 4550–4560.

- Seung, D., Boudet, J., Monroe, J., Schreier, T.B., David, L.C., Abt, M., Lu, K.-J., Zanella, M., and Zeeman, S.C.** (2017). Homologs of PROTEIN TARGETING TO STARCH Control Starch Granule Initiation in Arabidopsis Leaves. *Plant Cell* **29**: 1657–1677.
- Seung, D., Lu, K.-J., Stettler, M., Streb, S., and Zeeman, S.C.** (2016). Degradation of Glucan Primers in the Absence of Starch Synthase 4 Disrupts Starch Granule Initiation in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **291**: 20718–20728.
- Seung, D., Schreier, T., Burgy, L., Eicke, S., and Zeeman, S.** (2018). Two plastidial coiled-coil proteins are essential for normal starch granule initiation in Arabidopsis. *Plant Cell*: In press.
- 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**: e1002080.
- Shimomura, S., Nagai, M., and Fukui, T.** (1982). Comparative glucan specificities of two types of spinach leaf phosphorylase. *J. Biochem.* **91**: 703–717.
- Silver, D.M., Kötting, O., and Moorhead, G.B.G.** (2014). Phosphoglucan phosphatase function sheds light on starch degradation. *Trends Plant Sci.* **19**: 471–478.
- Singh, J. and Kaur, L.** (2016). *Advances in Potato Chemistry and Technology* (Elsevier).
- Skryhan, K., Cuesta-Seijo, J.A., Nielsen, M.M., Marri, L., Mellor, S.B., Glaring, M.A., Jensen, P.E., Palcic, M.M., and Blennow, A.** (2015). The Role of Cysteine Residues in Redox Regulation and Protein Stability of Arabidopsis thaliana Starch Synthase 1. *PLoS One* **10**: e0136997.
- Smith, A.M.** (2001). The Biosynthesis of Starch Granules. *Biomacromolecules* **2**: 335–341.
- Smith, A.M. and Zeeman, S.C.** (2020). Starch: A Flexible, Adaptable Carbon Store Coupled to Plant Growth. *Annu. Rev. Plant Biol.* **71**: 1–29.
- Solis-Badillo, E., Agama-Acevedo, E., Tiessen, A., Lopez Valenzuela, J.A., and Bello-Perez, L.A.** (2020). ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Located in the Plastid and Cytosol in the Pulp of Tropical Banana Fruit (*Musa acuminata*). *Plant Foods Hum. Nutr.* **75**: 76–82.
- Sonnewald, U., Basner, A., Greve, B., and Steup, M.** (1995). A second L-type isozyme of potato glucan phosphorylase: cloning, antisense inhibition and expression analysis. *Plant Mol. Biol.* **27**: 567–576.
- Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P., and Trost, P.** (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted β -amylase of arabidopsis. *Plant Physiol.* **141**: 840–850.
- Spooner, D.M. and Knapp, S.** (2013). *Solanum tuberosum*. Solanaceae Source. A Glob. Taxon. Resour. nightshade Fam.
- Spooner, D.M., Ghislain, M., Simon, R., Jansky, S.H., and Gavrilenko, T.** (2014). Systematics, Diversity, Genetics, and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *Bot. Rev.* **80**: 283–383.
- Stitt, M. and Heldt, H.W.** (1981). Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **638**: 1–11.

- Streb, S., Delatte, T., Umhang, M., Eicke, S., Schorderet, M., Reinhardt, D., and Zeeman, S.C.** (2008). Starch granule biosynthesis in *Arabidopsis* is abolished by removal of all debranching enzymes but restored by the subsequent removal of an endoamylase. *Plant Cell* **20**: 3448–3466.
- Streb, S. and Zeeman, S.C.** (2012). Starch Metabolism in *Arabidopsis*. *Arab. B.* **10**: e0160.
- Struik, P.C.** (2007). Above-ground and below-ground plant development. In *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives* (Elsevier), pp. 219–236.
- Subasinghe, R.M., Liu, F., Polack, U.C., Lee, E.A., Emes, M.J., and Tetlow, I.J.** (2014). Multimeric states of starch phosphorylase determine protein-protein interactions with starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *Plant Physiol. Biochem.* **83**: 168–179.
- Szylowski, N. 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.
- Szylowski, N., Ragel, P., Hennen-Bierwagen, T.A., Planchot, V., Myers, A.M., Mérida, A., D’Hulst, C., and Wattedled, F.** (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.
- Tang, H., Bowers, J.E., Wang, X., and Paterson, A.H.** (2010). Angiosperm genome comparisons reveal early polyploidy in the monocot lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 472–477.
- Tang, X., Zhang, N., Si, H., and Calderón-Urrea, A.** (2017). Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress. *Plant Methods* **13**: 1–8.
- Tatge, H., Marshall, J., Martin, C., Edwards, E.A., and Smith, A.M.** (1999). Evidence that amylose synthesis occurs within the matrix of the starch granule in potato tubers. *Plant, Cell Environ.* **22**: 543–550.
- Tetlow, I.J. and Emes, M.J.** (2014). A review of starch-branching enzymes and their role in amylopectin biosynthesis. *IUBMB Life* **66**: 546–558.
- Tetlow, I.J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C.G., Esposito, S., Kosar-Hashemi, B., Morell, M.K., and Emes, M.J.** (2004). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *Plant Cell* **16**: 694–708.
- Thalmann, M. and Santelia, D.** (2017). Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress. *New Phytol.* **214**: 943–951.
- Tiessen, A., Hendriks, J.H.M., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farré, E.M., and Geigenberger, P.** (2002). Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *Plant Cell* **14**: 2191–2213.
- Tuncel, A., Corbin, K.R., Ahn-Jarvis, J., Harris, S., Hawkins, E., Smedley, M.A., Harwood, W., Warren, F.J., Patron, N.J., and Smith, A.M.** (2019). Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant Biotechnol. J.*: 1–13.
- Uitdewilligen, J.G.A.M.L., Wolters, A.M.A., D’hoop, B.B., Borm, T.J.A., Visser, R.G.F., and van Eck, H.J.** (2013). A Next-Generation Sequencing Method for Genotyping-by-Sequencing of Highly Heterozygous Autotetraploid Potato. *PLoS One* **8**: 10–14.

- Vandromme, C., Spriet, C., Dauvillée, D., Courseaux, A., Putaux, J.-L., Wychowski, A., Krzewinski, F., Facon, M., D'Hulst, C., and Wattebled, F.** (2019). PII1: a protein involved in starch initiation that determines granule number and size in Arabidopsis chloroplast. *New Phytol.* **221**: 356–370.
- Vayda, M.E.** (1994). Environmental stress and its impact on potato yield.
- Veillet, F., Chauvin, L., Kermarrec, M.P., Sevestre, F., Merrer, M., Terret, Z., Szydlowski, N., Devaux, P., Gallois, J.L., and Chauvin, J.E.** (2019a). The *Solanum tuberosum* GBSSI gene: a target for assessing gene and base editing in tetraploid potato. *Plant Cell Rep.* **38**: 1065–1080.
- Veillet, F., Perrot, L., Chauvin, L., Kermarrec, M.P., Guyon-Debast, A., Chauvin, J.E., Nogué, F., and Mazier, M.** (2019b). Transgene-free genome editing in tomato and potato plants using Agrobacterium-mediated delivery of a CRISPR/Cas9 cytidine base editor. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.
- Verbeke, J., Penverne, C., D'Hulst, C., Rolando, C., and Szydlowski, N.** (2016). Rapid and sensitive quantification of C3- and C6-phosphoesters in starch by fluorescence-assisted capillary electrophoresis. *Carbohydr. Polym.* **152**: 784–791.
- Wang, W., Wei, X., Jiao, G., Chen, W., Wu, Y., Sheng, Z., Hu, S., Xie, L., Wang, J., Tang, S., and Hu, P.** (2019). GBSS-BINDING PROTEIN, encoding a CBM48 domain-containing protein, affects rice quality and yield. *J. Integr. Plant Biol.* **00**: jipb.12866.
- Wang, X., Xue, L., Sun, J., and Zuo, J.** (2010). The Arabidopsis BE1 gene, encoding a putative glycoside hydrolase localized in plastids, plays crucial roles during embryogenesis and carbohydrate metabolism. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 273–288.
- Wattebled, F., Dong, Y., Dumez, S., Delvallé, D., Planchot, V., Berbezy, P., Vyas, D., Colonna, P., Chatterjee, M., Ball, S., and D'Hulst, C.** (2005). Mutants of Arabidopsis Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulate Phytoglycogen and an Abnormal Form of Amylopectin. *Plant Physiol.* **138**: 184–195.
- Wayllace, N.Z., Valdez, H.A., Ugalde, R.A., Busi, M. V., and Gomez-Casati, D.F.** (2010). The starch-binding capacity of the noncatalytic SBD2 region and the interaction between the N- and C-terminal domains are involved in the modulation of the activity of starch synthase III from Arabidopsis thaliana: Enzymes and catalysis. *FEBS J.* **277**: 428–440.
- Weise, S.E. and Kiss, J.Z.** (1999). Gravitropism of inflorescence stems in starch-deficient mutants of Arabidopsis. *Int. J. Plant Sci.* **160**: 521–527.
- Wu, F. and Tanksley, S.D.** (2010). Chromosomal evolution in the plant family Solanaceae. *BMC Genomics* **11**: 182.
- Wychowski, A. and Hawkins, P.S.** (2017). Dynamique enzymatique et contrôle de la formation et de la distribution des branchements de l'amidon.
- Xie, Y., Barb, A.W., Hennen-Bierwagen, T.A., and Myers, A.M.** (2018). Direct Determination of the Site of Addition of Glucosyl Units to Maltooligosaccharide Acceptors Catalyzed by Maize Starch Synthase I. *Front. Plant Sci.* **9**: 1–8.
- Xu, X. et al.** (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**: 189–195.
- Yamamoto, T.** (2014). Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases (Springer).

- Yasumoto, S., Umemoto, N., Lee, H.J., Nakayasu, M., Sawai, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mizutani, M., Saito, K., and Muranaka, T.** (2019). Efficient genome engineering using platinum talein potato. *Plant Biotechnol.* **36**: 167–173.
- Ye, M., Peng, Z., Tang, D., Yang, Z., Li, D., Xu, Y., Zhang, C., and Huang, S.** (2018). Generation of self-compatible diploid potato by knockout of S-RNase. *Nat. Plants* **4**: 651–654.
- Yu, J.W. et al.** (2012). Dynamic proteomic profile of potato tuber during its in vitro development. *Plant Sci.* **195**: 1–9.
- Yu, T.S. et al.** (2001a). The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* **13**: 1907–1918.
- Yu, T.S. et al.** (2005). α -amylase is not required for breakdown of transitory starch in *Arabidopsis* Leaves. *J. Biol. Chem.* **280**: 9773–9779.
- Yu, Y., Mu, H.H., Wasserman, B.P., and Carman, G.M.** (2001b). Identification of the maize amyloplast stromal 112-kD protein as a plastidic starch phosphorylase. *Plant Physiol.* **125**: 351–359.
- Zeeman, S.C., Kossmann, J., and Smith, A.M.** (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 209–234.
- Zeeman, S.C. and Rees, T.A.** (1999). Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant. Cell Environ.* **22**: 1445–1453.
- Zeeman, S.C., Smith, S.M., and Smith, A.M.** (2007). The diurnal metabolism of leaf starch. *Biochem. J.* **401**: 13–28.
- Zhang, P.** (2020). A newly-identified inactive starch synthase simultaneously regulates starch synthesis and carbon allocation in storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz).
- Zhang, X., Szydlowski, N., Delvallé, D., D’Hulst, C., James, M.G., and Myers, A.M.** (2008). Overlapping functions of the starch synthases SSII and SSIII in amylopectin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **8**: 96.
- Zhong, Y., Blennow, A., Kofoed-Enevoldsen, O., Jiang, D., and Hebelstrup, K.H.** (2019). Protein Targeting to Starch 1 is essential for starchy endosperm development in barley. *J. Exp. Bot.* **70**: 485–496.
- Zhou, X., Zha, M., Huang, J., Li, L., Imran, M., and Zhang, C.** (2017). StMYB44 negatively regulates phosphate transport by suppressing expression of PHOSPHATE1 in potato. *J. Exp. Bot.* **68**: 1265–1281.
- Zimmerer, K.S.** (1998). The Ecogeography of Andean Potatoes. *Bioscience* **48**: 445–454.
- Zotarelli, L., Rens, L.R., Cantliffe, D.J., Stoffella, P.J., Gergela, D., and Fourman, D.** (2014). Nitrogen Fertilizer Rate and Application Timing for Chipping Potato Cultivar Atlantic. *Agron. J.* **106**: 2215–2226.