

Titre	Rôle du complexe formé par CPK3 et les protéines 14-3-3 dans la mort cellulaire induite par la fumonisine B1
Encadrant 1	Valérie COTELLE Mail : cotelle@lrsv.ups-tlse.fr Tél : 05 34 32 38 17
Equipe(s)	Signalisation calcique cytosolique et nucléaire chez les végétaux – LRSV Acceptez-vous que ce sujet soit également proposé à l'itinéraire PRO ? OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON <input type="checkbox"/>
Résumé	<p>Chez les végétaux, la mort cellulaire programmée est un processus intervenant dans le développement et dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Elle peut également être induite lors d'une attaque par un champignon nécrotrophe comme <i>Fusarium moniliforme</i> qui induit la mort cellulaire chez les plantes par le biais d'une mycotoxine, la fumonisine B1 (FB1). Chez <i>Arabidopsis thaliana</i>, cette toxine provoque la mort cellulaire via une accumulation de sphingolipides, qui combinée à une augmentation de la concentration en calcium (Ca^{2+}) intracellulaire, induit la dissociation d'un complexe formé par les protéines 14-3-3s et une protéine kinase Ca^{2+}-dépendante, CPK3 (Lachaud et al., 2013 ; Ormancey et al., 2017). Néanmoins, les mécanismes moléculaires de l'interaction entre CPK3 et les 14-3-3s, qui sont des protéines de signalisation régulant leurs protéines cibles phosphorylées par interaction protéine-protéine, restent encore mal connus.</p> <p>L'objectif du stage de M2R est de comprendre comment et dans quels compartiments subcellulaires CPK3 interagit avec les 14-3-3s et d'étudier les mécanismes de régulation du complexe CPK3/14-3-3 en relation avec la mort cellulaire induite par la FB1.</p> <p><u>Objectifs et approches :</u></p> <p>Des résultats préliminaires indiquent que CPK3 interagit préférentiellement avec certaines 14-3-3s d'<i>Arabidopsis</i>. Le premier objectif sera donc de déterminer la spécificité d'interaction et l'affinité <i>in vitro</i> entre CPK3 et les 13 isoformes de 14-3-3 d'<i>Arabidopsis</i> par thermophorèse à micro-échelle et par far-western blot (overlay). Ces analyses seront couplées à l'étude de la localisation subcellulaire de ces interactions et de leur spécificité <i>in planta</i> par analyse FRET-FLIM.</p> <p>De plus, des données récentes suggèrent que l'autophosphorylation de CPK3 permet son interaction phospho-dépendante avec les 14-3-3s. Le second objectif sera de vérifier cette hypothèse en testant, après autophosphorylation, la liaison aux 14-3-3s de CPK3 et de formes tronquées de cette protéine kinase. Ceci sera couplé à la recherche des sites phosphorylés de CPK3 permettant l'interaction avec les 14-3-3s en utilisant des approches de protéomique (spectrométrie de masse). Les outils nécessaires à la réalisation de ce stage sont déjà caractérisés et disponibles (protéines recombinantes, mutants, constructions...).</p> <p>L'étude des interactions CPK3/14-3-3s permettra de sélectionner les isoformes de 14-3-3s potentiellement impliquées dans la régulation de la mort cellulaire induite par FB1 chez <i>Arabidopsis</i>. Leur implication dans ce processus pourra, en fonction de l'avancement du stage, être étudiée au cours du M2R puis de la thèse en analysant, en réponse à la FB1, le phénotype de mutants d'<i>Arabidopsis</i> affectés au niveau de l'expression de différentes isoformes de 14-3-3s.</p> <p>Lachaud, C., Prigent, E., Thuleau, P., Grat, S., Da Silva, D., Brière, C., Mazars, C., and Cotelle, V. (2013). 14-3-3-Regulated Ca^{2+}-dependent protein kinase CPK3 is required for sphingolipid-induced cell death in <i>Arabidopsis</i>. <i>Cell Death Differ.</i> 20: 209–217.</p> <p>Ormancey, M., Thuleau, P., Mazars, C., and Cotelle, V. (2017). CDPKs and 14-3-3 proteins: emerging duo in signaling. <i>Trends Plant Sci.</i> 22: 263–272.</p>
Photo	