

**Stage financé de Master 2 en Biochimie/Biologie Moléculaire/ Biologie Végétale  
à l'Université de Strasbourg. Année 2021**

**Titre du sujet de stage :**

*Fr/* Rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité d'une protéine de liaison à l'ARN impliquée dans la biogénèse du ribosome du chloroplaste chez la plante Arabidopsis.

*Eng/* Role of phosphorylation in the regulation of the activity of an RNA binding protein involved in ribosome biogenesis in Arabidopsis chloroplast.

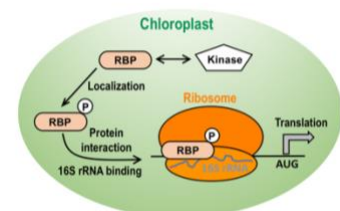
**Institut d'accueil et équipe:** Université de Strasbourg, CNRS UR2357 Institut de Biologie Moléculaire des Plantes- équipe Adaptation génétique du chloroplaste.

**Adresse Web de l'institut :** <http://www.ibmp.cnrs.fr>

**Responsable du projet :** Kamel HAMMANI, HDR  
Tél: (0)3 67 15 52 81  
Courrier-E : [khammani@unistra.fr](mailto:khammani@unistra.fr)

**Description du stage *Fr/Eng*:**

Le chloroplaste est l'organe essentiel à la photosynthèse et à de nombreuses voies métaboliques fondamentales à la productivité des plantes et à leur adaptation aux stress biotiques ou abiotiques. Le chloroplaste a une origine endosymbiotique bactérienne et possède un génome qui lui est propre. Toutefois, l'expression des gènes chloroplastiques et en particulier, la traduction des ARNm nécessite de nombreuses protéines de liaison à l'ARN qui sont codées par des gènes nucléaires de la plante et qui sont importées dans les chloroplastes. Nous avons identifié au laboratoire un gène codant une protéine de liaison à l'ARN qui facilite l'assemblage du ribosome chloroplastique et la traduction chez la plante Arabidopsis et, nous tentons de comprendre le rôle de la phosphorylation de la protéine dans la régulation de son activité *in vivo*. Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis d'établir que la protéine se lie à l'ARN ribosomique 16S dans le chloroplaste et interagit avec des protéines des sous-unité 30S et 50S du ribosome chloroplastique pour faciliter l'assemblage du ribosome 70S fonctionnel. De plus, des expériences de fusion de la protéine à la GFP ont révélé que cette protéine était localisée dans un sous-compartiment particulier des chloroplastes, le nucléoïde. De manière intéressante, les expériences de co-immunoprécipitation de la protéine couplées à la spectrométrie de masse ont révélé la présence de deux acides-aminés phosphorylés dans sa région N-terminale et un crible double hybride chez la levure a permis d'identifier une kinase chloroplastique interagissant physiquement avec notre protéine d'intérêt. Le but du projet de thèse sera de comprendre l'importance des sites de phosphorylation de notre protéine d'intérêt dans la régulation de son activité *in vivo*. Pour cela, nous disposons au laboratoire de lignées d'Arabidopsis exprimant dans un fond mutant pour le gène d'intérêt différentes versions de la protéine mutée ponctuellement au niveau des sites de phosphorylation et étiquetées (4xMyc et GFP). L'étudiant pourra étudier l'impact de ces mutations sur les fonctions de la protéine *in vivo* à savoir : sa sous-localisation cellulaire par microscopie confocale, ses capacités à interagir avec des partenaires protéiques ou à lier ses cibles ARN par co-immunoprécipitation de la protéine étiquetée.



Si l'étudiant souhaite poursuivre en thèse, il aura la possibilité de candidater au concours externe de l'école doctorale des Sciences de la Vie (EDSV) de l'université de Strasbourg afin d'obtenir un contrat doctoral. En 2020, 10 des 15 candidats externes (inscrits en M2 dans une autre université) au concours externe de l'EDSV à Strasbourg ont été admis.

**English :**

The chloroplast is an essential organelle that is the house of photosynthesis as well as many other metabolic pathways that are important for plant fitness and adaptation to biotic and abiotic stresses. The chloroplast has a bacterial endosymbiotic origin and possesses his own genome. However, chloroplast gene expression steps and in particular translation require the participation of hundreds of RNA binding proteins (RBPs) that

are encoded by the nuclear genome and imported into chloroplasts. Using reverse genetics and molecular phenotyping, our lab has identified a particular nuclear gene in Arabidopsis plants that encodes an RNA binding protein controlling chloroplast translation and ribosomal assembly and, the aim of this project is to understand the role of phosphorylation in the regulation of the protein activity *in vivo*. We showed by co-immunoprecipitations that the protein binds to the 16S chloroplast ribosomal RNA *in vivo* and interacts with proteins of the small 30s and large 50S subunits of the chloroplast ribosome to facilitate the assembly of the functional 70S ribosome. In addition, GFP protein fusion experiments demonstrated that the RNA binding protein localizes *in vivo* in a particular sub-compartment of the chloroplasts important for gene expression, the nucleoid. Intriguingly, the co-immunoprecipitation of the protein coupled to mass spectrometry analysis revealed the existence of two phosphorylated amino acids in the protein sequence in an N-terminal region. A yeast two hybrid screen has identified a chloroplastic kinase as an interactor of this RNA binding protein. The project aims to investigate the importance of phosphorylation in the regulation of the *in vivo* activity of this protein. To this end, we have in the lab several transgenic Arabidopsis lines in the *RBP* gene mutant background expressing different phosphomutant versions of the RNA binding protein. The master trainee will study the effect of these mutations on the *in vivo* protein functions looking at: its subcellular localization by confocal microscopy and its ability to interact with protein or RNA partners in chloroplasts by co-immunoprecipitation.

The master student will be given the opportunity to apply for a PhD scholarship at the University of Strasbourg if he wishes to pursue postgraduate studies. In 2020, 10 out of 15 candidates external to the University of Strasbourg were granted a PhD scholarship in Life Sciences to pursue their studies at the University of Strasbourg. There is no citizenship restrictions that apply to this PhD scholarship.

**Méthodologies:**

Biochimie des complexes ribonucléoprotéiques, Microscopie confocale, Co-immunoprécipitation de l'ARN/protéines, Spectrométrie de masse.

**Références :**

**Méteignier L-V, Ghandour R, Zimmerman A, Kuhn L, Meurer J, Zoschke R, Hammani K. 2020.** Arabidopsis mTERF9 protein promotes chloroplast ribosomal assembly and translation by establishing ribonucleoprotein interactions *in vivo*. bioRxiv: 2020.2006.2016.153288.