

Utilisation d'un senseur de malate fluorescent pour suivre les variations subcellulaires de cet acide organique lors de l'ouverture des stomates.

Laboratoire d'accueil : IPSiM

Equipe d'accueil : Influx

Responsable de stage : Nadine Paris

Adresse mail du responsable : nadine.paris@cnrs.fr

Gratification : Oui

L'étudiant de M2 intégrera l'équipe Influx de l'IPSiM qui s'intéresse à la régulation et la coordination de flux d'ions au travers les membranes des cellules végétales (<https://www1.montpellier.inra.fr/wp-inra/ipsim/recherche/les-equipes/coordination-des-flux-ioniques-et-signalisation-dans-les-cellules-vegetales-influx/>). L'équipe s'intéresse particulièrement à la réponse des stomates à cette coordination de flux; les stomates étant des pores microscopiques à la surface des feuilles qui régulent les échanges gazeux (H_2O et CO_2). Selon les modèles actuels qui décrivent l'ouverture/fermeture des stomates, l'acide malique est accumulé dans la vacuole des cellules de garde lors de l'ouverture des stomates, contribuant ainsi à l'augmentation de turgescence et à l'ouverture de l'ostiole qui en résulte. L'accumulation de l'acide malique est en lien avec le métabolisme et la dégradation de l'amidon des cellules de garde.

Le malate est considéré comme un acteur majeur de la régulation de l'ouverture stomatique, aussi bien en réponse à la lumière (signal d'ouverture) qu'en réponse à des conditions de stress (signal de fermeture). Cependant nos connaissances sur sa dynamique dans les différents compartiments cellulaires restent très faibles ce qui limite notre compréhension des réponses stomatiques à l'environnement. Le développement d'outils moléculaires qui nous permettraient de visualiser et quantifier les variations de malate dans les principaux compartiments des cellules de garde est donc une étape importante pour comprendre la physiologie des stomates. L'équipe d'accueil développe ces outils en générant des senseurs fluorescents pour mesurer *in vivo* les flux d'ions majoritaires (e.g. Cl^- , NO_3^- , malate²⁻, K^+ , Ca^{2+} and H^+), que ce soit au travers de la membrane plasmique ou du tonoplaste des cellules de garde.

Le ou la stagiaire sera impliqué dans la caractérisation *in planta* d'un nouveau senseur de malate, la Malone. Ce senseur a été développé par le groupe de Robert Campbell (U. Tokyo ; ACS Cent. Sci. 2020, 6, 1441-1450) avec qui nous collaborons. Il se compose d'une protéine fluorescente, la GFP, et d'un domaine capable de fixer le malate (Int. J. Mol. Sci. 2024, 25, 11098). En se liant, le composé induit un changement de conformation dans la structure du senseur, ce qui impacte sa capacité à émettre de la fluorescence. La quantification des changements de fluorescence émise révèle donc des changements de concentration de malate dans les compartiments cellulaires des cellules de garde où le biosenseur est exprimé.

L'équipe d'accueil a produit la Malone en bactérie, l'a purifiée et a effectué une caractérisation spectrale. Lors de cette étude nous avons découvert une propriété d'intérêt de la Malone, c'est-à-dire que le temps de vie de fluorescence de la Malone varie en fonction de la quantité de malate dans le milieu, et ceci dans une gamme de concentration compatible avec les concentrations de malate attendues dans le cytoplasme (1 à 5mM). La mesure des temps de vie de la fluorescence des biosenseurs est un développement récent des approches de microscopie qui offre divers avantages expérimentaux.

De plus, nos données préliminaires, obtenues en épiderme de tabac, montrent que la Malone est correctement repliée dans la cellule végétale, fluoresce et permet donc de quantifier le malate cytosolique *in vivo*. Ce biosenseur ouvre donc à des possibilités inédites de visualiser *in vivo* les changements de malate dans des cellules végétales vivantes.

Le stage vise donc à développer des biosenseurs pour la malate qui soient exploitables dans différents compartiments cellulaires des cellules de garde. Lors du stage, le/la candidat/e effectuera la caractérisation *in vivo* de la Malone exprimé dans le cytosol avec des mesures de temps de vie de fluorescence (FLIM) par microscopie confocale. Cette caractérisation sera effectuée notamment dans des lignées transgéniques d'*A. thaliana* sur des cellules de garde. Cette étude sera principalement focalisée sur la détection des variations de malate cytosolique dans le contexte de l'ouverture stomatique, qui est à ce jour méconnue. Dans un autre volet de ce stage visera à développer de nouvelles formes de la Malone pour les adapter aux concentrations de malate élevées et au pH acide que l'on trouve dans la vacuole.