



HAL
open science

Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote (NO) dans les réponses de défense chez le tabac

Jérémy Astier

► **To cite this version:**

Jérémy Astier. Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote (NO) dans les réponses de défense chez le tabac. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT: 2011DIJOS015 . tel-00671188

HAL Id: tel-00671188

<https://theses.hal.science/tel-00671188>

Submitted on 16 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale E2S n°490

Unité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne
Plante Microbe Environnement

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline Sciences de la Vie

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire



**Identification et étude du rôle des protéines
cibles du monoxyde d'azote (NO) dans les
réponses de défense chez le tabac.**

Présentée et soutenue publiquement par
Jérémy Astier

Le 30 mai 2011 devant le Jury composé de

Renaud Brouquisse	Chargé de recherche, INRA, Sophia Antipolis	Rapporteur
Yves Marco	Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse	Rapporteur
Christian Meyer	Directeur de Recherche, INRA, Versailles	Examineur
Catherine Vergely	Professeur, Université de Bourgogne	Examineur
David Wendehenne	Professeur, Université de Bourgogne	Directeur de Thèse



« La science est l'esthétique de l'intelligence. »

Gaston Bachelard

Remerciements

Pour commencer je tiens à remercier les membres du Jury, Renaud Brouquisse, Yves Marco, Christian Meyer et Catherine Vergely, pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Arrivé au terme des trois années (et quelques...) de dur labeur consacré à ce travail de thèse, j'aimerais exprimer ma gratitude à l'encontre des personnes qui ont contribué, directement ou non, à sa réalisation.

En premier lieu, je remercie très sincèrement David Wendehenne, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe OP2 de l'UMR Plante-Microbe-Environnement. David, j'ai particulièrement apprécié ton encadrement, toujours juste, toujours disponible malgré tes obligations au labo et à la fac. Un grand merci pour tout ce temps que tu m'as consacré. Je pense avoir énormément appris au cours de ces trois années grâce à toi. Merci.

Un travail de recherche ne se fait jamais seul. Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du laboratoire OP2 au sein duquel j'ai passé ces années. L'ambiance y est particulièrement amicale, et j'ai vraiment apprécié y travailler. Un grand merci aux personnes m'ayant aidé, par le biais de discussions franches et abouties, à préciser ce travail. Je pense particulièrement à Angélique, qui m'a tout appris à mon arrivée, à Olivier, que je connaissais déjà et qui, ne pouvant se passer de moi, m'a rejoint pour reprendre les rênes sur CDC48, où encore à Stéphane, Sylvain, Benoit, Manu, et Patrick pour leurs discussions, critiques et aide sur ce travail. J'en profite pour souhaiter bonne chance aux futurs docteurs de l'équipe.

Une partie de ce travail a été réalisée au Brésil, au sein du laboratoire du Prof. Hernan Terenzi de l'Université de Santa Catarina de Florianopolis. Je tiens à remercier l'ensemble des personnes de ce laboratoire pour m'avoir accueilli aussi chaleureusement. Je pense particulièrement à Hernan, à Manuel pour son aide à la préparation du voyage, à Veronika pour m'avoir fait découvrir Florianopolis, et à Jean, Guillaume, Javier, Gabriella et Carolina pour leur aide et leurs conseils.

Ce travail constitue l'aboutissement d'un parcours universitaire de huit années au cours duquel j'ai pu rencontrer des professeurs, des encadrants ou des amis qui m'ont conduit à choisir la voie de la recherche. Je tiens particulièrement à remercier Alain Pugin, qui m'a fait aimer la biochimie et m'a facilité les prises de contacts avec mes maitres de stages de Licence et Master. Merci également à Roger A. Leigh, qui m'a accueilli pour mon premier stage de laboratoire à l'Université de Cambridge, faisant naître en moi la fibre recherche, et à Jean-Pierre Métraux (et Olivier Lamotte, encore lui !) pour m'avoir accueilli (et encadré) au sein de leur laboratoire de Fribourg, en Suisse, confirmant mon attrait pour la recherche.

Je ne peux m'empêcher de penser à mes amis de faculté, notamment ceux de la Dream Team des TP de Bioch, avec lesquels j'ai usé mes premières pipettes, ainsi qu'aux promotions Licence 2005 et Master1 2006, avec lesquels j'ai passé quelques années bien sympathiques, qui m'ont également conduit à choisir cette orientation.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, James Dat et Frédéric Gaymard, pour avoir pris le temps de suivre mon travail et m'aider à l'orienter dans les bonnes directions.

Je tiens enfin à remercier ma famille pour m'avoir toujours soutenu et encouragé dans mes projets, ainsi qu'Amélie pour m'avoir supporté (dans les différents sens du terme) au cours de ces trois dernières années (notamment pendant la rédaction).

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	4
Liste des abréviations	8
Introduction	10
<i>Partie 1 : Les réponses de défense des plantes.....</i>	<i>11</i>
1. Généralités et résistance active	11
2. La reconnaissance de l'agent pathogène	13
2.1 Dans la résistance basale PTI.....	14
2.2 Dans la résistance spécifique ETI.....	16
3. La transduction du signal.....	18
3.1 La signalisation précoce.....	18
3.2 Le rôle des phytohormones.....	19
4. Les réponses de défense	20
4.1 Le renforcement de la paroi cellulaire	20
4.2 La synthèse de composés anti-microbiens.....	21
4.3 Production de protéines PR.....	21
4.4 La réponse hypersensible (HR)	22
4.5 La potentialisation	23
4.6 La résistance systémique acquise (SAR)	24
4.7 La résistance systémique induite (ISR)	24
4.8 La résistance systémique induite par blessure.....	25
<i>Partie 2 : Le modèle tabac/cryptogéine</i>	<i>26</i>
1. Les Phytophthora	26
2. Les élicitines des oomycètes	27
2.1 Caractéristiques générales et fonctions.....	27
2.2 Impact sur les défenses des plantes.....	29
3. La cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac.....	30
3.1 Reconnaissance de la cryptogéine	32
3.2 Signalisation précoce induite par la cryptogéine	32
<i>Partie 3 : Le monoxyde d'azote, un acteur essentiel de la signalisation chez les plantes</i>	<i>35</i>
1. La synthèse du NO.....	36
1.1 La synthèse du NO chez les animaux.....	36
1.2 La synthèse du NO chez les plantes	37
2. Rôle du NO chez les plantes	39
3. Mécanismes d'action du NO.....	43

3.1 NO, signalisation calcique et protéines kinases	44
3.2 Modifications post-traductionnelles des protéines	45
Objectifs de ce travail	56
Matériel et Méthodes	59
Matériel	60
1. Matériel biologique	60
1.1 Matériel végétal : suspensions cellulaires de tabac	60
1.2 Cryptogéine	61
1.3 Souches Bactériennes utilisées.....	61
2. Outils pharmacologiques.....	61
2.1 Composés relatifs à l'étude de la signalisation du NO	61
2.2 Composés relatifs à la détection et l'identification des protéines S-nitrosylées	63
2.3 Biologie moléculaire et purifications protéiques	64
2.4 Analyses protéiques et tests d'activités	65
Méthodes	66
1. La technique du « biotin switch »	66
1.1 Préparation du matériel végétal	66
1.2 Préparation des extraits protéiques.....	66
1.3 Blocage des thiols libres par méthylthiolation	66
1.4 Réduction et biotinylation des nitrosothiols	67
2. Immunodétection des protéines biotinylées	67
2.1 Séparation des protéines en SDS-PAGE	67
2.2 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	68
2.3 Détection des protéines biotinylées.....	68
2.4 Western Blot : Immunodétection spécifique de CDC48.....	69
3. Purification et identification des protéines S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine chez le tabac.....	69
3.1 Préparation des extraits protéiques.....	69
3.2 Préparation et identification des peptides purifiés par spectrométrie de masse	69
4. Clonage des gènes correspondants aux protéines candidates identifiées	70
4.1 Transformation des souches bactériennes compétentes	70
4.2 Recherche des séquences nucléotidiques d'intérêt.....	71
4.3 Prédiction de la structure tridimensionnelle <i>in silico</i>	71
4.4 Clonage des inserts CDCF et CDCM dans le vecteur pENTR D-TOPO	71
4.5 Réaction de ligation-recombinaison et obtention des bactéries recombinantes	73
5. Expression hétérologue des protéines candidates	73
5.1 Induction de l'expression	73
5.2 Vérification de la solubilité des protéines exprimées	74

5.3 Purification des protéines recombinantes candidates.....	74
6. Purification et analyses protéiques.....	74
6.1 Vérification de la S-nitrosylation des protéines candidates <i>in vitro</i>	74
6.2 Dichroïsme circulaire et fluorescence.....	75
6.3 Expériences de dénaturation thermique.....	75
6.4 Tests d'activités.....	76
Chapitre I : Identification des protéines S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine	77
Résultats.....	78
1. Modèle d'étude.....	78
2. Méthode de détection des protéines S-nitrosylées.....	78
3. Identification de protéines S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine.....	81
3.1 Application de la méthode biotin switch.....	81
3.2 Purification des protéines biotinyllées.....	83
3.3 Identification des peptides biotinyllés par MS.....	85
Discussion.....	91
Chapitre II : Caractérisation de CDC48	95
Rappel Bibliographique : CDC48, un acteur moléculaire ubiquitaire.....	96
1. Généralités et description.....	96
2. Activités de CDC48.....	98
2.1 CDC48 et la progression du cycle cellulaire et le développement.....	98
2.2 CDC48 et les mécanismes de dynamique membranaire.....	100
2.3 CDC48 et le contrôle de la synthèse protéique.....	102
2.4 CDC48 et les signalisations dépendantes des RLK.....	102
2.5 CDC48 et la régulation de la transcription.....	103
3. Les cofacteurs et partenaires protéiques de CDC48.....	104
3.1 Une grande variété de partenaires protéiques.....	104
3.2 Les domaines d'interaction protéique.....	106
4. Régulation de l'activité de CDC48 par des modifications post-traductionnelles.....	108
4.1 Régulation par phosphorylation.....	108
4.2 Régulation par acétylation.....	110
4.3 Régulation par oxydation.....	110
5. Conclusions générales et choix du candidat.....	111
Résultats.....	112
<i>Partie 1 : Génération d'outils permettant la caractérisation de CDC48.....</i>	<i>112</i>
1. Analyses <i>in silico</i> et identification de la séquence codante pleine longueur.....	112
1.1 Identification de la séquence codante.....	112
1.2 Clonage du CDS de CDC48 chez le tabac.....	113
1.3 Alignement de séquence et structure primaire de CDC48.....	113

1.4 Obtention d'une isoforme mutée de CDC48 pour le résidu Cys 526	116
2. Obtention des protéines recombinantes CDCF et CDCM.....	116
2.1 Clonage en vecteur d'expression : technologie GATEWAY	116
2.2 Expression des protéines recombinantes	118
2.3 Vérification de la solubilité des protéines recombinantes.....	118
2.4 Purification des protéines recombinantes	120
2.5 Vérification de l'identité des protéines produites	120
2.6 Obtention d'une seconde isoforme mutée	122
Partie 2 : Etude de l'impact de la S-nitrosylation de CDC48 sur sa structure et son activité.....	123
1. Tests de S-nitrosylation <i>in vitro</i>	123
2. Analyses structurales et impact de la S-nitrosylation	126
2.1 Modélisation de la structure tridimensionnelle de CDC48	126
2.2 Analyses par dichroïsme circulaire	128
2.3 Expériences de dénaturation thermique	130
2.4 Expériences de fluorescence	132
3. Tests d'activité <i>in vitro</i>	134
Discussion	137
Chapitre III : Régulation de la protéine NtOSAK et de son partenaire cellulaire GAPDH par le NO en réponse à un stress salin	142
Présentation de la publication 1	144
Publication 1 : <i>Regulation of Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity</i>	147
Références bibliographiques	164
Annexes.....	189
Liste des publications réalisées pendant ce travail de thèse	190
Publications soumises ou en cours d'écriture.....	190
Liste des communications réalisées pendant de ce travail de thèse	191
Communications orales.....	191
Communications affichées	191
Publication 2 : <i>Regulation of Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity</i>	192
Publication 3 : <i>Nitric oxide signaling in plants: cross-talk with Ca²⁺, protein kinases and reactive oxygen species</i>	200
Publication 4 : <i>Current view of nitric oxide-responsive genes in plants</i>	225
Contacts.....	234
Abstract.....	235

Liste des abréviations

- 6xHis** : étiquette six histidines
AAA-ATPase : *ATPases associated with various cellular activities*
ABA : acide abscissique
AdoMet : S-adénosylméthionine
AHb1 : hémoglobine non-symbiotique 1
Ala : alanine
Asp : aspartate
AtSABP3 : *Arabidopsis thaliana salicylic acid-binding protein 3*
Avr : produit des gènes d'avirulence
BABA : acide β -aminobutyrique
BAK1 : *brassinosteroid receptor1-associated kinase 1*
BH₄ : tétrahydrobioptérine
BTH : acide benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioïque
CA : *carbonic anhydrase*
CaM : calmoduline
CDCF : CDC48 native de *Nicotiana tabacum*
CDCM : CDC48 présentant une substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala
CDCM2 : CDC48 présentant une substitution du résidu Cys 526 par un résidu Asp
CDPK : *Ca²⁺-induced protein kinase*
CDS : *coding DNA sequence*
CeBIP : *chitin-binding protein*
CERK1 : *chitin elicitor receptor kinase 1*
CNGC : *cyclic nucleotide gated channel*
C-ter : extrémité C-terminale
Cys : cystéine
DAMP : *damage-associated molecular pattern*
DEA/NO : diéthylamine-NONOate
EFR : *elongation factor-Tu receptor*
eNOS : *nitric oxide synthase* endothéliale
ER : réticulum endoplasmique
ERAD : *endoplasmic reticulum-associated-degradation*
ER-t : réticulum endoplasmique transitionnel
EST : *expressed sequenced tag*
ET : éthylène
ETI : *effector-triggered immunity*
FAD : flavine adénine dinucléotide
FAO : formes actives de l'oxygène
FLS2 : *flagellin sensing 2*
FMN : flavine mononucléotide
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase
GBP : *glucan binding protein*
GDC : glycine décarboxylase
GRP : *glycine rich protein*
GSH : glutathion
GSNO : S-nitrosoglutathion.
GSNOR : S-nitrosoglutathion réductase
GSSG : glutathion disulfide
HDAC6 : Histone désacétylase
HR : réponse hypersensible
Hsr203J : *hypersensitive-related gene 203 J*
iNOS : NOS inductible
IP₃-R : récepteur à l'inositol tri-phosphate
ISR : résistance systémique induite
JA : acide jasmonique
KAPP : *kinase-associated protein phosphatase*
L-Arg : L-Arginine
Lb : leghémoglobine
LeEIX1 : *ethylene-inducing xylanase*
LRR : région riche en leucine
Lys : lysine
LZ-CC : domaine leucine zipper/coil-coil
MAMP : *microbe-associated molecular pattern*
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MeSA : méthyl salicylate
MF : microfilaments d'actine
MMTS : S-méthyl méthaneethiosulfonate
MS : spectrométrie de masse
MT : microtubules
NAM : *no apical meristem*
NBS : site de liaison aux nucléotides
Ni:NOR : *nitrite :NO reductase*
nNOS : NOS neuronale
NO : monoxyde d'azote
Npl4 : *nuclear protein localization 4*

NPR1 : <i>non-expressor of pathogenesis-related gene 1</i>	SNARE : <i>SNAP receptor</i>
NR : <i>nitrate reductase</i>	S-NO : liaison S-nitrosothiol
NSF : <i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>	SNF1 : <i>sucrose non-fermenting 1</i>
N-ter : extrémité N-terminale	SnRK : <i>sucrose non-fermenting-related protein kinase</i>
NtOSAK : <i>Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase</i>	tcl 7 : <i>tobacco cryptogein induced 7</i>
NtRbohD : <i>Nicotiana tabacum respiratory burst oxidase homologue</i>	TGA1 : <i>TGAGG motif-binding factor 1</i>
OG : oligogalacturonate	TIR : domain toll/récepteur à l'interleukine 1
PA : polyamine	TRP : <i>Transient receptor potential</i>
PAMP : <i>pathogen-associated molecular pattern</i>	Trp : tryptophane
PEPR1 : <i>Pep1 receptor 1</i>	Trx/TR : thioredoxine/thioredoxine réductase
PK : protéine kinase	TTSS : système de sécrétion de type III
PLAP : <i>phospholipase A2-activating protein</i>	Tyr : tyrosine
PNGase : <i>peptide N-glycosidase</i>	UBD : <i>ubiquitin D</i>
pO₂ : pression partielle en oxygène	UBX : <i>ubiquitin regulatory X</i>
PR : <i>pathogenesis-related</i>	Ufd1 : <i>ubiquitin fusion degradation 1</i>
PRR : <i>pattern recognition receptor</i>	VBM : <i>VCP-binding motif</i>
PrxII E : peroxyrédoxine II E	VCP : <i>vasolin-containing protein</i>
PTI : <i>PAMP-triggered immunity</i>	VIM : <i>VCP-interacting mot</i>
PUB : <i>peptide N-glycosidase ubiquitin-associated</i>	VOC : composés organiques volatiles
PUL : <i>phospholipase A2-activating protein, Ufd3p, Lub1p</i>	VPE : <i>vacuolar processing enzymes</i>
PUX : <i>plant UBX domain-containing protein</i>	WIPK : <i>wound-induced protein</i>
R : produit des gènes de résistance	
RIN4 : <i>RPM1 interacting 4</i>	
RK : récepteur kinases	
RLP : <i>receptor-like protein</i>	
RNS : <i>Reactive nitrogen species</i>	
Rubisco : ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	
RyR : récepteur à ryanodine	
SA : acide salicylique	
SABP2 : <i>salicylic acid binding protein 2</i>	
SAMS1 : S-adénosylméthionine synthétase 1	
SAR : résistance systémique acquise	
SERK1 : <i>somatic embryogenesis receptor-like kinase 1</i>	
sGC : guanylate cyclase soluble	
SIPK : <i>salicylic acid-induced protein kinase</i>	
SNAP : <i>soluble NSF-attachement protein</i>	

INTRODUCTION

Partie 1 : Les réponses de défense des plantes

1. Généralités et résistance active

Les plantes sont au cours de leur vie en constante interaction avec leur environnement. Elles sont confrontées à différents types de stress influant sur leur physiologie. En plus des variations environnementales sources de stress abiotiques, les plantes sont confrontées à des agressions causées par d'autres organismes vivants, regroupées sous le terme de stress biotiques. Au cours de l'évolution, l'ensemble de ces contraintes a conduit à la mise en place de réponses de défense efficaces permettant une meilleure adaptation des plantes à leur environnement. En effet, les plantes disposent d'un éventail de défense, allant de barrières morphologiques constitutives à la mise en place de mécanismes cellulaires spécifiques.

Lorsque la plante est confrontée à une attaque par un organisme potentiellement pathogène, les mécanismes de défense mis en œuvre permettent dans la plupart des cas de lutter efficacement contre cet agresseur. Ce processus est qualifié d'interaction incompatible et la plante est résistante. Toutefois, il arrive que ces défenses soient inefficaces, car déclenchées trop tard ou bloquées par l'agresseur. L'interaction est alors dite compatible et la plante est sensible.

La première ligne de défense contre les agressions causées par des pathogènes est formée par l'ensemble des barrières physiques de la plante, en particulier la cuticule et la paroi végétale. La cuticule, formée de cutine et de cires, protège la surface des parties aériennes de la plante. La paroi pecto-cellulosique protège quant à elle chaque cellule végétale. Généralement, ces défenses passives préexistantes constituent un obstacle suffisant pour la protection contre l'attaque de pathogènes. Cependant, certains micro-organismes parviennent parfois à s'affranchir de ces barrières physiques, en infectant la plante par des ouvertures naturelles telles que les stomates ou une blessure, ou encore *via* l'action d'enzymes hydrolytiques permettant la dégradation de la cuticule ou de la paroi cellulaire. Pour lutter contre ces derniers, les plantes disposent d'autres systèmes de défense activés par la perception du pathogène. Ces défenses, constituant l'immunité innée chez les plantes (Jones & Dangl, 2006 ; Chisholm *et al.*, 2006), impliquent des événements cellulaires

complexes conduisant à une résistance active vis-à-vis des micro-organismes pathogènes.

Deux types de résistance active sont classiquement définies : la résistance basale et la résistance spécifique (Iriti & Faoro, 2007 ; Dodds & Rathjen, 2010, figure 1).

La résistance basale, ou PTI (*PAMP-triggered immunity*), est non spécifique et impliquée lors d'interactions entre un grand nombre de plantes et de pathogènes. Elle est déclenchée par la reconnaissance de molécules appelées communément éliciteurs de réactions de défense, PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*) ou MAMP (*microbe-associated molecular patterns*). Les éliciteurs sont de nature chimique variée : peptidique, lipidique ou oligosaccharidique (Nürnberger *et al.*, 2004 ; Boller & Felix, 2009). Ils incluent des molécules d'origine microbienne, en particulier des constituants structuraux, mais également d'origine végétale. Ces dernières correspondent généralement à des produits issus de la dégradation des parois par des enzymes hydrolytiques libérées par le pathogène ou l'hôte et appelés DAMP (*damage-associated molecular patterns* ; Lotze *et al.*, 2007 ; Boller & Felix 2009). Les éliciteurs sont reconnus par des récepteurs des cellules végétales appelés PRR (*pattern-recognition receptors* ; Zipfel, 2008). La PTI constitue un premier niveau de défense. Cependant, certains pathogènes parviennent à contourner la PTI *via* la production d'effecteurs codés par des gènes d'avirulence (*Avr*). Un second niveau de défense, l'ETI (*effector-triggered immunity*) peut alors être mis en place par la plante. Cette résistance, dite spécifique, implique la reconnaissance moléculaire des effecteurs par des protéines codées par des gènes de résistance (*R*). Selon le concept gène pour gène (Flor, 1971), les plantes hôtes possèdent le gène *R* correspondant aux gènes *Avr* du pathogène. Une perte ou une altération de l'un de ces deux gènes conduit à la maladie. Au contraire, la reconnaissance du produit du gène *Avr* par la protéine *R* initie une cascade d'événements cellulaires conduisant à la résistance. L'ETI pourra de nouveau être détournée par le pathogène *via* la production de nouveaux effecteurs que la plante reconnaitra ensuite *via* la sélection de nouvelles protéines *R*. Ce mécanisme s'inscrit dans un processus de co-évolution des plantes et des pathogènes, les pathogènes contournant les barrières immunitaires des plantes qui mettent à leur tour en place des réponses plus spécifiques (Dangl & Jones, 2006).

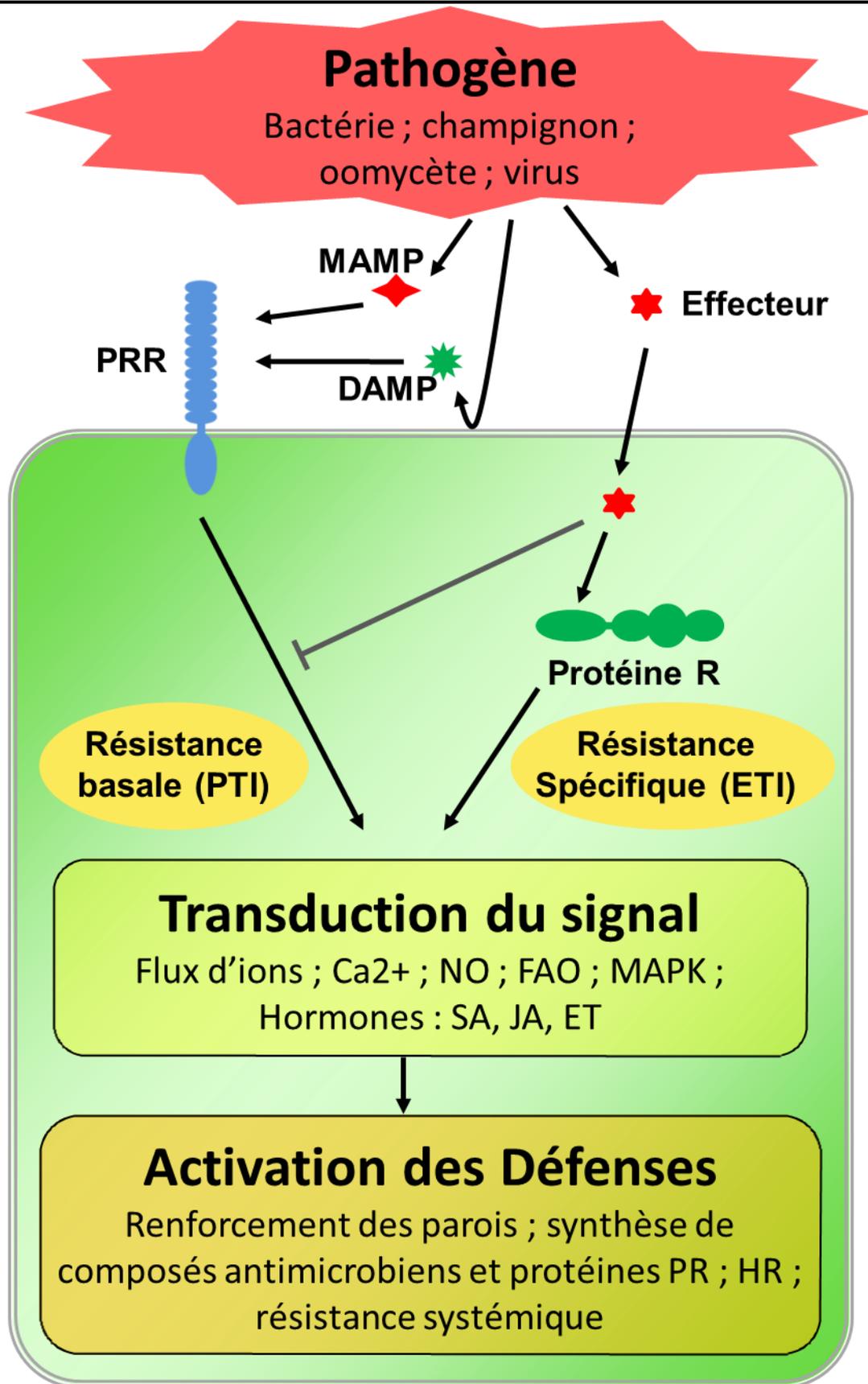


Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes de défenses des plantes. L'attaque du pathogène est perçue *via* des MAMP, DAMP issus de la dégradation de la paroi végétale ou des effecteurs. Les MAMP et les DAMP sont reconnus par les récepteurs PRR, induisant la PTI. Les effecteurs injectés dans la cellule concourent à l'inactivation de la PTI. Ils peuvent toutefois être reconnus, directement ou indirectement, par les protéines R, qui déclenchent alors l'ETI. L'activation des défenses implique des processus de signalisation cellulaire caractérisés par des flux d'ions dont le Ca^{2+} jouant un rôle de second messager, une production de NO et de FAO, l'activation de PK incluant des MAPK, et des phytohormones, en particulier le SA, le JA et l'ET.

2. La reconnaissance de l'agent pathogène

2.1 Dans la résistance basale PTI

La PTI conférée par des éliciteurs de nature peptidique est la plus étudiée. Ainsi Flg22, un peptide de 22 acides aminés issu de la flagelline des bactéries, déclenche des réactions de défense chez les plantes (Felix *et al.*, 1999). Un autre éliciteur peptidique très étudié est elf18, et son pendant elf26, correspondant à la partie N-terminale (N-ter) du facteur d'élongation EF-Tu d'*Escherichia coli* (Kunze *et al.*, 2004). Des éliciteurs peptidiques provenant d'autres micro-organismes pathogènes ont également été mis en évidence, comme le peptide Pep13, fragment d'une transglutaminase, présent chez une dizaine d'espèces de *Phytophthora*, qui possède des propriétés élicitrices chez le persil et la pomme de terre (Brunner *et al.*, 2002). Citons également les élicitines, sécrétées par la plupart des espèces de *Phytophthora*, qui conduisent à la mise en place de réactions de défense localisées et systémiques chez le tabac (Ricci *et al.*, 1989 ; voir la partie 2 de l'introduction). Des peptides endogènes sécrétés par les plantes en cas d'attaque pathogène sont également capables d'induire des réactions de défense, comme la systémine chez la tomate ou encore le peptide AtPep1 chez *Arabidopsis thaliana* (Boller, 2005 ; Huffaker *et al.*, 2006). Les éliciteurs de nature lipidique incluent l'acide arachidonique des oomycètes et l'ergostérol de certains champignons. Leur capacité à déclencher l'ETI a notamment été rapportée chez la pomme de terre, le tabac, la vigne ou encore la tomate (Boller, 1995 ; Granado *et al.*, 1995 ; Laquitaine *et al.*, 2006 ; Lochman & Mikes, 2006). Enfin, les éliciteurs de nature glucidique englobent certains peptidoglycanes de paroi bactérienne, ou encore des peptides de levure N-glycosylés (Erbs *et al.*, 2008 ; Boller, 1995) et des DAMP. Parmi les DAMP, les oligogalacturonates (OG), polymères d'acide galacturonique, sont les inducteurs d'ETI les plus étudiés (Hahn *et al.*, 1981 ; Boller & Felix, 2009). Par exemple, ils induisent chez la vigne ou *A. thaliana* une résistance contre une infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Ferrari *et al.*, 2007 ; Aziz *et al.*, 2004).

L'induction de la PTI implique la reconnaissance des éliciteurs par des PRR (Zipfel, 2008 ; Nürnberger & Brunner, 2002 ; figure 2). Ces récepteurs présentent des similarités de structure avec les récepteurs Toll-like exprimés dans les cellules animales (Hayashi *et al.*, 2001).

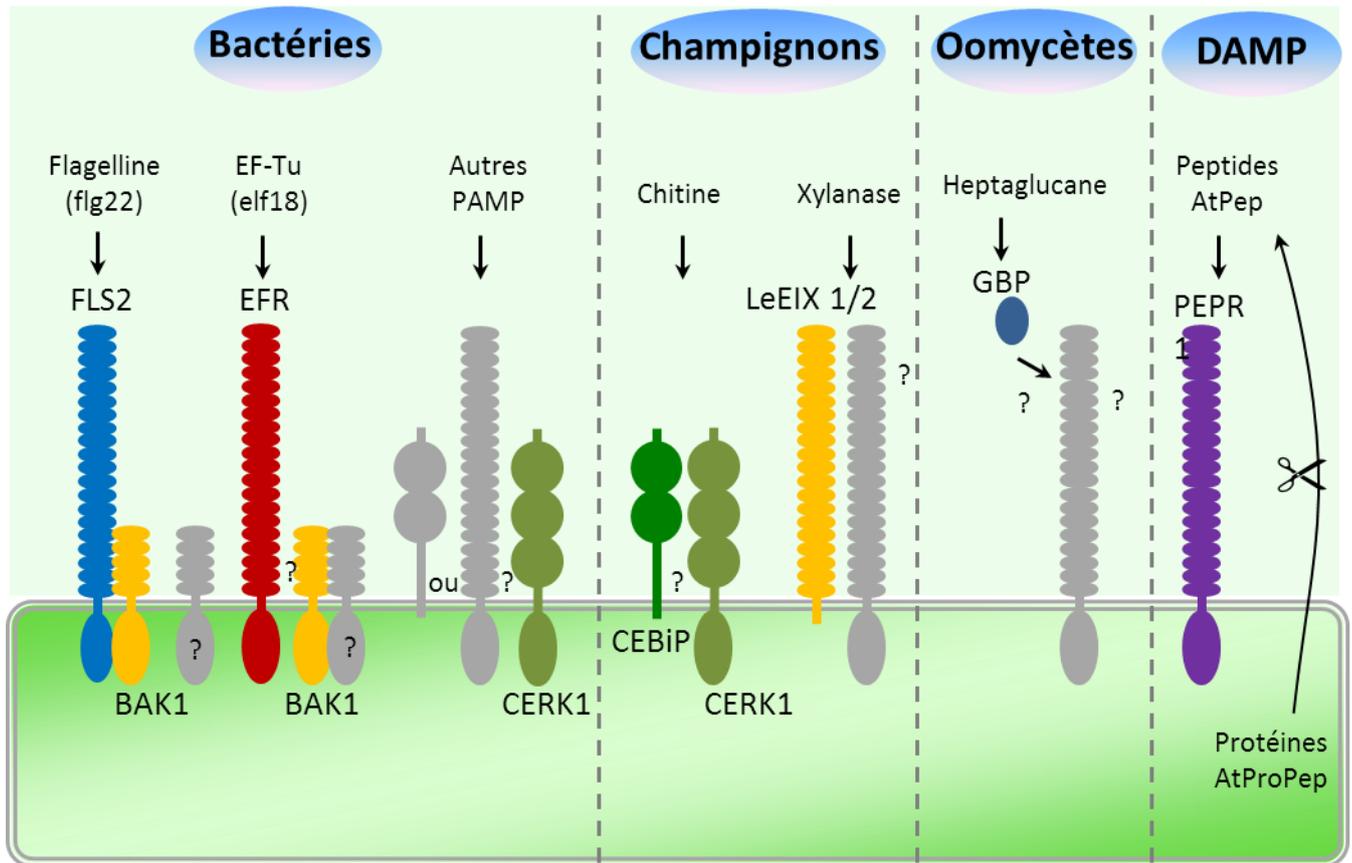


Figure 2 : Récepteurs de type PRR (*pattern recognition receptor*) chez les plantes. Chez *A. thaliana*, la flagelline bactérienne (flg22) et le facteur d'élongation EF-Tu (elf18) sont reconnus respectivement par FLS2 et EFR, des récepteurs de type LRR-RK. Les peptides endogènes Pep sont quant à eux reconnus par le récepteur PEPR1, également de type LRR-RK. Le site de haute affinité liant la chitine correspond à CEBiP chez le riz. La reconnaissance de la xylanase par LeEIX1/2 de type RLP est observée chez la tomate, où seul LeEIX2 est capable d'induire la transduction du signal. Chez le soja, l'heptaglucane de l'oomycète *Phytophthora sojae* est fixé par GBP. Les protéines BAK1 et CERK1 sont impliquées dans la signalisation chez la plupart des modèles. D'après Zipfel (2009).

Ils sont regroupés dans la classe des LRR-RK (*leucine-rich repeat receptor kinase* ; Zipfel 2008). Plusieurs membres de ces PRR ont pu être mis en évidence, notamment FLS2 (*flagellin sensing 2*), EFR (*elongation factor-Tu receptor*) ou encore PEPR1 (*Pep1 receptor 1*) impliqués respectivement dans la perception de flg22, elf18 et de AtPep1 chez *A. thaliana* (Gomez-Gomez & Boller, 2000 ; Zipfel *et al.*, 2006 ; Yamaguchi *et al.*, 2006). Une autre classe de récepteurs impliqués dans la PTI, les RLP (*receptor-like proteins*), semblables au LRR-RK mais sans le domaine intracellulaire de transmission du signal, est impliquée dans la reconnaissance des éliciteurs. C'est le cas du récepteur LeEIX1 (*ethylene-inducing xylanase*) qui reconnaît la xylanase EIX1 chez la tomate (Ron & Avni, 2004). D'autres sites de haute affinité participent à la reconnaissance des éliciteurs, tels que GBP (*glucan binding protein*) ou CeBIP (*chitin-binding protein*) en fixant respectivement des oligosaccharides chez le soja

ou de la chitine chez le riz (Kaku *et al.*, 2006). Enfin, il apparait que la perception des éliciteurs fait appel au concours de molécules membranaires adaptatrices pour permettre le déclenchement de la signalisation conduisant aux réponses de défense, comme la protéine BAK1 (*brassinosteroid receptor1-associated kinase 1*) ou CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1* ; Zipfel, 2009).

2.2 Dans la résistance spécifique ETI

Les effecteurs sont sécrétés par différents types de pathogènes incluant les bactéries, les champignons ou encore les oomycètes (Chisholm *et al.*, 2006 ; Stergiopoulos & de Wit, 2009 ; Schornack *et al.*, 2008 ; Dodds & Rathjen, 2010). On en recense un grand nombre, 20 à 30 d'entre eux ont par exemple pu être mis en évidence chez *Pseudomonas syringae* (Chang *et al.*, 2005). Ce sont généralement des facteurs de virulence nécessaires au processus infectieux et dont le rôle, pour la plupart d'entre eux, est d'inhiber la PTI. En effet, ces effecteurs agissent généralement en inactivant une protéine cible de l'hôte, impliquée dans la PTI ou dans le contrôle des événements de signalisation fondamentaux pour le développement de la plante (Jones & Dangl, 2006). Les effecteurs agissent donc au niveau intracellulaire et sont injectés dans la cellule végétale *via* les systèmes de sécrétion de type III (TTSS) dans le cas des bactéries. Chez les champignons et les oomycètes, qui ne présentent pas de systèmes comparables au TTSS, le processus d'injection d'effecteurs cytoplasmiques demeure inconnu. Toutefois, la sécrétion de ces effecteurs dans le milieu extracellulaire *via* la mise en place de systèmes endomembranaires a pu être établie (Panstruga & Dodds, 2009). De plus, un motif peptidique, RXLR, semble requis pour la délivrance de l'effecteur dans la cellule hôte. Des analyses génomiques de *Phytophthora infestans* ont montré que 563 effecteurs potentiels présentent ce motif (Haas *et al.*, 2009). Les produits des gènes de résistance *R* de la plante sont des protéines majoritairement cytoplasmiques, qui joueraient le rôle de récepteurs intracellulaires pour les effecteurs injectés par le pathogène. Ces protéines présentent des analogies de structures et plusieurs motifs protéiques sont conservés chez différentes espèces végétales (Tableau 1 ; Dangl & Jones 2001). La plupart de ces protéines *R* présentent un domaine LRR et NBS (*nucleotide-binding site*). Le domaine NBS autorise la liaison et l'hydrolyse de l'ATP et permettrait, *via* des changements de conformation de la protéine, l'activation d'événements de signalisation

cellulaire nécessaires à la mise en place des réponses de défense (Takken & Tameling, 2009). D'autres protéines R présentent des domaines TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*), LZ-CC (*leucine-zipper/coil-coil domain*) ou encore des séquences transmembranaires. Ces protéines R peuvent présenter des régions N-ter différentes, définissant deux classes distinctes : les protéines R CC-NBS-LRR et TIR-NBS-LRR (Meyers *et al.*, 2003).

La perception des effecteurs Avr du pathogène par les protéines R de plante implique différents mécanismes (Jones & Dangl, 2006, Chisholm *et al.*, 2006). D'une part, la reconnaissance peut être directe, la protéine R interagissant physiquement avec l'effecteur du pathogène. Ce type de reconnaissance a été démontré pour différents pathogènes, bactéries, champignons ou oomycètes, par des expériences de double hybride. C'est le cas par exemple de la reconnaissance du facteur d'avirulence Avr-Pita de l'oomycète *Magnaporthe grisea* par la protéine R Pi-ta du riz (Jia *et al.*, 2000), ou encore de l'interaction entre l'effecteur AvrPto de *P. syringae* avec la protéine Pto chez la tomate (Tang *et al.*, 2006). D'autre part, dans de nombreux pathosystèmes, il a été proposé que la reconnaissance de l'effecteur se fasse de manière indirecte (DeYoung & Innes, 2006). Les cellules végétales exprimeraient des protéines dites de garde susceptibles d'interagir avec le complexe formé entre l'effecteur et sa cible de pathogénicité et/ou avec la cible de pathogénicité ayant subi des modifications structurales suite à son interaction avec l'effecteur (*guard hypothesis* ; Dangl & Jones, 2001 ; Van der Biezen & Jones, 1998). Un des exemples les plus documentés concerne la protéine RIN4 (*RPM1 interacting 4*), cible de deux facteurs de virulence de *P. syringae* : AvrRpt2 qui la clive et AvrRpm1 qui la phosphoryle. La modification de RIN4 par ces effecteurs bactériens conduit à sa reconnaissance par RPS2 et RPM1 respectivement, permettant l'activation des défenses de la plante (Kim *et al.*, 2005).

Tableau 1. Classification des gènes de résistance R chez différentes espèces. ■ Domaine protéine kinase ; ■ Domaine leucine zipper/coil-coil (LZ-CC) ; ■ Région transmembranaire ; ■ Site de liaison aux nucléotides (NBS) ; ■ domaine toll/récepteur à l'interleukine 1 (TIR) ; ■ Région riche en leucines répétées (LRR). D'après Nürnberger *et al.*, 2004

Espèce Végétale	Gène R de plantes	Structure	Pathogène	Gène Avr correspondant
Tomate	<i>Pto</i>	■	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	AvrPto
<i>A. thaliana</i>	<i>RPW8</i>	■ ■	<i>Erysiphe</i> spp.	Avr <i>RPW8</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>RPM1</i>	■ ■ ■	<i>P. syringae</i> pv. <i>Maculicola</i>	Avr <i>Rpm1</i> , <i>avrB</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>RPP8</i>	■ ■ ■	<i>Peronospora parasitica</i>	Avr <i>Rpp8</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>RPS2</i>	■ ■ ■	<i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Avr <i>Rpt3</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>RPS5</i>	■ ■ ■	<i>P. syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	Avr <i>PphB</i>
Pomme de terre	<i>Rx</i>	■ ■ ■	Virus X de la pomme de terre	Protéine du virus
Orge	<i>Mla6</i>	■ ■	<i>Blumeria graminis</i>	Avr- <i>M16</i>
Riz	<i>Pi-ta</i>	■ ■	<i>Magnaporthe grisea</i>	Avr <i>Pita</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>RPP5</i>	■ ■ ■	<i>P. parasitica</i>	Avr <i>RPP5</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>RPS4</i>	■ ■ ■	<i>P. syringae</i> pv. <i>Pisi</i>	Avr <i>Rps4</i>
Lin	<i>L6</i>	■ ■ ■	<i>Melampsora lini</i>	Avr <i>L6</i>
Lin	<i>Mla6</i>	■ ■ ■	<i>M. lini</i>	Avr <i>M</i>
Tabac	<i>N</i>	■ ■ ■	Virus de la mosaïque du tabac	Replicase
Tomate	<i>Cf-2</i>	■ ■	<i>Cladosporium fulvum</i>	Avr2
Tomate	<i>Cf-4</i>	■ ■	<i>C. fulvum</i>	Avr4
Tomate	<i>Cf-5</i>	■ ■	<i>C. fulvum</i>	Avr5
Tomate	<i>Cf-9</i>	■ ■	<i>C. fulvum</i>	Avr9
Riz	<i>Xa21</i>	■ ■ ■	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	Avr <i>Xa21</i>

3. La transduction du signal

3.1 La signalisation précoce

La reconnaissance du pathogène conduit à la mise en place d'évènements de signalisation intracellulaire concourant à l'activation d'une réponse adaptative de la plante (Jones & Dangl, 2006). Ces évènements précoces, principalement documentés pour l'immunité basale dépendante de la perception d'éliciteurs, font intervenir un grand nombre d'acteurs.

Parmi les premiers évènements de signalisation mesurés suite à la perception d'un pathogène figurent des flux d'ions à travers la membrane plasmique, notamment des influx de Ca^{2+} et des efflux de NO_3^- ou Cl^- puis de K^+ . Ces mouvements d'ions déclenchent une dépolarisation membranaire, dont l'amplitude et la durée dépendent de l'éliciteur (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Le Ca^{2+} entrant est considéré comme un second messenger clé des processus de signalisation cellulaire induits par la reconnaissance du pathogène (Dodds &

Rathjen, 2010). Ces flux d'ions agissent en amont d'autres événements de signalisation incluant notamment l'activation des modules MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) et des CDPK (*Ca²⁺-dependant protein kinases*) responsables de processus de phosphorylation/déphosphorylation (Rodriguez *et al.*, 2010). De plus, ils opèrent en amont de la production précoce de formes actives de l'oxygène (FAO) et de l'azote (*Reactive Nitrogen Species* ou RNS). Les FAO, dont les principales sont le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂^{•-}), limitent le développement du pathogène de façon directe grâce à leur toxicité mais également en participant au renforcement des parois cellulaires de la plante. Elles sont également impliquées dans la cascade de signalisation cellulaire et, dans certains modèles d'études, contribueraient à la mise en place de la réponse hypersensible (HR) (Lamb & Dixon, 1997 ; voir le paragraphe 4.4 de cette section). Le RNS le plus étudié est le monoxyde d'azote (NO). Il est produit en réponse aux éliciteurs et contribue aux cascades de signalisation cellulaire conduisant à l'expression des réponses de défense des plantes (Lamotte *et al.*, 2006 ; voir la troisième partie de cette introduction).

Ces événements précoces de signalisation peuvent être communs à la PTI et à l'ETI (Tsuda & Katagiri, 2010 ; figure 1) et ont été décrits dans de nombreux pathosystèmes (voir par exemple Gomez-Gomez & Boller, 2000, Stergiopoulos & de Wit, 2009, Garcia-Brugger *et al.*, 2006).

3.2 Le rôle des phytohormones

Outre leur implication dans de nombreux processus physiologiques, certaines phytohormones jouent un rôle essentiel dans les réponses de défense de la plante. C'est le cas de l'acide salicylique (SA), de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène (ET) dont le rôle majeur dans la résistance aux micro-organismes pathogènes a été démontré il y a de nombreuses années (Glazebrook, 2005 ; Lorenzo & Solano, 2005 ; Broekaert *et al.*, 2006 ; Loake & Grant, 2007 ; Balbi & Devoto 2008). Plus récemment, ces études ont été complétées par la découverte de la participation d'autres phytohormones, initialement connues pour leur implication dans le développement, à la mise en place des réponses adaptatives des plantes à des stress biotiques et abiotiques (Pieterse *et al.*, 2009). C'est par exemple le cas des brassinostéroïdes, des auxines, des gibbérellines, des cytokinines et de l'acide abscissique (ABA).

Les mécanismes moléculaires régissant l'implication de ces phytohormones dans les voies de défense des plantes demeurent peu connus (Bari & Jones, 2009). D'après Pieterse *et al.* (2009), chacune d'entre elles déclenche des voies de signalisation spécifiques, bien qu'une interdépendance entre ces voies ne soit clairement établie. Ainsi, la spécificité de réponse découlera d'une balance hormonale caractéristique d'un pathosystème donné (Thomma *et al.*, 2001). La signalisation dépendante de la production de SA est généralement associée à l'attaque de pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes, alors que la signalisation dépendante du JA ou de l'ET est associée aux réponses de défense induites contre des pathogènes nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts (Glazebrook, 2005). Ces trois voies contribuent à la régulation de l'expression de gènes de défense propres à chacune, qui se traduira par la mise en place des réponses de défense (Bari & Jones, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2009).

4. Les réponses de défense

Les voies de signalisation cellulaire activées dans les cellules végétales suite à la reconnaissance des micro-organismes pathogènes conduisent à l'expression des défenses de la plante (figure 2). L'induction de ces défenses implique une reprogrammation de l'expression de certains gènes, notamment les gènes de défense. Cette modulation de l'expression génique, en partie commune à la PTI et à l'ETI (Tsuda & Katagiri, 2010), concerne principalement des gènes codant des protéines PR (*pathogenesis-related*), des protéines associées au renforcement des parois cellulaires, à la biosynthèse de composés antimicrobiens et à la mise en place de la HR.

4.1 Le renforcement de la paroi cellulaire

Après reconnaissance du pathogène, un renforcement de la paroi au site d'infection est observé. Ce renforcement consiste en une réorganisation structurale et chimique de la paroi *via* le dépôt de molécules nouvellement synthétisées. Les FAO permettent ce renforcement en catalysant la lignification des parois végétales (Huckelhoven, 2007). Cette lignification permet une meilleure résistance à la pression mécanique et limite la progression du pathogène. Un dépôt de callose, polymère de β 1-3 glucanes, est souvent observé au point

d'infection (Trouvelot *et al.*, 2008 ; Ahn *et al.*, 2007). En plus de ces dépôts, on observe une accumulation de composés phénoliques toxiques (Lherminier *et al.*, 2003) ainsi que le recrutement de protéines chargées d'inhiber les enzymes hydrolytiques sécrétées par le pathogène en vue de détruire la paroi végétale (De Lorenzo & Ferrari, 2002).

4.2 La synthèse de composés anti-microbiens

En plus du renforcement pariétal, les réponses de défense se caractérisent par la production de composés toxiques directement adressés contre le micro-organisme pathogène. Ces composés, de natures variées, synthétisés suite à une infection ou une élicitation, sont regroupés sous le terme de phytoalexines (Hammerschmidt, 1999). La phytoalexine la plus caractéristique d'*A.thaliana* est la camalexine. Elle confert à la plante une résistance contre certaines souches de *P. syringae* et *B. cinerea* (Glazebrook & Ausubel, 1994). Les glucosinolates chez les Brassicacées, importants dans la défense contre les herbivores (Halkier & Gershenzon, 2006), ou les stilbènes chez la vigne représentent d'autres exemples de phytoalexines.

4.3 Production de protéines PR

Les protéines PR sont produites en réponse à de nombreux pathogènes chez un grand nombre d'espèces végétales comme la tomate, le tabac, le persil, l'orge ou encore *A. thaliana*. L'expression des gènes correspondants est sous le contrôle des phytohormones SA, JA et/ou ET (Van Loon *et al.*, 2006). Les protéines PR possèdent des rôles biologiques différents et ont été classées en 17 familles selon leurs propriétés biochimiques. La plupart possèdent des propriétés antimicrobiennes et agissent au travers d'activités hydrolytiques, se traduisant par la dégradation de la paroi du pathogène ou par une toxicité vis-à-vis du pathogène. C'est le cas des β 1-3 glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3, -4, -8 et -11), des endoprotéases (PR-7), ou encore des défensines (PR-12), thionines (PR-13) et de certaines protéines de transfert de lipides (PR-14). Certaines ciblent préférentiellement les oomycètes, comme PR-1, dont la fonction reste inconnue, ou les *thaumatin-like* protéines (PR-5); d'autres ciblent les virus, comme certaines *ribonuclease-like* protéines (PR-10). La classe 6 regroupe les inhibiteurs de protéases et ciblerait les nématodes et les insectes herbivores. Enfin, certaines possèdent des activités superoxyde dismutase, comme les classes 15 et 16,

permettant la génération d'H₂O₂, qui suivant le contexte physiologique peut s'avérer toxique ou jouer un rôle de signalisation. Les peroxydases (PR-9) seraient quant à elles impliquées dans le renforcement de la paroi végétale (Van Loon *et al.* 2006).

4.4 La réponse hypersensible (HR)

Comme souligné précédemment, la HR est une forme de mort cellulaire programmée. Ce processus est considéré par certains auteurs comme l'étape finale de la mise en place de la résistance (Mur *et al.*, 2008). Elle est observée dans de nombreuses interactions plantes/micro-organismes et se caractérise par une mort cellulaire localisée au site d'infection du pathogène, entraînant l'apparition de lésions macro- ou microscopiques quelques heures après le début de l'infection (Heath, 2000).

Il est communément admis que la HR aurait pour but le confinement du pathogène en son site d'infection en réduisant l'accès aux nutriments disponibles (Greenberg & Yao, 2004). Cette stratégie s'avère appropriée lors d'une infection par un pathogène biotrophe ou hémibiotrophe, qui nécessite des cellules vivantes de l'hôte pour se développer (Glazebrook, 2005). En revanche, la HR favoriserait le développement de pathogènes nécrotrophes, qui se nourrissent de tissus morts, tels que le champignon *B. cinerea* (Govrin & Levine, 2000). La HR est généralement associée à la résistance spécifique des plantes. Elle concerne en effet majoritairement les défenses déclenchées à la suite de la reconnaissance d'un effecteur. Toutefois, certains PAMP, comme l'harpine, peuvent induire des réactions de HR (Jones & Dangl, 2006).

La HR se caractérise par plusieurs événements cellulaires incluant la condensation du cytoplasme et de la chromatine, le relargage du cytochrome c de la mitochondrie ou encore l'activation de protéases à cystéine (Mur *et al.*, 2008). Toutefois les mécanismes moléculaires précis concourant à l'établissement de la HR demeurent aujourd'hui sujets à controverse. Ceci tient probablement au fait que les événements sous-jacents à sa mise en place varient suivant le pathosystème et même l'effecteur considéré. Par exemple chez *A. thaliana*, le gène *NDR1* réprime la HR lors de l'infection par certaines des souches avirulentes de *P. syringae* produisant AvrB, alors qu'il participe à l'induction de la HR lors d'une infection par des souches synthétisant l'effecteur AvrRpt2 (Shapiro & Zhang, 2001).

Certains événements cellulaires précocement mobilisés en réponse aux éliciteurs, effecteurs ou micro-organismes pathogènes ont été associés au développement de la HR. C'est par exemple le cas de l'efflux d'anions et des changements de la concentration en Ca^{2+} libre cytosolique observés dans des suspensions cellulaires de tabac traitées par l'élicitrine cryptogéine (Lecourieux *et al.*, 2006 ; Wendehenne *et al.*, 2002 ; voir la seconde partie de cette introduction). De même, si le NO ou l' H_2O_2 seuls ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'induction de la HR, c'est la régulation de la balance NO/FAO qui est nécessaire à l'établissement de la HR (de Pinto *et al.*, 2002 ; Delledonne *et al.*, 2001). Enfin, la production de FAO, peut-être en complément de l'action de lipoxgénases, conduit à la peroxydation des lipides, mécanisme impliqué dans l'établissement de la HR (Montillet *et al.*, 2005 ; Mur *et al.*, 2008)

4.5 La potentialisation

L'efficacité des défenses de la plante dépend, en plus de la reconnaissance du pathogène, de la rapidité et de l'intensité des réponses cellulaires conduisant à la résistance (Conrath *et al.* 2006). L'application de certains composés, ou d'un premier stress, peut conduire à un état physiologique dans lequel la plante pourra mobiliser ses mécanismes de défense plus efficacement lors d'un stress ultérieur, identique ou non au premier. Ce phénomène est appelé potentialisation, ou « priming » (Conrath *et al.*, 2002).

Plusieurs composés ou situations sont connus pour conduire à ce genre de phénomène chez les plantes, même si les mécanismes moléculaires et génétiques impliqués demeurent peu connus. Ainsi, la potentialisation peut être induite par un pathogène, conduisant notamment à la résistance systémique acquise (SAR, Sticher *et al.*, 1997), par des organismes bénéfiques tels que les rhizobactéries ou les mycorhizes, conduisant à la résistance systémique induite (ISR ; Pieterse *et al.*, 1996 ; Pozo *et al.*, 2002), ou par la blessure (Ton *et al.*, 2007 ; Chassot *et al.*, 2008).

L'application de certains composés permet également la mise en place du priming. C'est par exemple le cas de certains lipopolysaccharides bactériens, composants de la membrane externe de bactérie Gram-négatives. Un traitement par ces composés confère par exemple une meilleure résistance du poivron vis-à-vis des bactéries *Xanthomonas axonopodis* et *X. campestris* sans présenter d'activité directe sur l'induction de gène de la plante (Newman

et al., 2002). D'autres dérivés bactériens, les exopolysaccharides, sécrétés pendant la croissance bactérienne, induisent une potentialisation, notamment chez le tabac ou le persil (Ortmann *et al.*, 2006). Le SA peut également potentialiser des cellules de persil (Thulke & Conrath, 1998), tout comme son analogue le BTH (acide benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioïque ; Katz *et al.*, 1998). La laminarine sulfatée, un β 1-3 glucane, possède également des propriétés potentialisatrices chez la vigne (Trouvelot *et al.*, 2008). Enfin, l'acide aminé non-protéique BABA (acide β -aminobutyrique) permet la potentialisation de plusieurs espèces végétales comme la tomate, la vigne ou encore *A. thaliana* (Oka *et al.*, 1999 ; Hamiduzzaman *et al.*, 2005 ; Zimmerli *et al.*, 2001).

4.6 La résistance systémique acquise (SAR)

La SAR est une forme de résistance qui s'établit dans toutes les cellules saines de la plante par l'intermédiaire du système vasculaire après une infection par un pathogène (Sticher *et al.*, 1997). Elle permet la protection de la plante contre une attaque ultérieure par un large spectre de pathogènes, et est effective pendant plusieurs semaines au moins (Durrant & Dong, 2004). De plus, une augmentation de l'expression des gènes codant certaines protéines PR est observée lors de la SAR, participant au maintien de l'état de résistance de la plante (Durrant & Dong, 2004 ; Maleck *et al.*, 2000)

L'établissement de la SAR fait intervenir la voie de signalisation dépendante du SA, celui-ci s'accumulant au point d'infection mais également dans les tissus non infectés (Durrant & Dong, 2004). Toutefois, le SA n'est pas le signal utilisé pour la propagation distale de la résistance (Vernooij *et al.*, 1994). Des travaux récents ont cherché à identifier les signaux impliqués dans l'établissement de la SAR. Ainsi, un dérivé inactif du SA, le méthyl salicylate (MeSA) est un des acteurs de l'établissement de la SAR (Park *et al.*, 2007a). Il est véhiculé par le système vasculaire et permet une production de SA à des sites distaux de l'infection par l'action de protéines comme SABP2 (*SA binding protein 2*), qui possède une activité MeSA estérase (Vlot *et al.*, 2008).

4.7 La résistance systémique induite (ISR)

Certaines interactions bénéfiques entre les plantes et des rhizobactéries ou des mycorhizes conduisent à la mise en place de l'ISR (Van Loon *et al.*, 1998 ; Pozo & Azcon-Aguilar, 2007).

L'ISR confère une meilleure résistance à la plante lors d'attaques ultérieures par des pathogènes (Pieterse *et al.*, 1996). Cette résistance utilise des voies de signalisation en partie différentes de la SAR puisqu'elle est régulée par le JA et l'ET, et ne dépend pas du SA (Van der Ent *et al.*, 2009). L'ISR induit une modulation de l'expression de gènes, majoritairement impliqués dans la défense ou la régulation de la transcription, au niveau des racines (Verhagen *et al.*, 2004). De plus, l'ISR induit une potentialisation systémique des défenses de la plante, caractérisées lors d'une infection ultérieure par une augmentation de l'expression génique et un dépôt de callose et de pectine au niveau des feuilles (Verhagen *et al.*, 2004 ; Cordier *et al.*, 1998).

4.8 La résistance systémique induite par blessure

Lors de l'attaque d'insectes herbivores, certaines plantes mettent en place des mécanismes de résistance systémique, dépendants de la production de JA, dans le but d'altérer le développement de l'herbivore (Schilmiller & Howe, 2005). De plus, des mécanismes de potentialisation interindividuelle sont activés *via* la production de composés organiques volatiles (VOC), permettant une communication entre des plantes voisines (Engelberth *et al.*, 2004 ; Ferry *et al.*, 2004). Par exemple, l'exposition d'un plant sain de maïs aux VOC produits par un plant attaqué par le ver du cotonnier conduit à une potentialisation de l'expression de gènes de défense. Cette potentialisation est corrélée à un moindre développement de la larve et à une attraction de la guêpe *Cotesia marginiventris*, un parasite de la larve (Ton *et al.*, 2007)

Une blessure mécanique peut également potentialiser les défenses des plantes. C'est par exemple le cas chez *A. thaliana* où une blessure induite par pincement de la feuille diminue le développement du pathogène *B. cinerea*. Cette résistance s'accompagne d'une plus forte production de phytoalexines (Chassot *et al.*, 2008)

Partie 2 : Le modèle tabac/cryptogéine

1. Les *Phytophthora*

Les *Phytophthora* constituent un genre du groupe des Oomycètes, un ensemble de micro-organismes comprenant environ 500 espèces. Longtemps classés parmi les champignons, les Oomycètes constituent aujourd'hui un phylum à part entière, basé sur des critères à la fois morphologiques et moléculaires. Ce sont des organismes hétérotrophes, dont l'une des caractéristiques est qu'ils ne peuvent synthétiser les stérols nécessaires à leur reproduction, puisqu'indispensables à la formation des zoospores (Hendrix & Guttman, 1970).

Les *Phytophthora* constituent une famille de phytopathogènes pouvant se révéler virulents pour un grand nombre d'espèces végétales. C'est par exemple le cas de *Phytophthora infestans*, l'agent responsable du mildiou de la pomme de terre, qui causa la famine qui décima l'Irlande dans le milieu du XIXème siècle. Plus récemment, une autre espèce de *Phytophthora*, *P. ramorum*, a infecté et causé la mort de plusieurs dizaines de milliers de chênes et de plantes ornementales dans le sud des Etats-Unis, principalement en Californie et en Oregon (Grünwald *et al.*, 2008). Le grand nombre d'espèces de phytophthora, la virulence de certaines de ces espèces ainsi que le large spectre d'hôtes concernés font de ce genre un excellent choix comme modèle d'étude des interactions plantes/pathogènes.

Parmi les différentes espèces de *Phytophthora*, il existe des pathogènes du tabac. En effet, certains pathovars de *P. parasitica* provoquent la maladie du pied-noir du tabac. Elle se caractérise par un pourrissement des jeunes pousses en cours de germination ou du collet des plantes adultes, faisant apparaître des taches noires. Une autre espèce de *Phytophthora*, *P. cryptogea*, va conduire lors d'un contact avec des plants de tabac à un nanisme des plantes et à l'apparition de zones de mort cellulaire localisées (Csinos & Hendrix, 1977). Toutefois, aucun symptôme d'infection comparable à la présence de *P. parasitica* n'est observé, témoignant d'un phénomène de résistance des plants de tabac à *P. cryptogea*. De plus, de manière remarquable, un plant de tabac prétraité par *P. cryptogea* présente une résistance à une infection ultérieure par *P. parasitica*, caractérisée d'une part par l'apparition de lésions nécrotiques témoignant de la mise en place d'une HR et d'autre part

par l'établissement de la SAR (Csinos & Hendrix, 1977). Ces observations ont conduit à la recherche des signaux du pathogène perçus par la plante et permettant la mise en place de ces phénomènes. Des travaux ont alors révélé que les *Phytophthora* produisent des protéines, appelées élicitines, responsables du déclenchement des réponses de défense chez le tabac (Bonnet & Rouse, 1988).

2. Les élicitines des oomycètes

2.1 Caractéristiques générales et fonctions

Les élicitines sont des protéines globulaires d'environ 10 kDa sécrétées par les *Phytophthora* qui possèdent plusieurs caractéristiques structurales communes. Elles sont toutes constituées de 98 acides aminés sous leur forme mature, et présentent une très forte homologie de séquence, de plus de 70 % d'identité pour les formes les plus éloignées (figure 3).

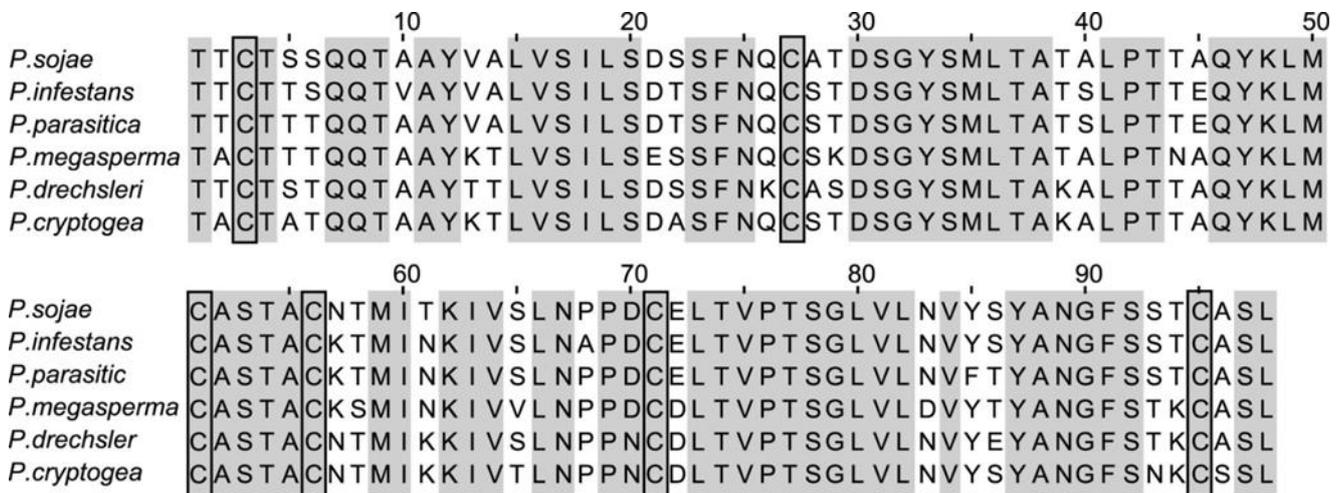


Figure 3. Alignement de séquences d'élicitines secrétées par différentes espèces de phytophthora. Les élicitines de *P. sojae*, *P. infestans* et *P. parasitica* présentées sont des α -élicitines. Les trois autres, dont la cryptogéine sécrétée par *P. cryptogea*, sont des β -élicitines. Les acides aminés présentant des identités de séquence sont présentés sur fond gris. Les six résidus cystéines conservés impliqués dans la formation des ponts disulfures sont encadrés en noir.

Leurs séquences sont notamment caractérisées par la présence de 6 résidus cystéines conservés, impliqués dans leur structure tridimensionnelle *via* la formation de ponts disulfures essentiels à leur activité (Boissy *et al.*, 1996 ; Fefeu *et al.*, 1997 ; figure 3).

Les élicitines sont réparties en deux classes distinctes définies selon leur point isoélectrique. Les α -élicitines, présentant un pI inférieur à 5, qui ne possèdent que peu ou pas de propriétés nécrosantes, et les β -élicitines, d'un pI supérieur à 7,5, qui sont très nécrosantes et induisent une meilleure protection de la plante hôte (Ricci *et al.*, 1989). Toutes les espèces de *Phytophthora* possèdent des gènes codant des élicitines. Plus précisément, les *Phytophthora* produisent toutes des α -élicitines, tandis que les β -élicitines sont sécrétées par une quantité plus restreinte d'espèces (Ponchet *et al.*, 1999).

La structure tridimensionnelle des élicitines a pu être établie à partir de celle de la cryptogéine, obtenue par diffraction aux rayons X (Boissy *et al.*, 1996 ; figure 4) et par résonance magnétique nucléaire (Fefeu *et al.*, 1997). Elle se caractérise par 6 hélices α constituant une face hydrophile en contact avec le solvant, ainsi que de deux feuilletts β et une boucle Ω définissant une cavité hydrophobe (figure 4 ; Ponchet *et al.*, 1999). Cette cavité hydrophobe confère aux élicitines la capacité de lier les stérols végétaux avec lesquels elles forment des complexes de forte affinité (Mikes *et al.*, 1997). De plus, il a été démontré que la cryptogéine catalyse le transfert de stérols entre des membranes biologiques (Mikes *et al.*, 1998 ; Vauthrin *et al.*, 1999). Le rôle des élicitines serait donc de capturer les stérols à partir des membranes végétales des cellules hôtes afin d'approvisionner le micro-organisme (Ponchet *et al.*, 1999). En effet, comme souligné précédemment, les *Phytophthora* sont incapables de synthétiser les stérols nécessaires à leur reproduction. Cette fonction indispensable justifie la conservation des gènes codant les élicitines chez les différentes espèces de *Phytophthora* au cours de l'évolution.

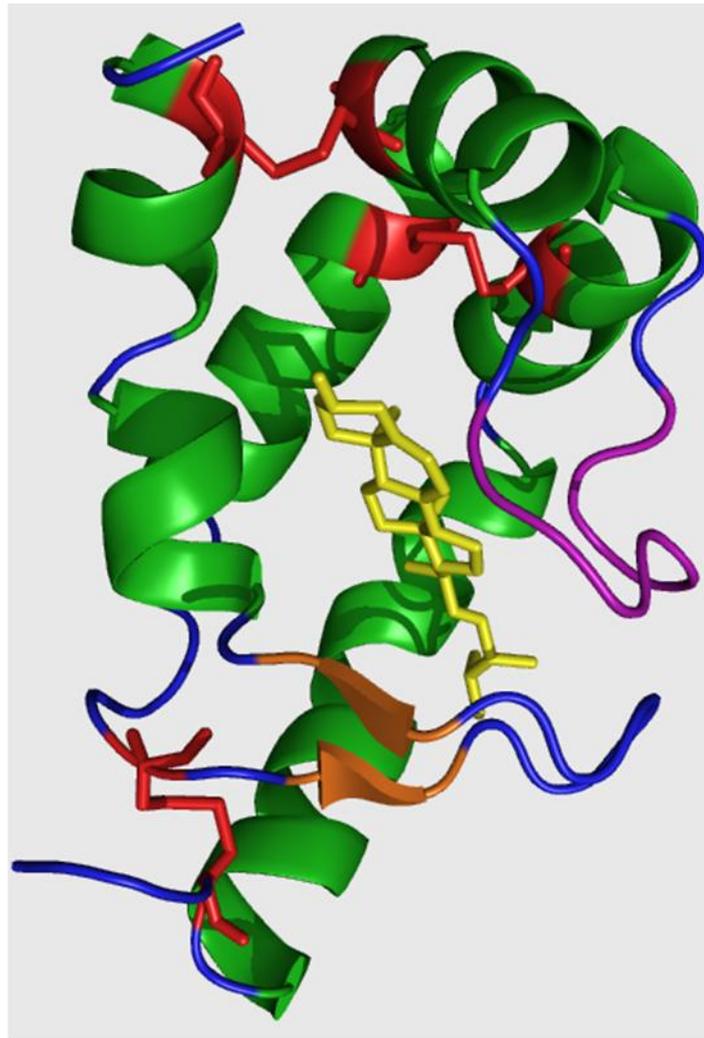


Figure 4. Structure tridimensionnelle de la cryptogéine complexée à l'ergostérol (jaune) obtenue par rayon X. La cryptogéine présente 6 hélices α (représentées en vert), 2 feuillets β (représentés en orange) et une boucle Ω (représentée en pourpre). Cette structure est obtenue grâce à l'établissement de 3 ponts disulfures entre les 6 résidus cystéines conservés (représentées en rouge).

2.2 Impact sur les défenses des plantes

Les élicitines ont été testées sur un grand nombre d'espèces végétales, appartenant à plusieurs familles botaniques. Hormis les espèces appartenant au genre *Nicotiana*, peu de plantes présentent une HR et/ou une SAR lorsqu'elles sont soumises à un traitement par les élicitines. En effet, seules quelques espèces de la famille des *Brassicaceae*, comme le radis ou certaines variétés de colza développent des réponses de type HR après traitement (Kamoun *et al.*, 1993 ; Ponchet *et al.*, 1999). L'origine de cette différence de réactivité entre espèces de plantes reste toutefois inconnue.

Toutes les élicitines produites par les *Phytophthora* permettent le développement de réactions de défense chez le tabac. Ces réponses se traduisent notamment par la mise en

place d'une HR lorsque les élicitines sont infiltrées dans les feuilles (Kamoun *et al.*, 1993) et de la SAR lorsqu'elles sont appliquées sur la tige de tabacs décapités (Bonnet *et al.*, 1996). L'établissement de la SAR nécessite le concours du SA (Keller *et al.*, 1996a) et s'accompagne d'une augmentation de l'expression de gènes *PR* à la fois localement et de manière systémique (Keller *et al.*, 1996b). D'autres mécanismes de défense, comme la peroxydation des lipides membranaires, une production d'ET et de phytoalexines comme le capsidiol sont observés au niveau des zones développant la HR après un traitement par la cryptogéine (Rustérucci *et al.*, 1996 ; Milat *et al.*, 1990). Enfin, un renforcement pariétal est observé chez des tabacs prétraités par la cryptogéine et soumis à une infection ultérieure par *P. parasitica*. Ce renforcement se caractérise par un dépôt de callose et d'un gel de pectate de calcium au site d'infection, permettant de limiter la pénétration intracellulaire du micro-organisme par une meilleure résistance mécanique et par le piégeage des hyphes intercellulaires (Lherminier *et al.*, 2003).

3. La cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense chez le tabac

La cryptogéine est une β -élicitrine produite par *P. cryptogea* qui confère la protection de plants de tabac contre une infection ultérieure par d'autres souches pathogènes (Ricci *et al.*, 1989). Des travaux réalisés sur suspensions cellulaires de tabac ont montré que la cryptogéine constitue l'une des élicitines les plus réactives en terme d'induction de réponses de défense (Rustérucci *et al.*, 1996 ; Bourque *et al.*, 1998). Outre l'affranchissement des contraintes environnementales et systémiques inhérentes à l'utilisation de plantes entières, les suspensions cellulaires de tabac ont constitué un modèle biologique de grand intérêt afin d'appréhender les événements de signalisation cellulaire sous-jacents à l'activation des réponses de défense déclenchées par la cryptogéine. Ces événements, décrits ci-dessous, sont résumés figure 5.

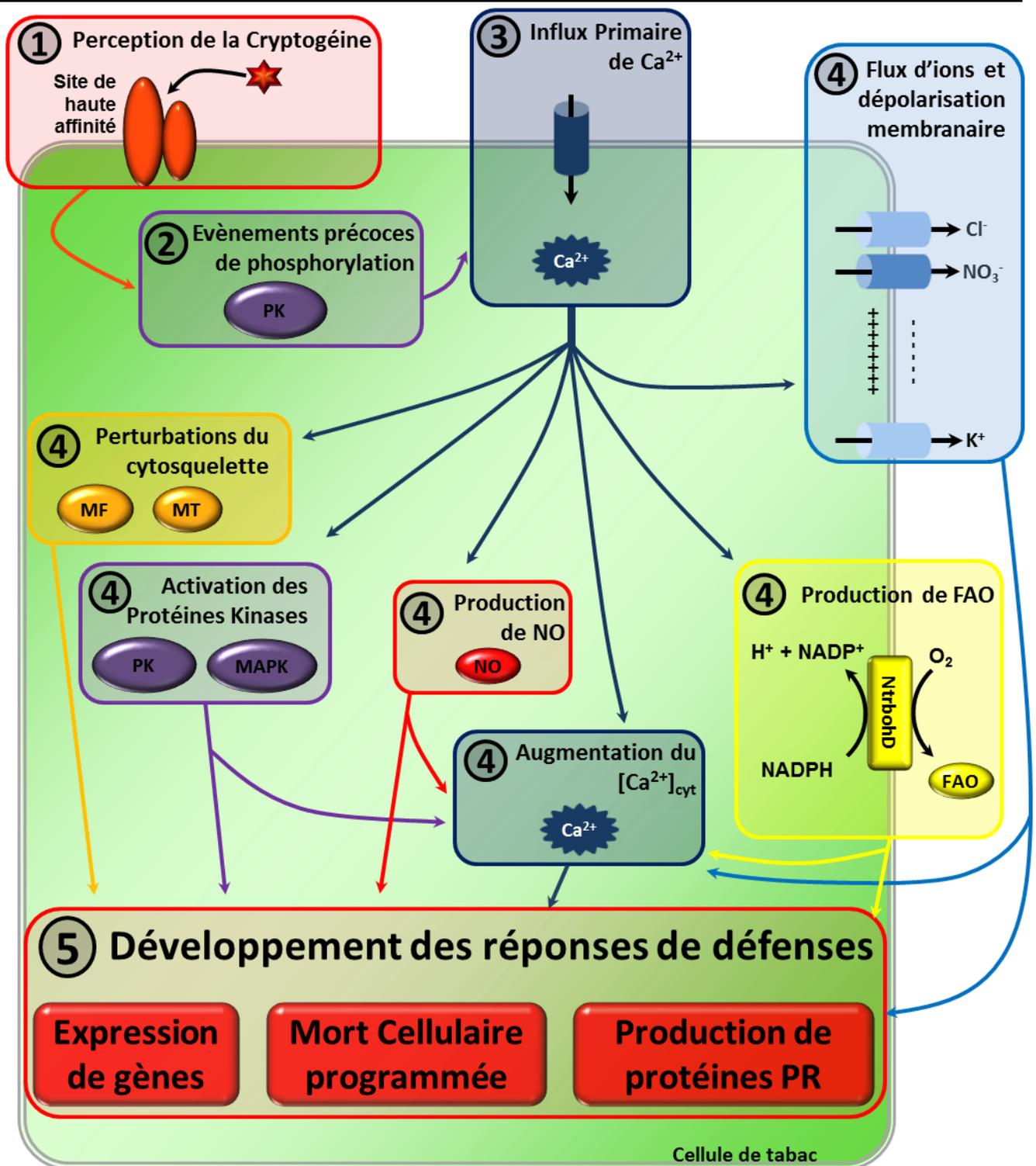


Figure 5. Représentation schématique des évènements déclenchés par la cryptogéine dans des suspensions cellulaires de tabac. La cryptogéine est reconnue par des sites de haute affinité de la membrane plasmique présentant des caractéristiques biochimiques de récepteur (①). Cette perception est suivie d'évènements de phosphorylation impliquant des protéines kinases (PK ; ②) agissant en amont d'un influx de Ca²⁺ depuis le milieu extracellulaire (③). Cet influx de Ca²⁺ est préalable et nécessaire à la mobilisation d'autres acteurs de signalisation (④). Parmi ceux-ci figurent des efflux d'anions concourant à une dépoliarisation membranaire compensée par un efflux de potassium, l'activation de la NtrbohD membranaire impliquée dans la formation de FAO à partir du NADPH et du dioxygène, une production de NO et l'activation de protéines kinases, dont des MAPK. Ces évènements contribuent à une augmentation de la concentration en calcium libre cytosolique ([Ca²⁺]_{cyt}) impliquée dans la mort cellulaire. De plus, une perturbation du cytosquelette de la cellule est observée, notamment une dépolymérisation des microtubules (MT) et une réorganisation des microfilaments d'actines (MF). L'ensemble de ces évènements conduit à l'expression des défenses de la cellule (⑤) manifestées par une modulation de l'expression génique conduisant à l'expression de protéines PR, la synthèse de phytoalexines et une mort cellulaire programmée.

3.1 Reconnaissance de la cryptogéine

La première étape de l'établissement de la signalisation cellulaire conduisant à l'expression des défenses des cellules de tabac concerne la reconnaissance de l'éliciteur. Une étude pionnière utilisant de la cryptogéine marquée à l'iode radioactif a permis la mise en évidence de l'existence de sites de haute affinité pour l'élicitine, présents sur la membrane plasmique des cellules de tabac à faible concentration. La cryptogéine fixe ces sites de façon saturable et réversible, avec un K_d de 2 nM (Wendehenne *et al.*, 1995). Des travaux ultérieurs ont permis la caractérisation biochimique de ces sites de haute affinité (Bourque *et al.*, 1999). Plus précisément, des expériences de cross-linking ont permis d'identifier deux protéines plasmalemmiques formant un complexe s'associant à la cryptogéine. Ces deux protéines, de masses moléculaires de 162 et 50 kDa, sont liées à leurs extrémités N-ter à des groupements glycosyles qui seraient impliqués directement dans la reconnaissance de l'éliciteur et constitueraient les deux sous-unités du site de fixation de la cryptogéine (Bourque *et al.*, 1999). Les tentatives d'identification de ces protéines n'ont malheureusement pas abouti. La reconnaissance de la cryptogéine par ces sites de haute affinité est corrélée à la faculté de la cryptogéine à fixer les stérols. En effet, des mutations de la cryptogéine diminuant son affinité pour les stérols impactent sa fixation aux sites de haute affinité et son activité biologique sur cellules. Il apparaît donc que le récepteur potentiel de la cryptogéine lie le complexe élicitine/stérol plutôt que la cryptogéine seule (Osman *et al.*, 2001).

3.2 Signalisation précoce induite par la cryptogéine

La reconnaissance de la cryptogéine déclenche des événements de signalisation cellulaire mobilisés durant la première heure suivant sa perception, conduisant ainsi à l'expression des défenses.

Cette cascade de signalisation implique dans une première étape des réactions de phosphorylation impliquant l'activation de protéines kinases (PK) et/ou une inhibition de protéines phosphatases (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs de PK bloque l'effet de la cryptogéine alors que des inhibiteurs de phosphatases le miment en partie. Ainsi, dans les cinq premières minutes suivant le traitement par la cryptogéine, une vingtaine de protéines subissent des événements de phosphorylation (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000).

Ces évènements de phosphorylation précoces sont suivis d'un influx de Ca^{2+} extracellulaire, qui constitue la seconde étape de la cascade de signalisation déclenchée par la cryptogéine. Cet influx de calcium contrôle l'ensemble des évènements situés en aval, puisque le blocage des canaux calciques par du chlorure de lanthane empêche leur mise en place (Tavernier *et al.*, 1995). Il contribue à une augmentation de la concentration en Ca^{2+} libre cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) (Lecourieux *et al.*, 2002) et nucléaire (Lecourieux *et al.*, 2005) observée dans les cinq à dix premières minutes de traitement des suspensions cellulaires de tabac par l'éliciteur.

L'influx initial de Ca^{2+} extracellulaire entraîne des flux d'ions au travers de la membrane plasmique, notamment des efflux d'anions incluant le chlore et le nitrate (Pugin *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002). Les efflux d'anions, de même que l'influx de Ca^{2+} , sont à l'origine d'une forte dépolarisation membranaire (Gauthier *et al.*, 2007). Cette dernière est compensée par un efflux ultérieur de potassium (Pugin *et al.*, 1997). De plus, l'efflux de nitrate agit en amont d'une alcalinisation du milieu extracellulaire, d'une production de FAO et enfin de l'induction de gènes de défense, notamment *hsr203J* (*hypersensitive-related gene 203 J*) et *VPE* (*vacuolar processing enzymes*) classiquement associés au développement de la HR (Pugin *et al.*, 1997 ; Wendehenne *et al.*, 2002 ; Simon-Plas *et al.*, 2002 ; Gauthier *et al.*, 2007).

L'enzyme catalysant la production de FAO en réponse à la cryptogéine a pu être identifiée (Simon-Plas *et al.*, 2002). Il s'agit d'une NADPH oxydase de la membrane plasmique nommée NtrbohD (*respiratory burst oxidase homologue*). Cette enzyme catalyse la réduction du dioxygène en $\text{O}_2^{\bullet-}$ en utilisant le NADPH comme donneur d'électron, conduisant au re-largage d'un proton dans le cytosol (Pugin *et al.*, 1997). L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ formé est rapidement transformé par l'action de la superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 , plus stable, capable de diffuser au travers des membranes (Wojtaszek, 1997). L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut aussi être protoné pour former le radical HO_2^{\bullet} . Enfin, une formation du radical hydroxyle (HO^{\bullet}), l'espèce oxydante la plus puissante connue, peut être observée en présence de fer *via* la réaction de Fenton (Wojtaszek, 1997). Dans le contexte du mode d'action de la cryptogéine, le fonctionnement de NtrbohD contribue à l'acidification du cytosol *via* l'oxydation du NADPH cytosolique (Pugin *et al.*, 1997) et le H_2O_2 produit amplifie l'influx de Ca^{2+} probablement *via* l'activation de canaux perméables au Ca^{2+} localisés sur la membrane plasmique (Lecourieux *et al.*, 2002).

Le peroxyde d'hydrogène participe également indirectement au développement de la HR, notamment *via* la peroxydation des lipides membranaires (Montillet *et al.*, 2005).

L'influx initial de calcium va également conduire à l'activation de PK, en particulier de MAPK Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Les MAPK situées en aval des récepteurs qui perçoivent les micro-organismes jouent un rôle clé dans la transduction du signal conduisant à l'expression des défenses des plantes, notamment par la modulation de l'expression génique (Pitzschke *et al.*, 2009). Ainsi l'activation des protéines SIPK (*SA-induced protein kinase* ; Zhang & Klessig., 1998) et WIPK (*wound-induced protein kinase* ; Zhang *et al.*, 2000) est observée dans des cellules de tabac quelques minutes après un traitement par la cryptogéine. Ces PK seraient impliquées dans le développement de la HR associée à la mise en place des réponses de défense des plantes (Menke *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2000). De plus, une étude récente a pu montrer que des PK nucléaires étaient également activées en réponse à la cryptogéine, notamment SIPK (Dahan *et al.*, 2009a).

Parmi les événements dépendants du Ca^{2+} figure également une production de NO (Lamotte *et al.*, 2004). Des expériences de microscopie confocale réalisées sur des cellules épidermiques de feuilles de tabac ont montré que le NO était produit en premier lieu dans les plastes puis était synthétisé, ou diffusait, rapidement dans le cytosol, la membrane plasmique et le noyau (Foissner *et al.*, 2000). L'hypothèse qu'il puisse diffuser a été renforcée par la démonstration que le traitement de suspensions cellulaires de tabac par la cryptogéine s'accompagne d'une augmentation rapide de la concentration de NO dans le milieu extracellulaire (Besson-Bard *et al.* 2008b). Une fois produit, le NO agit comme acteur dans les voies de signalisation activées par l'éliciteur. En particulier, il contribue à l'enrichissement du cytosol en Ca^{2+} libre *via* la mobilisation du Ca^{2+} stocké dans des réservoirs internes et module l'expression de gènes de défense. Toutefois, il ne participe que partiellement à l'établissement de la mort cellulaire de type HR (Lamotte *et al.*, 2004).

Enfin, parmi les événements cellulaires déclenchés par la cryptogéine, citons une dépolymérisation des microtubules (MT) des cellules de tabac (Binet *et al.*, 2001) et des perturbations de certains réseaux de filaments d'actines (MF). Ces perturbations sont associées à une rupture du tonoplaste corrélée à une mort cellulaire (Higaki *et al.*, 2007).

Partie 3 : Le monoxyde d'azote, un acteur essentiel de la signalisation chez les plantes

Le NO est un gaz diatomique ubiquitaire impliqué dans de nombreuses réactions chez tous les règnes du vivant. Sous sa forme radicalaire (NO^\bullet), le NO possède un électron non apparié sur son orbitale non-liante $2p-\pi$ et son temps de demi-vie est de l'ordre de quelques secondes. La perte de cet électron engendre la formation du cation nitrosonium (NO^+) tandis que le gain d'un électron formera le radical nitroxyle (NO^-), chacun de ces composés présentant des propriétés et réactivités propres (voir le paragraphe 3.2 de cette section ; Stamler *et al.* 1992). Pour la suite de ce travail, nous utiliserons le terme NO pour désigner aussi bien NO^\bullet , NO^+ que NO^- . Les principales connaissances des fonctions physiologiques du NO chez les organismes vivants sont essentiellement issues de travaux réalisés chez les mammifères depuis les années 1980. Il ressort de ces travaux que le NO est un médiateur physiologique qui participe à de nombreux processus, en particulier les réponses de défense, la vasodilatation sanguine, la neurotransmission, la reproduction, l'embryogenèse, l'inflammation ou encore l'apoptose. La possibilité que le NO puisse également jouer un rôle physiologique chez d'autres organismes a été appréhendée depuis une quinzaine d'années. Chez les micro-organismes, des études ont par exemple démontré que le NO induit l'expression de gènes impliqués dans les réponses aux stress oxydatifs, à la micro-aérobie et prend part à la transduction du signal dans les phénomènes de pathogénicité et de résistance (Crane *et al.*, 2010 ; Meilhoc *et al.*, 2010). Chez les plantes, de prolifiques travaux ont permis de mettre en évidence que le NO présente une fonction signalétique et est impliqué dans divers processus (Wilson *et al.*, 2008 ; Besson-Bard *et al.*, 2008a). Ces aspects sont développés de façon plus détaillées ci-dessous.

1. La synthèse du NO

La capacité des plantes à produire et émettre du NO dans l'atmosphère est établie depuis de nombreuses années (voir par exemple Klepper, 1979). Toutefois, la communauté scientifique ne s'est intéressée que récemment aux mécanismes moléculaires sous-jacents à cette synthèse. Afin de mieux cerner ces mécanismes, il est nécessaire dans un premier temps de décrire les principaux systèmes de synthèse de NO chez les animaux.

1.1 La synthèse du NO chez les animaux

Le NO est synthétisé principalement par voie enzymatique, *via* une famille de protéines appelées oxyde nitrique synthase (NOS: *nitric oxide syntases*). Ces enzymes catalysent la formation de L-citrulline et de NO à partir de L-arginine (L-Arg) *via* son oxydation. Chez l'homme, 3 isoformes de NOS ont été caractérisées. Deux d'entre elles sont constitutives, les NOS endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS), et une est inductible (iNOS). Toutes ces enzymes nécessitent le concours de plusieurs cofacteurs, notamment la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la calmoduline (CaM) et la tétrahydrobioptérine (BH₄).

De façon simplifiée, l'activité des eNOS et nNOS est dépendante de la fixation d'une CaM chargée en Ca²⁺. Leur activation conduit à une libération rapide, de courte durée, et faible de NO (pmol/min/mg de NOS), classiquement associée à des processus cellulaires dans lesquels le NO intervient en tant que molécule de signalisation. La iNOS peut quant à elle lier une CaM non chargée en Ca²⁺ et conduit à une formation plus importante et prolongée de NO (nmol/min/mg de NOS), plutôt impliquée dans la réponse immunitaire ou dans certaines pathologie, pour lesquelles le NO intervient en tant qu'agent cytotoxique (Beck *et al.*, 1999). Notons que le NO peut également être produit de façon non-enzymatique par réduction chimique des nitrites dans un environnement acide et/ou réducteur (Weitzberg & Lundberg, 1998 ; Zweier *et al.*, 1999). C'est le cas dans certains états pathologiques (Zweier *et al.*, 1995) mais également dans des environnements acides particuliers tels que la lumière de l'estomac (Benjamin *et al.*, 1994).

1.2 La synthèse du NO chez les plantes

L'origine de la production du NO chez les plantes est établie de façon moins certaine que chez les mammifères. Toutefois, plusieurs voies de synthèses, regroupées en deux principales, ont pu être caractérisées. La formation de NO peut ainsi provenir de voies réductrices, notamment par la réduction de nitrates, ou de voies oxydatives, à partir de composés dérivés de l'arginine, des polyamines ou des hydroxylamines (Moreau *et al.*, 2010 ; figure 6).

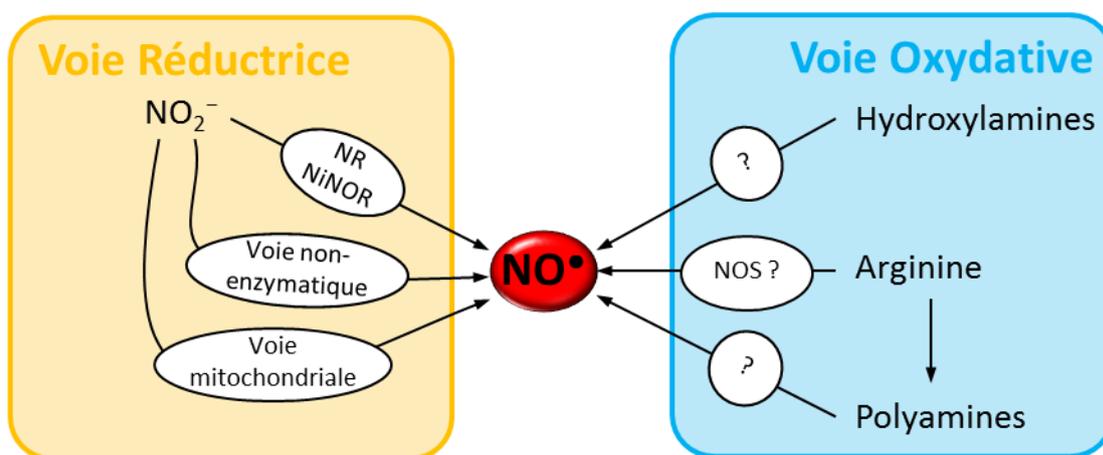


Figure 6. La synthèse de NO chez les plantes. Deux voies principales, l'une réductrice et l'autre oxydative contribuent à la synthèse du NO. La voie réductrice correspond à la réduction du nitrite (NO_2^-) et implique la respiration mitochondriale, la nitrate réductase (NR), la nitrite:NO réductase (NiNOR) ou encore un environnement fortement acide ou réducteur (voie non-enzymatique). La voie oxydative utilise comme substrat la L-arginine, des polyamines, ou des hydroxylamines. Les enzymes impliquées dans la voie oxydative ne sont pas connues. D'après Moreau *et al.*, 2010

1.2.1 Voie réductrice

La nitrate réductase (NR) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse principalement la réduction du nitrate en nitrite en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électron (Crawford, 1995). Cette enzyme peut également réduire le nitrite en NO. Toutefois, cette activité enzymatique est secondaire et ne représente que 1% de l'activité totale de la NR (Planchet *et al.*, 2005). Cette réaction est plus importante lors d'hypoxie et nécessite une concentration élevée en nitrite (Rockel *et al.*, 2002). Le NO produit par la NR est impliqué dans différents processus physiologiques tels que la fermeture des stomates (Neill *et al.*, 2008), la réponse à des stress abiotiques (Sang *et al.*, 2008) ou encore la réponse à des éliciteurs tels que le chitosane (Srivastava *et al.*, 2009).

Une seconde activité enzymatique associée à la synthèse de NO à partir du nitrite a pu être détectée sur des fractions membranaires de cellules de racines de tabac (Stohr *et al.*, 2001), la NiNOR (nitrite:NO réductase). Cette enzyme plasmalemmique, encore non identifiée à ce jour, ne serait exprimée que dans les racines et produit du NO dans l'apoplasme à partir du nitrite, en utilisant le NADPH comme donneur d'électron. L'activité de la NiNOR est induite par l'hypoxie et fonctionnerait en concert avec une NR apoplastique liée à la membrane catalysant la réduction du nitrate en nitrite (Stohr & Ullrich, 2002). De plus, en condition d'hypoxie et lors de la symbiose bactérienne, une formation de NO par la réduction du nitrite peut être également observée au niveau des mitochondries, les électrons provenant de la chaîne de respiration mitochondriale (Planchet *et al.*, 2005; Horchani *et al.*, 2011). Ces deux voies de production semblent toutefois limitées aux racines des plantes, où la pression partielle en oxygène est faible (Gupta *et al.*, 2010).

Enfin, le nitrite peut être réduit en NO de façon non-enzymatique, dans des conditions acides telles que celles rencontrées dans l'apoplasme des graines et des racines (Bethke *et al.*, 2004)

1.2.2 Voie oxydative

Des travaux récents ont permis l'identification d'une enzyme similaire à la NOS des mammifères chez les algues *Ostreococcus tauri* et *O. lucimarinus*. L'isoforme d'*O. tauri* catalyse la formation de NO *in vitro* à partir de L-Arg et est impliquée dans la physiologie de l'algue, notamment dans les réponses adaptatives déclenchées par une forte irradiation lumineuse (Foresi *et al.*, 2010). Contrairement à ces algues, les génomes des plantes terrestres modèles examinés à ce jour ne présentent pas de gène homologue aux gènes codant les NOS animales et les diverses études visant à l'identification de NOS chez les plantes ont échoué (Gupta *et al.*, 2010 ; Moreau *et al.*, 2010). Malgré ce constat, des arguments expérimentaux sont en faveur de l'existence d'une enzyme de type NOS (classiquement nommée NOS-like) chez les plantes terrestres (Gupta *et al.*, 2010 ; Moreau *et al.*, 2010). D'une part, des activités NOS-like, sensibles à des inhibiteurs de NOS de mammifères, ont été mesurées dans des extraits tissulaires ou cellulaires chez différentes espèces (Corpas *et al.*, 2009a). D'autre part, ces mêmes inhibiteurs sont capables de bloquer la synthèse de NO mesurée dans divers contextes physiologiques comme par exemple le

développement (Corpas *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2009a), les réponses des plantes à des pathogènes (Delledonne *et al.*, 1998, Besson-Bard *et al.*, 2008b ; Asai & Yoshioka, 2009) ou à des stress abiotiques tels qu'une exposition au cadmium (Besson-Bard *et al.*, 2009, De Michele *et al.*, 2009).

En parallèle de la voie NOS-like, une seconde voie oxydative de production de NO impliquant les polyamines dérivées de la L-Arg a été proposée. En effet, les polyamines, en particulier la spermine et la spermidine, déclenchent une production importante et rapide de NO chez *A. thaliana* (Tun *et al.*, 2006). Il est envisageable que cette synthèse de NO soit catalysée par les polyamines oxydases (Yamasaki & Cohen, 2006), bien qu'aucune expérience n'ait confirmée cette hypothèse. Enfin, des travaux récents ont montré qu'une synthèse de NO est possible à partir d'hydroxylamine dans des cellules de tabac (Rumer *et al.*, 2009). Toutefois, les acteurs moléculaires mis en jeu dans ces voies de synthèse de NO dépendantes de la L-Arg demeurent inconnus.

2. Rôle du NO chez les plantes

Depuis la fin des années 1990, un intérêt croissant a porté sur la compréhension du rôle du NO dans la physiologie des plantes. De nombreuses publications ont ainsi désigné le NO comme un acteur majeur d'évènements de signalisation, impliqué aussi bien dans la régulation de la croissance et du développement que dans la mise en place des réponses adaptatives à différents stress. En effet, le NO intervient dans les processus de germination, de croissance racinaire, dans la dynamique d'ouverture et de fermeture des stomates, le gravitropisme ou encore la respiration cellulaire. Il est également impliqué dans les réponses aux stress biotiques, comme des infections par des bactéries ou des champignons, et abiotiques, tels que les stress osmotiques, salins ou l'exposition aux métaux lourds (Wendehenne *et al.*, 2004 ; Wilson *et al.*, 2008). Le tableau 2 présente une liste non exhaustive des principales fonctions physiologiques du NO chez les plantes (Besson-Bard *et al.*, 2008c).

Tableau 2. Principales fonctions physiologiques du NO chez les plantes (adapté de Besson-Bard *et al.*, 2008c)

Processus	Références	Espèces concernées
A. Croissance et développement		
Stimulation du développement des graines	-Beligni & Lamattina, 2000	- <i>Lactuca sativa</i>
	-Guo <i>et al.</i> , 2003	- <i>A. thaliana</i>
	-Kopyra & Gwozdz, 2003	- <i>Lupinus luteus</i>
	-Simontacchi <i>et al.</i> , 2004	- <i>Sorghum bicolor</i>
	-Bethke <i>et al.</i> , 2006	- <i>A. thaliana</i>
Implication dans le verdissement des jeunes pousses induit par la lumière	-Zhang <i>et al.</i> , 2006	- <i>Hordeum vulgare</i>
Croissance des feuilles, lignification de la paroi cellulaire, croissance du tube pollinique	-Prado <i>et al.</i> , 2004	- <i>Lilium longiflorum</i>
Floraison	-He <i>et al.</i> , 2004	- <i>A. thaliana</i>
Sénescence	-Leshem & Pinchasov, 2000	- <i>Fragaria anannasa</i> ; <i>Persea Americana</i>
	-Guo & Crawford, 2005	- <i>A. thaliana</i>

Dans les processus régulés par l'auxine

Promotion de la croissance de la racine	-Gouvêa <i>et al.</i> , 1997	- <i>Zea mays</i>
Formation de racines adventives	-Pagnussat <i>et al.</i> , 2003	- <i>Cucumis sativus</i>
	-Lanteri <i>et al.</i> , 2006	- <i>Cucumis sativus</i>
Implication dans la formation de racines latérales et inhibition de la croissance de la racine primaire	-Correa-Aragunde <i>et al.</i> , 2004	- <i>Lycopersicon esculentum</i>
Réponse au gravitropisme	-Hu <i>et al.</i> , 2005a	- <i>Glycine max</i>
Activation du cycle cellulaire	-Otvos <i>et al.</i> , 2005	- <i>Medicago sativa</i>
Développement des poils racinaires	-Lombardo <i>et al.</i> , 2006	- <i>Lactuca sativa</i> ; <i>A. thaliana</i>

Dans les processus régulés par l'ABA

Fermeture des stomates	-Desikan <i>et al.</i> , 2002	- <i>A. thaliana</i>
	-Garcia-Mata & Lamattina, 2002	- <i>Vicia faba</i>
	-Guo <i>et al.</i> , 2003	- <i>A. thaliana</i>
	-Bright <i>et al.</i> , 2006	- <i>A. thaliana</i>
Mobilisation du calcium	-Garcia-Mata <i>et al.</i> , 2003	- <i>Vicia faba</i>
Induction d'enzymes anti-oxydantes	-Zhou <i>et al.</i> , 2005	- <i>Stylosanthes guianensis</i>
	-Zhang <i>et al.</i> , 2007	- <i>Zea mays</i>

Dans les processus régulés par les cytokinines

Accumulation de la bétalaïne	-Scherer & Holk, 2000	- <i>Amaranthus caudatus</i>
Mort cellulaire	-Carimi <i>et al.</i> , 2005	- <i>A. thaliana</i>

B. Dans les réponses et l'adaptation à divers stress abiotiques

En réponse à la sécheresse ou à un stress osmotique	-Garcia-Mata & Lamattina, 2001 -Gould <i>et al.</i> , 2003 -Xing <i>et al.</i> , 2004	- <i>Triticum aestivum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Tradescantia</i> and <i>Salpichroa organifolia</i> - <i>Nicotiana tabacum</i> - <i>Triticum aestivum</i>
En réponse à un stress salin	-Gould <i>et al.</i> , 2003 -Kopyra & Gwozdz, 2003 -Zhao <i>et al.</i> , 2004	- <i>Nicotiana tabacum</i> - <i>Lupinus luteus</i> - <i>Phragmites communis</i>
En réponse à l'ozone	-Velikova <i>et al.</i> , 2005 -Mahalingam <i>et al.</i> , 2006	- <i>Phragmites australis</i> - <i>A. thaliana</i>
En réponse à des variations de températures	-Gould <i>et al.</i> , 2003 -Cantrel <i>et al.</i> , 2011	- <i>Nicotiana tabacum</i> - <i>A. thaliana</i>
En réponse à une blessure	-Orozco-Cardenas & Ryan, 2002 -Huang <i>et al.</i> , 2004 -Paris <i>et al.</i> , 2007	- <i>Lycopersicon esculentum</i> - <i>A. thaliana</i> - <i>Solanum tuberosum</i>
En réponse à un stress mécanique	-Garcès <i>et al.</i> , 2001	- <i>A. thaliana</i>
En réponse au cisaillement	-Gong & Yuan, 2006	- <i>Taxus cuspidata</i>
En réponse à une exposition aux métaux	-Kopyra & Gwozdz, 2003 -Arnaud <i>et al.</i> , 2006 -Barroso <i>et al.</i> , 2006 -Rodriguez-Serrano <i>et al.</i> , 2006 -Besson-Bard <i>et al.</i> , 2009 -Groppa <i>et al.</i> , 2008	- <i>Lupinus luteus</i> - <i>A. thaliana</i> - <i>Pisum sativum</i> - <i>Pisum sativum</i> - <i>A. thaliana</i> - <i>Triticum aestivum</i>
En réponse aux stress oxydatifs	-Zhao <i>et al.</i> , 2008	- <i>Phragmites communis</i>
En réponse aux ultrasons	-Wang <i>et al.</i> , 2006a	- <i>Taxus yunnannensis</i>
En réponse aux UV	-An <i>et al.</i> , 2005 -He <i>et al.</i> , 2005 -Shi <i>et al.</i> , 2005	- <i>Zea mays</i> - <i>Vicia faba</i> - <i>Phaseolus vulgaris</i>
En réponse à un stress hypoxique	-Dordas <i>et al.</i> , 2003 -Perazzolli <i>et al.</i> , 2004 -Ilgamberdiev <i>et al.</i> , 2006	- <i>Medicago sativa</i> - <i>A. thaliana</i> - <i>Medicago sativa</i>

C. Dans les réponses et l'adaptation à diverses interactions biotiques*Dans les interactions incompatibles plantes/pathogènes*

Production de NO dans des tissus de plantes ou des cultures cellulaires	-Delledonne <i>et al.</i> , 1998 -Durner <i>et al.</i> , 1998	- <i>Glycine max</i> - <i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i> , <i>A. thaliana</i> - <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> and <i>avrRpml</i> - <i>Nicotiana tabacum</i> -TMV
---	--	---

	<p>-Clarke <i>et al.</i>, 2000</p> <p>-Foissner <i>et al.</i>, 2000</p> <p>-Conrath <i>et al.</i>, 2004</p> <p>-Lamotte <i>et al.</i>, 2004</p> <p>-Yamamoto <i>et al.</i>, 2004</p> <p>-Zeidler <i>et al.</i>, 2004</p> <p>-Modolo <i>et al.</i>, 2005</p> <p>-Mur <i>et al.</i>, 2005</p> <p>-Vandelle <i>et al.</i>, 2006</p> <p>-Laxalt <i>et al.</i>, 2007</p>	<p>-<i>A. thaliana</i>-<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i></p> <p>-<i>Nicotiana tabacum</i>-<i>cryptogein</i></p> <p>-<i>Nicotiana tabacum</i>-<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>, <i>Glycine max</i> cell suspensions-<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i></p> <p>-<i>Nicotiana tabacum</i> cell suspensions-<i>cryptogein</i></p> <p>-<i>Nicotiana tabacum</i> cell suspensions-<i>elicitin (INFI)</i></p> <p>-<i>A. thaliana</i>-LPS and <i>A. thaliana</i>-<i>P. syringae</i></p> <p>-<i>A. thaliana</i>-<i>P. syringae</i></p> <p>-<i>Nicotiana tabacum</i>-<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> and <i>tabaci</i></p> <p>-<i>Vitis vinifera</i> cell suspensions-<i>endopolygalacturonase 1</i></p> <p>-<i>Solanum lycopersicon</i> suspensions cellulaires-<i>xylanase</i></p>
Implication dans la mort cellulaire de type HR	<p>-Delledonne <i>et al.</i>, 1998</p> <p>-Tada <i>et al.</i>, 2004</p> <p>-Modolo <i>et al.</i>, 2005</p> <p>-Ali <i>et al.</i>, 2007</p>	<p>-<i>A. thaliana</i>-<i>P. syringae</i></p> <p>-<i>Avena sativa</i>-<i>Puccinia coronata</i></p> <p>-<i>A. thaliana</i>-<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i></p> <p>-<i>A. thaliana</i>-<i>P. syringae</i> ; <i>Nicotiana tabacum</i>/<i>Vicia faba</i>-LPS</p>
Implication dans la résistance systémique	<p>-Song & Goodman, 2001</p> <p>-Floryszak-Wieczorek <i>et al.</i>, 2007</p> <p>-Rusterucci <i>et al.</i>, 2007</p>	<p>-<i>Nicotiana tabacum</i>-TMV</p> <p>-<i>Pelargonium peltatum</i>-<i>Botrytis cinerea</i></p> <p>-<i>A. thaliana</i>-<i>Peronospora parasitica</i></p>

D. Dans les interactions symbiotiques

Fixation de l'azote	<p>-Creus <i>et al.</i>, 2005</p> <p>-Shimoda <i>et al.</i>, 2005</p>	<p>-<i>Lycopersicon esculentum</i>-<i>Azospirillum brasilense</i></p> <p>-<i>Lotus japonicus</i>-<i>Mesorhizobium loti</i></p>
Régulation de la symbiose	<p>-Baudouin <i>et al.</i>, 2006</p>	<p>-<i>Medicago truncatula</i>-<i>Sinorhizobium meliloti</i></p>

	-Ferrarini <i>et al.</i> , 2008	- <i>Medicago truncatula</i> - <i>Sinorhizobium meliloti</i>
	-Pauly <i>et al.</i> , 2011	- <i>Medicago truncatula</i> - <i>Sinorhizobium meliloti</i>
	-Horchani <i>et al.</i> , 2010	- <i>Medicago truncatula</i> - <i>Sinorhizobium meliloti</i>
E. Autres		
Dans l'homéostasie du fer	-Graziano <i>et al.</i> , 2002 -Murgia <i>et al.</i> , 2002	- <i>Zea mays</i> - <i>A. thaliana</i>
Dans la mobilisation du Calcium	-Lamotte <i>et al.</i> , 2006	- <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
En réponse aux polyamines	-Tun <i>et al.</i> , 2006	- <i>A. thaliana</i>
En réponse au SA	-Zottini <i>et al.</i> , 2007	- <i>A. thaliana</i>

3. Mécanismes d'action du NO

Les premiers travaux relatifs à l'étude des mécanismes sous-jacents aux effets physiologiques du NO ont révélé la capacité de ce dernier à moduler l'accumulation de transcrits de gènes. En particulier, des approches transcriptomiques à grande échelle (microarrays) ont démontré que le traitement par du NO généré artificiellement de suspensions cellulaires, de feuilles ou de racines de diverses espèces incluant *A. thaliana* et *Medicago truncatula* s'accompagnait de l'activation ou de la répression de nombreux gènes (revue par Besson-Bard *et al.*, 2009 : voir publication 4 en annexe ; Ahlfors *et al.*, 2009). Ces gènes codent notamment pour des protéines impliquées dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques, dans la signalisation hormonale et le métabolisme primaire (Moreau *et al.*, 2010). La capacité du NO produit dans des conditions physiologiques à moduler l'expression de gènes a également été démontrée dans diverses études (Grun *et al.*, 2006).

La possibilité que le NO puisse réguler l'expression de gènes a conduit de nombreuses équipes à caractériser les mécanismes de signalisation cellulaire en amont de celui-ci. Il s'est ainsi avéré que le NO est un acteur des voies de signalisation cellulaire chez les plantes modulant les flux calciques et l'activité de PK. Des protéines directement régulées par le NO par modification post-traductionnelle ont également été identifiées. Ces différents aspects sont présentés ci-dessous.

3.1 NO, signalisation calcique et protéines kinases

Les travaux conduits sur des modèles animaux ont démontré que le NO produit dans divers contextes (en réponse à des hormones, des neuromédiateurs et des micro-organismes pathogènes entre autres) module l'activité de la plupart des canaux calciques : canaux voltage-dépendants, récepteur à ryanodine (RYR), récepteurs au glutamate, récepteur à l'inositol tri-phosphate (IP3-R), canaux régulés par les nucléotides cycliques (CNGC) et les canaux TRP (*transient receptor potential*) (Astier *et al.*, 2010 : voir publication 3 en annexe). Cette modulation peut être directe *via* S-nitrosylation (voir le paragraphe 3.2.3 de cette section) ou indirecte. Les voies indirectes sont particulièrement complexes et impliquent le GMP cyclique (GMPc), des PK GMPc-dépendantes et l'ADP-ribose cyclique (Clementi, 1998 ; Courtois *et al.*, 2008).

Chez les plantes, le traitement de suspensions cellulaires de tabac et d'*A. thaliana*, de même que de stomates de *Vicia faba*, s'accompagne d'une élévation rapide et transitoire de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Garcia-Mata *et al.*, 2003 ; Lamotte *et al.*, 2004 ; Vandelle *et al.*, 2006). De même, des approches pharmacologiques basées sur l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de NO, ou des piègeurs de ce dernier, ont montré que le NO produit en réponse à divers stimuli déclenche une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ *via* l'activation potentielle de canaux perméables au Ca^{2+} de la membrane plasmique et/ou des endomembranes. La nature de ces canaux n'est pas connue mais des arguments expérimentaux, là encore pharmacologiques, indiquent qu'il s'agirait de canaux de type RYR, IP3-R et CNGC (revue par Courtois *et al.*, 2008). L'ensemble de ces données tendent à démontrer un rôle du Ca^{2+} dans la médiation des effets du NO.

Outre le Ca^{2+} , quelques travaux suggèrent que des PK constitueraient également des médiateurs moléculaires des effets du NO. Ces PK incluent des MAPK, des CDPK et des SnRK2 (*SNF1 [sucrose non-fermenting]-related protein kinase 2*). Concernant les MAPK, Kumar et Klessig (2000) puis Besson-Bard *et al.* (2008c), ont rapporté que le traitement de feuilles ou de suspensions cellulaires de tabac par du NO généré artificiellement déclenche l'activation rapide et transitoire de SIPK. La possibilité que le NO produit dans des conditions physiologiques régule SIPK a été démontrée dans le contexte d'un stress salin (Waver *et al.*, 2010). En addition de SIPK, une PK NO-dépendante présentant des caractéristiques

biochimiques d'une MAPK a été caractérisée chez le concombre par des expériences d'essais kinases en gel (Pagnussat *et al.*, 2003). L'identité de cette MAPK, également activée *via* le NO produit en réponse à l'auxine, n'est pas connue. Dans ce même modèle, une CDPK putative de 50 kDa activée en réponse au NO généré artificiellement ou produit en réponse à l'auxine a également été caractérisée par des essais kinase en gel. Là encore, son identité moléculaire n'a pas été rapportée mais un faisceau d'arguments suggère qu'elle serait impliquée dans la régulation de la formation de racines adventives chez le concombre (Pagnussat *et al.*, 2003 ; Lanteri *et al.*, 2006). Enfin, une PK de la famille SnRK2 régulée par du NO produit artificiellement ou en réponse à des stress biotiques et abiotiques a pu être identifiée chez le tabac (Lamotte *et al.*, 2006 ; Besson-Bard *et al.*, 2008c ; Wawer *et al.*, 2010). Il s'agit de NtOSAK (*Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase*) dont nous détaillerons les caractéristiques dans le troisième chapitre de ce travail. A l'exception des travaux réalisés sur le concombre évoqués ci-dessus, l'incidence de l'activation de ces PK par le NO en termes de réponse physiologique n'est pas connue. Il est toutefois suggéré que ces processus signalétiques seraient mobilisés lors de la réponse adaptative de la plante à des stress biotiques et abiotiques (Courtois *et al.*, 2008).

3.2 Modifications post-traductionnelles des protéines

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le NO est un radical. Il peut se coupler à d'autres radicaux, être oxydé ou réduit respectivement en NO^+ ou NO^- , ces derniers possédant une réactivité propre. *Via* ses différentes formes redox, le NO réagit directement avec des molécules de natures chimiques variées incluant l'oxygène moléculaire et ses dérivés, des lipides, des métaux, des protéines ou encore les acides nucléiques. En particulier, les études conduites sur des modèles animaux à partir des années 1990 ont démontré que le NO et certains de ses dérivés modulaient l'activité de protéines *via* trois principaux types de modifications post-traductionnelles : la métal-nitrosylation, la tyrosine (Tyr) nitration et la S-nitrosylation (figure 7 ; pour revue voir Besson-bard *et al.*, 2008a; Hess *et al.*, 2005).

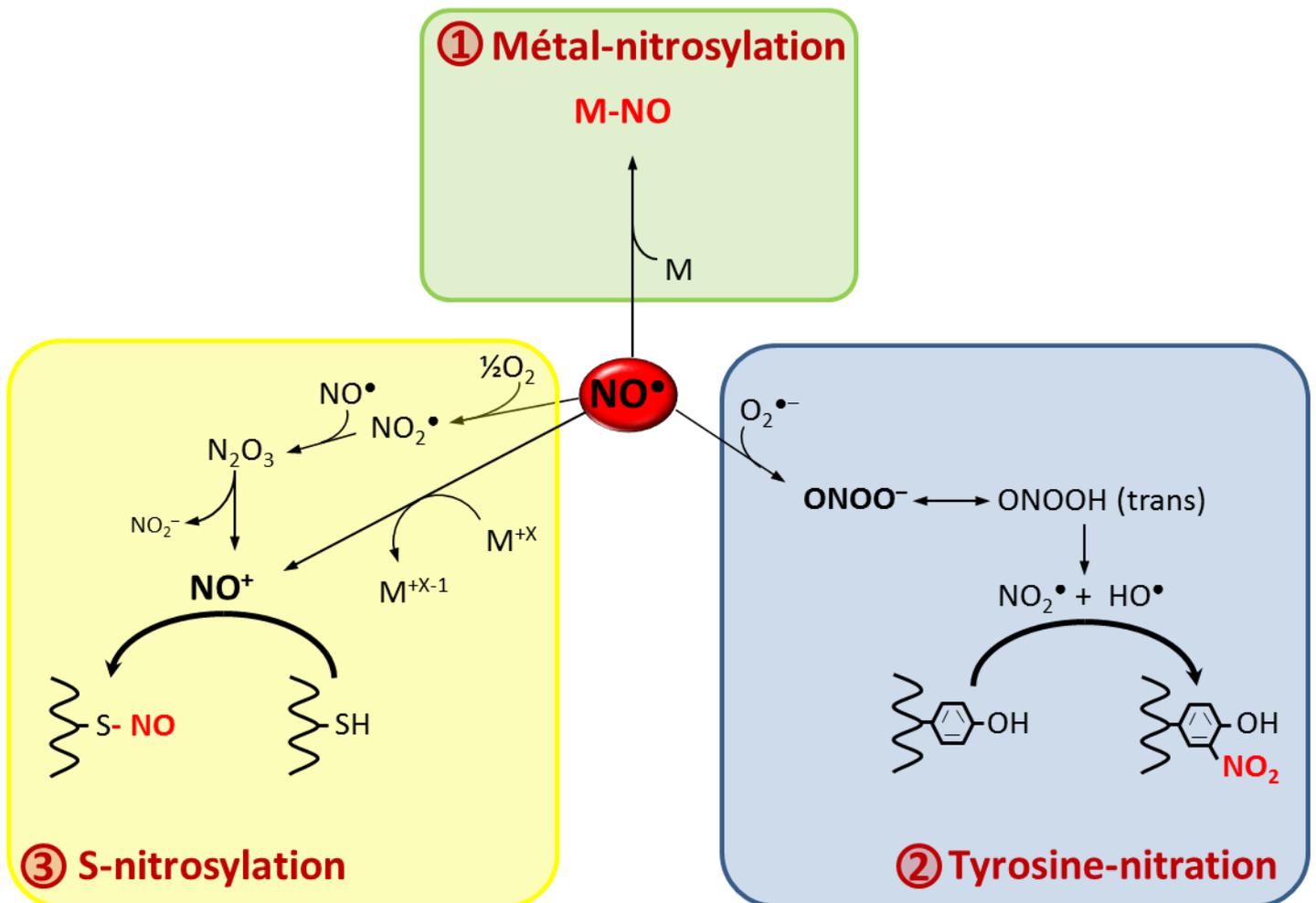


Figure 7. Les modifications post-traductionnelles induites par le NO. ① Le radical NO^\bullet peut céder un électron et réagir avec les métaux de transitions des métalloprotéines. Ce processus est appelé métal-nitrosylation. ② La Tyrosine-nitration dépend de la formation de dérivés du NO, notamment le peroxy-nitrite ONOO^- formé en présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). La nitration se produit sur l'un des deux carbones équivalent (C3) du cycle aromatique de résidus tyrosine pour former une 3-nitrosotyrosine. ③ La S-nitrosylation correspond à l'attaque électrophile du cation nitrosonium (NO^+ , résultant de l'oxydation du NO) sur un groupement thiolate d'un résidu cystéine d'une protéine cible. D'après Besson-Bard *et al.*, 2008

3.2.1 Métal-nitrosylation

La métal-nitrosylation est un mécanisme réversible désignant l'établissement d'une liaison covalente entre le NO^\bullet et un métal de transition d'une métalloprotéine. En effet, le NO^\bullet en tant que donneur d'électron réagit avec les métaux de transition comme le fer, le cuivre ou le zinc, conduisant à la formation de complexes métal-nitrosyles. Par exemple, chez les animaux, un des effets du NO les plus documentés concerne l'activation de la guanylate cyclase soluble (sGC). Plus précisément, le NO établit une liaison covalente avec le fer hémique de l'enzyme. Ceci s'accompagne d'un changement conformationnel accélérant la

formation du GMPc (Ahern *et al.*, 2002). Le mécanisme de métal-nitrosylation a également été décrit chez les plantes. Par exemple, il a été démontré que la leghémoglobine (Lb) de diverses légumineuses réagit avec le NO par métal-nitrosylation lors des interactions symbiotiques. Cette réaction participerait au processus de recyclage de la Lb et constituerait un mécanisme de protection de la plante contre un stress induit par une forte production de NO (pour revue voir Besson-Bard *et al.*, 2008a).

3.2.2 Tyrosine nitration

La Tyr-nitration correspond à l'addition d'un groupement NO_2^+ sur un résidu Tyr, conduisant à la formation de 3-nitrosotyrosine. Cette modification post-traductionnelle est généralement irréversible (Hanafy *et al.*, 2001). Le groupement NO_2^+ provient du radical dioxyde d'azote (NO_2^\bullet), un agent oxydant issu de la réaction entre le NO et l' O_2 , ou de la décomposition du peroxy-nitrite (ONOO^-). Le ONOO^- est également un oxydant puissant produit par la réaction du NO^\bullet et de $\text{O}_2^{\bullet-}$. Dans des conditions physiologiques, ONOO^- réagit principalement avec le CO_2 pour former le radical carbonate ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) et NO_2^\bullet et se comporte donc comme un agent de nitration. Chez les animaux, la Tyr-nitration augmente la susceptibilité des protéines à la protéolyse (Souza *et al.*, 2000) et la plupart des protéines Tyr-nitrées *in vivo* sont inhibées par cette modification (Hanafy *et al.*, 2001). Chez les plantes, une augmentation du nombre de protéines Tyr-nitrées a été observée après différents stress chez plusieurs espèces (Cecconi *et al.*, 2009 ; Corpas *et al.*, 2009b ; Leitner *et al.*, 2009)

3.2.3 S-nitrosylation

La S-nitrosylation correspond à la formation réversible d'une liaison covalente entre le NO et un résidu cystéine (Cys) d'une protéine cible, conduisant à la formation d'un S-nitrosothiol (S-NO, Hess *et al.*, 2005). Cette modification post-traductionnelle fait l'objet d'un intérêt grandissant. Chez les animaux, plus d'une centaine de protéines régulées par S-nitrosylation ont été identifiées. Ces protéines sont impliquées dans divers processus cellulaires, tels que la signalisation, le métabolisme, la réparation des acides nucléiques ou encore la réponse aux stress oxydants (Stamler *et al.*, 2001). Chez les plantes, des études récentes ont été entreprises afin d'identifier, puis de caractériser à l'échelle structurale et fonctionnelle, des

protéines modifiées par S-nitrosylation (Grennan, 2007 ; Lindermayr & Durner, 2009). Dans les paragraphes suivants, nous décrirons les bases mécanistiques du processus de S-nitrosylation et l'impact de ce mécanisme chez les plantes.

3.2.3.1 Processus de S-nitrosylation / dénitrosylation

Comme indiqué ci-dessus, la S-nitrosylation est un mécanisme désignant la réaction du NO avec l'atome de soufre d'un résidu Cys pour former une liaison S-NO (figure 7). Dans la majorité des cas, la nitrosylation n'implique pas directement le NO. En effet, elle nécessite dans un premier temps la synthèse d'oxydes d'azote, en particulier N_2O_3 issue de l'interaction entre NO et O_2 (Keshive *et al.*, 1996). Les oxydes d'azote formés se dissocient ensuite en NO^+ . Ainsi, classiquement, la S-nitrosylation correspond à l'attaque électrophile du cation NO^+ sur des groupements thiolate (Stamler *et al.*, 1992). D'après certains travaux, la formation de la liaison S-NO peut également résulter de l'attaque nucléophile du soufre chargé positivement de résidus Cys par du NO^- , ou de la réaction entre le radical thiyl (RS^\bullet) et NO^\bullet , ces mécanismes étant moins fréquents (Lindermayr & Durner, 2009 ; Wang *et al.*, 2006b). La transnitrosylation constitue un autre mécanisme de S-nitrosylation (figure 8). Il s'agit d'un échange direct du NO^+ d'une protéine S-nitrosylée à un thiolate réactif d'une seconde protéine. Chez les animaux, plusieurs enzymes possèdent une activité transnitrosylase telles que l'hémoglobine ou certaines thioredoxines (pour revue voir Seth & Stamler, 2010). La transnitrosylation implique également des nitrosothiols de faible poids moléculaire, en particulier le S-nitrosoglutathion (GSNO). Le GSNO est formé principalement par la S-nitrosylation du glutathion (GSH), un régulateur majeur de l'état redox cellulaire. Le GSNO est l'un des principaux nitrosothiols de faible poids moléculaire et peut servir de réservoir endogène de NO (Wang *et al.*, 2006b). Des études biochimiques et génétiques effectuées chez divers organismes dont les plantes ont conduit à l'identification de la formaldéhyde déshydrogénase GSH-dépendante, appelée aussi GSNO réductase (GSNOR), une enzyme clé métabolisant le GSNO en ammoniac et en GSH disulfide (GSSG). Chez la levure, cette enzyme confère une résistance importante au stress nitrosatif induit par le NO et ses dérivés (Liu *et al.*, 2001). Chez les plantes, des mutants d'*A. thaliana* invalidés dans l'expression de la GSNOR présentent un niveau élevé de S-nitrosothiols, suggérant que le GSNO contribue à la régulation de la teneur en S-nitrosothiol (Wang *et al.*, 2006b ; Feechan *et al.* 2005 ; Rusterucci *et al.*, 2007). Enfin, le mécanisme de S-nitrosylation peut impliquer

des métalloprotéines. C'est notamment le cas de l'hémoglobine et de la céruloplasmine animales qui lient le NO au niveau de leur hème ou centre cuivre respectifs, puis transfèrent ce dernier sur une Cys cible (Seth & Stamler, 2010 ; Foster *et al.*, 2004).

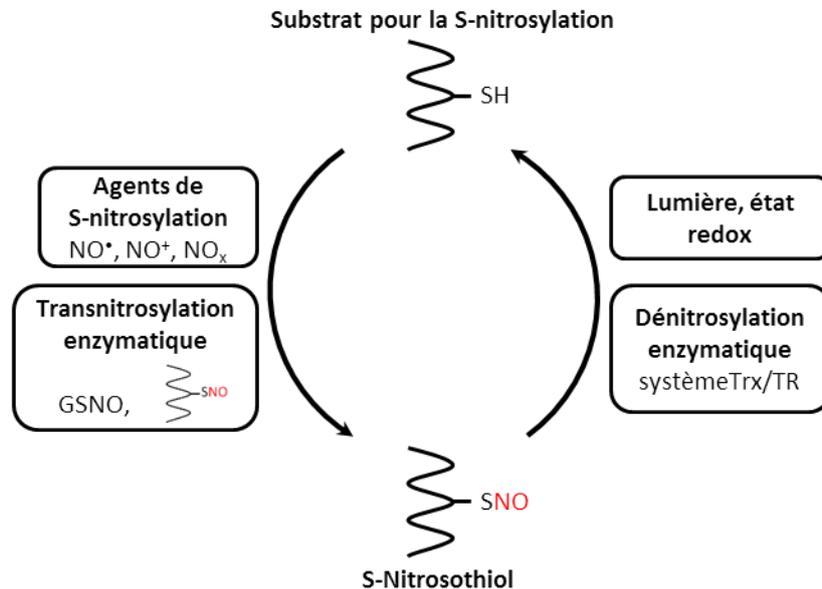


Figure 8. Principes de la S-nitrosylation. La S-nitrosylation cible des résidus cystéines spécifiques et implique principalement NO^+ (et de façon secondaire NO^\bullet et NO^-), des oxydes d'azote (NO_x) dont N_2O_3 ou des agents de transnitrosylation, en particulier le GSNO. Une fois formée, la liaison S-nitrosothiols est très labile et sensible à la lumière et au statut redox. De plus, une dénitrosylation enzymatique, catalysée notamment par le système thioredoxine/thioredoxine reductase (Trx/TR), intervient dans la régulation de la S-nitrosylation des protéines.

Bien que la plupart des protéines possèdent des résidus Cys, seuls certains d'entre eux sont spécifiquement régulés par S-nitrosylation *in vivo* (Belenghi *et al.* 2007 ; Palmieri *et al.*, 2010). Cette spécificité est régie par plusieurs facteurs. Tout d'abord, la formation de S-nitrosothiols est favorisée pour des résidus Cys dont la chaîne latérale est facilement ionisable. C'est en particulier le cas des résidus Cys localisés dans un environnement riche en résidus acides et/ou basiques. A partir de ces observations, Stamler *et al.* (1997) ont défini un motif peptidique consensus pour la S-nitrosylation. Les résidus acides et basiques peuvent être contigus à la Cys réactive au niveau de la séquence primaire, mais également rapprochés de cette Cys dans la configuration tridimensionnelle de la protéine (Hess *et al.*, 2005). Deuxièmement, les compartiments hydrophobes des protéines peuvent favoriser la S-nitrosylation de résidus Cys qu'ils contiennent. Ce concept repose sur le fait que le NO et l' O_2 peuvent se concentrer dans ces environnements hydrophobes, favorisant la formation d'agents de S-nitrosylation, notamment les oxydes d'azote sources de NO^+ (Seth & Stamler,

2010). Plus généralement, les facteurs augmentant la nucléophilie de l'atome de soufre des résidus Cys, y compris le repliement des protéines et leur allostérie, favorisent leur S-nitrosylation. Outre ces aspects intramoléculaires, la colocalisation des sources de NO et des protéines cibles de la S-nitrosylation contribue à la spécificité de cette réaction. Par exemple, un module de signalisation régulé par le NO dans lequel la NOS neuronale est colocalisée avec des cibles protéiques du NO telles que des petites protéines G, la sGC et le récepteur au N-méthyl D-aspartate, a été décrit dans les cellules nerveuses (pour revue, voir Hess *et al.*, 2005). Ces complexes moléculaires pourraient accroître l'efficacité et la spécificité de la S-nitrosylation.

La S-nitrosylation est un mécanisme réversible. La liaison S-NO formée par la S-nitrosylation est en effet très labile, sensible à la lumière et aux variations du statut redox (figure 8). Par conséquent, la liaison S-NO peut être réduite par l'action d'agents réducteurs intracellulaires tels que le GSH et l'ascorbate, ou encore par les ions métalliques réducteurs. Néanmoins, la dénitrosylation des protéines semble soumise à une régulation très contrôlée. En effet, des travaux relativement récents suggèrent que des enzymes pourraient spécifiquement catalyser la dénitrosylation (figure 8). Chez les animaux, des enzymes présentant une activité dénitrosylase ont été identifiées, incluant une disulfure isomérase, la xanthine oxydase, une carbonyl réductase, la GSH peroxydase, la superoxyde dismutase et le système thioredoxines/thioredoxines reductases (Trx/TR ; pour revue, voir Benhar *et al.*, 2009). L'exemple du système Trx/TR est particulièrement pertinent. En effet, il a été démontré dans des cellules T humaines engagées en apoptose que les Trx réduites dénitrosylent une sous-population de caspase 3 mitochondriale constitutivement S-nitrosylée et, en tant que telle, inhibée. Cette dénitrosylation favorise l'activation de cette sous-population et conduit à l'apoptose (Benhar *et al.*, 2008). La participation des Trx comme un facteur de dénitrosylation ne se limite pas aux cellules animales et a été récemment rapportée dans le cadre de la régulation de NPR1 (*non-expressor of pathogenesis-related gene 1*) chez *A. thaliana*. Plus précisément, NPR1, l'un des principaux régulateurs des réponses de défense des plantes, est localisé dans le cytosol sous forme oligomérique inactive maintenue grâce à des ponts disulfures intermoléculaires (Despres *et al.*, 2003). En réponse à des agents pathogènes, les oligomères de NPR1 sont réduits et les monomères obtenus subissent une translocation vers le noyau où ils favorisent l'activation transcriptionnelle de gènes liés à la défense (Pieterse & Van loon, 2004). Tada *et al.* (2008) ont rapporté que la S-

nitrosylation de NPR1 facilite son oligomérisation alors que les Trx catalysent sa réduction vers les formes monomériques actives.

En résumé, les évènements de S-nitrosylation/dénitrosylation constituent des processus dynamiques impliquant un éventail d'espèces réactives dérivées du NO, des agents réducteurs et des enzymes impliquées dans le maintien de l'état redox de la cellule. De plus, ces processus sont influencés par l'environnement moléculaire de la Cys réactive et par l'allostérie et la localisation subcellulaire de ces protéines.

3.2.3.2 - Impact de la S-nitrosylation

Six études visant à identifier les protéines végétales S-nitrosylées *via* des approches protéomiques à grande échelle ont été rapportées. Dans leur étude pionnière, Lindermayr *et al.* (2005) ont identifié 52 et 63 protéines respectivement S-nitrosylées dans des plantules d'*A. thaliana* exposées à du NO gazeux ou dans des cultures cellulaires traitées par le GSNO. Ces protéines sont impliquées dans différents processus cellulaires, dont le métabolisme, la signalisation, la réponse aux stress environnementaux, le statut redox ou encore l'architecture cellulaire. Une deuxième étude a permis l'identification de 16 protéines spécifiquement S-nitrosylées lors de l'établissement de la HR dans des plantules d'*A. thaliana* exposées au pathogène *P. syringae* pv. *tomato* (Romero-Puertas *et al.*, 2008). Là encore, les protéines d'intérêt sont principalement impliquées dans la réponse cellulaire aux stress environnementaux, la signalisation et le métabolisme cellulaire. La S-nitrosylation des protéines a également été appréhendée à l'échelle d'organites subcellulaires. Plus précisément, Palmieri *et al.* (2010) ont identifié 11 protéines S-nitrosylées dans les mitochondries de cellules de feuilles d'*A. thaliana* incubées avec l'agent de transnitrosylation GSNO. Ces protéines incluent la glycine décarboxylase (GDC), une composante majeure du système photorespiratoire (voir ci-dessous).

Les autres approches protéomiques ont été réalisées chez la crassulacée *Kalanchoe pinnata*, chez *Brassica juncea* et le citronnier. Dans les deux premières espèces, le traitement par du GSNO ou un stress froid conduit à la nitrosylation d'une douzaine de protéines liées au métabolisme primaire, à la photosynthèse, à la régulation du cytosquelette, à la réplication de l'ADN et aux réponses de défense des plantes (Abat & Deswal, 2009 ; Abat *et al.*, 2008). Chez le citronnier (*Citrus aurantium* L.), une cinquantaine de protéines S-nitrosylées ont été identifiées en réponse à du NO généré artificiellement. Ces protéines sont également

impliquées dans différentes fonctions cellulaires, allant du métabolisme aux réponses de stress (Tanou *et al.*, 2009). D'après les auteurs de ce travail, certaines joueraient un rôle important dans l'augmentation de la résistance au stress salin observée suite à un pré-traitement des plantes par du NO.

En parallèle de ces travaux, des études se sont plus spécifiquement focalisées sur certaines protéines S-nitrosylées afin de déterminer l'impact de cette modification post-traductionnelle sur leurs structures, leurs fonctions et leurs implications physiologiques. Une douzaine de protéines S-nitrosylées ont ainsi été caractérisées (tableau 3).

Tableau 3. Liste des protéines S-nitrosylées identifiées chez les plantes.

Proteine Identifiée		Organisme	Effet de la S-nitrosylation	Références
Hémoglobine non symbiotique	AHb1	<i>A. thaliana</i>	Détoxification du NO	Perazzolli <i>et al.</i> , 2004
Prométacaspase 9	AtMC9	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de la maturation et de l'activité	Belenghi <i>et al.</i> , 2007
S-adénosylméthionine synthétase 1	SAMS1	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
Peroxyrédoxine II E	PrxII E	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2007
MYB domain protein 2	AtMYB2	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de la liaison à l'ADN	Serpa <i>et al.</i> , 2007
Non expressor of pathogenesis related genes 1	NPR1	<i>A. thaliana</i>	Changements conformationnels	Tada <i>et al.</i> , 2008
Salicylic acid-binding protein 3	AtSABP3	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité et de la liaison au SA	Wang <i>et al.</i> , 2009b
TGAGG motif binding factor 1	TGA1	<i>A. thaliana</i>	Changements conformationnels et dans la liaison à NPR1/ADN	Lindermayr <i>et al.</i> , 2010
Phytochélatines	PC	<i>A. thaliana</i>	Non déterminé	De Michele <i>et al.</i> , 2009, Elviri <i>et al.</i> , 2010
Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase	GAPDH	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Lindermayr <i>et al.</i> , 2005, Holtgreffe <i>et al.</i> , 2008
Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase	GAPDH	<i>N. tabacum</i>	Inhibition de l'activité	Wawer <i>et al.</i> , 2010
Glycine décarboxylase	GDC	<i>A. thaliana</i>	Inhibition de l'activité	Palmieri <i>et al.</i> , 2010
Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	Rubisco	<i>K. pinnata</i>	Inhibition de l'activité	Abat <i>et al.</i> , 2007
Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase	Rubisco	<i>B. juncea</i>	Inhibition de l'activité	Abat and Deswal, 2008

L'hémoglobine non-symbiotique d'*A. thaliana* AHb1 a été la première protéine S-nitrosylée identifiée chez les plantes (Perazzolli *et al.*, 2004). AHb1 est S-nitrosylée *in vitro* et *in vivo* dans une lignée transgénique d'*A. thaliana* surexprimant l'ADNc correspondant. Selon les auteurs, la S-nitrosylation d'AHb1 est un mécanisme de piégeage et donc de détoxification

du NO produit lors de l'hypoxie. Fait intéressant, l'activité de piégeage de NO par AHB1 ne contribue pas à la modulation de la production de NO au cours de la HR, ce qui suggère que cet effet protecteur pourrait être limité à des stress particuliers.

Outre AHB1, l'impact de la S-nitrosylation de la peroxyrédoxine II E (PrxII E ; Romero-Puertas *et al.*, 2007), de la SA-Binding Protein 3 (AtSABP3 ; Wang *et al.*, 2009b), de NPR1 (voir ci-dessus ; Tada *et al.*, 2008), de TGA1 (Lindermayr *et al.*, 2010), de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH ; Wawer *et al.*, 2010), de la S-adénosyl-méthionine synthétase 1 (SAMS1 ; Lindermayr *et al.*, 2006) et de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco ; Abat & Deswal, 2009) dans des plantes ou des suspensions cellulaires exposées à des stress (a)biotiques a été étudié. Les données obtenues sont résumées ci-dessous.

- Romero-Puertas *et al.* (2007) ont démontré que l'infection de plantules d'*A. thaliana* par une souche non virulente de *P. syringae* déclenche la S-nitrosylation de nombreuses protéines dont PrxII E. Cette dernière possède une activité ONOO⁻ réductase et la S-nitrosylation du résidu Cys 121 entraîne la perte de cette activité. *In planta*, ce processus conduit à une augmentation de la Tyr-nitration de protéines, mettant en évidence un rôle clé pour la PrxII E dans le contrôle de la concentration de ONOO⁻ endogène. Il est envisageable que ce mécanisme participe à la mort cellulaire des cellules hôtes lors de l'établissement de la HR.

- AtSABP3 est un autre exemple de protéine régulée par S-nitrosylation chez *A. thaliana* lors de la résistance à une infection causée par une souche non virulente de *P. syringae*. Cette protéine chloroplastique joue un rôle important dans la réponse à certains pathogènes. Elle fixe le SA et possède une activité anhydrase carbonique (CA ; Slaymaker *et al.*, 2002). La S-nitrosylation du résidu Cys 280 de AtSABP3 diminue à la fois son affinité pour le SA et son activité CA, conduisant à une sensibilité accrue de la plante à la bactérie (Wang *et al.*, 2009b).

- L'importance des mécanismes de S-nitrosylation dans l'établissement de la résistance des plantes aux pathogènes a été récemment renforcée par le travail de Lindermayr *et al.* (2010). NPR1 et TGA1, un membre des facteurs de transcription liant le motif TGAGG (TGA), sont des régulateurs majeurs de la SAR chez les plantes et leur activité est dépendante du statut redox. Les monomères de NPR1 interagissent avec la forme réduite de TGA1 qui cible ensuite une séquence d'activation de la région promotrice des

gènes de défense. La conformation de TGA1 est dépendante de quatre résidus Cys. En conditions oxydantes, des ponts disulfures se forment entre les Cys 172 et 287 et les Cys 260 et 266, conduisant à une conformation inactive de TGA1. Cependant, le traitement de TGA1 par du GSNO conduit à sa S-nitrosylation/S-glutathionylation et, en conséquence, à une modification de sa conformation. En particulier, le statut redox de Cys 172 et Cys 287 est important pour la structure intramoléculaire de TGA1 mais également pour son activité. En effet, la réduction du pont disulfure entre ces deux résidus affecte positivement l'activité de liaison à TGA1 à l'ADN. Plus intéressant encore, le GSNO déclenche la liaison NPR1-dépendante de TGA1 à l'ADN. Cette observation peut s'expliquer de deux manières : soit le traitement par le GSNO favorise l'association de TGA1 et de NPR1, permettant une liaison à l'ADN plus efficace ; soit la S-nitrosylation des résidus Cys 172 et Cys 287 de TGA1 empêche la reformation de ponts disulfures, conservant ainsi le facteur de transcription sous une conformation active (Lindermayr *et al.*, 2010). Il convient de signaler qu'en plus des facteurs de transcription TGA, l'activité d'un des membres de la famille des facteurs de transcription R2R3 MYB peut être modulée par S-nitrosylation (Serpa *et al.*, 2007). Plus précisément, sa S-nitrosylation sur le résidu Cys 53 conduit à l'inhibition de sa liaison à l'ADN.

- L'enzyme de la glycolyse GAPDH est également une des protéines identifiées comme étant S-nitrosylées chez les plantes lors d'un stress environnemental. Chez *A. thaliana* et le tabac, des expériences *in vitro* ont démontré que l'activité GAPDH est inhibée par la S-nitrosylation de ses deux résidus Cys catalytiques (Lindermayr *et al.*, 2005 ; Wawer *et al.*, 2010 ; Holtgreffe *et al.*, 2008). En outre, une étude récente menée sur des suspensions cellulaires de tabac a révélé que la GAPDH subit également une S-nitrosylation rapide et transitoire en réponse à un stress salin (Wawer *et al.*, 2010). Cet aspect sera développé dans le chapitre III.

- La SAMS et la GDC sont deux autres enzymes métaboliques régulées par S-nitrosylation. SAMS1 catalyse la synthèse de la S-adénosylméthionine (AdoMet), un précurseur essentiel à la biosynthèse de l'éthylène (ET), des polyamines (PA), du GSH et de la nicotianamine (Mato *et al.*, 2002). Parmi les trois isoformes de SAMS d'*A. thaliana*, seule SAMS1 est S-nitrosylée *in vitro* (Lindermayr *et al.*, 2006). Cette S-nitrosylation conduit à l'inhibition de l'enzyme et concerne plus spécifiquement le résidu Cys 114 situé à proximité du site de liaison du substrat. La S-nitrosylation de SAMS1 pourrait avoir une incidence sur la production d'ET ainsi que sur la synthèse du NO dépendante de la production de PA

(Lindermayr & Durner, 2009). Concernant la GDC, les trois sous-unités GDC H1 et glycine déshydrogénase P1 et P2 subissent une S-nitrosylation (Palmieri *et al.*, 2010). Là encore, ce processus a été corrélé à une inhibition de l'enzyme. Toutefois, la perte d'activité a été observée non seulement en réponse au NO, mais aussi suite à la S-glutathionylation de plusieurs résidus Cys. D'après les auteurs, l'inhibition de la GDC observée en réponse à l'éliciteur bactérien harpine chez *A. thaliana* pourrait s'expliquer par sa S-nitrosylation et/ou S-glutathionylation bien qu'aucun argument expérimental n'étaye cette hypothèse (Palmieri *et al.*, 2010). Enfin, d'autres enzymes métaboliques sont régulées *via* S-nitrosylation comme la Rubisco (Abat *et al.*, 2008). La S-nitrosylation de cette dernière pourrait en partie contribuer à son inactivation en réaction au stress froid chez *Brassica juncea* (Abat & Deswal, 2009).

- Un exemple original de l'implication du NO dans la modulation d'activité de protéines par S-nitrosylation est celui de la métacaspase 9 (AtMC9) chez *A. thaliana*. *In vivo*, le zymogène d'AtMC9 est constitutivement S-nitrosylé sur le résidu Cys 147 du site catalytique (Belenghi *et al.*, 2007). Cette modification post-traductionnelle maintient AtMC9 sous une forme inactive et non maturée. La maturation d'AtMC9 nécessite l'intervention d'une protéase et, fait intéressant, la S-nitrosylation de la forme mature d'AtMC9 n'affecte pas son activité. Sur la base d'analyses structurales, il a été proposé que le changement de conformation d'AtMC9 provoqué par l'action de la protéase positionne un second résidu Cys (Cys 29) au niveau du site catalytique. D'un point de vue fonctionnel, le résidu Cys 29 se substituerait au résidu 147 et faciliterait la catalyse en agissant comme centre nucléophile. Il est intéressant de préciser que ce résidu Cys 29 n'est pas nitrosylable. Cette dernière donnée expliquerait pourquoi la S-nitrosylation de la forme mature d'AtMC9 n'affecte pas son activité. Considéré dans son ensemble, ce travail démontre que la S-nitrosylation n'affecte que certains résidus Cys.

OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

L'appréhension des mécanismes concourant à la mise en place des réponses de défense des plantes constitue un enjeu majeur, en termes de recherche fondamentale comme de recherche finalisée. En particulier, le domaine de la phyto-protection est en attente forte de méthodes alternatives à la lutte chimique basée sur l'utilisation massive de produits phytosanitaires. Ces méthodes alternatives incluent la stimulation des défenses naturelles par des éliciteurs ou des potentialisateurs (renommés SDN pour stimulateurs des défenses naturelles des plantes). Si de telles approches s'avèrent efficaces en parcelles cultivées, comprendre le mode d'action des SDN est indispensable. De plus, à l'image des stratégies utilisées dans la lutte contre les pathologies humaines, l'identification de protéines clés des voies de défense chez les plantes laisse entrevoir la possibilité de développer des méthodes de phytoprotection ciblées sur la modulation de ces protéines.

L'unité mixte de recherche Plante-Microbe-Environnement (UMR PME) vise à établir les mécanismes cellulaires qui aiguillent les interactions plante/micro-organismes soit vers la résistance, soit vers une symbiose mutualiste de type mycorhize. En parallèle, sur la base des données fondamentales acquises, l'UMR contribue à l'élaboration de nouveaux modes de gestion en production végétale basés sur les services écologiques rendus par les champignons mycorhizogènes et des stratégies de stimulation des défenses naturelles. L'équipe Signalisation Cellulaire et Moléculaire des Réactions de Défense des Plantes de l'UMR PME dans laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse a démontré que le NO était l'un des acteurs des processus de signalisation cellulaire rapidement mobilisés dans les cellules végétales lors des réponses de défense (revue par Besson-Bard et al., 2008a). Ces travaux ont été conduits sur différents modèles, dont le modèle cryptogéine/tabac. Nos connaissances du rôle de NO dans ce contexte restent toutefois rudimentaires. Afin d'appréhender ce rôle, dans le cadre de l'ANR PIANO (coordinateur D. Wendehenne) et de deux contrats d'étude soutenus par la Région Bourgogne, l'équipe a entrepris d'identifier et d'analyser la fonction de protéines et de gènes cibles du NO. Mon travail de thèse s'est inscrit dans ces études. Plus précisément il a été centré sur l'identification et l'étude fonctionnelle de protéines cibles du NO *via* trois principaux axes :

- **le premier axe a été centré sur l'identification de protéines rapidement S-nitrosylées dans des suspensions cellulaires de tabac élicitées par la cryptogéine.** Pour ceci, nous avons établi un profil de S-nitrosylation caractéristique d'une réponse à la cryptogéine. Les protéines S-nitrosylées ont ensuite été identifiées par des techniques de spectrométrie de masse. Ces données nous ont permis de sélectionner une protéine candidate nommée CDC48.

- **le deuxième axe a concerné l'étude de l'impact de la S-nitrosylation sur CDC48.** Nous avons mis en place des protocoles expérimentaux permettant l'expression en système hétérologue, la purification et l'analyse *in vitro* de caractéristiques biochimiques et structurales de CDC48. Ces outils nous ont notamment permis d'analyser finement l'incidence de la S-nitrosylation de CDC48 sur sa structure, en particulier secondaire et tertiaire, ainsi que son activité enzymatique.

- **le troisième axe a concerné l'étude des mécanismes sous-jacents à l'activation de la protéine kinase NtOSAK par le NO.** Cette protéine kinase a précédemment été démontrée par l'équipe comme étant régulée par le NO dans le contexte de stress abiotiques. Nous avons analysé si l'activation de NtOSAK par le NO impliquait sa S-nitrosylation et/ou sa phosphorylation. En parallèle, afin de mieux cerner les processus inhérents à son activation, nous avons identifié certaines des protéines partenaires de NtOSAK et, pour l'une d'entre elles, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, étudié sa régulation par le NO.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

1. Matériel biologique

1.1 Matériel végétal : suspensions cellulaires de tabac

Les suspensions cellulaires de *Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* ont été générées au laboratoire à partir de cals provenant de tissus foliaires. Les cellules sont cultivées sur milieu Murashige & Skoog (milieu MS ; (Murashige and Skoog, 1962)) complété en vitamines et minéraux (Tableau 4). Les cultures sont maintenues sous agitation (130 rpm) et lumière ($65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) continues, en salle climatisée (24°C). Elles sont repiquées en fin de phase exponentielle de croissance, tous les 7 jours, à raison de 8 PCV (*Packed cell volume*) dans 100 ml de milieu de culture frais. A saturation, les cellules sont diluées au demi par addition de milieu de culture frais et utilisées pour les mesures biologiques dans les 24 heures.

Tableau 4. Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires de tabac. Le milieu est préparé dans de l'eau ultrapure (18,2 M Ω) puis le pH ajusté à 5,5 à l'aide d'une solution concentrée en KOH. Le milieu est ensuite autoclavé 40 min à 155°C

Produits	[C] (mg/l)	<i>Fe-EDTA</i>	
Saccharose	30000	FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,80
Glutamine	200	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	37,26
<i>Macro-éléments</i>		<i>Vitamines</i>	
KNO ₃	1900	Glycine	2
NH ₄ NO ₃	1650	Biotine	0,05
MgSO ₄ , 7H ₂ O	180,70	Thiamine hydrochloride	0,50
CaCl ₂ , 2H ₂ O	332,20	Pyridoxine hydrochloride	0,50
KH ₂ PO ₄	170	Acide nicotinique	5
<i>Micro-éléments</i>		Panthoténate de calcium	3
MnSO ₄ , 4H ₂ O	16,90	Acide folique	0,50
H ₃ BO ₃	6,20	<i>Hormones</i>	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,60	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	0,166
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25	Kinétine	0,108
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025	Myo-inositol	100
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025		
KI	0,83		

1.2 Cryptogéine

La cryptogéine est produite au laboratoire selon le protocole établi par Bonnet *et al.* (1996). Elle est extraite et purifiée à partir de filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea*. Après dosage par mesure d'absorbance à 280 nm, la cryptogéine est préparée sous forme de solution mère à une concentration de 100 µM dans de l'eau ultrapure.

1.3 Souches Bactériennes utilisées

1.3.1 Souche utilisée pour les clonages

Les différentes constructions sont amplifiées dans la souche bactérienne *Escherichia coli* thermo-compétente OneShot TOP 10 (Invitrogen).

1.3.2 Souche utilisée pour l'expression hétérologue

Les constructions permettant l'expression hétérologue des protéines d'intérêt ont été introduites dans des bactéries *E. coli* souche Rosetta (Novagen). Cette souche possède un vecteur codant des ARNs de transfert rares et est adaptée à l'expression hétérologue de protéines eucaryotes.

2. Outils pharmacologiques

2.1 Composés relatifs à l'étude de la signalisation du NO

Le diéthylamine-NONOate (DEA/NO ; Enzo life science) est une nitrosamine utilisée comme donneur de NO radicalaire. Il a été préparé extemporanément sous forme de solution stock à 500 mM dans NaOH 0,01 M (stable à 4°C pendant 24 h). Pour induire la libération du NO, 10 µL de la solution stock ont été ajoutés à 990 µL de tampon phosphate 100 mM pH 7,2 afin d'obtenir une solution à 5 mM utilisée pour traiter les protéines aux concentrations finales spécifiées (figure 9)

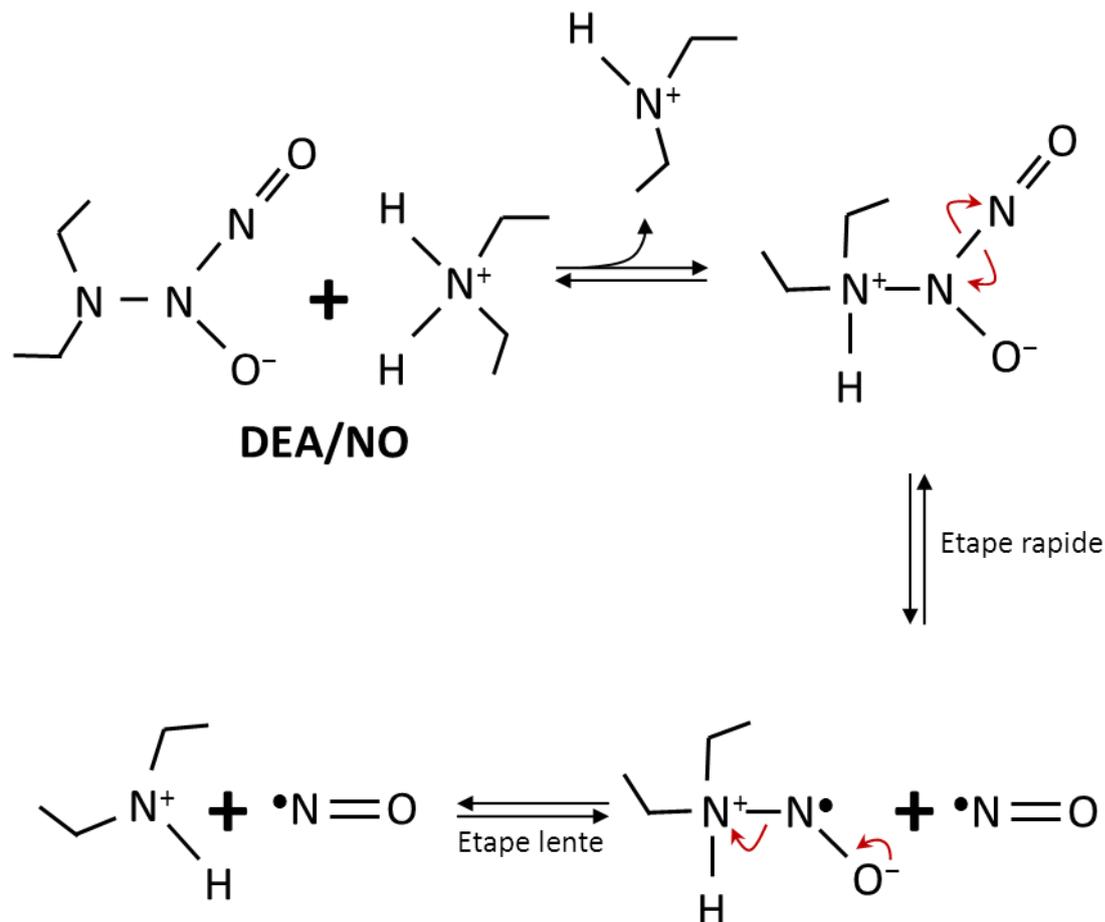


Figure 9 : Libération du NO radicalaire par le DEA/NO

Le GSNO (Enzo life science), donneur de cation nitrosonium (figure 10), est préparé extemporanément dans de l'eau ultrapure à une concentration de 5 mM. Cette solution a été utilisée pour traiter les protéines aux concentrations finales spécifiées.

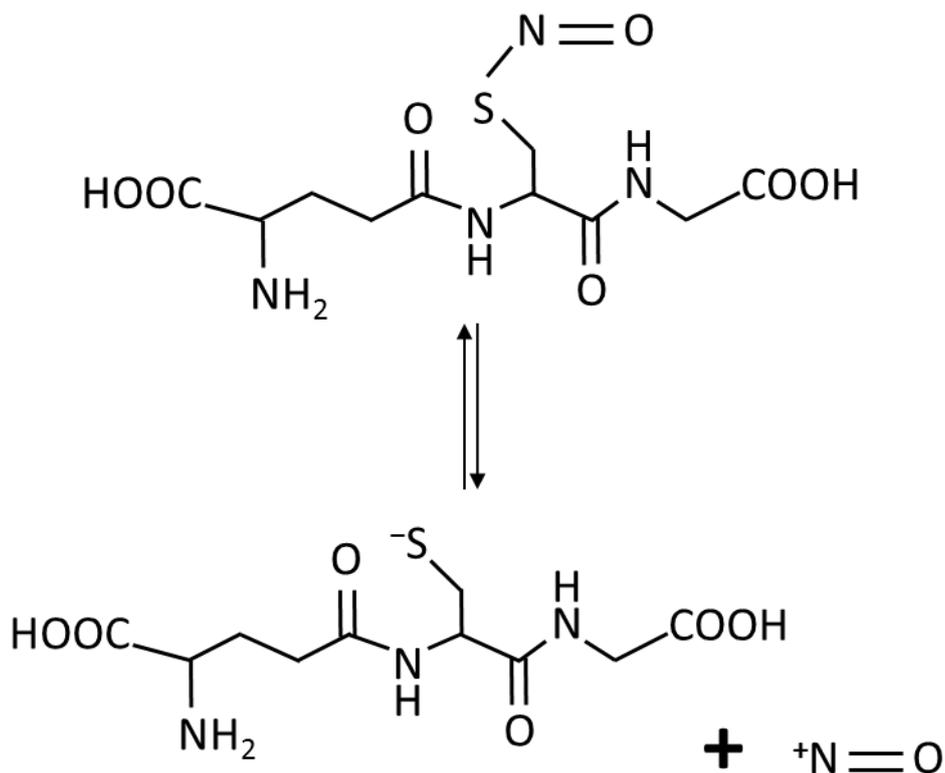


Figure 10 : Libération du cation nitrosonium par le GSNO

2.2 Composés relatifs à la détection et l'identification des protéines S-nitrosylées

2.2.1 Marquage et détection des protéines S-nitrosylées

Le S-méthyl méthanesulfonate (MMTS) en solution mère à 10,59 M dans le diméthyl formamide (DMF), la néocuproïne, chélateur des ions Cu II, et les anticorps monoclonaux antibiotine produits chez la souris et couplés à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline ont été fournis par Sigma-Aldrich. Les anticorps polyclonaux de poulet anti-CDC48 d'*A. thaliana* ont été fournis par le Pr. Sebastian Bednarek (Madison, USA). Les anticorps secondaires anti-poulet couplés à la peroxydase sont disponibles chez Euromedex.

Les inhibiteurs de protéases utilisés sont le paraméthylsulfonate fluoride (PMSF), solubilisé à 100 mM dans l'éthanol et conservé à 4°C (Sigma-Aldrich), ainsi que la leupeptine et l'antipaïne (Euromedex), solubilisés dans de l'eau ultrapure. L'agent de biotinylation N-[6-biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridylthio)propionamide (EZ-Link™ biotine-HPDP), solubilisé à 4 mM dans le DMF est commercialisé par PIERCE. Le kit LumiGLO™ Reagent and Peroxide

utilisé pour révéler l'activité peroxydase est disponible chez Cell Signaling Technology. Les réactifs utilisés pour révéler l'activité phosphatase alcaline (BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate ; NBT : *p*-nitro blue tetrazolium chloride) sont disponibles chez Bio-Rad.

2.2.2 Purification et identification des protéines S-nitrosylées

Les endoprotéases Lys C et trypsine ont été obtenues sous la forme d'une solution stock auprès de Sigma-Aldrich. Les colonnes d'avidine utilisées pour la purification des protéines biotinylées ont été fournies par Applied-Biosystems.

2.3 Biologie moléculaire et purifications protéiques

Les ARN totaux ont été extraits des cellules en utilisant du TRI Reagent (Molecular research center Inc.). Les ADN complémentaires ont été obtenus par l'utilisation du kit de rétrotranscription SuperScript®III Reverse Transcriptase disponible auprès d'Invitrogen.

Les amorces de PCR ainsi que les séquençages ont été obtenus auprès de la société Eurofins MWG Operon. Les amplifications des différentes séquences nucléotidiques par PCR ont été réalisées à l'aide de l'enzyme haute fidélité Phusion, disponible auprès de Finnzymes.

Les séquences d'intérêt ont été insérées dans le vecteur d'entrée pENTR (figure 11) à l'aide du kit de clonage pENTR Directional TOPO Cloning, disponible auprès d'Invitrogen. Les réactions de recombinaisons homologues permettant le clonage des séquences d'intérêt du pENTR au plasmide de destination ont été réalisées à l'aide du kit GATEWAY LR Clonase (Invitrogen). Le vecteur de destination pHGWA utilisé nous a été fourni par l'équipe du Dr. Didier Busso (IGBMC, Strasbourg ; Busso *et al.*, 2005 ; figure 11).

Les différentes enzymes de restriction ont été obtenues auprès de Promega. Les minipréparations d'ADN plasmidique et les purifications des produits PCR ont été respectivement effectuées avec les kits PureYield Plasmid Miniprep System et Wizard PCR Preps DNA Purification System, disponibles également auprès de Promega.

Les antibiotiques utilisés pour la sélection des clones transformés ont été obtenus auprès d'Euromedex.

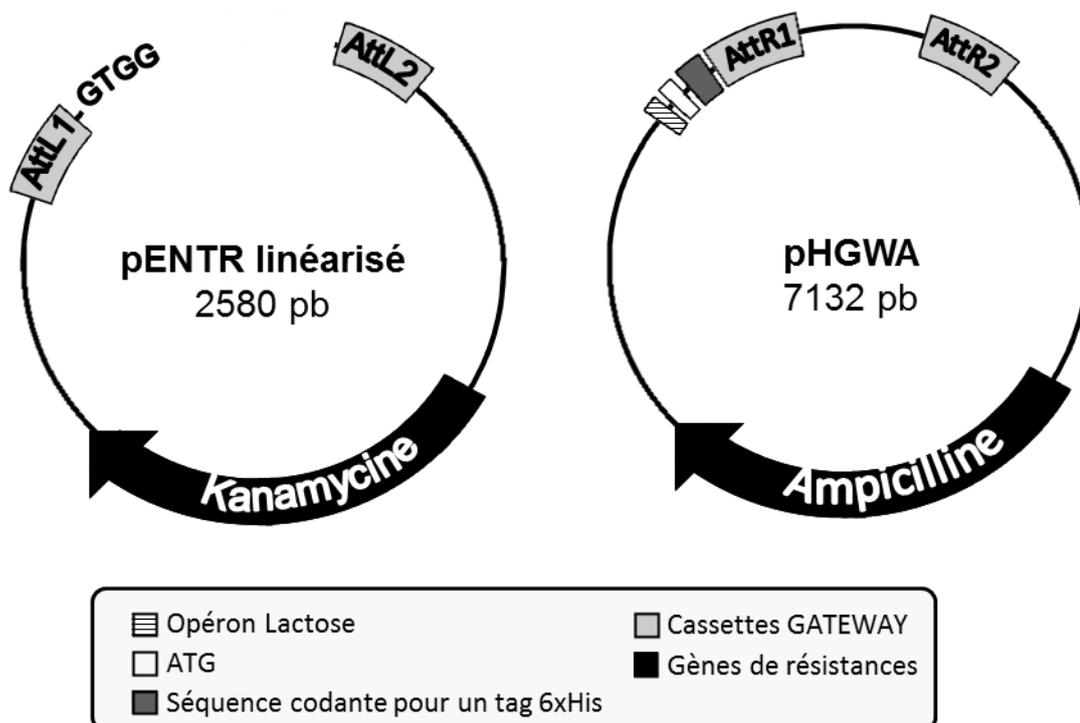


Figure 11 : Représentation schématique des plasmides d'entrée et de destination utilisés pour l'expression des protéines d'intérêt. Le pENTR linéarisé permet le clonage directionnel d'une séquence d'ADN d'intérêt. Il présente les séquences *AttL1* et *AttL2* qui permettent le transfert de la séquence d'intérêt clonée vers le plasmide de destination, le pHGWA, par double recombinaison homologue avec les séquences *AttR1* et *AttR2*. pHGWA permet l'expression de la protéine correspondant à la séquence d'intérêt sous le contrôle de l'opéron lactose, inductible par l'IPTG. De plus, ce plasmide permet la fusion d'une étiquette polyhistidine en N terminal de la protéine recombinante d'intérêt.

2.4 Analyses protéiques et tests d'activités

L'inducteur de l'expression des protéines recombinantes, l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), disponible en poudre, a été obtenu auprès de Sigma-Aldrich, tout comme le vert de malachite, obtenu sous la forme d'un sel d'oxalate, utilisé pour les tests d'activités. Les colonnes HisTrapp FF 1 mL permettant la purification des protéines recombinantes possédant une étiquette polyhistidine ont été obtenues auprès de General Electric Healthcare Life Sciences.

Méthodes

1. La technique du « biotin switch »

1.1 Préparation du matériel végétal

Pour les expériences, les suspensions cellulaires à saturation sont diluées au demi par addition de milieu de culture frais puis incubées 16 heures à 24°C sous agitation et en lumière continue comme indiqué précédemment (voir paragraphe 1.1 de la section Matériel). Elles sont ensuite traitées par la cryptogéine à une concentration finale de 100 nM. Des aliquotes de 2,5 mL (0,25 g) de cellules sont alors prélevées à différents temps et filtrées sous vide sur des filtres GFA. Les cellules sont immédiatement congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

1.2 Préparation des extraits protéiques

Les échantillons sont broyés dans l'azote liquide. Les broyats sont repris dans le tampon HEN (Hepès-NaOH pH 7,7 25 mM, EDTA 1 mM, néocuproïne 0,1 mM, CHAPS 0,5 % (m/v)) dans lequel sont ajoutés extemporanément des inhibiteurs de protéases (PMSF 2 mM, antipaïne et leupeptine 10 µM) à raison d'environ 1 µL de tampon par mg de broyat. Les échantillons sont maintenus à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'étape de biotinylation, les groupements nitrosothiols étant photosensibles. Après centrifugation (14000 *g*, 15 min, 4°C), la concentration en protéines des surnageants est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Après dosage, la concentration protéique des échantillons est ajustée à 0,8 µg/µL par ajout de tampon HEN complété par des inhibiteurs de protéases, de façon à obtenir environ 600 µg de protéines totales dans un volume final de 800 µL.

1.3 Blocage des thiols libres par méthylthiolation

Les résidus cystéinyles des protéines extraites peuvent se trouver sous au moins 3 états : réduits (-SH), nitrosothiols (-S-NO) et oxydés (ponts disulfures). Dans un premier temps, les résidus cystéine réduits sont protégés par alkylation *via* leur méthylthiolation. Pour ceci, un

mélange de SDS et de MMTS est ajouté dans les échantillons aux concentrations finales de 2,5 % de SDS (v/v) et 20 mM de MMTS. Les échantillons sont incubés à l'obscurité dans un bain-marie à 50°C pendant 25 min et mélangés au vortex régulièrement. L'excès de MMTS est éliminé par précipitation des protéines en ajoutant de l'acétone 100 % (10 volumes), 20 min à -20°C. Après centrifugation (3200 g, 20 min, 4°C), le culot est lavé avec 3 volumes d'acétone 80 % (v/v). Après une seconde centrifugation (3200 g, 5 min, 4°C), l'acétone est éliminée avant l'étape de biotinylation.

1.4 Réduction et biotinylation des nitrosothiols

Les culots de protéines sont repris dans le tampon HEN contenant 1 % de SDS (m/v) à raison de 0,1 µL de tampon par µg de protéines. Les échantillons sont ensuite traités 1 h 30 à température ambiante par un mélange d'ascorbate (1 mM final) et du réactif EZ-Link™ biotine-HPDP (1,33 mM final). L'ascorbate est un agent réducteur réduisant les nitrosothiols en -SH. Le réactif EZ-Link™ biotine-HPDP permet la biotinylation des groupements thiols ainsi réduits. Après cette étape, les tubes peuvent être exposés à la lumière. Les protéines sont ensuite précipitées par l'ajout de 10 volumes d'acétone 100 %. Après incubation 20 min à -20°C et centrifugation des échantillons (14000 g, 12 min, 4°C), l'acétone est éliminée.

2. Immunodétection des protéines biotinylées

2.1 Séparation des protéines en SDS-PAGE

Les culots protéiques sont repris dans 62 µL de tampon Tris-HCl 25 mM pH 6,8 contenant 1 % (m/v) de SDS. La concentration en protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) sur 2 µL d'échantillons. Après dosage, 60 µL de tampon Laemmli non dénaturant concentré 2 fois (Tris-HCl pH 6,8 126 mM, SDS 4 % (m/v), glycérol 20 % (v/v), Bleu de Bromophénol 0,12 % (m/v)) sont ajoutés aux 60 µL restants des échantillons. La quantité de protéines analysées pour chaque traitement est comprise entre 80 et 120 µg suivant les répétitions.

La migration des échantillons est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7 à 12 % suivant les expériences (Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1 % (m/v), acrylamide 7 ou 12 %

(v/v), APS (persulfate d'ammonium) 0,075 % (m/v) et TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) 0,15 % (v/v)) en conditions dénaturantes (SDS-PAGE), en grand (20 cm x 15 cm x 1 mm) ou petit (8 cm x 6 cm x 1 mm) système (Bio-Rad), dans un tampon de migration (Tris 50 mM, glycine 384 mM, SDS 0,1 % (m/v), pH 8,8). Des standards de masse molaire (Euromedex ou Bio-Rad) sont déposés en parallèle des échantillons afin de suivre la migration et d'évaluer la masse molaire des polypeptides d'intérêt.

2.2 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (HybondTM-ECLTM nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences) par transfert semi-sec (Bio-Rad). Entre les deux électrodes sont placés dans l'ordre une feuille de papier buvard (Extra Thick Blot Paper, PROTEAN XL SIZE, Bio-Rad), la membrane, le gel et à nouveau une feuille de papier buvard. La membrane et les papiers buvards sont préalablement imbibés dans le tampon de transfert (Tris 48 mM, Glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v), SDS 0,025 % (m/v)). Après migration par électrophorèse réalisée à 15 V pendant 45 min, les protéines transférées sur la membrane sont colorées par une solution de rouge Ponceau (Ponceau S 0,1 (m/v), acide acétique 5 % (v/v)) permettant de contrôler la qualité du transfert et l'homogénéité de la quantité des protéines entre les différents échantillons. Après décoloration dans l'eau, la membrane est saturée par incubation sous agitation douce dans un tampon TBS (Tris Buffered Saline)-Tween (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % (v/v)) contenant 2 % (m/v) de sérum albumine bovine (SAB) pendant 2 h à température ambiante.

2.3 Détection des protéines biotinylées

La membrane est incubée 1 h 30 min à température ambiante avec un anticorps anti-biotine couplé à l'enzyme peroxydase dilué au 1/50000 (Sigma-Aldrich), ou couplé à l'enzyme phosphatase alcaline dilué au 1/7500 (Sigma-Aldrich), dans un tampon TBS-Tween contenant 1 % de SAB. Après 3 lavages de 10 min dans le tampon TBS-Tween, la présence des protéines biotinylées est révélée par chimioluminescence sur films autoradiographiques grâce à l'utilisation du kit de révélation Lumiglo[®] lorsque l'anticorps est couplé à l'enzyme peroxydase. Lorsque l'anticorps utilisé pour la révélation est couplé à la phosphatase

alcaline, les protéines biotinylées sont détectées par ajout d'un mélange des réactifs BCIP 0,0075 % (m/v) et NBT 0,015 % (m/v), dans un tampon de réaction (Tris 0,1 mM, MgCl₂ 0,5 mM, pH 9,5) directement appliqué sur la membrane.

2.4 Western Blot : Immunodétection spécifique de CDC48

Après saturation dans le tampon TBS-Tween contenant 2 % (m/v) de SAB, la membrane de nitrocellulose préparée comme indiquée ci-dessus est incubée 1 h 30 min à température ambiante avec un anticorps polyclonal dirigé contre CDC48 d'*A. thaliana* préparé à 1/10000 dans un tampon TBS-Tween contenant 1 % de SAB. Après 5 lavages de 10 min dans du TBS-Tween, la membrane est ensuite incubée avec un anticorps secondaire anti-poulet couplé à la peroxydase dilué à 1/10000 dans un tampon TBS-Tween contenant 1 % de SAB. Après 5 nouveaux lavages de 10 min dans le tampon TBS-Tween, la présence de CDC48 est révélée par chimioluminescence sur films autoradiographiques par l'utilisation du kit Lumiglo®.

3. Purification et identification des protéines S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine chez le tabac

3.1 Préparation des extraits protéiques

Les échantillons protéiques sont préparés et prélevés comme décrit au paragraphe 1.2 de cette section. Pour chaque condition testée, les échantillons résultant d'une même cinétique sont rassemblés avant application de la méthode biotin switch, décrite ci-dessus. Après biotinylation, les culots sont repris dans un tampon Tris-HCl 25 mM pH 6,8 contenant 1 % de SDS (m/v) à raison de 0,1 µL de tampon par µg de protéine.

3.2 Préparation et identification des peptides purifiés par spectrométrie de masse

Après l'étape de biotin switch, 100 µg des protéines biotinylées sont digérés par 1 µg d'endoprotéase Lys C, pendant 16 h à 37°C. Le lysat protéique est ensuite chargé sur colonne

échangeuse de cation SCX (*strong cation exchange*, Applied-Biosystem) dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 10mM, acétonitrile 25 % (m/v), pH 3) puis élué par un volume minimal du même tampon supplémenté en sels (KH_2PO_4 10mM, acétonitrile 25 % (m/v), KCl 350 mM, pH 3). Cette étape permet d'améliorer la pureté des polypeptides résultants de la digestion par l'endoprotéase Lys C.

Les polypeptides possédant l'étiquette biotine présents dans la fraction d'éluion sont ensuite purifiés par chromatographie d'affinité en utilisant des colonnes d'avidine (Applied-Biosystems), molécule affine pour la biotine. Les protéines sont chargées dans un tampon phosphate (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7,2) puis éluées dans un volume minimum de tampon acide (acétonitrile 30 % (m/v), acide trifluorique 0,4 %).

La fraction d'éluion correspondant aux polypeptides biotinylés est concentrée par l'utilisation d'un SpeedVac, puis reprise dans 10 μL d'une solution d'acide trifluoroacétique 0,1 % (v/v). Les polypeptides biotinylés sont ensuite soumis à une digestion trypsique 2 h à 50°C avant séparation des peptides par nanochromatographie à haute pression et séquençage par spectrométrie de masse en tandem (ESI-IT MS/MS Esquire HCT (Bruker)). L'identification des peptides, ainsi que des protéines correspondantes, sont réalisées par l'application de l'algorithme MASCOT.

4. Clonage des gènes correspondants aux protéines candidates identifiées

4.1 Transformation des souches bactériennes compétentes

Les différentes souches bactériennes sont transformées par choc thermique. Pour ceci, une aliquote de bactéries compétentes est incubée à 4°C 30 min en présence du vecteur d'intérêt (environ 10 ng). La transformation est réalisée à 42°C 45 s, puis les bactéries sont immédiatement placées dans la glace. L'aliquote est alors reprise dans 250 μL de LB (Sigma-Aldrich) puis incubée 1 h à 37 °C sous agitation. Les bactéries transformées sont ensuite sélectionnées sur milieu solide LB agar contenant les antibiotiques appropriés, selon les vecteurs concernés, de la kanamycine à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, du

chloramphénicol à 34 µg/mL ou de la spectinomycine à 50 µg/mL. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées une nuit à 37°C.

4.2 Recherche des séquences nucléotidiques d'intérêt

Les recherches de séquences codantes correspondantes aux peptides identifiés en spectrométrie de masse ont été réalisées *via* l'utilisation de l'algorithme BLAST (*Basic Local Alignment Search tool*) et sur les bases de données disponibles sur NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

4.3 Prédiction de la structure tridimensionnelle *in silico*

La structure tridimensionnelle est prédite *in silico* par l'utilisation de logiciels de modélisation. Deux approches ont ainsi été utilisées, toutes deux basées sur la séquence primaire de la protéine analysée. La première approche est basée sur une modélisation fonctionnant par homologie avec des séquences dont la structure tridimensionnelle est déjà connue (SWISS-MODEL). La seconde approche prédit les repliements de la structure primaire (*threading* ; I-TASSER ; Roy *et al.*, 2010).

4.4 Clonage des inserts CDCF et CDCM dans le vecteur pENTR D-TOPO

Des ARN totaux issus de cellules de *N. tabacum* préparées comme expliqué au paragraphe 1.2 de cette section mais non traitées par la cryptogéine sont obtenus par extraction au TRI Reagent (Molecular research center Inc.), selon le protocole défini par le fabricant. Un microgramme des ARN totaux obtenus est traité à la DNase1 (Sigma-Aldrich) puis les ADNc correspondants sont obtenus par l'utilisation du kit de rétrotranscription SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), selon les protocoles respectifs des fabricants.

A partir de ces ADNc, l'ADNc pleine longueur codant CDC48 (CDCF) est amplifié par PCR en utilisant l'enzyme Phusion (Finnzyme) et les amorces PL-F et PL-R (Tableau 5).

Les amorces ont été dessinées à partir du CDS (*Coding DNA Sequence*) complet disponible sur les bases de données NCBI. Les quatre premières bases de l'amorce PF-L côté 5' (CACC) correspondent au site d'entrée pour le clonage dans le vecteur pENTR D-TOPO. Les trois bases suivantes correspondent quant à elles au codon Start (ATG) de la séquence codant

CDC48. Les trois premières bases de l'amorce PL-R (CTA) correspondent au codon Stop (UAG) de la séquence de CDC48.

En vue d'étudier le rôle du résidu Cys 526 de CDC48, potentiellement régulé par S-nitrosylation, une stratégie de mutagenèse dirigée a été mise en place afin d'obtenir une séquence codante pleine longueur de CDC48 pour laquelle le résidu Cys 526 a été substitué par un résidu alanine (Ala). L'utilisation d'amorces mutées (C526A-F et C526A-R) ciblant la zone nucléotidique codante pour le résidu Cys526 permet de remplacer celle-ci par une séquence codant pour une alanine (tableau 5). Par une combinaison de PCR présentées sur la figure 18, la mutation est introduite sur la séquence pleine longueur codante et permet l'obtention de l'insert CDCM.

Tableau 5. Amorces PCR utilisées pour les clonages et la mutagenèse dirigée de CDC48

Nom	Séquence	Fonction
PL-F	caccATGACTAACAAAGCTGAATCCTCC	Amplification pleine longueur de l'ADNc de CDC48, Amorce sens
PL-R	CTAACTATACAGGTCATCTTCATCTGC	Amplification pleine longueur de l'ADNc de CDC48, Amorce antisens
C526A-F	CCACCTGGAgcTGGGAAAAC	Amorce mutée pour substituer le résidu cystéine 526 par un résidu alanine, Amorce sens
C526A-R	GTTTTCCCAgcTCCAGGTGG	Amorce mutée pour substituer le résidu cystéine 526 par un résidu alanine, Amorce antisens

Les deux inserts correspondant à la forme native (CDCF) ou mutée (CDCM) de la protéine sont purifiés sur gel puis clonés dans le vecteur d'entrée pENTR/D-TOPO (Invitrogen) du type GATEWAY.

L'amorce PL-F permet l'intégration des deux inserts dans ce vecteur grâce à la séquence 5'cacc-3' localisée en 5' de l'amorce (figure 19). Les inserts sont clonés dans le vecteur d'entrée linéarisé (pENTR) par l'utilisation de la D-TOPO isomérase (Invitrogen). Le produit de clonage est introduit dans des bactéries TOP10 (Invitrogen) compétentes, sélectionnées sur un milieu de croissance contenant de la kanamycine à 50 µg/mL. Les constructions sont vérifiées sur des minipréparations d'ADN plasmidique par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction PvuII (Promega), 1 h à 37°C. Les profils de digestions sont visualisés par

électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 %. Les constructions sont confirmées par séquençage de l'insert (Eurofins MWG Opéron).

4.5 Réaction de ligation-recombinaison et obtention des bactéries recombinantes

A partir du pENTR D-TOPO contenant les inserts CDCF ou CDCM, une réaction de ligation-recombinaison (LR) est réalisée en utilisant le kit GATEWAY LR Clonase (Invitrogen), selon le protocole fourni par le fabricant en utilisant comme vecteur de destination GATEWAY le plasmide pHGWA (Busso *et al.*, 2005), fourni par le Dr. Didier Busso (IGBMC, Strasbourg). La technologie GATEWAY permet, par recombinaison homologue entre les régions AttR1 et AttL1 d'une part, et AttR2 et AttL2 d'autre part (figure 19), le passage de l'insert cloné du pENTR D-TOPO au vecteur d'expression pHGWA.

Les inserts sont placés en phase de l'ATG présent sur le plasmide pHGWA en vue de la fusion d'une étiquette polyhistidine en N-terminal des protéines recombinantes, l'ensemble étant sous le contrôle d'un opéron lactose et donc inductible par l'IPTG. La fusion entre l'étiquette polyhistidine et les inserts est vérifiée par séquençage.

Les produits de la réaction LR ont été introduits, après vérification de la construction par digestion enzymatique et analyse du profil de restriction sur gel d'agarose, dans des bactéries *E. coli* Rosetta. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur ampicilline et chloramphénicol.

5. Expression hétérologue des protéines candidates

5.1 Induction de l'expression

Les bactéries recombinantes sont mises en culture liquide dans du LB contenant les antibiotiques appropriés, à 37°C sous agitation (150 rpm). Lorsque la culture bactérienne atteint une densité optique à 600 nm comprise entre 0,6 et 1, l'induction de l'expression hétérologue est déclenchée par l'ajout d'IPTG, à la concentration finale de 1 mM. Les cultures cellulaires sont alors placées à 20°C, sous agitation (150 rpm), pendant 20 h.

5.2 Vérification de la solubilité des protéines exprimées

Les bactéries sont récoltées par centrifugation (6000 *g*, 25 min, 4°C). Les culots sont repris dans un volume minimal (environ 5 mL pour une culture initiale d'un litre) de tampon phosphate (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4) contenant 2 mM de PMSF. La solution bactérienne est alors soumise à sonication (2 min, pulse 50/50, 4°C). Après centrifugation (25000 *g*, 15 min, 4°C), les fractions soluble (FS) et non-soluble (FNS) sont séparées, puis un aliquote de chacune d'entre elles (FS, FNS et FT : fraction totale) est chargée sur gel SDS-PAGE, après ajout de tampon de charge dénaturant Laemmli 1X (Laemmli 5X : Tris-HCl 75 mM, glycérol 12,5% (v/v), SDS 2,5% (m/v), β-mercaptoéthanol 6,25% (v/v), bleu de bromophénol 0,05% (m/v)).

5.3 Purification des protéines recombinantes candidates

Les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie d'affinité à l'aide de colonnes HisTrapp FF (GE Healthcare) à partir des FS des lysats bactériens. Ces colonnes sont composées d'un polymère de sépharose chargé en nickel et permettent la purification des protéines présentant une étiquette polyhistidine. La purification est réalisée à 4°C. Les lysats sont déposés sur les colonnes de chromatographie dans la phase mobile (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4). Les protéines sont ensuite éluées de la colonne par le tampon d'éluion (NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 500 mM, imidazole 500 mM, pH 7,4). Le profil d'éluion est suivi par spectrophotométrie à 280 nm. Les fractions d'éluions obtenues sont ensuite concentrées à l'aide d'Amicons Ultra 50K (Millipore) et leurs teneurs en protéines recombinantes déterminées par la méthode de Bradford (1976). La qualité de la purification est estimée par SDS-PAGE.

6. Purification et analyses protéiques

6.1 Vérification de la S-nitrosylation des protéines candidates *in vitro*

Cinq microgrammes de protéines recombinantes purifiées reprises dans 100 µL de tampon HEN sont traités ou non par du DEA/NO à une concentration finale de 100 µM ou du GSNO à une concentration finale de 125 µM. Pour les échantillons traités au GSNO, des contrôles

traités aux mêmes concentrations de GSH sont réalisés. La technique du biotin switch décrite précédemment est alors appliquée sur ces échantillons. Les protéines sont ensuite soumises à une électrophorèse SDS PAGE avant transfert sur membrane de nitrocellulose. L'immunodétection des protéines biotinyllées est réalisée *via* l'utilisation d'anticorps dirigés contre la biotine et couplés à une peroxydase comme décrit précédemment.

6.2 Dichroïsme circulaire et fluorescence

Les analyses spectroscopiques sont réalisées dans un spectropolarimètre JASCO J-815 équipé d'une unité de contrôle de température Peltier et d'une unité de détection de fluorescence FMO427. Les mesures de dichroïsme circulaire (CD) sont effectuées dans une cuve en quartz de 0,2 cm de large (vitesse de balayage : 50 nm/min, temps de réponse : 4 secondes, largeur de bande : 2 nm, hauteur de mesure des données : 0,1 nm/s) avec une moyenne de trois balayages pour chaque spectre, d'une longueur d'onde comprise entre 195 nm et 280 nm. Les mesures de fluorescence sont effectuées dans une cuve de 1 cm de large avec une longueur d'onde d'excitation de 295 nm et une mesure de l'émission de fluorescence de 300 nm à 400 nm. Les échantillons de protéines sont concentrés à 2 pM. Pour les expériences de S-nitrosylation, CDCF et CDCM ont été traitées par le GSNO à 125 µM final pendant 20 minutes à l'obscurité, à température ambiante, puis immédiatement soumises aux analyses spectroscopiques.

6.3 Expériences de dénaturation thermique

Les expériences de dénaturation sont réalisées dans le même appareil en augmentant la température à raison de 0,5°C par minute, de 25°C à 80°C. La dénaturation est suivie par CD en suivant la réduction du signal CD à 222 nm. Les données sont collectées par intervalles de 0,1 nm. La fraction de protéine dénaturée (f_u) est estimée à partir de l'équation (1) :

$$(1) f_u = ([\vartheta]_{222} - [\vartheta]_N) / ([\vartheta]_U - [\vartheta]_N)$$

où $[\vartheta]_{222}$ est l'ellipticité molaire moyenne des résidus de la protéine à 222 nm, exprimée en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ et calculée à partir de l'équation 2 spécifiée ci-dessous. $[\vartheta]_N$ et $[\vartheta]_U$ sont respectivement l'ellipticité molaire moyenne des résidus des formes native et dénaturée de la protéine .

$$(2) [\vartheta] = (\vartheta \times 100 \times M) / (C \times l \times n)$$

où ϑ est l'ellipticité molaire exprimée en degrés, l est le chemin optique exprimé en cm, C est la concentration des échantillons exprimée en mg/mL, M est la masse moléculaire de la protéine et n le nombre de résidus de la protéine.

La température de fusion correspond à la température pour laquelle la moitié des protéines de l'échantillon présentent une conformation dénaturée.

6.4 Tests d'activités

L'activité de CDC48 a été estimée en mesurant les phosphates libérés lors de l'hydrolyse de l'ATP par cette dernière. Les phosphates sont dosés par l'essai au vert de Malachite, selon la méthode développée par Rowlands *et al.* (2004), après quelques modifications.

Une aliquote de protéines recombinantes purifiées est concentrée à l'aide d'amicons ultra 50 K, puis repris dans le tampon d'activité (Tris HCl 100 mM, MgCl₂ 6 mM, KCl 2 mM, pH 7,4), avant détermination de la concentration protéique par la méthode de Bradford (1976).

Le réactif de Malachite est préparé extemporanément. Il se compose de 2 volumes de vert de Malachite (solution à 0,0812 % (m/v) préparée dans de l'eau ultrapure), un volume d'ammonium molybdate (solution à 5,72 % (m/v) dans du HCl 6 M), un volume de polyvinyl alcool (solution à 2,32 % (m/v) dans de l'eau ultrapure) et deux volumes d'eau ultrapure. Une fois préparé, le tampon est incubé à température ambiante 30 min au moins avant utilisation, sa couleur passant de brun foncé à jaune clair.

Un microgramme de protéine recombinante reprise dans le tampon d'activité est soumis ou non à un traitement par un donneur de NO, le DEA/NO ou le GSNO, aux concentrations précisées, pendant 20 min à l'obscurité, en microplaque 96 puits. 0,2 mM d'ATP est ensuite ajouté aux protéines dans un volume final de 25 μ L. Une gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de KH₂PO₄ de 0 à 300 μ M dans 25 μ L finaux. Après 5, 10 ou 15 min d'incubation sous agitation à l'obscurité et à température ambiante, 80 μ L de réactif de Malachite sont ajoutés aux échantillons, suivis par 10 μ L d'une solution aqueuse de citrate de sodium 34% (m/v), stoppant ainsi la réaction enzymatique. La coloration verte, témoignant de la libération de phosphate libre, est laissée à développer pendant 15 min puis l'absorbance correspondante est mesurée à 650 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques.

*CHAPITRE I : IDENTIFICATION DES PROTEINES
S-NITROSYLEES EN REponse A LA
CRYPTOGEINE*

Résultats

1. Modèle d'étude

La liaison S-nitrosothiol établie entre un résidu Cys et le NO est une liaison particulièrement labile rendant difficile la détection des protéines S-nitrosylées dans des conditions physiologiques (Benhar *et al.*, 2009). Outre les difficultés inhérentes à la méthode de détection proprement dite (voir ci-dessous et publication 2 en annexe), l'identification de protéines S-nitrosylées nécessite de s'appuyer sur un modèle biologique dans lequel la production de NO est conséquente et mesurée de façon reproductible. C'est le cas du modèle cryptogéine/tabac utilisé pour ce travail. En effet, comme présenté en introduction, après traitement de suspensions cellulaires de tabac par la cryptogéine, une production de NO de l'ordre de la centaine de nanomolaires est mesurée localement, et ce de façon reproductible *via* différentes méthodes (Besson-Bard *et al.*, 2008b ; Lamotte *et al.*, 2004). De plus, les mécanismes de signalisation cellulaire sous-jacents aux effets de la cryptogéine ont été largement étudiés dans ce modèle, offrant la possibilité de replacer l'implication de protéines S-nitrosylées en fonction d'autres évènements cellulaires précédemment décrits. Nous avons donc cherché à établir dans un premier temps un profil de S-nitrosylation spécifique en réponse à la cryptogéine dans des suspensions cellulaires de tabac.

2. Méthode de détection des protéines S-nitrosylées

Le caractère labile de la liaison S-NO constitue un frein important à l'identification de protéines S-nitrosylées. L'identification de la plupart de ces dernières a en effet été basée sur des travaux *in vitro* où le caractère S-nitrosylable de protéines recombinantes a été vérifié à l'aide de NO généré artificiellement. En 2001, Jaffrey *et al.* ont proposé une méthode dite du biotin switch autorisant la détection de protéines S-nitrosylées dans des conditions physiologiques. Cette méthode consiste à substituer chimiquement une étiquette biotine à la fonction S-nitrosothiol (figure 12, voir également publication 2 en annexe).

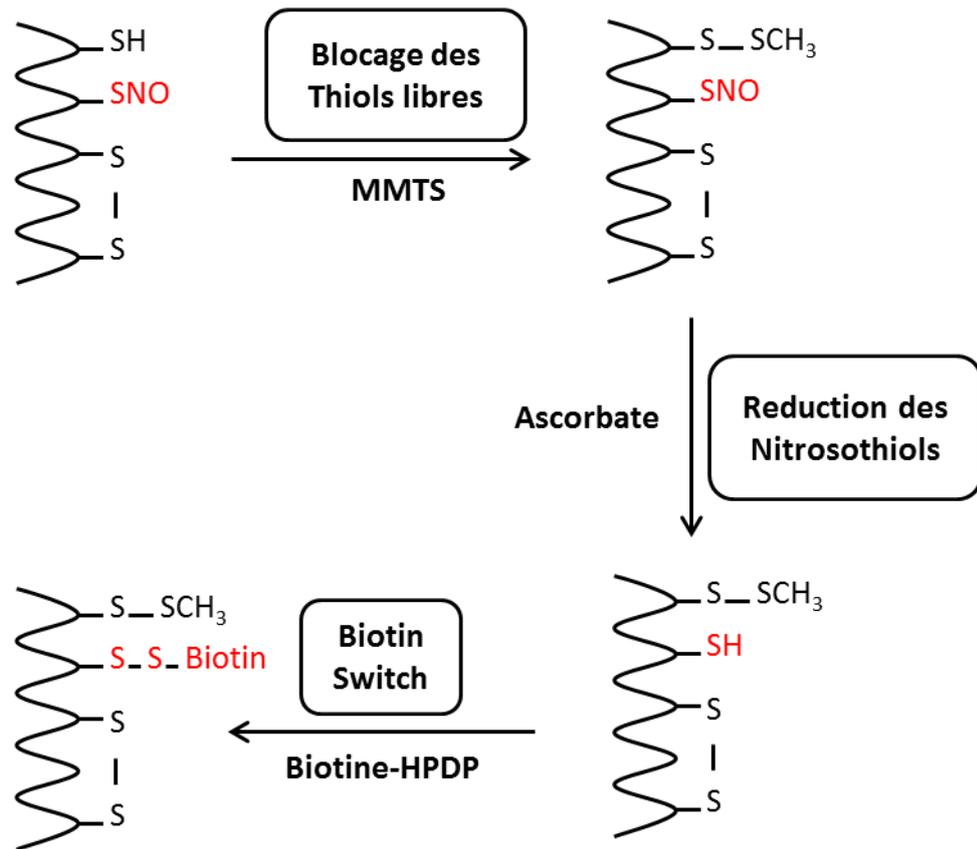


Figure 12 : Représentation schématique de la technique du Biotin Switch. Les extraits protéiques subissent trois étapes permettant la substitution spécifique des liaisons S-nitrosothiols (S-NO) par une étiquette biotine. Dans une première étape, les thiols libres sont protégés par méthylation *via* l'agent alkylant MMTS (méthylméthane thiosulfonate). Les liaisons S-NO sont ensuite réduites par l'ascorbate avant le marquage des thiols ainsi libérés par la biotine-HPDP.

Cette méthode consiste en 2 étapes distinctes et a été adaptée à notre modèle d'étude (figure 12). La liaison S-NO étant sensible à la lumière, l'ensemble de la procédure est réalisée à l'obscurité. A partir d'extraits protéiques totaux, la première étape consiste à protéger les groupements thiols libres des protéines *via* leur alkylation par le méthylméthanethiosulfonate (MMTS). L'excès de MMTS est éliminé en précipitant les protéines par ajout d'acétone froid. Dans la seconde étape, les résidus S-nitrosylés sont réduits par l'ascorbate, puis biotinylés grâce à l'utilisation de biotine-HPDP interagissant spécifiquement avec les résidus Cys réduits. Ici encore, une étape de précipitation des protéines permet de supprimer l'excès de biotine-HPDP avant reprise du culot dans un tampon approprié. Les protéines biotinyllées sont finalement purifiées par affinité dans le but de les identifier ou sont directement révélées par immunoblotting en utilisant des anticorps dirigés contre la biotine.

Dans le cadre de nos travaux, plusieurs modifications ont été apportées à la méthode initiale développée par Jaffrey *et al.* (2001). D'une part, la quantité initiale de protéines a été augmentée à 600 µg pour les expériences de caractérisation des protéines biotinylées par immunoblotting et à 2,5 mg pour leur identification en spectrométrie de masse (MS), au lieu des 150 µg préconisés par Jaffrey *et al.* (2001). D'autre part, les protéines ont été extraites dans un tampon HEN (voir le paragraphe 1.2 de la section Méthode) supplémenté en antiprotéases afin d'éviter la dégradation des protéines au cours du traitement. Enfin, parmi les autres modifications mineures apportées, précisons un dosage protéique par la méthode de Bradford (1976) avant le chargement des protéines sur le gel de polyacrylamide, et l'utilisation de grands gels de polyacrylamide (20 x 15 cm) afin d'obtenir des profils protéiques plus résolutifs.

Outre la possibilité de détecter des protéines S-nitrosylées dans un contexte physiologique, plusieurs intérêts de la technique de biotin switch peuvent être soulignés. D'une part, cette méthode peut être menée de façon routinière. D'autre part, il est possible de vérifier si une protéine d'intérêt est S-nitrosylée *in vivo*. Pour ceci, un western blotting utilisant un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est réalisé à partir des protéines biotinylées purifiées par affinité (voir le chapitre II de ce travail). Enfin, comme indiqué précédemment, après leur purification, les protéines biotinylées peuvent être analysées par MS en vue de leur identification. Toutefois, cette méthode présente également des limites. Ainsi, en partie dû au fait des encombrements stériques inhérents aux protéines, le blocage des groupements thiols libres par le MMTS n'est probablement pas complètement efficace. Les résidus Cys réduits non bloqués pourront donc être sujets à la biotinylation par la biotine-HPDP, générant des faux-positifs. De plus, les différentes étapes de précipitation à l'acétone s'accompagnent d'une perte importante de matériel. En effet, seulement un peu moins de 20 % des protéines initiales est recouvré à l'issue du traitement.

3. Identification de protéines S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine

3.1 Application de la méthode biotin switch

Des suspensions cellulaires de tabac ont été traitées par 100 nM de cryptogéine. Des aliquotes de 2,5 mL de cellules ont été prélevées à 0, 5, 10, 15, 30, 60 et 120 minutes après traitement puis congelées dans l'azote liquide. Après broyage des cellules, les protéines totales ont été extraites et soumises à la technique du biotin switch décrite ci-dessus. Les extraits protéiques ainsi traités ont ensuite été chargés sur un gel de polyacrylamide et séparés par électrophorèse, avant transfert sur membrane de nitrocellulose et révélation des protéines biotinylées par immunodétection, en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette biotine.

Deux contrôles ont été réalisés. D'une part, un échantillon pour lequel les groupements thiols libres n'ont pas été bloqués par le MMTS a été rajouté. Ce contrôle permet d'estimer l'efficacité du MMTS, de la biotinylation et donc de la méthode biotin switch. D'autre part, afin d'estimer la part de protéines biotinylées dans les suspensions cellulaires de tabac, un échantillon non traité à la biotine a été préparé.

Un résultat représentatif des répliques obtenus est présenté figure 13. Dans les pistes correspondant aux protéines extraites des cellules de tabac traitées par la cryptogéine, une douzaine de protéines ayant immunoréagit avec l'anticorps dirigé contre la biotine sont détectées dès 5 minutes de traitement par l'éliciteur. Ces protéines présentent des masses moléculaires variées, de 25 à 80 kDa. L'intensité du signal est importante et décroît ensuite avec le temps de traitement, peu de protéines biotinylées étant détectées après 120 minutes. En comparaison, dans les pistes correspondant aux protéines extraites des cellules témoins, moins d'une dizaine de protéines biotinylées ont été immunodétectées avec une intensité de signal beaucoup moins importante que celle observée dans les échantillons issus du traitement par la cryptogéine.

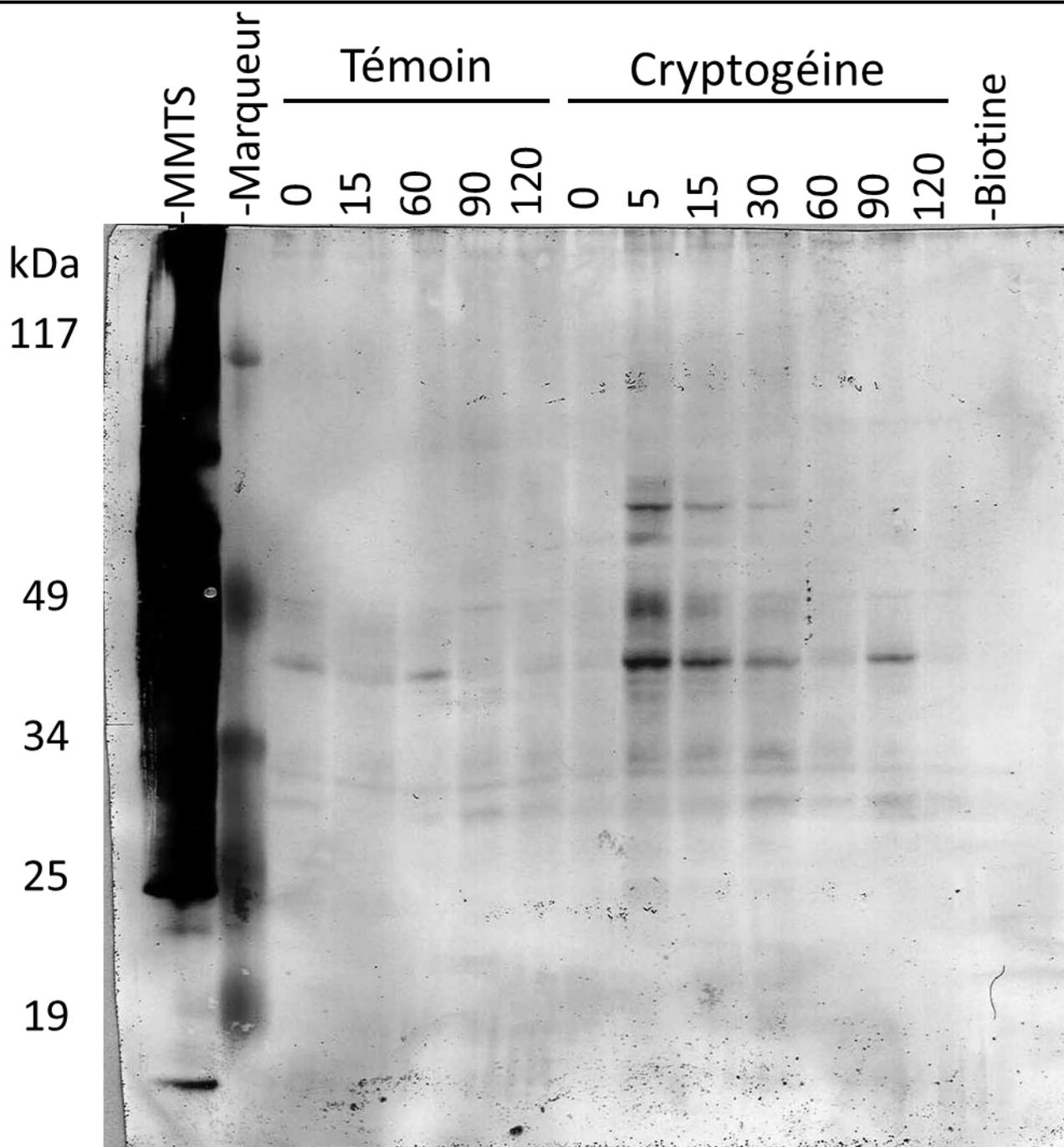


Figure 13 : Profil protéique de S-nitrosylation en réponse à la cryptogéine. Les cellules ont été prélevées 0, 5, 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après traitement par la cryptogéine. Les cellules témoins ont été traitées par un volume équivalent d' H_2O . Les extraits protéiques correspondants ont ensuite été soumis à la technique du biotin switch. Un dosage des protéines par la méthode de Bradford avant chargement sur gel, puis une coloration de la membrane après transfert au rouge ponceau, ont permis de s'assurer de l'homogénéité des quantités protéiques chargées sur gel. Les protéines biotinylées ont été révélées à l'aide d'anticorps anti-biotine couplés à la phosphatase alcaline. -MMTS : contrôle positif. Marqueur : Marqueur de poids moléculaire. -Biotine : contrôle négatif. La figure présente un résultat représentatif d'une douzaine de répliques indépendants.

Concernant les contrôles, la piste relative aux protéines non-traitées par le MMTS, c'est-à-dire pour lesquelles l'ensemble des groupements thiols libres sont potentiellement marqués par la biotine, présente une intensité de marquage très importante. Cette piste témoigne de l'efficacité de blocage du MMTS. La piste correspondant à des protéines non-traitées par la

biotine permet la visualisation des protéines biotinylées chez le tabac soit constitutivement, soit en réponse à la cryptogéine. Elle permet également d'estimer des protéines détectées non spécifiquement par l'anticorps dirigé contre la biotine. On remarque que le signal obtenu pour cette piste est quasi nul, démontrant que les protéines biotinylées chez le tabac sont peu abondantes.

En conclusion, la méthode du biotin switch révèle un profil différentiel de protéines biotinylées, donc potentiellement S-nitrosylées, entre les suspensions cellulaires témoins et traitées par la cryptogéine.

Dans la douzaine d'expériences similaires que nous avons réalisées, ce différentiel a systématiquement été observé. Toutefois, la cinétique d'apparition des protéines potentiellement S-nitrosylées dans les échantillons traités par la cryptogéine s'est avérée variable selon les expériences, le profil observé à 5 minutes dans la figure 13 pouvant être observé à des temps ultérieurs (15, 30 voire 60 minutes), ceci malgré le soin que nous avons pris pour systématiquement travailler dans les mêmes conditions. Au regard de cette contrainte, pour la suite des analyses, les différents échantillons d'une même cinétique ont été mélangés, permettant l'obtention d'un seul échantillon traité ou témoin par cinétique.

3.2 Purification des protéines biotinylées

Sur la base du profil différentiel précédemment observé, les protéines biotinylées ont été purifiées. Pour ceci, une purification par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine, molécule ayant une forte affinité pour la biotine, a été réalisée à partir de 2,5 mg de protéines totales par prélèvement, soit des quantités plus importantes que celles utilisées pour la mise en évidence du profil de S-nitrosylation. Afin d'améliorer l'efficacité de purification, nous avons au préalable rajouté une étape de digestion des protéines par l'endoprotéase Lys-C (EndoLys-C), enzyme clivant spécifiquement les résidus Lys à leur extrémité C-terminale (figure 14).

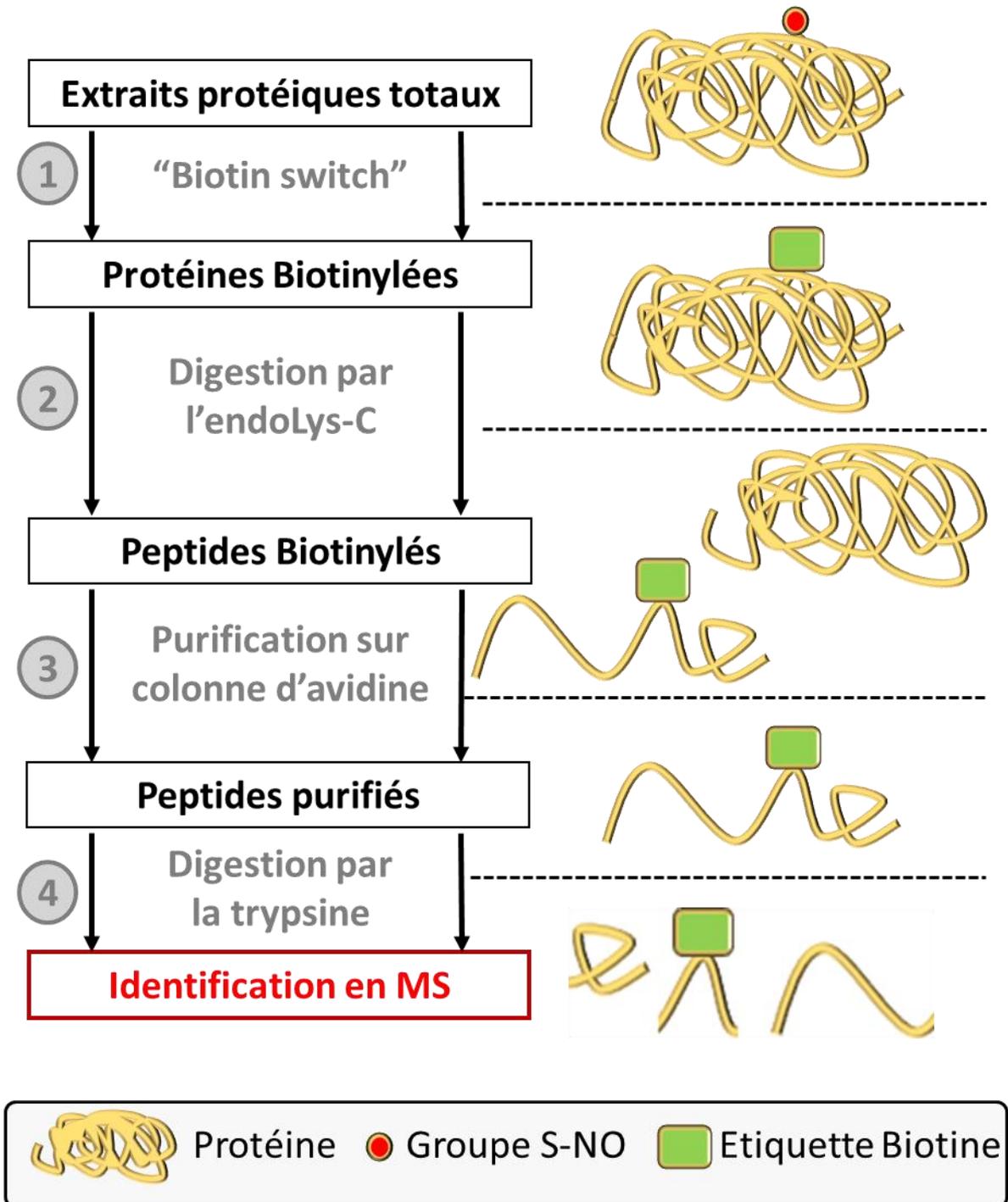


Figure 14 : Stratégie expérimentale pour l'identification des protéines S-nitrosylées. Les extraits protéiques totaux ont été soumis à la technique du biotin switch (①) substituant les liaisons S-NO par une étiquette biotine. Les protéines ont ensuite été soumises à l'action de l'endoprotéase Lys-C (②), permettant l'obtention de fragments peptidiques biotinylés plus facilement purifiables. Ces fragments peptidiques ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine (③) puis soumis à une digestion par la trypsine (④). Les peptides obtenus, biotinylés ou directement contigus à un peptide biotinylé, ont finalement été analysés et identifiés en spectrométrie de masse (MS).

3.3 Identification des peptides biotinylés par MS

Après purification des peptides biotinylés, ces derniers ont été digérés par la trypsine puis les fragments tryptiques correspondants ont été analysés par MS ESI MS/MS couplée à une nanochromatographie liquide. Du fait des deux digestions enzymatiques réalisées (figure 14), les peptides analysés en MS sont soit ceux comportant l'étiquette biotine, donc possédant un ou plusieurs résidus Cys potentiellement S-nitrosylés, soit ceux contigus à un peptide présentant cette étiquette. Les analyses ont porté sur les échantillons peptidiques correspondant à trois essais biologiques indépendants avec, pour chacun, un traitement cryptogéine et un contrôle. De plus, un échantillon correspondant à un essai où la technique biotin switch a été appliquée en absence de biotine a été inclus.

Une analyse MASCOT a ensuite permis l'identification des protéines candidates et, pour certaines d'entre elles, du résidu Cys potentiellement S-nitrosylé (tableau 6, figurées en rouge). Sur l'ensemble des échantillons analysés, 56 protéines ont pu être identifiées, à partir d'un ou plusieurs de leurs peptides. Seuls les peptides présentant un score d'identification supérieur à 20 ont été conservés. Une classification fonctionnelle a été réalisée selon Bevan *et al.* 1998.

Tableau 6: Résultats des analyses de spectrométrie de masse. Les résidus Cys impliqués dans la S-nitrosylation sont indiqués en rouge si présents dans la séquence du peptide identifié. CDC48, le candidat retenu pour la suite des analyses, est figuré en orange. Cryptogéine : protéines identifiées uniquement dans les échantillons issus de cellules traitées par la cryptogéine. Témoin : protéines identifiées uniquement dans les échantillons issus de cellules non-traitées. Cryptogéine et témoins : protéines identifiées pour les échantillons issus de cellules traitées ou non par la cryptogéine. Contrôle négatif : protéines identifiées au moins dans l'échantillon protéique non-traité par la biotine. La classification fonctionnelle à été réalisée selon Bevan *et al.*, 1998.

Numéro d'accèsion	Description	Classification fonctionnelle	Sous-classification fonctionnelle	Peptide identifié	Organisme	S-nitrosylation précédemment démontrée
Q1G0Z1	putative disassembly related protein CDC48	Adressage des protéines et Stockage	Protéolyse	K.GVLFYGP ^{CG} K.T	<i>Nicotiana tabacum</i>	
Q8SIC3	ATP synthase subunit alpha	Energie		K.TAIAIDTILNQK.Q	<i>Ficalhoa laurifolia</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Palmieri <i>et al.</i> , 2010 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
1YVEI	Acetohydroxy Acid Isomeroreductase	Métabolisme	Amino-Acides	K.NISVIAV ^{CP} K.G	<i>Spinacia oleracea</i>	
P23981	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyl transferase 1	Métabolisme	Amino-Acides	K.TFPNYFDVLQYQSK.H	<i>Nicotiana tabacum</i>	
CALM_CAPAN	Calmodulin	Signalisation	Autres	K.DGDG ^{CIT} K.E	<i>Capsicum annuum</i>	
Q69IM9	Putative CDPK	Signalisation	Kinases	R.ISALGAGADSVVRLR.D	<i>Oryza sativa</i>	
Q8VWN8	Reversibly glycosylated polypeptide (GRP-like protein 1)	Structure cellulaire	Paroi Cellulaire	K.TGLPYIWHSK.A	<i>Gossypium hirsutum</i>	
Q2VCI3	60S ribosomal protein L7A-like	Synthèse Protéique	Protéines Ribosomales	K.HITYLIEQNK.A	<i>Solanum tuberosum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Abat & Deswal, 2009
Q9FLY7	hypothetical protein	Inconnue		K.N ^{CD} VLQLEVVPRQEK.S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Q70KS1	NAM1 protein	Inconnue		R.LDPSDGTNLELENASEFRLS	<i>Oryza sativa</i>	
Q3E950	Uncharacterized protein At5g25600.1	Inconnue		R.VLRALPR.S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Q6ZI28	Putative 8-oxoguanine DNA glycosylase isoform 1a; 8-hydroxyguanine DNA glycosylase	Croissance cellulaire / Division	Recombinaison / Réparation	K.VATQYLMPELAGK.S	<i>Oryza sativa</i>	
Q2PYX3	Fructose-bisphosphate aldolase	Energie	Glycolyse	K.AQA ^{AF} LTR. ^C	<i>Solanum tuberosum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Abat & Deswal, 2009 - Abat <i>et al.</i> , 2008 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
Q8H9C7	NADP-dependent malic enzyme	Energie	Photosynthèse	K.YAES ^{CM} YTPNYR.S	<i>Solanum tuberosum</i>	- Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008
Q94JJ0	Fructose-bisphosphate aldolase	Energie	Glycolyse	R.GILAI ^{DES} NAT ^{CG} K.R	<i>Oryza sativa</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Abat & Deswal, 2009 - Abat <i>et al.</i> , 2008 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
Q84UH4	Dehydroascorbate reductase	Métabolisme	Cofacteurs	K.AAVGAPNV ^{LGDC} PF SQR.A	<i>Nicotiana tabacum</i>	- Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008
Q6IVK4	Putative UDP-glucuronate decarboxylase 2	Métabolisme	Sucres et Polysaccharides	K.TNVIGTLNMLGLAK.R	<i>Nicotiana tabacum</i>	

	H84714	Aspartate aminotransferase	Métabolisme	Amino-Acides	R.ISMAGVTTGNVGYL ANAIHEVTK.S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
	Q2V3B8	Uncharacterized protein At4g34230.2	Inconnue		R.DPSGILSPYTYTLR.E	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Témoïn	AAA63543	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Adressage des protéines et Stockage	Repliement et Stabilisation	K.HTGPGILSMANAGP GTNGSQFFICTAK.T	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
	Q1RSM6	AAA ATPase; 26S proteasome subunit P45	Adressage des protéines et Stockage	Protéolyse	R.ACAAQTNATFLK.L	<i>Medicago truncatula</i>	
	JQ1185	Enolase	Energie	Glycolyse	K.TGAPCR.S	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
	Q9FSF0	Malate dehydrogenase	Energie	Respiration	K.VLVVANPANTNALIL K.E	<i>Nicotiana tabacum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008
	Q9XG67	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Energie	Glycolyse	R.FGIVEGLMTTVHSIT ATQK.T	<i>Nicotiana tabacum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008 - Abat <i>et al.</i> , 2008 - Tanou <i>et al.</i> , 2009 - Wawer <i>et al.</i> , 2010
	T06407	Mono-dehydroascorbate reductase	Métabolisme	Co-Facteurs	K.AYLFPEGAAR.L	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008
	Q76MS4	LEXYL2 protein	Métabolisme	Sucres et Polysaccharides	K.HYTAYDVEDDWK.G	<i>Solanum lycopersicum</i>	
	BAD37407	Probable GDP-L-fucose synthase 1	Métabolisme	Sucres et Polysaccharides	K.LLFLGSSCIYPK.F	<i>Oryza sativa</i>	
	Q6SYB9	S-adenosylmethionine synthetase 2	Métabolisme	Amino-Acides	K.TNMVMVFGEITTK.A	<i>Nicotiana tabacum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
	Q9FRY2	Betaine aldehyde dehydrogenase	Métabolisme Secondaire	Amines	K.IMTAAAQLVKPVTLE LGGK.S	<i>Avicennia marina</i>	
	Q70G33	Hydroxycinnamoyl CoA quinate transferase	Métabolisme Secondaire	Phénylpropanoïde / Composés Phénoliques	R.LCPPLPPGYLGNVVF TGTPMAK.S	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	CAA77130	Glutaredoxin	Pathologie / Défense	Réponse aux stress	K.HIGGCDATTALHR.E	<i>Solanum lycopersicum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
	Q8H976	Fructokinase	Signalisation	Kinases	K.EAGALLSYDPNLR.L	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	Q946G3	Small GTPase Rab2	Signalisation	Protéines G	R.AVSTEEGEQFAK.E	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	UBKM	Tubulin beta-1/beta-2 chain	Structure cellulaire	Cytosquelette	K.NSSYFVEWIPNNVK.S	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
	Q8VXC9	Alpha-tubulin	Structure cellulaire	Cytosquelette	R.TIQFVDWCPTGFK.C	<i>Nicotiana tabacum</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
	Q38M60	Ribosome-associated protein p40-like	Synthèse Protéique	Protéines Ribosomales	R.HTPGFTFNQLQTSYS EPR.L	<i>Solanum tuberosum</i>	
	Q259R9	Putative uncharacterized protein	Inconnue		K.LPFADASVGSVLAVI K.K	<i>Oryza sativa</i>	
Q3E6V1	Uncharacterized protein At3g43153.1	Inconnue		R.SSEIGGAVIR.V	<i>Arabidopsis thaliana</i>		
Q688G5	Putative uncharacterized protein OSJNBa0039A21.9	Inconnue		R.SVKNMAELVK.K	<i>Oryza sativa</i>		

Contrôle négatif	Q6X0N9	Putative Rab geranylgeranyl transferase type II beta subunit	Adressage des protéines et Stockage	Modification	K.LNVIDVDK.V	<i>Glycine max</i>	
	CAC05440	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-2, chloroplastic	Adressage des protéines et Stockage	Repliement et Stabilisation	R.HVVFGQVIEGMEVV K.L	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005
	Q1PCD2	Glucose-6-phosphate isomerase	Energie	Glycolyse	K.HMVAVSTNLK.L	<i>Solanum lycopersicum</i>	
	AAA67087	NADP-dependent malic enzyme	Energie	Photosynthèse	R.RPQGLYISLK.E	<i>Vitis vinifera</i>	- Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008
	AAP43628	Phosphoenolpyruvate carboxylase	Energie	Photosynthèse	K.NQTVDLVLAHTPTQ SVR.R	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Abat <i>et al.</i> , 2008 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
	Q9ZQY1	Pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit isoform 3	Energie	Respiration	K.SNYMSAGQISVPIVF R.G	<i>Zea Mays</i>	
	Q1M0P0	UDP-glucuronic acid decarboxylase	Métabolisme		K.TNVIGTLNMLGLAK. R	<i>Populus tomentosa</i>	
	T04092	Phospholipase D alpha 1	Métabolisme	Lipides et stérols	K.HIVQALNAK.G	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	Q6T379	Triosephosphate isomerase	Métabolisme	Sucres et Polysaccharides	K.WLQANVSAEVAAST R.I	<i>Solanum chacoense</i>	- Romero-Puertas <i>et al.</i> , 2008 - Abat & Deswal, 2009 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
	Q1W7A7	Developmental process IMP	Métabolisme		K.HYLGPFELYGK.V	<i>Solanum lycopersicum</i>	
	Q8RWM8	Enolase	Métabolisme	Sucres et Polysaccharides	K.VNQIGSVTESIEAVK. M	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- Lindermayr <i>et al.</i> , 2005 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
	Q8W3Z7	UDP-glucose pyrophosphorylase	Métabolisme	Sucres et Polysaccharides	R.LVTEDFSPLPK.G	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	Q40589	Cytosolic ascorbate peroxidase	Pathologie / Défense	Réponse aux stress	K.CYPTVSEEYLK.A	<i>Nicotiana tabacum</i>	- Abat & Deswal, 2009 - Tanou <i>et al.</i> , 2009
	Q50LG4	Peroxidase	Pathologie / Défense	Réponse aux stress	K.LGGQGYNVALGR.R	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	Q8H2B6	Pollen specific actin-depolymerizing factor 2	Structure cellulaire	Cytosquelette	K.IFFIAWSPDTSK.V	<i>Nicotiana tabacum</i>	
	Q1EPK9	Putative uncharacterized protein	Inconnu		K.QCGFHMHIGAAELR .S	<i>Musa acuminata</i>	
	Q6ZB68	Putative uncharacterized protein OJ1119_B10.7	Inconnu		R.VAVVAGFTR.R	<i>Oryza sativa</i>	

De façon détaillée, 17 protéines ont été détectées dans le contrôle négatif pour lequel les extraits protéiques n'ont pas été soumis à une biotinylation lors de l'étape de biotin switch. Parmi les peptides ayant permis leur identification, seuls deux d'entre eux sont identifiés comme biotinylés (Q8W3Z7 et Q40589). Tous les autres sont non biotinylés ou contigus à un résidu cystéine sur la séquence primaire des protéines identifiées. Dans tous les cas, ces

protéines sont très probablement des faux-positifs (voir la discussion de ce chapitre) et ne sont pas prises en compte pour la suite des analyses.

Trente-neuf protéines différentes sont détectées comme potentiellement S-nitrosylées dans les échantillons traités par la cryptogéine et/ou les échantillons témoins. Plus précisément, 20 protéines ne sont retrouvées que dans les échantillons témoins, 11 protéines sont spécifiques aux échantillons issus de suspensions cellulaires traitées par la cryptogéine et 8 protéines sont communément retrouvées dans ces deux types d'échantillons. Fait intéressant, parmi ces 39 protéines, 15 d'entre elles ont déjà été référencées comme cibles potentielles de la S-nitrosylation chez les plantes dans diverses analyses protéomiques à grande échelle (Tableau 6 ; Lindermayr *et al.*, 2005 ; Palmieri *et al.*, 2010 ; Tanou *et al.*, 2009 ; Abat *et al.*, 2008 ; Abat & Deswal, 2009 ; Romero-puertas *et al.*, 2008).

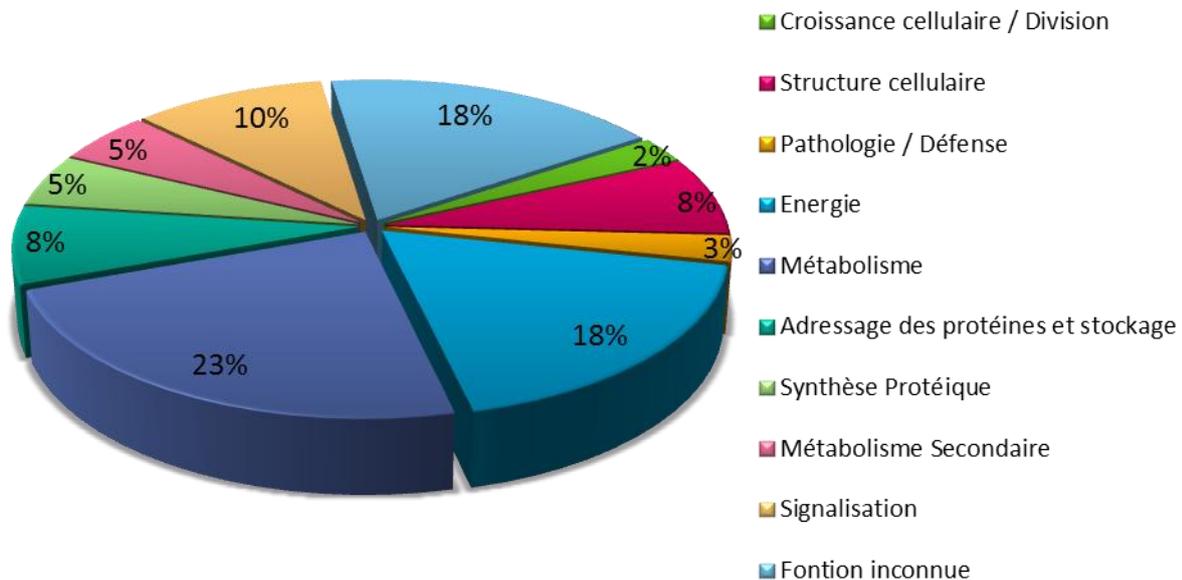


Figure 15 : Répartition des 39 protéines identifiées comme potentiellement S-nitrosylées chez le tabac selon leur fonction putative.

La figure 15 représente la répartition des protéines candidates à la S-nitrosylation selon leurs fonctions putatives (Bevan *et al.* 1998). On remarque que celles-ci sont impliquées dans des processus cellulaires variés, bien qu'environ un cinquième d'entre elles soient de fonction

inconnue. Ces protéines participent pour leur majorité au métabolisme primaire et aux évènements énergétiques (respectivement 23 et 18 % des protéines identifiées), à la synthèse ou l'adressage et le stockage des protéines (5 et 8 %), à la structure cellulaire et aux phénomènes de croissance et de division cellulaire (8 et 2 %) et sont impliquées dans la signalisation cellulaire, le métabolisme secondaire et les défenses des plantes (respectivement 10, 5 et 3 %).

Comme indiqué ci-dessus, seules 11 protéines ont été identifiées spécifiquement dans les échantillons protéiques issus de cellules de tabac soumises à un traitement par la cryptogéine (Tableau 6). Ces protéines présentent également des fonctions variées. Trois d'entre elles, les produits des gènes *At5g25600* et *At5g39490*, ainsi qu'une protéine présentant un domaine NAM (*no apical meristem*), n'ont pas de fonction établie à ce jour. D'autres sont impliquées dans l'énergie ou le métabolisme primaire. C'est le cas de la sous-unité α d'une ATPase, de l'acide acétohydroxy-isoméroréductase et de la 3-phosphoshikimate-1-carboxyvinyltransférase 1, ces deux dernières étant impliquées dans la synthèse d'acides aminés. Une troisième protéine associée à la synthèse protéique a pu être mise en évidence, il s'agit de la sous-unité ribosomale 60S. Une autre protéine candidate, la GRP (*glycine rich protein*)-like protein 1, constitue l'un des composants de la paroi cellulaire (Mangeon *et al.*, 2010). Enfin, une calmoduline (CaM) et une CDPK putative sont également détectées.

Il est important de spécifier que parmi les 11 protéines potentiellement S-nitrosylées spécifiquement en réponse à la cryptogéine, une seule a été retrouvée dans plusieurs réplicats indépendants (tableau 6, surlignée en orange). Cette protéine est référencée sous le nom de CDC48 (*cell division cycle 48*), une protéine initialement identifiée chez la levure dont le rôle chez le tabac, et d'une façon plus générale dans les réactions de défense chez les plantes, n'a pas été clairement établi au jour d'aujourd'hui. Compte-tenu de la reproductibilité de ce résultat, de l'identification du résidu Cys potentiellement S-nitrosylé et du peu de connaissances relatives à cette protéine chez les plantes, nous avons retenu cette protéine pour la suite des analyses.

Discussion

L'objectif de la première partie de mon travail de thèse a été d'identifier des protéines de tabac S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine afin de mieux appréhender le rôle du NO dans les étapes précoces des réponses de défense de la plante.

Grâce à l'utilisation de la technique biotin switch, légèrement modifiée, nous avons vérifié que la cryptogéine induit la S-nitrosylation potentielle d'une douzaine de protéines dès 5 min de traitement (figure 13). Ce mécanisme est transitoire et l'intensité du signal détecté s'est révélée variable suivant les protéines. Ce profil de S-nitrosylation a pu être confirmé dans une douzaine de répétitions indépendantes. Toutefois, il est important de préciser que la cinétique d'apparition des protéines potentiellement S-nitrosylées s'est avérée variable selon les répétitions. Bien que nous n'ayons pas d'explications définitives, ces différences de cinétique pourraient s'expliquer par le caractère labile du NO. En effet, ce dernier pourrait être facilement piégé, de façon transitoire, par divers réducteurs présents dans les cellules de tabac (ascorbate ou glutathion par exemple) dont la concentration cellulaire varie probablement d'une expérience à l'autre. Il est également envisageable que la cinétique du NO produit en réponse à la cryptogéine varie d'une expérience à une autre et qu'une concentration minimale de NO soit requise pour la S-nitrosylation, cette concentration minimale étant atteinte à des temps différents suivant les expériences. La différence de cinétique observée entre les expériences a été rapportée par d'autres équipes travaillant sur différents modèles biologiques (M. Delledonne et C. Lindermayr, communications personnelles).

L'analyse par spectrométrie de masse des protéines potentiellement S-nitrosylées dans nos différentes conditions expérimentales a conduit à l'identification de 17 protéines dans le contrôle négatif et d'une quarantaine de protéines dans les échantillons témoins et cryptogéine.

Concernant le contrôle négatif, les extraits protéiques n'ont pas été soumis à une biotinylation. Les peptides identifiés, pour la plupart, ne présentent pas de résidus cystéines. Toutefois, deux d'entre eux sont détectés comme étant biotinylés. L'origine de ces

détections peut être multiple et peut s'expliquer par les limites de la méthode biotin switch exposées précédemment (voir paragraphe 2 de la section résultat de ce chapitre). En effet, des protéines constitutivement biotinylées, ou biotinylées lors de la préparation des suspensions cellulaires, peuvent être purifiées et détectées au cours de l'expérience. Ces protéines sont probablement peu abondantes comme en témoigne la figure 13 où aucun signal n'a été détecté dans la piste correspondant aux extraits protéiques n'ayant pas subi l'étape de biotinylation. Outre cette possibilité, une alkylation incomplète des thiols libres de protéines lors de l'étape de méthylthiolation peut contribuer à ces détections. Enfin ces peptides peuvent également résulter d'une contamination dans l'étape de purification des peptides biotinylés par chromatographie d'affinité. Ces protéines peuvent donc être qualifiées de faux-positifs et n'ont pas été prises en compte pour la suite des analyses.

Concernant les protéines identifiées dans les échantillons témoins et ceux résultant du traitement par la cryptogéine, celles-ci constituent un catalogue original de protéines potentiellement soumises à une régulation par le NO chez *N. tabacum*. Quinze de ces 39 protéines ont été précédemment référencées comme cibles potentielles du NO dans de précédentes analyses protéomiques menées sur plusieurs modèles (Lindermayr *et al.*, 2005 ; Palmieri *et al.*, 2010 ; Tanou *et al.*, 2009 ; Abat *et al.*, 2008 ; Abat & Deswal, 2009 ; Romero-puertas *et al.*, 2008 ; voir la partie 3 de l'introduction). Une classification fonctionnelle des protéines identifiées, selon Bevan *et al.* (1998) indique que ces candidates à la S-nitrosylation prennent part à des processus cellulaires variés, allant du métabolisme primaire à la défense des plantes. Ces données confirment l'hypothèse selon laquelle le NO serait une molécule multifonctionnelle chez les plantes impliquée dans des processus cellulaires variés.

Parmi les 39 protéines candidates identifiées, 8 sont présentes à la fois dans les échantillons issus de cellules traitées et non traitées par la cryptogéine (tableau 6). Il est donc envisageable que la S-nitrosylation ou dénitrosylation de ces protéines ne soit pas un évènement inhérent à la réponse des cellules de tabac à la cryptogéine. Toutefois, une analyse quantitative du taux de S-nitrosylation de chaque protéine dans les conditions témoins et élicitées par la cryptogéine est nécessaire afin d'étayer cette hypothèse. La moitié de ces protéines a déjà été référencée dans de précédentes études, confirmant leur

probable S-nitrosylation (Lindermayr *et al.*, 2005 ; Tanou *et al.*, 2009 ; Abat *et al.*, 2008 ; Abat & Deswal, 2009 ; Romero-puertas *et al.*, 2008). Fait intéressant, à l'exception d'une d'entre elles non caractérisée, elles sont toutes impliquées dans des fonctions cellulaires basales, à savoir le métabolisme énergétique et primaire, ou encore la division et la croissance cellulaire.

Vingt protéines candidates ont été identifiées uniquement dans les échantillons protéiques extraits de suspensions cellulaires de tabac non traitées par la cryptogéine. Ici encore, environ la moitié d'entre elles ont déjà été décrites comme potentiellement S-nitrosylées dans de précédents travaux (Lindermayr *et al.*, 2005 ; Tanou *et al.*, 2009 ; Abat *et al.*, 2008 ; Abat & Deswal, 2009 ; Romero-puertas *et al.*, 2008). Si trois de ces candidates n'ont pas de fonction potentielle attribuée, ces protéines sont impliquées dans des fonctions cellulaires variées, en majorité le métabolisme primaire et énergétique. Notons toutefois la présence d'une glutarédoxine, protéine associée classiquement au contrôle de l'état redox des cellules et impliquée dans les réponses de défense des plantes (Rouhier, 2010), d'une fructokinase et d'une GTPase ou encore de protéines kinases impliquées dans les phénomènes de signalisation cellulaire et potentiellement dans la mise en place des réponses de défense des plantes. Une sous-unité 26S du protéasome, requise dans la régulation de la synthèse protéique, est également détectée. L'implication du protéasome dans les mécanismes cellulaires déclenchés par la cryptogéine a préalablement été rapportée par Etienne *et al.* (2000). Ces auteurs ont en effet démontré que la cryptogéine induit rapidement l'accumulation du transcrit *tcl 7* (*tobacco cryptogein induced 7*) codant une sous-unité du protéasome. Ainsi, en réponse à l'éliciteur, suivant les sous-unités, le protéasome serait régulé au niveau transcriptionnel et/ou post-traductionnel. D'autres protéines candidates présentent un intérêt potentiel dans notre modèle, comme une hydroxycinnamoyl-CoA quinate transférase impliquée dans la synthèse de composés phénoliques, acteurs des défenses des plantes. Notons également la détection de différents fragments de la tubuline. Là encore, cette observation est à rapprocher de précédents travaux dans lesquels il a été démontré que la cryptogéine induit une modification de l'organisation du cytosquelette chez le tabac, notamment *via* une dépolymérisation des réseaux de microtubules (Binet *et al.*, 2001). Ces protéines candidates étant absentes dans les échantillons résultant du traitement par la cryptogéine, il est possible qu'elles subissent une dénitrosylation lors de la réponse

cellulaire à l'éliciteur. Des études ultérieures seront nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Enfin, 11 candidats à la S-nitrosylation n'ont été retrouvés que dans les échantillons traités par la cryptogéine. Ces protéines sont également impliquées dans des fonctions cellulaires variées. La majorité d'entre elles participent à des fonctions basales incluant le métabolisme primaire, énergétique, ou la synthèse protéique. Notons toutefois l'identification d'une calmoduline (CaM) et d'une CDPK. Ces protéines sont classiquement associées à la signalisation calcique, plus précisément au décodage des variations de la concentration en Ca^{2+} dans les processus de signalisation cellulaire. Leur régulation par S-nitrosylation est en accord avec l'existence des régulations croisées entre le NO et le second messager Ca^{2+} relevées dans diverses études et en particulier dans le modèle tabac/cryptogéine (Courtois *et al.*, 2008). En plus de ces deux candidats d'intérêt, une GRP a également été identifiée. Les GRP, composants de la paroi cellulaire, sont entre autres potentiellement impliquées dans la résistance à certains stress biotiques ou abiotiques (Mangeon *et al.*, 2010). Enfin, la liste des protéines potentiellement S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine comprend une AAA-ATPase nommée CDC48. Cette protéine est associée à divers processus cellulaires et participe notamment aux phénomènes de contrôle de l'adressage des protéines. Chez les plantes, peu d'informations sont disponibles quant à son implication dans les processus de signalisation cellulaire et, d'une façon plus générale, dans les réponses de défense de la plante.

En conclusion, grâce à la technique de biotin switch couplée à une analyse en spectrométrie de masse, nous avons pu identifier des protéines potentiellement S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine. Il s'agit d'un résultat original dans la mesure où peu de protéines S-nitrosylées ont été identifiées dans des contextes physiologiques. Compte-tenu des problèmes de détections non spécifiques et de sensibilité associés à la méthode biotin switch, la validation de ces données nécessite des analyses complémentaires focalisées sur les protéines candidates. Nous avons retenu la protéine CDC48 pour la suite de nos travaux. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE CDC48

Rappel Bibliographique : CDC48, un acteur moléculaire ubiquitaire

1. Généralités et description

CDC48 est une protéine ubiquitaire présente en grande quantité dans les cellules eucaryotes (environ 1 % de la masse protéique cytosolique). Elle a été identifiée en premier lieu chez la levure (Moir *et al.*, 1982) puis chez les mammifères sous le nom de VCP (*vasolin-containing protein*) ou p97 (Peters *et al.*, 1990).

CDC48 appartient à la famille des AAA-ATPases (*ATPases associated with various cellular activities*). Ces protéines représentent une superfamille impliquée dans une large gamme de fonctions cellulaires, allant de la dégradation protéique au contrôle de la réplication de l'ADN (Tucker & Sallai, 2007). CDC48 est une protéine très conservée. En effet, l'isoforme principale d'*A. thaliana* partage plus de 65% d'identité avec les homologues de levure ou de mammifère (Feiler *et al.*, 1995 ; voir le tableau 9 dans la discussion de ce chapitre).

CDC48 est une protéine d'environ 90 kDa présente et active *in vivo* sous la forme d'un complexe homohexamérique organisé en cercle et présentant un pore en son centre (Aker *et al.*, 2007 ; figure 16). Elle est localisée principalement dans le cytoplasme, souvent associée à la membrane plasmique, à la membrane du réticulum ou à l'enveloppe nucléaire, mais peut être relocalisée au noyau en faible quantité suite à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (Feiler *et al.*, 1995 ; Madeo *et al.*, 1998).

De nombreuses études menées aussi bien chez les plantes, les levures ou les mammifères ont permis de décrire la structure primaire de cette protéine de façon précise.

CDC48 contient deux différents domaines ATPasiques fonctionnels, D1 et D2 (respectivement résidus 207-414 et 481-691 chez *A. thaliana*, figure 17 ; Feiler *et al.* 1995). Cette propriété classe CDC48 dans la catégorie des AAA-ATPases de type II (Frölich *et al.*, 1991). La majeure partie de l'activité ATPasique est conférée par le site D2, le domaine D1 étant plutôt impliqué dans l'oligomérisation de la protéine (Song *et al.*, 2003). Chacun des

domaines ATPasiques inclut les domaines très conservés Walker A (GPPGSGKT et GPPGCGKT chez *A. thaliana*) et Walker B (DEID et DELD chez *A. thaliana*) respectivement impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Feiler *et al.*, 1995).

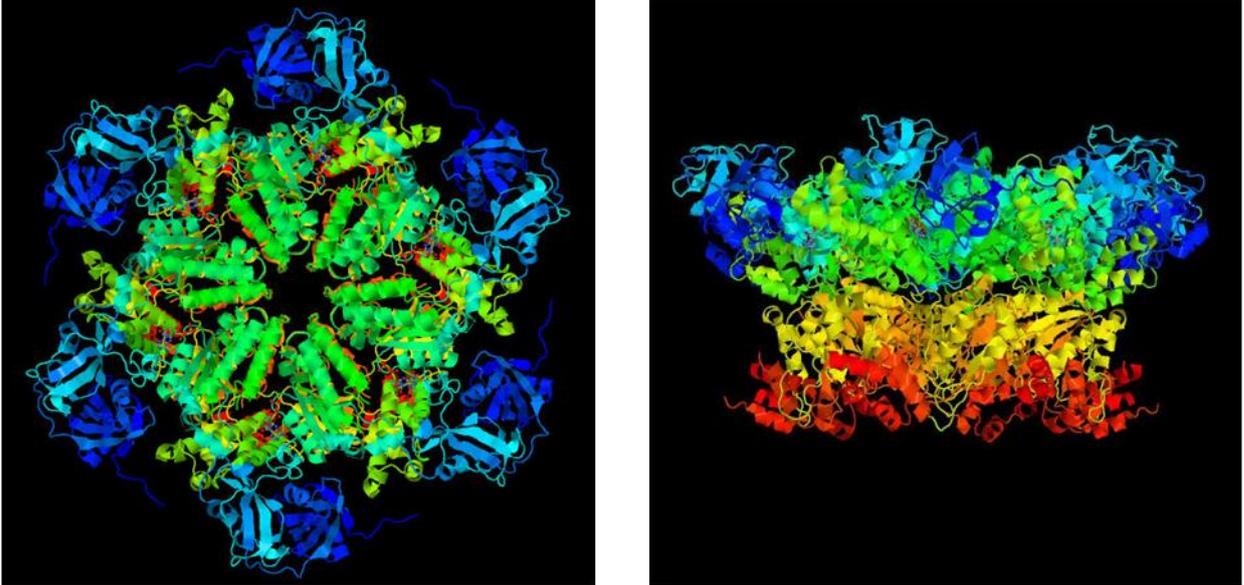


Figure 16 : Représentation de la structure tridimensionnelle prédite d'un hexamère de CDC48 de souris (*M. musculus*). Les 6 monomères de CDC48 s'organisent en cercle. Le domaine N-ter (majoritairement représenté en bleu) tend vers l'extérieur de la structure, favorisant la liaison avec des protéines adaptatrices.

La fixation et l'hydrolyse de l'ATP au sein du domaine D1 provoquent des réarrangements conformationnels conduisant à l'héxamérisation de la protéine. Cette propriété induit une réorientation du domaine N-ter favorisant l'interaction de CDC48 avec ses divers partenaires protéiques (Rancour *et al.*, 2004).

CDC48 présente également dans sa région N-ter (200 premiers résidus) un domaine d'interaction avec des substrats ou cofacteurs (Feiler *et al.*, 1995 ; Rancour *et al.*, 2002, Rancour *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2007b). Ce domaine intervient de façon prépondérante dans l'activité de CDC48. En effet, l'énergie libérée après hydrolyse enzymatique de l'ATP par le domaine D2 va être utilisée dans différentes fonctions cellulaires suivant la nature des partenaires, cofacteurs ou substrats, auxquels la protéine est associée. Ces partenaires sont très nombreux et sont impliqués dans des processus variés (voir ci-dessous ; Dreveny *et al.*, 2004 ; Yeung *et al.* 2008 ; Madsen *et al.*, 2009).

Enfin, la région C-ter de CDC48 est impliquée dans l'interaction avec des protéines adaptatrices ou partenaires (Madsen *et al.*, 2009) et constitue un site de régulation de

l'activité de la protéine (Aker *et al.*, 2006 ; voir ci-dessous). Par exemple, plusieurs travaux ont montré que cette région est soumise à phosphorylation chez la levure (Madeo *et al.*, 1998), les animaux (Madsen *et al.*, 2009) ou les plantes (Rientes *et al.*, 2005).

2. Activités de CDC48

Comme indiqué précédemment, CDC48 prend part à des activités cellulaires variées. En effet, de nombreuses études ont montré que cette protéine est impliquée dans les phénomènes de dynamique membranaire, dans les processus de développement cellulaire et intervient par ailleurs dans le contrôle de la dégradation protéique associée au réticulum endoplasmique (ER). D'autres fonctions ont été mises en évidence, notamment dans les modèles animaux, à savoir la réparation et la réplication de l'ADN ou encore l'activation de facteurs de transcription *via* leur ubiquitinylation. Nous détaillerons dans les paragraphes suivants chacune de ces activités en nous attardant sur celles confirmées chez les plantes.

2.1 CDC48 et la progression du cycle cellulaire et le développement

CDC48 a été initialement décrite chez la levure (Moir *et al.*, 1982). Un mutant invalidé dans l'expression de cette protéine présente une altération dans la progression du cycle cellulaire, d'où son nom. En effet, chez le mutant *cdc48* de *Saccharomyces cerevisiae*, on observe une organisation aberrante des microtubules lors de la formation des fuseaux mitotiques, conduisant à l'arrêt de la croissance cellulaire (Frohlich *et al.*, 1991). Si la non-dégradation de régulateurs du cycle cellulaire a été proposée pour expliquer le phénotype observé chez le mutant *cdc48*, le rôle exact de CDC48 dans la régulation du cycle cellulaire chez la levure demeure aujourd'hui peu connu (Ye, 2006).

p97 est également impliquée dans le contrôle de la division cellulaire des cellules animales, en participant à différents mécanismes, tels que la mise en place et la dégradation des fuseaux mitotiques, la reformation de l'appareil de Golgi ou la formation de l'enveloppe nucléaire (Cao *et al.*, 2003 ; Hetzer *et al.*, 2001). Ces événements font intervenir des partenaires nombreux et les mécanismes moléculaires par lesquels p97 agit restent à déterminer (Meyer & Popp, 2008).

L'implication de VCP/p97/CDC48 dans la protection cellulaire et/ou la mise en place de processus apoptotiques a également été étudiée chez l'animal et la levure. Plusieurs études ont donné des résultats différents, voire contradictoires.

La mutation, la déplétion ou l'oxydation de CDC48 conduisent à une modification de la régulation de la synthèse protéique dépendante du réticulum endoplasmique (le système ERAD : *ER[endoplasmic reticulum]-associated-degradation* ; voir paragraphe 2.3 ci-dessous). Ce changement conduit à une accumulation des substrats de l'ERAD qui se traduit par un stress de l'ER. Ces événements vont aboutir à une mort cellulaire de type apoptotique (Braun & Zischka, 2008). En effet, l'expression d'une forme mutée de CDC48 chez la levure conduit à une mort cellulaire présentant des caractéristiques d'apoptose, telles que la condensation de la chromatine ou la fragmentation nucléaire (Madeo *et al.*, 1997). Chez les mammifères, une déplétion ou une mutation de VCP sur son domaine D2, possédant l'activité ATPasique majeure (Song *et al.*, 2003), conduit également à la mise en place d'une mort par apoptose (Hirabayashi *et al.*, 2001 ; Shirogane *et al.*, 1999). Un aspect particulièrement intéressant à mentionner ici est l'impact de l'oxydation du résidu cystéine 522 de VCP. En effet, cette oxydation conduit à une diminution importante de l'activité. L'expression dans la levure d'une forme mutée de VCP de drosophile pour laquelle le résidu Cys 522 est substitué par une lysine, mimant ainsi un état oxydé constitutif, conduit à un stress de l'ER aboutissant à une mort des cellules de type apoptotique (Noguchi *et al.*, 2005). En accord avec ces données, une surexpression de CDC48 fonctionnelle dans les cellules s'accompagne au contraire d'une meilleure résistance des cellules à des facteurs apoptotiques (Noguchi *et al.*, 2005) et d'une prolifération cellulaire plus importante. Par exemple, chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), l'expression de CDC48 est induite en réponse au stress froid, participant à l'ajustement du métabolisme cellulaire en réponse à ce stress (Yamashita *et al.*, 1996). La surexpression de CDC48 conduit dans ce modèle à une plus grande prolifération cellulaire (Imamura *et al.*, 2003). Des travaux sur des cellules de mammifères ont également montré que p97 contrôle la dissociation de NFκB et de son inhibiteur IκBα, permettant l'activation de la signalisation dépendante de NFκB conduisant à la prolifération cellulaire (Asai *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces travaux tend donc à démontrer un rôle anti-apoptotique de CDC48. Toutefois, des travaux menés sur des cellules de souris ont montré que VCP possède un rôle pro-apoptotique (Rao *et al.*, 2004). Dans ce modèle VCP permet l'activation des caspases 9

et 12, faisant suite à un stress de l'ER induit chimiquement par la thapsigargine, un inhibiteur des ATPases calcique de l'ER. L'activation des caspases conduit à la mort cellulaire par apoptose. Les auteurs expliquent cette fonction pro-apoptotique en proposant que VCP interagit avec un complexe protéique permettant l'activation des caspases (Rao *et al.*, 2004).

Chez les plantes, CDC48 est exprimée majoritairement dans les tissus en croissance (Feiler *et al.*, 1995 ; Rancour *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2008). De plus, des mutants d'*A. thaliana* invalidés dans l'expression de CDC48 présentent des phénotypes altérés notamment lors de la germination et de la croissance du tube pollinique, et un arrêt de développement des embryons (Park *et al.*, 2008). CDC48 est en effet nécessaire à la prolifération cellulaire puisque des mutants invalidés dans l'expression de cette protéine présentent un arrêt de la croissance des plantules à un stade précoce chez *A. thaliana* (Rancour *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2008). De plus, une étude récente menée chez le tabac a montré que des lignées antisens de *Nicotiana tabacum* exprimant une séquence de CDC48 de *Nicotiana glutinosa* ont une croissance altérée. Les lignées obtenues présentent en effet des aberrations de croissance et de développement des organes végétatifs et reproductifs (Bae *et al.*, 2009). Enfin, l'utilisation de lignées invalidées dans l'expression de CDC48, ainsi que des expériences de localisation cellulaire, ont montré que CDC48 est essentielle à l'établissement de la plaque cellulaire lors de la division cellulaire chez *A. thaliana* (Feiler *et al.*, 1995 ; Rancour *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2008).

2.2 CDC48 et les mécanismes de dynamique membranaire

CDC48 présente des homologies de séquence et de structure avec une autre AAA-ATPase, appelée NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*), impliquée dans les mécanismes de fusion membranaire mis en place dans le cadre du système sécrétoire. NSF, en association avec certains cofacteurs appelés SNAP (*soluble NSF-attachement protein*), permet l'adressage et la fusion de vésicules membranaires (Rancour *et al.*, 2002 ; Grefen *et al.*, 2009). Cette fusion implique des protéines membranaires résidentes appelées SNARE (*SNAP receptor*), qui interagissent avec le complexe NSF/SNAP. Les SNARE présentes sur les vésicules ((v)-SNARE) ciblent les SNARE correspondantes des membranes cibles ((t)-SNARE) pour former un complexe protéique permettant la fusion des deux membranes (Jahn &

Südhof, 1999 ; Brunger, 2001). NSF fonctionne alors comme une protéine chaperonne et permet, par l'utilisation de l'énergie résultant de l'hydrolyse de l'ATP, la dissociation des complexes SNARE formés, libérant les protéines impliquées pour de nouveaux cycles de fusion membranaire (Littleton *et al.*, 2001 ; May *et al.*, 2001). En plus de leur implication dans ces processus de fusions hétérotypiques dans le cadre du système sécrétoire, les SNARE sont également impliquées dans les mécanismes de fusions homotypiques observés pour les membranes de la vacuole ou de l'ER (Nichols *et al.*, 1997 ; Patel *et al.*, 1998 ; Roy *et al.*, 2000).

Des études menées chez la levure et chez les animaux ont permis de montrer que CDC48 participe à un système similaire de fusion membranaire. Ainsi, des évènements de fusions homotypiques de membrane de l'ER, participant à la biogénèse et la maintenance de l'ER, ou encore les fusions hétérotypiques des vésicules membranaires du système sécrétoire précoce (entre l'ER et l'appareil de Golgi) nécessitent le concours de CDC48 et de certains de ses partenaires, à savoir les SNARE Ufe1p et Sed5p/syntaxine 5 (Latterich *et al.*, 1995 ; Roy *et al.*, 2000). CDC48 participerait au repliement et à la régulation de la formation des complexes de SNARE. Chez les mammifères, p97, en interaction avec ses partenaires protéiques Ufd1 (*ubiquitin fusion degradation 1*)-Npl4 (*nuclear protein localization 4*) et p47, est également impliquée dans la reformation de l'enveloppe nucléaire suivant la mitose (Hetzer *et al.*, 2001). De plus, à la suite d'une division cellulaire, p97 participe également à la reformation de l'appareil de Golgi, à partir de fragments vésiculaires (Kondo *et al.*, 1997 ; Rabouille *et al.*, 1995).

Chez *A. thaliana*, quelques études sont disponibles concernant l'implication de CDC48 dans les mécanismes de dynamique membranaire. Des expériences de localisation subcellulaire par immunofluorescence ont montré que CDC48 est localisée au niveau de la plaque cellulaire (Feiler *et al.*, 1995), de la membrane plasmique, de la membrane des organelles, ou de l'enveloppe nucléaire (Rancour *et al.*, 2002). De plus, des expériences d'immunoprécipitation ont montré que CDC48 interagit avec SYP31, le SNARE homologue de Sed5p de levure et de la syntaxine 5 de mammifère (Rancour *et al.*, 2002). Cette interaction nécessite la liaison et l'hydrolyse de l'ATP par CDC48, et est retrouvée au niveau de la plaque cellulaire lors de la division des cellules d'*A. thaliana*, laissant envisager un rôle de CDC48 dans l'établissement de cette structure lors de la mitose (Feiler *et al.*, 1995 ; Rancour *et al.*, 2002).

2.3 CDC48 et le contrôle de la synthèse protéique

La dégradation des protéines présentant des altérations dans leur conformation ou des repliements incorrects est un processus cellulaire essentiel. La suppression des protéines mal repliées du système sécrétoire nécessite leur reconnaissance au niveau de l'ER. Cette perception est suivie d'une translocation de ces protéines mal repliées vers le cytosol. Ces protéines sont alors ubiquitinylées et vont interagir avec des protéines chaperonnes qui les détacheront de la membrane pour permettre leur prise en charge et leur dégradation par le protéasome (Raasi & Wolf, 2007). Ce système de contrôle de l'ER conduisant à la protéolyse des protéines incorrectement repliées est appelé système ERAD.

Plusieurs travaux visant à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans ce système de contrôle de la synthèse protéique, menés originellement chez la levure ou les mammifères, ont mis en évidence l'implication de CDC48. En effet, CDC48 complexée avec certains de ses cofacteurs, notamment Ufd1 et Npl4, permet le détachement des membranes de l'ER et l'adressage au cytosol puis au protéasome des substrats de l'ERAD, *via* son activité ATPasique (pour revue voir Raasi & Wolf, 2007).

Chez les plantes, quelques travaux ont montré que CDC48 participe également à la rétro-translocation de protéines substrats de l'ERAD, telles que des toxines ou des protéines tronquées, depuis l'ER vers le cytosol, participant ainsi à ce système de dégradation protéique (Muller *et al.*, 2005 ; Marshall *et al.*, 2008 ; Yamamoto *et al.*, 2010).

2.4 CDC48 et les signalisations dépendantes des RLK

De récents travaux menés chez les plantes ont montré que l'isoforme CDC48A d'*A. thaliana* interagit avec un récepteur membranaire de type LRR-RLK, SERK1 (*somatic embryogenesis receptor-like kinase 1* ; Rientes *et al.*, 2005 ; Aker *et al.*, 2006 ; Aker *et al.*, 2007). SERK1 est un récepteur aux brassinostéroïdes, impliqué dans l'embryogenèse somatique (Shah *et al.*, 2001). Si les ligands de ce récepteur et les signalisations déclenchées suite à son activation demeurent peu connus, des travaux menés chez le riz ont pu mettre en évidence un rôle potentiel de ce récepteur dans l'établissement des réponses de défense (Hu *et al.*, 2005b). En effet, l'expression du gène codant SERK1 est induite en réponse aux hormones classiquement impliquées dans la défense des plantes telles que le SA, le JA ou l'ABA. De

plus, des lignées de riz surexprimant ce récepteur présentent une résistance plus importante que des lignées sauvages à une infection par le champignon pathogène *Magnaporthe grisea* responsable de la pyriculariose (Hu *et al.*, 2005b). Cette surexpression est également associée à une HR plus importante, notamment lors d'interactions non-compatibles (Hu *et al.*, 2005b).

Chez *A. thaliana*, CDC48 interagit avec le domaine kinase de SERK1, ce qui favorise sa phosphorylation (Rientes *et al.*, 2005 ; Aker *et al.*, 2006, Aker *et al.*, 2007). L'interaction entre ces deux protéines se produit au sein d'un complexe protéique plus important (Rientes *et al.*, 2005) et fait intervenir CDC48 sous sa forme homohexamérique (Aker *et al.*, 2007). Cependant, l'impact de cette interaction en termes de signalisation cellulaire n'est pas clairement défini. Il a été proposé que CDC48 participerait à la régulation de la signalisation dépendante de l'activation de SERK1 en conduisant à sa dégradation par le protéasome (Aker & de Vries, 2008).

2.5 CDC48 et la régulation de la transcription

Certaines études ont proposé une implication de CDC48 dans le contrôle de la transcription. Ainsi, comme mentionné précédemment, VCP interagit avec I κ B α , un inhibiteur de la signalisation dépendante de NF κ B, un facteur de transcription impliqué dans la régulation de nombreux gènes dans les cellules animales (Dai *et al.* 1998). VCP régulerait ainsi la signalisation dépendante de NF κ B en participant à la dégradation d'I κ B α .

Chez la levure, CDC48 permet également la maturation des facteurs de transcription Spt23 et Mga2, impliqués dans la régulation de gènes contrôlant le métabolisme des acides gras (Hitchcock *et al.*, 2001). CDC48 conduit au détachement du précurseur de ces protéines de la membrane de l'ER. Cet évènement permet la prise en charge du précurseur par le protéasome qui permettra la maturation des facteurs de transcription (Rape & Jentsch, 2004). Enfin, des partenaires potentiels de VCP chez les animaux ou la levure participant au contrôle de l'intégrité de l'ADN ou des ARN ont été identifiés, suggérant un rôle de CDC48 dans ces phénomènes, bien qu'aucun mécanisme moléculaire ne soit clairement établi (Ye, 2006 ; Dreveny *et al.*, 2004).

3. Les cofacteurs et partenaires protéiques de CDC48

3.1 Une grande variété de partenaires protéiques

Comme nous l'avons évoqué, CDC48 est un acteur majeur d'un grand nombre de processus cellulaires. Cette diversité de fonctions, associée à son ubiquité, pose la question de la spécificité du rôle de cette protéine dans un contexte donné. Cette spécificité est gouvernée par la nature de ses partenaires protéiques. C'est en effet le recrutement de ses partenaires qui déterminera, *via* l'établissement de complexes protéiques, l'utilisation de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP par CDC48. En effet, CDC48 peut lier un très grand nombre de cofacteurs. Une liste non exhaustive de ces partenaires, rassemblée par Madsen *et al.*, (2009) est présentée tableau 7 (pour revues voir Devreny *et al.*, 2004 ; Shuberth & Buchberger, 2008 ; Yeung *et al.*, 2008 ; Ye, 2006, Madsen *et al.*, 2009).

Les partenaires protéiques participent de différentes manières à l'activité de CDC48.

CDC48 peut lier directement des protéines incorrectement repliées ou l'ubiquitine *in vitro*. Cependant, CDC48 nécessite *in vivo* le concours de certains de ses partenaires (*substrate-recruiting factors*) pour le recrutement de substrats, permettant une stabilisation des complexes protéiques CDC48/cofacteurs/substrat (Shuberth & Buchberger, 2008 ; Madsen *et al.*, 2009). C'est le cas par exemple des cofacteurs Ufd1-Npl4 impliqués dans la dégradation protéique ou la fusion membranaire.

D'autres cofacteurs possèdent des activités enzymatiques propres (*substrate-processing factors*) et s'associent à CDC48 après le recrutement de substrats (Shuberth & Buchberger, 2008 ; Madsen *et al.*, 2009). Ils confèrent des activités enzymatiques spécifiques au complexe formé par CDC48 et ses différents cofacteurs/substrats, ou peuvent participer à l'inhibition de l'activité de CDC48 (Madsen *et al.*, 2009). Les adaptateurs Ufd3 (*ubiquitin fusion degradation*) et Ufd2 sont des exemples de cette classe de protéines partenaires. Elles sont toutes les deux impliquées dans les voies de dégradation de protéines ubiquitinylées (Rumpf & Jentsch, 2006).

Tableau 7 : Liste non exhaustive des partenaires de CDC48. D'après Madsen *et al.*, 2009.

Partenaires de CDC48/p97/VCP	Autre noms	Motif de liaison	Fonctions	Références
<i>Substrate recruiting factors</i>				
p47	Shp1	UBX, Boite SHP	Fusion membranaire, dégradation	Kondo <i>et al.</i> 1997
Ufd1/Npl4	-	Boite SHP	Fusion membranaire, maturation de facteurs de transcription, ERAD	Meyer <i>et al.</i> 2000
p37	-	UBX	Fusion membranaire	Uchiyama <i>et al.</i> 2006
Ubx ^{d1} ^a	-	PUB	ERAD	Allen <i>et al.</i> 2006 , Nagahama <i>et al.</i> 2009
Erasin	Ubx ^{d2}	UBX	ERAD	Liang <i>et al.</i> 2006
Ubx ^{d3} ^a	-	UBX	Inconnue	Alexandru <i>et al.</i> 2008
Ubx ^{d4} ^a	-	UBX	Inconnue	Alexandru <i>et al.</i> 2008
Ubx ^{d5}	Socius	UBX	Dynamique des microfilaments	Katoh <i>et al.</i> 2002 , Alexandru <i>et al.</i> 2008
FAF1	-	UBX	Dégradation protéique, apoptose	Song <i>et al.</i> 2005
SAKS	Y33K	UBX	Dégradation protéique	McNeill <i>et al.</i> 2004 , Alexandru <i>et al.</i> 2008
VIMP	SelS	Inconnu	ERAD	Ye <i>et al.</i> 2004
Derlin-1	-	Boite SHP	Rétro-translocation, ERAD	Schulze <i>et al.</i> 2005 , Ye <i>et al.</i> 2005
Ubx ^{d6} ^a	Rep8	UBX	Inconnue	Alexandru <i>et al.</i> 2008
Ubx ^{d7}	-	UBX	Dégradation de HIF1 α	Alexandru <i>et al.</i> 2008
Ubx ^{d8} ^a	ESEA	UBX	Inconnue	Alexandru <i>et al.</i> 2008
Ubx ^{d9}	TUG, ASPL	UBX	Import de glucose	Bogan <i>et al.</i> 2003 , Alexandru <i>et al.</i> 2008
<i>Substrate processing factors</i>				
Hrd1	Synoviolin	VBM	E3 ubiquitine ligase, ERAD	Ye <i>et al.</i> 2005 , Morreale <i>et al.</i> 2009
gp78	AMFR	VIM	E3 ubiquitine ligase, ERAD	Zhong <i>et al.</i> 2004
VCIP135	-	UBX-like	Désubiquitylation, fusion membranaire	Uchiyama <i>et al.</i> 2002
Otu1	-	UBX-like	Désubiquitylation	Rumpf and Jentsch 2006
Ataxin3	-	VBM	Désubiquitylation, ERAD	Doss-Pepe <i>et al.</i> 2003
Ufd2	Ube4, E4	VBM	E4, maturation de facteurs de transcription, ERAD	Koeglet <i>et al.</i> 1999
Ufd3	Doa1, PLAA	PUL	Inhibiteur de Ufd2	Rumpf and Jentsch 2006
PNGase	Png1	PUB	Déglycosylation, ERAD	Park <i>et al.</i> 2001, Allen <i>et al.</i> 2006
SVIP	-	VIM	Inhibiteur de p97 dans l'ERAD	Ballar <i>et al.</i> 2007

^a partenaires dont la fonction est inconnues mais classés parmi les *substrate recruiting factors* car ils ne possèdent pas d'activité enzymatique

La plupart des partenaires protéiques de CDC48 connus et étudiés sont issus de cellules animales ou de levure. Toutefois quelques études menées chez *A. thaliana* ont conduit à l'identification de deux partenaires de CDC48 chez les plantes (Rancour *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2007b ; Chandran *et al.*, 2009). Ces deux partenaires, PUX1 (*plant UBX domain-containing protein*) et PUX2, présentent un domaine UBX (*ubiquitin regulatory X* ; voir paragraphe 3.2 ci-dessous) qui leur permet de s'associer à CDC48.

PUX1 est une protéine soluble cytosolique d'environ 30 kDa qui interagit directement avec la région N-ter de CDC48 d'*A. thaliana* (Park *et al.*, 2007b). Cette protéine va conduire à la dissociation des complexes hexamériques actifs de CDC48, participant ainsi à la régulation de son activité (Rancour *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2007b). La régulation de l'activité de CDC48 par ce mécanisme est importante puisque des lignées déficientes dans l'expression de PUX1 présentent une croissance cellulaire accélérée (Rancour *et al.*, 2004), bien que les mécanismes cellulaires mis en jeu ne soient pas connus.

PUX2 possède également un domaine UBX et lie notamment le complexe CDC48/SYP31 chez *A. thaliana* (Rancour *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2007b). De façon remarquable, le gène *PUX2* est induit au cours d'infections d'*A. thaliana* par les pathogènes *P. syringae* pv *maculicola* et *Golovinomyces orontii*. Plus précisément, des lignées mutantes d'*A. thaliana* *pux2* présentent une résistance plus importante à ces maladies (Chandran *et al.*, 2009). Toutefois, ces observations sont préliminaires, le rôle de PUX2 dans ces phénomènes n'a pas été appréhendé et aucun mécanisme liant CDC48 à cette résistance n'est connu.

3.2 Les domaines d'interaction protéique

Le recrutement de CDC48 vers les substrats ubiquitylés ou son association avec ses protéines adaptatrices font intervenir des domaines d'interaction protéique divers. A ce jour, sept motifs protéiques ont été décrits, dont deux principaux (Madsen *et al.*, 2009).

- les domaines UBX/UBX-like :

Les domaines UBX ont initialement été décrits comme une séquence d'environ 80 résidus d'acides aminés dont la fonction était inconnue (Buchberger *et al.*, 2001). De façon remarquable, cette séquence présente une conformation structurale similaire à l'ubiquitine, et peut donc interagir avec des protéines liant habituellement l'ubiquitine, comme CDC48. Cependant, l'absence d'un motif di-glycine coté C-ter de cette séquence ne permet pas au

motif UBX de fixer de manière covalente ses partenaires (Shuberth & Buchberger, 2008 ; Dreveny *et al.*, 2004 ; Yeung *et al.*, 2008). Des études menées sur le cofacteur p47 ont montré que celui-ci se lie au niveau du domaine N-ter de p97 *via* cette séquence UBX, mettant en jeu des interactions de type hydrophobe (Yuan *et al.*, 2001). Cette séquence est retrouvée chez plusieurs partenaires protéiques (15 protéines sont prédites pour présenter un motif UBX chez *A. thaliana* ; Rancour *et al.*, 2004) et lie avec plus d'affinité p97 que l'ubiquitine (Shuberth & Buchberger, 2008 ; Dreveny *et al.*, 2004 ; Yeung *et al.*, 2008).

Dans la région N-ter de Npl4, un autre cofacteur de p97 impliqué notamment dans les mécanismes de fusions membranaires, se retrouve un domaine UBX-like appelé UBD (*ubiquitin D* ; Meyer *et al.*, 2000). Malgré l'absence de similarité de séquence entre les domaines UBX et UBD, ce dernier présente également un arrangement structural comparable à l'ubiquitine, et permet l'interaction avec p97 de la même manière que le domaine UBX (Isaacson *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces domaines UBX/UBX-like se retrouve chez un grand nombre de protéines adaptatrices de CDC48. Les prédictions structurales suggèrent que l'ensemble des protéines présentant ce type de domaines pourraient représenter des partenaires protéiques de CDC48 (Shuberth & Buchberger, 2008 ; Dreveny *et al.*, 2004 ; Yeung *et al.*, 2008).

- le domaine PUB

Le domaine PUB (*PNGase [peptide N-glycosidase] ubiquitin-associated*) a été originellement identifié à l'extrémité N-ter de PNGases chez les eucaryotes, des enzymes impliquées dans la déglycosylation de protéines et associées à leur dégradation par l'ERAD (Suzuki *et al.*, 2001). Ce domaine interagit avec les résidus d'acides aminés de la région C-ter de p97 grâce à des liaisons hydrophobes et ioniques (Zhao *et al.*, 2007). De manière remarquable, la phosphorylation du résidu Tyr 805 de p97 abolit complètement l'interaction de p97 avec le domaine PUB (voir ci-dessous ; Zhao *et al.*, 2007).

Le domaine PUB est également retrouvé chez un grand nombre de protéines, dont PUX2 (Yeung *et al.*, 2008). Cependant, la fonction de ces partenaires dans les mécanismes cellulaires dépendants de CDC48 n'a à ce jour été que peu étudiée.

- Autres domaines

D'autres domaines d'interaction protéique permettant le recrutement de CDC48 par des protéines adaptatrice ont été décrits.

Ainsi, le domaine PUL (*PLAP [phospholipase A2-activating protein], Ufd3p, Lub1p*), retrouvé chez certains cofacteurs de p97 et CDC48 chez les animaux ou les levures, interagit avec les dix derniers résidus de la région C-ter de p97 (Zhao *et al.*, 2007). Cette interaction est, ici encore, sensible à la phosphorylation du résidu Tyr 805 de p97.

Un motif protéique conservé de 8 résidus, appelé boîte SHP car identifiée originellement chez la protéine de levure Shp1p (Sato *et al.*, 2006), permet également la liaison à p97 et est retrouvé chez plusieurs de ces cofacteurs, comme p47. Cependant, les mécanismes permettant cette interaction demeurent inconnus (Yeung *et al.*, 2008).

Signalons enfin l'existence des motifs VIM (*VCP-interacting motif*) et VBM (*VCP-binding motif*), retrouvés chez certains partenaires de p97 chez les animaux, mais dont les fonctions et mécanismes moléculaires d'interaction à p97 restent à déterminer (Yeung *et al.*, 2008).

4. Régulation de l'activité de CDC48 par des modifications post-traductionnelles

Si la fonction de CDC48 dépend du recrutement de partenaires protéiques, son activité est également modulée par des modifications post-traductionnelles. Ces modifications peuvent avoir une incidence sur l'activité enzymatique propre de CDC48 ou agir plus indirectement en modifiant l'affinité de la protéine pour ses différents partenaires.

4.1 Régulation par phosphorylation

Comme nous l'avons déjà évoqué, plusieurs études menées chez la levure ou l'animal ont montré que CDC48 pouvait être soumise à une régulation *via* phosphorylation portant sur différents domaines de la protéine (Egerton & Samelson., 1994 ; Madeo *et al.*, 1998 ; Morikonya *et al.*, 2009 ; Ewens *et al.*, 2010). Ces phosphorylations provoquent des

réarrangements structuraux de la protéine (Ewens *et al.*, 2010) à l'origine de changements fonctionnels.

Outre la phosphorylation du résidu Tyr 805 chez les animaux commentée précédemment et conduisant notamment à une baisse d'affinité de la région C-ter de p97 pour les domaines adaptateurs de types PUB et PUL, la phosphorylation du résidu Tyr 834 chez la levure, situé également dans le domaine C-ter de CDC48, conduit à une relocalisation subcellulaire de la protéine du cytosol au noyau (Madeo *et al.*, 1998). Chez les mammifères, la phosphorylation du résidu Tyr correspondant (Tyr 805) conduit à la localisation de l'homologue p97 aux centrosomes (Madeo *et al.*, 1998).

La phosphorylation de p97 provoque également la déstabilisation du complexe p97/p47/syntaxine-5 nécessaire à la formation de l'ER transitionnel (ER-t). Cette structure est impliquée dans la transition des protéines de l'ER vers l'appareil de Golgi et sa formation est dépendante de l'activité de p97, permettant la fusion des membranes des deux organelles. Inversement, la déphosphorylation de p97 conduirait à la stabilisation du complexe p97/p47/syntaxine-5 (Lavoie *et al.* 2000).

Des changements d'état de phosphorylation de p97 ont été également observés après différents stress, tels que l'hypoxie ou un stress froid, en cas de dommage de l'ADN (Ewens *et al.*, 2010) ou encore d'agrégations protéiques anormales (Koike *et al.*, 2010). De plus, un facteur de virulence de *Salmonella*, SptP, présente un domaine tyrosine phosphatase qui lie et déphosphoryle spécifiquement p97, permettant ainsi une inhibition de la dégradation protéique et une synthèse plus importante des protéines pathogènes (Humphreys *et al.*, 2009).

Enfin, des études chez des cellules de mammifères ont montrées que VCP est ciblée par la protéine kinase Akt (Klein *et al.*, 2005 ; Vandermoere *et al.*, 2006). Akt participe à l'activation indirecte de la signalisation dépendante de NFκB, conduisant à la prolifération cellulaire (Karin & Greten, 2005). Akt phosphoryle VCP sur 3 différents résidus sérine localisés dans le domaine ATPasique D1 et la partie C-ter. Cette modification participe à la signalisation dépendante de l'activation d'Akt (Vandermoere *et al.*, 2006).

Chez les plantes, l'interaction de CDC48 d'*A. thaliana* avec la protéine SERK1 conduit à la phosphorylation de CDC48 sur l'un des 62 derniers résidus de sa région C-ter (Rientes *et al.*, 2005). Cette phosphorylation est régulée par l'interaction de CDC48 avec la phosphatase

KAPP (*kinase-associated protein phosphatase*). Aker *et al.* (2007) ont pu montrer plus récemment que le résidu sérine 41 appartenant au domaine N-ter est phosphorylé après des expériences de transphosphorylation avec SERK1 *in vitro*. Toutefois, l'impact de ces phosphorylations n'a pu être déterminé avec certitude.

4.2 Régulation par acétylation

CDC48 est également régulée par acétylation (Ewens *et al.*, 2010). Une étude récente a permis l'identification de plusieurs sites putatifs d'acétylation, par des analyses en spectrométrie de masse (Mori-Konya *et al.*, 2009). En particulier, la construction par mutagenèse dirigée d'une isoforme de p97 substituant le résidu lysine 696 par une glutamine, mimant ainsi la forme acétylée de la protéine, a montré que cette forme « constitutivement acétylée » possède une activité plus importante que la forme sauvage (Mori-Konya *et al.*, 2009). De plus, une interaction directe entre HDAC6 (Histone désacétylase 6) et p97 a été démontrée (Seigneurin-Berny *et al.*, 2001). HDAC6, en plus de son activité désacétylase, est capable de lier des substrats polyubiquitylés et est donc impliquée dans la dégradation protéique. On peut dès lors suggérer une régulation de p97 par acétylation dans un contexte de dégradation de protéines incorrectement repliées (Seigneurin-Berny *et al.*, 2001).

4.3 Régulation par oxydation

En plus des différentes modifications post-traductionnelles exposées ci-dessus, l'activité ATPasique de VCP est dépendante de l'oxydation d'un de ses résidus Cys, à savoir le résidu Cys 522 chez la drosophile (Noguchi *et al.*, 2005). Ce résidu cystéine est conservé chez les organismes multicellulaires et appartient au domaine Walker A du domaine D2. Les auteurs ont pu montrer que des traitements induisant un stress oxydatif, tels que l'H₂O₂ ou encore le peroxydite, induisent *in vitro* une diminution de l'activité de VCP impliquant ce résidu. De plus, un traitement par des agents de nitrosylation tels que le GSNO induisent une modification de l'activité de VCP, là encore *via* la modification du résidu Cys 522 (Noguchi *et al.*, 2005). Une forme mutée de la protéine dans laquelle le résidu Cys 522 est substitué par un résidu lysine perd totalement son activité. L'expression de cette forme mutante en levure conduit à la vacuolisation du cytoplasme des cellules transformées et à l'accumulation de

protéines polyubiquitinylées. Ces changements s'accompagnent de l'induction de marqueurs de stress de l'ER et de l'agrégation de substrats de l'ERAD. Ces phénomènes correspondent à une forme de mort cellulaire programmée semblable à l'apoptose (Noguchi *et al.*, 2005). Ces données témoignent de l'importance du rôle du résidu Cys 522 pour l'activité de VCP et de son implication dans l'ERAD. La régulation de l'activité ATPasique de VCP par oxydation *via* ce résidu permettrait le contrôle de ce système de dégradation protéique et, par extension, serait impliquée dans le contrôle de la mort ou de la prolifération cellulaire.

5. Conclusions générales et choix du candidat

CDC48 est donc une protéine ubiquitaire impliquée dans un très grand nombre de processus cellulaires, et dont l'activité est soumise à une régulation complexe. De façon très intéressante, le résidu Cys 522 de la protéine homologue de la drosophile est sensible à un traitement par des donneurs de NO (Noguchi *et al.*, 2005). Ce résidu est l'exacte correspondance du résidu Cys 526 de CDC48 de tabac identifié comme cible potentielle de la S-nitrosylation au cours de la première partie de notre travail. De plus, l'implication de CDC48 dans la régulation de la synthèse protéique, de la mort et du développement cellulaire, ou encore son interaction avec des récepteurs membranaires laissent présager un rôle de cette protéine dans la mise en place des réponses de défense des plantes, en particulier dans notre modèle d'étude.

L'ensemble de ces données et hypothèses nous ont conduit à choisir ce candidat pour la suite de nos investigations.

Résultats

Comme nous l'avons spécifié au chapitre précédent, nous avons décidé de focaliser nos investigations sur la protéine candidate CDC48. Pour ceci, des outils permettant la caractérisation biochimique de ce candidat ont dû être générés. Dans ce chapitre, nous présenterons dans une première partie les stratégies d'obtention de ces outils, puis, dans un second temps, nous exposerons les résultats relatifs aux caractérisations structurale et enzymatique de CDC48

Partie 1 : Génération d'outils permettant la caractérisation de CDC48

1. Analyses *in silico* et identification de la séquence codante pleine longueur.

1.1 Identification de la séquence codante

L'interrogation des bases de données disponibles pour le tabac (NCBI) à partir de la séquence peptidique identifiée en spectrométrie de masse (voir chapitre précédent) a permis l'identification d'une séquence codante complète d'ADN (CDS : *coding DNA sequence*) correspondant à une isoforme du gène *CDC48* de *N. tabacum cv BY2*. Ce cultivar possède un génome très similaire à celui des cellules *Xanthi* utilisées pour l'identification des protéines S-nitrosylées. Le CDS identifié a donc constitué une séquence d'intérêt pour dessiner des amorces PCR adaptées à notre plante modèle. En parallèle, la recherche de séquences codantes chez *Nicotiana tabacum* a conduit à l'identification d'une vingtaine d'EST (*expressed sequenced tag*). Ces EST correspondent toutes à la région du CDS *CDC48* de *Nicotiana tabacum cv BY2* codant la séquence identifiée en spectrométrie de masse. Aucune autre séquence codante de *N. tabacum* disponible dans les bases nucléotidiques publiques ne correspond au peptide identifié en spectrométrie de masse.

1.2 Clonage du CDS de CDC48 chez le tabac

Sur la base du CDS *CDC48* de *N. tabacum* cv *BY2*, des amorces PCR ont été dessinées et utilisées en vue de l'amplification de l'ADNc codant la protéine CDC48 complète de *N. tabacum* cv *Xanthi*. Plus précisément, une amorce sens (PL-F) débutant sur l'ATG de l'ADNc pleine longueur et précédée de la séquence CACC permettant le clonage directionnel de l'amplicon dans le vecteur d'entrée pENTR, ainsi qu'une amorce antisens (PL-R) contenant le codon stop de la séquence, ont été dessinées (tableau 5, voir section matériel et méthode). Grâce ce couple d'amorces, un amplicon d'une taille similaire au CDS *CDC48* de *N. tabacum* cv *BY2* (2431 pb) a pu être obtenu à partir d'ADNc totaux issus de suspensions cellulaires de *N. tabacum* cv. *Xanthi* (figure 17, piste 1). L'identité de cette séquence, nommée *CDCF*, a été vérifiée par séquençage et correspond exactement au CDS référencé pour le cultivar *BY2*

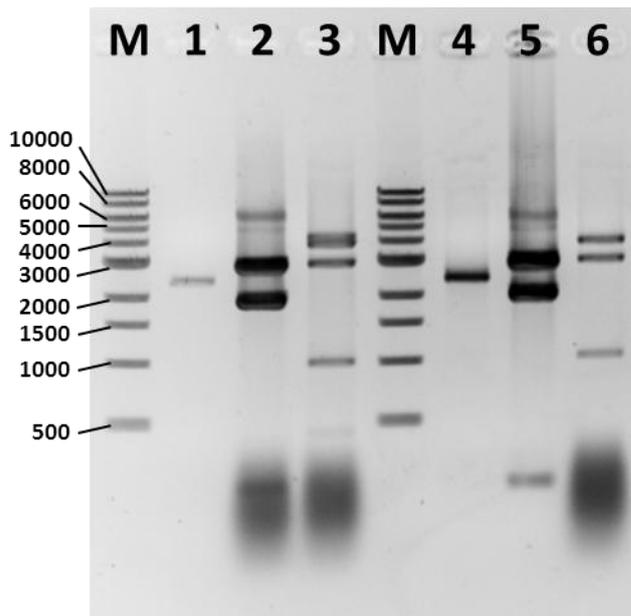


Figure 17 : Analyse sur gel d'agarose des diverses constructions. Les pistes 1 et 4 correspondent respectivement aux séquences pleine longueur de *CDCF* et *CDCM* (taille de bande attendue : 2431 pb). Les pistes 2 et 5 correspondent respectivement aux produits de digestion par l'enzyme PvuII des séquences *CDCF* et *CDCM* insérées dans le vecteur d'entrée pENTR (bandes attendues : 159, 1942 et 2906 pb). Les pistes 3 et 6 correspondent respectivement aux produits de digestion par l'enzyme PvuII des séquences *CDCF* et *CDCM* insérées dans le vecteur de destination pHGWA (tailles des bandes attendues : 99, 999, 2933, 3915 pb) M : Marqueur de poids moléculaire en paires de bases.

1.3 Alignement de séquence et structure primaire de CDC48

Un alignement de la séquence protéique codée par *CDCF* et des homologues correspondants chez *A. thaliana*, *Homo sapiens* et *Saccharomyces cerevisiae* est présentée figure 18 A. Les protéines présentent une très forte identité de séquence d'un minimum de 67% pour les séquences les plus éloignées (tableau 9).

En particulier, les sites actifs Walker A et Walker B correspondant respectivement aux sites de fixation et d'hydrolyse de l'ATP des domaines ATPases D1 et D2 (Figure 18 B) sont très conservés. Une telle conservation de séquence entre des organismes appartenant à des règnes différents suggère un rôle conservé et potentiellement important de CDC48 dans le fonctionnement cellulaire. Il est à noter que le résidu Cys 526 de l'isoforme de *N. tabacum* cv *xanthi* identifié comme site potentiel de la S-nitrosylation est conservé chez l'homologue d'*A. thaliana* et humaine, mais pas chez la levure (figure 18 A, figuré en rouge). D'autres alignements ont montré que ce résidu cystéine est principalement conservé chez les organismes pluricellulaires (résultat non montré). Il est important de spécifier que chez l'homologue de drosophile, ce résidu a été identifié comme étant un résidu clé impliqué dans la régulation de l'activité de la protéine lors de son exposition au NO (Noguchi *et al.*, 2005). Ce résultat est en faveur de la potentielle S-nitrosylation de ce résidu et souligne son éventuel rôle dans la régulation de l'activité de CDC48.

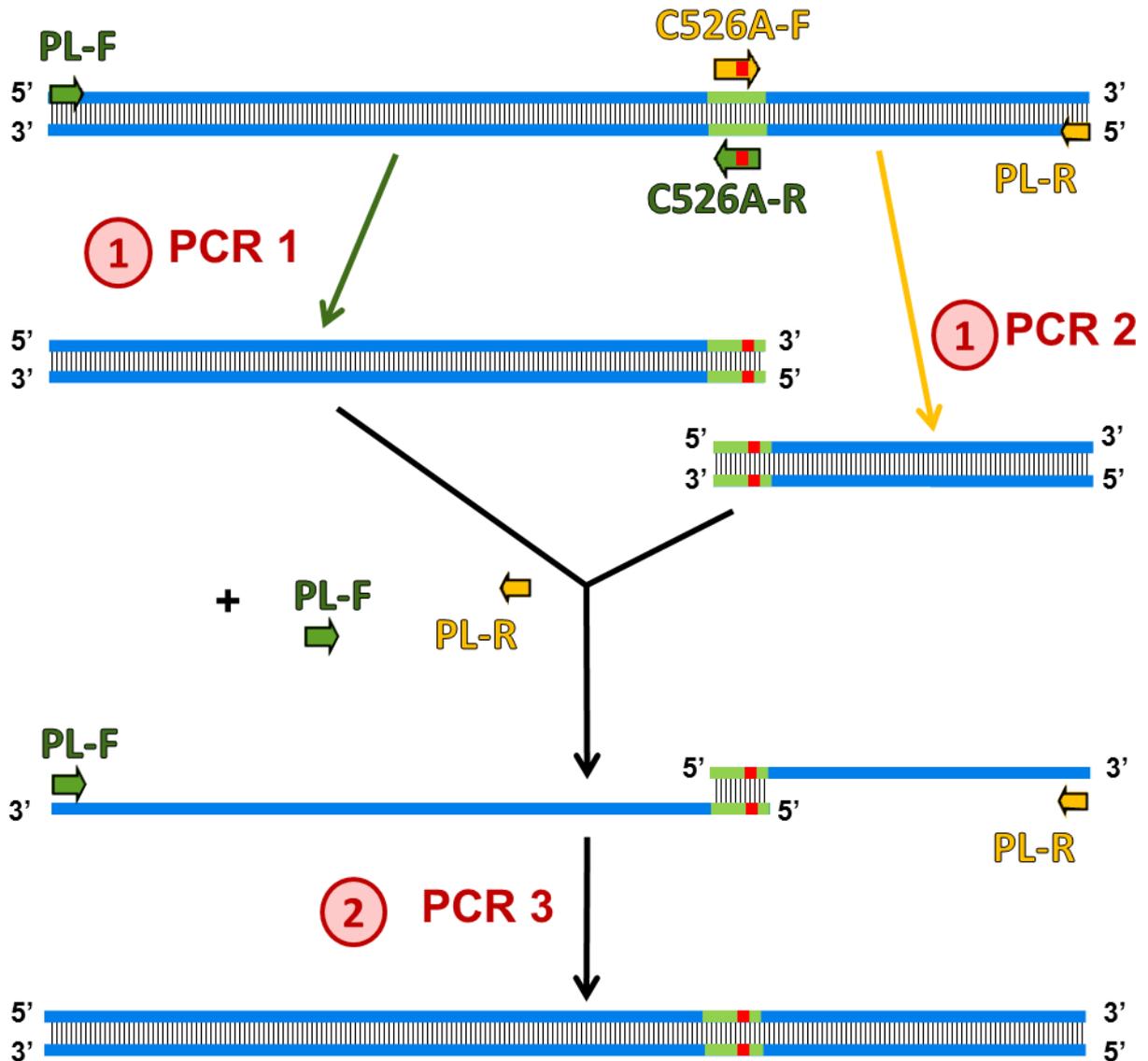
1.4 Obtention d'une isoforme mutée de CDC48 pour le résidu Cys 526

En vue d'étudier le rôle de la nitrosylation du résidu Cys 526 identifié en spectrométrie de masse, une approche de mutagenèse dirigée par PCR a été mise en place. Pour ceci, deux amorces (C526A-F et C526A-R, tableau 5) ont été dessinées. Elles permettent par une combinaison de PCR présentée sur la figure 19 l'obtention d'un ADNc pleine longueur codant pour une forme mutée de CDC48, dans laquelle le résidu Cys 526 a été substitué par un résidu alanine (Ala). Cet acide aminé est classiquement utilisé pour substituer un résidu cystéine. Un amplicon de la taille attendue, *CDCM* a été obtenu (figure 17, piste 4) et la présence de la mutation vérifiée par séquençage.

2. Obtention des protéines recombinantes CDCF et CDCM

2.1 Clonage en vecteur d'expression : technologie GATEWAY

Les ADNc *CDCF* et *CDCM* obtenus par PCR ont été amplifiés en utilisant des amorces permettant l'ajout de la séquence CACC en 5' de l'ATG de leur séquence codante (tableau 5).



- █ ADN codant
- █ Région codant le peptide identifié en MS, natif
- █ █ Région codant le peptide identifié en MS, muté pour la cystéine S-nitrosylée
- ➔ Amorces PCR utilisées pour la mutagenèse dirigée

Figure 19 : Stratégie de mutagenèse dirigée. A partir de la séquence codante de CDC48, deux PCR consécutives ont été effectuées avec deux couples d'amorces permettant l'introduction de la mutation (①). Les amplicons obtenus, qui s'apparient entre eux au niveau du site muté, ont ensuite été utilisés comme matrice pour une troisième PCR faisant appel aux amorces permettant l'amplification de la séquence complète de CDC48 (②). L'amplicon résultant de cette dernière PCR correspond à la séquence initiale mutée.

Cet ajout permet le clonage directionnel de ces séquences codantes dans le plasmide d'entrée pENTR grâce à l'utilisation de la D-TOPO isomérase (figure 11 et 20). Les différents plasmides obtenus pour chaque insert ont été amplifiés en système bactérien. Une vérification du clonage a été réalisée par digestion enzymatique (figure 17, pistes 2 et 5). Les clones positifs ont ensuite été validés par séquençage.

A partir de ces clones positifs, une réaction de ligation/recombinaison a été réalisée, avec pour vecteur de destination le plasmide pHGWA (Busso *et al.*, 2005 ; figures 11 et 20). Ce plasmide permet l'expression inductible de protéines en système bactérien et ajoute une étiquette poly-histidines (6xHis) en N-ter des protéines recombinantes. Cette étiquette permet la purification des protéines recombinantes produites par chromatographie d'affinité. Après recombinaison homologue, les plasmides obtenus ont été introduits dans des bactéries *E. coli* et les clones positifs sélectionnés sur milieu de culture supplémenté en ampicilline. Les plasmides ont été vérifiés par digestion enzymatique (figure 17, pistes 3 et 6) puis validés par séquençage.

2.2 Expression des protéines recombinantes

Les plasmides d'expression vérifiés contenant les séquences codantes *CDCF* ou *CDCM* ont été introduits dans des bactéries d'expression Rosetta, adaptées à l'expression de protéines eucaryotes. Les clones transformés ont été sélectionnés sur milieu de culture supplémenté en antibiotiques puis vérifiés par séquençage.

2.3 Vérification de la solubilité des protéines recombinantes

Après induction, les bactéries recombinantes transformées par la construction sauvage (*CDCF*) ou mutante (*CDCM*) ont été récoltées par centrifugation puis lysées par sonication. Les fractions protéiques solubles et non solubles ont été séparées par centrifugation puis analysées sur gel SDS PAGE. Le gel présenté figure 21 montre le profil protéique des différentes fractions obtenues à partir des bactéries transformées par le plasmide pHGWA comportant la séquence *CDCF*. On observe que l'expression de *CDCF* recombinante est inductible par l'IPTG. La protéine recombinante est présente en faible quantité dans la fraction insoluble et s'accumule fortement dans la fraction soluble. Des résultats similaires ont été obtenus pour la forme mutée de *CDC48* (résultats non montrés).

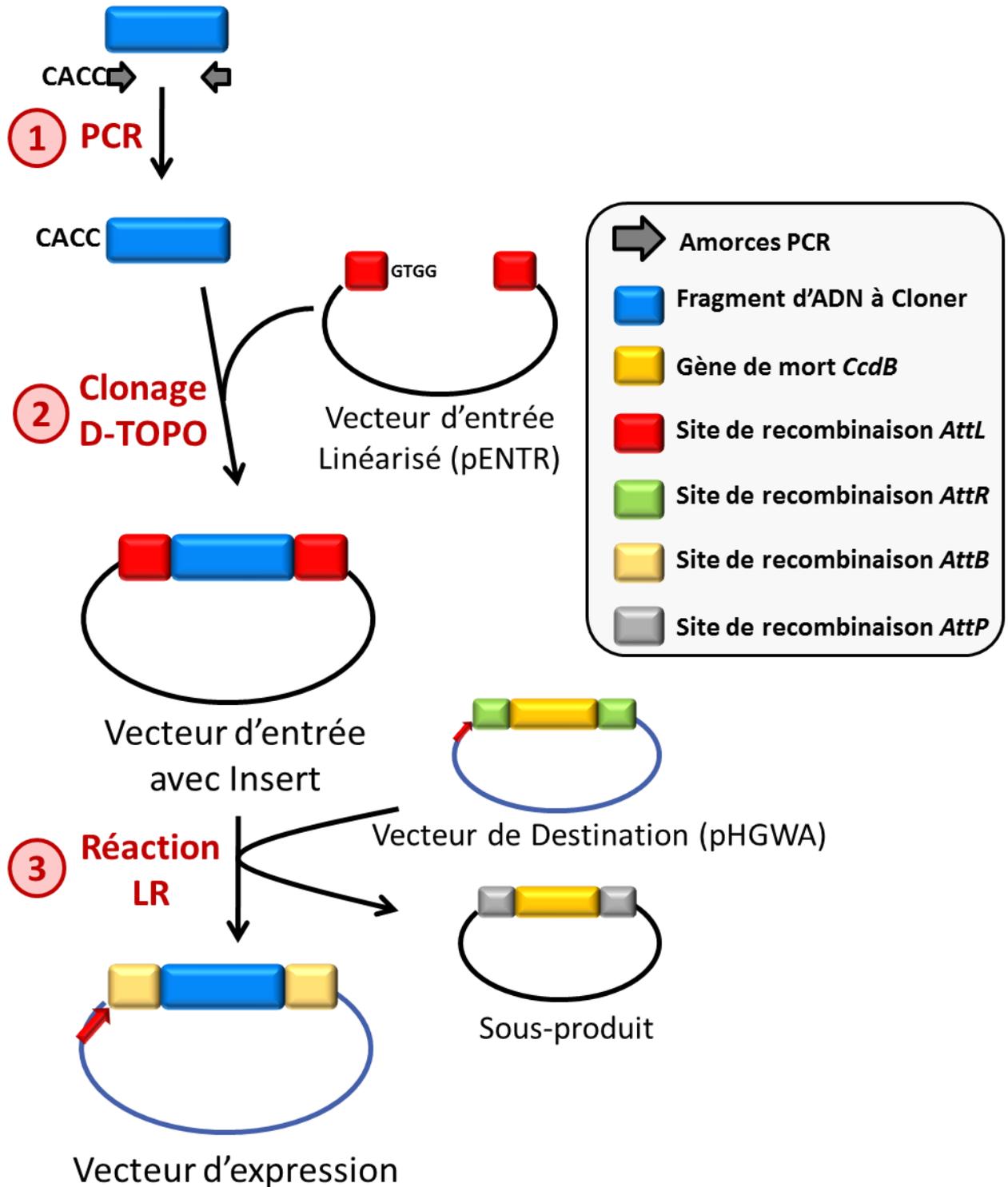


Figure 20 : Représentation schématique de la stratégie de clonage GATEWAY. Une PCR a été réalisée en utilisant des amorces permettant l'ajout d'une séquence CACC en 5' de la séquence à cloner (①). Cet ajout a permis le clonage directionnel de la séquence d'intérêt dans le vecteur d'entrée (pENTR) linéarisé grâce à l'action d'une D-TOPO isomérase (②). Une réaction de double recombinaison homologue entre les sites de recombinaison *AttL* et *AttR* (réaction LR, ③) a ensuite autorisé le transfert de la séquence d'intérêt du vecteur d'entrée vers le vecteur de destination (pHGWA), permettant ainsi l'obtention du vecteur d'expression correspondant à la séquence d'intérêt clonée dans le vecteur de destination.

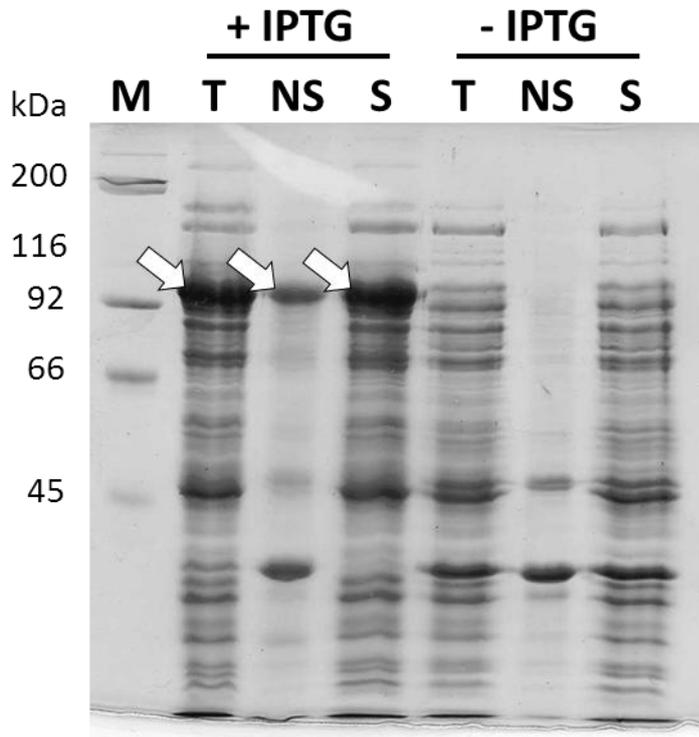


Figure 21 : Solubilité de CDCF recombinante produite en système hétérologue bactérien. Les différentes fractions protéiques issues de la lyse des bactéries d'expression induites (+IPTG) ou non (-IPTG) ont été chargées sur gel SDS-PAGE. T : Fraction protéique totale. NS : Fraction protéique non soluble. S : Fraction protéique soluble. M : Marqueur de poids moléculaire.

Le traitement des bactéries à l'IPTG conduit à l'apparition d'une bande témoin de l'expression d'une protéine recombinante d'une masse moléculaire d'environ 92 kDa, identique à CDCF (flèches)

2.4 Purification des protéines recombinantes

Les protéines recombinantes ont été purifiées par chromatographie d'affinité en utilisant des colonnes HisTrapp chargées en nickel et donc présentant une affinité pour l'étiquette 6xHis. Le profil d'élution a été suivi par spectrophotométrie à 280 nm (figure 22 B). L'analyse sur gel SDS-PAGE des différentes fractions d'élution est présentée figure 22 A. Les protéines recombinantes CDCF et CDCM sont principalement présentes dans la fraction 4 (figure 22 A, pistes 4). Cette fraction a été concentrée par filtration en centrifugeuse. La figure 22 C témoigne de la qualité de cette étape de concentration. Au final, une quantité de l'ordre de la dizaine de mg de protéines recombinantes a été obtenue à partir de 500 mL de culture bactérienne.

2.5 Vérification de l'identité des protéines produites

Afin de vérifier l'identité des protéines recombinantes purifiées, l'immunoréactivité des protéines recombinantes CDCF et CDCM purifiées vis-à-vis d'un anticorps dirigé contre l'homologue de CDC48 d'*A. thaliana* (don du Prof. Sebastian Bednarek, Madison, USA) a été vérifiée par Western blot (figure 23).

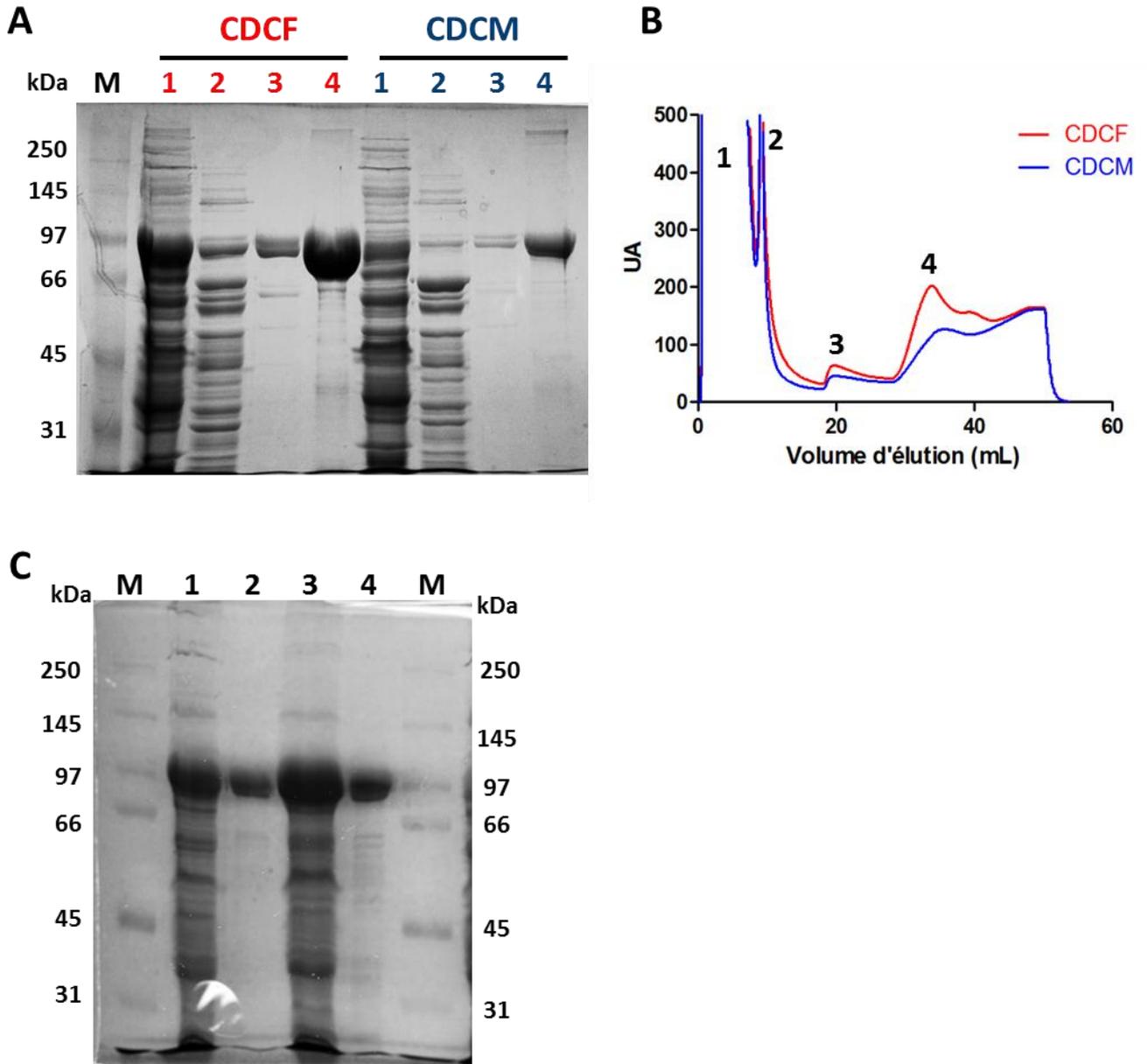


Figure 22 : Purification des protéines recombinantes CDCF et CDCM. A. Gel SDS-PAGE des différentes fractions de purification des protéines recombinantes CDCF et CDCM. La majeure partie des protéines produites est recouvrée dans la fraction 4. B. Spectre d'absorption à 280 nm en fonction du volume d'éluion de la purification des protéines CDCF (représenté en rouge) et CDCM (représenté en bleu). Les fractions d'éluion correspondantes aux différents pics d'absorption (1, 2, 3, 4) correspondent à celles chargées sur le gel A. C. Gel de vérification de purification des protéines CDCF et CDCM. Cinq μ L de fraction soluble (fraction 5 figure 21) ou cinq μ g de protéine de la fraction 4 concentrée ont été chargés sur gel afin d'estimer la qualité des étapes de purification, concentration et dosage. Les pistes 1 et 2 correspondent respectivement à la fraction soluble et à la protéine purifiée CDCF; les pistes 3 et 4 correspondent respectivement à la fraction soluble et à la protéine purifiée CDCM. M : Marqueur de poids moléculaire.

L'anticorps reconnaît bien les deux formes de CDC48, native ou mutée, confirmant l'identité des protéines purifiées. Toutefois, nous observons la présence de deux bandes immunoréactives, de masses molaires légèrement différentes, pour les deux protéines recombinantes CDCF et CDCM (figure 23).

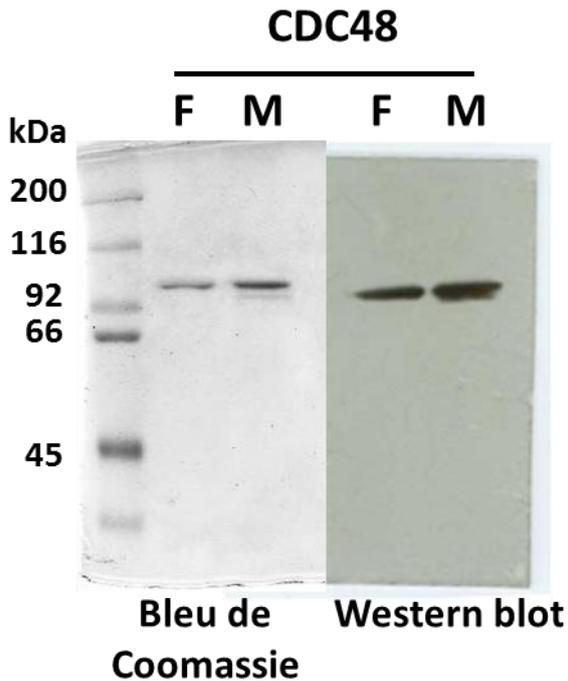


Figure 23 : Analyse par Western blot des protéines CDCF et CDCM purifiées. Cinq μg de protéines recombinantes purifiées ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 7%. Les protéines ont été alors soit révélées au bleu de Coomassie, soit analysées par Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'homologue de CDC48 d'*A. thaliana*. F: protéine CDCF. M: protéine CDCM.

2.6 Obtention d'une seconde isoforme mutée

Une stratégie similaire à celle décrite ci-dessus a été entreprise en parallèle afin de produire une protéine CDC48 recombinante pour laquelle le résidu Cys 526 a été substitué par un aspartate (Asp). Cette protéine, nommée CDCM2, a été obtenue en quantité satisfaisante (résultats non montrés).

Partie 2 : Etude de l'impact de la S-nitrosylation de CDC48 sur sa structure et son activité.

La stratégie de clonage, d'expression et de purification mise en place nous a permis l'obtention de protéines CDC48 recombinantes native (CDCF) ou mutée (CDCM et CDCM2). Grâce à ces outils, nous avons entrepris une analyse structurale et enzymatique afin de cerner l'impact de la S-nitrosylation sur CDC48. Cette analyse est détaillée dans cette seconde partie.

1. Tests de S-nitrosylation *in vitro*

Les expériences de biotin switch (figure 13) nous ont permis d'identifier CDC48 comme potentiellement S-nitrosylée en réponse à la cryptogéine (voir Chapitre I). Une fois la protéine recombinante purifiée, la possibilité qu'elle puisse effectivement être S-nitrosylée, en particulier sur le résidu Cys 526, a été vérifiée *in vitro*. Pour ceci, la protéine native CDCF a été exposée à deux donneurs de NO, le diéthylamine NONOate (DEA/NO) et le GSNO. Le DEA/NO est un donneur de NO[•], le GSNO quant à lui libère NO⁺ (figures 9 et 10). La S-nitrosylation *in vitro* des deux isoformes mutées CDCM et CDCM2 a été testée en parallèle *via* leur exposition respective au GSNO et DEA/NO. Après traitement par les donneurs de NO, les protéines recombinantes ont été soumises à la technique du biotin switch, séparées sur gel puis révélées par immunodétection en utilisant un anticorps dirigé contre la biotine. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 24. Les pistes contrôles 1 et 2, de même que 5 et 6, où l'efficacité du blocage par le MMTS et de la biotinylation ont été testées sur les protéines CDCF et CDCM2 donnent les résultats attendus, à savoir une forte biotinylation en absence de MMTS et l'absence de marquage lorsque le biotin switch a été réalisé sans biotine-HPDP. Le traitement de la protéine recombinante non mutée CDCF par les deux donneurs de NO, le DEA/NO ou le GSNO (respectivement pistes 3 et 9), a conduit à l'obtention d'une bande immuno-réactive.

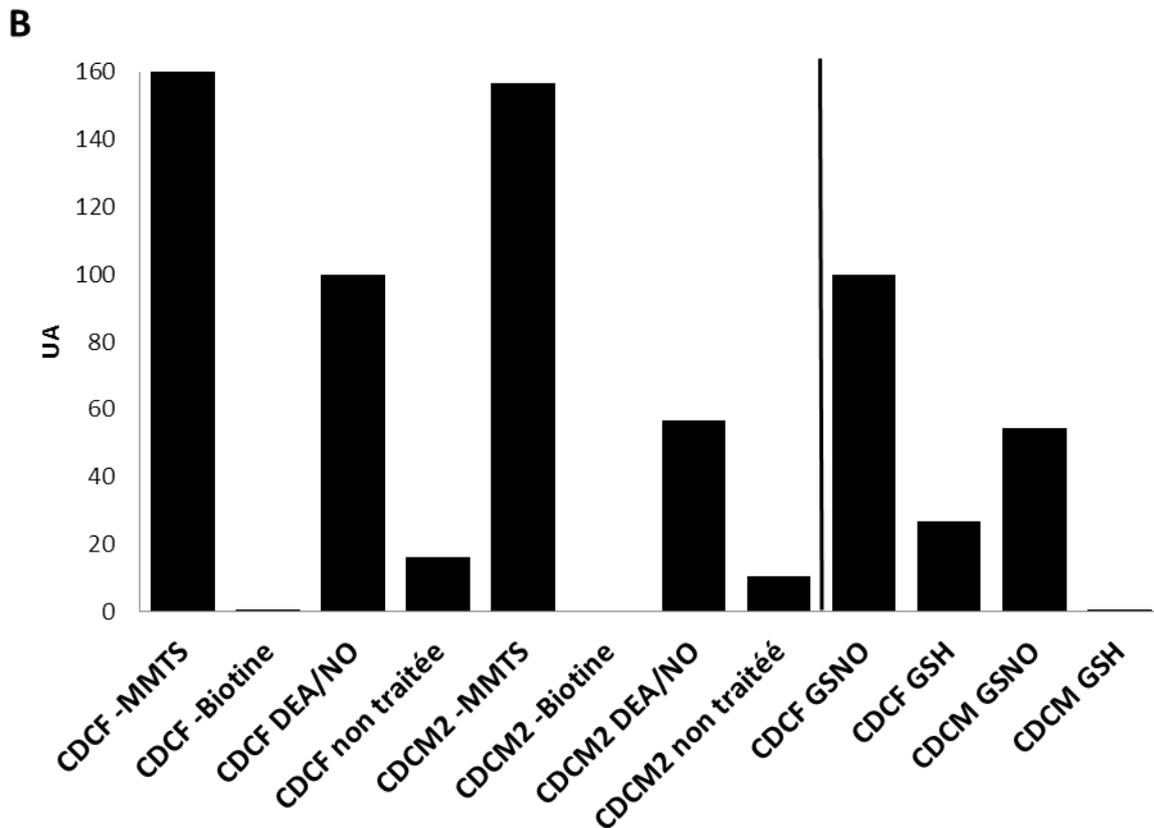
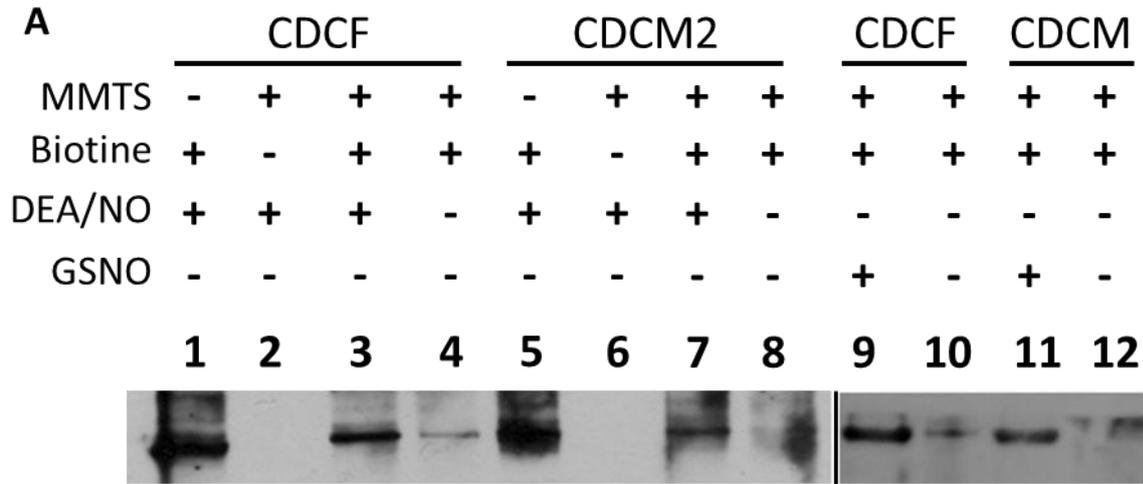


Figure 24 : S-nitrosylation de CDC48 *in vitro*. A. Cinq microgrammes de protéines recombinantes purifiées natives (CDCF) ou mutées pour le résidu Cys 526 (CDCM et CDCM2) ont été soumises ou non à des traitements par les donneurs de NO DEA/NO (100 μ M) ou GSNO (125 μ M). Les protéines ont ensuite subi un biotin switch, avant électrophorèse, transfert sur membrane et immuno-révélation par l'utilisation d'anticorps anti-biotine. Des contrôles positif (-MMTS) et négatif (-biotine) ont été réalisés. B. Quantification relative de l'intensité des bandes révélées. L'intensité des bandes immuno-réactives détectées dans la piste correspondant au traitement CDCF + DEA/NO ou CDCF + GSNO (piste 3 et 9 figure 24 A) ont été fixées à 100% ; le pourcentage d'intensité des bandes des protéines pour les autres conditions testées ont été relativisées par rapport à ces valeurs (pistes 1, 2, 4 à 8 pour la référence CDCF + DEA/NO et pistes 10, 11 et 12 pour la référence CDCF + SNO, figure 24 A).

Un signal a également été détecté lorsque la protéine non mutée CDCF a été incubée avec H₂O ou du GSH (pistes 4 et 10, respectivement), mais de façon beaucoup moins intense. Cette détection peut s'expliquer par les limites de la technique du biotin switch exposées précédemment. En effet, il est par exemple possible que l'étape de blocage des thiols libres de CDCF par le MMTS ne soit pas complètement efficace, générant ainsi un faible marquage à la biotine de CDCF non nitrosylée, et donc une faible immunodétection de cette dernière. Toutefois, une quantification relative du signal de ces bandes montre que leur intensité est limitée. L'ensemble de ces données indiquent que la protéine recombinante non mutée CDCF est S-nitrosylable.

De façon inattendue, une bande immuno-réactive a également été observée suite au traitement des protéines recombinantes mutées CDCM et CDCM2 respectivement par le GSNO (piste 11) et le DEA/NO (piste 7). Ce signal n'a pas été détecté dans les pistes contrôles où CDCM et CDCM2 ont été traités respectivement par du GSH (piste 12) ou H₂O (piste 8), indiquant qu'il est bien la conséquence de l'exposition aux donneurs de NO, donc d'une S-nitrosylation. Toutefois, une analyse quantitative montre que les bandes immuno-réactives correspondant aux protéines recombinantes mutées CDCM et CDCM2 sont moins intenses comparativement à celles détectées dans les pistes correspondant à la protéine native CDCF (Figure 24 B). En effet, le signal mesuré pour les échantillons mutés ne correspond qu'à environ 55 % du signal mesuré pour l'isoforme native. Un signal faible est également détecté pour les isoformes CDCM et CDCM2 traitées par le GSH ou l'H₂O, respectivement. Ces détections sont cependant beaucoup moins intenses que celles détectées pour CDCF traitée par le GSNO ou le DEA/NO.

Considéré dans son ensemble, ce résultat confirme que la protéine native CDC48 est nitrosylable *in vitro*. La substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala ou Asp réduit l'intensité de S-nitrosylation de CDC48 mais ne l'empêche pas. Il est donc envisageable que le résidu Cys 526 soit bien un site de S-nitrosylation mais que d'autres résidus Cys de la protéine soient également régulés par cette modification post-traductionnelle. Ces résultats sont toutefois préliminaires dans la mesure où l'expérience n'a été réalisée qu'une fois. Des analyses complémentaires sont en cours afin de confirmer ces observations.

2. Analyses structurales et impact de la S-nitrosylation

Une analyse structurale a été menée afin d'analyser l'incidence de la S-nitrosylation de CDC48 sur ses structures supérieures (secondaire et tertiaire). Nous avons réalisé ce travail au sein de l'équipe du Prof. Hernan Terenzi, du Centre de Biologie Moléculaire Structurale du Département de Biochimie de l'Université Santa Catarina de Florianopolis, au Brésil.

2.1 Modélisation de la structure tridimensionnelle de CDC48

Via l'utilisation de logiciels bioinformatiques de modélisation basés sur les homologies de séquences ou la reconnaissance des repliements, nous avons déterminé *in silico* la structure tridimensionnelle de CDC48 de *N. tabacum cv xanthi*. Il est à noter que deux approches de modélisation, l'une basée sur l'homologie de séquence avec l'homologue cristallisé de *Mus musculus* (identité de 77,1%), l'autre sur la reconnaissance des repliements à partir de la structure primaire, ont donné un résultat identique. La structure tridimensionnelle d'un monomère de CDC48 de tabac complexé à deux molécules d'ATP au niveau des sites ATPasiques D1 et D2 est présentée figure 25 A. La protéine comporte deux principales régions reliées par une conformation en pelote statistique non périodique (random coil). Chaque région comporte un site de fixation de liaison de l'ATP. Le site Walker A du domaine ATPasique D2 comprend le résidu Cys 526 (figure 25 A et B). On remarque la proximité spatiale de ce résidu Cys 526 avec l'ATP, substrat de la protéine.

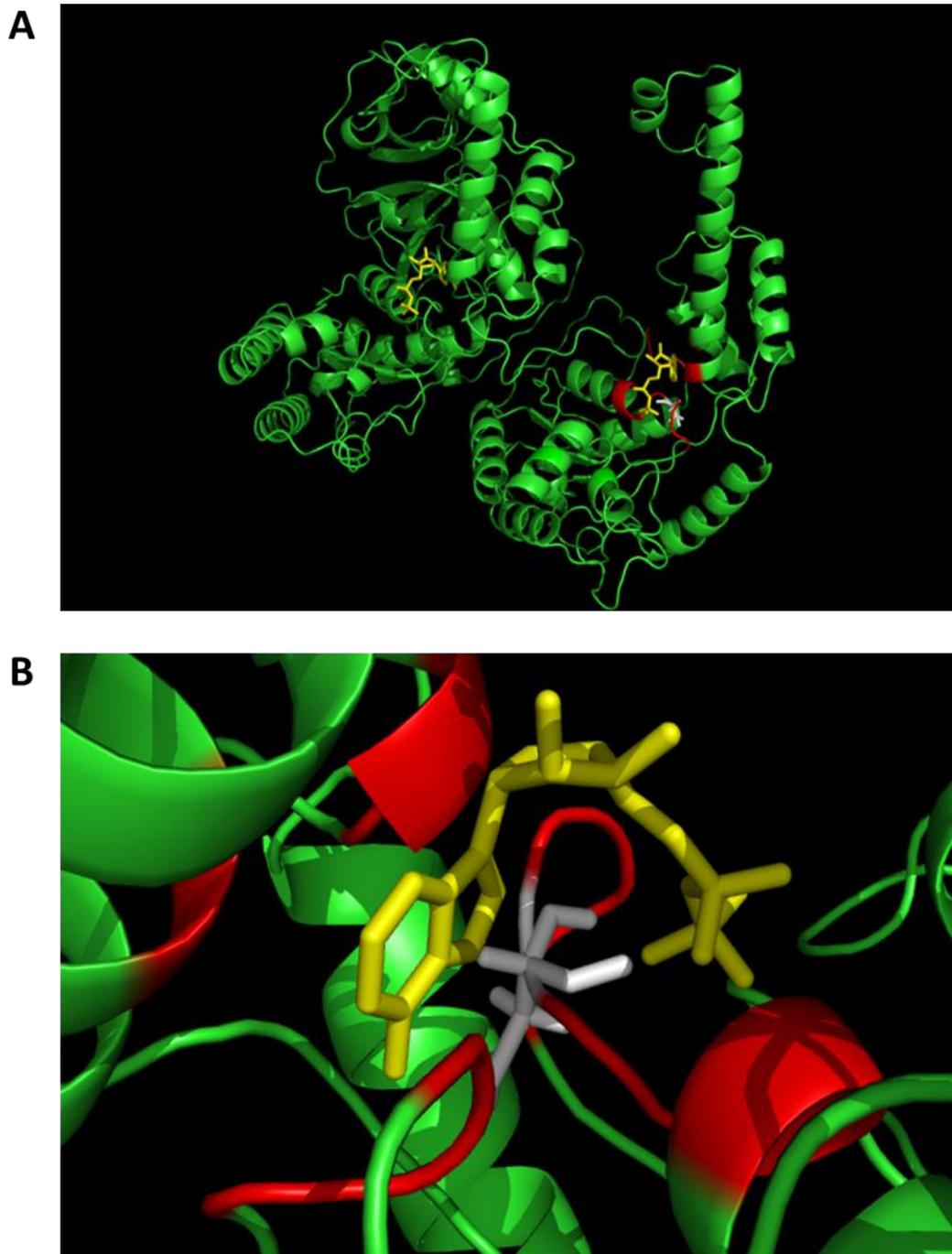


Figure 25 : Modélisation de la structure tridimensionnelle de CDC48. A. Structure d'un monomère de CDC48 complexé avec l'ATP (figuré en jaune). Le site Walker A du second domaine ATPasique est figuré en rouge, le résidu Cys 526 en blanc. B. Agrandissement du site de fixation Walker A du domaine D2. Le résidu Cys 526 est spatialement proche du substrat.

2.2 Analyses par dichroïsme circulaire

Afin d'estimer le rôle du résidu Cys 526 dans l'établissement de la structure secondaire de CDC48 ainsi que l'impact de la S-nitrosylation sur cette structure, des analyses par dichroïsme circulaire ont été réalisées sur les protéines recombinantes CDCF et CDCM soumises ou non à un traitement par le GSNO ou le GSH. La figure 26 présente les résultats obtenus.

Le spectre de dichroïsme circulaire de la protéine non mutée CDCF indique après calcul par l'algorithme k2d (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/terms.shtml>) que la structure secondaire de celle-ci comporte 43 pourcents d'hélice alpha, 12 pourcents de feuillet bêta, et 45 pourcents de random coil. Cette proportion de structures secondaires correspond à celle établie *in silico* par reconnaissance de repliement (Roy *et al.*, 2010 ; respectivement 40,59 % d'hélice alpha, 13,46 % de feuillet beta et 45,95 % de random coil). De plus, ce spectre est strictement identique à celui de la protéine mutée CDCM, indiquant que la substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala n'affecte pas la structure secondaire. Lorsque la même expérience a été réalisée sur les protéines CDCF et CDCM exposées au GSNO, donc S-nitrosylées, les spectres obtenus se sont avérés identiques à ceux observés avec les protéines CDCF et CDCM non traitées (figure 26 B et C).

Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les protéines CDCF et CDCM ont été traitées par le GSH (figure 26 B et C).

En conclusion, la S-nitrosylation de CDC48, en particulier du résidu Cys526, ne présente pas d'incidence sur la structure secondaire de CDC48.

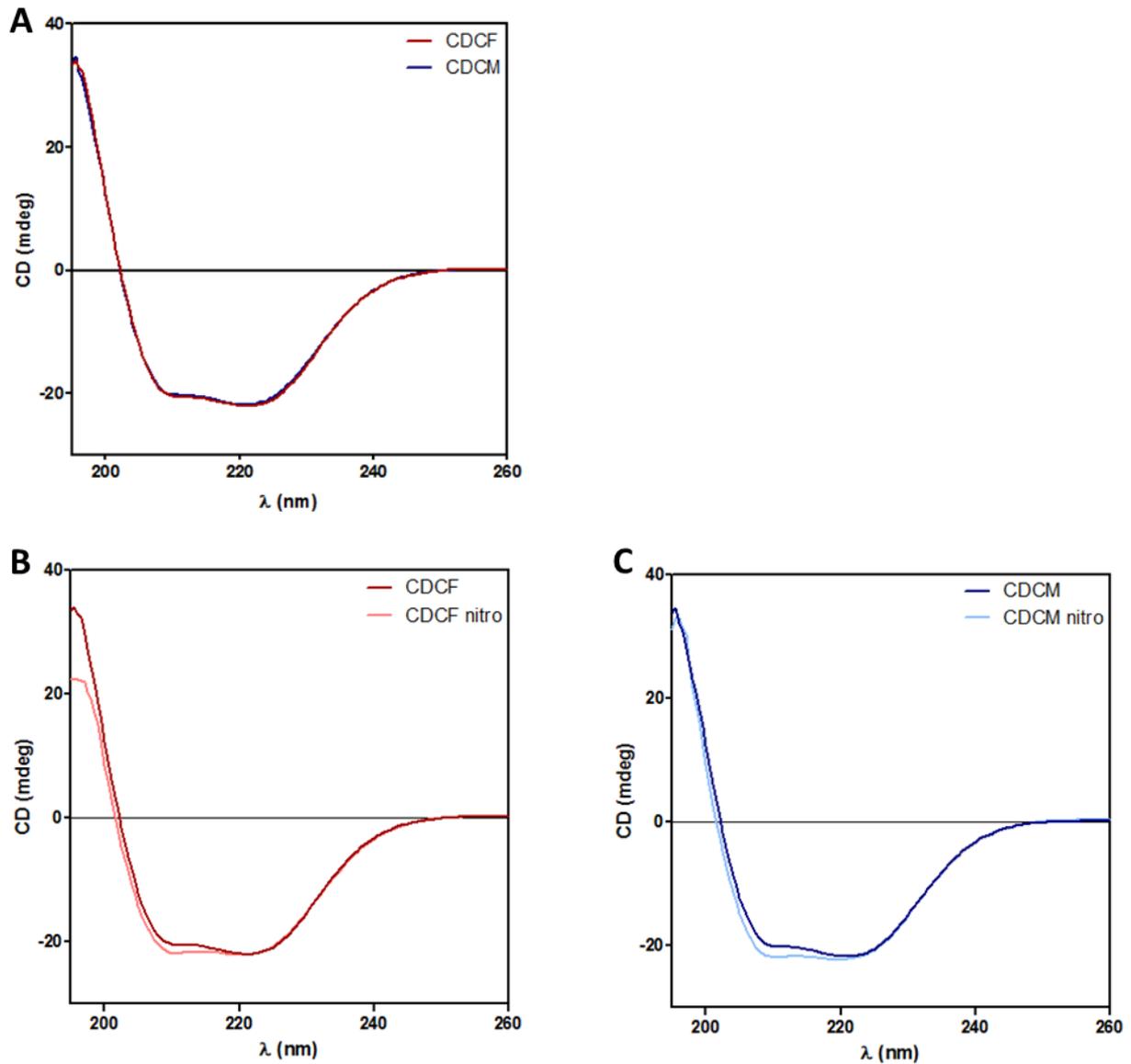


Figure 26 : Spectre de dichroïsme circulaire des protéines CDCF et CDCM. A. Spectres des protéines CDCF (rouge) et CDCM (bleu) non traitées. B. Spectres de la protéine CDCF soumise à un traitement par le GSNO (rouge clair) ou le GSH (rouge foncé). C. Spectres de la protéine CDCM soumise à un traitement par le GSNO (rouge clair) ou le GSH (rouge foncé). Pour chaque expérience, 2 μ M de protéines recombinantes ont été utilisés. Les spectres présentés sont une moyenne de 5 mesures.

2.3 Expériences de dénaturation thermique

Afin de compléter les résultats précédents et d'estimer plus précisément le rôle du résidu Cys 526 et l'impact de sa S-nitrosylation sur la structure de la protéine, des expériences de dénaturation thermique ont été effectuées. Pour cela, le signal de dichroïsme circulaire à 222 nm a été mesuré pour les protéines CDCF et CDCM soumises à des températures croissantes, traitées ou non par le GSNO. Les courbes de dénaturation obtenues et les températures de fusion correspondantes sont présentées figure 27 et tableau 8.

La comparaison des échantillons CDCF et CDCM démontre que la substitution du résidu Cys 526 en alanine se traduit par une baisse de la température de fusion, celle-ci passant de 49.2°C à 46.3°C (tableau 8, figure 27 A). Ainsi, la mutation affecte la stabilité thermique de CDC48. En revanche, l'exposition au GSNO ou au GSH ne s'est pas accompagnée d'un changement de la température de fusion des protéines CDCF et CDCM, les spectres obtenus suite au traitement par l'un ou l'autre des composés étant identiques pour une protéine donnée (Tableau 8, figure 27 B et C). Il apparaît donc que la S-nitrosylation de CDC48 n'impacte pas sa stabilité thermique.

Tableau 8 : Températures de fusion calculées pour les différents échantillons. Les données représentent la moyenne +/- la déviation standard de trois répliques indépendants. Les calculs statistiques ont été obtenus par une ANOVA suivi d'un test de Turkey. * $p \leq 0.001$ comparé à l'échantillon CDCF traité par le GSH

CDCF		CDCM	
GSH	GSNO	GSH	GSNO
49.2°C ± 0.5°C	49°C ± 0.7°C	46.3°C ± 0.4°C*	47°C ± 0.3°C

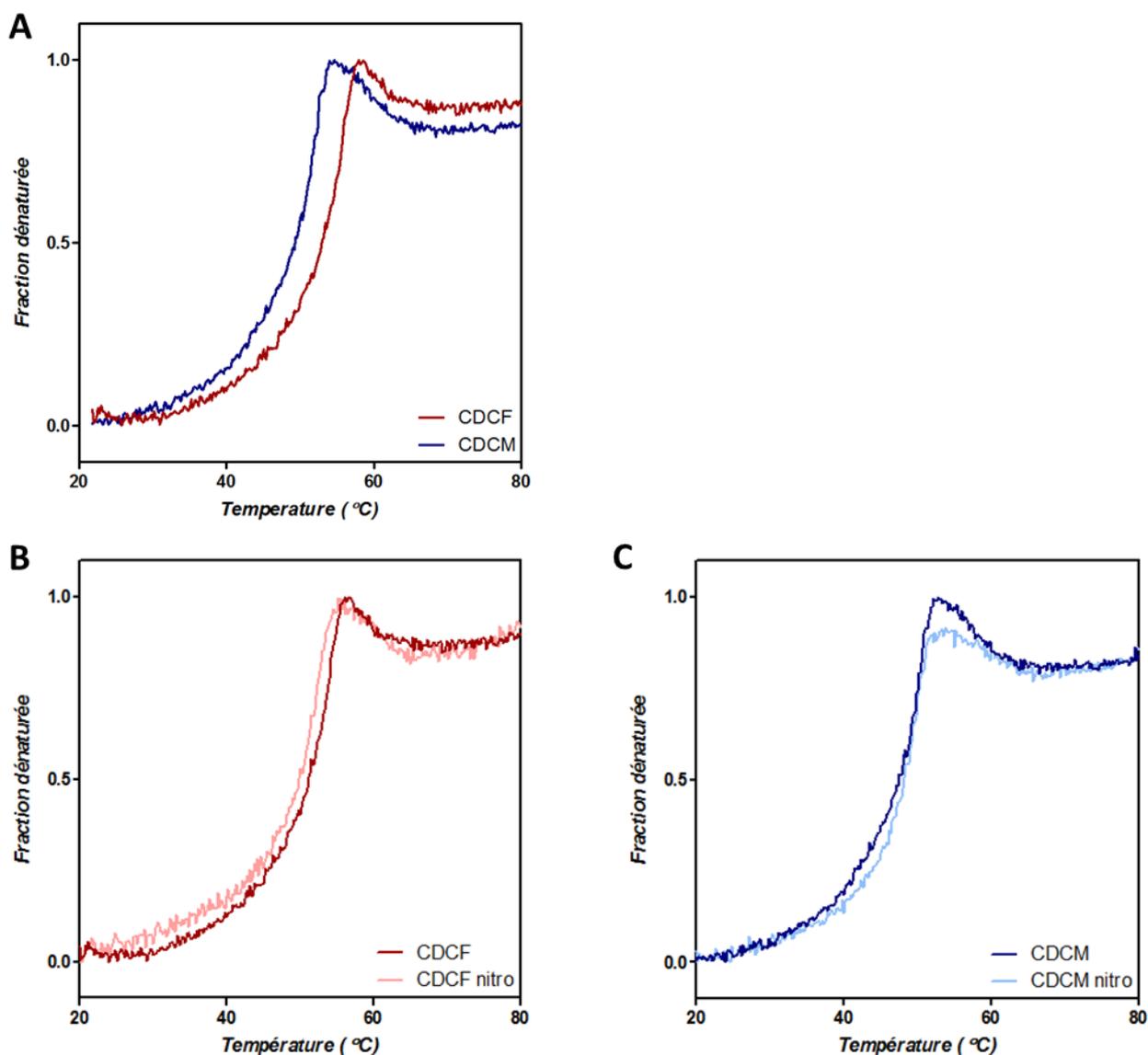


Figure 27 : Courbes de dénaturation des protéines CDCF et CDCM. A. Courbes de dénaturation des protéines CDCF (rouge) et CDCM (bleu) non traitées. B. Courbes de dénaturation de la protéine CDCF soumise à un traitement par le GSNO (rouge clair) ou le GSH (rouge foncé). C. Courbes de dénaturation de la protéine CDCM soumise à un traitement par le GSNO (rouge clair) ou le GSH (rouge foncé). La dénaturation des protéines a été suivie en mesurant la disparition du signal de dichroïsme circulaire à 222 nm. Pour chaque expérience, 2 μ M de protéines recombinantes ont été utilisés. Les courbes de dénaturation présentées sont une moyenne de 3 expériences indépendantes

2.4 Expériences de fluorescence

Afin d'estimer l'impact du résidu Cys 526 et de sa S-nitrosylation sur la structure tertiaire de la protéine, des expériences de mesure de fluorescence ont été réalisées. En effet, la fluorescence de certains résidus d'acides aminés, notamment des tryptophanes (Trp), dépend de l'accessibilité de ces résidus à la lumière d'excitation et donc de l'arrangement tridimensionnel de la protéine. CDCF présente seulement deux résidus Trp, spatialement proches du site Walker A du domaine ATPasique D2 comme le montre la figure 28. La mesure de la fluorescence intrinsèque de ces résidus Trp a donc été déterminée pour les protéines recombinantes CDCF et CDCM exposées préalablement ou non au GSNO. Les courbes de fluorescence obtenues sont présentées figure 29.

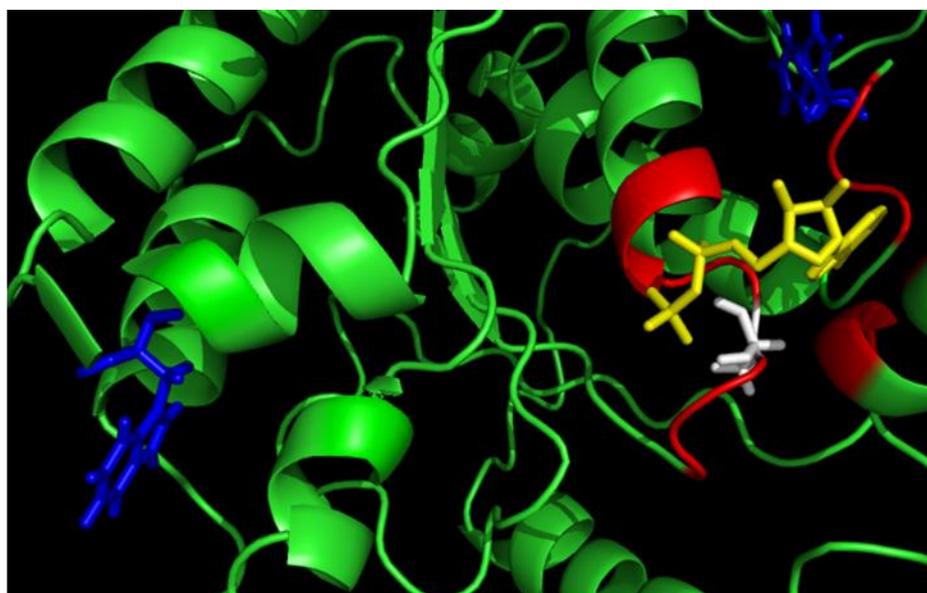


Figure 28 : Position des résidus tryptophanes de CDC48. CDC48 ne contient que 2 résidus Trp (représentés en bleu). Ceux-ci sont à proximité du site Walker A (représenté en rouge) du domaine D2 de CDC48 impliqué dans la fixation de l'ATP (représenté en jaune) et contenant le résidu Cys 526 (représenté en blanc).

Les protéines CDCF et CDCM non traitées présentent des spectres de fluorescence différents (figure 29 A). En effet, la fluorescence de la forme mutée de CDC48 présente un déplacement du maximum de fluorescence vers les longueurs d'ondes courtes, et une intensité maximum de fluorescence 20 % moins importante que celle mesurée pour CDCF.

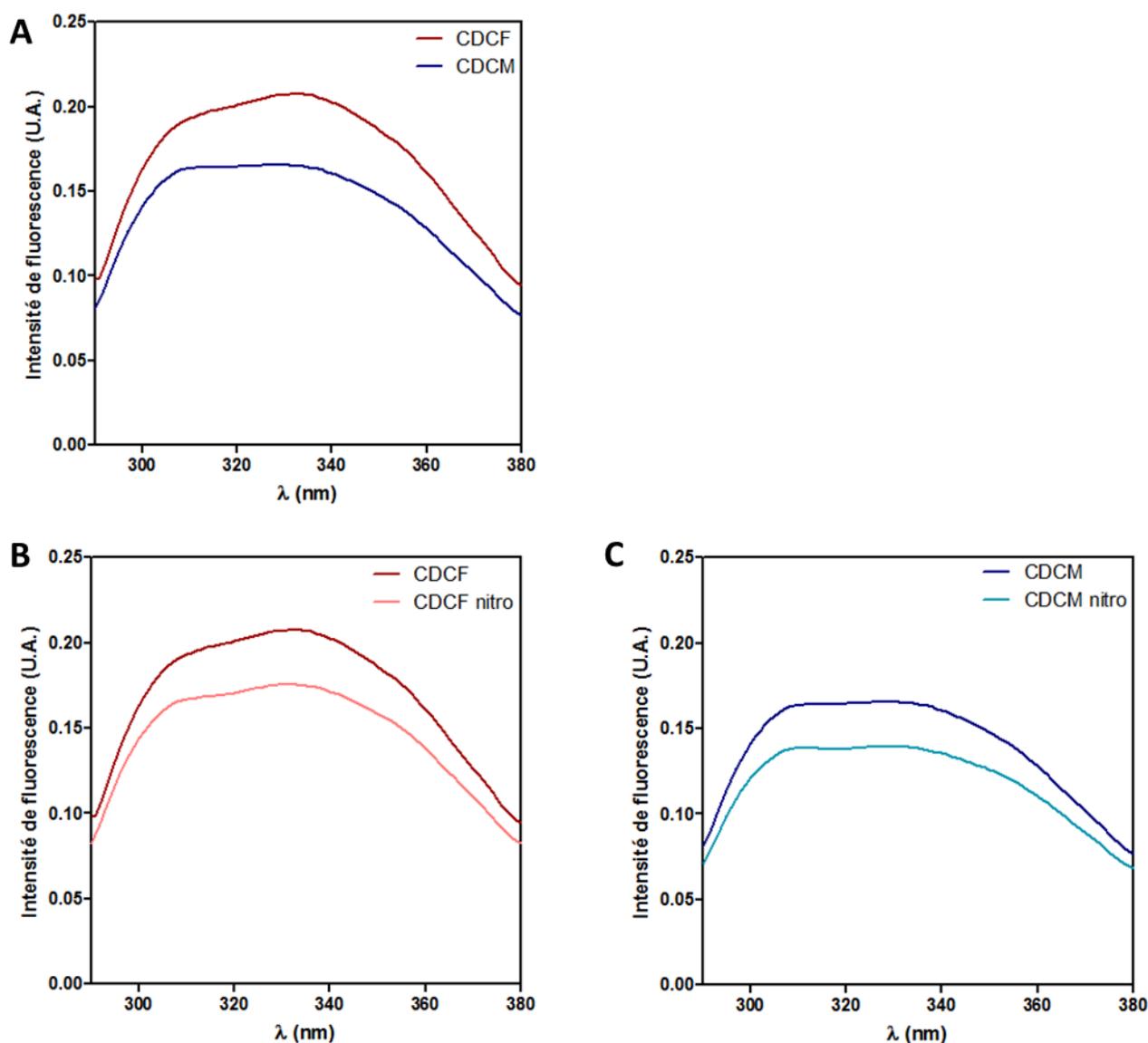


Figure 29 : Fluorescence des protéines CDCF et CDCM. A. Spectres de fluorescence des protéines CDCF (rouge) et CDCM (bleu) non traitées. B. Spectres de fluorescence de la protéine CDCF soumise à un traitement par le GSNO (rouge clair) ou le GSH (rouge foncé). C. Spectres de fluorescence de la protéine CDCM à un traitement par le GSNO (rouge clair) ou le GSH (rouge foncé). Pour chaque expérience, 2 μM de protéines recombinantes ont été utilisés. Les spectres de fluorescence présentés sont une moyenne de 3 expériences indépendantes

Ce résultat montre que la substitution du résidu Cys 526 modifie le spectre de fluorescence de la protéine, traduisant probablement une modification de la structure tertiaire du monomère de CDC48.

Suite au traitement par le GSNO, les spectres de fluorescence obtenus pour les protéines CDCF et CDCM S-nitrosylées montrent une réduction de la fluorescence des résidus Trp (figure 29 B et C). En effet, une diminution de l'intensité de fluorescence, de 15 % pour chacune des isoformes testées, est observée. Ces données indiquent que la S-nitrosylation de la protéine native, comme celle de la mutée, affecte vraisemblablement la structure tertiaire. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'établir un lien formel entre la S-nitrosylation du résidu Cys 526 et la structure de CDC48.

3. Tests d'activité *in vitro*

La localisation du résidu Cys 526 dans le site actif Walker A du domaine D2, de même que l'impact de la S-nitrosylation sur la structure tertiaire de CDC48, suggèrent que le NO pourrait moduler l'activité ATPasique de la protéine. Pour répondre à cette interrogation, des tests d'activités enzymatiques *in vitro* ont été réalisés. Plus précisément, les protéines recombinantes native CDCF ou mutée CDCM ont été exposées ou non aux donneurs de NO DEA/NO ou GSNO et leurs activités ATPasiques respectives ont été mesurées *in vitro* via la quantification des phosphates libres résultant de l'hydrolyse de l'ATP. Les phosphates libérés ont été dosés par l'essai au vert de Malachite, en spectrophotométrie, selon la méthode développé par Rowlands *et al.*, 2004. Les résultats sont présentés figure 30.

En absence de traitement par les donneurs de NO, la protéine recombinante non mutée CDCF présente une activité ATPasique significative manifestée par l'accumulation croissante de phosphates libérés dans le milieu réactionnel au cours du temps (5, 10 et 15 minutes ; figure 30 A). Cette activité est plus forte que celle mesurée chez la protéine mutée CDCM dans les mêmes conditions. En effet, après 15 minutes de traitement, la quantité de phosphates libérés s'est avérée environ 65% inférieure à celle mesurée pour la protéine non mutée. Ainsi, le résidu Cys 526 semble jouer un rôle important dans l'activité ATPasique de la protéine.

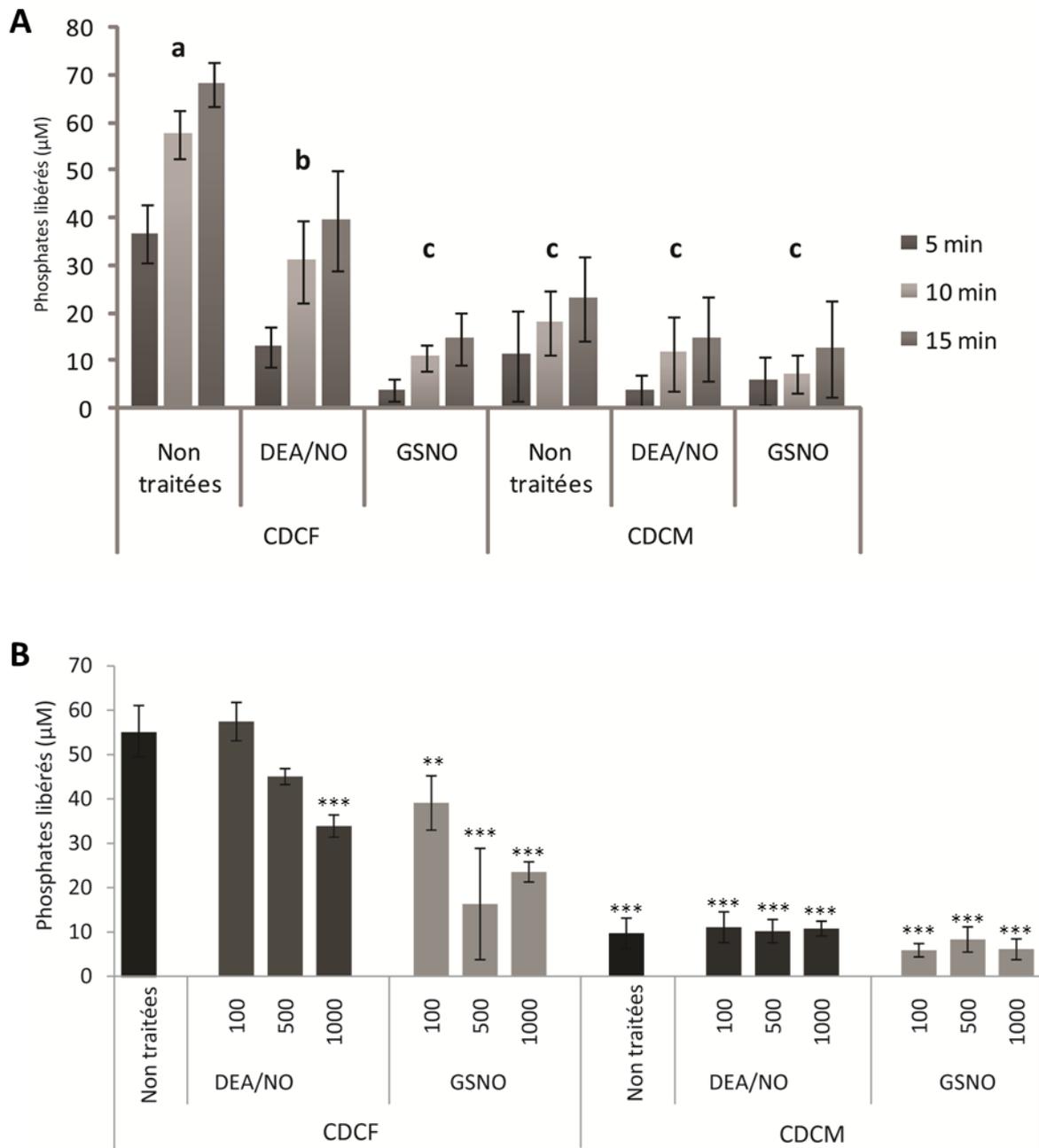


Figure 30 : Activité ATPasique de CDC48. A. Concentration de phosphates libérés par l'hydrolyse de l'ATP (0,2 mM initial) catalysée par CDC48 native (CDCF) ou mutée (CDCM). Les protéines recombinantes (concentration à préciser) ont été prétraitées ou non avec le DEA/NO (1 mM) ou le GSNO (1 mM) 30 min à l'obscurité. La concentration de phosphates libérés a été mesurée après 5, 10 et 15 minutes par spectrophotométrie grâce au test au vert de malachite. Les calculs statistiques ont été obtenus par une ANOVA suivi d'un test de Turkey. $p \leq 0,001$. B. Dose dépendance de l'inhibition de l'activité de la protéine CDC48 par les donneurs de NO DEA/NO et GSNO. Les protéines ont été traitées comme indiqué ci-dessus avec le DEA/NO ou le GSNO aux concentrations spécifiées, puis le phosphate libéré mesuré après 10 min de réaction enzymatique. Les calculs statistiques ont été obtenus par une ANOVA suivi d'un test de Turkey. *** $p \leq 0,001$ et ** $p \leq 0,01$ comparé à l'échantillon CDCF non traité.

Suite au traitement de la protéine native CDCF par le DEA/NO, une réduction de l'activité ATPasique a été observée, la quantité de phosphates libérés après 15 minutes étant environ 40% inférieure à celle mesurée lorsque l'expérience a été réalisée en absence de donneur de NO. Cette inhibition s'est révélée beaucoup plus importante lorsque la protéine native a été exposée au GSNO. En effet, une baisse d'environ 80% de l'activité ATPasique a été mesurée après 15 minutes de traitement. De plus, l'inhibition de l'activité ATPasique induite par l'exposition de la protéine aux donneurs de NO est dose dépendante (figure 30 B) : dans le cas du DEA/NO, elle est significative à une concentration de 1 mM ; pour le GSNO elle s'observe dès 100 μ M.

Lorsque des expériences similaires ont été réalisées sur la protéine mutée CDCM, aucune inhibition significative d'activité n'a été observée après traitement par les donneurs de NO (figure 30 A et B). Ces résultats suggèrent fortement que l'inhibition de l'activité de la protéine CDC48 native induite par les donneurs de NO implique le résidu cystéine 526. De plus, ils confortent le rôle clé de ce résidu dans l'activité ATPasique de la protéine.

Discussion

Dans ce second chapitre, nous nous sommes intéressés à la régulation de CDC48 par le NO, CDC48 constituant une cible potentielle du NO produit dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine.

Dans une première étape, nous avons cloné chez *N. tabacum* cv *xanthi* un ADNc pleine longueur codant CDC48. La séquence protéique déduite de l'ADNc, nommée CDCF, comporte le peptide ayant permis l'identification de CDC48 en MS. Chez *A. thaliana*, 3 différentes isoformes de CDC48 ont été identifiées, notées de A à C, l'isoforme CDC48A étant majoritaire (Rancour *et al.*, 2002). Une publication récente a également rapporté l'identification d'un homologue de CDC48 chez *Nicotiana glutinosa*, espèce proche de *N. tabacum*, présentant dans sa séquence primaire le peptide identifié en MS au cours de nos travaux (Bae *et al.*, 2009). Ces observations posent la question de la possible existence de plusieurs isoformes de CDC48 chez le tabac. Toutefois, l'ensemble des séquences disponibles ne correspond qu'à une seule protéine, en l'occurrence à CDCF. Par ailleurs, nos tentatives de clonage de l'isoforme de *N. glutinosa* chez *N. tabacum* cv *xanthi* ont échoué, ou conduit au clonage difficile de CDCF. L'ensemble de ces observations sont en faveur de l'existence d'une isoforme unique de CDC48 dans notre modèle. Des approches de Southern blot pourraient étayer cette affirmation.

Tableau 9 : Identité de séquence des homologues de CDC48 de différents organismes. L'identité de séquence est exprimée en pourcentage.

	<i>A. thaliana</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>N. tabacum</i>	92,8	77,1	67,4
<i>A. thaliana</i>		78	66,9
<i>H. sapiens</i>			68,8

CDCF présente une identité de séquence remarquable avec ses homologues humaine et de levure (tableau 9). Ainsi, l'isoforme de levure partage plus de 65% d'identité avec les séquences de tabac, humaine ou d'*A. thaliana*. Les isoformes de *N. tabacum* et d'*A. thaliana* présentent plus de 90% d'identité entre elles et plus de 75% avec l'homologue humaine. La

forte conservation de séquence observée n'est pas surprenante compte tenu du rôle clé de cette protéine dans différents processus cellulaires comme cela a été exposé en début de chapitre. La seconde information apportée par l'alignement de séquence présenté figure 18 est que les différents domaines fonctionnels de CDC48 sont présents chez CDCF. En particulier, les domaines Walker A et Walker B des sites ATPasiques D1 et D2 sont conservés. Les zones les plus divergentes concernent les domaines N-ter et C-ter classiquement impliqués dans la fixation des partenaires protéiques.

Concernant le peptide séquencé en MS ayant permis l'identification de CDCF, il est quasi conservé chez les quatre homologues alignés, à l'exception d'un résidu pour la levure. Il s'agit du résidu Cys 526, identifié comme cible potentielle de S-nitrosylation en réponse à la cryptogéine. Chez la levure, ce résidu est remplacé par un résidu thréonine. De manière générale, le résidu Cys 526 n'est présent que chez les organismes pluricellulaires. Cette observation suggère un rôle particulier de ce résidu pour la fonction de CDC48 chez les organismes supérieurs. Renforçant cette hypothèse, ce résidu est localisé dans le domaine Walker A du second domaine ATPasique de CDC48 possédant l'activité ATPasique majeure (Song *et al.*, 2003). De plus, comme l'indique notre analyse mais également d'autre études, il est régulé par des processus de S-nitrosylation/oxydation (Noguchi *et al.*, 2006 ; voir les pages suivantes).

L'analyse du mode de régulation de CDCF par le NO a impliqué sa production en système hétérologue, sous forme native ou mutée (CDCM et CDCM2). Nous avons choisi d'utiliser un système d'expression bactérien et la technologie étiquette 6xHis. En effet, d'après les données de la littérature, ce système d'expression ainsi que la fusion d'une étiquette 6xHis ne constituent pas d'obstacles à l'obtention de CDC48 recombinantes fonctionnelles (Davies *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2003). Ce choix s'est avéré judicieux et des quantités suffisantes de protéines ont été obtenues. Toutefois, il est à noter que deux bandes immunoréagissant aux anticorps dirigés contre l'isoforme d'*A. thaliana* de CDC48 ont été détectées lors de l'analyse de la production des protéines recombinantes. Nous n'avons pas d'explication définitive quant à la présence de ces 2 bandes. Il est envisageable qu'elles soient la conséquence de conformations distinctes de la protéine. En effet, CDC48 s'organise en hexamère *in vivo*, via la mise en place d'interactions faibles entre plusieurs monomères.

Les conditions dénaturantes dans lesquelles les gels d'électrophorèse ont été réalisés conduisent très probablement à la dissociation de ces structures, résultant en l'obtention de monomères de CDC48 pouvant être différemment repliés et présentant des propriétés électrophorétiques différentes. Nous ne pouvons toutefois pas exclure une contamination par une autre protéine, qui serait reconnue par les anticorps anti-CDC48, ou encore un mécanisme de protéolyse.

Les tests de S-nitrosylation *in vitro* de la protéine recombinante CDCF se sont avérés positifs, quel que soit le donneur de NO testé (DEA/NO ou GSNO). Ce résultat confirme le caractère S-nitrosylable de l'isoforme de CDC48 de *N. tabacum* cv *xanthi*. Afin de confirmer l'implication du résidu Cys 526 dans ce processus, les tests de S-nitrosylation ont également été réalisés chez les protéines recombinantes CDCM et CDCM2 pour lesquelles le résidu Cys 526 a été substitué respectivement par un résidu Ala ou Asp. Dans ces conditions, les deux isoformes mutées se sont révélées S-nitrosylées avec toutefois un taux de S-nitrosylation inférieur à celui mesuré pour CDCF. Cette observation soulève deux commentaires :

- d'une part, la moindre intensité de S-nitrosylation observée chez les isoformes mutantes est en adéquation avec l'hypothèse que le résidu Cys 526 constitue un site de S-nitrosylation. Ce résultat confirme également l'efficacité de l'approche de protéomique que nous avons entreprise afin de purifier et d'identifier des peptides S-nitrosylés. De plus, il est en accord avec les travaux de Noguchi *et al.* (2006) suggérant que chez l'isoforme CDC48 de drosophile ce résidu Cys est un site de S-nitrosylation.

- d'autre part, la détection d'un signal de S-nitrosylation chez les isoformes mutées indique qu'un ou plusieurs autres résidus Cys sont également S-nitrosylables *in vitro*. La protéine comporte en effet 13 autres résidus Cys qui pourraient constituer des sites potentiels de S-nitrosylation.

Ces données doivent toutefois être interprétées prudemment. Premièrement, elles sont préliminaires puisque qu'un seul test de S-nitrosylation a été réalisé. Deuxièmement, le traitement de protéines recombinantes par du NO généré artificiellement peut conduire à la S-nitrosylation aspécifique de résidus Cys. Ce phénomène n'est pas complètement compris mais serait lié à la pression en oxygène (pO₂) lors des essais. Eu *et al.* (2000) ont notamment montré que le récepteur à ryanodine RYR1 de muscle squelettique est poly-S-nitrosylé lorsque les essais de S-nitrosylation sont réalisés à une pO₂ ambiante (environ 150 mm Hg)

alors qu'un seul résidu est S-nitrosylé lorsqu'une pO_2 équivalente à celle mesurée dans les tissus (environ 10 mm Hg) est utilisée. Troisièmement, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la substitution du résidu Cys 526 par le résidu Ala ou Asp chez les isoformes mutées CDCM et CDCM2 conduise à des réarrangements conformationnels favorisant la S-nitrosylation aspécifique de résidus Cys. Des analyses de MS comparatives entre la protéine native et les protéines mutées exposées à des donneurs de NO pourraient permettre l'identification des résidus Cys S-nitrosylés et donc de vérifier si les protéines sont ou non différenciellement S-nitrosylées.

Via deux approches, l'une basée sur l'homologie de séquence et l'autre sur la reconnaissance des repliements, nous avons modélisé *in silico* la structure tridimensionnelle d'un monomère de CDC48 de tabac. Cette analyse a montré que le résidu Cys 526, présent dans le domaine Walker A du second site ATPasique, est localisé au sein de la poche de liaison au substrat et présente une proximité spatiale avec l'ATP. Cette proximité suggère que la S-nitrosylation du résidu Cys 526 pourrait modifier la structure locale de la protéine et/ou présenter une incidence soit sur l'affinité du site actif Walker A du domaine D2 pour l'ATP, soit sur la fixation de ce dernier. Les différentes expériences menées afin d'étayer en partie ces hypothèses ont conduit aux conclusions suivantes :

- la S-nitrosylation *in vitro* de CDCF, de même que la substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala, ne modifient pas le contenu en structures secondaires. Ce résultat était attendu. En effet, les structures secondaires dépendent de l'établissement de liaisons hydrogène établies entre le groupement carbonyle et la fonction amine des groupements α -carboxylique et α -aminé de résidus proches et régulièrement espacés au sein de la structure primaire. Dans ces structures, les chaînes latérales sont positionnées à l'extérieur des hélices. L'unique mutation du résidu Cys 526, ou la simple S-nitrosylation de ce dernier, sont probablement des évènements insuffisants pour compromettre la mise en place de ces structures.

- la S-nitrosylation de CDCF n'entraîne pas de modification de sa stabilité thermique. L'analyse de la stabilité thermique de l'isoforme mutée CDCM a toutefois révélée que celle-ci exhibe une température de fusion significativement inférieure à la protéine native CDCF. Ce résultat suggère que la substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala pourrait introduire des changements de conformation fragilisant la protéine. Dans l'affirmatif, ces changements

n'affectent pas le contenu en structures secondaires comme l'indiquent les résultats de dichroïsme circulaire discutés ci-dessus.

- la substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala conduit à une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine comme en témoigne les expériences de mesure de fluorescence intrinsèque des deux résidus Trp de CDC48. Ce constat est cohérent avec les résultats de stabilité thermique et désigne le résidu Cys 526 comme étant essentiel au repliement correct de CDC48. Ces données renforcent également l'hypothèse que les changements structuraux inhérents à la mutation du résidu Cys 526 pourraient faciliter la S-nitrosylation aspécifiques de résidus Cys.

- le traitement des protéines recombinantes CDCF et CDCM par le GSNO conduit à une réduction similaire de l'intensité de fluorescence des résidus Trp. Ainsi, la protéine native et la protéine mutée subissent un changement de conformation lors d'une exposition au NO. Sur la base de ce résultat, il est plausible que la baisse d'intensité de fluorescence observée dépende d'une réorganisation structurale indépendante du résidu Cys 526. Cette réorganisation pourrait impliquer la S-nitrosylation d'un ou plusieurs autres résidus Cys ou éventuellement s'expliquer par la réactivité du NO vis-à-vis d'autres résidus. En particulier, Stamler *et al.* (1992) ont proposé que le NO puisse réagir avec les centres aromatiques. La démonstration que ce mécanisme ait une réalité physiologique n'a pas été rapportée.

L'importance du résidu Cys 526, et donc de l'impact potentiel de sa S-nitrosylation, a été confirmée *via* les mesures d'activité ATPasique de CDC48. D'une part, l'isoforme mutée CDCM a présenté une faible activité enzymatique, démontrant l'implication du résidu Cys 526 dans l'activité ATPasique de CDC48. Ce résultat est très probablement associé à la localisation de ce résidu dans le domaine Walker A du second site ATPasique. Les modifications structurales engendrées par la substitution du résidu Cys 526 par un résidu Ala discutées ci-dessus pourraient également expliquer la baisse d'activité de CDCM. D'autre part, l'exposition de la protéine native CDCF aux donneurs de NO s'accompagne d'une inhibition significative de l'activité ATPasique. Sur la base des résultats de S-nitrosylation *in vitro* (figure 24), il est plausible que cette baisse d'activité soit due, tout au moins en partie, à la S-nitrosylation du résidu Cys 526. En accord avec cette conclusion, le traitement de l'isoforme mutée CDCM par les donneurs de NO n'a pas conduit à une diminution de l'activité ATPasique résiduelle de celle-ci. Ce résultat indique que la S-nitrosylation

potentielle des autres résidus Cys de CDC48 ne modulerait pas l'activité de la protéine. Des expériences complémentaires, notamment d'analyse d'activité ATPasique et de S-nitrosylation d'isoformes de CDC48 mutées sur les autres résidus Cys, seront nécessaires afin de vérifier ces hypothèses. Enfin, notons que l'inhibition de CDC48 a été plus marquée lors des traitements par le GSNO comparativement au DEA/NO. Ces différences d'efficacité entre les deux donneurs sont probablement dues à leur chimie. En effet, comme souligné précédemment, le DEA/NO est une nitrosamine libérant du NO[•] alors que le GSNO est un agent S-nitrosylant libérant le cation nitrosonium NO⁺.

En résumé, les données accumulées dans ce chapitre démontrent que la S-nitrosylation de CDC48, notamment de son résidu Cys 526, conduit à une baisse de son l'activité ATPasique, et pourrait ainsi constituer l'un des mécanismes de régulation post-traductionnelle de la protéine.

*CHAPITRE III : REGULATION DE LA PROTEINE
NTOSAK ET DE SON PARTENAIRE CELLULAIRE
GAPDH PAR LE NO EN REponse A UN STRESS
SALIN*

En parallèle des travaux centrés sur l'identification et l'étude fonctionnelle de protéines modulées par S-nitrosylation dans le modèle cryptogéine/tabac, j'ai participé à l'analyse de la régulation de la protéine kinase NtOSAK (*Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase*) par le NO produit en réponse aux stress abiotiques.

Présentation de la publication 1

NtOSAK appartient à la famille des protéines SnRK (*SNF1 [sucrose non-fermenting]-related protein kinase*). Cette famille est subdivisée en trois sous-familles, les SnRK1, SnRK2 et SnRK3. Les enzymes de la sous-famille des SnRK1 sont apparentées aux protéines kinases SNF1/AMPK (*AMP-activated protein kinase*) des levures et animaux, respectivement. Elles sont impliquées dans la régulation du métabolisme global et participeraient à l'adaptation cellulaire aux stress nutritionnels ou environnementaux (pour revue voir Halford & Hardie, 1998 ; Hrabak *et al.*, 2003 ; Halford & Hey, 2009). A l'opposé, les enzymes SnRK2 et SnrK3 sont spécifiques aux plantes. Les membres de la sous-famille SnRK3 prennent part aux mécanismes de défenses des plantes soumises à des stress abiotiques (Boudsocq & Lauriere, 2005).

Les protéines de la sous-famille SnrK2, à laquelle appartient NtOSAK, ont été plus tardivement étudiées, bien qu'un intérêt croissant porte sur la détermination de leurs fonctions. Ainsi, dix différents membres de cette famille sont prédits chez *A. thaliana* et *O. sativa* (Kobayashi *et al.*, 2004 ; Boudsocq *et al.*, 2004). A l'exception d'une d'entre elles, elles sont toutes activées par des stress abiotiques causées par des osmolytes, tels que le sucrose, le mannitol, NaCl ou encore le sorbitol. Certaines d'entre elles sont également induites par un traitement à l'ABA.

En effet, la première protéine de la sous-famille des SnrK2 décrite chez les plantes est la protéine PKABA1 (*protein kinase induced by abscissic acid 1*) de blé, induite par un stress hydrique, un stress froid, un stress osmotique, un stress salin, ou par l'ABA (Anderberg & Walker-Simmons, 1992 ; Holapa & Walker-Simmons, 1995). L'activité de PKABA1 est corrélée à une répression de l'expression de gènes associés la synthèse de gibbérellines (Gomez-Cadenas, 2001). L'homologue de PKABA1 identifié chez *Vicia faba*, AAPK (*abscissic activated*

protein kinase), est activé par l'ABA dans les cellules de garde en réponse à un stress hydrique (Li *et al.*, 2000). Cette enzyme contrôle l'activité de canaux anioniques impliqués dans les mouvements stomatiques et, en conséquence, régule la fermeture des stomates, un processus dans lequel le NO est également engagé (Li *et al.*, 2000 ; Garcia-Mata & Lamattina, 2002). Une autre protéine de la famille des SnRK2 d'*A. thaliana*, OST1 (*open stomata 1*), est également activée à la suite d'un stress hydrique *via* l'ABA (Yoshida *et al.*, 2002). Cette activation conduit à la fermeture des stomates et agit en amont d'une production de FAO (Mustilli *et al.*, 2002). L'ensemble de ces exemples tendent à démontrer que les enzymes appartenant à la sous-famille SnRK2 sont impliquées d'une manière générale dans les réponses des plantes aux stress abiotiques (Kobayashi *et al.*, 2004 ; Boudsocq *et al.*, 2004). Précisons toutefois que OST1 est aussi activée dans les cellules de garde en réponse à des PAMP bactériens, démontrant que le rôle des protéines kinases SnRK2 n'est pas limité aux stress abiotiques (Melotto *et al.*, 2006).

NtOSAK a été identifiée il y a une dizaine d'année par le groupe de Grazyna Dobrowolska (Institut de Biochimie et de Biophysique de Varsovie, Pologne) s'intéressant aux protéines kinases impliquées dans la réponse des plantes aux stress salin et hyperosmotique (Mikolajczyk *et al.*, 2000). En effet, NtOSAK est activée dès les premières minutes de traitement de suspensions cellulaires de tabac par de fortes concentrations de NaCl ou de sorbitol (Hoyos & Zhang, 2000 ; Mikolajczyk *et al.*, 2000). Des travaux plus récents ont démontré que cette protéine kinase est également activée en réponse au cadmium (Cd) et, de façon moins reproductible, en réponse à la cryptogéine (Dahan *et al.*, 2009b ; Kulik *et al.*, article soumis). D'un point de vue mécanistique, l'activation de cette protéine implique la phosphorylation de deux résidus sérine (Ser) situés dans la boucle d'activation de l'enzyme, à savoir les résidus Ser 154 et Ser 158 (Burza *et al.*, 2006). Son activité est indépendante du calcium (Kelner *et al.*, 2004). Il est intéressant de préciser que les différents stress conduisant à l'activation de NtOSAK déclenchent tous une production de NO (Besson-bard *et al.*, 2008b ; Besson-Bard *et al.*, 2009 ; Gould *et al.*, 2003).

Des travaux réalisés dans mon équipe d'accueil en partenariat avec celle de Grazyna Dobrowolska ont montré que l'activité de NtOSAK est modulée par le NO produit lors de l'exposition de suspensions cellulaires de tabac à un stress hyperosmotique (Lamotte *et al.*, 2006), la cryptogéine (Dahan *et al.*, 2009b) et le cadmium (Kulik *et al.*, article soumis). La capacité du NO à induire l'activité de NtOSAK a été vérifiée à l'aide de donneurs de NO (Lamotte *et al.*, 2006 ; Besson-Bard *et al.*, 2008c).

NtOSAK est la première protéine kinase identifiée comme étant modulée par le NO produit dans un contexte physiologique (pour revue voir Courtois *et al.*, 2008). Il nous est donc apparu particulièrement intéressant d'appréhender les mécanismes sous-jacents à son activation. Les résultats de cette étude sont décrits dans la publication présentée dans les pages suivantes. En résumé, nous avons démontré qu'outre les stress évoqués précédemment, l'activation de NtOSAK par un stress salin dans les suspensions cellulaires de tabac est également dépendante, au moins partiellement, du NO. Cependant, le NO n'active pas directement NtOSAK par S-nitrosylation, mais indirectement en promouvant la phosphorylation d'au moins un résidu sérine (Ser 158) localisé dans la boucle d'activation de l'enzyme. Afin d'approfondir cette étude, nous avons ensuite identifié par des approches de co-immunoprécipitation les partenaires de NtOSAK. Parmi ceux-ci figure la GAPDH, une enzyme préalablement décrite comme étant régulée par S-nitrosylation dans les contextes apoptotiques chez les mammifères et identifiée comme cible potentielle de NO chez les plantes (voir introduction). Nous avons également démontré qu'*in vivo* et *in vitro* NtOSAK forme un complexe avec 2 isoformes de GAPDH de tabac, ce complexe étant présent constitutivement dans les cellules de tabac, soit dans le cytosol, soit dans le cytosol et le noyau suivant l'isoforme de GAPDH.

D'un point de vue fonctionnel, la GAPDH est rapidement S-nitrosylée en réponse à un stress salin. Cette S-nitrosylation ne concerne qu'une faible proportion de la GAPDH cellulaire et n'affecte aucunement la glycolyse. De plus, la S-nitrosylation de la GAPDH ne présente aucun impact sur le complexe avec NtOSAK et, inversement, NtOSAK ne phosphoryle pas la GAPDH.

Notre hypothèse actuelle est qu'à l'image des mécanismes décrits chez la levure et les animaux, la GAPDH S-nitrosylée pourrait constituer une plateforme de signalisation cellulaire recrutant les substrats des protéines kinases avec lesquels elle interagit.

Publication 1 : *Regulation of Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity*

Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity

Izabela WAWER*^{†1}, Maria BUCHOLC^{†1}, Jérémy ASTIER*, Anna ANIELSKA-MAZUR[†], Jennifer DAHAN*, Anna KULIK[†], Aleksandra WYSŁOUCH-CIESZYNSKA[†], Monika ZARĘBA-KOZIOŁ[†], Ewa KRZYWINSKA[†], Michal DADLEZ[†], Grażyna DOBROWOLSKA^{†2} and David WENDEHENNE*²

*UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, Plante-Microbe-Environnement, 17 rue Sully, 21065 Dijon cedex, France, and [†]Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Pawlowskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland

Several studies focusing on elucidating the mechanism of NO (nitric oxide) signalling in plant cells have highlighted that its biological effects are partly mediated by protein kinases. The identity of these kinases and details of how NO modulates their activities, however, remain poorly investigated. In the present study, we have attempted to clarify the mechanisms underlying NO action in the regulation of NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase), a member of the SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase 2 family. We found that in tobacco BY-2 (bright-yellow 2) cells exposed to salt stress, NtOSAK is rapidly activated, partly through a NO-dependent process. This activation, as well as the one observed following treatment of BY-2 cells with the NO donor DEA/NO (diethylamine-NONOate), involved the phosphorylation of two residues located in the kinase activation loop, one being identified as Ser¹⁵⁸. Our results indicate that NtOSAK does not undergo the direct chemical modifications of its cysteine residues by S-nitrosylation. Using a co-immunoprecipitation-based strategy,

we identified several proteins present in immunocomplex with NtOSAK in salt-treated cells including the glycolytic enzyme GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Our results indicate that NtOSAK directly interacts with GAPDH *in planta*. Furthermore, in response to salt, GAPDH showed a transient increase in its S-nitrosylation level which was correlated with the time course of NtOSAK activation. However, GAPDH S-nitrosylation did not influence its interaction with NtOSAK and did not have an impact on the activity of the protein kinase. Taken together, the results support the hypothesis that NtOSAK and GAPDH form a cellular complex and that both proteins are regulated directly or indirectly by NO.

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase (NtOSAK), nitric oxide, phosphorylation, SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase 2 (SnRK2), S-nitrosylation.

INTRODUCTION

Over the last few years, the free radical gas NO (nitric oxide) has become established as an intracellular messenger that affects signalling pathways involved in the plant cell response to various biotic and abiotic stimuli including hormones, pathogens and derived PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), heavy metals or salt [1–3]. The emerging picture is that NO exerts part of its biological actions by modulating the activity of a wide array of proteins, some being involved in the production or in the mobilization of cellular messengers such as H₂O₂, Ca²⁺ and cGMP [4–6]. Ultimately, these processes might influence the expression of numerous NO target genes, thus leading to an adaptive response [7]. Mechanistically, a growing body of evidence indicates that NO has an impact on the activity of target proteins by the direct chemical modification of transition metals and critical residues, preferentially cysteine and tyrosine residues. In particular, proteins regulated by S-nitrosylation, which is the reversible coupling of an NO moiety to a critical cysteine residue (forming an S-nitrosothiol), have been identified in *Arabidopsis*

thaliana. These include glycine decarboxylase [8], the glycolytic enzyme GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) [9,10], methionine adenosyltransferase 1 [11], metacaspase 9 [12], NPR1 [13], the salicylic-acid-binding protein 3 [14], peroxiredoxin II [15] and the transcription factor AtMYB2 [16]. These proteins are related to cell death, defence responses and metabolism. Depending on the protein, S-nitrosylation promotes or inhibits their activity.

Several studies have highlighted a role for protein kinases in conveying NO effects in plants. The bulk of the evidence for protein kinase regulation by NO has mainly relied on the ability of NO donors to trigger protein kinase activities in cell suspensions and/or tissues of various species [17]. Similarly, NO scavengers and inhibitors of NO synthesis were shown to impair the activation of protein kinases triggered by PAMPs [18], ABA (abscisic acid) [19], auxin [20] and sorbitol-induced hyperosmotic stress [21]. These protein kinases exhibited MAPK (mitogen-activated protein kinase) or CDPK (Ca²⁺-dependent protein kinase) properties [22–24]. However, although the list of examples showing the involvement of protein kinases in mediating

Abbreviations used: ABA, abscisic acid; BiFC, bimolecular fluorescence complementation; BY-2, bright-yellow 2; CDPK, Ca²⁺-dependent protein kinase; cPTIO, carboxy PTIO; DEA/NO, diethylamine-NONOate; DMF, dimethylformamide; DTT, dithiothreitol; EGFP, enhanced green fluorescent protein; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione transferase; LC-ESI-MS-MS/MS, liquid chromatography-electrospray ionization MS with collisional fragmentation; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MBP, myelin basic protein; MMTS, methyl methanethiosulfonate; Ni-NTA, Ni²⁺-nitrilotriacetate; NtGAPC, *Nicotiana tabacum* cytosolic GAPDH; NtOSAK, *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; RT, reverse transcription; SIPK, salicylic-acid-induced protein kinase; SnRK, SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase.

¹ These authors contributed equally to the present study.

² Correspondence may be addressed to either of these authors (email dobrowol@bb.waw.pl or wendehen@dijon.inra.fr).

NO signalling in plants is increasing, only a few of them have been firmly identified. This includes the tobacco MAPK SIPK (salicylic-acid-induced protein kinase) [23,25] and the alfalfa p34^{cdc2} cyclin-dependent protein kinase [26].

Besides MAPK and CDPK, we recently investigated the possibility that NO also contributes to the activation of protein kinases belonging to the SnRK2 [SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinase 2]. Plant SnRKs include three subfamilies (SnRK1, SnRK2 and SnRK3), with the SnRK2 and SnRK3 subfamilies appearing to be specific to plants [27–29]. The SnRK2 protein kinases have been described as key components of water stress and ABA signalling and were shown to contribute to the adaptive responses to drought tolerance [30–34]. Work focused on several SnRK2 members has suggested that the activity of these protein kinases is regulated by phosphorylation [35–37]. Accordingly, Burza et al. [38] provided evidence that in tobacco BY-2 (bright-yellow 2) cells exposed to salt, the SnRK2 protein kinase NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase) is reversibly activated via the phosphorylation on two serine residues (Ser¹⁵⁴ and Ser¹⁵⁸) located in the kinase activation loop. We also demonstrated that the exposure of *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspensions to the NO donor DEA/NO (diethylamine-NONOate) led to rapid and transient activation of NtOSAK [21]. The NO-induced activation of NtOSAK appeared to be Ca²⁺-independent [25,39]. In further support of a key role for NO in the regulation of NtOSAK, we showed that NO, endogenously produced in *N. plumbaginifolia* cell suspensions exposed to a sorbitol-induced hyperosmotic stress, is required for the full activation of this SnRK2 protein kinase [21]. Taken together, these results suggest that SnRK2 protein kinases are NO signalling components.

In animals, NO modulates the activity of different classes of protein kinases including MAPKs, protein kinase C, Janus kinases and the tyrosine kinase Src, by direct chemical modification of the kinases themselves or by modulation of upstream factors such as small GTP-binding proteins or phosphatases [40–46]. Direct chemical modifications include S-nitrosylation and tyrosine nitration [4]. In plants, the process by which NO regulates the activity of protein kinases remains enigmatic. In the present study, using BY-2 cell suspensions, we attempted to provide a first insight into the mechanisms underlying this regulation by performing a detailed analysis of NtOSAK post-translational modifications mediated by NO endogenously produced in response to salt treatment or exogenously released by the NO donor DEA/NO. Our results have shown that, in response to NO, NtOSAK is not regulated by S-nitrosylation but via the phosphorylation of two residues located within the kinase activation loop, one being identified as Ser¹⁵⁸. Furthermore, we have identified a cellular partner of NtOSAK, the glycolytic enzyme GAPDH, and provided evidence that in BY-2 cells exposed to salt, GAPDH undergoes S-nitrosylation, but is not phosphorylated by NtOSAK. Functional analysis further indicated that GAPDH S-nitrosylation did not affect NtOSAK activation or the complex formation between both enzymes.

EXPERIMENTAL

Cell culture and treatments

BY-2 tobacco cells were cultured as described previously [38]. The cells were treated with NaCl (250 mM), cPTIO (carboxy PTIO; 500 μ M) or DEA/NO (50 μ M) for the time indicated, harvested by filtration, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysed. DEA/NO was prepared as described previously [21].

Immunoblotting

Western blot analysis was performed according to a standard procedure as described by Burza et al. [38]. An anti-NtOSAK-specific polyclonal antibody raised against the C-terminal peptide (KQVQQAHESGEVRLT) of the protein kinase, an anti-Ser¹⁵⁸(P) phospho-specific polyclonal antibody raised against the phosphopeptide K¹⁵⁷pSTVGT phosphorylated on residue Ser¹⁵⁸ and anti-GAPDH-specific polyclonal antibodies raised against the peptide CYDDIKAAIKEESEG of GAPDH were obtained from Biogenes. Proteins from crude extracts were separated on SDS/PAGE (10% gels) and transferred on to nitrocellulose by electroblotting using transfer buffer (25 mM Tris base and 192 mM glycine) overnight at 15 V. The membrane was blocked overnight at 4°C in TBST {TBS [Tris-buffered saline; 10 mM Tris/HCl (pH 7.5) and 100 mM NaCl] containing 0.1% Tween 20} buffer containing 2% (w/v) BSA, and then incubated for 1 h in TBST with the primary antibodies at a dilution of 1:1000. In the case of blots probed with the anti-Ser¹⁵⁸(P) antibodies, in order to block non-specific binding, the membranes were incubated with 5% (w/v) BSA and 5% (w/v) skimmed milk powder in TBST overnight at room temperature (20°C), and then for 2 h in the same solution with the antibodies at a 1:500 dilution at room temperature and then overnight at 4°C. After removing unbound antibodies by extensive washing (five times, 5 min each) with TBST, the blots were incubated for 1 h with alkaline-phosphatase-conjugated secondary antibodies (anti-rabbit from Sigma) at a 1:5000 dilution, or with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad; at a 1:50 000 dilution). After washing (five times, 5 min each) with TBST, immunoreactive proteins were visualized using BCIP (5-bromo-4-chloroindol-3-yl phosphate)/NBT (Nitro Blue Tetrazolium) colour development substrate (Promega) or LumiGLO[®] reagent (Cell Signaling Technology) respectively.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was performed as described previously [39] with some minor changes. Proteins from BY-2 crude extracts (4 mg) were incubated with an anti-NtOSAK antibody (120 μ g) in immunoprecipitation buffer [20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM 2-glycerophosphate, 100 μ M sodium orthovanadate, 2 mM DTT (dithiothreitol), 500 μ M PMSF, 1 μ M pepstatin, 1 μ M leupeptin, 1 μ M aprotinin, 1% Triton X-100 and 150 mM NaCl] at 4°C for 4 h on a rocker. Approx. 50 μ l of packed volume of Protein A-agarose (Santa Cruz Biotechnology) was added, and the incubation was continued for a further 2 h. Agarose bead-protein complexes were pelleted by brief centrifugation and washed three times with immunoprecipitation buffer and two times with the following buffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM 2-glycerophosphate, 100 μ M sodium orthovanadate, 2 mM DTT, 500 μ M PMSF, 1 μ M pepstatin, 1 μ M leupeptin and 1 μ M aprotinin. After washing, the immunocomplexes were divided into two pools at a ratio of 1:10. The smaller portion was used directly for the immunocomplex kinase activity assay, whereas the major part was used for determination of phosphorylation sites by MS. In parallel, cell extracts were analysed by immunoblotting with anti-Ser¹⁵⁸(P) antibodies.

Immunocomplex kinase activity assay

Sample buffer (50 μ l) was added to the pelleted agarose bead-protein complex after immunoprecipitation, and the sample

was heated at 95°C for 3 min. After brief centrifugation, the supernatant was analysed by an in-gel kinase activity assay.

In-gel kinase activity assays

In-gel kinase activity assays were performed using a method described previously [47]. Protein samples were electrophoresed on SDS/PAGE (10% gels) with 0.5 mg/ml MBP (myelin basic protein) embedded in the separating gel as a substrate for the kinase. After electrophoresis, SDS was removed by washing the gel with washing buffer [25 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM sodium fluoride, 0.5 mg/ml BSA, 0.1% Triton X-100, 0.5 mM DTT and 0.1 mM sodium orthovanadate] three times each for 30 min at room temperature. Next, proteins were renatured overnight in renaturing buffer [25 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM sodium fluoride, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT and 0.1 mM sodium orthovanadate] at 4°C with three changes of buffer. The gel was then incubated for 1.5 h at room temperature in 10 ml of reaction buffer {10 mM Tris/HCl (pH 7.5), 2 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 15 mM MgCl₂ and 20 μM ATP, supplemented with 50 μCi of [γ -³²P]ATP}. Unincorporated [γ -³²P]ATP was removed by extensive washing of the gels in 5% trichloroacetic acid with 1% sodium phosphate. Finally, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R250, dried and exposed to X-ray film.

Staining of NtOSAK with Pro-Q Diamond

Staining was performed as described previously [38].

MS

Protein samples were analysed by LC-ESI-MS-MS/MS (liquid chromatography-electrospray ionization MS with collisional fragmentation) as described previously [38].

Biotin-switch assay

The biotin-switch technique was performed according to a procedure described by Sell et al. [48] with some minor changes. After treatment, cells (0.25 g) were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and ground in a mortar. Samples were mixed with 800 μl of HEN buffer [25 mM Hepes/NaOH (pH 7.7), 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 2 mM PMSF, 10 μM antipain and 10 μM leupeptin] containing 0.5% Chaps and freshly prepared MMTS [methyl methanethiosulfonate; 2 M in DMF (dimethylformamide)] added to a final concentration of 5 mM. The mixture obtained was centrifuged at 15 000 g for 20 min and the corresponding proteins were quantified. Then, 5 mg of the protein was adjusted to 0.8 μg/μl HEN buffer followed by the addition of freshly prepared MMTS (2 M in DMF) and SDS [25% (v/v)] to final concentrations of 20 mM and 2.5% respectively. Following frequent vortex mixing at 50°C for 20 min, proteins were precipitated with 3 vol. of acetone at -20°C for 20 min. The proteins were recovered by centrifugation at 3200 g for 12 min, followed by gentle rinsing of the pellet four times with 1 ml of acetone. The pellets were then suspended in 10 μl of HENS (HEN buffer containing 1% SDS) per 100 μg of starting material of proteins. The samples were divided into two equal pools and were mixed with 1 mM biotin-HPDP {N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide; Thermo Scientific; dissolved in DMF} and 1 mM ascorbate in HEN buffer. For the control samples, appropriate volumes of DMF and ascorbate were added. Labelling reactions were performed in the

dark at room temperature for 1 h. Next, the labelling reaction was acetone-precipitated overnight at -20°C. The washed pellet was resuspended in 240 μl of HENS buffer, followed by the addition of 750 μl of neutralization buffer [20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and 0.5% Triton X-100 (pH 7.7)]. This material was incubated for 1.5 h with 150 μl of 50% neutravidin-agarose slurry (previously equilibrated in neutralization buffer). The beads were washed four times with 750 μl of wash buffer (neutralization buffer supplemented with 500 mM NaCl). The beads were eluted with 70–90 μl of 2×Laemmli buffer with 100 mM DTT. The eluted mixture was then analysed by SDS/PAGE, followed by immunoblotting with anti-NtOSAK (1:1000) or anti-GAPDH (1:1000) antibodies.

Measurement of GAPDH activity

The activity of GAPDH was determined according to a method described by Lindermayr et al. [10] with slight modifications. Crude extracts of BY-2 cell suspension cultures [300 mg of protein in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5)] were incubated with 4 mM arsenate and 100 μg/ml 3-phosphoglycerinaldehyde and were adjusted to 1900 μl with 50 mM Tris/HCl (pH 7.5). The reaction was performed at 30°C and initiated by adding 100 μl of 100 mM NAD⁺. The reduction of NAD⁺ to NADH was monitored by spectrophotometry at 340 nm. For *in vitro* inhibition assays, protein extracts were incubated before initiation of the reaction with different concentrations of DEA/NO at room temperature for 2 min.

Cloning of cDNAs encoding NtGAPCa and NtGAPCb

cDNAs encoding NtGAPCa and NtGAPCb (*N. tabacum* cytosolic GAPDH a and b respectively) were obtained by RT (reverse transcription)-PCR with total RNA isolated from 3-week-old *N. tabacum* (LA Burley 21 line) plants. RNA was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized using 5 μg of total RNA as a template with the Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma-Aldrich). The cDNA was used for PCR amplification of NtGAPCa and NtGAPCb with primer pairs (listed in Supplementary Table S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/429/bj4290073add.htm>) designed based on nucleotide sequences available in databases. PCR products were cloned into pCR II-TOPO vector (Invitrogen) and verified by DNA sequencing.

Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*

Expression and purification of GST (glutathione transferase)-NtOSAK was performed as described previously [38]. Full-length cDNAs encoding NtGAPCa and NtGAPCb were PCR-amplified using the appropriate primers listed in Supplementary Table S1 and EcoRI/SalI fragments of NtGAPCa and EcoRI/XhoI of NtGAPCb were cloned into the expression vector pET-28A (Novagen).

All PCRs were performed using a high-fidelity Pfu DNA polymerase (Stratagene) and verified by sequencing. Recombinant proteins were expressed overnight in *E. coli* BL21(DE3) cells at 18°C and purified using glutathione-agarose beads (Sigma-Aldrich) as described previously [38] or Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetate)-agarose beads (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

In vitro binding assay

Purified recombinant NtOSAK (5 μ g) without a GST tag (the GST epitope was cleaved off with thrombin) was mixed with a similar amount of His₆-NpGAPC1 or His₆-NpGAPC2 attached to Ni-NTA-agarose beads (Qiagen), or as a control to Ni-NTA-agarose beads in binding buffer [50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 10 mM imidazole and 0.1 % Triton X-100]. After gentle rotation (overnight at 4°C) the beads were centrifuged (1 min at 1000 g) and washed six times with the binding buffer. Proteins attached to the resin were analysed by SDS/PAGE and then by Western blotting using anti-NtOSAK antibodies.

Protoplast transient expression assay and BiFC (bimolecular fluorescence complementation)

Protoplasts were isolated and transformed via PEG [poly(ethylene) glycol] treatment according to the protocol of He et al. [49] with minor modifications.

After transformation, *Arabidopsis thaliana* T87 protoplasts were suspended in WI incubation solution [0.5 M mannitol, 4 mM Mes (pH 5.7) and 20 mM KCl] and incubated at 25°C in the dark for 2 days.

cDNAs encoding NtOSAK, NtGAPCa, NtGAPCb, NtGAPCa(C157S,C161S) and NtGAPCb(C154S,C158S) were PCR-amplified using Pfu DNA polymerase (the primers used are listed in Supplementary Table S1), cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen) and verified by DNA sequencing. For analysis of the effect of NtGAPCs (wild-type and mutated forms) on NtOSAK activity, the XhoI/EcoRI fragment of cDNA encoding NtOSAK and XhoI/BamHI fragments of cDNAs encoding NtGAPCa, NtGAPCb, NtGAPCa(C157S,C161S) or NtGAPCb(C154S,C158S) were inserted into pSAT6-EGFP-C1. For BiFC, the cDNA encoding NtOSAK was inserted into pSAT4-nEYFP-C1 and the cDNA fragments for NtGAPCs into pSAT4-cEYFP-C1-B. The vectors were provided by Dr T. Tzfira (University of Michigan, Ann Arbor, MI, U.S.A.).

In each transformation approx. 2×10^5 protoplasts were transfected with approx. 40 μ g of plasmid DNA; for BiFC experiments the plasmids were mixed in a 1:1 (w/w) ratio. The transfected protoplasts after incubation in the dark for 2 days were subjected to 250 mM NaCl treatment. In control experiments, water instead of NaCl was added to the transfected protoplasts. Protoplasts were carefully placed on to slides with home-made chambers preventing damage and drying. Fluorescent images was visualized with the Nikon EZ-C1 laser-scanning microscope, equipped with a 60 \times [NA (numerical aperture) 1.4] PlanApo oil-immersion objective mounted on an inverted epifluorescence microscope TE 2000E. The fluorescence of EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) was excited with blue light at 488 nm emitted by a 40 mW argon-ion laser (Melles Griot). EYFP fluorescence was detected with a 535/30 nm band-pass filter and rendered in false green. Nuclei were stained with 0.3 mM Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen) and excited with the 408 nm line from an MOD diode laser (Melles Griot). Hoechst fluorescence was detected with a 450/35 nm band-pass filter and rendered in false blue. Fluorescent images are single optical sections made with the standard EZ-C1 Nikon software. Brightness and contrast were adjusted with the Adobe Photoshop 6.0 program.

Site-directed mutagenesis

pSAT6-EGFP-NtGAPCa and pSAT6-EGFP-NtGAPCb constructs were used as a template for site-directed mutagenesis with the QuikChange[®] II site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

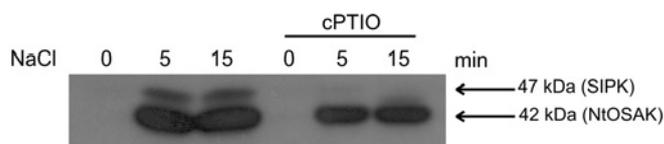


Figure 1 NO contributes to the activation of NtOSAK and SIPK induced in response to salt

cPTIO (500 μ M) was added to BY-2 cell suspensions 10 min prior to salt (250 mM NaCl). Aliquots of the culture were taken at the times indicated and analysed for protein kinase activity by in-gel kinase assay with MBP as substrate. Results shown are one from five representative experiments.

The primers used for substitution of Cys¹⁵⁷ and Cys¹⁶¹ in NtGAPCa and Cys¹⁵⁴ and Cys¹⁵⁸ in NtGAPCb are listed in Supplementary Table S1. The constructs obtained were sequenced to verify the mutations introduced.

RESULTS

NO contributes to NaCl-induced NtOSAK activation

Protein kinase activities were assessed by in-gel kinase assays using MBP as a substrate. Exposure of BY-2 cells to 250 mM NaCl resulted in the rapid activation of two protein kinases with apparent molecular masses of 47 and 42 kDa previously identified as SIPK and NtOSAK respectively (Figure 1) [50]. To investigate the involvement of NO in mediating NaCl-induced SIPK and NtOSAK activation, cPTIO, an NO scavenger, was used. This compound has been shown to suppress the fast production of NO triggered by salt both in tobacco cell suspensions and plant tissues [51]. Pre-treatment of BY-2 cells with cPTIO affected the salt-induced activation of SIPK and NtOSAK: SIPK activation was almost completely suppressed, whereas NtOSAK activity was reduced by approx. 50%. As previously reported [21,25], the ability of NO to promote NtOSAK activation was confirmed by the demonstration that treatment of BY-2 cells with 50 μ M of the NO donor DEA/NO promotes its transient activation within 30 min (Figure 2A). In contrast, SIPK activation by DEA/NO was detected only at millimolar concentrations of DEA/NO (results not shown; [25]). Taken together, these results indicate that the activation of NtOSAK triggered by salt depends, at least partially, on NO production. This result fits well with our previous study [21] showing that NO produced in response to sorbitol-induced hyperosmotic stress acts upstream of NtOSAK.

NO regulates NtOSAK by phosphorylation on residues Ser¹⁵⁴ and Ser¹⁵⁸, but not via S-nitrosylation

To decipher the mechanisms underlying NtOSAK activation by NO, we analysed its phosphorylation state in tobacco cells exposed to 50 μ M DEA/NO for 30 min. For this purpose, proteins extracted from DEA/NO or salt-treated cells were immunoprecipitated with a specific anti-NtOSAK polyclonal antibody and the resulting immunocomplexes were analysed by an in-gel kinase assay (Figure 2A) and stained with the Pro-Q Diamond stain (Figure 2B) which recognizes phosphorylated serine, tyrosine and threonine residues. As shown in Figure 2(B), NtOSAK displays phosphorylation in BY-2 cells exposed to salt in accordance with previous results [38], but also in response to DEA/NO. The phosphorylation of NtOSAK was well correlated with its protein kinase activity (Figure 2A).

We next mapped the NtOSAK amino acid residues undergoing phosphorylation in tobacco cells exposed to DEA/NO. Particular

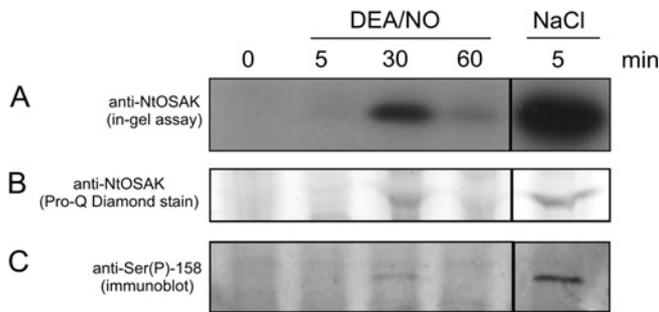


Figure 2 NO induces NtOSAK phosphorylation

(A) DEA/NO triggers NtOSAK activation in BY-2 cell suspensions. Cell suspensions were treated with DEA/NO (50 μ M) for the time indicated or with NaCl (250 mM) for 5 min as a positive control. Protein extracts were immunoprecipitated with anti-NtOSAK antibodies. The resulting immunocomplexes were analysed by in-gel kinase assay with MBP as a substrate. Results shown are one from five representative experiments. (B) The immunocomplexes obtained in (A) were subjected to SDS/PAGE. Phosphorylation of NtOSAK was determined by Pro-Q Diamond stain. Results shown are one from three representative experiments. (C) Analysis of NtOSAK phosphorylation on residue Ser¹⁵⁸. Crude extracts from BY-2 cells treated with DEA/NO (50 μ M) for 60 min or NaCl (250 mM) for 5 min were subjected to Western blot analysis and probed with anti-Ser¹⁵⁸(P) antibodies. Results shown are one from three representative experiments.

attention was paid to residues Ser¹⁵⁴ and Ser¹⁵⁸ as active NtOSAK, isolated from NaCl-treated BY-2 cells, was shown to be phosphorylated on those residues [38]. First, protein extracts from DEA/NO or NaCl-treated BY-2 cells were subjected to Western blot analysis and probed with the phospho-specific antibody anti-Ser¹⁵⁸(P). This antibody, raised against the phosphorylated peptide K¹⁵⁷pSTVGT, specifically reacts with NtOSAK phosphorylated on Ser¹⁵⁸ [38]. As expected, immunostaining revealed one band in the protein extracts corresponding to phosphorylated NtOSAK present in NaCl-treated cells (Figure 2C). Of interest, the antibodies recognized the phosphopeptide also in the protein extracts from cells exposed to DEA/NO for 30 min, indicating that NtOSAK is phosphorylated on Ser¹⁵⁸ in response to NO. Secondly, in order to check whether NO promotes the phosphorylation of Ser¹⁵⁴, NtOSAK was immunoprecipitated from BY-2 cells untreated or treated with DEA/NO for 30 min according to the procedure described by Burza et al. [38], and subjected to SDS/PAGE. Then the protein was excised from the gel and the corresponding tryptic fragments were analysed by LC-ESI-MS-MS/MS. In the samples corresponding to DEA/NO-treated cells, the MS analysis revealed the presence of two peptides (residues 149–157 and residues 158–173; Table 1) containing Ser¹⁵⁴ and Ser¹⁵⁸ respectively, and showing an *m/z* value increased by 40 as compared with the *m/z* values measured in the control samples. This difference in the *m/z* value, expected for doubly charged phosphorylated species, corresponds to a difference of 80 Da and highlights the presence of a phosphorylated residue in both peptides. Therefore, based on the immunoblot assay (Figure 2C) and the findings of Burza et al. [38] showing that NtOSAK is phosphorylated on Ser¹⁵⁸ and Ser¹⁵⁴ in response to salt treatment, our MS result strongly suggests that NO up-regulates NtOSAK activity by promoting the phosphorylation on both serine residues.

We also considered the possibility that NO might regulate NtOSAK through S-nitrosylation. To verify this assumption, NtOSAK putative S-nitrosylation was surveyed by the biotin-switch assay [52] after treatment of BY-2 cells with the NO donor DEA-NO or NaCl for various times (up to 1 h). In a first step, protein extracts were treated with MMTS in order to chemically block all free thiol groups without modifying nitrosothiols or disulfides. In a second step, nitrosothiols, but not disulfides, were reduced to free thiol groups by ascorbate. This step was

Table 1 Mass spectrometric identification of NtOSAK phosphorylation peptides

BY-2 cell suspensions were treated with DEA/NO (50 μ M) for 30 min. Protein extracts were immunoprecipitated with anti-NtOSAK antibodies and separated by SDS/PAGE. Coomassie-Blue-stained protein bands were excised from the gel and analysed by LS-MS-MS/MS after in-gel digestion with trypsin. Protein sequence database searches were carried out by MASCOT (<http://www.MatrixScience.com>). MS/MS fragmentation ion scores (ion scores) indicate the presence or absence of a phosphorylated and unphosphorylated form of the peptide containing Ser¹⁵⁴ and Ser¹⁵⁸ (in bold where phosphorylated) in NtOSAK. For each peptide signal its *m/z* and charge is given. Results are one from three representative experiments. – indicates lack of the phosphorylated form of the peptide.

Peptides	Control ion score (<i>m/z</i> , charge)	DEA/NO treatment ion score (<i>m/z</i> , charge)
Phosphorylated peptides: sequence		
S ¹⁴⁹ LLH S RPK ¹⁵⁷	–	33 (552.77, 2+)
S ¹⁵⁸ TVGTPYIA P EVL S LR ¹⁷³	–	34 (870.93, 2+)
Unphosphorylated peptides: sequence		
S ¹⁴⁹ LLH S RPK ¹⁵⁷	42 (512.79, 2+)	40 (512.79, 2+)
S ¹⁵⁸ TVGTPYIA P EVL S LR ¹⁷³	78 (830.94, 2+)	60 (830.94, 2+)

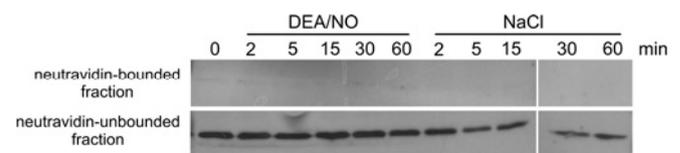


Figure 3 NtOSAK does not undergo S-nitrosylation

BY-2 cell suspensions were treated with DEA/NO (50 μ M) or with NaCl (250 mM) for the time indicated. The corresponding crude extracts were subjected to the biotin-switch assay. Biotinylated proteins were purified with neutravidin-agarose and eluted under reducing conditions. Biotinylated proteins and non-biotinylated proteins (that is, proteins that did not bind to neutravidin) were analysed by Western blotting using anti-NtOSAK antibodies. Results shown are one from three representative experiments.

followed by the biotinylation of the newly formed free thiols by biotin-HPDP. Next, the biotinylated proteins were concentrated by affinity purification with neutravidin-agarose, eluted under reducing conditions using a DTT-enriched buffer and then subjected to Western blot analysis using a specific anti-NtOSAK polyclonal antibody. As shown in Figure 3, immunostaining did not reveal the presence of NtOSAK in the samples corresponding to biotinylated proteins. In contrast, NtOSAK was clearly detected in the samples containing proteins that did not bind to neutravidin, that is those which were not biotinylated during the biotin-switch assay. The presence of NtOSAK in the samples corresponding to non-biotinylated proteins suggested that NtOSAK is not regulated by S-nitrosylation in response to salt or NO released by DEA/NO.

GAPDH is present in immunocomplex with NtOSAK and undergoes S-nitrosylation under salt treatment

To further explore NtOSAK regulation in the salt signalling pathway, a search for proteins which interact with NtOSAK was performed. For this purpose, we undertook the identification of proteins co-immunoprecipitating with NtOSAK in extracts prepared from BY-2 cells subjected to 250 mM NaCl for 5 min. Proteins pulled down together with NtOSAK in the immunocomplex or pre-immune serum (negative control) were separated by SDS/PAGE and the Coomassie-Blue-stained protein bands were excised from the gel (Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/429/bj4290073add.htm>). After in-gel digestion with trypsin, the corresponding peptides were analysed by ESI-MS-MS/MS and identified using the

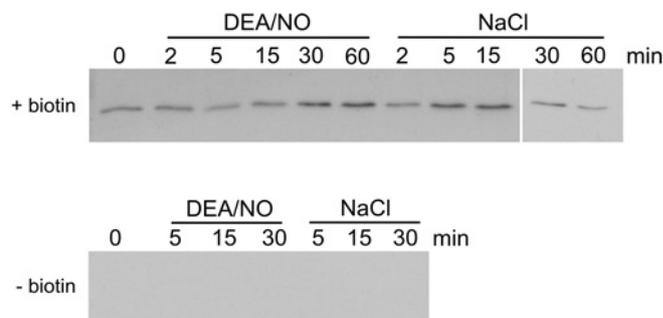
Table 2 Identification of proteins co-immunoprecipitating with NtOSAK in BY-2 cells exposed to salt

Cell suspensions were treated with NaCl (250 mM) for 5 min. Protein extracts were immunoprecipitated with anti-NtOSAK antibodies or pre-immune serum as a control. Proteins present in the immunocomplex were separated by SDS/PAGE. Coomassie-Blue-stained protein bands were excised from the gel and analysed by ESI-MS-MS/MS after in-gel digestion with trypsin. Results were used to search the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database using the MASCOT search engine (<http://www.MatrixScience.com>) under the taxon restriction of Viridiplantae. The Table shows a list of proteins selectively co-immunoprecipitated with NtOSAK, but not with the pre-immune serum, in response to NaCl treatment. *Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits; **number of peptides sequenced *de novo* found to be derived from a given protein; ***band numbers correspond to Supplementary Figure S1 (at <http://www.BiochemJ.org/bj/429/bj4290073add.htm>). Results are one from three representative experiments.

Accession number	Name	Protein score*	Queries matched**	Band number***
gi 19568098	OSAK	921	26	1
gi 120676	GAPDH	325	12	3
gi 1419092	Glutamine synthetase (cytosolic)	299	12	2
gi 3021506	Isocitrate dehydrogenase (NAD+)	177	9	2
gi 40036995	β -Tubulin	130	8	1
gi 78191448	ADP/ATP translocator-like	122	6	1
gi 50058115	Actin	84	4	2

MASCOT search engine. The list of proteins selectively co-immunoprecipitated with NtOSAK, but not with the pre-immune serum, as well as their functional classification, is shown in Table 2. These proteins are related to N/C (nitrogen and carbon) metabolism, cellular architecture, protein synthesis and degradation, and ATP metabolism.

Interestingly, one of the potential partners of NtOSAK showing the highest score corresponds to the glycolytic enzyme GAPDH. In animals, NO was shown to elicit S-nitrosylation of GAPDH under several physiological contexts, including apoptosis [53,54]. In *A. thaliana*, Lindermayr et al. [10] demonstrated that GAPDH is S-nitrosylated *in vitro* by artificially released NO, this process leading to a reversible inhibition of the enzyme activity. Based on these results, we monitored the influence of NO on GAPDH by analysing its S-nitrosylation profile in BY2 cells exposed to salt or DEA/NO for up to 1 h. For this purpose, proteins extracted at different time points during both treatments were subjected to the biotin-switch assay. The resulting biotinylated proteins were purified by affinity chromatography using neutravidin-agarose and then subjected to Western blot analysis using a specific anti-GAPDH polyclonal antibody. As a negative control, the same procedure was performed without adding biotin-HPDP. The immunoblots in Figure 4 show the presence of a band only in the samples in which biotin-HPDP was added during the biotin-switch assay. Therefore the detection of the immunoreactive bands in those samples did not reflect a constitutive and/or inducible endogenous biotinylation of GAPDH in response to salt or DEA/NO treatment, but highlighted the S-nitrosylation of the enzyme. More precisely, S-nitrosylated GAPDH was already detected at zero time, suggesting that the enzyme is constitutively S-nitrosylated in our culture conditions. In response to DEA/NO, the level of S-nitrosylation increased after 30 min, a time at which NtOSAK showed its highest activity in NO-treated cells (Figure 2A). In cells challenged by salt, the increase in GAPDH S-nitrosylation was maximal at 5–15 min and returned to the basal level within 30 min (see also Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/429/bj4290073add.htm> for quantification). Here too, the increase in the GAPDH S-nitrosylation level was well correlated with NtOSAK kinetic activity (Figure 1). Taken together, these results indicate that in BY-2 cells exposed to salt, GAPDH is present in immunocomplex with NtOSAK and the induction of NtOSAK protein kinase activity and GAPDH S-nitrosylation occur in the same lapse of time. However, it should be specified that only a small proportion of GAPDH appeared to be regulated by S-nitrosylation in response to salt as most of the enzyme was clearly detected

**Figure 4 Salt-stress induced GAPDH S-nitrosylation**

BY-2 cell suspensions were treated with DEA/NO (50 μ M) or with NaCl (250 mM) for the time indicated. The corresponding crude extracts were subjected to the biotin-switch assay. As a negative control, the biotin-switch assay was performed without adding the sodium ascorbate. Biotinylated proteins were then purified with neutravidin-agarose, eluted under reducing conditions and analysed by Western blotting using anti-GAPDH antibodies. Results shown are one from three representative experiments.

in the non S-nitrosylated fraction (Supplementary Figure S3 at <http://www.BiochemJ.org/bj/429/bj4290073add.htm>).

GAPDH activity is not impaired in BY2 cells exposed to salt or DEA/NO

As stated above, it was previously reported that the exposure of crude extracts of *A. thaliana* cell cultures to NO donors leads to the inhibition of GAPDH activity through direct S-nitrosylation [10]. Because GAPDH was found to be transiently S-nitrosylated in BY2 cells exposed to salt or DEA/NO (Figure 4), we investigated whether these treatments could affect the activity of the enzyme. Therefore BY2 cell suspensions were exposed to NaCl or DEA/NO for various times, and the total GAPDH activity was determined. As shown in Figure 5(A), treatment of cell suspensions with salt or DEA/NO did not affect the total GAPDH activity. To complete these data, we next analysed GAPDH activity in BY2 cell crude extracts exposed to DEA/NO at room temperature. Similarly to the Lindermayr et al. [10] study, under these *in vitro* conditions, the NO donor reduced the GAPDH activity by 25% and 85% when used at 50 μ M or 500 μ M respectively (Figure 5B). Taken together, these results indicate that, whereas an inhibition of GAPDH activity by NO occurred *in vitro*, the activity of the enzyme was not impaired *in vivo* following the exposure of BY2 cells to salt or DEA/NO.

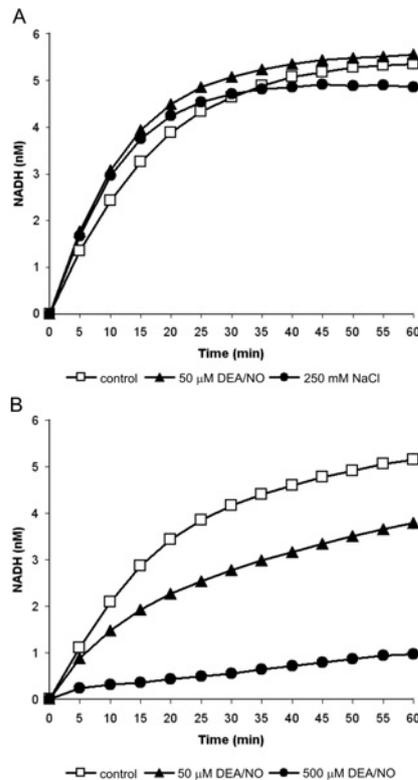


Figure 5 GAPDH activity is not inhibited in salt or DEA/NO treated cells

(A) *In vivo* activity. BY-2 cell suspensions were treated with DEA/NO (50 μM) for 30 min or with NaCl (250 mM) for 5 min. Then, GAPDH activity was measured by following the time course of NAD⁺ reduction to NADH by spectrophotometry at 340 nm (see the Experimental section). Results shown are one from three representative experiments. (B) *In vitro* activity. Proteins extracted from untreated BY-2 cells were exposed to NO artificially released by DEA/NO (50 or 500 μM) for 2 min and GAPDH activity was measured as specified in (A). Results shown are one from three representative experiments.

This suggests that the S-nitrosylation of GAPDH observed *in vivo* (Figure 4) had a negligible effect on the total GAPDH activity. This result seems plausible as only a small proportion of GAPDH undergoes S-nitrosylation under these conditions (Figure 4 and Supplementary Figure S3).

GAPDH interacts directly with NtOSAK

In order to establish whether GAPDH interacts directly or indirectly with NtOSAK, an *in vitro* pull-down assay was used. The *A. thaliana* genome encodes two cytosolic GAPDHs, GACP1 (At3g04120) and GACP2 (At1g13446). In the NCBI nucleotide database, two cDNA sequences for *N. tabacum* cytosolic GAPDHs were deposited [GenBank® accession numbers M14419 (partial cDNA sequence) and AJ133422]. We have cloned cDNAs encoding these GAPDHs (NtGAPCa and NtGAPCb) by RT-PCR using total RNA isolated from tobacco seedlings as a template and appropriate primers designed based on sequences available in nucleotide and EST (expressed sequence tag) databases. The sequences of the cDNA we cloned did not completely fit with those of M14419 and AJ133422 deposited in the NCBI database. The sequence identities between NtGAPCa and M14419, and between NtGAPCb and AJ133422 were approx. 99%. Analogous discrepancies were also observed for *A. thaliana* GACPs [9]. Most probably, these variations are due to ecotype-specific GAPDHs in plants.

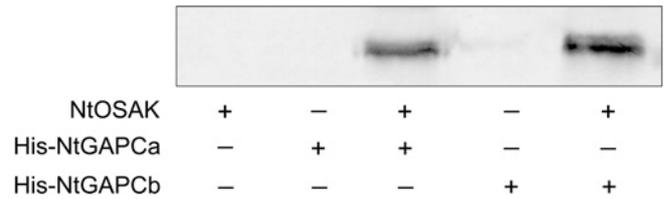


Figure 6 NtOSAK directly interacts with NtGAPCa and NtGAPCb

In vitro binding assay of His₆-NtGAPCa and His₆-NtGAPCb with NtOSAK. Ni-NTA-agarose with attached His₆-NtGAPCa or His₆-NtGAPCb was incubated with purified NtOSAK produced in *E. coli*, or as a control NtOSAK was incubated with Ni-NTA-agarose. In additional controls, NtOSAK was not added to His₆-NtGAPCa or His₆-NtGAPCb Ni-NTA-agarose. After washing, the presence of NtOSAK attached to the beads was analysed by Western blotting with anti-NtOSAK antibodies. Results shown are one from three representative experiments.

In order to produce the tobacco GAPDH proteins for a pull-down assay, the cloned cDNAs were introduced into the bacterial expression vector pET-28A and recombinant proteins His₆-NtGAPCa and His₆-NtGAPCb were produced in *E. coli*. NtOSAK was expressed in *E. coli* as a fusion protein with a GST tag, purified on glutathione-Sepharose beads, and the GST epitope was cleaved off with thrombin. The purified NtOSAK was incubated with His₆-NtGAPCa or His₆-NtGAPCb attached to Ni-NTA-agarose or with Ni-NTA-agarose beads, as a control. After incubation followed by extensive washing of the beads, the presence of NtOSAK bound to His₆-NtGAPCa or His₆-NtGAPCb or to free Ni-NTA-agarose (control) was analysed by SDS/PAGE and then by Western blotting using anti-NtOSAK antibodies (Figure 6). The results revealed that NtOSAK interacts directly with both NtGAPCs.

GAPDH interacts with NtOSAK *in planta*

To study the interaction between NtOSAK and GAPDH in plant cells we applied BiFC. Appropriate constructs for transient expression of NtOSAK and NtGAPCa or NtGAPCb fused to complementary non-fluorescent fragments of YFP (described in the Experimental section) were introduced into *A. thaliana* (T-87 cells) protoplasts. In the first approach, we have tried to transform tobacco BY-2 cells protoplasts for this purpose, however, in our hands this transformation was not efficient enough. Therefore we have chosen *A. thaliana* protoplasts for our studies. Interaction of the protein partners resulted in reconstruction of YFP and its fluorescence. For negative controls, each fusion protein was tested in the presence of the other half of YFP alone. We have observed NtOSAK-NtGAPCa and NtOSAK-NtGAPCb complex formation in protoplasts not treated and treated with 250 mM NaCl (Figure 7). In the absence of salt treatment, the NtOSAK-NtGAPCa complex formation occurred mainly in the cytoplasm and sporadically also in the nucleus, whereas the NtOSAK-NtGAPCb complex was localized more often to the nucleus (besides the cytoplasm), suggesting that both GAPDHs may have a different function in plant cells. The salt treatment did not change significantly the complex localization. Moreover, NtGAPCb very often formed aggregates (when expressed in protoplasts with or without NtOSAK). Aggregate formation is a well-known feature of GAPDH, which can play a role in oxidative stress-induced cell death [55].

We have also analysed the impact of NtGAPCa or NtGAPCb S-nitrosylation on their interaction with NtOSAK. It was shown previously that Cys¹⁵⁵ and Cys¹⁵⁹ of *A. thaliana* GACP1 and GACP2, corresponding to Cys¹⁵⁷ and Cys¹⁶¹ or Cys¹⁵⁴ and Cys¹⁵⁸ of tobacco NtGAPCa or NtGAPCb respectively,

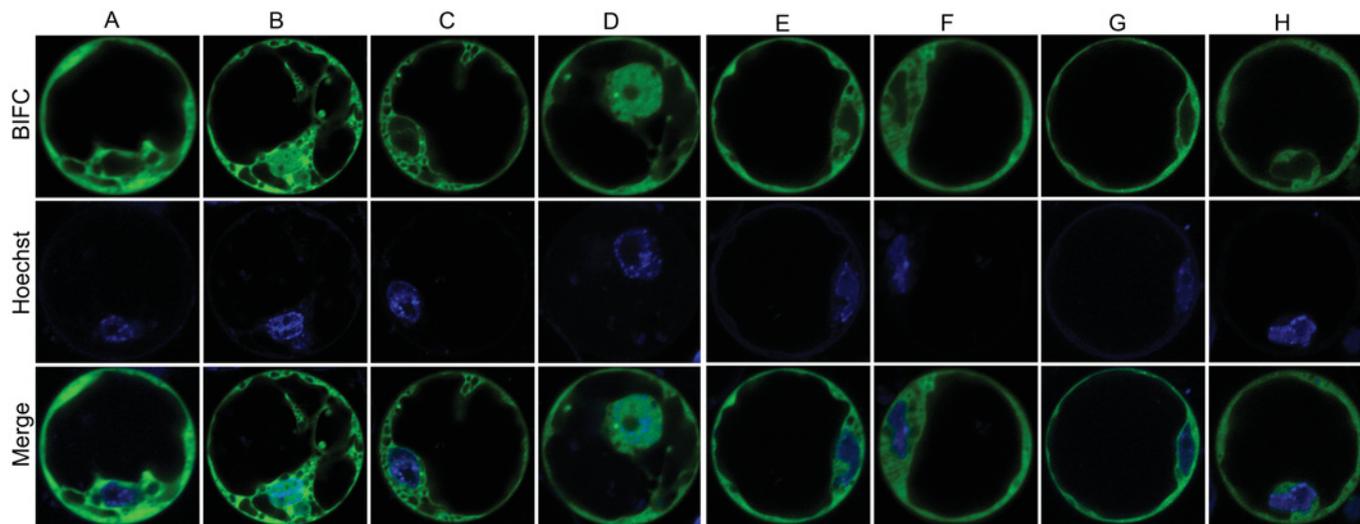


Figure 7 NtOSAK interacts with NtGAPCa and NtGAPCb *in planta*

NtOSAK interacts with NtGAPCa and NtGAPCb in *A. thaliana* T87 protoplasts, as shown by BIFC. The physical interaction of NtOSAK and NtGAPCa or NtGAPCb leads to reconstitution of the EYFP molecule. The EYFP signal was localized mainly to the cytoplasm in the case of complex formation between NtOSAK and NtGAPCa before (A) and after (C) 1 h of treatment with 250 mM NaCl. EYFP was localized to the cytoplasm and nucleus in the case of interaction between NtOSAK and NtGAPCb before (B) and after (D) 1 h of treatment with 250 mM NaCl. Interaction between NtOSAK and GAPCa(C157S,C161S) or GAPCb(C154S,C158S) in protoplasts not treated (E and F respectively) and treated with NaCl (G and H respectively) gave the BiFC signal restricted only to the cytoplasm. False green colour represents EYFP (BiFC). False blue colour represents stained nuclei (Hoechst). Merge, overlay of the EYFP and Hoechst signals. Results shown are one from several independent experiments showing similar results.

undergo glutathionylation and S-nitrosylation [9]. Therefore we replaced these cysteine residues in NtGAPCa and NtGAPCb with serine residues and used constructs with cDNA encoding NtGAPCa(C157S,C161S) or GAPCb(C154S,C158S) and NtOSAK fused to complementary fragments of YFP for/in BiFC analysis. Mutated GAPCs interacted with NtOSAK, exclusively in the cytoplasm (Figure 7), since NtGAPCa(C157S,C161S) and GAPCb(C154S,C158S) were not found in the nucleus.

Taken together, our results indicate that NtOSAK interacts with GAPDH in living plant cells and this interaction is independent of stress application and S-nitrosylation. However, the absence of the complexes between NtOSAK and the mutated forms of NtGAPCa and NtGAPCb from the nucleus suggests that the corresponding cysteine residues in the native forms of NtGAPCs might play an important role in the cellular localization of the proteins.

NtOSAK does not phosphorylate GAPDH *in vitro* and under our experimental conditions GAPDH does not influence NtOSAK activity

The interaction between NtOSAK and NtGAPCa or NtGAPCb indicates that GAPDH can be a substrate of NtOSAK and/or one of its regulators in plant cells. To determine whether tobacco GAPDH could be phosphorylated by NtOSAK, an *in vitro* phosphorylation reaction was performed using purified proteins (NtOSAK and His₆-NtGAPCa or His₆-NtGAPCb) expressed in *E. coli*. Additionally, as a source of the active kinase, we used NtOSAK purified from tobacco BY-2 cells, as has been described previously [39]. The phosphorylation reaction was conducted under standard phosphorylation conditions elaborated for this kinase [39]. Our results indicate that GAPDH is not phosphorylated by NtOSAK *in vitro* (results not shown).

To corroborate the possible role of the S-nitrosylation of GAPDH in NtOSAK activation in response to salinity stress, we expressed EGFP-NtOSAK (EGFP is enhanced green fluorescent protein) with EGFP-NtGAPCa or EGFP-GAPCb [wild-types

and their mutated forms, EGFP-NtGAPCa(C157S,C161S) or EGFP-GAPCb(C154S,C158S)] in *A. thaliana* protoplasts. At 2 days after transformation, protoplasts were treated with 250 mM NaCl and the activity of EGFP-NtOSAK expressed in protoplasts together with each of NtGAPCs (not mutated or mutated) or with EGFP (as control) was analysed. The kinase activity was monitored by an in-gel kinase activity assay using MBP as a substrate. In our experimental conditions we have not observed any significant changes of NtOSAK activity caused by the presence of NtGAPCs (wild-type or mutated forms) in plant protoplasts (Supplementary Figure S4 at <http://www.BiochemJ.org/bj/429/bj4290073add.htm>). However, it has to be stressed that in protoplasts the level of endogenous native GAPDH, was very high in most experiments, even higher than transiently expressed EGFP-NtGAPCa or EGFP-GAPCb (Supplementary Figure S4). Therefore the effect of artificially introduced NtGAPCs on NtOSAK activity is extremely difficult to estimate. Additionally, GAPDH exists in oligomeric forms; in the protoplasts analysed most probably the native *A. thaliana* GAPC1 or GAPC2 can form oligomers with expressed EGFP-NtGAPCs, and this makes the analysis even more complicated. In our experimental conditions we are simply unable to establish the role of GAPDH and its S-nitrosylation in NtOSAK signalling in response to salinity stress.

DISCUSSION

In previous studies, we have reported that NO promotes the activation of the SnRK2 protein kinase NtOSAK in tobacco cell suspensions subjected to a hyperosmotic stress triggered by sorbitol [21]. In the present study, we confirmed the key role of NO in regulating NtOSAK activity *in vivo* by showing that it also contributes to NtOSAK activation in BY-2 cells exposed to salt stress. The functional relationship between NO and NtOSAK is further strengthened by the demonstration that the protein

kinase is transiently activated in response to NO artificially released by the NO donor DEA/NO (the present study and [21,25]). The observation that the NO scavenger cPTIO partly, but not completely, suppressed the salt-induced NtOSAK activation suggests that the up-regulation of the protein kinase may occur through both NO-dependent and NO-independent pathways. It is also plausible that the partial inhibition of NtOSAK might be related to the inability of cPTIO to fully scavenge NO produced in response to salt. Supporting this assumption, Gould et al. [51] reported that the scavenging efficiency of cPTIO varies according to the abiotic stress applied to plant cell suspensions. Notably, these authors observed that in tobacco cell suspensions, the addition of 250 mM of NaCl in the extracellular medium reduced by 40 % the efficiency of cPTIO to scavenge NO released by the NO donor NOC-9. The mechanism underlying this observation remains to be investigated.

Previous studies have indicated that members of the SnRK2 subfamily including NtOSAK are activated by phosphorylation [35,38,50,56]. Accordingly, we found that the activation of NtOSAK observed in BY-2 cells exposed to DEA/NO is correlated with an increase in its phosphorylation status. Furthermore, MS analysis of NtOSAK purified from DEA/NO-treated cells revealed the presence of two phosphopeptides (S¹⁴⁹SLLHSRPK¹⁵⁷; S¹⁵⁸TVGTPAYIAPEVLSR¹⁷³) containing Ser¹⁵⁴ and Ser¹⁵⁸ respectively. Those residues are localized in the kinase activation loop (residues 143–169) and were previously identified as two key phosphorylation sites in active NtOSAK [38]. The NO-induced phosphorylation of Ser¹⁵⁸ was further confirmed by its visualization by Western blotting with anti-Ser¹⁵⁸(P) antibodies. Taken together, these results establish that in response to the NO donor, NtOSAK undergoes phosphorylation on Ser¹⁵⁸ and on a second serine residue localized within the peptide S¹⁴⁹SLLHSRPK¹⁵⁷ and which might correspond to Ser¹⁵⁴. Therefore the mechanisms by which NO activates NtOSAK resembles those observed in response to salt. This finding clearly reinforces the notion that NO is a key mediator of NtOSAK activation.

Beside phosphorylation, we also monitored whether NtOSAK could be regulated by S-nitrosylation. In animals, S-nitrosylation has been shown to have an impact on the activity of several protein kinases, including, for instance, Janus kinases and the apoptosis signalling kinase 1 [54]. It was therefore plausible that the S-nitrosylation of NtOSAK could promote conformational changes favouring its phosphorylation by an upstream kinase. Our finding indicates that in BY-2 cells exposed to salt or DEA/NO, NtOSAK did not undergo S-nitrosylation. Accordingly, in preliminary *in vitro* S-nitrosylation assays, we were not able to find NtOSAK among the S-nitrosylated proteins identified from BY-2 cell protein extracts exposed to the S-nitrosylating agent GSNO (S-nitrosoglutathione; results not shown). Therefore NtOSAK might not be regulated by direct S-nitrosylation of critical cysteine residue(s).

There are mounting data indicating that SnRKs link metabolism and stress signalling in plants [28]. Studies in rice and *A. thaliana* showed that ABF (ABA-response-element-binding factor) transcription factors, as well as proteins related to energy metabolism, are targets for SnRK2 protein kinases [57–59]. Accordingly, we found that NtOSAK co-immunoprecipitated with proteins primarily involved in N/C metabolism, and ATP synthesis and transport. The other interacting proteins include the elongation factor-1 α that binds aminoacyl-tRNAs to the acceptor site of ribosomes during peptide chain elongation [60], the 26S proteasome subunit 4-like and proteins related to the cytoskeleton. The possibility that elongation factors represent SnRK2-interacting proteins has been previously reported by Shin

et al. [59] who identified several phosphorylated targets of the *A. thaliana* SnRK2.8 protein kinase.

Among the NtOSAK-interacting proteins, we preferentially focused our attention on GAPDH. Several arguments supported this choice. First, in animals, besides its glycolytic activity, GAPDH participates in several cellular events including gene transcription, RNA transport and DNA replication [61]. This multifunctional protein has been reported to be inhibited by S-nitrosylation of a conserved catalytic cysteine residue, both *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, Hara et al. [53] reported that in macrophages exposed to endotoxin, as well as in neurons elicited by glutamate, the S-nitrosylation of GAPDH causes structural changes allowing GAPDH to interact with the E3 ubiquitin ligase Siah1. The complex is then translocated into the nucleus where Siah1 promotes cell death through the ubiquitin-mediated degradation of nuclear target proteins. Secondly, in *A. thaliana*, GAPDH from cell culture crude extracts as well as its recombinant purified cytosolic isoform were shown to be *in vitro* S-nitrosylated by the NO donors GSNO and sodium nitroprusside [9,10]. In those studies, S-nitrosylation led to the inhibition of its enzymatic activity. Finally, in various organisms, including plants, GAPDH was identified as a direct target of H₂O₂ [62,63]. Mechanistically, H₂O₂ triggers the inhibition of GAPDH through the oxidation of the catalytic cysteine residue also prone to S-nitrosylation. In yeast, the H₂O₂-induced oxidation of GAPDH was shown to promote its interaction with the response regulator Mcs4 which, in turn, activates the Spc1 MAPK cascade [63]. Taken together, these results indicate that GAPDH has roles outside of that of glycolysis, and modulates cellular signalling pathways once S-nitrosylated or oxidized on a critical cysteine residue.

Based on these studies, we investigated the degree of S-nitrosylation of GAPDH in salt-treated BY-2 cells and found that it undergoes an increased and transient S-nitrosylation. The kinetics of GAPDH S-nitrosylation in response to salt or DEA/NO was well correlated with the kinetics of NtOSAK activation, suggesting that the physical association between both proteins might have been related to their respective S-nitrosylated and phosphorylated status. However, our studies have not confirmed this hypothesis. The complex formation analysis *in planta* indicate that the proteins interact with each other before and after stress application, and their interaction does not depend on S-nitrosylation of GAPDH. The increased S-nitrosylation of GAPDH cells exposed to salt or DEA/NO was not accompanied by a reduction of the total GAPDH enzymatic activity. This observation resembles the situation encountered in stimulated macrophages in which only a small proportion of GAPDH is S-nitrosylated with a negligible effect on overall cellular glycolysis [53,64]. Consistently, after applying the biotin-switch assay to proteins extracted from salt and DEA/NO-treated BY-2 cells, GAPDH was also strongly detected in the samples corresponding to proteins that did not bind to neutravidin (Supplementary Figure S2).

In mammals the activity of GAPDH can be modulated by phosphorylation [65]. Therefore we have considered that in response to salinity stress, GAPDH can be regulated by phosphorylation catalysed by NtOSAK. However, we were unable to detect phosphorylation of tobacco GAPDH by NtOSAK (*in vitro* studies). Moreover, our MS data also did not show any phosphorylated peptides of GAPDH isolated from tobacco cells. To establish a possible role of GAPDH in NtOSAK signalling, we expressed NtOSAK in *A. thaliana* protoplasts together with tobacco GAPDH and monitored NtOSAK activity after salt stress application. Two different cytosolic GAPDHs were tested, that is wild-type and mutated forms in which the cysteine residues undergoing S-nitrosylation were replaced with serine residues. We did not observe any significant differences in

the kinase activity due to GAPDH overexpression, suggesting that the S-nitrosylation state of GAPDH does not influence NtOSAK activity. These results do not exclude the possibility that interaction with GAPDH and its additional S-nitrosylation in response to salinity can influence NtOSAK substrate specificity and/or interaction with other NtOSAK signalling components.

In conclusion, the present study provides the first description of the mechanisms underlying NO-induced activation of protein kinases in a physiological context in plants. The finding that GAPDH associates with NtOSAK and following exposure to salt undergoes an increased S-nitrosylation suggests that, besides its glycolytic activity, GAPDH might act as a component of a signalling cascade involving phosphorylation-dependent events. Work is ongoing to address these issues.

AUTHOR CONTRIBUTION

Izabella Wawer was involved in the analysis of the NO-dependence of NtOSAK and GAPDH S-nitrosylation, identification of NtOSAK serine residues undergoing phosphorylation, immunoprecipitation assays and identification of GAPDH as the NtOSAK partner. Maria Bucholc was involved in cloning of NtGAPCa and NtGAPCb, preparation of the constructs for expression of NtOSAK and GAPDHs in the bacterial system and in plant protoplasts, site-directed mutagenesis of NtGAPCa and NtGAPCb and *in vitro* binding assays. Jeremy Astier was involved in setting up of the biotin-switch assay. Anna Anielska-Mazur was involved in confocal microscopy analysis. Jennifer Dahan helped in the measurement of NtOSAK activity. Anna Kulik analysed the influence of GAPDHs on NtOSAK activity, and measured NtOSAK activity in plant protoplasts transformed with NtOSAK and NtGAPCa or NtGAPCb. Aleksandra Wystubuch-Cieszynska and Monika Zarba-Kozioł helped with the biotin-switch assay and with analysis of protein S-nitrosylation. Ewa Krzywinska was involved in the expression and purification of NtOSAK and GAPDHs in the bacterial system and protoplast transformation. Michal Dadlez performed the MS analysis. Grazyna Dobrowolska and David Wendehenne supervised the project in their respective laboratories.

FUNDING

This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne [grant number 07 9201 CPER 02 S 5527]; the Agence Nationale de la Recherche [grant number BLAN07-2_184783]; the Ministère des Affaires Étrangères [grant number EGIDE Polonium, 11545WG]; and the Ministry of Science and Higher Education [grant numbers N301 2540 and 500/N-COST/2009/0]. I.W. was supported by a fellowship from the Conseil Régional de Bourgogne [grant number 07 HCP 36]

REFERENCES

- Besson-Bard, A., Gravot, A., Richaud, P., Auroy, P., Duc, C., Gaymard, F., Taconnat, L., Renou, J.-P., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol.* **149**, 1302–1315
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M. and Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 109–136
- Wilson, I. D., Neill, S. J. and Hancock, J. T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**, 622–631
- Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) New Insights into nitric-oxide signalling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 21–39
- Delledonne, M. (2005) NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 390–396
- Wendehenne, D., Durner, J. and Klessig, D. F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 449–455
- Besson-Bard, A., Astier, J., Rasul, S., Wawer, I., Dubreuil-Maurizi, C., Jeandroz, S. and Wendehenne, D. (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci.* **177**, 302–309
- Palmieri, M. C., Lindermayr, C., Bauwe, H., Steinhauser, C. and Durner, J. (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol.* **152**, 1514–1528
- Holtgreve, S., Gohlke, J., Starmann, J., Druce, S., Klocke, S., Altmann, B., Wojtera, J., Lindermayr, C. and Scheibe, R. (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol. Plant.* **133**, 211–228
- Lindermayr, C., Saalbach, G. and Durner, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **13**, 921–930
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G. and Durner, J. (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 4285–4291
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M. C., Vercammen, D., Brackener, A., Inze, D., Delledonne, M. and Van Breusegem, F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **282**, 1352–1358
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J. and Dong, X. (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956
- Wang, Y. Q., Feechan, A., Yun, B. W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F. Q., Xie, Z. S., Pallas, J. A. et al. (2009) S-Nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J. Biol. Chem.* **284**, 2131–2137
- Romero-Puertas, M. C., Laxa, M., Mattè, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A. M., Perazzolli, M., Vandelle, E., Dietz, K. J. and Delledonne, M. (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120–4130
- Serpa, V., Vemal, J., Lamattina, L., Grotewold, E., Cassia, R. and Terenzi, H. (2007) Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 1048–1053
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinase. *J. Exp. Bot.* **59**, 155–163
- Yamamoto, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N. and Kawakita, K. (2004) Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *J. Gen. Plant Pathol.* **70**, 85–92
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X. and Tan, M. (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol.* **175**, 36–50
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C. and Lamattina, L. (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.* **135**, 279–286
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radical Biol. Med.* **40**, 1369–1376
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R. D., Hancock, J. T. and Neill, S. J. (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* **24**, 667–677
- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P. et al. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8849–8855
- Lanteri, M. L., Pagnussat, G. C. and Lamattina, L. (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J. Exp. Bot.* **57**, 1341–1351
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signalling. *Mol. Plant* **1**, 218–228
- Otvös, K., Pasternak, T. P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorigotov, D., Szucs, A., Bottka, S., Dudits, D. and Fehér, A. (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J.* **43**, 849–860
- Boudsocq, M. and Lauriere, C. (2005) Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol.* **138**, 1185–1194
- Halford, N. G. and Hey, S. J. (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.* **419**, 247–259
- Hrabak, E. M., Chan, C. W. M., Gribskov, M., Harper, J. F., Choi, J. H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H. G., Sussman, M. R. et al. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.* **132**, 666–680
- Fujii, H. and Zhu, J. K. (2009) *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 8380–8385
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K. et al. (2009) Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **50**, 2123–2132
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M. et al. (2009) Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1345–1363

- 33 Yoshida, R., Hobo, T., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Takahashi, F., Aronso, J., Ecker, J. R. and Shinozaki, K. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1473–1483
- 34 Umezawa, T., Yoshida, R., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17306–17311
- 35 Vlad, F., Rubio, S., Rodrigues, A., Sirichandra, C., Belin, C., Robert, N., Leung, J., Rodriguez, P. L., Laurière, C. and Merlot, S. (2009) Protein phosphatases 2C regulate the activation of the Snf1-related kinase OST1 by abscisic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3170–3184
- 36 Umezawa, T., Sugiyama, N., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Myouga, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ishihama, Y., Hirayama, T. and Shinozaki, K. (2009) Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17588–17593
- 37 Belin, C., de Franco, P. O., Bourbousse, C., Chaignepain, S., Schmitter, J. M., Vavasseur, A., Giraudat, J., Barbier-Brygoo, H. and Thomine, S. (2006) Identification of features regulating OST1 kinase activity and OST1 function in guard cells. *Plant Physiol.* **141**, 1316–1327
- 38 Burza, A. M., Pekala, I., Sikora, J., Siedlecki, P., Malagocki, P., Bucholc, M., Koper, L., Zielenkiewicz, P., Dadlez, M. and Dobrowolska, G. (2006) *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. *J. Biol. Chem.* **281**, 34299–34311
- 39 Kelner, A., Pekala, I., Kaczanowski, S., Muszynska, G., Hardie, D. G. and Dobrowolska, G. (2004) Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiol.* **136**, 3255–3265
- 40 Hsu, M. F. and Meng, T. C. (2010) The enhancement of insulin responsiveness by nitric oxide-mediated inactivation of protein tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **285**, 7919–7928
- 41 Curcio, M. F., Batista, W. L., Linares, E., Nascimento, F. D., Moraes, M. S., Borges, R. E., Sap, J., Stem, A. I. and Monteiro, H. P. (2010) Regulatory effects of nitric oxide on Src kinase, FAK, p130Cas, and receptor protein tyrosine phosphatase α (PTP α): a role for the cellular redox environment. *Antioxid. Redox Signaling*, doi:10.1089/ars.2009.2534
- 42 Chen, Y. Y., Chu, H. M., Pan, K. T., Teng, C. H., Wang, D. L., Wang, A. H., Khoo, K. H. and Meng, T. C. (2008) Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. *J. Biol. Chem.* **283**, 35265–35272
- 43 Barrett, D. M., Black, S. M., Todor, H., Schmidt-Ullrich, R. K., Dawson, K. S. and Mikkelsen, R. B. (2005) Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 14453–14461
- 44 Beck, K. F., Eberhardt, W., Frank, S., Huwiler, A., Messmer, U. K., Mühl, H. and Pfeilschifter, J. (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J. Exp. Biol.* **202**, 645–653
- 45 Lander, H. M., Jacovina, A. T., Davis, R. J. and Tauras, J. M. (1996) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J. Biol. Chem.* **271**, 19705–19709
- 46 Park, H. S., Yu, J. W., Cho, J. H., Kim, M. S., Huh, S. H., Ryoo, K. and Choi, E. J. (2004) Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 by nitric oxide through a thiol redox mechanism. *J. Biol. Chem.* **279**, 7584–7590
- 47 Zhang, S. and Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**, 809–824
- 48 Sell, S., Lindemayr, C. and Durner, J. (2008) Identification of S-nitrosylated proteins in plants. *Methods Enzymol.* **440**, 283–292
- 49 He, P., Shan, L. and Sheen, J. (2007) The use of protoplasts to study innate immune responses. *Methods Mol. Biol.* **354**, 1–9
- 50 Mikolajczyk, M., Awotunde, O. S., Muszyńska, G., Klessig, D. F. and Dobrowolska, G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**, 165–178
- 51 Gould, K., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2003) Nitric oxide production by tobacco leaves: a general stress responses? *Plant Cell Environ.* **26**, 1851–1862
- 52 Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. and Snyder, S. H. (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat. Cell Biol.* **3**, 193–197
- 53 Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B. and Fujimuro, M. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat. Cell Biol.* **7**, 665–674
- 54 Stamler, J. S., Lamas, S. and Fang, F. C. (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signalling mechanism. *Cell* **106**, 675–683
- 55 Nakajima, H., Amano, W., Kubo, T., Fukuhara, A., Ihara, H., Azuma, Y. T., Tajima, H., Inui, T., Sawa, A. and Takeuchi, T. (2009) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase aggregate formation participates in oxidative stress-induced cell death. *J. Biol. Chem.* **284**, 34331–34341
- 56 Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., Kagaya, Y. and Hattori, T. (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**, 1163–1177
- 57 Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1988–1993
- 58 Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Yamamoto, A. and Hattori, T. (2005) Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* **44**, 939–949
- 59 Shin, R., Alvarez, S., Burch, A. Y., Jez, J. M. and Schachtman, D. P. (2007) Phosphoproteomic identification of targets of the *Arabidopsis* sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 6460–6465
- 60 Browning, K. S. (1996) The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32**, 107–144
- 61 Sirover, M. A. (1999) New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **432**, 159–184
- 62 Hancock, J. T., Henson, D., Nyirenda, M., Desikan, R., Harrison, J., Lewis, M., Hughes, J. and Neill, S. J. (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 828–835
- 63 Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M. and Shiozaki, K. (2008) Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol. Cell* **30**, 108–113
- 64 Benhar, M. and Stamler, J. S. (2005) A central role for S-nitrosylation in apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **7**, 645–646
- 65 Singh, P., Salih, M., Leddy, J. J. and Tuana, B. S. (2004) The muscle-specific calmodulin-dependent protein kinase assembles with the glycolytic enzyme complex at the sarcoplasmic reticulum and modulates the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a Ca²⁺/calmodulin-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **279**, 35176–35182

Received 31 March 2010; accepted 16 April 2010

Published as BJ Immediate Publication 16 April 2010, doi:10.1042/BJ20100492

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity

Izabela WAWER*^{†1}, Maria BUCHOLC^{†1}, Jérémy ASTIER*, Anna ANIELSKA-MAZUR[†], Jennifer DAHAN*, Anna KULIK[†], Aleksandra WYSŁOUCH-CIESZYŃSKA[†], Monika ZARĘBA-KOZIOL[†], Ewa KRZYWIŃSKA[†], Michał DADLEZ[†], Grażyna DOBROWOLSKA^{†2} and David WENDEHENNE*²

*UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, Plante-Microbe-Environnement, 17 rue Sully, 21065 Dijon cedex, France, and [†]Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warsaw, Poland

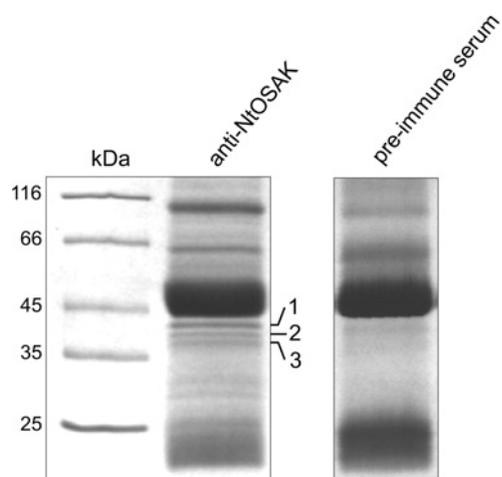


Figure S1 Proteins co-immunoprecipitated with NtOSAK in BY-2 cells subjected to osmotic stress

Protein extracts (4 mg) from cells subjected to 250 mM NaCl were immunoprecipitated with anti-NtOSAK antibodies or pre-immune serum as a control, and the resulting immunocomplexes were subjected to SDS/PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue staining. Band numbers correspond to the bands identified in Table 2 of the main text.

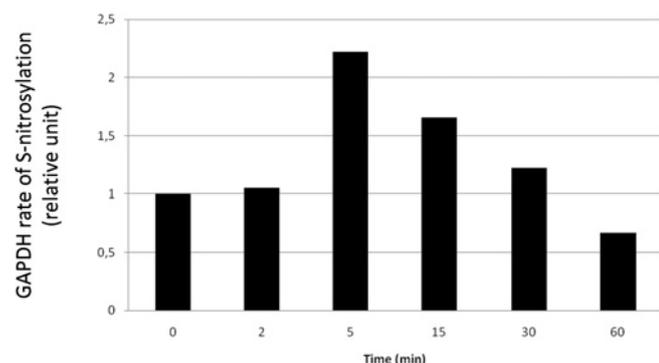


Figure S2 Relative quantification of GAPDH S-nitrosylation in response to salt

Experiments were carried out as explained in the legend of Figure 4 of the main text. The relative intensity of the immunoreactive bands of the Western blot was quantified using the Bio-Rad program Quantity One, version 4.6.7.



Figure S3 GAPDH detection in non-S-nitrosylated protein fraction

BY-2 cell suspensions were treated with NaCl (250 mM) for the time indicated. The corresponding crude extracts were subjected to the biotin-switch assay. As a negative control, the biotin-switch assay was performed without adding biotin. Biotinylated proteins were purified with neutravidin-agarose and eluted under reducing conditions. Non-biotinylated proteins (that is, proteins that did not bind to neutravidin) were analysed by Western blotting using anti-GAPDH antibodies. Results are one from three representative experiments.

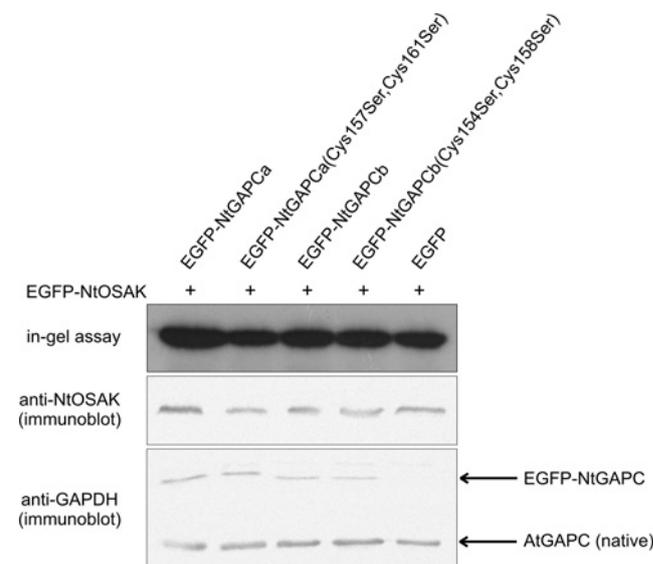


Figure S4 GAPDH does not influence NtOSAK activity

EGFP-NtOSAK was transiently expressed with EGFP-NtGAPCa or EGFP-NtGAPCb or EGFP-NtGAPCa(C157S,C161S) or EGFP-NtGAPCb(C154S,C158S) or EGFP in *Arabidopsis thaliana* protoplasts. The protoplasts were treated with 250 mM NaCl and the activity of EGFP-NtOSAK expressed in protoplasts, as well as the protein level of EGFP-NtOSAK, EGFP-NtGAPCs (wild-type and mutated forms) and endogenous *Arabidopsis thaliana* GAPC were analysed. The kinase activity was monitored by in-gel kinase activity assay using MBP as a substrate, whereas the protein level was analysed by Western blotting using anti-NtOSAK or anti-GAPDH antibodies. Results are one from three representative experiments.

¹ These authors contributed equally to the present study

² Correspondence may be addressed to either of these authors (email dobrowol@ibb.waw.pl or wendehen@dijon.inra.fr).

Table S1 List of primers used in the present study

Primer name	Primer sequence
Primers used to amplify GAPCa cDNA for BIFC constructs with XhoI/BamHI sites	
FGAPCa	5'-ATCCTCGAGTGGCATCTGACAAGAAGATCA-3'
RGAPCa	5'-AGCGGATCCTAAGCAACAGAAGCCATATG-3'
Primers used to amplify GAPCb cDNA for BIFC constructs with XhoI/BamHI sites	
FGAPCb	5'-ATCCTCGAGTGGCCAAGGTAAAGATT-3'
RGAPCb	5'-AGCGGATTCCTACTGAACCTGATGCCAT-3'
Primers used for site-directed mutagenesis of cysteine residues	
FGAPCaC157S	5'-CCAATGCTAGTTCCTACCAACTGCC-3'
RGAPCaC157S	5'-GGCAGTTGGTAGTGGAACTAGCATTGG-3'
FGAPCbC154S	5'-CAAATGCTAGCTCTACCACAAATTGCC-3'
RGAPCbC154S	5'-GGCAATTTGGTAGAGCTAGCATTGG-3'
FGAPCaC161S	5'-TCCACTACCAACTCCCTTGACCTTTG-3'
RGAPCaC161S	5'-CAAAGGTGCAAGGGAGTTGGTAGTGG-3'
FGAPCbC158S	5'-TCTACCACAAATTCCTTGCTCCCTTG-3'
RGAPCbC158S	5'-CAAGGGAGCAAGGGAATTTGGGTAGA-3'
Primers used to amplify GAPCa cDNA for pET28A construct with EcoRI/SalI sites	
FGAPCaPET	5'-AGCGAATTCATGGCATCTGACAAGAAGATC-3'
RGAPCaPET	5'-TAGGTCGACTTAAGCAACAGAAGCCATATG-3'
Primers used to amplify GAPCb cDNA for pET28A construct with EcoRI/XhoI sites	
FGAPCbPET	5'-AGCGAATTCATGGCCAAGGTAAAGATTGGA-3'
RGAPCbPET	5'-ATACTCGAGTTACTGAACTGATGCCATGTG-3'
Primers used to amplify NtOSAK cDNA for BIFC constructs with XhoI/EcoRI sites	
FNTOSAK	5'-GTCCTCGAGATAAATACGAGCTTGTGAAAG-3'
RNTOSAK	5'-ATTGTCGACTTAGGTGAGACGAACCTCTCC-3'

Received 31 March 2010; accepted 16 April 2010

Published as BJ Immediate Publication 16 April 2010, doi:10.1042/BJ20100492

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'est inscrit dans l'étude de la compréhension du rôle du NO dans les processus de signalisation cellulaire activés dans les cellules végétales lors de la réponse adaptative aux stress biotiques et abiotiques. Il a conduit à l'identification de plusieurs protéines cibles du NO, en particulier CDC48 et la GAPDH, en réponse à une élicitation par la cryptogéine ou à un stress salin.

Les travaux relatifs à la S-nitrosylation de CDC48 sont particulièrement originaux. D'une part, peu de protéines S-nitrosylées ont été identifiées dans des contextes physiologiques. D'autre part, sa régulation directe par le NO n'a jamais été démontrée chez les plantes et, d'une façon plus générale, simplement suspectée chez la drosophile. Au regard de l'important panel de processus cellulaires dans lesquels CDC48 est potentiellement associée, comprendre l'impact de sa S-nitrosylation dans la mise en place des réponses de défense pourrait mettre à jour son implication dans d'autres processus physiologiques.

En termes de perspectives, outre la nécessité de confirmer certains des résultats obtenus, ce travail sera poursuivi par l'analyse du rôle de CDC48 dans les réponses de défense induites par la cryptogéine chez le tabac. Ceci nécessitera notamment l'identification de protéines partenaires et des approches de génomique fonctionnelle. Cette dernière stratégie a été engagée par l'obtention de plants et de lignées cellulaires de tabac invalidés dans l'expression de CDC48. Dans la mesure où CDC48 est une protéine nécessaire à la croissance et au développement des cellules, nous avons opté pour une approche d'interférence à ARN inducible. Ainsi, nous disposons actuellement de trois lignées cellulaires transformées différentes et les plantes correspondantes ont été régénérées. Grâce à ces lignées, nous pourrions analyser le rôle de CDC48 dans les événements déclenchés par la cryptogéine chez le tabac.

Une attention particulière sera portée sur la réponse hypersensible. En effet, au regard de la littérature animale et plus précisément du rôle de CDC48 dans l'élimination de protéines incorrectement repliées *via* son interaction avec le protéasome, il est envisageable que l'inhibition de la S-nitrosylation de CDC48 conduise à une accumulation de protéines ubiquitinylées, processus pouvant conduire à la mort cellulaire. Cette hypothèse sera vérifiée en collaboration avec l'équipe de L. Dubrez-Daloz (UMR Inserm U866/Université de

Bourgogne Lipides, Nutrition, Cancer) spécialisée dans l'étude de l'apoptose chez les mammifères. En parallèle, son implication dans la SAR devra être étudiée.

Toujours en référence aux fonctions de CDC48 découvertes dans le domaine animal, son implication dans les modifications de dynamiques membranaires déclenchées par la cryptogéine (voir par exemple Leborgne-Castel *et al.*, 2008) sera intéressante à appréhender en collaboration avec l'équipe "Microdomaines membranaires dans les interactions plantes/micro-organismes" de notre UMR dirigée par F. Simon-Plas.

Enfin, une hypothèse particulièrement intéressante concerne la "manipulation" potentielle de CDC48 par un micro-organisme pathogène. En effet, comme cela a été présenté en introduction du chapitre II, Humphreys *et al.* (2009) ont rapporté que le facteur de virulence SptP de *Salmonella* est capable de lier et de déphosphoryler p97 *via* son activité tyrosine phosphatase. L'inhibition de la dégradation protéique résultant de ce mécanisme conduit à une synthèse plus importante des protéines du pathogène lors du processus infectieux. Il est envisageable que la S-nitrosylation de CDC48 puisse constituer une stratégie mise en place par le micro-organisme pour favoriser la synthèse de protéines pathogènes.

Outre CDC48, nous avons identifié d'autres protéines S-nitrosylées en réponse à la cryptogéine, en particulier une calmoduline et une CDPK, deux protéines clés de la signalisation calcique. Ces données renforcent le lien fonctionnel entre le NO et le second messenger Ca^{2+} préalablement démontré par l'équipe (pour revue voir Courtois *et al.*, 2008). Elles indiquent que le NO, *via* le processus de S-nitrosylation, pourrait constituer un médiateur ou un régulateur des effets moléculaires du Ca^{2+} impliquant des calmodulines et des CDPK. Etayer cette hypothèse nécessitera d'appréhender l'impact de la S-nitrosylation des deux protéines sur leurs activités et leurs fonctions physiologiques.

Enfin, nos travaux relatifs à l'analyse des mécanismes moléculaires sous-jacents à l'activation de NtOSAK par le NO ont révélé que cette protéine kinase formait constitutivement un complexe avec la GAPDH. En réponse à un stress salin, le NO concourt indirectement à l'activation de NtOSAK et promeut la S-nitrosylation de sa protéine partenaire, la GAPDH. Là encore, à l'image des processus décrits chez la levure et les mammifères, nous émettons l'hypothèse que ce complexe forme une plateforme de signalisation. Plus précisément, il est envisageable que la S-nitrosylation de la GAPDH puisse favoriser un changement de sa

conformation autorisant le recrutement de protéines kinases phosphorylant NtOSAK et/ou de substrats de NtOSAK. La recherche de protéines partenaires de la GADPH et l'étude de la phosphorylation potentielle des protéines cibles de NtOSAK identifiées dans notre étude pourraient permettre de répondre à cette interrogation. De plus, ce type d'étude permettra de mieux comprendre le rôle de ce complexe et d'appréhender l'incidence de sa S-nitrosylation dans la réponse au stress salin.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abat JK, Deswal R (2009) Differential modulation of S-nitrosoproteome of Brassica juncea by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* **9**: 4368-4380
- Abat JK, Mattoo AK, Deswal R (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant Kalanchoe pinnata- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *FEBS J* **275**: 2862-2872
- Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* **25**: 510-517
- Ahlfors R, Brosche M, Kangasjarvi J (2009) Ozone and nitric oxide interaction in Arabidopsis thaliana: a role for ethylene? *Plant Signal Behav* **4**: 878-879
- Ahn YO, Zheng M, Bevan DR, Esen A, Shiu SH, Benson J, Peng HP, Miller JT, Cheng CL, Poulton JE, Shih MC (2007) Functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana glycoside hydrolase family 35. *Phytochemistry* **68**: 1510-1520
- Aker J, Borst JW, Karlova R, de Vries S (2006) The Arabidopsis thaliana AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *J Struct Biol* **156**: 62-71
- Aker J, de Vries SC (2008) Plasma membrane receptor complexes. *Plant Physiol* **147**: 1560-1564
- Aker J, Hesselink R, Engel R, Karlova R, Borst JW, Visser AJ, de Vries SC (2007) In vivo hexamerization and characterization of the Arabidopsis AAA ATPase CDC48A complex using forster resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Plant Physiol* **145**: 339-350
- Alexandru G, Graumann J, Smith GT, Kolawa NJ, Fang R, Deshaies RJ (2008) UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1alpha turnover. *Cell* **134**: 804-816
- Ali R, Ma W, Lemtiri-Chlieh F, Tsaltas D, Leng Q, von Bodman S, Berkowitz GA (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: Arabidopsis CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* **19**: 1081-1095
- Allen GJ, Muir SR, Sanders D (1995) Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both InsP₃ and cyclic ADP-ribose. *Science* **268**: 735-737
- Allen MD, Buchberger A, Bycroft M (2006) The PUB domain functions as a p97 binding module in human peptide N-glycanase. *J Biol Chem* **281**: 25502-25508
- An L, Liu Y, Zhang M, Chen T, Wang X (2005) Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *J Plant Physiol* **162**: 317-326
- Anderberg RJ, Walker-Simmons MK (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10183-10187
- Arnaud N, Murgia I, Boucherez J, Briat JF, Cellier F, Gaymard F (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for Arabidopsis AtFer1 ferritin gene expression. *J Biol Chem* **281**: 23579-23588
- Asai S, Yoshioka H (2009) Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen Botrytis cinerea in Nicotiana benthamiana. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 619-629
- Asai T, Tomita Y, Nakatsuka S, Hoshida Y, Myoui A, Yoshikawa H, Aozasa K (2002) VCP (p97) regulates NFkappaB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. *Jpn J Cancer Res* **93**: 296-304

- Astier J, Besson-Bard A, Wawer I, Parent C, Rasul S, Jeandroz S, Dat J, Wendehenne D (2010) Nitric Oxide Signalling in Plants: Cross-Talk With Ca²⁺, Protein Kinases and Reactive Oxygen Species. In *Annual Plant Reviews Volume 42*, pp 147-170. Wiley-Blackwell
- Aziz A, Heyraud A, Lambert B (2004) Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* **218**: 767-774
- Bae H, Choi SM, Yang SW, Pai HS, Kim WT (2009) Suppression of the ER-localized AAA ATPase NgCDC48 inhibits tobacco growth and development. *Mol Cells* **28**: 57-65
- Balbi V, Devoto A (2008) Jasmonate signalling network in *Arabidopsis thaliana*: crucial regulatory nodes and new physiological scenarios. *New Phytol* **177**: 301-318
- Ballar P, Zhong Y, Nagahama M, Tagaya M, Shen Y, Fang S (2007) Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* **282**: 33908-33914
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* **69**: 473-488
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Rodriguez-Serrano M, Esteban FJ, Fernandez-Ocana A, Chaki M, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Sandalio LM, del Rio LA (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* **57**: 1785-1793
- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A (2006) Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 970-975
- Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H, Pfeilschifter J (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *J Exp Biol* **202**: 645-653
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, Brackener A, Inze D, Delledonne M, Van Breusegem F (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* **282**: 1352-1358
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221
- Benhar M, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS (2008) Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**: 1050-1054
- Benhar M, Forrester MT, Stamler JS (2009) Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 721-732
- Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M, McKenzie H (1994) Stomach NO synthesis. *Nature* **368**: 502
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D (2008a) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 21-39
- Besson-Bard A, Griveau S, Bedioui F, Wendehenne D (2008b) Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *J Exp Bot* **59**: 3407-3414
- Besson-Bard A, Courtois C, Gauthier A, Dahan J, Dobrowolska G, Jeandroz S, Pugin A, Wendehenne D (2008c) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Mol Plant* **1**: 218-228
- Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou JP, Pugin A, Wendehenne D (2009) Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiol* **149**: 1302-1315

- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**: 332-341
- Bethke PC, Libourel IG, Reinohl V, Jones RL (2006) Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* **223**: 805-812
- Bevan M, Bancroft I, Bent E, Love K, Goodman H, Dean C, Bergkamp R, Dirkse W, Van Staveren M, Stiekema W, Drost L, Ridley P, Hudson SA, Patel K, Murphy G, Piffanelli P, Wedler H, Wedler E, Wambutt R, Weitzenegger T, Pohl TM, Terryn N, Gielen J, Villarroel R, De Clerck R, Van Montagu M, Lecharny A, Auborg S, Gy I, Kreis M, Lao N, Kavanagh T, Hempel S, Kotter P, Entian KD, Rieger M, Schaeffer M, Funk B, Mueller-Auer S, Silvey M, James R, Montfort A, Pons A, Puigdomenech P, Douka A, Voukelatou E, Milioni D, Hatzopoulos P, Piravandi E, Obermaier B, Hilbert H, Dusterhoft A, Moores T, Jones JD, Eneva T, Palme K, Benes V, Rechman S, Ansorge W, Cooke R, Berger C, Delseny M, Voet M, Volckaert G, Mewes HW, Klosterman S, Schueller C, Chalwatzis N (1998) Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of Arabidopsis thaliana. *Nature* **391**: 485-488
- Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A (2001) Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol* **125**: 564-572
- Bogan JS, Hendon N, McKee AE, Tsao TS, Lodish HF (2003) Functional cloning of TUG as a regulator of GLUT4 glucose transporter trafficking. *Nature* **425**: 727-733
- Boissy G, de La Fortelle E, Kahn R, Huet JC, Bricogne G, Pernollet JC, Brunie S (1996) Crystal structure of a fungal elicitor secreted by Phytophthora cryptogea, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* **4**: 1429-1439
- Boller T (1995) Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 189-214
- Boller T (2005) Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 116-122
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379-406
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 181-192
- Bonnet P, Rousse G (1988) Purification de divers filtrats de culture de Phytophthora et activités biologiques sur le tabac des différentes fractions. *Agronomie* **8**: 347-350
- Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **279**: 41758-41766
- Boudsocq M, Lauriere C (2005) Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiol* **138**: 1185-1194
- Bourque S, Binet MN, Ponchet M, Pugin A, Lebrun-Garcia A (1999) Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* **274**: 34699-34705
- Bourque S, Ponchet M, Binet MN, Ricci P, Pugin A, Lebrun-Garcia A (1998) Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol* **118**: 1317-1326
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Braun RJ, Zischka H (2008) Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease. *Biochim Biophys Acta* **1783**: 1418-1435

- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J* **45**: 113-122
- Broekaert WF, Delaure SL, De Bolle MF, Cammue BP (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 393-416
- Brunger AT (2001) Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 157-171
- Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D, Nurnberger T (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from Phytophthora transglutaminases. *EMBO J* **21**: 6681-6688
- Buchberger A, Howard MJ, Proctor M, Bycroft M (2001) The UBX domain: a widespread ubiquitin-like module. *J Mol Biol* **307**: 17-24
- Burza AM, Pekala I, Sikora J, Siedlecki P, Malagocki P, Bucholc M, Koper L, Zielenkiewicz P, Dadlez M, Dobrowolska G (2006) Nicotiana tabacum osmotic stress-activated kinase is regulated by phosphorylation on Ser-154 and Ser-158 in the kinase activation loop. *J Biol Chem* **281**: 34299-34311
- Busso D, Delagoutte-Busso B, Moras D (2005) Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in Escherichia coli. *Anal Biochem* **343**: 313-321
- Cantrel C, Vazquez T, Puyaubert J, Reze N, Lesch M, Kaiser WM, Dutilleul C, Guillas I, Zachowski A, Baudouin E (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* **189**: 415-427
- Cao K, Nakajima R, Meyer HH, Zheng Y (2003) The AAA-ATPase Cdc48/p97 regulates spindle disassembly at the end of mitosis. *Cell* **115**: 355-367
- Carimi F, Zottini M, Costa A, Cattelan I, De Michele R, Terzi M, Lo Schiavo F (2005) NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* **28**: 1171-1178
- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L, Delledonne M (2009) Protein nitration during defense response in Arabidopsis thaliana. *Electrophoresis* **30**: 2460-2468
- Chandran D, Tai YC, Hather G, Dewdney J, Denoux C, Burgess DG, Ausubel FM, Speed TP, Wildermuth MC (2009) Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted processes and regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 1435-1451
- Chang JH, Urbach JM, Law TF, Arnold LW, Hu A, Gombar S, Grant SR, Ausubel FM, Dangl JL (2005) A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from Pseudomonas syringae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2549-2554
- Chassot C, Buchala A, Schoonbeek HJ, Metraux JP, Lamotte O (2008) Wounding of Arabidopsis leaves causes a powerful but transient protection against Botrytis infection. *Plant J* **55**: 555-567
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-814
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in Arabidopsis thaliana suspension cultures. *Plant J* **24**: 667-677
- Clementi E (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Pharmacol* **55**: 713-718
- Conrath U, Amoroso G, Kohle H, Sultemeyer DF (2004) Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. *Plant J* **38**: 1015-1022

- Conrath U, Beckers GJ, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CM, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1062-1071
- Conrath U, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **7**: 210-216
- Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 1017-1028
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, Leon AM, Sandalio LM, del Rio LA (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**: 246-254
- Corpas FJ, Palma JM, del Rio LA, Barroso JB (2009a) Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* **184**: 9-14
- Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB (2009b) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal Behav* **4**: 920-923
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**: 900-905
- Courtois C, Besson A, Dahan J, Bourque S, Dobrowolska G, Pugin A, Wendehenne D (2008) Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J Exp Bot* **59**: 155-163
- Crane BR, Sudhamsu J, Patel BA (2010) Bacterial nitric oxide synthases. *Annu Rev Biochem* **79**: 445-470
- Crawford NM (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**: 859-868
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L (2005) Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* **221**: 297-303
- Csinos, A., and Hendrix, J. 1977. Toxin produced by *Phytophthora cryptogea*. *Can J. Bot.* **55**:1156-1162.
- Dahan J, Pichereaux C, Rossignol M, Blanc S, Wendehenne D, Pugin A, Bourque S (2009a) Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem J* **418**: 191-200
- Dahan J, Wawer I, Besson-Bard A, Astier J, Gauthier A, Bourque S, Lamotte O, Jeandroz S, Dobrowolska G, Wendehenne D. (2009b) Nitric oxide signaling in tobacco cells elicited by cryptogein : interplays with calcium and protein kinases. In Antoun H, Avis T, Brisson L, Prévost D, Trepanier M (eds.), *Biology of Plant-Microbe Interactions*. The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, Vol. 7, pp. 1-7.
- Dai RM, Chen E, Longo DL, Gorbea CM, Li CC (1998) Involvement of valosin-containing protein, an ATPase Co-purified with IkappaBalpha and 26 S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha. *J Biol Chem* **273**: 3562-3573
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833
- Davies JM, Brunger AT, Weis WI (2008) Improved structures of full-length p97, an AAA ATPase: implications for mechanisms of nucleotide-dependent conformational change. *Structure* **16**: 715-726

- De Lorenzo G, Ferrari S (2002) Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 295-299
- De Michele R, Vurro E, Rigo C, Costa A, Elviri L, Di Valentin M, Careri M, Zottini M, Sanita di Toppi L, Lo Schiavo F (2009) Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiol* **150**: 217-228
- de Pinto MC, Tommasi F, De Gara L (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiol* **130**: 698-708
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13454-13459
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16314-16318
- Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert PR (2003) The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181-2191
- DeYoung BJ, Innes RW (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol* **7**: 1243-1249
- Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* **11**: 539-548
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill RD (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J* **35**: 763-770
- Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG, Madura K (2003) Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol* **23**: 6469-6483
- Dreveny I, Pye VE, Beuron F, Briggs LC, Isaacson RL, Matthews SJ, McKeown C, Yuan X, Zhang X, Freemont PS (2004) p97 and close encounters of every kind: a brief review. *Biochem Soc Trans* **32**: 715-720
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10328-10333
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209
- Egerton M, Samelson LE (1994) Biochemical characterization of valosin-containing protein, a protein tyrosine kinase substrate in hematopoietic cells. *J Biol Chem* **269**: 11435-11441
- Elviri L, Speroni F, Careri M, Mangia A, di Toppi LS, Zottini M (2010) Identification of in vivo nitrosylated phytochelatin in *Arabidopsis thaliana* cells by liquid chromatography-direct electrospray-linear ion trap-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1217**: 4120-4126
- Engelberth J, Alborn HT, Schmelz EA, Tumlinson JH (2004) Airborne signals prime plants against insect herbivore attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1781-1785
- Erbs G, Silipo A, Aslam S, De Castro C, Liparoti V, Flagiello A, Pucci P, Lanzetta R, Parrilli M, Molinaro A, Newman MA, Cooper RM (2008) Peptidoglycan and muropeptides from pathogens

- Agrobacterium and Xanthomonas elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chem Biol* **15**: 438-448
- Etienne P, Petitot AS, Houot V, Blein JP, Suty L (2000) Induction of tcl 7, a gene encoding a beta-subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **466**: 213-218
- Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G (2000) The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell* **102**: 499-509
- Ewens CA, Kloppsteck P, Forster A, Zhang X, Freemont PS (2010) Structural and functional implications of phosphorylation and acetylation in the regulation of the AAA+ protein p97. *Biochem Cell Biol* **88**: 41-48
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8054-8059
- Fefeu S, Bouaziz S, Huet JC, Pernollet JC, Guittet E (1997) Three-dimensional solution structure of beta cryptogein, a beta elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Sci* **6**: 2279-2284
- Feiler HS, Desprez T, Santoni V, Kronenberger J, Caboche M, Traas J (1995) The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *EMBO J* **14**: 5626-5637
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**: 265-276
- Ferrari S, Galletti R, Denoux C, De Lorenzo G, Ausubel FM, Dewdney J (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiol* **144**: 367-379
- Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A, Delledonne M (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 781-790
- Ferry N, Edwards MG, Gatehouse JA, Gatehouse AM (2004) Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 155-161
- Flor HH (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275-296
- Floryszak-Wieczorek J, Arasimowicz M, Milczarek G, Jelen H, Jackowiak H (2007) Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of *pelargonium* to a necrotrophic pathogen. *New Phytol* **175**: 718-730
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J* **23**: 817-824
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Calo G, Salerno G, Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**: 3816-3830
- Foster MW, Stamler JS (2004) New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system. *J Biol Chem* **279**: 25891-25897
- Frohlich KU, Fries HW, Rudiger M, Erdmann R, Botstein D, Mecke D (1991) Yeast cell cycle protein CDC48p shows full-length homology to the mammalian protein VCP and is a member of a protein family involved in secretion, peroxisome formation, and gene expression. *J Cell Biol* **114**: 443-453

- Garcês H, Durzan D, Pedroso MC (2001) Mechanical Stress Elicits Nitric Oxide Formation and DNA Fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* **87**: 567-574
- Garcia-Brugger A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 711-724
- Garcia-Mata C, Gay R, Sokolovski S, Hills A, Lamattina L, Blatt MR (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11116-11121
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* **126**: 1196-1204
- Garcia-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol* **128**: 790-792
- Gauthier A, Lamotte O, Rebutier D, Bouteau F, Pugin A, Wendehenne D (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signal Behav* **2**: 86-95
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227
- Glazebrook J, Ausubel FM (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8955-8959
- Gomez-Cadenas A, Zentella R, Sutliff TD, Ho TH (2001) Involvement of multiple cis-elements in the regulation of GA responsive promoters: Definition of a new cis-element in the Amy32b gene promoter of barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant* **112**: 211-216
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003-1011
- Gong YW, Yuan YJ (2006) Nitric oxide mediates inactivation of glutathione S-transferase in suspension culture of *Taxus cuspidata* during shear stress. *J Biotechnol* **123**: 185-192
- Gould KS, Lamotte O, Klinguer A, Pugin A, Wendehenne D (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell & Environment* **26**: 1851-1862
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhães ACN, Martins IS (1997) NO--releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* **21**: 183-187
- Govrin EM, Levine A (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**: 751-757
- Granado J, Felix G, Boller T (1995) Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiol* **107**: 485-490
- Graziano M, Beligni MV, Lamattina L (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol* **130**: 1852-1859
- Greenberg JT, Yao N (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 201-211
- Grefen C, Blatt MR (2008) SNAREs--molecular governors in signalling and development. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 600-609
- Grennan AK (2007) Protein S-nitrosylation: potential targets and roles in signal transduction. *Plant Physiol* **144**: 1237-1239

- Groppa MD, Rosales EP, Iannone MF, Benavides MP (2008) Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* **69**: 2609-2615
- Grun S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* **57**: 507-516
- Grunwald NJ, Goss EM, Press CM (2008) Phytophthora ramorum: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals. *Mol Plant Pathol* **9**: 729-740
- Guo FQ, Crawford NM (2005) Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**: 3436-3450
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100-103
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT (2010) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci*
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RH, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AM, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JI, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grunwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AM, Jones JD, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJ, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzon A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJ, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PR, Whisson SC, Judelson HS, Nussbaum C (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393-398
- Hahn MG, Darvill AG, Albersheim P (1981) Host-Pathogen Interactions : XIX. THE ENDOGENOUS ELICITOR, A FRAGMENT OF A PLANT CELL WALL POLYSACCHARIDE THAT ELICITS PHYTOALEXIN ACCUMULATION IN SOYBEANS. *Plant Physiol* **68**: 1161-1169
- Halford NG, Hardie DG (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* **37**: 735-748
- Halford NG, Hey SJ (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J* **419**: 247-259
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 303-333
- Hamiduzzaman MM, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus JM, Mauch-Mani B (2005) beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 819-829
- Hammerschmidt R (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol* **37**: 285-306
- Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* **7**: 801-819
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103

- He J, Xu H, She X, Song X, Zhao W (2005) The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B-induced stomatal closure in broad bean. *Functional Plant Biology* **32**: 237-247
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**: 1968-1971
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-334
- Hendrix JW, Guttman SM (1970) Sterol or calcium requirement by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* for growth on nitrate nitrogen. *Mycologia* **62**: 195-198
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 150-166
- Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G, Mattaj JW (2001) Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* **3**: 1086-1091
- Higaki T, Goh T, Hayashi T, Kutsuna N, Kadota Y, Hasezawa S, Sano T, Kuchitsu K (2007) Elicitor-induced cytoskeletal rearrangement relates to vacuolar dynamics and execution of cell death: in vivo imaging of hypersensitive cell death in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* **48**: 1414-1425
- Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, Nakadate K, Ohsawa Y, Kamei Y, Popiel AH, Sinohara A, Iwamatsu A, Kimura Y, Uchiyama Y, Hori S, Kakizuka A (2001) VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* **8**: 977-984
- Hitchcock AL, Krebber H, Fietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA (2001) The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell* **12**: 3226-3241
- Holappa LD, Walker-Simmons MK (1995) The Wheat Abscisic Acid-Responsive Protein Kinase mRNA, PKABA1, Is Up-Regulated by Dehydration, Cold Temperature, and Osmotic Stress. *Plant Physiol* **108**: 1203-1210
- Holtgreve S, Gohlke J, Starmann J, Druce S, Klocke S, Altmann B, Wojtera J, Lindermayr C, Scheibe R (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiol Plant* **133**: 211-228
- Horchani F, Prevot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A, Brouquisse R (2011) Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules. *Plant Physiol* **155**: 1023-1036
- Hoyos ME, Zhang S (2000) Calcium-independent activation of salicylic acid-induced protein kinase and a 40-kilodalton protein kinase by hyperosmotic stress. *Plant Physiol* **122**: 1355-1363
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol* **132**: 666-680
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005a) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* **137**: 663-670
- Hu H, Xiong L, Yang Y (2005b) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**: 107-117

- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P, Mueller M, Durner J (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946
- Huckelhoven R (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**: 101-127
- Huffaker A, Pearce G, Ryan CA (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10098-10103
- Humphreys D, Hume PJ, Koronakis V (2009) The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell Host Microbe* **5**: 225-233
- Igamberdiev AU, Stoimenova M, Seregelyes C, Hill RD (2006) Class-1 hemoglobin and antioxidant metabolism in alfalfa roots. *Planta* **223**: 1041-1046
- Imamura S, Ojima N, Yamashita M (2003) Cold-inducible expression of the cell division cycle gene CDC48 and its promotion of cell proliferation during cold acclimation in zebrafish cells. *FEBS Lett* **549**: 14-20
- Iriti M, Faoro F (2007) Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia* **164**: 57-64
- Isaacson RL, Pye VE, Simpson P, Meyer HH, Zhang X, Freemont PS, Matthews S (2007) Detailed structural insights into the p97-Npl4-Ufd1 interface. *J Biol Chem* **282**: 21361-21369
- Jaffrey SR, Snyder SH (2001) The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE* **2001**: pl1
- Jahn R, Sudhof TC (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 863-911
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**: 4004-4014
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329
- Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11086-11091
- Kamoun S, Young M, Glascock CB, Tyler BM (1993) Extracellular Protein Elicitors from *Phytophthora*: Host-Specificity and Induction of Resistance to Bacterial and Fungal Phytopathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 15-25
- Karin M, Greten FR (2005) NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* **5**: 749-759
- Kato T, Kawahara A, Ashida H, Yamamoto K (2007) Unique Peptide:N-glycanase of *Caenorhabditis elegans* has Activity of Protein Disulphide Reductase as well as of Deglycosylation. *Journal of Biochemistry* **142**: 175-181
- Katz VA, Thulke OU, Conrath U (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol* **117**: 1333-1339
- Keller H, Bonnet P, Galiana E, Pruvot L, Friedrich L, Ryals J, Ricci P (1996a) Salicylic Acid Mediates Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance, but Not Necrosis in Tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**: 696-703
- Keller H, Blein JP, Bonnet P, Ricci P (1996b) Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiol* **110**: 365-376

- Kelner A, Pekala I, Kaczanowski S, Muszynska G, Hardie DG, Dobrowolska G (2004) Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiol* **136**: 3255-3265
- Keshive M, Singh S, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Deen WM (1996) Kinetics of S-nitrosation of thiols in nitric oxide solutions. *Chem Res Toxicol* **9**: 988-993
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* **121**: 749-759
- Klein JB, Barati MT, Wu R, Gozal D, Sachleben LR, Jr., Kausar H, Trent JO, Gozal E, Rane MJ (2005) Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **280**: 31870-31881
- Klepper LA (1979) Effects of certain herbicides and their combinations on nitrate and nitrite reduction. *Plant Physiol* **64**: 273-275
- Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, Kagaya Y, Hattori T (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**: 1163-1177
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635-644
- Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, Kakizuka A (2010) Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. *J Biol Chem* **285**: 21736-21749
- Kondo H, Rabouille C, Newman R, Levine TP, Pappin D, Freemont P, Warren G (1997) p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature* **388**: 75-78
- Kopyra M, Gwozdz EA (2003) Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 1011-1017
- Kulik A, Anielska-Mazur A, Koen E, Żmieńko A, McLoughlin F, Bucholc M, Krzywińska E, Wawer I, Figlerowicz M, Testerink C, Wendehenne D, Dobrowolska G. SNF1-related protein kinases type 2 are involved in plant responses to cadmium stress. *Plant Physiology*. article soumis
- Kumar D, Klessig DF (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 347-351
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**: 3496-3507
- Lamb C, Dixon RA (1997) THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lamotte O, Courtois C, Dobrowolska G, Besson A, Pugin A, Wendehenne D (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radic Biol Med* **40**: 1369-1376
- Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-Garcia A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* **135**: 516-529
- Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *J Exp Bot* **57**: 1341-1351

- Laquitaine L, Gomes E, Francois J, Marchive C, Pascal S, Hamdi S, Atanassova R, Delrot S, Coutos-Thevenot P (2006) Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against botrytis cinerea: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1103-1112
- Latterich M, Frohlich KU, Schekman R (1995) Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* **82**: 885-893
- Lavoie C, Chevet E, Roy L, Tonks NK, Fazel A, Posner BI, Paiement J, Bergeron JJ (2000) Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13637-13642
- Laxalt AM, Raho N, Have AT, Lamattina L (2007) Nitric oxide is critical for inducing phosphatidic acid accumulation in xylanase-elicited tomato cells. *J Biol Chem* **282**: 21160-21168
- Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* **146**: 1255-1266
- Lecourieux D, Mazars C, Pauly N, Ranjeva R, Pugin A (2002) Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* **14**: 2627-2641
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 821-829
- Lecourieux D, Lamotte O, Bourque S, Wendehenne D, Mazars C, Ranjeva R, Pugin A (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**: 527-538
- Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol* **171**: 249-269
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 451-458
- Leshem YY, Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J Exp Bot* **51**: 1471-1473
- Lherminier J, Benhamou N, Larrue J, Milat ML, Boudon-Padiou E, Nicole M, Blein JP (2003) Cytological Characterization of Elicitin-Induced Protection in Tobacco Plants Infected by *Phytophthora parasitica* or *Phytoplasma*. *Phytopathology* **93**: 1308-1319
- Li G, Zhao G, Schindelin H, Lennarz WJ (2008) Tyrosine phosphorylation of ATPase p97 regulates its activity during ERAD. *Biochem Biophys Res Commun* **375**: 247-251
- Li J, Wang XQ, Watson MB, Assmann SM (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* **287**: 300-303
- Liang J, Yin C, Doong H, Fang S, Peterhoff C, Nixon RA, Monteiro MJ (2006) Characterization of erasin (UBXD2): a new ER protein that promotes ER-associated protein degradation. *J Cell Sci* **119**: 4011-4024
- Lindermayr C, Durner J (2009) S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *J Proteomics* **73**: 1-9
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J (2006) Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* **281**: 4285-4291
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **137**: 921-930

- Lindermayr C, Sell S, Muller B, Leister D, Durner J (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* **22**: 2894-2907
- Littleton JT, Barnard RJ, Titus SA, Slind J, Chapman ER, Ganetzky B (2001) SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12233-12238
- Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**: 490-494
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 466-472
- Lochman J, Mikes V (2006) Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco. *Plant Mol Biol* **62**: 43-51
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* **1**: 28-33
- Lorenzo O, Solano R (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 532-540
- Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tor M, Billiar T (2007) The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**: 60-81
- Madeo F, Schlauer J, Zischka H, Mecke D, Frohlich KU (1998) Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p. *Mol Biol Cell* **9**: 131-141
- Madsen L, Seeger M, Semple CA, Hartmann-Petersen R (2009) New ATPase regulators--p97 goes to the PUB. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 2380-2388
- Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P (2006) Analysis of oxidative signalling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **29**: 1357-1371
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* **26**: 403-410
- Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-Martins G (2010) Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav* **5**: 99-104
- Marshall RS, Jolliffe NA, Ceriotti A, Snowden CJ, Lord JM, Frigerio L, Roberts LM (2008) The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells. *J Biol Chem* **283**: 15869-15877
- Mato JM, Corrales FJ, Lu SC, Avila MA (2002) S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J* **16**: 15-26
- May AP, Whiteheart SW, Weis WI (2001) Unraveling the mechanism of the vesicle transport ATPase NSF, the N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J Biol Chem* **276**: 21991-21994
- McNeill H, Knebel A, Arthur JS, Cuenda A, Cohen P (2004) A novel UBA and UBX domain protein that binds polyubiquitin and VCP and is a substrate for SAPKs. *Biochem J* **384**: 391-400
- Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C (2010) The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 748-759
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-980
- Menke FL, Kang HG, Chen Z, Park JM, Kumar D, Klessig DF (2005) Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **18**: 1027-1034

- Meyer H, Popp O (2008) Role(s) of Cdc48/p97 in mitosis. *Biochem Soc Trans* **36**: 126-130
- Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren G (2000) A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *EMBO J* **19**: 2181-2192
- Meyers BC, Kozik A, Griego A, Kuang H, Michelmore RW (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 809-834
- Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Panabieres F, Ricci P, Blein JP (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **245**: 133-139
- Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Ricci P, Blein JP (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett* **416**: 190-192
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G, Klessig DF, Dobrowolska G (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**: 165-178
- Milat ML, Ricci P, Bonnet P, Blein JP (1990) Capsidiol and ethylene production by tobacco cells in response to cryptogein, an elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytochemistry* **30**: 2171-2173
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhaes JR, Salgado I (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by Arabidopsis thaliana in response to Pseudomonas syringae. *FEBS Lett* **579**: 3814-3820
- Moir D, Stewart SE, Osmond BC, Botstein D (1982) Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**: 547-563
- Montillet JL, Chamnongpol S, Rusterucci C, Dat J, van de Cotte B, Agnel JP, Battesti C, Inze D, Van Breusegem F, Triantaphylides C (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* **138**: 1516-1526
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF (2010) NO synthesis and signaling in plants--where do we stand? *Physiol Plant* **138**: 372-383
- Mori-Konya C, Kato N, Maeda R, Yasuda K, Higashimae N, Noguchi M, Koike M, Kimura Y, Ohizumi H, Hori S, Kakizuka A (2009) p97/valosin-containing protein (VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation. *Genes Cells* **14**: 483-497
- Morreale G, Conforti L, Coadwell J, Wilbrey AL, Coleman MP (2009) Evolutionary divergence of valosin-containing protein/cell division cycle protein 48 binding interactions among endoplasmic reticulum-associated degradation proteins. *FEBS J* **276**: 1208-1220
- Muller J, Piffanelli P, Devoto A, Miklis M, Elliott C, Ortmann B, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2005) Conserved ERAD-like quality control of a plant polytopic membrane protein. *Plant Cell* **17**: 149-163
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* **59**: 501-520
- Mur LA, Santosa IE, Laarhoven LJ, Holton NJ, Harren FJ, Smith AR (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent Pseudomonas syringae Pathovars. *Plant Physiol* **138**: 1247-1258
- Murashige T, Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497
- Murgia I, Delledonne M, Soave C (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in Arabidopsis. *Plant J* **30**: 521-528

- Mustilli AC, Merlot S, Vavasseur A, Fenzi F, Giraudat J (2002) Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**: 3089-3099
- Nagahama M, Ohnishi M, Kawate Y, Matsui T, Miyake H, Yuasa K, Tani K, Tagaya M, Tsuji A (2009) UBXD1 is a VCP-interacting protein that is involved in ER-associated degradation. *Biochem Biophys Res Commun* **382**: 303-308
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* **59**: 165-176
- Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J* **29**: 487-495
- Nichols BJ, Ungermann C, Pelham HR, Wickner WT, Haas A (1997) Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* **387**: 199-202
- Noguchi M, Takata T, Kimura Y, Manno A, Murakami K, Koike M, Ohizumi H, Hori S, Kakizuka A (2005) ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *J Biol Chem* **280**: 41332-41341
- Nurnberger T, Brunner F (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 318-324
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266
- Oka Y, Cohen Y, Spiegel Y (1999) Local and Systemic Induced Resistance to the Root-Knot Nematode in Tomato by DL-beta-Amino-n-Butyric Acid. *Phytopathology* **89**: 1138-1143
- Orozco-Cardenas ML, Ryan CA (2002) Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* **130**: 487-493
- Ortmann I, Conrath U, Moerschbacher BM (2006) Exopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. *FEBS Lett* **580**: 4491-4494
- Osman H, Vauthrin S, Mikes V, Milat ML, Panabieres F, Marais A, Brunie S, Maume B, Ponchet M, Blein JP (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell* **12**: 2825-2834
- Otvos K, Pasternak TP, Miskolczi P, Domoki M, Dorjgotov D, Szucs A, Bottka S, Dudits D, Feher A (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* **43**: 849-860
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* **132**: 1241-1248
- Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J (2010) Regulation of plant glycine decarboxylase by s-nitrosylation and glutathionylation. *Plant Physiol* **152**: 1514-1528
- Panstruga R, Dodds PN (2009) Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science* **324**: 748-750
- Paris R, Lamattina L, Casalongue CA (2007) Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiol Biochem* **45**: 80-86

- Park H, Suzuki T, Lennarz WJ (2001) Identification of proteins that interact with mammalian peptide:N-glycanase and implicate this hydrolase in the proteasome-dependent pathway for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11163-11168
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007a) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113-116
- Park S, Rancour DM, Bednarek SY (2007b) Protein domain-domain interactions and requirements for the negative regulation of Arabidopsis CDC48/p97 by the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein, PUX1. *J Biol Chem* **282**: 5217-5224
- Park S, Rancour DM, Bednarek SY (2008) In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiol* **148**: 246-258
- Patel SK, Indig FE, Olivieri N, Levine ND, Latterich M (1998) Organelle membrane fusion: a novel function for the syntaxin homolog Ufe1p in ER membrane fusion. *Cell* **92**: 611-620
- Pauly N, Ferrari C, Andrio E, Marino D, Piardi S, Brouquisse R, Baudouin E, Puppo A (2011) MtNOA1/RIF1 modulates Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti nodule development without affecting its nitric oxide content. *J Exp Bot* **62**: 939-948
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794
- Peters JM, Walsh MJ, Franke WW (1990) An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF. *EMBO J* **9**: 1757-1767
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308-316
- Pieterse CM, Van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456-464
- Pieterse CM, van Wees SC, Hoffland E, van Pelt JA, van Loon LC (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-1237
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 421-426
- Planchet E, Jagadis Gupta K, Sonoda M, Kaiser WM (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* **41**: 732-743
- Ponchet M, Panabieres F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP (1999) Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell Mol Life Sci* **56**: 1020-1047
- Pozo MJ, Azcon-Aguilar C (2007) Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 393-398
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM, Azcon-Aguilar C (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to Phytophthora infection in tomato plants. *J Exp Bot* **53**: 525-534
- Prado AM, Porterfield DM, Feijo JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* **131**: 2707-2714

- Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J (1997) Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* **9**: 2077-2091
- Raasi S, Wolf DH (2007) Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 780-791
- Rabouille C, Levine TP, Peters JM, Warren G (1995) An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments. *Cell* **82**: 905-914
- Rancour DM, Dickey CE, Park S, Bednarek SY (2002) Characterization of AtCDC48. Evidence for multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants. *Plant Physiol* **130**: 1241-1253
- Rancour DM, Park S, Knight SD, Bednarek SY (2004) Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of arabidopsis CDC48. *J Biol Chem* **279**: 54264-54274
- Rao RV, Poksay KS, Castro-Obregon S, Schilling B, Row RH, del Rio G, Gibson BW, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **279**: 177-187
- Rape M, Jentsch S (2004) Productive RUPture: activation of transcription factors by proteasomal processing. *Biochim Biophys Acta* **1695**: 209-213
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* **183**: 555-563
- Rienties IM, Vink J, Borst JW, Russinova E, de Vries SC (2005) The Arabidopsis SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14lambda and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta* **221**: 394-405
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103-110
- Rodriguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2006) Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* **29**: 1532-1544
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 621-649
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Matte A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, Roepstorff P, Delledonne M (2008) Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis thaliana undergoing hypersensitive response. *Proteomics* **8**: 1459-1469
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**: 4120-4130
- Ron M, Avni A (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**: 1604-1615
- Rouhier N (2010) Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytol* **186**: 365-372
- Rowlands MG, Newbatt YM, Prodromou C, Pearl LH, Workman P, Aherne W (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Anal Biochem* **327**: 176-183
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* **5**: 725-738

- Roy L, Bergeron JJ, Lavoie C, Hendriks R, Gushue J, Fazel A, Pelletier A, Morre DJ, Subramaniam VN, Hong W, Paiement J (2000) Role of p97 and syntaxin 5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **11**: 2529-2542
- Rumer S, Gupta KJ, Kaiser WM (2009) Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *J Exp Bot* **60**: 2065-2072
- Rumpf S, Jentsch S (2006) Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* **21**: 261-269
- Rusterucci C, Espunya MC, Diaz M, Chabannes M, Martinez MC (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol* **143**: 1282-1292
- Rusterucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, Blein JP (1996) Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in Nicotiana. *Plant Physiol* **111**: 885-891
- Sang J, Jiang M, Lin F, Xu S, Zhang A, Tan M (2008) Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular anti-oxidant defense in maize plants. *J Integr Plant Biol* **50**: 231-243
- Sato BK, Hampton RY (2006) Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* **23**: 1053-1064
- Scherer GFE, Holk A (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaineaccumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation* **32**: 345-350
- Schilmiller AL, Howe GA (2005) Systemic signaling in the wound response. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 369-377
- Schorneck S, Minsavage GV, Stall RE, Jones JB, Lahaye T (2008) Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol* **179**: 546-556
- Schuberth C, Buchberger A (2008) UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2360-2371
- Schulze A, Standera S, Buerger E, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Koning F, Kloetzel PM, Seeger M (2005) The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol* **354**: 1021-1027
- Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemercier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**: 8035-8044
- Serpa V, Vernal J, Lamattina L, Grotewold E, Cassia R, Terenzi H (2007) Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* **361**: 1048-1053
- Seth D, Stamler JS (2010) The SNO-proteome: causation and classifications. *Curr Opin Chem Biol*
- Shah K, Vervoort J, de Vries SC (2001) Role of threonines in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *J Biol Chem* **276**: 41263-41269
- Shapiro AD, Zhang C (2001) The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**: 1089-1101
- Shi S, Wang G, Wang Y, Zhang L (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* **13**: 1-9

- Shimoda Y, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Sato S, Kato T, Tabata S, Higashi S, Uchiumi T (2005) Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* **46**: 99-107
- Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T (1999) Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* **11**: 709-719
- Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* **31**: 137-147
- Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* **167**: 839-847
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB, Klessig DF (2002) The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11640-11645
- Song C, Wang Q, Li CC (2003) ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *J Biol Chem* **278**: 3648-3655
- Song EJ, Yim SH, Kim E, Kim NS, Lee KJ (2005) Human Fas-associated factor 1, interacting with ubiquitinated proteins and valosin-containing protein, is involved in the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* **25**: 2511-2524
- Song F, Goodman RM (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 1458-1462
- Souza JM, Choi I, Chen Q, Weisse M, Daikhin E, Yudkoff M, Obin M, Ara J, Horwitz J, Ischiropoulos H (2000) Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* **380**: 360-366
- Srivastava N, Gonugunta VK, Puli MR, Raghavendra AS (2009) Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Planta* **229**: 757-765
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**: 675-683
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898-1902
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ (1997) (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* **18**: 691-696
- Stergiopoulos I, de Wit PJ (2009) Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 233-263
- Sticher L, Mauch-Mani B, Metraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**: 235-270
- Stohr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835-841
- Stohr C, Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J Exp Bot* **53**: 2293-2303
- Suzuki T, Park H, Till EA, Lennarz WJ (2001) The PUB domain: a putative protein-protein interaction domain implicated in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 1083-1087

- Tada Y, Mori T, Shinogi T, Yao N, Takahashi S, Betsuyaku S, Sakamoto M, Park P, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S (2004) Nitric oxide and reactive oxygen species do not elicit hypersensitive cell death but induce apoptosis in the adjacent cells during the defense response of oat. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 245-253
- Tada Y, Spoel SH, Pajeroska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952-956
- Takken FL, Tameling WI (2009) To nibble at plant resistance proteins. *Science* **324**: 744-746
- Tang X, Xiao Y, Zhou JM (2006) Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1159-1166
- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D (2009) Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *Plant J* **60**: 795-804
- Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A (1995) Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol* **109**: 1025-1031
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunol* **13**: 63-68
- Thulke O, Conrath U (1998) Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. *Plant J* **14**: 35-42
- Ton J, D'Alessandro M, Jourdie V, Jakab G, Karlen D, Held M, Mauch-Mani B, Turlings TC (2007) Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize. *Plant J* **49**: 16-26
- Trouvelot S, Varnier AL, Allegre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert JM, Pugin A, Daire X (2008) A beta-1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 232-243
- Tsuda K, Katagiri F (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 459-465
- Tucker PA, Sallai L (2007) The AAA+ superfamily--a myriad of motions. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 641-652
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EI, Scherer GF (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Cell Physiol* **47**: 346-354
- Uchiyama K, Jokitalo E, Kano F, Murata M, Zhang X, Canas B, Newman R, Rabouille C, Pappin D, Freemont P, Kondo H (2002) VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol* **159**: 855-866
- Uchiyama K, Totsukawa G, Puhka M, Kaneko Y, Jokitalo E, Dreveny I, Beuron F, Zhang X, Freemont P, Kondo H (2006) p37 is a p97 adaptor required for Golgi and ER biogenesis in interphase and at the end of mitosis. *Dev Cell* **11**: 803-816
- Van der Biezen EA, Jones JD (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 454-456
- Van der Ent S, Van Wees SC, Pieterse CM (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* **70**: 1581-1588

- van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CM (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 453-483
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**: 135-162
- Vandelle E, Poinssot B, Wendehenne D, Bentejac M, Alain P (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 429-440
- Vandermoere F, El Yazidi-Belkoura I, Slomianny C, Demont Y, Bidaux G, Adriaenssens E, Lemoine J, Hondemarck H (2006) The valosin-containing protein (VCP) is a target of Akt signaling required for cell survival. *J Biol Chem* **281**: 14307-14313
- Vauthrin S, Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Maume B, Osman H, Blein JP (1999) Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* **1419**: 335-342
- Velikova V, Pinelli P, Pasqualini S, Reale L, Ferranti F, Loreto F (2005) Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytol* **166**: 419-425
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 895-908
- Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994) Salicylic Acid Is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *Plant Cell* **6**: 959-965
- Vlot AC, Klessig DF, Park SW (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol* **11**: 436-442
- Wang Q, Song C, Li CC (2003) Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities. *Biochem Biophys Res Commun* **300**: 253-260
- Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX (2006a) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* **15**: 351-358
- Wang Y, Yun BW, Kwon E, Hong JK, Yoon J, Loake GJ (2006b) S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *J Exp Bot* **57**: 1777-1784
- Wang Y, Chen T, Zhang C, Hao H, Liu P, Zheng M, Balua Ka FE, J AA, Lin J (2009a) Nitric oxide modulates the influx of extracellular Ca and actin filament organization during cell wall construction in *Pinus bungeana* pollen tubes. *New Phytol* **182**: 851-862
- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC, Loake GJ (2009b) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem* **284**: 2131-2137
- Wawer I, Bucholc M, Astier J, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wyslouch-Cieszynska A, Zareba-Kozioł M, Krzywinska E, Dadlez M, Dobrowolska G, Wendehenne D (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J* **429**: 73-83
- Weitzberg E, Lundberg JO (1998) Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide* **2**: 1-7
- Wendehenne D, Binet MN, Blein JP, Ricci P, Pugin A (1995) Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* **374**: 203-207

- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 449-455
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1937-1951
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* **31**: 622-631
- Wielopolska A, Townley H, Moore I, Waterhouse P, Helliwell C (2005) A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnol J* **3**: 583-590
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322 (Pt 3)**: 681-692
- Xing H, Tan L, An L, Zhao Z, Wang S, Zhang C (2004) Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regulation* **42**: 61-68
- Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10104-10109
- Yamamoto A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2004) Involvement of nitric oxide generation in hypersensitive cell death induced by elicitor in tobacco cell suspension culture. *Journal of General Plant Pathology* **70**: 85-92
- Yamamoto M, Kawanabe M, Hayashi Y, Endo T, Nishikawa S (2010) A vacuolar carboxypeptidase mutant of Arabidopsis thaliana is degraded by the ERAD pathway independently of its N-glycan. *Biochem Biophys Res Commun* **393**: 384-389
- Yamasaki H, Cohen MF (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* **11**: 522-524
- Yamashita M, Ojima N, Sakamoto T (1996) Induction of proteins in response to cold acclimation of rainbow trout cells. *FEBS Lett* **382**: 261-264
- Ye Y (2006) Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase. *J Struct Biol* **156**: 29-40
- Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA (2005) Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 14132-14138
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retrotranslocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**: 841-847
- Yeung HO, Kloppsteck P, Niwa H, Isaacson RL, Matthews S, Zhang X, Freemont PS (2008) Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochem Soc Trans* **36**: 62-67
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* **43**: 1473-1483
- Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15811-15816

- Zhang A, Jiang M, Zhang J, Ding H, Xu S, Hu X, Tan M (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol* **175**: 36-50
- Zhang L, Wang Y, Zhao L, Shi S (2006) Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *J Plant Physiol* **163**: 818-826
- Zhang S, Klessig DF (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7225-7230
- Zhang S, Liu Y, Klessig DF (2000) Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* **23**: 339-347
- Zhao G, Zhou X, Wang L, Li G, Schindelin H, Lennarz WJ (2007) Studies on peptide:N-glycanase-p97 interaction suggest that p97 phosphorylation modulates endoplasmic reticulum-associated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8785-8790
- Zhao L, He J, Wang X, Zhang L (2008) Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J Plant Physiol* **165**: 182-191
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiol* **134**: 849-857
- Zhong X, Shen Y, Ballar P, Apostolou A, Agami R, Fang S (2004) AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* **279**: 45676-45684
- Zhou B, Guo Z, Xing J, Huang B (2005) Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *J Exp Bot* **56**: 3223-3228
- Zimmerli L, Metraux JP, Mauch-Mani B (2001) beta-Aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **126**: 517-523
- Zipfel C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 10-16
- Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 414-420
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760
- Zottini M, Costa A, De Michele R, Ruzzene M, Carimi F, Lo Schiavo F (2007) Salicylic acid activates nitric oxide synthesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **58**: 1397-1405
- Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P (1999) Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* **1411**: 250-262
- Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P (1995) Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* **1**: 804-809

ANNEXES

Liste des publications réalisées pendant ce travail de thèse

Astier J, Besson-Bard A, Wawer I, Parent C, Rasul S, Jeandroz S, Dat J, Wendehenne D (2010) Nitric Oxide Signalling in Plants: Cross-Talk With Ca²⁺, Protein Kinases and Reactive Oxygen Species. In *Annual Plant Reviews Volume 42*, pp 147-170. Wiley-Blackwell

Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C, Wendehenne D S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* **Sous presse, manuscript accepté**

Wawer I, Bucholc M, **Astier J**, Anielska-Mazur A, Dahan J, Kulik A, Wyslouch-Cieszyńska A, Zareba-Kozioł M, Krzywinska E, Dadlez M, Dobrowolska G, Wendehenne D (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J* **429**: 73-83

Besson-Bard A, **Astier J**, Rasul S, Wawer I, Dubreuil-Maurizi C, Jeandroz S, Wendehenne D (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Science* **177**: 302-309

Dahan J, Wawer I, Besson-Bard A, **Astier J**, Gauthier A, Bourque S, Lamotte O, Jeandroz S, Dobrowolska G, Wendehenne D. (2009) Nitric oxide signaling in tobacco cells elicited by cryptogein : interplays with calcium and protein kinases. In Antoun H, Avis T, Brisson L, Prévost D, Trepanier M (eds.), *Biology of Plant-Microbe Interactions*. The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN, Vol. 7, pp. 1-7.

Publications soumises ou en cours d'écriture

Koen E, Besson-Bard A, Duc C, **Astier J**, Gravot A, Richaud P, Lamotte O, Gaymard F, Wendehenne D *Arabidopsis thaliana* Nicotianamine Synthase 4 (AtNAS4) is Required for Proper Response to Iron Deficiency and to Cadmium Supply. **en préparation**

La Camera S, L'Haridon F, **Astier J**, Zander M, Abou-Mansour E, Page G, Thurow C, Wendehenne D, Gatz C, Metraux J, Lamotte O. The glutaredoxin ATGRXS13 is required for *Arabidopsis* susceptibility to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *The Plant Journal*, **encouragé à resoumettre**

Liste des communications réalisées pendant de ce travail de thèse

Communications orales

15 et 16 Juillet 2010 : Third Plant NO club meeting, Olomouc (République Tchèque). *Identification and Characterization of NO Target Proteins in Cryptogein Elicited-Tobacco Cells.*

22 et 23 Octobre 2009 : Congrès 2009 du Club NO, Paris. *Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote dans les réponses de défenses induites chez le tabac par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense.*

25 et 26 Juin 2009 : XVe Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Bourgogne, Dijon. *Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote dans les réponses de défenses induites chez le tabac par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense.* Prix du Jury

Communications affichées

7-10 Juillet 2009 : Plant ROS Congress, Helsinki (Finlande). *Nitric oxide plays a central role in iron homeostasis and in Cd²⁺ resistance in Arabidopsis thaliana by regulating iron transport and nicotianamine synthesis*

12 et 13 juin 2008 : XIVe Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Franche-Comté, Besançon. *Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote dans les réponses de défenses induites chez le tabac par la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense.*

Publication 2 : *Regulation of Nicotiana tabacum osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity*



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci

Review

S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants

Jérémy Astier^a, Sumaira Rasul^a, Emmanuel Koen^a, Hamid Manzoor^a, Angélique Besson-Bard^a, Olivier Lamotte^a, Sylvain Jeandroz^b, Jörg Durner^c, Christian Lindermayr^c, David Wendehenne^{a,*}

^a UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, Plante-Microbe-Environnement, F-21065 Dijon cedex, France

^b UPSP Plante-Redox-Signalisation-Stress, AgroSup-Dijon, 26 Boulevard du Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

^c Institute of Biochemical Plant Pathology, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, D-85764 Neuherberg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2011

Received in revised form 21 February 2011

Accepted 22 February 2011

Available online xxx

Keywords:

Nitric oxide

Plant

Post-translational protein modifications

S-nitrosothiol

S-nitrosylation

ABSTRACT

Increasing evidences support the assumption that nitric oxide (NO) acts as a physiological mediator in plants. Understanding its pleiotropic effects requires a deep analysis of the molecular mechanisms underlying its mode of action. In the recent years, efforts have been made in the identification of plant proteins modified by NO at the post-translational level, notably by S-nitrosylation. This reversible process involves the formation of a covalent bond between NO and reactive cysteine residues. This research has now born fruits and numerous proteins regulated by S-nitrosylation have been identified and characterized. This review describes the basic principle of S-nitrosylation as well as the Biotin Switch Technique and its recent adaptations allowing the identification of S-nitrosylated proteins in physiological contexts. The impact of S-nitrosylation on the structure/function of selected proteins is further discussed.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
2. Process of S-nitrosylation/de-nitrosylation	00
3. Detection and identification of S-nitrosylated proteins	00
4. Function of S-nitrosylated proteins in plants	00
5. Concluding remarks	00
Acknowledgements	00
References	00

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is an ubiquitous diatomic gas involved in a large panel of physiological functions in all kingdoms [1]. Notably, over the last decades, NO has been shown to be involved in various processes in plants, such as germination, root growth, stomatal closure, flowering, gravitropism, cell death and adaptive responses to biotic and abiotic stresses [1,2].

In its radical form (NO[•]), NO has a single electron in its 2p- π antibonding orbital and its half life is assumed to be on the order of seconds. Loss of this electron gives nitrosonium cation (NO⁺) while the addition of an extra electron to this orbital leads to nitroxyl radical (NO⁻), both compounds displaying distinct properties and

reactivities. Therefore, in this review, the term NO is used to refer to NO[•], NO⁻ and NO⁺. The biological effects of NO are determined by its chemical reactions with a large panel of molecules ranging from dioxygen to proteins, lipids and nucleic acids. In particular, NO affects the activity of numerous proteins by promoting post-translational modifications through S- or metal-nitrosylation and tyrosine (Tyr) nitration. To date, over 200 different proteins have been found to be regulated through these NO-dependent processes which are involved in a large variety of cellular functions and signaling events.

Metal-nitrosylation refers to the binding of NO to the transition metal of metalloproteins. Indeed, as an electron donor, NO[•] reacts with transition metals such as iron, copper or zinc, thus leading to the formation of metal-nitrosyl complexes. For instance, in animals, one of the physiologically most relevant actions of NO is the activation of soluble guanylate cyclase. More precisely, NO binds to the heme of the enzyme and triggers a conformational change

* Corresponding author. Tel.: +33 380693722; fax: +33 380693226.

E-mail address: wendehen@dijon.inra.fr (D. Wendehenne).

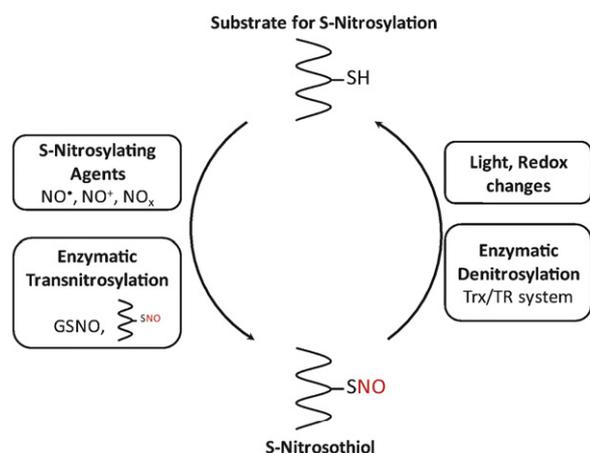


Fig. 1. Basic principle of S-nitrosylation. S-nitrosylation occurs on specific Cys residue and is mediated by reactive nitrogen species including NO^\bullet , NO^+ and NO_x , such as N_2O_3 , as well as by transnitrosylating agents, notably GSNO. Once formed, S-nitrosothiols are very labile and sensitive to light and redox changes. Furthermore, denitrosylation might be catalyzed enzymatically by the thioredoxine/thioredoxine reductase system (Trx/TR).

that increases the catalysis of the second messenger cyclic GMP [3]. In plants, reaction of leghemoglobin (Lb) with NO through metal nitrosylation has been reported in symbiotic interactions and is thought to be part of a Lb recycling process or a protection against NO burst [4].

Tyr nitration corresponds to the addition of a NO_2^+ group to Tyr residues, thus leading to 3-nitrotyrosine. NO_2^+ originates from nitrogen dioxide (NO_2), a potent oxidizing agent resulting from the reaction between NO and O_2 , or from peroxyxynitrite (ONOO^-). ONOO^- is also a powerful oxidant produced following the interaction between NO^\bullet and superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Under physiological conditions, ONOO^- reacts with CO_2 to give the carbonate radical ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) and NO_2 , and therefore acts as a main nitrating agent. In animals, Tyr nitration has been shown to increase protein susceptibility to proteolysis [5] and most of the proteins which are known to be Tyr nitrated *in vivo* are inhibited by this process [6]. The evidence for nitration as a transduction mechanism is also supported in different studies. In plants, an increase in the pattern of nitrated proteins under stress conditions has been reported in different species and first proteins undergoing this post-translational modification have been identified ([7–9]; these aspects are also covered in this special issue).

S-nitrosylation refers to the covalent binding of a NO group to cysteine (Cys) residues of targets proteins, thus leading to S-nitrosothiols [10]. Recently, a strong interest has been raised in the identification and functional characterization of plant proteins regulated through S-nitrosylation [11–13].

In this article, we first describe the mechanisms underlying the process of S-nitrosylation and introduce the Biotin Switch method developed to detect S-nitrosylated proteins *in vivo*. The function of the S-nitrosylated proteins identified in plants is further discussed.

2. Process of S-nitrosylation/de-nitrosylation

As mentioned above, S-nitrosylation designates the reaction of NO with the sulfur atom of Cys residue to form an S–NO bond (Fig. 1). S-nitrosylation requires preliminary reaction of NO^\bullet with O_2 via the formation of higher nitrogen oxides, notably N_2O_3 , which further dissociate into NO^+ . Thus, conventionally, S-nitrosylation refers to the electrophilic attack of NO^+ on thiolate. However, there is also evidence that the formation of the S–NO bonds results from the nucleophilic attack of relatively electropositive sulfur of Cys residue by NO^- or from the reaction between thyl radical

(RS^\bullet) and NO^\bullet [13,14]. Besides these mechanisms, transnitrosylation appears to be an important process explaining the nitrosylation of Cys residues presenting non-optimal reactive thiols (Fig. 1). Transnitrosylation consists in the direct exchange of NO^+ from a S-nitrosylated protein to a reactive thiolate of a target protein. Transnitrosylation involves low molecular weight S-nitrosothiols such as nitrosoglutathione (GSNO). GSNO is formed primarily by S-nitrosylation of glutathione (GSH), a major regulator of the cellular redox state. GSNO is a major small molecular weight S-nitrosothiol and may serve as an endogenous reservoir of NO for S-nitrosylation in cells and extracellular fluids [14]. Biochemical and genetic studies carried out both in animals and plants led to the identification of GSH-dependent formaldehyde dehydrogenase, also named GSNO reductase (GSNOR), a key enzyme metabolizing GSNO into ammonia and GSH disulfide (GSSG). Interestingly, *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in the expression of GSNOR displayed an increased level of S-nitrosothiols, suggesting that GSNO contributes to the regulation of the S-nitrosothiol content [14–16]. Finally, in animals, several enzymes have been shown to possess transnitrosylase activity (reviewed by [17]). For instance, in animals, hemoglobin and ceruloplasmin, which bind NO to their respective heme and copper centers, transfer the NO group to target Cys [17,18].

Although most proteins possess Cys residues, only some of them are specifically regulated by S-nitrosylation *in vivo* and, therefore, contribute to the NO-dependent modulation of protein function [19,20]. This specificity is governed by several factors. Firstly, S-nitrosothiol formation can be favored in more ionisable Cys residues, such as those surrounded by acidic and basic amino acid residues. Based on this observation, Stamler et al. defined a consensus S–NO motif for S-nitrosylation [21]. The flanking acidic and basic residues could not only be adjacent to the reactive Cys in the primary sequence, but also might be in its proximity only in the three-dimensional structure of the protein [22]. Secondly, hydrophobic compartments into proteins might promote S-nitrosylation of resident Cys residue. This concept relies on the fact that hydrophobic cores within proteins can concentrate NO and O_2 and therefore enable the formation of S-nitrosylation agents [17]. Novel software for the prediction of S-nitrosylation sites was recently developed [23] and is available on line (<http://sno.biocuckoo.org/online.php>). These prediction results should be useful for experimental analysis of protein of interest as well as for screening proteins potentially regulated through this post-translational modification. More generally, factors increasing the nucleophilicity of the sulfur atom of Cys residues, including protein folding and allostery, tend to promote its S-nitrosylation. Besides these intramolecular aspects, the colocalization of NO sources with key proteins targeted for S-nitrosylation is assumed to contribute to the specificity of S-nitrosylation. Supporting this assumption, a NO signaling module consisting of a NO synthase (NOS) spatially confined within NO targets such as small G proteins, the soluble guanylate cyclase and the N-methyl D-aspartate receptor has been described in neurons (for review see [10]). Such molecular complexes might increase the efficiency and specificity of S-nitrosylation.

As classical post-translational protein modifications, S-nitrosylation is a reversible mechanism. The S–NO bond formed by S-nitrosylation is indeed highly labile and light and redox sensitive (Fig. 1). Consequently, the S–NO bond can be lost by the action of intracellular reducing agents such as GSH and ascorbate and also reduced metal ions. Nevertheless, in regard to the importance of S-nitrosylation in numerous biological processes, denitrosylation of proteins must be subjected to a tight controlled regulation. In this regard, accumulating evidences indicate that specific enzymes can catalyse denitrosylation and, therefore, govern the level of S-nitrosylation of proteins (Fig. 1). In animals, the enzymes dis-

playing denitrosylase activity include protein disulfide isomerase, xanthine oxidase, carbonyl reductase, GSH peroxidase, superoxide dismutase and the thioredoxine/thioredoxine reductase (Trx/TR) system (reviewed by [24]). The example of the Trx/TR system is particularly relevant. Indeed, in human cells undergoing cell death, reduced-Trx denitrosylates a subpopulation of mitochondrial caspase 3 constitutively S-nitrosylated and, as such, is inhibited. This denitrosylation promotes the activation of this subpopulation and leads to apoptosis [25]. The involvement of Trx as a denitrosylating factor is not restricted to animal cells and has been recently reported in the context of the regulation of NPR1 (for non-expressor of pathogenesis-related gene 1) in *A. thaliana*. More precisely, NPR1, one of the major regulators of plant defense responses, is localized in the cytosol as an inactive oligomeric form maintained through intermolecular disulfide bonds [26]. In cells challenged with pathogens, the oligomeric-NPR1 is reduced and consequently released monomers are translocated to the nucleus where they promote the transcriptional activation of defense-related genes ([27]; see also Section 4). Interestingly, Tada et al. [28] reported that the S-nitrosylation of NPR1 facilitates its oligomerization whereas Trx directly catalyses the NPR1 oligomer–monomer exchange, thus releasing active monomers.

In summary, S-nitrosylation/denitrosylation are dynamic processes involving an array of NO-derived species, reducing agents and redox-related enzymes. Furthermore, this process appears to be influenced by the molecular environment of the reactive Cys, and by the allostery and subcellular localization of the proteins.

3. Detection and identification of S-nitrosylated proteins

As discussed previously, S-nitrosylation is a very labile covalent modification. Therefore, identification of proteins regulated through S-nitrosylation/denitrosylation remains a challenging task.

A first specific strategy consists in measuring the level of NO released from proteins of interest immunoprecipitated from protein extracts. Technically, NO is displaced from the S-nitrosylated proteins by photolysis or transition metals, such as copper or mercury. The measurement of the NO released is performed *via* different methods, such as chemiluminescence, colorimetry, fluorescence or electrochemistry [13,29].

A second strategy, commonly named the Biotin Switch Technique (BST), has proven to be a very efficient tool for identifying S-nitrosylated proteins *in vivo*. The BST, first developed by Jaffrey and Snyder [30], consists in the specific labeling of S-nitrosylated proteins by replacing their nitrosothiol group by a biotin tag. Fig. 2 describes the three steps of the BST and variant methods derived from the protocol initially published by Jaffrey and Snyder [30]. In the first step, free Cys of proteins are blocked by S-methylthiolation by addition of methylmethane thiosulfonate (MMTS). Then, nitrosothiols are specifically reduced by ascorbate. Finally, resulting free thiols are labeled with biotin-HPDP (N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide). Free thiol S-methylthiolation and nitrosothiol reduction are two critical steps, as complete free thiol blocking and selective ascorbate reduction are necessary to avoid non specific detections. Adequate controls are therefore available to check the efficiency and specificity of those steps [31]. Once biotinylated, the proteins are either immunodetected by western blot using antibodies raised against biotin, or purified by affinity using affinity beads such as streptavidin or neutravidin before their identification by mass spectrometry analyses.

In recent years, the BST technique has been improved (Fig. 2). Firstly, to precisely identify the S-nitrosylated sites of proteins, Hao et al. [32] developed the SNOSID technique (S–NO site identifi-

cation). In this technique, the biotinylation step is followed by a tryptic digestion of the proteins prior to the affinity purification. This procedure allows the selective purification of peptides containing the S-nitrosylated sites, which are further identified by mass spectrometry analysis (Fig. 2). Secondly, in the His-Tag switch setup by Camerini et al. [33], biotin-HPDP is replaced by an His-tag, thus converting S-nitrosylated proteins into His-tagged ones. Then, the tagged proteins are immunodetected using an anti-His-antibody or purified *via* Ni-beads. One key advantage of this method is that the His-tag is kept during the purification procedure and, therefore, the labeled Cys residues can be directly identified by mass spectrometry analysis. Thirdly, for comparative analysis between biological samples, a technique combining fluorescent labeling and bidimensional (2D) gel electrophoresis has been developed [34]. This method is named SNO-DIGE (S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis). Briefly, three protein samples are used: one is extracted from a biological source exposed to NO and contains S-nitrosylated proteins, the two others (called control and standard, respectively) are from the same biological source but unexposed to NO. After blocking of the free protein thiols and reduction of the S-nitrosothiols, both control and NO-treated samples are labeled with the fluorescent dye Cy5 (indodicarbocyanine, false coloured red fluorescence) whereas the standard sample is labeled with the fluorescent dye Cy3 (indodicarbocyanine, false coloured green fluorescence). Then, the Cy3-labeled standard sample is pooled with either the Cy5-labeled control or the Cy5-labeled NO-treated samples. Combined samples are resolved by 2D gel electrophoresis and analyzed for red and green fluorescence. The protein spots showing a red fluorescence in the gel corresponding to the NO-treated samples, but not in the gel corresponding to the control samples, are supposed to be S-nitrosylated. Spots can be further excised for mass spectrometry analyses. Fourthly, Forrester et al. [35] described a method consisting in a resin-assisted-capture of S-nitrosylated protein (SNO-RAC). After reduction of the S-nitrosothiols, the resulting free thiols form covalent bonds with a thiol-reactive resin instead of biotin-HPDP. This resin makes the direct purification of proteins possible, avoiding the labeling step of BST. Reducing the number of steps enables a more sensitive identification of S-nitrosylated proteins. Indeed, a side-by-side comparison of SNO-RAC and BST shows that SNO-RAC is more efficient for the detection of proteins with high molecular weight [35]. Moreover, since proteins react covalently with the resin, an on-resin trypsin digestion is possible, allowing an easy identification of S-nitrosylation sites of the proteins (Fig. 2). Finally, a method using organic phenylmercury compounds has been recently set up. It is based on the reactivity between phenylmercury compounds with S-nitroso-Cys yielding thiol-mercury bonds. Using agarose-coupled or biotin-coupled mercury compounds, a direct capture of S-nitrosothiols is therefore possible. This direct reaction, which is assumed to be highly specific, enables the accurate detection of S-nitrosylation sites, avoiding the reduction step with ascorbate [36].

Taken together, all these techniques allow the detection and identification of nitrosylated proteins. However, because of the labeling step, they are indirect. To date, several analytical methods based on mass spectrometry also allow direct detection of S-nitrosylated proteins. Nevertheless, the direct detection of S-nitrosylated proteins by mass spectrometry is primary hindered by the labile character of S–NO bonds. Indeed, in addition to chemical degradation of nitrosothiols during the experimental procedure, the ionization process can result in the release of NO from the Cys residues. Nevertheless, this difficulty can be overcome by applying gentle ionization conditions. Using such procedure, some peptides showing a typical +29 Da switch as compared to the corresponding non-S-nitrosylated peptides have been characterized by mass spectrometry [32,37–39]. Moreover, besides proteins, S-

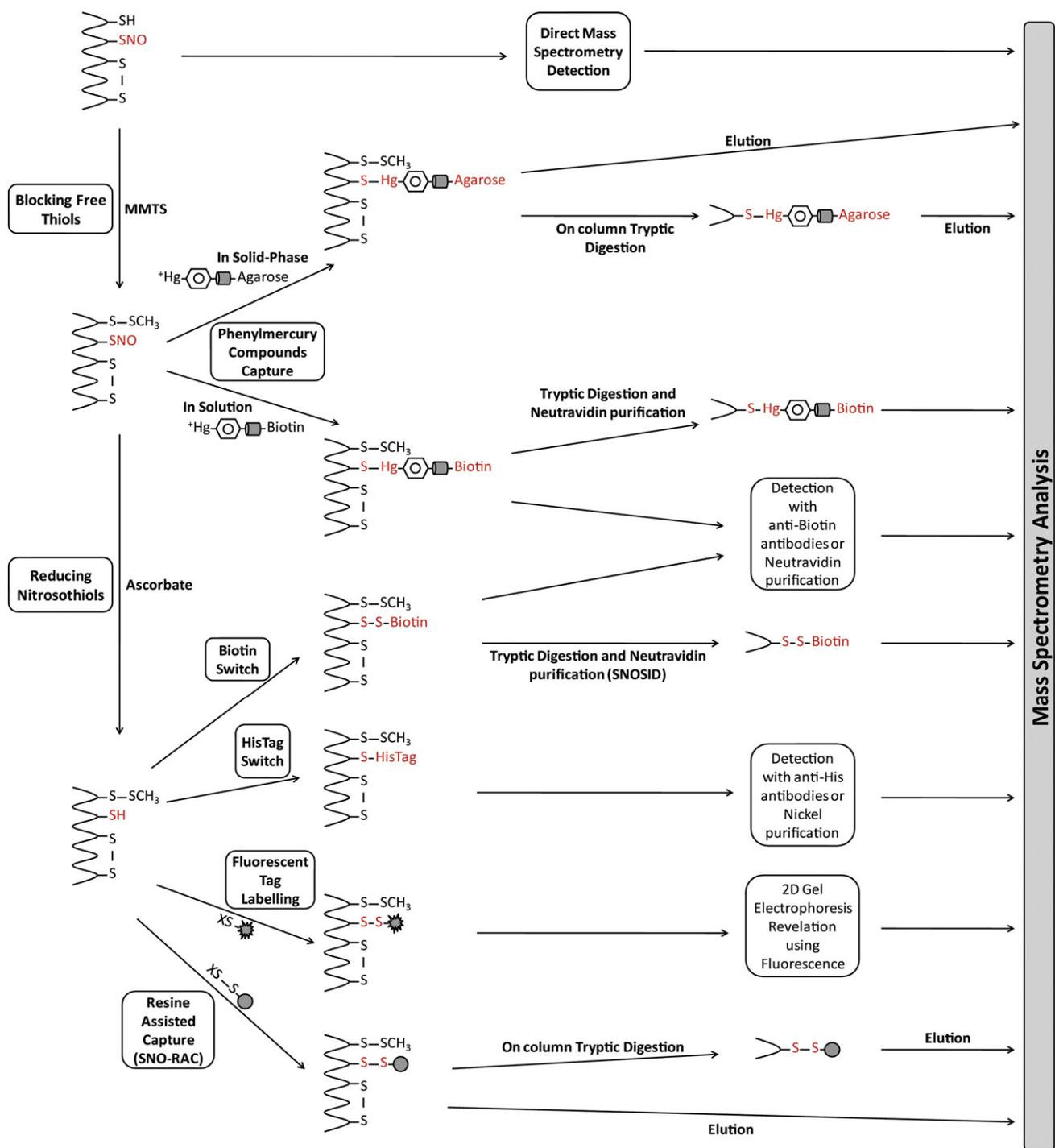


Fig. 2. Principles of the Biotin Switch Technique (BST) and related methods for the detection and identification of S-nitrosylated proteins. BST includes three steps. In the first step, free thiols are blocked by methylthiolation using MMTS. Further to a second step consisting in the reduction of nitrosothiol by ascorbate, reduced thiols are labeled using biotin linker, His-tag or fluorescent linker in the last step. Detection of tagged-proteins is allowed by anti-biotine antibody, anti-His antibody or fluorescence, respectively. Further purifications of tagged proteins, submitted or not to enzymatic digestion, require affinity chromatography before mass spectrometry identification. Proteins can also react with a thiol-reactive resin allowing on-resin enzymatic digestion before mass spectrometry analysis. Through this procedure, the labeling and the purification step (SNO-RAC) are performed simultaneously. The high reactivity of phenylmercury compounds with S-nitrosothiols permits the labeling of methylthiolated S-nitrosylated proteins directly, avoiding the ascorbate reduction step. Using biotin-coupled or resin-coupled phenylmercury compounds, different purification and detection assays can be achieved. In parallel to these indirect techniques, direct identification of S-nitrosylated proteins using mass spectrometry analysis can be performed.

nitrosylated phytochelatin (PC) extracted from cadmium-treated *A. thaliana* plants have been directly identified through mass spectrometry analysis [38]; a detailed protocol for *in vivo* detection of S-nitrosylated PC is available in Torta et al. [40]. However, it should be mentioned that the majority of the S-nitrosylated

proteins or peptides directly detected through mass spectrometry corresponds to purified recombinant proteins, commercial or synthetic compounds [32,37]. In other words, the direct identification of S-nitrosylated proteins from crude extracts remains a challenge.

4. Function of S-nitrosylated proteins in plants

To date, a total of six studies aiming at identifying plant S-nitrosylated proteins on a proteome-wide scale have been carried out. In all these investigations, the classical BST was used with minor modifications [20,41–45]. In their pioneer study, Lindermayr et al. [43] identified 52 and 63 proteins undergoing S-nitrosylation in *A. thaliana* seedlings exposed to gaseous NO or cell culture extracts treated with GSNO, respectively. These proteins participate to a wide range of cellular functions, including metabolism, signaling, stress responses, redox homeostasis and cellular architecture. A second study enabled the identification of 16 proteins specifically S-nitrosylated during the development of the hypersensitive response in *A. thaliana* seedlings exposed to pathogenic infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* [44]. Here too, the proteins of interest were mainly involved in stress responses, signaling and metabolism. Protein S-nitrosylation was also investigated in subcellular organelles. More precisely, Palmieri et al. [20] identified 11 protein candidates for S-nitrosylation in mitochondria of *A. thaliana* leaves incubated with the trans-nitrosylating agent GSNO. These proteins include glycine decarboxylase (GDC), a major component of the photorespiratory system (see below). The other proteomic approaches were performed in the crassulacean acid metabolism plant *Kalanchoe pinnata*, in *Brassica juncea* and citrus. In the two first plant species, treatment with GSNO or cold stress led to the identification of a dozen of S-nitrosylated proteins related to carbon, nitrogen or sulfur metabolism, photosynthesis, cytoskeleton, DNA replication and plant defense responses [41,42]. In citrus (*Citrus aurantium* L.), about fifty S-nitrosylated proteins were identified, putatively involved in mechanisms underlying the ability of NO to increase the plant resistance to high salinity. They belong once again to different functional classes, from metabolism to stress responses [45].

In addition to the proteome-wide scale analyses, case studies were focused on given S-nitrosylated proteins in order to investigate the structural, functional and physiological impact of this post-translational modification. To date, a dozen of S-nitrosylated proteins have been tightly characterized (Table 1). The *A. thaliana* non-symbiotic hemoglobin AHb1 was the first protein identified as target for S-nitrosylation in plants [46]. AHb1 was found to be S-nitrosylated *in vitro* as well as *in vivo* in transgenic *A. thaliana* plants overexpressing the corresponding mRNA. According to the authors, the S-nitrosylation of AHb1 represents a mean for scavenging NO during the nitrosative stress associated with hypoxia. Interestingly, the NO scavenging activity of AHb1 did not contribute to the modulation of the NO production during the hypersensitive response, suggesting that this protective effect might be restricted to particular stresses. Besides AHb1, the impact of the S-nitrosylation of peroxiredoxin II E (PrxIIIE) [47], salicylic acid-binding protein 3 (AtSABP3) [48], NPR1 (see above); [28], TGA1 [49], glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [50], S-adenosyl-methionine synthetase 1 (SAMS1) [51] and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) [41] in plant or cell suspensions exposed to (a)biotic stresses was also investigated. *A. thaliana* PrxIIIE was demonstrated to undergo S-nitrosylation during the progression of the hypersensitive response triggered by an avirulent strain of *P. syringae* [44]. This enzyme possesses an ONOO⁻ reductase activity and, interestingly, *in vitro* S-nitrosylation of Cys 121 resulted in the loss of this activity. *In planta*, this process leads to an increase of protein Tyr nitration, highlighting a key role for PrxIIIE in controlling the endogenous level of ONOO⁻ [47]. AtSABP3 is another example of *A. thaliana* proteins regulated through S-nitrosylation during the development of disease resistance against an avirulent strain of *P. syringae*. This chloroplastic protein binds salicylic acid (SA) and possesses a carbonic anhydrase (CA) activity which contributes to the expression of defense

responses [52]. The S-nitrosylation of Cys 280 of AtSABP3 was reported to decrease both its SA-binding and CA activity, leading to an increased sensibility of the plant to the bacterial pathogen [48]. The relevance of S-nitrosylation in proteins related to plant resistance against pathogens has been recently reinforced by the work of Lindermayr et al. [49]. NPR1 and TGA1, a member of the TGACG motif binding factors (TGA), are key redox-controlled regulators of systemic acquired resistance in plants. NPR1 monomers interact with the reduced form of TGA1, which targets the activation sequence-1 element of the promoter regions of defense genes. The conformation of TGA1 is organized by four Cys residues. Under oxidizing conditions, TGA1 forms disulfide bonds between Cys 172/Cys 287 and Cys 260/Cys 266 leading to an inactive conformation. However, treatment of TGA1 with GSNO results in S-nitrosylation/S-glutathionylation and conformational alteration of the transcription factor. Especially the redox-status of Cys 172 and Cys 287 is important for the intramolecular structure of TGA1 and opening of the disulfide bond between these two Cys residues and their GSNO-dependent modification positively affects DNA binding activity of this transcription factor. More interestingly, GSNO also enhances the NPR1-mediated DNA binding activity of TGA1. Probably, GSNO-dependent modifications of TGA1 and/or NPR1 result in a more effective NPR1–TGA1 interaction and consequently a more effective DNA binding activity of TGA1. On the other side, it is also possible that the GSNO-dependent modifications just protect TGA1 from formation of disulfide bonds, which would result in lower DNA-binding activity of TGA1. It should be mentioned that besides TGA transcription factors, the possibility that the activity of members of the R2R3-MYB family of transcription factors might be modulated through S-nitrosylation has been also examined [53]. This study pointed to *A. thaliana* MYB2 as target for NO and demonstrated that the S-nitrosylation of residue Cys 53 inhibited the DNA binding activity of this transcription factor.

Finally, the glycolytic enzyme GAPDH completes the list of proteins identified as being S-nitrosylated in plant challenged by environmental stresses. In *A. thaliana* and tobacco, *in vitro* experiments provided evidence that GAPDH activity is inhibited through S-nitrosylation of its catalytic Cys residues [43,50,54]. Furthermore, a recent study performed in tobacco cell suspensions revealed that GAPDH also undergoes a fast and transient S-nitrosylation in response to a salt stress [50]. This S-nitrosylation concerns only a small proportion of GAPDH population and does not affect the glycolysis. However, in this context, GAPDH directly interacts with the protein kinase NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase), a member of the SnRK2 protein kinase family previously shown to be rapidly activated through NO in response to salt and hyperosmotic stresses [1,50,55]. This situation resembles those described in animal cells and yeast in which S-nitrosylated GAPDH was reported to convey oxidative and nitrosative signaling by interacting with E3 ligase, protein kinases and substrates of these protein kinases [56,57]. Whether S-nitrosylated GAPDH acts as a phosphorelay recruiting protein substrates for NtOSAK remains to be established but is certainly a promising challenge.

In addition to GAPDH, SAMS and GDC are two other metabolic enzymes in which regulation through S-nitrosylation has been precisely examined. SAMS1 catalyses the synthesis of S-adenosylmethionine (AdoMet), a key precursor for the biosynthesis of ethylene (ET), polyamines (PA), GSH and nicotianamine [58]. Amongst the three SAMS isoforms of *A. thaliana*, only SAMS1 has been demonstrated to be S-nitrosylated *in vitro* [51]. S-nitrosylation led to the inhibition of the enzyme and occurred on Cys 114 which is located close to the substrate binding site of the enzyme. In regard to the metabolic pathways in which AdoMet acts as a precursor, the S-nitrosylation of SAMS1 might influence ET-mediated processes as well as PA-mediated NO synthesis [13]. Concerning GDC, the three subunits GDC H1 and glycine dehydrogenase P1 and P2 were

Table 1
List of plant S-nitrosylated proteins tightly characterized.

Protein identified	Organism	Effect of S-nitrosylation	References
Non-symbiotic hemoglobin	AtHb1 <i>A. thaliana</i>	NO detoxification	[46]
Prometacaspase 9	AtMC9 <i>A. thaliana</i>	Inhibition of autoprocessing and activity	[19]
S-adenosylmethionine synthetase 1	SAMS1 <i>A. thaliana</i>	Inhibition of activity	[51]
Peroxiredoxine II E	PrxII E <i>A. thaliana</i>	Inhibition of activity	[47]
MYB domain protein 2	AtMYB2 <i>A. thaliana</i>	Inhibition of DNA Binding	[53]
Non expressor of pathogenesis related genes 1	NPR1 <i>A. thaliana</i>	Conformational changes	[28]
Salicylic acid-binding protein 3	AtSABP3 <i>A. thaliana</i>	Inhibition of activity and SA binding	[48]
TGAGG motif binding factor 1	TGA1 <i>A. thaliana</i>	Conformational and DNA/NPR1 binding behaviour changes	[49]
Phytochelatin	PC <i>A. thaliana</i>	ND	[38]
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH <i>A. thaliana</i>	Inhibition of activity	[43,54]
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH <i>N. tabacum</i>	Inhibition of activity	[50]
Glycine decarboxylase	GDC <i>A. thaliana</i>	Inhibition of activity	[20]
Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase	Rubisco <i>K. pinnata</i>	Inhibition of activity	[42]
Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase	Rubisco <i>B. juncea</i>	Inhibition of activity	[41]

found to be S-nitrosylated [20]. Here too, this process was correlated to an inhibition on the enzyme. However, the loss of activity was not only due to NO but also due to the S-glutathionylation of several Cys residues. The physiological relevance of this finding was assessed by the demonstration that GDC inhibition is part of the stress-related response triggered by the bacterial elicitor harpin. Other examples of metabolic enzymes regulated *via* S-nitrosylation include Rubisco [42]. S-nitrosylation of Rubisco might partly contribute to its inactivation occurring in response to cold-stress in *B. juncea* [41].

Finally, *A. thaliana* metacaspase 9 (AtMC9) is an original example of how NO modulates enzyme activity. *In vivo*, the zymogen of AtMC9 is constitutively S-nitrosylated at residue Cys 147 [19]. This post-translational modification impairs both the autoprocessing and proteolytic activities of AtMC9, thus avoiding inappropriate activation of the enzyme. Interestingly, S-nitrosylation of the processed mature form of AtMC9 does not affect its activity. Based on structural analysis, it has been proposed that this unexpected regulation is due to a second NO-insensitive catalytic Cys residue which acts as an alternative nucleophile for catalyzing the proteolytic reaction. This work also highlights the concept that some protein Cys residues are more susceptible to NO-induced modification than others.

5. Concluding remarks

S-nitrosylation has recently emerged as an important post-translational modification of proteins and is becoming an intensive field of research in plants. Through the benefits of the BST and recent improved methods, numerous proteins subjected to S-nitrosylation have been identified and first structural analyses of the incidence of this modification provided insights as to how NO-induced effects are achieved. However, while the number of candidates for S-nitrosylation is increasing, with few exceptions the physiological relevance of the S-nitrosylation process has been poorly investigated. Therefore, a major challenge will be to confirm functionality of reactive Cys as NO-sensor *in vivo* and to investigate how their regulation by NO impacts biological processes. Such investigation will also help in further understand the functions of NO described so far, such as the regulation of Ca²⁺ fluxes [59], iron uptake [60] or gene expression [61].

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (program BLAN072.184783), the Conseil Régional de Bourgogne (No. 2010-9201CPERO004S01401) and the Taste-Nutrition-Health Network Innovation VITAGORA.

References

- [1] A. Besson-Bard, A. Pugin, D. Wendehenne, New insights into nitric oxide signaling in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 21–39.
- [2] I.D. Wilson, S.J. Neill, J.T. Hancock, Nitric oxide synthesis and signalling in plants, *Plant Cell Environ.* 31 (2008) 622–631.
- [3] S.P.L. Cary, J.A. Winger, E.R. Derbyshire, M.A. Marletta, Nitric oxide signaling: non longer simply on or off, *Trends Biochem. Sci.* 31 (2006) 231–239.
- [4] M. Angelo, A. Hausladen, D.J. Singel, J.S. Stamler, Interactions of NO with hemoglobin: from microbes to man, *Methods Enzymol.* 436 (2008) 131–168.
- [5] J.M. Souza, I. Choi, Q. Chen, M. Weisse, E. Daikhin, M. Yudkoff, M. Obin, J. Ara, J. Horwitz, H. Ischiropoulos, Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins, *Arch. Biochem. Biophys.* 380 (2000) 360–366.
- [6] K.A. Hanafy, J.S. Krumenacker, F. Murad, NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction, *Med. Sci. Monit.* 7 (2001) 801–819.
- [7] D. Ceconi, S. Orzetti, E. Vandelle, S. Rinalducci, L. Zolla, M. Delledonne, Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*, *Electrophoresis* 30 (2009) 2460–2468.
- [8] F.J. Corpas, M. Chaki, M. Leterrier, J.B. Barroso, Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants, *Plant Signal. Behav.* 4 (2009) 920–923.
- [9] M. Leitner, E. Vandelle, F. Gaupels, D. Bellin, M. Delledonne, NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence, *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (2009) 451–458.
- [10] D.T. Hess, A. Matsumoto, S.O. Kim, H.E. Marshall, J.S. Stamler, Protein S-nitrosylation: purview and parameters, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 150–166.
- [11] A.K. Grennan, Protein S-nitrosylation: potential targets and roles in signal transduction, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1237–1239.
- [12] J.K. Hong, B.W. Yun, J.G. Kang, M.U. Raja, E. Kwon, K. Sorhagen, C. Chu, Y. Wang, G.J. Loake, Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 147–154.
- [13] C. Lindermayr, J. Durner, S-nitrosylation in plants: pattern and function, *J. Proteomics* 73 (2009) 1–9.
- [14] Y. Wang, B.W. Yun, E. Kwon, J.K. Hong, J. Yoon, G.J. Loake, S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 1777–1784.
- [15] A. Feechan, E. Kwon, B.W. Yun, Y. Wang, J.A. Pallas, G.J. Loake, A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (2005) 8054–8059.
- [16] C. Rusterucci, M.C. Espunya, M. Diaz, M. Chabannes, M.C. Martinez, S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically, *Plant Physiol.* 143 (2007) 1282–1292.
- [17] D. Seth, J.S. Stamler, The SNO-proteome: causation and classifications, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15 (2010) 1–8.
- [18] M.W. Foster, J.S. Stamler, New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25891–25897.
- [19] B. Belenghi, M.C. Romero-Puertas, D. Vercammen, A. Brackener, D. Inze, M. Delledonne, F. Van Breusegem, Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 1352–1358.
- [20] M.C. Palmieri, C. Lindermayr, H. Bauwe, C. Steinhauser, J. Durner, Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation, *Plant Physiol.* 152 (2010) 1514–1528.
- [21] J.S. Stamler, E.J. Toone, S.A. Lipton, N.J. Sucher, (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif, *Neuron* 18 (1997) 691–696.
- [22] M. Liu, J. Hou, L. Huang, X. Huang, T.H. Heibeck, R. Zhao, L. Pasa-Tolic, R.D. Smith, Y. Li, K. Fu, Z. Zhang, S.H. Hinrichs, S.J. Ding, Site-specific proteomics approach for study protein S-nitrosylation, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7160–7168.
- [23] Y. Xue, Z. Liu, X. Gao, C. Jin, L. Wen, X. Yao, J. Ren, GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm, *PLoS ONE* 5 (2010) e11290.
- [24] M. Benhar, M.T. Forrester, J.S. Stamler, Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 721–732.

- [25] M. Benhar, M.T. Forrester, D.T. Hess, J.S. Stamler, Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins, *Science* 320 (2008) 1050–1054.
- [26] C. Despres, C. Chubak, A. Rochon, R. Clark, T. Bethune, D. Desveaux, P.R. Fobert, The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1, *Plant Cell* 15 (2003) 2181–2191.
- [27] C.M. Pieterse, L.C. Van Loon, NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (2004) 456–464.
- [28] Y. Tada, S.H. Spoel, K. Pajerowska-Mukhtar, Z. Mou, J. Song, C. Wang, J. Zuo, X. Dong, Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins, *Science* 321 (2008) 952–956.
- [29] J.B. Mannick, C.M. Schonhoff, Measurement of protein S-nitrosylation during cell signaling, *Methods Enzymol.* 440 (2008) 231–242.
- [30] S.R. Jaffrey, S.H. Snyder, The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins, *Sci. STKE* 2001 (2001) 11.
- [31] M.T. Forrester, M.W. Foster, M. Benhar, J.S. Stamler, Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 119–126.
- [32] G. Hao, B. Derakhshan, L. Shi, F. Campagne, S.S. Gross, SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1012–1017.
- [33] S. Camerini, M.L. Polci, U. Restuccia, V. Usueli, A. Malgaroli, A. Bachi, A novel approach to identify proteins modified by nitric oxide: the HIS-TAG switch method, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 3224–3231.
- [34] E.T. Chouchani, T.R. Hurd, S.M. Nadtochiy, P.S. Brookes, I.M. Fearnley, K.S. Lilley, R.A. Smith, M.P. Murphy, Identification of S-nitrosated mitochondrial proteins by S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis (SNO-DIGE): implications for the regulation of mitochondrial function by reversible S-nitrosation, *Biochem. J.* 430 (2010) 49–59.
- [35] M.T. Forrester, J.W. Thompson, M.W. Foster, L. Nogueira, M.A. Moseley, J.S. Stamler, Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 557–559.
- [36] P.T. Doulias, J.L. Greene, T.M. Greco, M. Tenopoulou, S.H. Seeholzer, R.L. Dunbrack, H. Ischiropoulos, Structural profiling of endogenous S-nitrosocysteine residues reveals unique features that accommodate diverse mechanisms for protein S-nitrosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (2010) 16958–16963.
- [37] Y.Y. Chen, Y.F. Huang, K.H. Khoo, T.C. Meng, Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases, *Methods* 42 (2007) 243–249.
- [38] L. Elvir, F. Speroni, M. Careri, A. Mangia, L.S. di Toppi, M. Zottini, Identification of in vivo nitrosylated phytochelatin in *Arabidopsis thaliana* cells by liquid chromatography–direct electrospray–linear ion trap–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4120–4126.
- [39] Y. Wang, T. Liu, C. Wu, H. Li, A strategy for direct identification of protein S-nitrosylation sites by quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1353–1360.
- [40] F. Torta, L. Elvir, A. Bachi, Direct and indirect detection methods for the analysis of S-nitrosylated peptides and proteins, *Methods Enzymol.* 473 (2010) 265–280.
- [41] J.K. Abat, R. Deswal, Differential modulation of S-nitroso proteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity, *Proteomics* 9 (2009) 4368–4380.
- [42] J.K. Abat, A.K. Mattoo, R. Deswal, S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* – ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition, *FEBS J.* 275 (2008) 2862–2872.
- [43] C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner, Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 137 (2005) 921–930.
- [44] M.C. Romero-Puertas, N. Camprotrini, A. Matte, P.G. Righetti, M. Perazzolli, L. Zolla, P. Roepstorff, M. Delledonne, Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response, *Proteomics* 8 (2008) 1459–1469.
- [45] G. Tanou, C. Job, L. Rajjou, E. Arc, M. Belghazi, G. Diamantidis, A. Molassiotis, D. Job, Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity, *Plant J.* 60 (2009) 795–804.
- [46] M. Perazzolli, P. Dominici, M.C. Romero-Puertas, E. Zago, J. Zeier, M. Sonoda, C. Lamb, M. Delledonne, Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHB1 modulates nitric oxide bioactivity, *Plant Cell* 16 (2004) 2785–2794.
- [47] M.C. Romero-Puertas, M. Laxa, A. Matte, F. Zaninotto, I. Finkemeier, A.M. Jones, M. Perazzolli, E. Vandelle, K.J. Dietz, M. Delledonne, S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration, *Plant Cell* 19 (2007) 4120–4130.
- [48] Y.Q. Wang, A. Feechan, B.W. Yun, R. Shafei, A. Hofmann, P. Taylor, P. Xue, F.Q. Yang, Z.S. Xie, J.A. Pallas, C.C. Chu, G.J. Loake, S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 2131–2137.
- [49] C. Lindermayr, S. Sell, B. Muller, D. Leister, J. Durner, Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide, *Plant Cell* 22 (2010) 2894–2907.
- [50] I. Wawer, M. Bucholc, J. Astier, E. Anielska-Mazur, J. Dahan, A. Kulik, A. Wyslouch-Cieszyńska, M. Zareba-Kozioł, E. Krzywinska, M. Dadlez, G. Dobrowolska, D. Wendehenne, Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity, *Biochem. J.* 429 (2010) 73–83.
- [51] C. Lindermayr, G. Saalbach, G. Bahnweg, J. Durner, Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4285–4291.
- [52] D.H. Slaymaker, D.A. Navarre, D. Clark, O. del Pozo, G.B. Martin, D.F. Klessig, The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 11640–11645.
- [53] V. Serpa, J. Vernal, L. Lamattina, E. Grotewold, R. Cassia, H. Terenzi, Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361 (2007) 1048–1053.
- [54] S. Holtgreve, J. Gohlke, J. Starmann, S. Druce, S. Klocke, B. Altmann, J. Wojtera, C. Lindermayr, R. Scheibe, Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications, *Physiol. Plant.* 133 (2008) 211–228.
- [55] O. Lamotte, C. Courtois, G. Dobrowolska, A. Besson, A. Pugin, D. Wendehenne, Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1369–1376.
- [56] M.R. Hara, N. Agrawal, S.F. Kim, M.B. Cascio, M. Fujimuro, Y. Ozeki, M. Takahashi, J.H. Cheah, S.K. Tankou, L.D. Hester, C.D. Ferris, S.D. Hayward, S.H. Snyder, A. Sawa, S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 665–674.
- [57] S. Morigasaki, K. Shimada, A. Ikner, M. Yanagida, K. Shiozaki, Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade, *Mol. Cell* 30 (2008) 108–113.
- [58] J.M. Mato, F.J. Corrales, S.C. Lu, M.A. Avila, S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function, *FASEB J.* 16 (2002) 15–26.
- [59] C. Courtois, A. Besson, J. Dahan, S. Bourque, G. Dobrowolska, A. Pugin, D. Wendehenne, Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinase, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 155–163.
- [60] L. Ramirez, E.J. Zabaleta, L. Lamattina, Nitric oxide and frataxin: two players contributing to maintain cellular iron homeostasis, *Ann. Bot.* 105 (2010) 801–810.
- [61] A. Besson-Bard, J. Astier, S. Rasul, I. Wawer, C. Dubreuil-Maurizi, S. Jeandroz, D. Wendehenne, Current view of nitric oxide-responsive genes in plants, *Plant Sci.* 177 (2009) 302–309.

Publication 3 : *Nitric oxide signaling in plants: cross-talk with Ca²⁺, protein kinases and reactive oxygen species*



Chapter 7

NITRIC OXIDE SIGNALLING IN PLANTS: CROSS-TALK WITH Ca^{2+} , PROTEIN KINASES AND REACTIVE OXYGEN SPECIES

Jérémy Astier¹, Angélique Besson-Bard¹, Izabela Wawer^{1,2}, Claire Parent³, Sumaira Rasul¹, Sylvain Jeandroz⁴, James Dat³ and David Wendehenne¹

¹UMR INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, Plante-Microbe-Environnement, 21000 Dijon, France

²Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, ul. Pawinskiego 5a, 02-106, Warsaw, Poland

³Laboratoire de Chrono-Environnement, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, Université de Franche-Comté, 25030, Besançon Cedex, France

⁴UPSP PROXISS, ENESAD, 26 Boulevard Dr Petitjean, BP 87999, 21079, Dijon Cedex, France

Abstract: Nitric oxide (NO) is a gaseous free radical recognized as a ubiquitous signal transducer that contributes to various biological processes in animals. It exerts most of its effects by regulating the activities of various proteins including Ca^{2+} channels, protein kinases and transcription factors. In plants, studies conducted over the past 10 years revealed that NO also functions as an endogenous mediator in diverse physiological processes ranging from root development to stomatal closure. Its biological role as an intracellular plant messenger molecule, however, remains poorly understood. Here, we review the molecular basis of NO signalling in animals and discuss current knowledge of NO signalling in plants, focusing on its interplay with Ca^{2+} , protein kinases and reactive oxygen species which are well established as widespread key regulators of signal transduction.

Keywords: calcium; cell death; nitric oxide; protein kinases; reactive oxygen species; signalling

Annual Plant Reviews Volume 42, Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-genomic Era, First Edition, edited by Christine Foyer and Hanma Zhang © 2011 by Blackwell Publishing Ltd.

Nitric oxide (NO) is a noxious free radical gas, which, in the late 1980s, was discovered to exist physiologically in mammalian systems. This discovery offered fresh perspectives on main processes including neurotransmission, immunity and relaxation of vascular smooth muscles (Schmidt & Walter, 1994). Notably, the idea that a simple gas could act as a messenger revolutionized researchers' understanding of signal transduction. Recently, NO was also shown to mediate diverse plant physiological processes such as germination, root growth, flowering, stomatal closure and resistance to biotic as well as abiotic stresses (see reviews by Lamattina *et al.*, 2003; Delledonne, 2005; Besson-Bard *et al.*, 2008a; Wilson *et al.*, 2008). Although evidences supporting NO as a plant physiological mediator are still growing, its functions at the molecular level remain poorly understood and, in some examples, are subject to controversies. Research conducted over the past years has revealed that NO mediates part of its action in a concerted way with the second messenger Ca^{2+} , protein kinases and reactive oxygen species (ROS). The interplays between these molecules operate in cells challenged by biotic and abiotic stresses and modulate various cellular responses including gene expression and cell death. This review introduces the basic concepts of NO signalling in animals and discusses the mechanisms through which NO exerts its signalling activities in plants with a particular emphasis on Ca^{2+} , protein kinases and ROS signalling.

7.1 Basic concepts of NO signalling in animals

The field of research dedicated to NO signalling in animals has been extraordinary fruitful in the past two decades and has led scientists to introduce new concepts of signal transduction. NO is derived from the amino acid L-arginine by the enzymatic activity of nitric oxide synthase (NOS). Once produced, NO acts predominantly via the post-translational modifications of proteins. Three main processes have been described: S-nitrosylation, metal nitrosylation and tyrosine nitration. Well over a hundred proteins susceptible to these NO-dependent post-translational modifications and involved in all major cellular activities have been identified. In this section, we describe the principles of S-nitrosylation, metal nitrosylation and tyrosine nitration and discuss how these post-translational protein modifications influence Ca^{2+} and protein kinase signalling. Understanding these signalling concepts should facilitate a comprehensive analysis of the way NO acts as a signal in plants.

7.1.1 Metal nitrosylation

As a radical, NO is capable of donating electrons and therefore reacts with transition metals. Covalent interaction of NO with the centres of iron-sulphur clusters, and with haeme and zinc-finger proteins, leads to an increase or a decline in protein activity. Amongst the proteins regulated through metal

nitrosylation, a well-studied target for NO is soluble guanylate cyclase (sGC; Denninger & Marletta, 1999). Soluble guanylate cyclase catalyses the conversion of GTP to pyrophosphate and 3',5'-cyclic GMP (cGMP), a well-defined second messenger. The interaction of NO with the sGC haeme leads to the opening of the bond between ferrous iron and histidine 105 of the enzyme, thus triggering a conformational change that increases the catalysis of cGMP synthesis by several hundred-fold (Cary *et al.*, 2006; Roy & Garthwaite, 2006). Once produced, cGMP binds to target proteins: cGMP-dependent protein kinases (PKGs), cyclic nucleotide-gated channels (cNNGCs) and cyclic nucleotide phosphodiesterases, resulting in cell-specific downstream outputs (Beck *et al.*, 1999). Examples of physiological responses regulated through NO/cGMP signalling include neurotransmission, development, smooth muscle relaxation and blood pressure regulation (Denninger & Marletta, 1999; Krumenacker *et al.*, 2004).

7.1.2 S-nitrosylation

S-nitrosylation corresponds to the covalent modification of cysteine sulphurs of proteins by NO (or its derivatives) to form S-nitrosothiols (Stamler *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2005). It is not yet clear how NO S-nitrosylates target proteins. Candidate mechanisms include the electrophilic attack of the nitrosonium cation (NO^+ , resulting from NO auto-oxidation) on thiolate, direct interaction of NO with thiolate in the presence of electron acceptors such as nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) and complex chemical processes involving nitroxyl anions (NO^- , resulting from NO autoreduction or dinitrogen trioxide decomposition) (Gow *et al.*, 1997; Hanafy *et al.*, 2001; Foster & Stamler, 2004). Interestingly, primary peptide sequences for motifs that might facilitate S-nitrosylation have been described, consisting of acidic/basic motifs, as well as hydrophobic motifs surrounding the cysteine residue (Hess *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2006). Similarly to metal nitrosylation, S-nitrosylation is a reversible form of post-translational modification. De-S-nitrosylation occurs chemically without the help of enzymes or enzymatically through thioredoxin and thioredoxin reductase (Jaffrey *et al.*, 2001; Benhar *et al.*, 2008).

7.1.3 Tyrosine nitration

Tyrosine nitration is mediated by two main NO-derived species including peroxynitrite (ONOO^-), resulting from the fast reaction between NO and ROS such as superoxide (O_2^-), and nitroso-peroxocoxylate (ONOOCO_2^-). This adduct is formed following the reaction between ONOO^- and CO_2 at a physiological concentration (Radi, 2004). Nitration occurs in one of the two equivalent carbon atoms in the ortho-position (with respect to the hydroxyl group) of the phenolic ring of tyrosine residues and leads to protein 3-nitrotyrosine (3- NO_2 -Tyr) (Radi, 2004). 3- NO_2 -Tyr was first related to NO-dependent oxidative stress occurring during inflammatory diseases such as asthma (Schopfer

et al., 2003). Indeed, tyrosine nitration is usually associated with loss of protein functions and target proteins include Mn superoxide dismutase, cytochrome P450, tyrosine hydroxylase, glutamine synthase, glutathione reductase, actin and other cytoskeleton-related proteins (Greenacre & Ischiropoulos, 2001; Gow *et al.*, 2004). It is generally assumed that this process may be irreversible and increase the susceptibility of proteins to degradation by the 20S proteasome (Mannick & Schonhoff, 2002). However, the description of denitrase activities reversing protein nitration in several mammalian tissues suggests that tyrosine nitration might also be a reversible process (Gorg *et al.*, 2007). This latter finding opens the possibility that the formation of 3-NO₂-Tyr may play a role in signal transduction. Regarding this aspect, the relationship with protein tyrosine phosphorylation is particularly noteworthy. Indeed, according to several studies, the importance of tyrosine nitration on cell signalling would lie essentially in the inhibition of tyrosine residues to undergo phosphorylation and/or in the inhibition of phosphatases that allows protein kinases to become dominantly activated (Minetti *et al.*, 2002). A first mechanism has been proposed to explain the activation of tyrosine kinases c-Src by ONOO⁻: *in vitro* nitration of a C-terminal tyrosine residue could prevent its phosphorylation which normally helps c-Src folding into an inactive conformation (Klotz *et al.*, 2002). At present, however, it is unclear if this process can occur *in vivo*.

7.1.4 Interplays between NO and Ca²⁺

Currently, NO is recognized as one of the key messengers governing the overall control of Ca²⁺ homeostasis, and almost all types of Ca²⁺ channels and transporters are under its control. The effects of NO on Ca²⁺ channel and transporter activities can be divided into two mechanisms of action: a cGMP-dependent one and a cGMP-independent one. The molecular mechanisms underlying the cGMP-dependent pathway are complex, and at least three processes have been reported. First, cGMP could directly activate CNGCs by virtue of their cyclic nucleotide-binding sites, leading to an enrichment of cytosolic free Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_{cyt}) (Hanafy *et al.*, 2001; Ahern *et al.*, 2002). Second, the effects of cGMP could be mediated via the activation of PKGs (Clementi & Meldolesi, 1997; Clementi, 1998; Ahern *et al.*, 2002). PKGs have distinct effects on intracellular Ca²⁺, increasing or decreasing [Ca²⁺]_{cyt}, depending on the target channel, the stimuli and cell types. For example, in hepatocytes, phosphorylation of the inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) receptor by PKGs potentiates IP₃-dependent Ca²⁺ release, whereas an opposite effect is observed in smooth muscle (Clementi, 1998; Murthy & Makhoulouf, 1998). Besides the IP₃ receptor, Ca²⁺-permeable channels and Ca²⁺ transporters whose activities appear to be modulated by PKGs include voltage-dependent Ca²⁺ channels (L-, N-, P/Q- and T-types), store-operated Ca²⁺ channels, mechanosensitive Ca²⁺-permeable non-selective cation channels,

the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) and the plasma membrane Ca^{2+} pump (PMCA) (Clementi, 1998; Wang *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2002; Yao & Huang, 2003; Grassi *et al.*, 2004). The biochemical steps downstream of PKGs that are responsible for the modulation of these channels and transporters have not been completely clarified. Third, to add further complexity to these scenarios, PKG activation has been found to be a crucial step in NO-induced cyclic ADP-ribose (cADPR) synthesis (Willmott *et al.*, 1996; Reyes-Harde *et al.*, 1999; Leckie *et al.*, 2003). cADPR is synthesized from its precursor NAD^+ by ADP-ribosyl cyclase, which might be activated through PKG-induced phosphorylation. cADPR is a Ca^{2+} mobilizing second messenger, which promotes Ca^{2+} release from endoplasmic reticulum in a wide variety of animal cells via the activation of the ryanodine receptors (RYRs) (Fliegert *et al.*, 2007). The cGMP/PKG/cADPR cascade is now recognized as a fundamental mechanism through which NO contributes to the generation and propagation of Ca^{2+} signals in various physiological processes including the induction of hippocampal long-term depression and fertilization in echinoderms (Willmott *et al.*, 1996; Reyes-Harde *et al.*, 1999; Leckie *et al.*, 2003).

The cGMP-independent action of NO on Ca^{2+} homeostasis operates through the direct S-nitrosylation of Ca^{2+} channels and transporters. Voltage-dependent Ca^{2+} channels, RYRs, N-methyl-D-aspartate receptors, transient receptor potential channels (TRPC) and CNGCs were shown to be reversibly S-nitrosylated, with activation or inhibition as a consequence (Broillet, 2000; Stamler *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2006; Tjong *et al.*, 2007). For instance, the skeletal muscle RyR1 (one of the three isoforms of RYRs) consists of four homologous 565 kDa subunits containing 100 cysteine residues. In the native protein, 50 of these residues appear to be in a reduced state (Aracena-Parks *et al.*, 2006). Remarkably, submicromolar NO concentrations were shown to activate RYR1 by S-nitrosylation of a single cysteine (Cys 3635), this reaction occurring only at low (e.g. physiological) pO_2 but not ambient pO_2 (Sun *et al.*, 2003). This specific S-nitrosylation reverses RYR1 inhibition by Ca^{2+} /calmodulin (CaM) and may contribute to enhanced RYR1 activity. Interestingly, Cys 3635 can also be S-glutathionylated, suggesting that competition between S-nitrosylation and S-glutathionylation on Cys 3635 may occur in physiological processes (Aracena-Parks *et al.*, 2006). Another remarkable example of the influence of S-nitrosylation on Ca^{2+} channel activities concerns TRPC5, one of the seven TRPC homologues in humans. This plasma membrane Ca^{2+} channel was shown to induce Ca^{2+} entry into human embryonic kidney cells in response to NO released by several NO donors (Yoshida *et al.*, 2006). The molecular mechanism underlying NO-dependent TRPC5 activation may involve the nucleophilic attack of nitrosylated Cys 553 by the free sulphhydryl group of Cys 558, thus leading to the formation of a disulphide bond between both cysteine residues. The disulphide bond might stabilize the open state of the channel.

The existence of both cGMP-mediated and direct *S*-nitrosylation pathways expands and enriches the possibilities for NO to modulate Ca²⁺-dependent signalling processes including gene expression (Peunova & Enikolopov, 1993). Furthermore, because NO production by NOS requires an increase in [Ca²⁺]_{cyt}, the ability for NO to attenuate Ca²⁺ influx by inhibiting some types of Ca²⁺ channels and/or to initiate cytosolic free Ca²⁺ removal by activation of SERCA and/or PMCA helps to protect cells from the deleterious effect of NO. The pathophysiological relevance of these processes is outlined in several examples such as the modulation of neuronal excitability or hypertension but has probably paved the way for new roles in normal and disturbed cell functions. From a mechanical point of view, the plasticity of the NO/Ca²⁺ pathways is particularly intriguing when both pathways act on the same channels. Several studies have provided support that the cGMP-dependent pathway generally occurs at low levels of NO whereas *S*-nitrosylation requires higher levels of NO and tends to proceed with slower kinetics than cGMP-induced actions (Denninger & Marletta, 1999; Hanafy *et al.*, 2001). However, this subject is still controversial and the issue is far from settled (Stamler *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2005).

7.2 NO signalling in plants

During the last decade, NO has been recognized as a versatile player in diverse plant physiological processes. Several routes for NO synthesis have been described: non-enzymatic as well as enzymatic pathways involving nitrate reductase and putative NOS-like enzymes (Kaiser & Huber, 2001; Corpas *et al.*, 2006; Crawford, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008a, 2008b, 2008c; Wilson *et al.*, 2008). A major and still opened question concerns the molecular mechanisms of its signalling action. More than hundred proteins have been asserted to undergo regulation by *S*-nitrosylation and metal nitrosylation. Similarly, numerous genes up- and/or down-regulated in response to artificially produced NO have been identified based on microarray analyses. However, with few exceptions, the physiological significance of these post-transcriptional and post-translational modifications remains to be established. Parallel to these approaches, over the last years, evidence gathered from a number of studies has indicated that NO mediates part of its effects through the mobilization of free Ca²⁺, via the modulation of protein kinase activities and by interacting with ROS. The aim of this section is to concentrate on the interplay between NO, Ca²⁺ and ROS and to describe what is known thus far concerning the physiological impact of the cross-talk between these signalling components.

7.2.1 Interplays between NO and Ca²⁺

A large number of signals, including plant hormones, light, biotic as well as abiotic stresses, cause transient and specific changes in intracellular [Ca²⁺]

In the recent years, it has become increasingly appreciated that the signalling components that govern these changes include NO. Furthermore, because NO production is under the control of intracellular Ca^{2+} fluctuations, NO might also act as a Ca^{2+} sensor contributing to decoding the intracellular Ca^{2+} changes in plants.

7.2.2 NO acts as a Ca^{2+} -mobilizing messenger

The first conclusive evidence implicating NO as a Ca^{2+} -mobilizing messenger in plant cells came from studies exploring the ability of NO donors to induce increases in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$. Using Ca^{2+} -sensitive dye fura-2 fluorescence ratio imaging, Garcia-Mata *et al.* (2003) showed that treating *Vicia faba* guard cells by the NO donor *S*-nitroso-*N*-acetyl-penicillamine (SNAP) induced stomatal closure by promoting an increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$. The ability of exogenous NO to induce a rise of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ was further supported by the finding that the NO donor diethylamine NONOate (DEA/NO) triggers a transient rise of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspensions, expressing the Ca^{2+} -reporter apo-aequorin (Lamotte *et al.*, 2004, 2006). By contrast, the same NO donor did not induce any change in nuclear free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$) (Lecourieux *et al.*, 2005), suggesting that NO effects on Ca^{2+} homeostasis are restricted to specific cellular compartments.

The influence of NO on the cellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in physiological contexts was highlighted by the demonstration that NO scavengers and mammalian NOS inhibitors reduced stimulus-induced rises in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Notably, Lamotte *et al.* (2004) showed that the NO scavenger cPTIO and NOS inhibitors reduced the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases induced in *N. plumbaginifolia* cells by the proteinaceous elicitor cryptogein, secreted by the oomycete *Phytophthora cryptogea*. These pharmacological agents did not reduce the cryptogein-triggered $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nuc}}$ rises, confirming the observation made using NO donors (see above; Lecourieux *et al.*, 2005). Similar effects of NO were reported in grapevine cell suspensions exposed to the elicitor endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* (Vandelle *et al.*, 2006). Another example emerges from studies investigating NO function in plant cells exposed to hyperosmotic stress. Under this condition, addition of the NO scavenger cPTIO reduced the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in *N. plumbaginifolia* cell suspensions, expressing the calcium reporter apo-aequorin, highlighting again the role of NO in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevations (Gould *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2006).

7.2.3 Underlying mechanisms

The mechanisms that enable NO-triggered changes in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ have been intensively studied in recent years. Pharmacological analyses of $[\text{Ca}^{2+}]$ variations have indicated that NO might activate both plasma membrane and intracellular Ca^{2+} -permeable channels (Garcia-Mata *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2004, 2006; Lecourieux *et al.*, 2005; Vandelle *et al.*, 2006). Whereas

the putative identity of the NO-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels remains unknown, several lines of evidence have suggested that NO might target RYR-like channels. Indeed, the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ of *N. plumbaginifolia* cells treated by the NO donor DEA/NO was sensitive to ruthenium red, an inhibitor of mammalian RYRs (Lamotte *et al.*, 2004). A similar inhibitory effect was obtained using the cADPR antagonist 8Br-cADPR, designing cADPR as possible intermediates of the NO signal leading to changes in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$. According to Garcia Mata *et al.* (2003), cADPR might function together with cGMP as reported in animals (Willmott *et al.*, 1996; Reyes-Harde *et al.*, 1999). Indeed, they showed that ryanodine, an antagonist of RYR as well as ODQ (1-*H*-(1,2,4)-oxadiazole-(4,3-*a*)quinolxalin-1-one), an inhibitor of sGC, was able to suppress SNAP-mediated increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in *V. faba* guard cells. The authors provided several arguments indicating that a similar NO/cGMP/cADPR/ Ca^{2+} pathway might occur in response to abscisic acid (ABA).

Besides cADPR and cGMP, evidences that NO could also contribute to $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases via phosphorylation events were provided. Indeed, protein kinase inhibitors efficiently suppress NO donor-triggered elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ in *V. faba* guard cells and *N. plumbaginifolia* cells (Sokolovski *et al.*, 2005; Lamotte *et al.*, 2006), indicating that the signalling cascades relaying NO and Ca^{2+} -permeable channels could involve protein kinases, besides or together with cADPR. At present, only one protein kinase candidate, named NtOSAK (*Nicotiana tabacum* osmotic Stress-activated protein kinase), has been identified (Lamotte *et al.*, 2006). This aspect is discussed farther. Finally, it should be specified that several arguments pointing out the involvement of NO in stimulus-induced plasma membrane depolarization have been reported (Lamotte *et al.*, 2006; Vandelle *et al.*, 2006). Such NO-dependent changes of the plasma membrane potential might modulate the activity of plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels. The mechanisms underlying this effect are poorly understood.

7.2.4 Impacts of the NO/ Ca^{2+} pathways

The first conclusive evidence of the biological significance of an NO/ Ca^{2+} pathway came from studies in which the function of NO in plant defence responses was investigated (Durner *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000). Using *N. tabacum* plants and suspension cells treated with a recombinant mammalian NOS or NO donors, respectively, it was shown that NO was able to mediate the expression of the defence-related genes *PR* (*pathogenesis related-1*)-1 and *PAL* (*phenylalanine ammonia lyase*) through cGMP and/or cADPR. In addition to gene expression, compelling evidence suggests a role for the interplay between NO and Ca^{2+} on micro-organism-triggered hypersensitive response (HR). In this context, NO appears to act as a Ca^{2+} sensor, contributing to decode the intracellular Ca^{2+} changes in plants leading to cell death. Both pharmacological and genetic experimental data support this concept (Delledonne

et al., 1998; Lamotte *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2007). For instance, in cryptogein-elicited tobacco cell suspensions, NO production is stimulated by an influx of extracellular Ca^{2+} (Lamotte *et al.*, 2004). In turn, NO partly contributes to the elicitor-triggered cell death. The plasma membrane cyclic nucleotide-gated Ca^{2+} -permeable channel CNGC2 was identified as one of the putative key components of this pathway in *Arabidopsis thaliana* (Ali *et al.*, 2007). Accordingly, the HR normally suppressed in the *A. thaliana dnd1* (*defence no death 1*) mutant, impaired in CNGC2 expression, was shown to be partially restored by the NO donor sodium nitroprusside (SNP). Further research is needed to understand how NO, the production of which is stimulated by an influx of Ca^{2+} , can contribute to HR. Because, as discussed previously, NO also amplifies the mobilization of free Ca^{2+} , it is possible that the NO-dependent rise of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ facilitates cellular Ca^{2+} overload, which, in turn, could cause cytotoxicity and could trigger cell death. Besides mediating defence responses, the NO/ Ca^{2+} pathways might influence diverse cellular processes such as ABA-induced stomatal closing or auxin-mediated adventitious root formation (Garcia-Mata *et al.*, 2003; Lamattina *et al.*, 2003; Desikan *et al.*, 2004).

7.2.5 Interplays between NO and protein kinases

Multiple protein kinase cascades are involved in the transduction and amplification of the information received through cellular signals. Protein phosphorylation and dephosphorylation are very common intracellular signalling modes. Kinases and phosphatases regulate a wide range of cellular processes such as enzyme activation, assembly of macromolecules, protein localization and degradation. In animals, NO has been described to modify the activity of protein kinases involved in signal transduction, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades, Janus kinases or protein kinase C (Beck *et al.*, 1999). Also, the activity of primary metabolism-related kinases, for instance pyruvate kinase, was identified to be modified by S-nitrosylation (Gao *et al.*, 2005).

It is presently known that serine/threonine protein kinases play a crucial role in the transduction of various extra- and intracellular signals in plants (Mishra *et al.*, 2006). However, although the identification of NO-modulated protein kinases is a major issue in the understanding of NO-dependent signal transduction, only few of them have been identified and studied. Moreover, these observations have been carried out using, for most part of them, artificially generated NO from NO donors, and not during a physiological plant process.

7.2.6 NO modulates MAPK activities

In all eukaryotes, MAPK pathways serve as highly conserved central regulators of growth, death, differentiation, proliferation and stress responses (Samaj *et al.*, 2004; Qi & Elion, 2005). MAPKs form the terminal components

of the MAPK cascades (MAPKKK → MAPKK → MAPK). MAPKs are activated by MAPK kinases (MAPKKs/MEKs) via dual phosphorylation of conserved threonine and tyrosine residues in the motif TxY located in the activation loop. Some evidence shows that in plants NO also contributes to the activation of MAPK cascades.

Kumar and Klessig (2000) found an MAPK activated by NO in tobacco leaves and cell suspensions. Injection of tobacco leaves with recombinant rat neuronal NOS, together with its co-factors and substrate, transiently activated a 48 kDa protein kinase phosphorylating MBP (myelin basic protein), an artificial MAPK substrate. Using the specific anti-SIPK antibody in immunocomplex kinase activity assay, they identified this kinase as salicylic acid (SA)-induced protein kinase (SIPK). The NO donors – S-nitroso-L-glutathione (GSNO), DEA/NO and SNAP – also transiently activate SIPK in tobacco cell suspension cultures (Kumar & Klessig, 2000; Besson-Bard *et al.*, 2008b). Depending on the NO-generating system, this activation was shown to be SA-dependent or SA-independent.

Although SIPK is the first and the only NO-dependent MAPK identified to date, there are more data indicating influence of NO on MAPK pathways. Working with *A. thaliana* shoots, Capone *et al.* (2004) demonstrated that brief oxidative or nitrosative stresses in the roots, using respectively H₂O₂ and the NO donor SNP, triggered the activation of a 38 kDa protein kinase able to phosphorylate MBP. It was confirmed that this kinase belongs to the MAPK family by using antibodies raised against the active (phosphorylated) form of a mammalian p38 MAPK, but no direct relation between this activation and NO production has been clearly demonstrated. Another example of NO ability to activate MAPK was provided by Clarke *et al.* (2000). The authors reported that a 47 kDa protein kinase, able to phosphorylate MBP, is activated within 5 minutes in response to the NO donor Roussin's black salt in *A. thaliana* cell suspensions. A role for the 47 kDa protein kinase in mediating NO-induced cell death was tentatively assigned. However, pharmacological inhibition of this MAPK was inefficient in reducing cell death. Thus, many questions regarding the cellular impact of the activation of this MAPK by NO remain open.

Recently, a functional link between NO and MAPKs has been established in ABA signalling in mesophyll cells of maize leaves (Zhang *et al.*, 2007). Using pharmacological approach, a linear interplay of these signalling components has been demonstrated: ABA treatment induces H₂O₂ production, acting upstream NO synthesis. In turn, NO favours the activation of a 46 kDa MAPK. Induction of this MAPK results in an enhancement of the expression of gene-encoding antioxidant proteins such as catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase or ascorbate peroxidase, thus improving the total antioxidative activity of the cells. This cascade of reactions could be triggered in response to stresses such as water stress, thus highlighting a key role for NO in controlling MAPK involved in the plant adaptive response to abiotic stresses.

Finally, several lines of evidence suggest that NO and MAPKs act together in the auxin transduction pathway leading to adventitious root formation. More precisely, pharmacological-based experiments designed NO as a key regulator of an auxin-induced 48 kDa MAPK, sensitive to the MAPK inhibitor PD098059 (Pagnussat *et al.*, 2004). Cucumber explants co-treated with an NO donor and PD098059 showed a significant reduction in root length and root number, demonstrating firstly that NO is required for the activation of the 48 kDa MAPK, and secondly that this activation is essential for adventitious root formation. Interestingly, addition of an sGC inhibitor was not able to prevent the NO-dependent activation of the 48 kDa MAPK activation. This latter result suggested that this MAPK might be part of an NO-dependent/cGMP-independent signalling pathway, which parallels a previously characterized NO/cGMP-dependent signalling cascade also acting in auxin-induced adventitious root formation (Pagnussat *et al.*, 2003).

7.2.7 NO and Ca²⁺-dependent protein kinases

Support for the hypothesis that NO promotes the activation of Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs) came through biochemical and pharmacological approaches that showed the ability of SNP and auxin to induce the activation of a 50 kDa protein kinase in a Ca²⁺-dependent manner in cucumber hypocotyls (Lanteri *et al.*, 2006). The auxin- or SNP-triggered activation of the 50 kDa protein kinase was also reduced by CaM antagonists including trifluoperazine dihydrochloride (TFP) and *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulphonamide hydrochloride (W-7). These results led to the assumption that the 50 kDa protein kinase may contain CaM-like Ca²⁺-binding domains, a structural feature of CDPKs. However, it should be noticed that both TFP and W-7 are not specific inhibitors of CDPKs. Indeed, these compounds also affect the binding of Ca²⁺ to proteins such as CaM and calcineurin B-like proteins (Anil & Rao, 2000) which normally regulate the activity, and therefore the function, of a variety of target proteins including protein kinases (e.g. CcaMKs, CaMKs and SnRKs3; Hrabak *et al.*, 2003).

At a physiological level, the CaM antagonists TFP and W-7 were shown to negatively affect NO- or auxin-induced adventitious root formation in cucumber, suggesting the involvement of the 50 kDa protein kinase in this process (Lanteri *et al.*, 2006). Interestingly, in contrast to the NO-dependent 48 kDa MAPK described above, the activity of the 50 kDa putative CDPK triggered by SNP or auxin was inhibited by sGC inhibitors, suggesting that this protein kinase is part of the NO/cGMP-dependent pathway leading to adventitious root formation (Pagnussat *et al.*, 2003). Because the activity of the 50 kDa cucumber CDPK was detected at the earlier stages of adventitious root formation, it was proposed that this NO-dependent protein kinase can be involved in cell dedifferentiation, division and/or differentiation (Lanteri *et al.*, 2006).

7.2.8 NO and SnRKs

Plant SNF1 (sucrose non-fermenting 1)-related protein kinases (SnRKs) are classified into three subfamilies: SnRK1, SnRK2 and SnRK3. Available evidence indicates that SnRK1 might play an important role in the regulation of global metabolism, the disturbance of which might lead to developmental or adaptation defects (for reviews see Halford & Hardie, 1998; Halford *et al.*, 2003; Hrabak *et al.*, 2003). The SnRK2 and SnRK3 subfamilies are specific to plants and are involved in environmental stress signalling (for reviews see Hrabak *et al.*, 2003; Boudsocq & Lauriere, 2005).

First evidence that NO modulates the activity of SnRKs was provided by Lamotte *et al.* (2006). These authors showed that application of the NO donor DEA/NO to tobacco cell suspensions resulted in a fast and transient activation of a 42 kDa protein kinase phosphorylating MBP and histone H3, another protein kinase substrate. Using specific antibodies in immuno-complex activity assay, this 42 kDa protein kinase was identified as NtOSAK, a member of the SnRK2 family (Kelner *et al.*, 2004). Similarly to other SnRK2 members in *A. thaliana* (Droillard *et al.*, 2002; Boudsocq *et al.*, 2004) and rice (Kobayashi *et al.*, 2004), NtOSAK is activated within minutes in response to hyperosmotic stress (Mikolajczyk *et al.*, 2000), a process which leads to a rapid increase in NO synthesis (Gould *et al.*, 2003). Importantly, NtOSAK activation in response to osmotic stress was abolished by the NO scavenger cPTIO, highlighting the ability of NO in promoting SnRK2 activation during physiological processes.

These findings might be of general importance because it is consistent with the central roles of both NO and SnRK2s in the regulation of stomatal closure as well as defence responses. This assumption is exemplified by the involvement of NO and the *A. thaliana* SnRK2 protein kinase OST1 (open stomata 1) in common pathways. Indeed, OST1 was found to mediate the regulation of stomatal closure by ABA, a function also assigned to NO (Mustilli *et al.*, 2002). Similarly, the pathogen-associated molecular pattern flagellin 22 and lipopolysaccharide were shown to trigger stomatal closure through an NO- and OST1-dependent signalling cascade (Melotto *et al.*, 2006). Although a mechanistic connection between NO and OST1 remains to be established, these data further support the hypothesis that NO and SnRK2 protein kinases act together in the plant adaptive responses to biotic as well as abiotic stresses.

7.3 Interplays between NO and ROS

7.3.1 Impacts of the NO/ROS balance in HR

The interplay between ROS and NO has long been recognized in the animal field (Curtin *et al.*, 2002). In fact, many of the NO-derived responses are believed to stem from the reaction between NO and ROS to form reactive

nitrogen species (RNS) such as ONOO^- . In contrast to ROS, NO is exclusively produced by specific enzymes in animal cells (Turpaev & Litvinov, 2004). Conversely, plants can produce NO through a number of pathways, both enzymatic or non-enzymatic (Kaiser & Huber, 2001; Corpas *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008a, 2008b, 2008c; Wilson *et al.*, 2008). An interaction between both molecules during the HR was originally suggested by Delledonne *et al.* (1998, 2001). The authors observed a strong NO burst accompanied by ROS generation following inoculation of soybean cell cultures with avirulent bacteria. However, up-regulation of NO following bacterial infection was insufficient to activate the HR cell death. Moreover, ONOO^- is unable to induce cell death in plant cells. Thus, although O_2^- is not directly involved in this response, its conversion to H_2O_2 by superoxide dismutase is critical for the $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}$ signalling pathway.

De Pinto *et al.* (2002, 2006) also demonstrated that the NO/ROS couple is necessary for programmed cell death (PCD) in *N. tabacum* cv. BY-2 cells and a strong spatio-temporal correlation was reported between ROS and NO production during powdery mildew-dependent HR in barley (Mur *et al.*, 2008). The HR elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and pv. *tomato* harbouring the *avrRpm1* gene in tobacco and *A. thaliana* was preceded by an NO peak followed immediately by an H_2O_2 burst (Mur *et al.*, 2005). Similarly, inoculation of *A. thaliana* cell cultures with *P. syringae* pv. *maculicola* carrying the *avrRpm1* avirulence gene resulted in a rapid and sustained NO increase, whereas the increased production of H_2O_2 was delayed (Clarke *et al.*, 2000). Thus, although some discrepancies exist in the literature concerning the co-operation between NO and H_2O_2 , the NO/ H_2O_2 balance still seems crucial for many HR-dependent cell death events.

The question may thus arise as to how do cellular NO and H_2O_2 interact during the HR. A mechanistic answer was provided by Romero-Puertas *et al.* (2007). Employing a proteomic strategy based on the biotin-switch assay, the authors identified several proteins in which the S-nitrosylation level is increased in *A. thaliana* leaves challenged by the incompatible pathogen *P. syringae*. The authors focused their attention on peroxiredoxin II E (PrxII E), a member of the peroxiredoxin family which catalyses the reduction of H_2O_2 but also ONOO^- , depending on the isoforms. Extensive biochemical and genetic approaches indicate that S-nitrosylation of PrxII E inhibits its capacity to detoxify ONOO^- . Based on these data, an interesting model was proposed in which S-nitrosylation of PrxII E impairs its peroxynitrite reductase activity, thus leading to an increased level of tyrosine nitration, a hallmark of NO/ROS-dependent oxidative stress.

7.3.2 Candidate sites of interaction between NO and ROS during the HR

In animals, mitochondria play a central role in PCD by releasing cytochrome *c* and activating caspases, and there is growing belief that the intracellular

redox status is critical in mitochondria-dependent cell death in animals (Kowaltowski *et al.*, 2001). In particular, the interaction between mitochondrial cytochrome *c* and NO constitutes an important signalling pathway for the controlled production of H₂O₂ (Brookes *et al.*, 2002). In plants, mitochondria have been identified as key players of cell redox homeostasis and signalling (Noctor *et al.*, 2007), as well as important integrators of PCD (Jones, 2000; Swidzinski *et al.*, 2002, 2004; Lam, 2004). Transgenic tobacco cells lacking the alternative oxidase show enhanced susceptibility to various cell death inducers, including H₂O₂ (Robson & Vanlerberghe, 2002; Vanlerberghe *et al.*, 2002), and H₂O₂-driven cell death occurs through a mitochondria-dependent pathway (Mur *et al.*, 2008). Interestingly, mitochondria are also considered as potential sites of NO action. Notably, although oxygen consumption via the cytochrome pathway is inhibited by NO in isolated soybean cotyledons (Millar & Day, 1996) and carrot cell suspensions (Zottini *et al.*, 2002), in both cases the cyanide-insensitive alternative oxidase is not significantly affected. Similarly, Yamasaki *et al.* (2001) found that the alternative pathway is resistant to NO in plant mitochondria isolated from mung bean. Thus, these data suggest that the NO effect on the respiratory pathway may play some role in maintaining mitochondrial homeostasis by limiting ROS release. Further support for this comes from the fact that mitochondria can support nitrite-dependent NO synthesis (Planchet *et al.*, 2005) and that AtNOA1 (nitric oxide associated 1), an enzyme initially thought to display NOS activity, is targeted to the mitochondria (Guo & Crawford, 2005). Considering the hydrophobic and diffusible nature of NO, these data provide additional support for a potential interaction between NO and ROS in the mitochondria or its vicinity, thus potentially participating in mitochondria-derived cell death signals.

The chloroplast has also been put forward as a critical player in the development of the HR under light (Zeier *et al.*, 2004; Montillet *et al.*, 2005; Mur *et al.*, 2008). NO can inhibit chloroplast electron transport in a reversible manner (Takahashi & Yamasaki, 2002), and chloroplasts have also been identified as a potential participant in NO synthesis and ONOO⁻ production in plants (Gould *et al.*, 2003; Jasid *et al.*, 2006). In fact, a strong correlation between ONOO⁻ and the presence of oxidatively modified proteins in both the stroma and the thylakoids was observed in soybean chloroplasts (Jasid *et al.*, 2006). Furthermore, it was suggested that ONOO⁻ interacts with non-haeme Fe²⁺, leading to PSII inhibition on the acceptor site (Gonzalez-Perez *et al.*, 2008). Thus, *in situ* production of NO in the chloroplasts could play a protective role in preventing oxidation of chloroplast lipids and proteins, but alternatively, the reaction between O₂^{·-} and NO could lead to ONOO⁻ production, which could be responsible for the impairment of the photosynthetic machinery. Thus, the different HR cell death phenotypes observed in the light or in the dark during pathogen infection (Montillet *et al.*, 2005) may therefore depend not only on the effect of NO on chloroplast homeostasis but also on the release of ROS by the chloroplast and their interaction with NO.

Finally, both ROS and NO are also produced by peroxisomes. Peroxisomes are a major site of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 production in plant cells (del Rio *et al.*, 2002). They have also been considered as a major site of NO synthesis (Corpas *et al.*, 2001). In a study, the possible interaction between NO and peroxisomal H_2O_2 production on gene regulation was analysed in transgenic catalase antisense tobacco plants (Zago *et al.*, 2006). The different phenotypes obtained under various concentrations of H_2O_2 and NO clearly supported the idea that a tight balance between both molecules is necessary for HR-type cell death. Furthermore, this cDNA-AFLP analysis demonstrated that only 16 differentially expressed transcripts required both NO and H_2O_2 . In contrast, 152 genes could be modulated by either NO or H_2O_2 , thus demonstrating that the NO and H_2O_2 pathways may overlap to a greater extent than initially thought in HR-induced cell death.

7.3.3 A protective molecule

Finally, NO has been reported as both a cytotoxic and cytoprotective molecule in plants (Beligni & Lamattina, 2001). This dual role may depend to a large extent on a tight spatio-temporal kinetic of cellular concentrations, which will be governed by the production, displacement and removal of RNS (Noriega *et al.*, 2007). NO was shown to function as an antioxidant and thus to protect plants from a variety of abiotic stresses such as drought, heat, salt or heavy metal stresses (Garcia-Mata & Lamattina, 2002; Uchida *et al.*, 2002; Noriega *et al.*, 2007; Tewari *et al.*, 2008) and oxidative stress (Beligni & Lamattina, 2001; Dubovskaya *et al.*, 2007). First, this protective effect may originate from direct detoxification of ROS by NO. Indeed, it is widely believed that NO can protect cells against oxidative stress by preventing the Fenton reaction by scavenging iron, thus avoiding the formation of hydroxyl radicals, one of the most phytotoxic oxygen radicals (Wink *et al.*, 1995). Furthermore, the reaction between NO and $O_2^{\cdot-}$, which leads to $ONOO^-$ formation, may help in reducing the adverse effects of oxygen radical accumulation. Second, the antioxidative properties of NO may rely on its ability to alter the plant antioxidant system. Indeed, it was demonstrated that NO could stimulate the expression of a haeme oxygenase, which catalyses the conversion of haeme to biliverdin IX with the concomitant release of CO and iron, and acts against oxidative stress in plants (Noriega *et al.*, 2007). In addition, several studies have also reported an up-regulation of several antioxidant enzymes following treatment with low NO concentrations (Parani *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005).

Finally, new insight into NO cytoprotective effects was provided by Belenghi *et al.* (2007). These authors reported that the *A. thaliana* metacaspase 9 (AtMC9) is constitutively S-nitrosylated *in vivo* at the catalytic Cys 147 residue. This post-translational modification inhibits AtMC9 autoprocessing and proteolytic activity. This mechanism resembles those described for caspase-3 in mammalian cells. In resting cells, S-nitrosylation of the catalytic cysteine of caspase-3 maintains the enzyme in an inactive form

of the key messengers governing the control of Ca^{2+} homeostasis. The interaction between NO and Ca^{2+} operates in response to various stimuli in plants, suggesting that the cross-talk between both messengers is a basic transduction mechanism as reported in other organisms. Similarly, NO and ROS act in concert with protective or toxic effects as potential consequences, depending on the tight spatio-temporal kinetics of their respective production. It is however extremely difficult to predict the effects of the concerted action of NO and ROS, the main problems facing these studies being the currently lack of drugs capable of selectively acting in one species and our limited understanding of NO chemistry in plants. Finally, the ability of NO to modulate protein kinase activities represents another example of how NO mediates its action. The question of the physiological influence of NO/phosphorylation cascades remains, for the most, unanswered.

It is to be hoped that current and future studies will contribute towards the identification of S-nitrosylated, metal-nitrosylated and tyrosine-nitrated proteins mediating NO signalling. Deeper insight into these NO-dependent post-translational protein modifications not only will permit the detailed characterization of the biochemical steps involved in NO control of the Ca^{2+} , ROS and protein kinase systems, but also will allow us to understand the physiological significance of the heterogeneous behaviours of NO in plants.

Acknowledgements

This work was supported by the Conseil Régional de Bourgogne (funding number 07 9201 CPER O2 S 5527) and the Agence Nationale de la Recherche (BLAN07-2_184783). Jérémy Astier, Angélique Besson-Bard and Claire Parent are supported by fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie. Angélique Besson-Bard was also supported by a fellowship from L'Oréal France-UNESCO-Académie des Sciences ('Pour les Femmes et la Science' Program, National France Award 2007).

References

- Ahern, G.P., Klyachko, V.A. & Jackson, M.B. (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neuroscience* **25**, 510–517.
- Ali, R., Ma, W., Lemtiri-Chlieh, F., *et al.* (2007) Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* **19**, 1081–1095.
- Anil, V.S. & Rao, K.S. (2000) Calcium-mediated signaling during sandalwood somatic embryogenesis. Role for exogenous calcium as second messenger. *Plant Physiology* **123**, 1301–1312.
- Aracena-Parks, P., Goonasekera, S.A., Gilman, C.P., *et al.* (2006) Identification of cysteines involved in S-nitrosylation, S-glutathionylation, and oxidation to

- disulfides in ryanodine receptor type 1. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 40354–40368.
- Beck, K.F., Eberhardt, W., Frank, S., *et al.* (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signalling. *Journal of Experimental Biology* **202**, 645–653.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., *et al.* (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1352–1358.
- Beligni, M.V. & Lamattina, L. (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell and Environment* **24**, 267–278.
- Benhar, M., Forrester, M.T., Hess, D.T., *et al.* (2008) Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins. *Science* **320**, 1050–1054.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. & Wendehenne, D. (2008a) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21–39.
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., *et al.* (2008b) Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling. *Molecular Plant* **1**, 218–228.
- Besson-Bard A., Griveau S., Bedioui F., *et al.* (2008c). Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3407–3414.
- Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H. & Lauriere, C. (2004) Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41758–41766.
- Boudsocq, M. & Lauriere, C. (2005) Osmotic signaling in plants: multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant Physiology* **138**, 1185–1194.
- Broillet, M.C. (2000) A single intracellular cysteine residue is responsible for the activation of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel by NO. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 15135–15141.
- Brookes, P.S., Levonen, A.L., Shiva, S., *et al.* (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 755–764.
- Capone, R., Tiwari, B.S. & Levine, A. (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**, 425–428.
- Cary, S.P., Winger, J.A., Derbyshire, E.R., *et al.* (2006) Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 231–239.
- Chen, J., Daggett, H., De Waard, M., *et al.* (2002) Nitric oxide augments voltage-gated P/Q-type Ca²⁺ channels constituting a putative positive feedback loop. *Free Radical Biology and Medicine* **32**, 638–649.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., *et al.* (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Journal* **24**, 667–677.
- Clementi, E. (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochemical Pharmacology* **55**, 713–718.
- Clementi, E. & Meldolesi, J. (1997) The cross-talk between nitric oxide and Ca²⁺: a story with a complex past and a promising future. *Trends in Pharmacological Sciences* **18**, 266–269.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B. & del Rio, L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 145–150.

- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., *et al.* (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* **224**, 246–254.
- Crawford, N.M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 471–478.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R., *et al.* (2006) Response to Zemojtel *et al.*: plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* **11**, 526–527.
- Curtin, J.F., Donovan, M. & Cotter, T.G. (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods* **265**, 49–72.
- de Pinto, M.C., Tommasi, F. & De Gara, L. (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* **130**, 698–708.
- de Pinto, M.C., Paradiso, A., Leonetti, P., *et al.* (2006) Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant Journal* **48**, 784–795.
- del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., *et al.* (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1255–1272.
- Delledonne, M. (2005) NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 390–396.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., *et al.* (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., *et al.* (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13454–13459.
- Denninger, J.W. & Marletta, M.A. (1999) Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica Biophysica Acta* **1411**, 334–350.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., *et al.* (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* **55**, 205–212.
- Droillard, M., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., *et al.* (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters* **527**, 43–50.
- Dubovskaya, L., Kolesneva, E., Knyazev, D., *et al.* (2007) Protective role of nitric oxide during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in tobacco plants. *Russian Journal of Plant Physiology* **54**, 755–762.
- Durner, J., Wendehenne, D. & Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10328–10333.
- Fliegert, R., Gasser, A. & Guse, A.H. (2007) Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochemical Society Transaction* **35**, 109–114.
- Foster, M.W. & Stamler, J.S. (2004) New insights into protein S-nitrosylation. Mitochondria as a model system. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25891–25897.
- Gao, C., Guo, H., Wei, J., *et al.* (2005) Identification of S-nitrosylated proteins in endotoxin-stimulated RAW264.7 murine macrophages. *Nitric Oxide* **12**, 121–126.
- Garcia-Mata, C. & Lamattina, L. (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology* **128**, 790–792.

- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., *et al.* (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11116–11121.
- Gonzalez-Perez, S., Quijano, C., Romero, N., *et al.* (2008) Peroxynitrite inhibits electron transport on the acceptor side of higher plant photosystem II. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**, 25–33.
- Gorg, B., Qvartrkhava, N., Voss, P., *et al.* (2007) Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Letters* **581**, 84–90.
- Gould, K.S., Lamotte, O., Klinguer, A., *et al.* (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell and Environment* **26**, 1851–1862.
- Gow, A.J., Buerk, D.G. & Ischiropoulos, H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosothiol *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2841–2845.
- Gow, A.J., Farkouh, C.R., Munson, D.A., *et al.* (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, L262–268.
- Grassi, C., D'Ascenzo, M. & Azzena, G.B. (2004) Modulation of Ca_v1 and Ca_v2.2 channels induced by nitric oxide via cGMP-dependent protein kinase. *Neurochemistry International* **45**, 885–893.
- Greco, T.M., Hodara, R., Parastatidis, I., *et al.* (2006) Identification of S-nitrosylation motifs by site-specific mapping of the S-nitrosocysteine proteome in human vascular smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7420–7425.
- Greenacre, S.A. & Ischiropoulos, H. (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radical Research* **34**, 541–581.
- Guo, F.Q. & Crawford, N.M. (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436–3450.
- Halford, N.G. & Hardie, D.G. (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology* **37**, 735–748.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurrea, D., *et al.* (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of Experimental Botany* **54**, 467–475.
- Hanafy, K.A., Krumenacker, J.S. & Murad, F. (2001) NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical Science Monitor* **7**, 801–819.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., *et al.* (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 150–166.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., *et al.* (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* **132**, 666–680.
- Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., *et al.* (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology* **3**, 193–197.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C.G., *et al.* (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* **142**, 1246–1255.
- Jones, A. (2000) Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death? *Trends in Plant Science* **5**, 225–230.

- Kaiser, W.M. & Huber, S.C. (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1981–1989.
- Kelner, A., Pekala, I., Kaczanowski, S., *et al.* (2004) Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein kinase activated by osmotic stress. *Plant Physiology* **136**, 3255–3265.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., *et al.* (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8849–8855.
- Klotz, L.O., Schroeder, P. & Sies, H. (2002) Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 737–743.
- Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Minami, H., *et al.* (2004) Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell* **16**, 1163–1177.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F. & Vercesi, A.E. (2001) Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* **495**, 12–15.
- Krumenacker, J.S., Hanafy, K.A. & Murad, F. (2004) Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin* **62**, 505–515.
- Kumar, D. & Klessig, D.F. (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Molecular Plant Microbe Interactions* **13**, 347–351.
- Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 305–315.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M., *et al.* (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 109–136.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., *et al.* (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**, 516–529.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., *et al.* (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 1369–1376.
- Lanteri, M.L., Pagnussat, G.C. & Lamattina, L. (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1341–1351.
- Leckie, C., Empson, R., Becchetti, A., *et al.* (2003) The NO pathway acts late during the fertilization response in sea urchin eggs. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 12247–12254.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., *et al.* (2005) Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* **38**, 527–538.
- Mannick, J.B. & Schonhoff, C.M. (2002) Nitrosylation: the next phosphorylation? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **408**, 1–6.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., *et al.* (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969–980.
- Mikolajczyk, M., Awotunde, O.S., Muszynska, G., *et al.* (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**, 165–178.

- Millar, A.H. & Day, D.A. (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Letters* **398**, 155–158.
- Minetti, M., Mallozzi, C. & Di Stasi, A.M. (2002) Peroxynitrite activates kinases of the src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 744–754.
- Mishra, N.S., Tuteja, R. & Tuteja, N. (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**, 55–68.
- Mitchell, D.A., Morton, S.U., Fernhoff, N.B., *et al.* (2007) Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11609–11614.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., *et al.* (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* **138**, 1516–1526.
- Mur, L.A., Santosa, I.E., Laarhoven, L.J., *et al.* (2005) Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* Pathovars. *Plant Physiology* **138**, 1247–1258.
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., *et al.* (2008) The hypersensitive response: the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**, 501–520.
- Murthy, K.S. & Makhlof, G.M. (1998) cGMP-mediated Ca²⁺ release from IP₃-insensitive Ca²⁺ stores in smooth muscle. *American Journal of Physiology* **274**, C1199–1205.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., *et al.* (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* **14**, 3089–3099.
- Noctor, G., De Paepe, R. & Foyer, C.H. (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* **12**, 125–134.
- Noriega, G.O., Yannarelli, G.G., Balestrasse, K.B., *et al.* (2007) The effect of nitric oxide on heme oxygenase gene expression in soybean leaves. *Planta* **226**, 1155–1163.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L. & Lamattina, L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* **132**, 1241–1248.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lombardo, M.C., *et al.* (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology* **135**, 279–286.
- Parani, M., Rudrabhatla, S., Myers, R., *et al.* (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 359–366.
- Peunova, N. & Enikolopov, G. (1993) Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells. *Nature* **364**, 450–453.
- Planchet, E., Jagadis-Gupta, K., Sonoda, M., *et al.* (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant Journal* **41**, 732–743.
- Qi, M. & Elion, E.A. (2005) MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* **118**, 3569–3572.
- Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4003–4008.
- Reyes-Harde, M., Potter, B.V., Galione, A., *et al.* (1999) Induction of hippocampal LTD requires nitric-oxide-stimulated PKG activity and Ca²⁺ release from cyclic ADP-ribose-sensitive stores. *Journal of Neurophysiology* **82**, 1569–1576.

- Robson, C.A. & Vanlerberghe, G.C. (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiology* **129**, 1908–1920.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Matte, A., *et al.* (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**, 4120–4130.
- Roy, B. & Garthwaite, J. (2006) Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 12185–12190.
- Samaj, J., Baluska, F. & Hirt, H. (2004) From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany* **55**, 189–198.
- Schmidt, H.H. & Walter, U. (1994) NO at work. *Cell* **78**, 919–925.
- Schopfer, F.J., Baker, P.R. & Freeman, B.A. (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 646–654.
- Shi, S., Wang, G., Wang, Y., *et al.* (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* **13**, 1–9.
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., *et al.* (2005) Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant Journal* **43**, 520–529.
- Stamler, J.S., Lamas, S. & Fang, F.C. (2001) Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675–683.
- Sun, J., Xu, L., Eu, J.P., *et al.* (2003) Nitric oxide, NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different mechanisms. An allosteric function for O₂ in S-nitrosylation of the channel. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 8184–8189.
- Swidzinski, J.A., Sweetlove, L.J. & Leaver, C.J. (2002) A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **30**, 431–446.
- Swidzinski, J.A., Leaver, C.J. & Sweetlove, L.J. (2004) A proteomic analysis of plant programmed cell death. *Phytochemistry* **65**, 1829–1838.
- Takahashi, S. & Yamasaki, H. (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters* **512**, 145–148.
- Tewari, R., Kim, S., Hahn, E.J., *et al.* (2008) Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng*. *Plant Biotechnology Reports* **2**, 113–122.
- Tjong, Y.W., Jian, K., Li, M., *et al.* (2007) Elevated endogenous nitric oxide increases Ca²⁺ flux via L-type Ca²⁺ channels by S-nitrosylation in rat hippocampal neurons during severe hypoxia and in vitro ischemia. *Free Radical Biology and Medicine* **42**, 52–63.
- Turpaev, K.T. & Litvinov, D.Y. (2004) Redox-dependent regulation of the expression of nitric oxide-inducible genes. *Molecular Biology* **38**, 47–57.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., *et al.* (2002) Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science* **163**, 515–523.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., *et al.* (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 429–440.

- Vanlerberghe, G.C., Robson, C.A. & Yip, J.Y.H. (2002) Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiology* **129**, 1829–1842.
- Wang, Y., Wagner, M.B., Joyner, R.W., *et al.* (2000) cGMP-dependent protein kinase mediates stimulation of L-type calcium current by cGMP in rabbit atrial cells. *Cardiovascular Research* **48**, 310–322.
- Willmott, N., Sethi, J.K., Walseth, T.F., *et al.* (1996) Nitric oxide-induced mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 3699–3705.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. & Hancock, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell and Environment* **31**, 622–631.
- Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., *et al.* (1995) Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicology Letters* **82–83**, 221–226.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., *et al.* (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* **5**, 261–270.
- Yao, X. & Huang, Y. (2003) From nitric oxide to endothelial cytosolic Ca²⁺: a negative feedback control. *Trends Pharmacological Science* **24**, 263–266.
- Yoshida, T., Inoue, R., Morii, T., *et al.* (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chemical Biology* **2**, 596–607.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., *et al.* (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* **141**, 404–411.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., *et al.* (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiology* **136**, 2875–2886.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., *et al.* (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist* **175**, 36–50.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., *et al.* (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Letters* **515**, 75–78.

Publication 4 : *Current view of nitric oxide-responsive genes in plants.*



Review

Current view of nitric oxide-responsive genes in plants[☆]

Angélique Besson-Bard^a, Jérémy Astier^a, Sumaira Rasul^a, Izabela Wawer^a, Carole Dubreuil-Maurizi^a, Sylvain Jeandroz^{b,*}, David Wendehenne^{a,*}

^aUnité Mixte de Recherche INRA 1088/CNRS 5184/Université de Bourgogne, Plante-Microbe-Environnement, 17 rue Sully, 21000 Dijon, France

^bUnité Propre de Recherche avec Soutien de Programme Plante-Redox-Signalisation-Stress, AgroSup-Dijon, 26 Boulevard du Docteur Petitjean, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2009

Received in revised form 24 June 2009

Accepted 25 June 2009

Available online 1 July 2009

Keywords:

Biotic and abiotic stresses

L-NAME

Nitric oxide

Nitric oxide-responsive genes

Nitric oxide synthase-like enzyme

Transcriptomic analysis

ABSTRACT

Significant efforts have been directed towards the identification of genes differentially regulated through nitric oxide (NO)-dependent processes. These efforts comprise the use of medium- and large-scale transcriptomic analyses including microarray and cDNA-amplification fragment length polymorphism (AFLP) approaches. Numerous putative NO-responsive genes have been identified in plant tissues and cell suspensions with transcript levels altered by artificially released NO, or endogenously produced. Comparative analysis of the data from such transcriptomic analyses in *Arabidopsis* reveals that a significant part of these genes encode proteins related to plant adaptive responses to biotic and abiotic stresses. Putative common transcription factor-binding sites in the promoter of NO-regulated genes have been defined. The current challenge remains to validate the interpretations deduced from the transcriptomic analyses and to understand the molecular mechanisms underlying the NO-dependent modulation of the genes of interest.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	302
2. Inhibitors of mammalian NOS: useful tools to decipher NO functions in plants	303
3. Overview of genes modulated through NO constitutively produced via a NOS-like pathway	303
4. Overview of NO-responsive genes in plants: comparison of transcriptomic data	303
4.1. Medium- and large-scale transcriptional analyses	303
4.2. NO-responsive promoters	307
4.3. Commonly modulated genes	307
5. Concluding remarks	308
Acknowledgements	308
References	308

1. Introduction

The role of the free radical nitric oxide (NO) in plants has become an important research topic. NO is endogenously produced via non-enzymatic as well as enzymatic routes involving nitrate reductase and a putative nitric oxide synthase (NOS), the main source for NO in animals [1–3]. Recent advances highlight that NO

modulates many functions ranging from root growth to the adaptive response to biotic and abiotic stresses [4]. Mechanistically, the biological effects of NO and its derivatives, such as peroxynitrite (ONOO⁻), appear to be partly determined by their chemical reactions with transition metals or critical Cys and Tyr residues of target proteins [5]. These post-translational modifications have been implied in the control of the activity of several proteins *in vitro* and of a few *in vivo*, e.g. metacaspase 9, methionine adenosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NPR1, and peroxiredoxin [6–8]. Biological actions arise as a consequence of NO interplay with signaling components such as protein kinases, reactive oxygen species (ROS), as well as the second messengers Ca²⁺, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose [9–11]. Cross-talk between these signaling compounds occurs in plant

[☆] Note: To access the results of the CATMA arrays related to L-NAME-modulated genes in *Arabidopsis*, please email: wendehen@dijon.inra.fr.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jeandroz@dijon.inra.fr (S. Jeandroz), wendehen@dijon.inra.fr (D. Wendehenne).

cells challenged by hormones, PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) and various abiotic stresses [12–15].

Certain NO target proteins and signaling partners are part of intracellular transduction cascades leading to the activation or suppression of gene expression. Accordingly, exogenously applied or endogenously produced NO in plant tissues or cell suspensions has been reported to modulate the accumulation of the transcripts of numerous genes in various plant species [16,17]. The physiological impacts of these gene modulations by NO have hardly been investigated. In this review, we summarize, compare and comment on the data sets resulting from medium- and large-scale transcriptomic experiments performed to identify NO-responsive genes in plants. This analysis strengthens the emerging picture that NO plays a central role in mediating adaptive responses to (a)biotic stresses.

2. Inhibitors of mammalian NOS: useful tools to decipher NO functions in plants

Two main enzymatic pathways for NO production in plants have been described. The first one involves nitrate reductase which catalyses the reduction of nitrite to NO, both *in vivo* and *in vitro* [3]. Nitrate reductase is a main NO source during hypoxia and in the signaling pathway triggers by abscisic acid leading to stomatal closure [4,10]. The second pathway involves a putative NOS. In mammals, NOS generates NO from the metabolism of L-arginine (L-Arg). More precisely, NOS catalyses the NADPH- and O₂-dependent oxidation of L-Arg to citrulline and NO and utilizes FAD, FMN and tetrahydrobiopterin as redox cofactors. This enzyme has bidomain structures containing an oxygenase domain and a reductase domain separated by a calmodulin binding site [18,19]. The possibility that a NOS-like enzyme also exists in plants has been investigated in depth in the past decade. NOS activity occurs in distinct plant tissues and, at the cellular level, in specific organelles including mitochondria, peroxisomes, and the nucleus (for example see [2,20]). This activity is sensitive to competitive inhibitors of mammalian NOS such as N^ω-nitro-L-Arg-methyl ester (L-NAME) and N^ω-monomethyl-L-Arg acetate (L-NMMA) (Table 1). Although these experimental arguments support the existence of an L-Arg-dependent pathway for NO synthesis in plants, the corresponding enzymes remain unidentified and there is no homolog of animal NOS in the plant genomes sequenced so far [21]. Therefore, it seems reasonable that the plant NOS-like protein could be structurally different from animal NOS.

Inhibitors of mammalian NOS (Table 1) are useful in analysing the putative involvement of plant NOS-like enzyme, and therefore NO, in modulating physiological functions. These compounds have been useful in demonstrating that a NOS-like enzyme is involved in processes such as plant growth, hormonal signaling, stomatal closure, disease resistance and response to abiotic stresses including salt and iron overload. These compounds were also highly helpful in deciphering the processes underlying NO signaling in plant cells and highlighted the ability of NO to modulate protein kinase activities, ROS production, Ca²⁺ mobilization, and gene transcript accumulation [9,10,17].

Table 1
Examples of inhibitors of mammalian NOS suppressing NO synthesis in plants.

Mammalian NOS inhibitors
L-NAME: N ^ω -nitro-L-Arg-methyl ester
L-NIO: N ² -(iminoethyl)-L-ornithine
L-NMMA: N ^ω -monomethyl-L-Arg acetate
L-NNA: N ^ω -nitro-L-Arg
M-ITU: methylisothiourea
PBITU: S,S'-1,3-phenylene-bis(1,2-ethanediy)-bis-isothiourea

3. Overview of genes modulated through NO constitutively produced via a NOS-like pathway

A microarray analysis (CATMA arrays, 22,089 nuclear genes) aimed at identifying L-NAME-modulated genes in *Arabidopsis* has been recently performed [22]. This work provided a first catalogue of genes whose expression could be modulated through a constitutive NOS-like activity sensitive to L-NAME. This microarray analysis showed that the exposure of *Arabidopsis* seedling roots to 4 mM of L-NAME for 24 h significantly affected the level of expression of 2656 genes. Three-quarters of these genes were down-regulated and are candidate genes to be up-regulated through NO constitutively produced via a L-Arg-dependent process. The functional classification and distribution of the L-NAME-repressed genes showing the highest changes in transcript levels (435 genes with a Log₂ ratio < -1.5) are shown in Fig. 1A. The most abundant categories correspond to genes whose products are predicted to be involved in primary and secondary metabolism, response to (a)biotic stimuli and stress, and the transport of micronutrient ions, amino-acids, and carbohydrates. The less abundant categories include genes related to signal transduction, transcriptional regulation and protein biosynthesis/folding and energy pathways. Several of these genes are known to be modulated by NO produced under physiological contexts such as defence responses and iron deficiency. These include genes encoding phenylalanine ammonia-lyase (PAL1, AT2G37040), a key enzyme of the phenylpropanoid pathway [23,24], L-ascorbate peroxidase (APX1, AT1G07890), a major ROS-detoxifying enzyme [25,26], and the iron transport-related proteins IRT1 (AT4G19690), FRO2 (AT1G01580) and FIT (AT2G28160) whose tomato orthologs were also shown to be up-regulated in roots exposed to NO donors [27]. Interestingly, the L-NAME-repressed genes described above include genes encoding proteins related to auxin biosynthesis, transport and signaling such as the argonaute protein AGO1 (AT1G48410) and the auxin influx transporter AUX1 (AT2G38120). These data fit well with previous evidence that NO cross-talks with the auxin pathways [13]. Finally, the functional classification of L-NAME-induced genes having the highest increase in transcript levels (15 genes with a Log₂ ratio > 1.5; Fig. 1A) suggests their putative function in various processes similar to those described for L-NAME-repressed genes. In regards to the repressing effect of L-NAME on NO production, these genes might be down-regulated through a NOS-like-dependent mechanism. So far, none of them are known to be regulated by NO in physiological conditions.

4. Overview of NO-responsive genes in plants: comparison of transcriptomic data

4.1. Medium- and large-scale transcriptional analyses

Changes in *Arabidopsis* plantlet and cell suspension gene expression in response to gaseous NO or NO donors have been investigated using medium- and large-scale transcriptional analyses including microarray and cDNA-AFLP. The first extensive survey of NO-responsive genes was performed using a cDNA microarray containing 200 defence-related genes and 50 genes related to primary metabolism [28]. This analysis revealed that the treatment of *Arabidopsis* cell suspensions with the NO donor NOR-3 ((±)-(E)-ethyl-2-[(E) hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamine) promoted the transient accumulation of transcripts encoding pathogenesis-related (PR) proteins, alternative oxidase (AOX1a, AT3G22370) and redox-related proteins such as glutathione S-transferase (GST). Based on these data, a role for AOX1a in counteracting the toxicity of NO has been suggested. A functional link between lipopolysaccharide (LPS)-induced NO production and the induction of genes encoding GSTs, cytochrome P450 and PR proteins was established with a larger

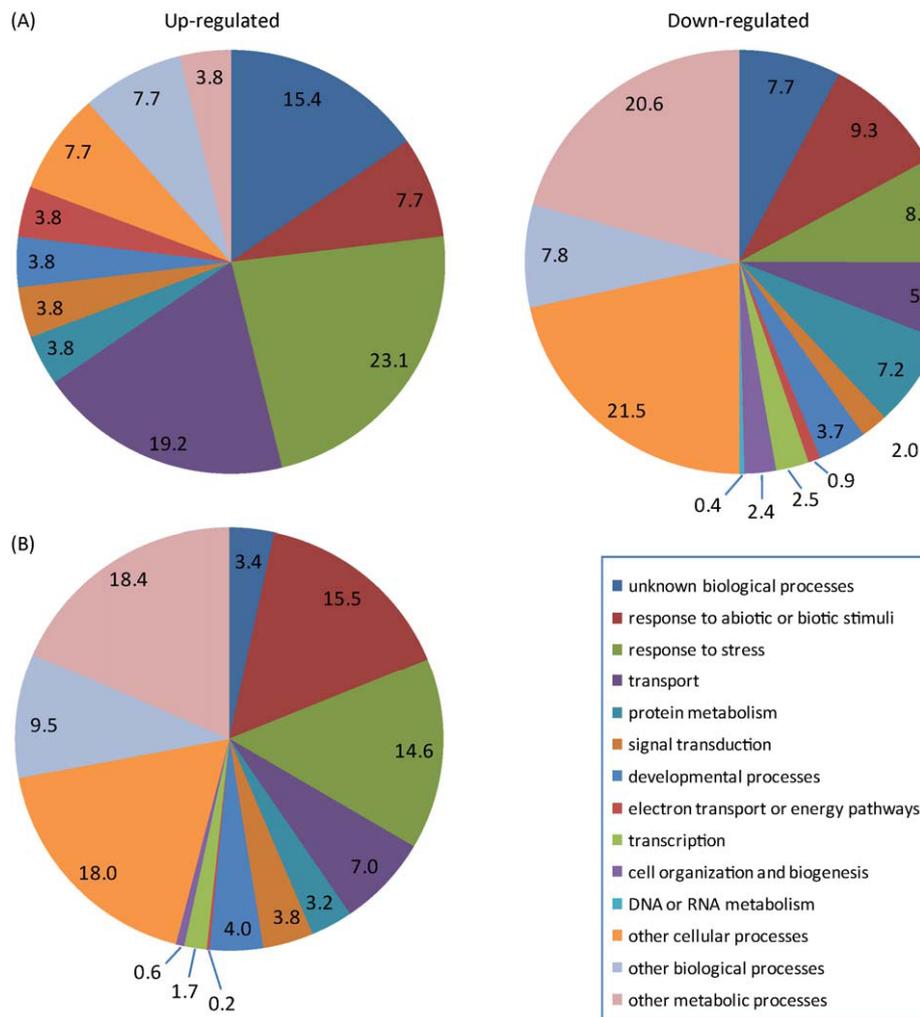


Fig. 1. Putative functional classification of *l*-NAME-responsive genes in *Arabidopsis*. (A) Functional classification of the *l*-NAME-up-regulated (left) and *l*-NAME-down-regulated (right) genes displaying the highest changes in transcript levels (Log_2 ratio > 1.5 and Log_2 ratio < -1.5 , respectively). (B) Functional classification of the *l*-NAME-responsive genes also identified in at least one of the medium- and large-scale transcriptomic analyses devoted to the identification of *Arabidopsis* NO target genes. Genes were putatively assigned to functional categories based on the Gene Ontology Annotations from the TAIR database (<http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp>). The number of genes in each category is expressed in percent (%).

custom-designed microarray including about 700 *Arabidopsis* defence-related genes [29]. These studies were further completed by three full genome global transcripts profiling analyses. First, the transcript changes were measured in *Arabidopsis* irrigated with different concentrations of the NO donor sodium nitroprusside using a genome array covering over 24,000 genes [30]. In total, 342 genes were up-regulated and 80 genes were down-regulated at least twofold in response to 3 h of sodium nitroprusside treatment. These genes putatively encode proteins related to ethylene and lignin biosynthesis, to signaling such as protein kinases, to cellular transport, to transcriptional regulation, and to defence responses and protection against oxidative stresses. A transcript encoding ferritin 1 (AT5G01600) also accumulated, thus suggesting a key role of NO in the regulation of iron homeostasis, similar to other reports [22,28,31,32]. Second, a whole genome microarray with about 26,000 predicted unigenes was used to identify root genes modulated by the NO donor sodium nitroprusside in *Arabidopsis* plantlets [33]. Only 87 genes differentially expressed more than twofold after 3 h of treatment. The number of repressed genes was higher than those induced (60:26). The functional putative classification of the corresponding proteins was almost similar to those reported in the other transcriptomic approaches. Interestingly, among these genes,

only a few genes were similarly modulated by salicylate and jasmonate and only one gene putatively encoding a NAC (no apical meristem/ATAF/cup-shaped cotyledon) transcription factor (AtNAC3, AT3G29035) appeared to be commonly regulated by salicylate, jasmonate and NO. Each signaling molecule may well control specific signaling pathways leading to the modulation of the transcriptional activity of a specific set of genes. Third, a full genome array analysis was recently performed from *Arabidopsis* leaves sprayed with the NO donor sodium nitroprusside [34]. A total of 614 genes, including 579 up-regulated and 35 down-regulated genes, were identified as NO target genes. A majority of these genes are also responsive to hormones and (a)biotic stresses. Interestingly, many of the sodium nitroprusside-regulated genes were also activated by ozone (O_3), suggesting that both NO and O_3 use common or converging signaling pathways. Finally, as mentioned above, NO-induced transcriptional changes in *Arabidopsis* were also analysed by cDNA-AFLP transcript profiling. The infiltration of *Arabidopsis* leaves with the NO donor sodium nitroprusside induced the differential expression of 120 genes amongst 2,500 cDNA examined [35]. Those genes were putatively related to defence and stress responses, cellular transport, signal transduction, metabolism and photosynthesis.

Table 2 (Continued)

AGI ID	Annotation	Ratio	Huang et al., 2002	Polverari et al., 2003	Parani et al., 2004	Zeidler et al., 2004	Badri et al., 2008	Palmieri et al., 2008	Ahlfors et al., 2009	Ferrari et al., 2008
AT3G21070	ATP-NAD kinase family protein	-1.02								
AT3G47220	phosphoinositide-specific phospholipase C family protein	-1.03								
AT2G28190	copper/zinc superoxide dismutase 2 (CSD2)	-1.04								
AT3G16857	arabidopsis response regulator 1 (ARR1)	-1.04								
AT3G56360	expressed protein	-1.04								
AT1G79410	organic cation/carnitine transporter5 (ATOCT5)	-1.05								
AT1G79550	cytosolic phosphoglycerate kinase (PGK)	-1.05								
AT4G34950	nodulin family protein	-1.06								
AT5G39670	calcium-binding EF hand family protein	-1.06								
AT5G12890	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-1.07								
AT2G36880	methionine adenosyltransferase 3 (MAT3)	-1.08								
AT3G02990	heat shock transcription factor A1E (ATHSFA1E)	-1.08								
AT2G05810	armadillo/beta-catenin repeat family protein	-1.10								
AT3G46930	protein kinase family protein	-1.14								
AT3G48990	AMP-dependent synthetase and ligase family protein	-1.14								
AT2G04780	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA7)	-1.14								
AT2G26710	cytochrome P450 CYP734A1 (BAS1)	-1.17								
AT3G54420	class IV chitinase (CHIV)	-1.17								
AT1G05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO4)	-1.17								
AT2G36830	gamma tonoplast intrinsic protein 1 (TIP1:1)	-1.18								
AT2G45550	cytochrome P450 family protein CYP76C4	-1.18								
AT1G74590	glutathione S-transferase tau 10 (AtGSTU10)	-1.18								TC95725
AT1G30510	root-type ferredoxin:NADP(H) oxidoreductase (ATRFNR2)	-1.18								
AT1G68620	hydrolase	-1.19								
AT1G57590	carboxylesterase	-1.25								
AT1G27320	arabidopsis histidine kinase (AHK3)	-1.26								
AT4G30190	plasma membrane proton ATPase 2 (PMA2)	-1.20								
AT5G60660	plasma membrane intrinsic protein 2:4 (PIP2:4/PIP2F)	-1.20								
AT5G26030	ferrochelatase I	-1.21								
AT5G54160	O-methyltransferase 1 (OMT1)	-1.22								
AT2G46140	late embryogenesis abundant protein, putative	-1.22								
AT3G50740	UDP-glucosyl transferase 72E1 (UGT72E1)	-1.24								
AT1G77490	L-ascorbate peroxidase, thylakoid-bound (tAPX)	-1.26								
AT3G19010	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	-1.31								
AT2G22500	plant uncoupling mitochondrial protein 5 (ATPUMP5)	-1.31								
AT1G67810	sulfur E 2 (SUFE2)	-1.35								
AT5G63190	MA3 domain-containing protein	-1.41								
AT1G74020	stricotidine synthase 2 (SS2)	-1.42								
AT3G54640	tryptophan synthase alpha chain (TSA1)	-1.43								
AT5G58620	zinc finger (CCCH-type) family protein	-1.50								
AT1G76490	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 1 (HMG1)	-1.51								
AT1G24100	UDP-glucosyl transferase 74B1 (UGT74B1)	-1.51								
AT1G70520	protein kinase family protein	-1.52								
AT5G55620	expressed protein	-1.55								
AT4G36430	peroxidase, putative	-1.61								
AT3G55430	glycosyl hydrolase family 17 protein / beta-1,3-glucanase, putative	-1.74								
AT1G09560	germin-like protein 5 (GLP5)	-1.76								
AT5G13750	zinc induced facilitator-like 1 (ZIFL1)	-1.77								
AT2G28080	glycosyltransferase family protein	-1.80								
AT3G44990	xyloglucan endo-transglycosylase-related 8 (XTR8)	-1.81								
AT2G24180	cytochrome P450 71B6 (CYP71B6)	-1.93								
AT2G28560	phospholipase A 2A (PLA2A/PLP2)	-1.96								
AT4G02330	pectinesterase ATPMEPCRB	-1.98								
AT1G53580	glyoxalase 2-3 (ETHE1/GLX2-3/GLY3)	-2.00								
AT3G01290	band 7 family protein	-2.03								
AT5G07440	glutamate dehydrogenase 2 (GDH2)	-2.05								
AT1G54270	eukaryotic translation initiation factor 4A-2 (eIF-4A-2)	-2.06								
AT1G22710	sucrose-proton symporter 2 (SUC2)	-2.07								TC94438
AT2G16660	nodulin family protein	-2.11								
AT3G16240	delta tonoplast integral protein (delta-TIP)	-2.17								
AT1G01300	aspartyl protease family protein	-2.20								
AT4G22330	acyl-CoA independent ceramide synthase (AtCES1)	-2.22								
AT1G64720	membrane related protein CP5	-2.31								
AT1G08930	early-responsive to dehydration 6 (ERD6)	-2.37								
AT3G07720	kelch repeat-containing protein	-2.44								
AT1G16880	uridylyltransferase-related	-2.48								
AT4G34410	redox responsive transcription factor 1 (RRTF1)	-2.51								
AT2G36910	P-glycoprotein 1 (ATPGP1)	-2.55								
AT1G07890	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic (APX1)	-2.60								
AT2G46370	jasmonate resistant 1 (JAR1)	-2.61								
AT1G59870	ABC transporter family protein PEN3	-2.62								
AT3G19930	sugar transporter 4 (AISTP4)	-2.85								
AT2G41410	calmodulin, putative	-2.72								
AT1G64650	expressed protein	-2.79								
AT1G51680	4-coumarate:CoA ligase 1 (4CL1)	-3.01								
AT3G28860	multidrug resistance protein 11 (AtMDR11) / P-glycoprotein 19	-3.18								
AT4G04610	5prim-adenylylsulfate reductase (APR1) / PAPS reductase homolog	-3.31								
AT3G09440	heat shock cognate 70 kDa protein 3 (HSC70-3) (HSP70-3)	-3.68								
AT2G30490	cinnamate 4-hydroxylase (C4H) / cytochrome P450 73 (CYP73A5)	-4.44								



4.2. NO-responsive promoters

A recent study provided a first insight as to how NO might regulate gene expression [36]. Using a whole *Arabidopsis* genome microarray, 28 up-regulated genes were identified in plants and cell suspensions exposed to gaseous NO as well as to the NO donor NOR-3. Putative genes specifically modulated in plants or in cell suspensions were also identified (121 and 105 genes, respectively). Five of the up-regulated genes were putatively related to the jasmonate biosynthesis pathway including three 12-oxophytodienoate reductases (AT1G17990, AT1G76680, AT2G06050) and two lipoxygenases (AT1G17420, AT1G72520) [36]. An *in silico* search for common transcription factor binding sites (TFBS) in the promoter regions of the selected genes was performed. Eight families of TFBS occurred at least 15% more often in the promoter region of the candidate genes. Most of the expressed TFBS genes putatively correspond to the binding elements of stress-related transcriptional activators such as bZIP (basic region/leucine zipper motif), WRKY and MYCL (myelocytomatosis viral oncogene homolog L) transcription factors, strengthening a role for NO as a component of (a)biotic stress-related signaling pathways. TFBS elements found in the genes associated to jasmonate biosynthesis give further evidence for the involvement of NO in jasmonate-associated processes. The conclusions drawn from this study should be experimentally validated, but they clearly serve as a starting point for future studies focused on the identification of NO-inducible transcription factors.

4.3. Commonly modulated genes

These microarray analyses provide a global survey of the physiological processes that might be controlled by NO and overwhelm researchers with a wealth of potentially valuable data. A first comprehensive view of these data sets requires looking at the most basic questions: which genes are commonly modulated in all these studies? May they be considered to be real NO targets? An efficient comparison between these transcriptomic approaches requires an understanding of the numerous biological and experimental factors influencing the measurement of gene expression. Indeed, in addition to the chemical nature of the signal applied (gaseous NO, sodium nitroprusside, NOR-3, L-NAME) as well as their respective concentrations, many variables are involved such as the biological systems (leaves or roots, cell cultures) and the corresponding growth conditions (e.g. lighting, age, growth in hydroponic medium or on soil) that differ among studies. We screened all the medium- and large-scale transcriptional analyses discussed above to identify common *Arabidopsis* NO-responsive genes. We limited our search to genes commonly modulated by L-NAME [one study, 22] and NO donors [seven studies, 28,29,30,33,34–36]. Basically, these genes are candidates for modulation by NO produced *via* a L-Arg-dependent process. We identified 158 genes differentially expressed in at least one other study among 2656 L-NAME-modulated genes (Table 2). A significant proportion of those genes are putatively associated with plant responses to biotic, abiotic stimuli and stresses (about 30%, Fig. 1B). Almost 61% of the selected L-NAME-modulated genes were found in only one of the seven other studies, even though similar NO donors (NOR-3 or sodium

nitroprusside) were used, thus underlying the high variability between the transcriptomic analyses. About 31% of the selected genes were identified in two studies and include, for instance, genes encoding GST and glutathione peroxidase, L-ascorbate peroxidase (cytosolic and thylakoid-bound) and proteins of the cytochrome P450 family. 7.5% of the genes were found in three other studies. These genes encode a O-methyltransferase (OMT1, AT5G54160), a plant uncoupling mitochondrial protein (ATPUMP5, AT2G22500) involved in mitochondrial energy linked processes [37], a multidrug resistance P-glycoprotein (PGP4, AT2G47000) displaying auxin efflux activity [38], a UDP-glycosyl transferase (AT2G43820) involved in tryptophan synthesis [39], a polygalacturonase inhibiting protein (PGIP1, AT5G06860) involved in defence response [40], a zinc finger-containing protein (AT1G63840), a class IV chitinase (CHIV; AT3G54420), the germin-like protein 5 (GLP5; AT1G09560), the dark inducible protein DIN10 (AT5G20250) and, once again, proteins of the cytochrome P450 family (AT3G20130, AT2G30490 and AT3G28740). Interestingly, most of these genes were differentially expressed in *Arabidopsis* rosette leaves infected with cabbage leaf curl virus [41], suggesting that their expression could be commonly altered in response to a same biotic stress. Finally, a unique gene, AT3G55430, was commonly found in five other studies. It putatively encodes a beta-1,3-glucanase-like protein belonging to the glycoside hydrolase family 17. Its up-regulation was shown to be under the control of the E2Fa-DPa transcription factor and the corresponding protein putatively catalyses polysaccharide breakdown to serve the energy needs required to synthesize new nucleotides [42]. According to the microarray database Genevestigator [43], AT3G55430 transcripts also accumulate in response to biotic and abiotic stimuli including *Botrytis cinerea*, abscisic acid, ozone, cold and salt. All these stimuli trigger NO synthesis [4].

We extend our comparison to two other transcriptomic analyses looking for NO-responsive genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and *Medicago truncatula*. In the first analysis, the transcriptome of tobacco leaves that have been infiltrated with sodium nitroprusside was investigated by the mean of cDNA-AFLP [44]. Differential gene expression was detected for 214 of the 8000 transcripts examined. However, none of these genes were found to be orthologs to the 158 *Arabidopsis* genes presented Table 2. In the second study, in a first step, a custom-designed microarray representing approximately 1000 NO-regulated genes has been produced [45]. These genes were initially identified by a cDNA-AFLP analysis as modulated by the NO donors sodium nitroprusside and nitrosogluthathione (GSNO) in *Medicago* roots. In a second step, the microarray was hybridized with RNA extracted from *Medicago* leaves or roots treated with the same NO donors for 3 h. Through this approach, 497 genes showed a significant change in expression in a least one condition. Among those genes, 4 orthologs were found in the list of the 158 *Arabidopsis* genes described Table 2. These genes encode a germin-like protein (GLP9, AT4G14630), a serine hydroxymethyltransferase (SHM4, AT4G13930), a GST (tau 10, AT1G74590) and a sucrose-proton transporter (SUC2, AT1G22710) essential for phloem loading with sucrose [46]. These genes were shown to be modulated in response to abscisic acid and during nematodes, *Pseudomonas syringae*, and cabbage leaf curl virus infections, highlighting again a role for NO in mediating the plant response to biotic factors [41,47–49].

*NO-responsive genes which promoter region contains the putative common transcription factor-binding sites (TFBS) described by Palmieri et al. [36]. Annotation refers to automatic *Arabidopsis* annotation according to AGI number from the Institute for Genomic Research. The ratio column indicates complete *Arabidopsis* transcriptome microarray (CATMA) results in a Log₂ ratio obtained from comparison between L-NAME-treated plants and untreated plants. A statistical cut-off, $P < 0.05$ after Bonferroni correction (see colour code), was used to determine which genes were differentially expressed. Positive ratio indicates that the gene is induced (red box); negative ratio that the gene is repressed (green box).

5. Concluding remarks

Advances in understanding NO functions in plants are being aided by the use of medium- and large-scale transcriptional analyses aimed at identifying genes conveying NO signaling to a biological response. Together with other techniques investigating the transcriptional activity of specific genes such as real time PCR and northern blotting (for instance see [16,50]), multiple NO target genes involved in a broad spectrum of processes have been identified. The comparative analysis reported in this review highlights the difficulty in exploiting the data sets deduced from the microarray and cDNA-AFLP approaches in an integrated fashion. This statement is primarily related to the experimental design, array design, hybridization conditions, and other technical concerns which differ between each study. Also, besides technical aspects, one must be cautious of physiological interpretations based on such analyses. Indeed, the list of genes shown Table 2 is restricted to genes whose transcript levels are commonly modulated by L-NAME and NO donor treatments. Basically, these genes might represent candidate genes regulated through NO produced by a NOS-like enzyme. However, we should bear in mind that the selectivity, specificity and metabolism of NO donors and L-NAME in plants remain enigmatic [4,5]. Furthermore, the NO-responsive genes might behave differently depending on the plant species, the tissue, the physiological context and the source of NO [45]. Notably, the list of candidate genes selected Table 2 probably excludes genes modulated in response to NO produced by nitrate reductase. Finally, there is also a need to consider the regulatory networks underlying the expression of those genes and which might involve other signaling molecules such as H₂O₂ or the secondary messenger Ca²⁺ [9,44].

Although a meaningful comparison of the data generated in the NO-related transcriptomic approaches is difficult, the finding that almost 30% of the candidate genes commonly identified in at least two studies are related to the plant response to biotic, abiotic stimuli and stresses is particularly relevant. Notably, these genes include the genes commonly found in at least four studies, e.g. glutathione- and redox-related enzymes such as GST, glutathione peroxidase and L-ascorbate peroxidase, proteins of the cytochrome P450 family, *PGIP1*, *CHIV*, *GLP5*, *DIN10* and *AT3G55430* encoding a beta-1,3-glucanase-like protein. These data strengthen the emerging picture that NO functions as a signal involved in the plant adaptive response to environmental cues. The observation that L-NAME modulates the expression of genes classically associated to the plant response to various stresses warrants specific attention. Indeed, although unspecific effects of L-NAME cannot be excluded, these data open the possibility that the transcriptional activity of such genes might be under the control of NO constitutively produced by a NOS-like enzyme. In other words, their regulation by NO might also occur in resting cells, suggesting their involvement in stress-unrelated cellular processes.

With few exceptions, the physiological impact of the modulation of the putative NO-target genes has not been investigated. Therefore, a comprehensive view of the functions of NO *in vivo* requires the experimental validation of the interpretation deduced from the transcriptomic data. Furthermore, the characterization of the molecular mechanisms underlying the modulation of the transcript accumulation of the genes of interest is imperative. Obtaining such results is a major challenge.

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (BLAN07-2_184783), the Commissariat à l'Energie Atomique (Toxicologie Nucléaire Environnementale program)

and the Taste, Nutrition, and Health Innovation Pole (VITAGORA). Angélique Besson-Bard was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and by L'Oréal France-UNESCO-Académie des Sciences ("Pour les Femmes et la Science" Program, National France Award 2007); Jérémy Astier and Carole Dubreuil-Maurizi were supported by fellowships from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie; Izabela Wawer was supported by a fellowship from the Conseil Régional de Bourgogne (funding number 07 HCP 36) and Sumaira Rasul by Higher Education Commission, Pakistan (SFERE (Société Française d'Exportation des Ressources Educatives) program).

References

- [1] P.C. Bethke, M.R. Badger, R.L. Jones, Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues, *Plant Cell* 16 (2004) 332–341.
- [2] F.J. Corpas, J.B. Barroso, A. Carreras, R. Valderrama, J.M. Palma, A.M. León, L.M. Sandalio, L.A. del Río, Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development, *Planta* 224 (2006) 246–254.
- [3] H. Yamasaki, Y. Sakihama, Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species, *FEBS Lett.* 468 (2000) 89–92.
- [4] A. Besson-Bard, C. Courtois, A. Gauthier, J. Dahan, G. Dobrowolska, S. Jeandroz, A. Pugin, D. Wendehenne, Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signalling, *Mol. Plant* 1 (2008) 218–228.
- [5] A. Besson-Bard, A. Pugin, D. Wendehenne, New insights into nitric oxide signaling in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (2008) 21–39.
- [6] C. Lindermayr, S. Sell, J. Durner, Generation and detection of S-nitrosothiols, *Meth. Mol. Biol.* 476 (2009) 210–222.
- [7] M.C. Romero-Puertas, M. Laxa, A. Mattè, F. Zaninotto, I. Finkemeier, A.M. Jones, M. Perazzolli, E. Vandelle, K.J. Dietz, M. Delledonne, S-Nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration, *Plant Cell* 19 (2007) 4120–4130.
- [8] Y. Wang, B.W. Yun, E. Kwon, J.K. Hong, J. Yoon, G.J. Loake, S-Nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 1777–1784.
- [9] C. Courtois, A. Besson, J. Dahan, S. Bourque, G. Dobrowolska, A. Pugin, D. Wendehenne, Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 155–163.
- [10] M. Delledonne, NO news is good news for plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 (2005) 390–396.
- [11] D. Wendehenne, J. Durner, D.F. Klessig, Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses, *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (2004) 449–455.
- [12] C. García-Mata, R. Gay, S. Sokolovski, A. Hills, L. Lamattina, M.R. Blatt, Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 11116–11121.
- [13] L. Lamattina, C. García-Mata, M. Graziano, G. Pagnussat, Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 109–136.
- [14] O. Lamotte, C. Courtois, G. Dobrowolska, A. Besson, A. Pugin, D. Wendehenne, Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 1369–1376.
- [15] E. Vandelle, B. Poinssot, D. Wendehenne, M. Bentejac, A. Pugin, Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses, *Mol. Plant Microbe Interact.* 19 (2006) 429–440.
- [16] N. Correa-Aragunde, M. Graziano, C. Chevalier, L. Lamattina, Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 581–588.
- [17] S. Grün, C. Lindermayr, S. Sell, J. Durner, Nitric oxide and gene regulation in plants, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 507–516.
- [18] D.J. Stuehr, J. Santolini, Z.Q. Wang, C.C. Wei, S. Adak, Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36167–36170.
- [19] D. Wendehenne, O. Lamotte, A. Pugin, Plant iNOS: conquest of the Holy Grail, *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 465–468.
- [20] N.M. Crawford, Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 471–478.
- [21] Arabidopsis Genome Initiative, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature* 408 (2000) 796–815.
- [22] A. Besson-Bard, A. Grivot, P. Richaud, P. Auroy, F. Gaymard, L. Tacconat, J.P. Renou, A. Pugin, D. Wendehenne, Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake, *Plant Physiol.* 149 (2009) 1302–1315.
- [23] J. Durner, D. Wendehenne, D.F. Klessig, Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 10328–10333.
- [24] J. Zeier, M. Delledonne, T. Mishina, E. Severi, M. Sonoda, C. Lamb, Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant–pathogen interactions, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2875–2886.

- [25] M.C. de Pinto, A. Paradiso, P. Leonetti, L. De Gara, Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death, *Plant J.* 48 (2006) 784–795.
- [26] J. Sang, A. Zhang, F. Lin, M. Tan, M. Jiang, Cross-talk between calcium-calmodulin and nitric oxide in abscisic acid signaling in leaves of maize plants, *Cell Res.* 18 (2008) 577–588.
- [27] M. Graziano, L. Lamattina, Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots, *Plant J.* 52 (2007) 949–960.
- [28] X. Huang, U. von Rad, J. Durner, Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells, *Planta* 215 (2002) 914–923.
- [29] D. Zeidler, U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler, J. Durner, Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 15811–15816.
- [30] M. Parani, S. Rudrabhatla, R. Myers, H. Weirich, B. Smith, D.W. Leaman, S.L. Goldman, Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol. J.* 2 (2004) 359–366.
- [31] N. Arnaud, I. Murgia, J. Boucherez, J.F. Briat, F. Cellier, F. Gaymard, An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23579–23588.
- [32] I. Murgia, M. Delledonne, C. Soave, Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*, *Plant J.* 30 (2002) 521–528.
- [33] D.V. Badri, V.M. Loyola-Varga, J. Du, F.R. Stermitz, C.D. Broeckling, L. Iglesias-Andreu, J.M. Vivanco, Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion, *New Phytol.* 179 (2008) 209–223.
- [34] R. Ahlfors, M. Brosché, H. Kollist, J. Kangasjärvi, Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 58 (2009) 1–12.
- [35] A. Polverari, B. Molesini, M. Pezzotti, R. Buonauro, M. Marte, M. Delledonne, Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 (2003) 1094–1105.
- [36] M.C. Palmieri, S. Sell, X. Huang, M. Scherf, T. Werner, J. Durner, C. Lindermayr, Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 177–186.
- [37] J. Borecky, F.T. Nogueira, K.A. de Oliveira, I.G. Maia, A.E. Vercesi, P. Arruda, The plant energy-dissipating mitochondrial systems: depicting the genomic structure and the expression profiles of the gene families of uncoupling protein and alternative oxidase in monocots and dicots, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 849–864.
- [38] M. Cho, S.H. Lee, H.T. Cho, P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells, *Plant Cell* 19 (2007) 3930–3943.
- [39] J.A. Quiel, J. Bender, Glucose conjugation of anthranilate by the *Arabidopsis* UGT74F2 glucosyltransferase is required for tryptophan mutant blue fluorescence, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 6275–6281.
- [40] S. Ferrari, R. Galletti, D. Vairo, F. Cervone, G. De Lorenzo, Antisense expression of the *Arabidopsis thaliana* ATPGIP1 gene reduces polygalacturonase-inhibiting protein accumulation and enhances susceptibility to *Botrytis cinerea*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 19 (2006) 931–936.
- [41] J.T. Ascencio-Ibáñez, R. Sozzani, T.J. Lee, T.M. Chu, R.D. Wolfinger, R. Cella, L. Hanley-Bowdoin, Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection, *Plant Physiol.* 148 (2008) 436–454.
- [42] K. Vlieghe, M. Vuylsteke, K. Florquin, S. Rombauts, S. Maes, S. Ormenese, P. Van Hummelen, Y. Van de Peer, D. Inzé, L. De Veylder, Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 4249–4259.
- [43] P. Zimmermann, M. Hirsch-Hoffmann, L. Hennig, W. Gruissem, GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2621–2632.
- [44] E. Zago, S. Morsa, J.F. Dat, P. Alard, A. Ferrarini, D. Inzé, M. Delledonne, F. Van Breusegem, Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco, *Plant Physiol.* 141 (2006) 404–411.
- [45] A. Ferrarini, M. De Stefano, E. Baudouin, C. Pucciariello, A. Polverari, A. Puppo, M. Delledonne, Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions, *Mol. Plant Microbe Interact.* 21 (2008) 781–790.
- [46] A.C. Srivastava, S. Ganesan, I.O. Ismail, B.G. Ayre, Functional characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 sucrose/H⁺ symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport, *Plant Physiol.* 148 (2008) 200–211.
- [47] F. Jammes, P. Lecomte, J. de Almeida-Engler, F. Bitton, M.L. Martin-Magniette, J.P. Renou, P. Abad, B. Favery, Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*, *Plant J.* 44 (2005) 447–458.
- [48] P.G. Mohr, D.M. Cahill, Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Funct. Integr. Genomics* 7 (2007) 181–191.
- [49] F. Cartieaux, C. Contesto, A. Gallou, G. Desbrosses, J. Kopka, L. Taconnat, J.P. Renou, B. Touraine, Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* sp. strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 leads to complex transcriptome changes, *Mol. Plant Microbe Interact.* 21 (2008) 244–259.
- [50] Y. He, R.H. Tang, Y. Hao, R.D. Stevens, C.W. Cook, S.M. Ahn, L. Jing, Z. Yang, L. Chen, F. Guo, F. Fiorani, R.B. Jackson, N.M. Crawford, Z.M. Pei, Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition, *Science* 305 (2004) 1968–1971.

Contacts

Jeremy Astier

 52 rue des Péjoces
21000 DIJON

 +33 (0) 950 131 344

 jeremy.astier@gmail.com

David Wendehenne

 UMR Plante-Microbe-Environnement
Batiment CMSE
17 rue Sully, BP 86510
21000 Dijon

 +33 (0) 380 693 722

 wendehen@dijon.inra.fr

Abstract

Studies conducted over the past ten years indicate that nitric oxide (NO) is a physiological mediator involved in many physiological processes in plants, including germination, root development, stomatal closure or responses against biotic or abiotic stresses. Despite this important range of functions, the mechanisms underlying the effects of NO in plants remain largely unknown. The present work aims at identifying and functionally characterizing NO target proteins in tobacco in the context of biotic and abiotic stresses.

We demonstrated that cryptogein, an elicitor of defense responses, induces a rapid and transient S-nitrosylation of several proteins in tobacco cell suspensions. After purification, a dozen of these proteins have been identified through mass spectrometry analysis. These proteins include CDC48 (Cell Division Cycle 48), a chaperone-like protein belonging to the AAA-ATPase family. The regulation of CDC48 by NO was deeply investigated using a combination of structural and biochemical analyses. Once the *in vitro* S-nitrosylation of CDC48 was confirmed, we next demonstrated that this process does not affect the secondary structure of the protein but induces local changes in its tertiary structure together with an inhibition of its ATPase activity. The cysteine residue 526, located in the second ATPase domain of the protein, was identified as a probable S-nitrosylation site. This crucial localization may explain the inhibitory effect of NO on CDC48 enzymatic activity.

The last part of this work was focused on the analysis of the mechanisms underlying the NO-dependent activation of the protein kinase NtOSAK (*Nicotiana tabacum* stress activated protein kinase) in tobacco. We demonstrated that NtOSAK forms a constitutive complex with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). In response to salt stress, NO promotes the activation of NtOSAK *via* the phosphorylation of two serine residues located in the activation loop of the enzyme. Moreover, it induces a rapid S-nitrosylation of GAPDH. Interestingly, this latter process does not affect the complex formation. Our hypothesis is that once S-nitrosylated, GAPDH might act as a phosphorelay recruiting protein substrates for NtOSAK.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, nitric oxide, cryptogein, CDC48, NtOSAK, plant defenses.

Résumé

Les études entreprises depuis une douzaine d'années indiquent que le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur physiologique impliqué dans de nombreux processus chez les plantes, incluant la germination, le développement des racines, la fermeture des stomates ou encore la réponse adaptative aux stress biotiques et abiotiques. Malgré cet important panel de fonctions, les mécanismes sous-jacents aux effets du NO ont été peu appréhendés et restent pour l'essentiel énigmatiques. Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans cette problématique et a consisté en l'identification et la caractérisation de protéines cibles du NO chez le tabac dans le contexte de stress biotiques et abiotiques.

Nous avons démontré que la cryptogéine, un éliciteur des réactions de défense, induit la S-nitrosylation rapide et transitoire de plusieurs protéines dans des suspensions cellulaires de tabac. Après purification, une douzaine de ces protéines ont été identifiées *via* une analyse par spectrométrie de masse. Celles-ci incluent notamment une protéine chaperonne de la famille des AAA-ATPase nommée CDC48 (*Cell Division Cycle 48*). Cette dernière a fait l'objet d'une étude structure/fonction approfondie afin d'appréhender l'impact de sa S-nitrosylation. Après avoir vérifié que la protéine recombinante était S-nitrosylable *in vitro*, nous avons démontré que ce processus n'affecte pas la structure secondaire de la protéine mais induit des modifications locales de sa structure tertiaire et une inhibition de son activité ATPasique. Le résidu cystéine 526, localisé dans le second domaine ATPasique de la protéine, a été identifié comme site probable de S-nitrosylation. Cette localisation stratégique pourrait expliquer l'effet inhibiteur du NO sur l'activité enzymatique de CDC48.

La dernière partie de ce travail a été centrée sur l'analyse des mécanismes par lesquels le NO active la protéine kinase NtOSAK (*Nicotiana tabacum stress activated protein kinase*) chez le tabac. Nous avons démontré que NtOSAK forme un complexe constitutif avec la glyceraldéhyde 3 phosphate deshydrogénase (GAPDH). En réponse à un stress salin, le NO promeut l'activation de NtOSAK *via* la phosphorylation de deux résidus serine localisés dans la boucle d'activation de l'enzyme. De plus, il induit une S-nitrosylation rapide de la GAPDH, ce processus n'affectant pas la formation du complexe. Notre hypothèse est que ce complexe constituerait une plateforme de signalisation régulée par le NO et pouvant recruter les protéines cibles de NtOSAK lors de la réponse au stress salin.

Mots Clés : *Nicotiana tabacum*, monoxyde d'azote, cryptogéine, CDC48, NtOSAK, défenses des plantes.