



HAL
open science

Caractérisation des NO synthases de *Klebsormidium nitens*

Pauline Chatelain

► **To cite this version:**

Pauline Chatelain. Caractérisation des NO synthases de *Klebsormidium nitens*. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK104 . tel-04766776

HAL Id: tel-04766776

<https://theses.hal.science/tel-04766776v1>

Submitted on 5 Nov 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT
UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
Préparée à l'UMR 1347 Agroécologie, INRAE, Institut Agro Dijon, uB, UBFC

Ecole doctorale n°554

Environnements Santé

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Pauline CHATELAIN

Caractérisation des NO synthases de
Klebsormidium nitens

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 15/12/2022

Composition du Jury :

François HERICOURT	Maître de conférences, Université d'Orléans, Orléans	Rapporteur
Renaud BROUQUISSE	Directeur de recherche, INRAE, Sophia Antipolis	Rapporteur
Eliane MEILHOC	Maitre de conférences, INSA, Toulouse	Examinatrice
Jérôme SANTOLINI	Directeur de recherche, CEA, Paris-Saclay	Président du jury
Sylvain JEANDROZ	Professeur, Institut Agro, Dijon	Directeur de thèse
Claire ROSNOBLET	Maître de conférences, Université de Bourgogne, Dijon	Codirectrice de thèse

*Certaines expériences doivent être vécues,
et non racontées, pour que la courbe soit harmonieuse.*

- Ellana

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je remercie les membres du jury, M. Héricourt, M. Brouquisse, Mme Meihloc d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie également M. Santolini d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse et de m'avoir accompagné durant ces trois années à travers le comité de suivi de thèse. Je tiens également à remercier Mme Vergely pour son implication dans le comité de suivi de thèse et pour ses conseils avisés.

Je voudrais remercier mes deux directeurs de thèse Sylvain Jeandroz et Claire Rosnoblet pour leur aide, implication et soutien tout au long de ma thèse. Claire, tu as toujours été résolue et tu vas au bout de tes objectifs, c'est inspirant et j'espère pouvoir faire preuve de ces qualités dans ma vie professionnelle future. Au cours de ma thèse, mon expérience avec l'enseignement n'a pas toujours été facile, mais tu as été d'un grand soutien face aux comportements des étudiants qui m'ont désarmé, merci pour cela ! Sylvain tu as su prendre le temps de toujours m'expliquer tes corrections et je pense que ça m'a beaucoup appris, donc merci. Tu m'as également ravitaillé en éclair au chocolat pendant la rédaction du manuscrit (et comme le dit Claire le cerveau ça ne marche qu'avec du sucre) et ça, c'était chouette.

Merci à toute l'équipe immunité et signalisation. Vous avez toujours été accueillant que ce soit lors de mon premier stage de L3 jusqu'aux derniers jours de ma thèse. Merci, David de m'avoir donné envie de faire la biochimie et d'avoir envoyé ma demande de stage à Angélique qui m'a fait faire mes premiers pas au laboratoire. Merci également d'avoir pensé à moi pour ce sujet de thèse. Pour tous les conseils, surtout sur les vieilles techniques de bioch oubliées et les plasmides sortis des tiroirs, je tiens à remercier Oliv et Steph. Valérie, tu as toujours pris le temps de répondre à toutes mes questions et tes conseils en biologie moléculaire et sur la RACE-PCR m'ont aidée, donc merci beaucoup.

Merci également à Hoai-Nam, Carine, Antoine, Sébastien et Siham pour leurs aides leurs conseils et aussi pour toutes ces petites (ou longues selon les jours) conversations aux détours des couloirs qui font qu'une équipe c'est aussi ces petits moments de convivialité.

Jerem tu t'es cassé les dents bien avant moi sur *K. nitens* (maudite algue verte !), mais tu n'as pas hésité à continuer de me donner des conseils et à participer à l'avancement de ce projet donc merci à toi.

Agnès, c'est un plaisir d'avoir passé ces trois années de thèse à tes côtés. J'ai adoré chacune de nos séances papotages que ce soit autour d'une bière ou d'une fiole verte, et quand je vais partir pour de nouvelles aventures (je ne sais où) ces moments me manqueront.

Cécile, je ne pense pas que deux petites lignes ici seront à la hauteur de l'aide que tu m'as apportée ! Merci de m'avoir aidée sur les manips à un moment où j'avais du mal à sortir la tête de l'eau. Ça m'a redonné une vision fraîche et neuve sur ma thèse et c'était très agréable donc merci, merci, merci !

Je voudrais également remercier tous les copains du labo qui participe grandement à rendre cette aventure qu'est la thèse sympa. Commençons par les anciens, Hervé tu es un vrai casse-pied, mais c'est vrai tu mérites quand même que je te remercie (à la hauteur de la place que j'ai dans tes propres remerciements de thèse Ahah). Grâce à toi j'ai découvert R et ça, c'est vraiment chouette, mais mes graphiques sont plus beaux que les tiens, il n'y a pas photo l'élève a dépassé le maître. Flo ! Franchement partager ce bureau avec toi ça a été magique, on a refait le monde plus d'une fois et nos étiquettes de porte laisseront une trace pendant longtemps de notre passage à l'inra, la loutre et le héron ont tout défoncé !

Adiilah, Stephie, Lama j'ai adoré tous les moments qu'on a passés ensemble, surtout nos pauses-café que ce soit au labo ou au Gufo. Je voudrais aussi remercier tous les copains de l'équipe mycorhize, PA, Antoine, Célien je sais que vous faites exprès de ne pas manger avec nous le midi, mais c'est sans rancune. Merci aussi à toute la team du premier étage, la transversalité dans la science est ben c'est nous. Laly, Sarah on a traversé l'épopée de la rédaction ensemble, on a filé le cafard à Thibault, mais c'était marrant quand même. Thanks Adam for helping me to practice my English every lunch.

Tania, Damien, vous avez eu le courage de rester parmi nous, pourtant je n'ai pas ménagé mes efforts pour vous en dissuader Ahaha. Si mes plaintes perpétuelles (surtout sur la bouffe) ne vous ont pas fait peur, c'est que vous êtes prêt à prendre la suite (j'espère en vous plaignant autant que moi 😊).

Zoé, tu as su trouver ta place au sein du bureau 604, chacune de tes histoires m'a fait rire et je suis dégoutée de ne pas avoir assisté à tes séances d'étirements (on ne dira pas pourquoi). Thibault, ça va être difficile de résumer tout ce qu'on a vécu ici. Je n'ai pas arrêté d'essayer de te déconcentrer, mais tu es comme un moine bouddhiste accro au transfo de bactos, PCR et

autres joyeusetés. Tu as été un super coloc de bureau et cette aventure sans toi aurait été bien moins marrante.

Elodie, tu as été mon échappatoire, nos balades à cheval et tous nos moments passés ensemble pendant ces trois ans (ça ne sert à rien de rabâcher une fois de plus que tu es ma plus vieille amie) ont été libérateurs.

Je remercie d'avance mes amis de l'internat (ça fait maintenant plus de 10 ans qu'on se connaît, et depuis les inondations de salle de bain, les cafés au Rabelais et les batailles de boule de Noël on a parcouru un sacré chemin) qui alors qu'elles détestent toutes les sciences vont venir assister à ma soutenance. C'est une sorte de petite vengeance pour m'avoir obligé à vous expliquer comment remplir un tableau d'avancement et sans avoir rien retenu.

Enfin, je voulais remercier toute ma famille, et particulièrement mon père et ma mère. Je ne suis pas toujours un cadeau, mais vous avez été et vous êtes incroyablement soutenant, ce qui petit à petit m'aide à relativiser ce qui me paraît si insurmontable. Donc merci à vous !

Et le mot de la fin, merci le COVID de m'avoir fait remarquer que le monde continue de tourner même quand les labos sont fermés.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
A. Le monoxyde d'azote.....	2
1. Historique.....	2
2. Les formes du NO et ses modes d'actions.....	2
B. La NO synthase, principale source de production chez les mammifères	3
1. Structure.....	3
2. Fonctionnement moléculaire	4
C. Les sources de production du NO chez les végétaux.....	4
1. La voie réductrice	4
2. La voie oxydative	5
3. Les sources de production et la signalisation NO chez les algues	6
D. Objectifs de la thèse.....	20
CHAPITRE I.....	22
A. Contexte de l'étude	23
1. Les NOS dans le monde du vivant	23
2. <i>Klebsormidium nitens</i> comme nouvel organisme modèle.....	25
3. Objectifs	26
B. Matériels et méthodes	26
1. Culture de <i>Klebsormidium nitens</i>	26
2. Vérification des séquences nucléotidiques des KnNOS.....	26
3. Obtention des modèles 3D des KnNOS	29
4. Reconstruction phylogénétique des NOS chez les organismes photosynthétiques...	29
C. Résultats	30
1. La protéine KnNOS1 : une architecture canonique de NOS.....	30
2. La protéine KnNOS2 : une architecture atypique et incomplète de NOS.....	33
3. Diversité phylogénétique des NOS chez les organismes photosynthétiques et place des KnNOS dans cette phylogénie	36
A. Discussion et perspectives.....	36
CHAPITRE II	43

A.	Contexte de l'étude	44
1.	NOS, NO et réponse aux stress.....	44
2.	Les études de transcription chez <i>K. nitens</i>	47
3.	Objectifs	47
B.	Matériels et méthodes	48
1.	Conditions de cultures de <i>K. nitens</i>	48
2.	Analyse de l'accumulation de transcrit	49
3.	Analyse de l'abondance des protéines	51
C.	Résultats	53
1.	Détermination de gènes de référence et de gènes marqueurs en réponse à trois stress abiotiques chez <i>K. nitens</i>	53
2.	Accumulation des transcrits des deux <i>KnNOS</i> en réponse à trois stress abiotiques chez <i>K. nitens</i>	65
3.	Détection de la protéine KnNOS1 par western blot	66
D.	Discussion et perspectives	68
	CHAPITRE III	73
A.	Contexte de l'étude	74
1.	Les NOS, actrices de complexes protéiques	74
2.	Objectifs	76
B.	Matériels et méthodes	77
1.	Production de la protéine recombinante KnNOS1 en système hétérologue	77
2.	Identification des partenaires de la KnNOS1 par co-immunoprécipitation suivie d'analyse en spectrométrie de masse	84
3.	Détermination <i>in silico</i> de l'interactome des NOS humaines et conservation chez <i>K. nitens</i>	85
C.	Résultats	85
1.	Production de la protéine hétérologue KnNOS1	85
2.	Identification de partenaires de la KnNOS1 par co-immunoprécipitation	90
3.	Identification de partenaires candidats des KnNOS par une approche <i>in silico</i>	91
D.	Discussion et perspectives	92
	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	98
	CONTRIBUTION : Le projet CDC48	102
A.	Contexte du projet CDC48	103

1.	Historique de l'équipe sur l'étude de CDC48	103
2.	Contribution à l'étude de l'interaction entre CDC48 et le protéasome	105
B.	La protéine chaperonne CDC48 régule le système ubiquitine protéasome chez les plantes	105
C.	Conclusion	126
ANNEXES		127
A.	Liste des productions scientifiques et activité complémentaire	127
1.	Publications internationales	127
2.	Participations conférences	127
3.	Activité complémentaire d'enseignement	128
B.	Résultat séquençage produit de PCR de la 3'RACE de la KnNOS2	129
C.	Milieu de culture pour les algues.....	130
1.	Milieu de culture C	130
2.	Milieu BCDAT + Glucose 0,1 % (m/v).....	131
D.	Cartes des plasmides.....	132
1.	Plasmide donneur	132
2.	Plasmides destinations	133
E.	Article scientifique n°4.....	135
RÉFÉRENCES		147

LISTE DES ABBREVIATIONS

ARE : *Adenylate/uridylate-rich elements*

BH₄ : Tétrahydrobioptérine

BiFC : *Bimolecular fluorescence complementation*

BLAST : *Basic Local Alignment Search tool*

CaM : Calmoduline

CPMV-HT : *Cowpea mosaic virus hypertranslational*

eNOS : NOS endothéliale ou NOS3

FAD : Flavine adénine

Flav : Flavodoxine

FLIM : *Fluorescence life time imaging*

FMN : Mononucléotide de flavine

FNR : *Ferredoxin reductase*

FRET : *Fluorescence/Förster resonance energy transfer*

GML : *Graph modelling language*

GSNO : S-nitrosoglutathion

iNOS : NOS inductible ou NOS2

IPP : Interaction protéine-protéine

mNOS : NOS de mammifères

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NiNOR : *Nitrite:NO-reductase*

NMDA : récepteur N-méthyl-D-aspartate

nNOS : NOS neuronale ou NOS1

NO : Monoxyde d'azote

NOFNiR : Nitrite réductase formant du NO

NOHA : N-hydroxy-arginine

NOS : NO synthase

NR : Nitrate réductase

OGT : *O-linked N-acetylglucosamine transferase*

ORF : *Open reading frame*

PDZ : *Domains that occur in PSD-95, Dlg and LO-1*

PSD95 : *Postsynaptic density protein 95*

RACE : *Rapid Amplification of cDNA Ends*

RLM : *RNA Ligase Mediated*

RMN : résonance magnétique nucléaire

SD-Ura : *Synthetic Drop out sans Uracile*

TB : *Terrific Broth*

TH₄ : Tétrahydrofolate

Tyr : Tyrosine

UTR : *Untranslated Transcribed Region*

YNB : *Yeast Nitrogen Base*

INTRODUCTION

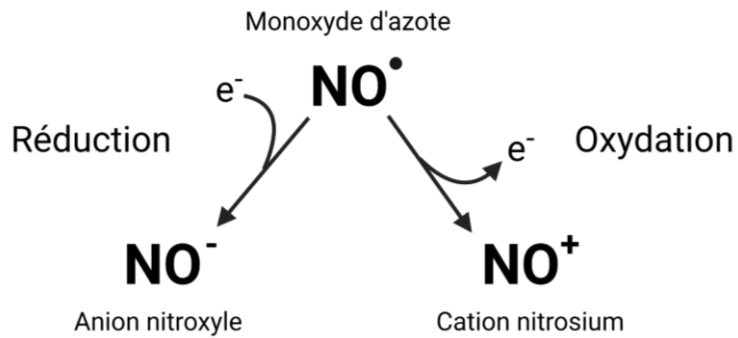
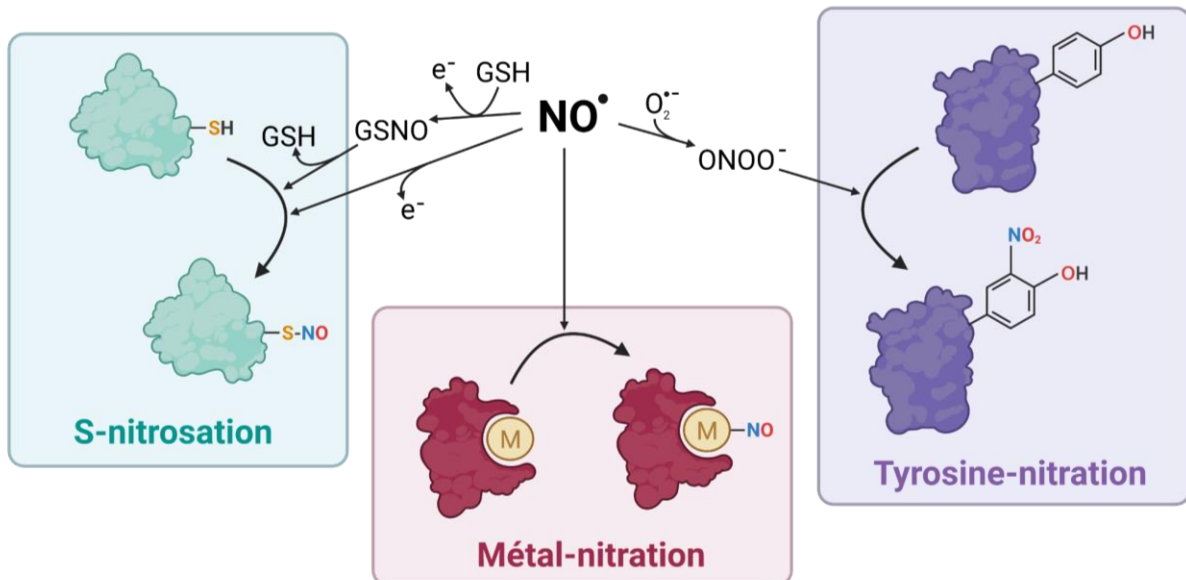
A**B**

Fig. 1. A) Les différentes formes du monoxyde d'azote obtenues par oxydation et réduction. **B)** Modifications post-traductionnelles induites par le NO. La S-nitrosation des protéines est l'attaque électrophile du cation nitrosonium (NO^+), résultant de l'oxydation de NO sur un groupement thiolate d'un résidu cystéine d'une protéine cible. Le NO peut également S-nitroser le glutathion (GSH) pour former du S-nitrosoglutathion (GSNO). Le GSNO peut alors transférer le NO sur le résidu cystéine d'une protéine cible par trans-nitrosation. Le radical NO peut réagir avec les métaux de transition (M) des métalloprotéines. Ce processus est appelé métal-nitration. La Tyrosine-nitration dépend de la formation de dérivés du NO, en particulier le peroxy-nitrite (ONOO^-) formé en présence de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). La nitration se produit sur l'un des deux équivalents carbone (C3) du cycle aromatique des résidus de tyrosine pour former une 3-nitrotyrosine. Adapté de Astier and Lindermayr (2012).

A. Le monoxyde d'azote

1. Historique

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz diatomique radicalaire découvert en 1772 (Priestley, 1772), mais son rôle biologique n'a été étudié que deux siècles plus tard. Depuis les années 1980, les travaux menés sur les fonctions du NO chez les mammifères ont mis en évidence son rôle de médiateur physiologique à travers sa participation à de nombreux processus, en particulier, les réponses immunitaires, la vasodilatation sanguine, la neurotransmission, la reproduction, l'embryogenèse, l'inflammation ou encore l'apoptose (Schmidt and Walter, 1994; Cinelli *et al.*, 2020). Chez les végétaux, la production de NO a été mise en évidence pour la première fois dans des feuilles de soja en réponse à un herbicide (Klepper, 1979). Les premiers travaux mettant en évidence le NO comme un signal sont plus tardifs et ont été majoritairement menés dans le contexte des réponses de défenses des plantes contre les microorganismes pathogènes. Depuis le NO a été caractérisé comme un médiateur physiologique ubiquitaire chez les végétaux (pour revue ; Brouquisse, 2019; Kolbert *et al.*, 2019).

2. Les formes du NO et ses modes d'action

Comme indiqué ci-dessus, le monoxyde d'azote (NO^{*}) est une espèce radicalaire qui possède un électron non apparié sur son orbitale non liante π lui conférant une grande réactivité. La perte de cet électron engendre la formation du cation nitrosonium (NO⁺) tandis que le gain d'un électron formera l'anion nitroxyle (NO⁻; **Fig. 1.A**). La réactivité du NO lui permet d'interagir directement avec les protéines de son environnement *via* trois types de modifications post-traductionnelles : la S-nitrosation, la métal-nitration et la tyrosine (tyr)-nitration (**Fig. 1.B**).

La S-nitrosation correspond à la liaison covalente de NO⁺ avec l'atome de soufre du groupement thiolate d'une cystéine. Le NO peut également réagir avec le glutathion pour former le S-nitrosoglutathion (GSNO), les protéines cibles peuvent ainsi être S-nitrosées par transfert du NO depuis le GSNO par un phénomène appelé la trans-nitrosation (Astier and Lindermayr, 2012). La métal-nitration résulte de la liaison du NO sur le métal de transition d'une métalloprotéine comme par exemple sur l'atome de fer des noyaux hémique des guanylate cyclase (Besson-Bard *et al.*, 2008b). La tyr-nitration correspond à l'addition d'un

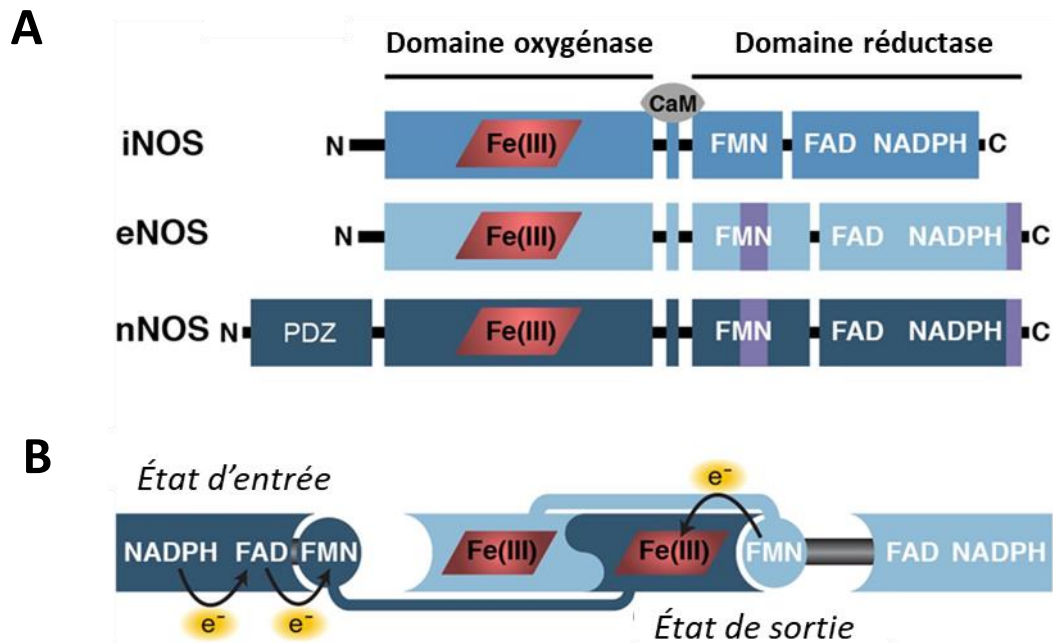


Fig. 2. A) Organisation structurale des NOS. Chaque monomère de NOS est composé de deux domaines : le domaine oxygénase et le domaine réductase. Le noyau hémique (rouge) se fixe dans le domaine oxygénase. Le domaine réductase est divisé en deux sous-domaines : le domaine de liaison du FAD/NADPH et le domaine de liaison du FMN. La calmoduline (CaM) se lie à un petit segment hélicoïdal qui relie les domaines oxygénase et réductase. L'extension C-terminale ainsi que l'hélice auto-inhibitrice incluse dans le sous-domaine FMN présentes sur la eNOS et la nNOS sont représentées en violet. **B)** Voie de transfert d'électrons de la NO synthase. La NOS est représentée sous la forme de son homodimère natif. Le monomère de gauche montre l'état d'entrée, et le monomère de droite montre l'état de sortie. Dans l'état d'entrée, le sous-domaine FMN interagit avec le sous-domaine FAD/NADPH permettant le transfert d'électrons entre les cofacteurs flavine. Dans l'état de sortie, le sous-domaine FMN interagit avec l'hème permettant le transfert d'électrons entre le FMN et l'hème. Adapté de Campbell *et al.*, (2014)

groupe nitro (NO₂) en position ortho du cycle aromatique d'une tyrosine de la protéine cible (Schopfer *et al.*, 2003).

A travers ces modifications post-traductionnelles, le NO influence la conformation et l'activité des protéines cibles et ainsi régule de nombreux phénomènes physiologiques chez les animaux comme chez les espèces chlorophylliennes (Schopfer *et al.*, 2003; Astier and Lindermayr, 2012; Wynia-Smith and Smith, 2017).

B. La NO synthase, principale source de production chez les mammifères

1. Structure

Chez les mammifères, le NO est principalement synthétisé à partir de la L-arginine par une famille d'enzyme appelée NO synthase (NOS, EC 1.14.13.39). Il existe trois isoformes de NOS : la NOS neuronale (NOS1 ou nNOS), la NOS inductible (NOS2 ou iNOS), et la NOS endothéliale (NOS3 ou eNOS). La NOS2, inductible, est calcium indépendante, contrairement aux NOS1 et NOS3, constitutives et calcium (Ca²⁺) dépendantes (Stuehr *et al.*, 2004; Campbell *et al.*, 2014). Chaque NOS est une enzyme modulaire qui consiste en un domaine oxygénase N-terminal et un domaine réductase C-terminal, les deux domaines étant reliés par un site de liaison à la calmoduline (CaM) d'une vingtaine d'acides aminés (**Fig. 2.A** ; Poulos *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2014). Le domaine oxygénase est composé d'un site de fixation du cofacteur tétrahydrobioptérine (BH₄), et d'un site de fixation d'un noyau héminique (**Fig. 2.A**). Le domaine réductase contient des sites de liaison pour le NADPH, le dinucléotide de flavine adénine (FAD) et le mononucléotide de flavine (FMN ; **Fig. 2.A**). Chaque isoforme de la NOS, possède également quelques caractéristiques uniques. La NOS2 a une masse moléculaire plus faible (130 kDa) et ne possède pas d'hélice auto-inhibitrice dans le sous-domaine FMN, présente dans les NOS1 et NOS3. L'hélice auto-inhibitrice correspond à une séquence de 40 à 50 résidus, qui confère une sensibilité au Ca²⁺ aux NOS constitutives en déstabilisant la liaison à la CaM à de faibles concentrations en Ca²⁺, ce qui influence la vitesse de transfert des électrons du FMN à l'hème. La NOS3 a une masse moléculaire de 133 kDa, et la NOS1 de 160 kDa en raison d'une extension N-terminale d'environ 250 acides aminés contenant un domaine PDZ, typique des protéines impliquées dans la signalisation, responsable d'interactions protéine-protéine (**Fig. 2.A** ; Campbell *et al.*, 2014).

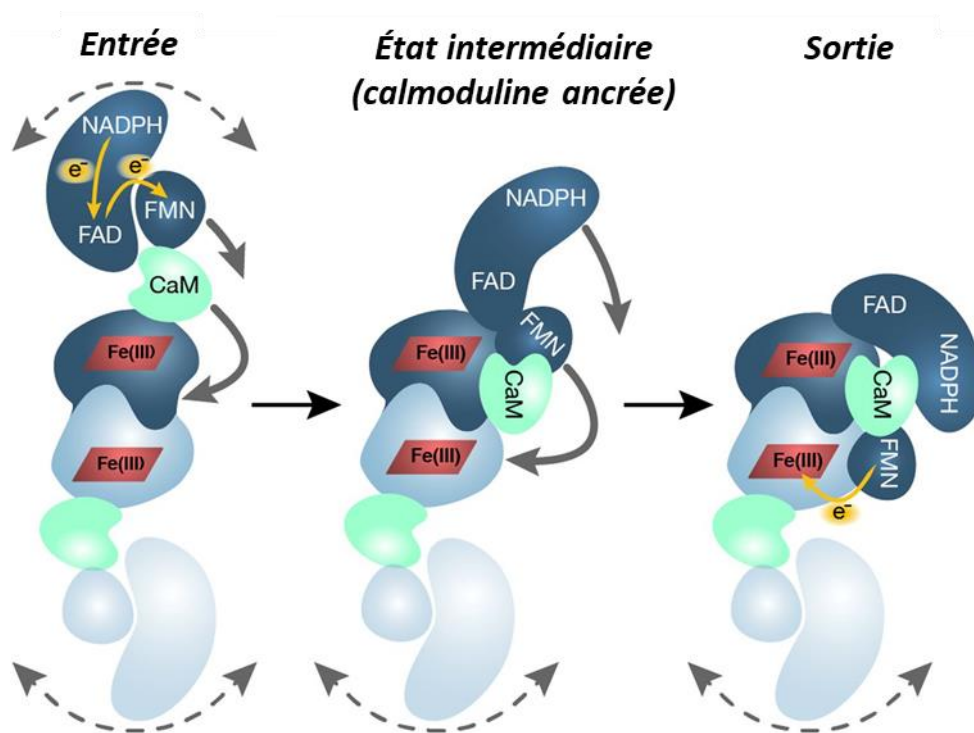


Fig. 3. États de transfert d'électrons de la NOS. Dans l'état d'entrée, les deux domaines de la NOS réductase sont très flexibles par rapport aux domaines oxydase et adoptent une large gamme de conformations (flèches grises en pointillés). Lorsque le transfert d'électrons est initié (flèches jaunes ; *entrée*), un seul monomère (bleu foncé) subit une série de changements de conformation : la calmoduline (CaM) se fixe sur le dimère au niveau des domaines oxygénases, ce qui éloigne le sous-domaine FMN du sous-domaine NADPH/FAD (flèches grises pleines), bloquant le monomère dans un état intermédiaire, où la CaM se fixe. La NOS passe ensuite à l'état de sortie, et le sous-domaine FMN subit une deuxième transition (flèche grise) pour interagir avec le domaine oxygénase du monomère opposé et transférer un électron (flèche jaune) au noyau hémique. Tout au long de ce processus de transfert d'électrons, le second monomère (bleu clair) reste dans l'état d'entrée et adopte une variété de conformations (flèches grises en pointillés) qui ne sont pas affectées par la mobilité importante qui se produit dans le monomère opposé. Adapté de Campbell *et al.*, (2014).

2. Fonctionnement moléculaire

Chez les mammifères, la NOS active est structurée en homodimères, chaque sous-unité comprenant un domaine oxygénase porteur d'un noyau héminique et un domaine réductase (**Fig. 2.B** ; Campbell *et al.*, 2014; Arnett *et al.*, 2018). Lors de la catalyse de l'oxydation de la L-arginine, le domaine réductase d'un monomère transporte l'électron fourni par le NADPH au domaine oxygénase du second monomère par transfert successif d'électrons *via* le FAD et le FMN jusqu'à l'hème (**Fig. 3** ; Campbell *et al.*, 2014; Hollingsworth *et al.*, 2016). Puis, la fixation de dioxygène sur le noyau héminique ferreux (Fe II) formera un noyau héminique ferrique (Fe III) dioxygéné. Ce dernier sera réduit par le facteur redox BH₄ afin de permettre l'oxydation successive de la L-arginine et du N-hydroxy-arginine (NOHA) conduisant à la production de L-citrulline et de NO.

C. Les sources de production du NO chez les végétaux

Chez les plantes, la capacité à produire du NO est établie depuis de nombreuses années (Klepper, 1979; Kolbert *et al.*, 2019). Bien que la compréhension des mécanismes sous-jacents à la biosynthèse du NO chez les plantes reste incomplète, deux voies principales ont été décrites (**Fig. 4**) : une voie réductrice, notamment par réduction du nitrite, et une voie oxydante, à partir de composés dérivés de la L-arginine, des polyamines ou des hydroxylamines (Gupta *et al.*, 2011).

1. La voie réductrice

La voie réductrice conduit à la production de NO *via* la réduction de nitrite de manière enzymatique ou non enzymatique. Les processus enzymatiques impliquent principalement la nitrate réductase (NR). La NR est un enzyme cytosolique qui catalyse principalement la réduction du nitrate (NO₃⁻) en nitrite (NO₂⁻) en utilisant le NADH comme donneur d'électrons. La NR possède une activité secondaire de réduction des nitrites en NO. Toutefois, cette activité enzymatique nécessite une concentration élevée en nitrite et ne représente que 1 % de l'activité totale de la NR. Il a également été démontré que des plantes d'*Arabidopsis thaliana* dont l'activité NR est très réduite (double mutant *nia1nia2* ou par traitement au tungstate) sont toujours capables de produire du NO en réponse à certains signaux exogènes tel que les oligogalacturonides (Rasul *et al.*, 2012). La NR ne peut donc pas être responsable à elle seule de la production de NO chez les végétaux.

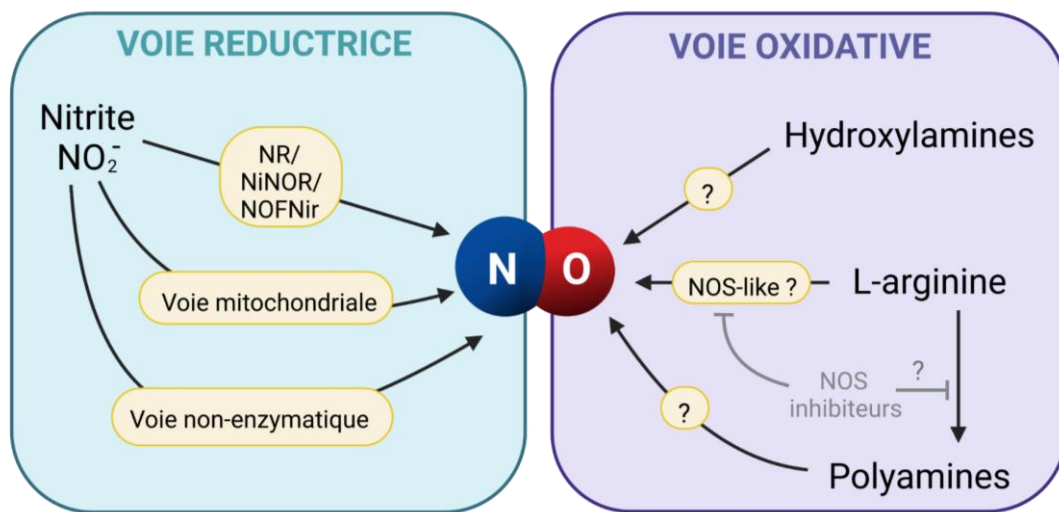


Fig. 4. Différentes voies de biosynthèse du NO chez les végétaux. La voie réductrice conduit à la formation de NO *via* la réduction de nitrites (NO_2^-) soit par une enzyme telle que la nitrate réductase (NR), la nitrite:NO réductase (NiNOR) ou la nitrite réductase formant du NO (NOFNiR), soit par la respiration mitochondriale ou encore par voie non-enzymatique dans un environnement fortement acide ou réducteur. La voie oxydative permet la formation du NO depuis différents substrats : la L-arginine, des polyamines ou des hydroxylamines. Les enzymes catalysant ces réactions restent inconnues, seule la présence d'oxyde nitrique synthase (NOS), enzyme oxydant la L-arginine en L-citrulline et NO, a été détectée chez quelques espèces d'algues. Les inhibiteurs de NOS des mammifères (notamment les inhibiteurs compétitifs) pourraient inhiber les enzymes NOS-like ainsi que la voie de biosynthèse des polyamines, ce qui entraînerait une diminution de la production de NO. Adapté de Besson-Bard *et al.*, (2008).

Un autre acteur de la voie réductrice serait une NR membranaire. En effet, l'activité enzymatique d'une nitrite:NO-reductase de NO plasmalemmique (NiNOR) a été caractérisée dans les racines de tabac (Stöhr and Stremmlau, 2006). Elle fonctionnerait de concert avec une NR apoplastique liée à la membrane catalysant la réduction du nitrate en nitrite permettant ainsi à la NiNOR de réduire le nitrite en NO. Plus récemment, une nitrite réductase formant du NO (NOFNiR) a été découverte chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*. La NOFNiR interagit avec la NR permettant la formation d'une chaîne d'électrons, ce qui catalyse la production de NO à partir de nitrites (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2016; Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017).

En cas de faible concentration en oxygène, la réduction des nitrites peut également se produire dans la membrane interne mitochondriale *via* la chaîne de transport d'électrons mitochondriaux et à l'aide du NAD(P)H comme cofacteur (Gupta *et al.*, 2011). Cette production de NO semble beaucoup plus élevée en conditions d'hypoxie (Gupta *et al.*, 2005) et participe par exemple au fonctionnement de la symbiose rhizobienne (Horchani *et al.*, 2011), où l'activité de la nitrogenase nécessite de très faibles concentrations en oxygène.

Enfin, le NO peut être produit par les voies non enzymatiques, ces dernières restent toutefois peu décrites. Une production de NO a été observée à pH acide dans l'apoplaste de graines d'orge sous l'action de l'acide abscissique et de gibbérelline, deux hormones acidifiant rapidement le milieu apoplastique (Bethke *et al.*, 2004).

2. La voie oxydative

Chez les plantes, les connaissances sur la synthèse du NO *via* les voies oxydatives restent parcellaires. En effet, différents substrats tel que la L-arginine, les polyamines ou encore l'hydroxylamine peuvent être catalysés en NO (Tun *et al.*, 2006; Rümer *et al.*, 2009). Toutefois, les acteurs moléculaires mis en jeu dans ces voies de synthèse demeurent inconnus.

Comme décrit précédemment, la principale source de NO chez les animaux provient d'une famille d'enzymes appelée NOS (Campbell *et al.*, 2014; Cinelli *et al.*, 2020). Bien que plusieurs études ont rapporté des mesures d'activité NOS dans des extraits de tissus végétaux, des cellules, ou encore des compartiments subcellulaires purifiés et bien que cette production de NO soit sensible aux inhibiteurs de NOS de mammifères, aucune preuve de l'existence d'une NOS végétale n'a été apportée (**Fig. 4**; Zeidler *et al.*, 2004; Rasul *et al.*, 2012; Corpas and

Barroso, 2017; Kolbert *et al.*, 2019). Les recherches de protéines à activité NOS n'avaient jusqu'alors été principalement menées que chez les plantes terrestres. En 2010, une étude menée chez les algues, par Foresi *et al.*, (2010) a mis en évidence une NOS chez la Chlorophyte *Ostreococcus tauri* (OtNOS) qui présentait les caractéristiques structurales et fonctionnelles des NOS de mammifères. Ces travaux ont ouvert une brèche dans l'étude des NOS chez les organismes photosynthétiques et ont conduit mon laboratoire d'accueil à mener une étude bio-informatique sur l'ensemble des données du consortium international *1000 Plants* (1KP) regroupant les génomes et transcriptomes disponibles d'environ 1300 organismes verts et sur l'ensemble des séquences de génomes disponibles dans les bases de données publiques. Les analyses ont confirmé les travaux de Foresi *et al.*, (2010) en identifiant une vingtaine d'espèces d'eucaryotes photosynthétiques (algue verte, algue rouge, algue brune et diatomées) qui possèdent une séquence homologue à OtNOS et aux NOS des mammifères (Jeandroz *et al.*, 2016; Santolini *et al.*, 2017). Ces travaux ont également confirmé l'absence de séquence de NOS chez les plantes terrestres.

3. Les sources de production et la signalisation NO chez les algues

Article scientifique n°1 : article de revue paru en Septembre 2020 dans *Journal of Experimental Botany*

J'ai principalement contribué à ce manuscrit par une revue bibliographique concernant les fonctions du NO chez les algues (partie II, *NO Signaling in Algae*). J'ai ainsi pu participer à l'écriture et relecture de l'article.

Après avoir introduit certains aspects généraux sur le rôle du NO, son mode d'action et ses principales fonctions connues, l'article avait pour objectif de présenter l'étendue des connaissances sur la production du NO et de son implication dans la signalisation cellulaire chez les algues.

L'étude de la littérature indique que le NO est impliqué dans diverses fonctions chez les algues. Il contribue à la réponse cellulaire aux stress abiotiques déclenchés par la carence en nutriments, l'hypoxie, les blessures, les fortes intensités lumineuses, l'irradiation UV, certains composés chimiques dont les herbicides, le stress thermique et les fortes concentrations en sel et de métaux. Le NO est impliqué dans plusieurs processus physiologiques dont dans la régulation du cycle cellulaire, de la photosynthèse et de l'assimilation, de la signalisation et du

métabolisme de l'azote. Comme chez les plantes terrestres, le rôle respectif des différentes sources de production du NO, ainsi que les voies de transduction impliquées, est encore peu connu.

REVIEW PAPER

Nitric oxide production and signalling in algae

Jeremy Astier, Jordan Rossi, Pauline Chatelain, Agnès Klinguer, Angélique Besson-Bard, Claire Rosnoblet, Sylvain Jeandroz, Valérie Nicolas-Francès and David Wendehenne*

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

* Correspondence: david.wendehenne@u-bourgogne.fr or david.wendehenne@inrae.fr

Received 26 June 2020; Editorial decision 2 September 2020; Accepted 7 September 2020

Editor: Zsuzsanna Kolbert, University of Szeged, Hungary

Abstract

Nitric oxide (NO) was the first identified gaseous messenger and is now well established as a major ubiquitous signalling molecule. The rapid development of our understanding of NO biology in embryophytes came with the partial characterization of the pathways underlying its production and with the decrypting of signalling networks mediating its effects. Notably, the identification of proteins regulated by NO through nitrosation greatly enhanced our perception of NO functions. In comparison, the role of NO in algae has been less investigated. Yet, studies in *Chlamydomonas reinhardtii* have produced key insights into NO production through the identification of NO-forming nitrite reductase and of S-nitrosated proteins. More intriguingly, in contrast to embryophytes, a few algal species possess a conserved nitric oxide synthase, the main enzyme catalysing NO synthesis in metazoans. This latter finding paves the way for a deeper characterization of novel members of the NO synthase family. Nevertheless, the typical NO–cyclic GMP signalling module transducing NO effects in metazoans is not conserved in algae, nor in embryophytes, highlighting a divergent acquisition of NO signalling between the green and the animal lineages.

Keywords: Algae, cyclic GMP, guanylate cyclase, nitrite, nitric oxide, nitric oxide synthase, nitrate reductase, NO-forming nitrite reductase, nitrosation, signalling.

Introduction

Nitric oxide (NO) is a free radical that might have been one of first biological signalling molecules used by organisms during evolution (Feelisch and Martin, 1995). Following its discovery as a major gasotransmitter in mammals (Schmidt and Walter, 1994), research on the biology of NO in plants has escalated since the end of the 1990s (Kolbert *et al.*, 2019). While

NO is toxic at high concentrations (Beligni and Lamattina, 1999), these studies highlighted that it possesses a large repertoire of physiological roles in plants. NO has been involved in diverse functions such as root growth and development, regulation of stomatal closure, maintenance of iron homeostasis, control of floral transition, hormonal signalling, growth

Abbreviations: ARC, amidoxime reducing component; cGMP, cyclic GMP; CO, carbon monoxide; CNGC, cyclic nucleotide-gated channel; CYB5, cytochrome *b*₅; CYB5R, CYB5 reductase; FAD, flavin adenine dinucleotide; FMN, flavin mononucleotide; GSNO, nitrosoglutathione; GSNOR, GSNO reductase; NiNOR, plasma membrane-bound nitrite:NO-reductase; NO, nitric oxide, NOFNIR, NO-forming nitrite reductase; NOS, nitric oxide synthase, NOSoxy, N-terminal oxygenase domain; NOSred, C-terminal reductase domain; NR, nitrate reductase; PDE, phosphodiesterase; PKG, cGMP-dependent protein kinase; PTM, post-translational modification; ROS, reactive oxygen species; sGC, soluble guanylate cyclase; Trx, thioredoxin.

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Experimental Biology. All rights reserved.
For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

regulation, and targeting of pollen tubes to ovules (He *et al.*, 2004; Simontacchi *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014; Domingos *et al.*, 2015; Del Castello *et al.*, 2019). Also, NO has been recognized as a key mediator of plant immunity and responses to various abiotic stresses (Wendehenne *et al.*, 2014; Fancy *et al.*, 2017). Besides, NO is a crucial player in symbiosis, acting as a metabolic intermediate in the phytohemoglobin–NO respiration cycle under hypoxia (Berger *et al.*, 2019).

Many investigations have attempted to characterize the sources and mode of action of NO in plants at the cellular and molecular levels. The ubiquitous nature and multiple actions of NO, its complex chemistry, as well as the lack of specific tools dedicated to NO research in plants have made this task particularly challenging. This notwithstanding, we have learned from these studies that NO is produced by plant cells through different routes, enzymatic as well as non-enzymatic, part of them being still enigmatic. Once produced, NO acts mainly as an intracellular and probably intercellular signalling molecule. Based on the literature, there exist multiple pathways for it to modulate signal transduction. Indeed, NO was shown to exert its signalling activity in combination with second messengers including Ca^{2+} , cyclic GMP (cGMP), cyclic AMP, cyclic ADP-ribose and hydrogen sulphide as well as with hormones, signalling lipids, and reactive oxygen species (ROS) (Lindermayr and Durner, 2015; Trapet *et al.*, 2015). Furthermore, cross-talks between NO and various post-translational modifications (PTMs)/signalling systems such as phosphorylation, SUMOylation, ubiquitinylation, methylation, acetylation, *S*-sulfenylation, and persulfidation have been reported (Gupta *et al.*, 2020). A main advance in the understanding of NO cellular actions came from the identification of proteins regulated by NO at the post-translational levels. More precisely, NO or its derived products (such as dinitrogen trioxide, N_2O_3 ; nitrosoglutathione, GSNO; nitrosonium cation, NO^+ ; and peroxynitrite, ONOO^-) interact with cysteine (Cys) or tyrosine (Tyr) residues and with transition metals (notably iron) of metallo-proteins. These processes are commonly referred to as *S*-nitrosation, Tyr-nitration, and metal-nitrosylation, respectively (Corpas *et al.*, 2009a; Astier and Lindermayr, 2012; Kolbert *et al.*, 2019). Studies in animals suggest that the occurrence of these PTMs is dictated by the concentration of NO and spatial and temporal parameters such as the close proximity between nitric oxide synthase (NOS, see below) and NO targets and the diffusion rate of NO (Hess *et al.*, 2001, 2005). Notably, *S*-nitrosation and Tyr-nitration are considered high concentration effects of NO (concentration of NO $>1 \mu\text{M}$) while metal-nitrosylation is observed at the lowest concentrations (Hanafy *et al.*, 2001). Thousands of proteins regulated by NO through these PTMs have been identified through proteomic approaches. These proteins are related to almost all cellular processes. Nevertheless, only a few studies have investigated the detailed incidence of these PTMs at the structural, biochemical, cellular, and tissular levels (Lindermayr and Durner, 2009; Spoel and Loake, 2011; Frederickson Matika and Loake, 2014). Examples of *S*-nitrosated proteins include

the ubiquitin–proteasome system regulator CDC48 (Rosnoblet *et al.*, 2017), plant immunity mediators like SRG1 and HopA11 (Ling *et al.*, 2017; Cui *et al.*, 2018), and other master signalling regulators such as GSNOR1 and PCE1 (Zhan *et al.*, 2018; Skelly *et al.*, 2019). More generally, many studies deciphering NO signalling in plants have involved exogenous NO sources and pharmacological tools with possible side effects. It is therefore difficult to estimate the true extent to which NO exerts its effects. The limited amount of information acquired with regard to the chemistry of NO in plants reinforced this statement.

The majority of the reports dealing with NO biology in plants are based on studies in which embryophytes were used as biological models. By comparison, the function of NO in algae has been far less investigated. This observation is quite surprising in light of the important roles of algae in marine, freshwater, and terrestrial ecosystems, but also with regard to the increasing recognition of microalgae in biotechnologies, notably for the production of biofuels, health-related products, and numerous chemicals (Wijffels and Barbosa, 2010; Khan *et al.*, 2018; Barkia *et al.*, 2019). Especially, the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* has been a useful model organism to decipher mechanisms underlying NO production in plants (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2016). Furthermore, and in contrast to embryophytes, a small number of algal species possess a metazoan-type NOS (Foresi *et al.*, 2010; Jeandroz *et al.*, 2016) and, therefore, constitute pertinent biological models to unravel NO functions in photosynthetic organisms.

In the present review, we provided an overview of NO production, roles, and signalling functions in algae. More generally, we believe that the time is ripe to take algae as an emerging model to understand the evolution of NO signalling.

NO production in algae

The mechanisms underpinning the biosynthesis of NO in plants have been widely documented over the past 20 years. There is a common understanding that the production of NO in land plants relies on two main pathways typically described as the reductive and the oxidative pathways (Gupta *et al.*, 2011). In the first one, nitrite is reduced enzymatically or non-enzymatically to NO. The enzymatic processes involve mainly nitrate reductase (NR), a cytosolic enzyme that can catalyse NO production from nitrite using NADH as electron donor (Yamasaki *et al.*, 1999; Desikan *et al.*, 2002). While its primary activity relies on the reduction of nitrate to nitrite, *in vitro* experiments demonstrated that recombinant NR possess also a nitrite:NO reductase activity. Nevertheless, this activity is low (1% of the total NR activity) and seems to be promoted in specific conditions (Rockel *et al.*, 2002). Interestingly, a much more efficient NR-dependent mechanism of NO production was recently described in algae, involving the NR partner protein NO-forming nitrite reductase (NOFNiR; Chamizo-Ampudia *et al.*, 2016; see below). In addition, the importance

of NR in plant NO synthesis has been highlighted by several pharmacological and genetic approaches (Mur *et al.*, 2013; Astier *et al.*, 2018). Also, the activity of a root-specific plasma membrane-bound nitrite:NO-reductase (NiNOR) reducing apoplastic nitrite to NO has been characterized enzymatically (Stöhr and Stremmlau, 2006). Nevertheless, the molecular identity of the corresponding protein(s) remains unknown. In addition, numerous studies pointed to a role for enzyme complexes of the mitochondrial electron transport chain in nitrite-dependent NO production (Gupta *et al.*, 2011; Horchani *et al.*, 2011). This process occurs mainly under low oxygen concentrations. Furthermore, a nitrite-dependent NO production involving photosynthetic electron flow was reported in soybean chloroplasts (Jasid *et al.*, 2006). Finally, the possibility that nitrite reduction to NO might be catalysed by the peroxisomal enzyme xanthine oxidoreductase has been suggested, but not proved *in vivo* (Gupta *et al.*, 2011). In contrast, little is known about the non-enzymatic routes for nitrite reduction. For instance, a non-enzymatic NO production from nitrite was observed at acidic pH in the apoplast of barley aleurone layers (Bethke *et al.*, 2004). This apoplastic synthesis was triggered by abscisic acid and gibberellin, two hormones that rapidly acidify the apoplastic medium, thus highlighting a putative physiological role of such production.

By comparison, the oxidative pathways are still enigmatic. Substrates include mainly L-arginine (L-Arg), polyamines and, potentially, hydroxylamines (Jasid *et al.*, 2006; Tun *et al.*, 2006; Yamasaki and Cohen, 2006; Kolbert *et al.*, 2019). Polyamines and L-Arg are intimately linked as the latter acts as substrate of L-arginase in the biosynthetic pathway leading to polyamines. A combination of pharmacological and enzymatic evidence provide support for the hypothesis that a still unidentified NOS-like enzyme constitutes a key component of the oxidative route for NO synthesis (see below). Also, by controlling the availability of L-Arg, L-arginase and the Arabidopsis copper amine oxidase 8 could constitute key regulators of the oxidative pathway for NO synthesis (Flores *et al.*, 2008; Groß *et al.*, 2017).

Similarly, it became apparent that algae produce NO through the reductive and/or the oxidative pathways (Fig. 1) (Mallick *et al.*, 1999; Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017; Astier *et al.*, 2019). In particular, the recent analysis of the involvement of amidoxime reducing component (ARC) in NO synthesis in *C. reinhardtii* provides an important insight into the reductive pathways (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2016). In human, ARC is a mitochondrial molybdopterin-containing enzyme (mARC) forming a three-component complex with cytochrome *b*₅ (CYB5) and cytochrome *b*₅ reductase (CYB5R) (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Interestingly, *in vitro* enzymatic assays, as well as mARC overexpression assays in human embryonic kidney cells, showed that this protein generates NO from nitrite when forming an electron transfer chain with NADH and its two partners, CYB5–CYB5R (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). In *C. reinhardtii*, Chamizo-Ampudia *et al.* (2016)

found that nitrite acts as a substrate for ARC and also as a regulator of its expression. Furthermore, using a collection of dedicated *C. reinhardtii* mutants and biochemical experiments, these authors provided strong arguments that ARC interacts with NR and that this complex catalyses NO production from nitrite *in vitro*, and also in the cytosol. In terms of mechanism, it has been proposed that the diaphorase moiety of NR, and not the classical CYB5–CYB5R ARC partners, is the electron supplier for ARC. Consequently, ARC has been renamed as NOFNiR (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017). ARC being highly conserved, it is plausible to conceive that the process described in *C. reinhardtii* could be extended to other algae and also to land plants.

As indicated above, although not identified yet, a compelling amount of evidence indicates that NOS-like enzymes are central components of the oxidative pathways in land plants (Corpas *et al.*, 2009b). Basically, NOS designates a specific family of enzymes conserved in metazoans that catalyse the production of NO and L-citrulline from L-Arg, with *N*-hydroxy-L-Arg as an intermediate catalytic product (Bignon *et al.*, 2019; Kolbert *et al.*, 2019; Santolini, 2019; Cinelli *et al.*, 2020). NOSs are active as a homodimer and this family comprises three isoenzymes in mammals. All NOSs contain a catalytic N-terminal oxygenase domain (NOSoxy) and a C-terminal reductase domain (NOSred), the two domains being connected by a calmodulin-binding site (Stuehr and Haque, 2019). The NOSoxy domain holds binding sites for L-Arg, haem (iron protoporphyrin IX) and the redox cofactor tetrahydrobiopterin (H₄B). This domain is extended by an N-terminal-hairpin hook and zinc-binding region that contribute to the stabilization of H₄B and to the dimerization, respectively (Crane *et al.*, 1999). The NOSred domain shares similarity with cytochrome P450 reductases and contains binding sites for NADPH, flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN). During catalysis, the NOSred domain of one monomer transfers electrons from NADPH to FAD and FMN cofactors and, ultimately, to the haem centre of the NOSoxy domain of the second monomer (Santolini, 2011).

Although mammalian-like NOS activities were measured in plant tissues, cells and also purified subcellular compartments, a bioinformatic search for the presence of NOSs in the available genomes and transcriptomes of about 1300 green organisms strongly suggests that embryophytes do not possess NOS (Jeandroz *et al.*, 2016; see also Hancock and Neill, 2019). Therefore, the identity of the proteins with mammalian-like NOS activities in land plants remains an open question. In contrast, few occurrences of NOS homologues were retrieved from more than a dozen green algae. Intriguingly, these NOS candidates are unequally distributed and do not correspond to phylogeny. These algal species include *Ostreococcus tauri* in which a functional NOS (OtNOS) was initially discovered by Foresi *et al.* (2010). Primary structure analyses confirmed that algal NOSs

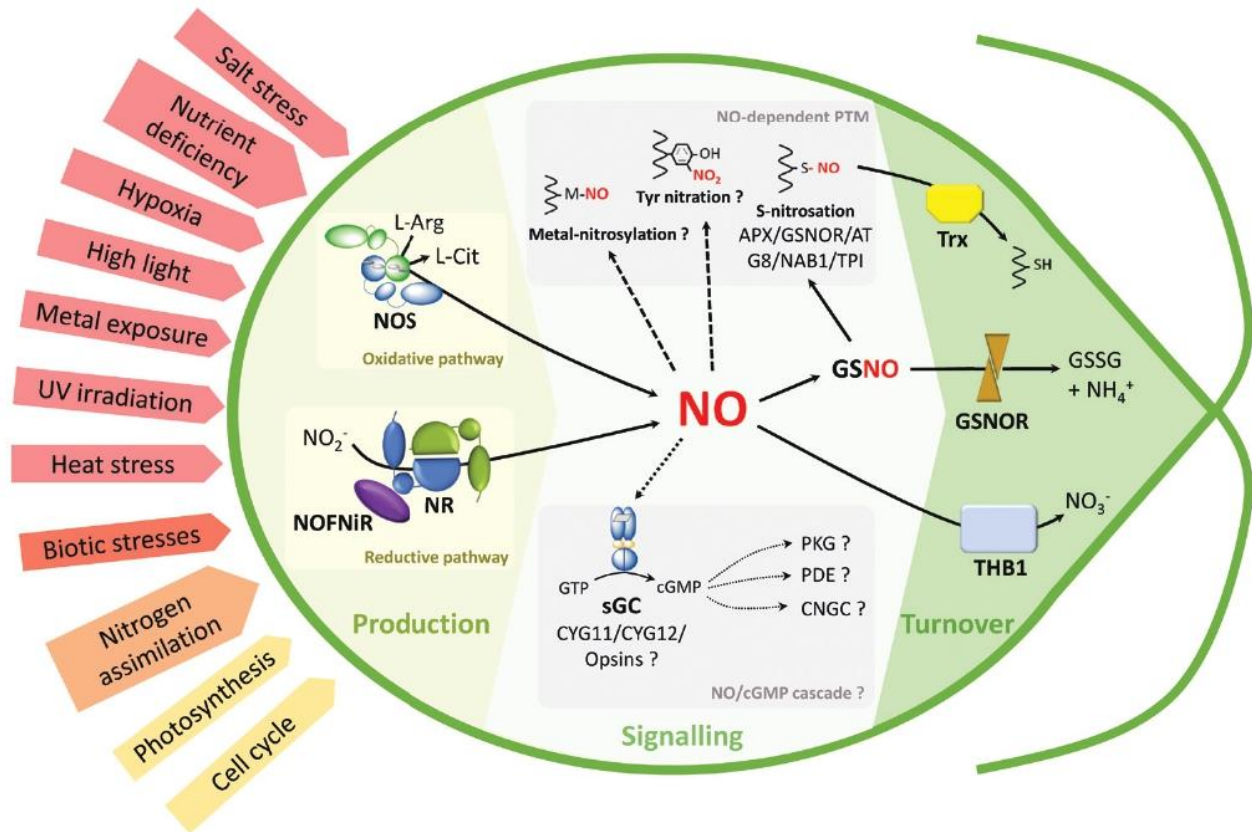


Fig. 1. NO production and signalling in algae. NO takes part in environmental stress responses as well as developmental processes in algae. Its signalling activities can be schematically divided into three principal steps. First, NO production can be achieved via an oxidative route through nitric oxide synthase (NOS) activity that oxidizes L-arginine into L-citrulline and NO, or through the reduction of nitrite by nitrate reductase (NR). This latter process could involve the interaction of NR with NO-forming nitrite reductase (NOFNiR). Second, NO signalling relies mainly on NO-dependent post-translational modifications (PTMs), S-nitrosation being as yet the only demonstrated mechanism. The occurrence and importance of tyrosine nitration and metal-nitrosylation, another NO-dependent PTM (Martínez-Ruiz et al., 2011), remain to be addressed. On the other hand, the possibility that the NO signal in algae could be transduced through an NO-cGMP signalling cascade has been proposed. The existence of soluble guanylate cyclases (sGC) activated by NO has been documented in *Chlamydomonas reinhardtii*. However, the downstream effectors including cGMP-dependent protein kinases (PKG), cyclic nucleotide-gated channels (CNGC), and phosphodiesterases (PDE) have not been reported to date. The turnover of NO signalling relies on the regulation of the S-nitrosated protein pool by Trx and GSNOR, the later controlling the content of the S-nitrosating agent GSNO. Phytoglobins are also critical to control NO levels by processing it to nitrate, as exemplified with the THB1 protein (Johnson et al., 2014; Sanz-Luque et al., 2015).

contain both the NOSoxy and NOSred domains (Jeandroz et al., 2016). Binding sites for NADPH, FAD, FMN and haem are also conserved. Nevertheless, these NOSs display singularities as compared with their animal counterparts. In particular, similarly to bacterial NOSs, they lack the N-terminal-hairpin hook and possess an atypical putative zinc-binding region (Cys-X₃-Cys instead of the typical Cys-X₄-Cys) (Santolini et al., 2017). In addition, detailed *in silico* structural analyses of NOSs of some algae, such as *Cosmarium subtumidum* and *O. tauri*, highlighted the substitution of key residues involved in crucial NOS catalytic features, as well as numerous short sequence gaps or inserts. Overall, this information suggests that algal NOSs could possess a specific quaternary structure and unexpected biological chemistry. Consistent with this assumption, using the recombinant NOSoxy domain of OtNOS,

Weisslocker-Schaetzl et al. (2017) found that this protein displays an ultrafast NO-producing capacity.

Together, the above analyses not only highlight the benefit of algae as biological models to investigate NO functions in green organisms but also that certain of these organisms have evolved specific NOSs whose regulation and function remain largely unknown. Extending these studies, another issue that deserves to be raised is the ability of photosynthetic algae to reduce NO into nitrous oxide (N₂O) (Plouviez et al., 2017). Using *C. reinhardtii* as a biological model, it was found that this reduction involved flavodiiron proteins in light and a cytochrome P450 in the dark (Burlacot et al., 2020). Interestingly, the NO-dependent N₂O production was restricted to Chlorophytes, the second most represented photosynthetic organisms in the ocean. Whether this process account for the N₂O atmospheric budget is not known.

Table 1. Examples of NO functions in algae

Physiological and cellular process	Algal species	NO functions	Reference
Response to drugs, herbicides and metals, oxidants	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Mediates mastopran-induced cell death in co-operation with ethylene	Yordanova <i>et al.</i> (2010)
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Promotes copper-induced proline accumulation	Zhang <i>et al.</i> (2008)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Protects against the toxicity of surfactants and polycyclic aromatic hydrocarbons	Li <i>et al.</i> (2014)
		Protects against the deleterious effects of the herbicides atrazine and glufosinate	Qian <i>et al.</i> (2009)
	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	Antioxidative role against copper toxicity	Singh <i>et al.</i> (2004)
		Modulates cadmium-induced physiological and metabolic changes	Kováčik <i>et al.</i> (2015)
	<i>Prorocentrum minimum</i>	Promotes the expression of <i>PmCYP</i> , a cyclophilin-encoding gene induced by copper and polychlorinated biphenyl	Ponmani <i>et al.</i> (2015)
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Mediates 5-fluorouracil toxicity and controls ROS production	Kováčik <i>et al.</i> (2014)
	<i>Ulva compressa</i>	Protective roles against H ₂ O ₂ -induced toxicity	Mallick <i>et al.</i> (2002)
		Signalling component in response to copper excess	González <i>et al.</i> (2012)
Nitrogen assimilation, signalling, metabolism	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Mediates ammonium-induced repression of <i>GLB1</i> , a member of the PII signal transducers family	Zalutskaya <i>et al.</i> (2018a)
		Inhibits high-affinity uptake of ammonium and nitrate/nitrite; reversibly inhibits NR activity	Sanz-Luque <i>et al.</i> (2013)
		Mediates ammonium-induced repression of the expression of the NR gene <i>NIA1</i>	de Montaigu <i>et al.</i> (2010)
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Role in nitrite sensing, high-nitrite adaptation, reprogramming of lipid synthesis	Dolch <i>et al.</i> (2017)
Cell cycle	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Regulation of the cell-cycle progress in interaction with ROS	Pokora <i>et al.</i> (2017)
	<i>Chlorella</i> sp.	Growth promotion	Estevez and Puntarulo (2005)
Nutrient deficiency	<i>Micrasterias denticulata</i>	Inhibition of growth	Lehner <i>et al.</i> (2009)
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Mediates CO-induced adaptation to iron deficiency	Liping <i>et al.</i> (2013)
		Mediates the acclimation response to phosphorus deficiency?	Filina <i>et al.</i> (2019)
		Mediates degradation of the cytochrome <i>b₆f</i> complex in response to nitrogen deprivation	Wei <i>et al.</i> (2014)
		Contributes to the remodelling of thylakoid protein complexes upon sulphur starvation	De Mia <i>et al.</i> (2019)
		Negatively regulates the expression of the ferredoxin-encoding gene <i>FDX5</i> upon sulphur starvation	Zalutskaya <i>et al.</i> (2018b)
Heat stress	<i>Symbiodinium</i> , <i>Microadriaticum</i>	Involvement in the coral bleaching mechanism?	Bouchard and Yamasaki (2008)
Hypoxia, dark anoxia	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Component of the signalling cascade inherent to anaerobic acclimation	Hemschemeier <i>et al.</i> (2013a)
		Signalling component in anoxic cells	Hemschemeier <i>et al.</i> (2013b)
Illumination (high light intensity), UV irradiation	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Mediates inhibition of carotenoid synthesis and PSII electron transport and promotes singlet oxygen production	Chang <i>et al.</i> (2013)
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Protects against cellular damages induced by UV-B irradiation	Chen <i>et al.</i> (2010)

Table 1. Continued

Physiological and cellular process	Algal species	NO functions	Reference
Salt stress	<i>Ostreococcus tauri</i>	Protection against photo-inhibitory light intensities?	Foresi <i>et al.</i> (2010)
	<i>Ulva fasciata</i>	Mediates up-regulation of methionine sulfoxide reductase A and B expression	Hsu and Lee (2012)
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acts as a signal contributing to the cell adaptation to salt stress	Chen <i>et al.</i> (2016)
Wounding	<i>Acetabularia acetabulum</i> , <i>Dasycladus vermicularis</i>	Acts downstream of extracellular nucleotides released from wound	Torres <i>et al.</i> (2008)
	<i>Dasycladus vermicularis</i>	Acts as a signalling component promoting peroxidase activity and co-operates with ROS	Ross <i>et al.</i> (2006)
Biotic stress	<i>Phaeodactylum</i> , <i>Tricornutum</i> , <i>Thalassiosira weissflogii</i>	Mediates cell death in response to diatom-derived antiproliferative aldehydes	Vardi <i>et al.</i> (2006)
Photosynthesis	<i>Skeletonema costatum</i>	Mediates the expression of ScDSP-1 when electron flow between photosystems is blocked	Chung <i>et al.</i> (2008)
Environmental stress	<i>Seminavis robusta</i>	Contributes to the adhesion of diatoms to surfaces	Thompson <i>et al.</i> (2008)

NO signalling in algae

A survey of the literature indicates that NO is involved in various functions in algae (Fig. 1; Table 1). Briefly, it contributes to the cell response to abiotic stresses triggered by nutrient deficiency, hypoxia, wounding, high light intensities, UV irradiation, drugs and herbicides, heat stress, and excessive extracellular concentrations of salt and metals. Furthermore, it has been implicated in the regulation of the cell cycle, of photosynthesis and of nitrogen assimilation, signalling and metabolism. By comparison, few studies have ascribed a role for NO in biotic interactions. Overall, these functions resemble those described in embryophytes, although the involvement of NO in biotic interactions is widely investigated in land plants. At the cellular level, NO acts as a component of signalling pathways inherent to the regulation of nitrogen nutrient uptake and NR activity, to metabolite accumulation, and to the modulation of ROS effects, genes expression and cell death. Furthermore, depending on the stress applied, pro-toxic or protective effects of NO were noticed (Table 1).

The demonstration that NO is involved in so many biological processes highlights its importance in algae biology. Despite its perceived importance, the paths by which it affects transduction in algae have been poorly investigated so far. Returning to animals, NO cellular signalling schematically relies on the so-called classical and non-classical pathways (Martínez-Ruiz *et al.*, 2011). In the classical pathway, NO produced by NOSs binds with the haem centre of soluble guanylate cyclases (sGC) that catalyse the synthesis of cGMP from GTP. Then cGMP transduces the signal through the mobilization of downstream effector proteins including cGMP-dependent protein kinases (PKG) and cyclic nucleotide-gated channels (CNGC). This chain of events is suppressed by specific phosphodiesterase (PDE) isoforms that degrade cGMP

to GMP (Poulos, 2006; Horst and Marletta, 2018). In addition to this prototypic NO/cGMP signalling cascade, NO exerts its functions through the non-classical pathways, that is direct modifications of target proteins via S-nitrosation and Tyronitration (Corpas *et al.*, 2009a; Astier and Lindermayr, 2012; Gupta *et al.*, 2020). According to a set of experimental arguments, the NO signalling scheme in land plants appears to involve the classical and non-classical pathways described above. What is the situation in algae?

NO/cGMP signalling cascade

The prototypical NO signalling pathway mobilizes NO-dependent sGC (Martínez-Ruiz *et al.*, 2011). A similar search for homologues of sGCs in the genomes or transcriptomes of more than a thousand green organisms resulted in a dozen hits, all concerning algae from the Chlamydomonadales order (Fig. 1; Supplementary Table S1 at JXB online). Looking closer at the candidates, they were all missing critical Cys residues in their primary sequences, close to the haem NO/oxygen binding domain consensus motif (HNOX), which are essential for the sensitivity of the protein to NO (Morton *et al.*, 1999; Nighorn *et al.*, 1999; de Montaigne *et al.*, 2010; Astier *et al.*, 2019).

Among the candidates identified in *C. reinhardtii*, some were further characterized, including CYG12, CYG56, and CYG11. CYG12 shares 40–50% identity with animal GCs. The crystal structure resolution of its inactive catalytic domain revealed that it exhibits a similar protein fold to mammalian adenylate cyclase. This folding allows a functional cyclase activity, possibly activated through analogous structural rearrangement to the one observed for mammalian sGC (Winger *et al.*, 2008). However, the precise physiological role of CYG12, or its dependency for NO, remains to be determined. Conversely, CYG56 was found

to be involved in the regulation of nitrate assimilation through its participation in the NO/cGMP-dependent signalling cascade mediating ammonium-induced NR (NIA1) repression (de Montaigu *et al.*, 2010). Although the recombinant protein displayed a significant GC activity, CYG56 did not show NO sensitivity as treatments with NO donors did not induce any modulation of its activity. Regarding CYG11, a recent investigation shed light on its unique features as compared with other described eukaryotic sGCs (Horst *et al.*, 2019). Indeed, it is active as a homodimer and possesses two HNOX domains. Furthermore, CYG11 is the first example of sGC displaying a higher activity with carbon monoxide (CO) rather than NO. Based on enzymatic parameters including activity induction, affinity, and dissociation rates, the authors assumed that CO may represent the physiological ligand of CYG11, designating this unusual sGC a putative CO sensing protein in *C. reinhardtii* (Horst *et al.*, 2019). Noteworthy, CO recently emerged as a potent signalling molecule in plants and was associated with the regulation of developmental and growth processes such as seed germination and root development, interfering with hormonal pathways, as well as with the plant responses to (a)biotic stresses (Wang and Liao, 2016). The confirmation of CYG11 as a CO sensor and the determination of its precise role in related signalling cascades constitute promising new areas of research. In particular, its putative involvement in the CO-dependent adaptation of green algae to iron deficiency (Liping *et al.*, 2013) is worth considering. However, if confirmed, this putative role may be restricted to specific Chlamydomonadales species, as no homologues of CYG11 can be retrieved in the green lineage but in this order (see Supplementary Table S1).

Finally, completing this panorama, Tian *et al.* (2018) recently reported the characterization of two opsins from the green algae *C. reinhardtii* and *Volvox carteri*. These proteins, named two-component cyclase opsins (2c-Cyclops) possess rhodopsin, histidine kinase and guanylate cyclase domains. They display high ATP-dependent guanylyl cyclase activity in the dark both *in vivo* and *in vitro* and were shown to be light inhibited. Their putative regulation by NO or CO has not been reported.

So far, the identification of putative plant PKG activities relied exclusively on indirect approaches (Świeżawska *et al.*, 2018) and the first biochemical characterization of a plant PKG was reported only recently in rice (Shen *et al.*, 2019). This PKG presents atypical features compared with animal ones, notably the coexistence of a phosphatase and a kinase domain within the sequence. The recombinant enzyme displayed functional phosphatase and kinase activities, the first one being inhibited by cGMP binding when the kinase activity is induced. This PKG activity was involved in gibberellin signalling and salt stress responses, two pathways in which NO acts as a signalling molecule (Freschi, 2013). However, although assumed, the existence of a gibberellin–NO–cGMP signal cascade in rice remains to be confirmed since the corresponding molecular actors, particularly those related to NO and cGMP synthesis,

are yet to be identified (Shen *et al.*, 2019). Nonetheless, a phylogenetic analysis shows that homologues of this rice PKG are generally present in single copy and well distributed among the green lineage (algae and land plants), diverge from animal ones, but originate from a common ancestral gene (Shen *et al.*, 2019). Looking closer for their repartition in the green lineage, PKG homologues can be found in 20% of the algal species available in the 1KP database (www.onekp.com), whereas they are distributed more homogeneously among embryophytes (65%, see Supplementary Table S1). Their implication in plant and algae physiology would definitely be a field of interest.

Similarly, until recently, the presence of PDE in the green lineage was only based on indirect evidence and a unique potential homologue of class I PDE was described in *C. reinhardtii* (Gross and Durner, 2016). Yet, a recent work reported the characterization of AtCN-PDE, the first functional cGMP-activated PDE in Arabidopsis and, more generally in the plant kingdom, involved in the response to UVA radiation (Isner *et al.*, 2019). A phylogenetic analysis revealed the widespread distribution of this protein among the different eukaryotic phyla with the notable exception of the metazoans, suggesting its probable loss and a divergent evolution between green and animal lineages. Similarly to the rice PKG described above, homologues of AtCN-PDE can be retrieved mainly as a single gene copy widespread in the green lineage (Isner *et al.*, 2019), but here again, much better represented in embryophytes (81%) than algae (10%) (see Supplementary Table S1). However, no information on the implication of this enzyme in a NO-dependent signalling cascade has been reported yet, and its precise physiological role and regulation remain to be determined.

Likewise, the relation between NO and CNGCs is not fully elucidated. A recent investigation of the role of AtCNGC6 during heat shock exposure in Arabidopsis revealed that it mediates thermotolerance by regulating NO production (Peng *et al.*, 2019). This result places AtCNGC6 upstream in the NO signalling, the converse of the classical NO–cGMP signalling pathway described in animals. Accordingly, no regulation of plant or algal CNGCs by NO-dependent mechanisms has been reported so far (DeFalco *et al.*, 2016; Duszyn *et al.*, 2019).

Taken together, the recent data questioning the existence of a prototypical NO–cGMP signalling module in plants and algae tend to confirm the divergent acquisition of NO signalling between the green and the animal lineages. While deeper analyses of the function of recently identified GCs, PKGs, and PDEs in the plant lineage, and particularly in algae, are required to precisely specify their role, they also minimize the likelihood that an animal-type classical NO–signalling pathway also exists in the green lineage.

S-nitrosation

S-nitrosation designates a PTM mechanism in which NO reacts with a Cys thiol in the presence of an electron acceptor to form a S–NO covalent bond designated as S-nitrosothiol

(Smith and Marletta, 2012). *S*-nitrosation impacts protein function, subcellular localization and stability (Hess *et al.*, 2005). Although no sequence consensus for *S*-nitrosation has been firmly identified, this PTM is facilitated at lower Cys pK_a, by the presence of basic residues stabilizing deprotonated Cys and the absence of high-volume residues surrounding the Cys of interest (Stamler *et al.*, 2001; Lamotte *et al.*, 2015). Furthermore, *S*-nitrosation is promoted by local hydrophobicity and accessibility of the Cys residue under consideration. Protein *S*-nitrosation is one of the key molecular bases of NO-related cellular signal transduction and has emerged as a conserved mechanism in all the kingdoms investigated so far. This process is reversible and denitrosation is promoted by non-enzymatic as well enzymatic processes. These latter involve thioredoxins (Trx) and, indirectly, GSNO reductase (GSNOR), which catalyses the denitrosation of GSNO into glutathione disulphide and ammonia and, therefore, controls the cellular level of the *S*-nitrosating agent GSNO (Stamler and Hess, 2010; Spoel and Loake, 2011). In land plants, hundreds of proteins undergoing *S*-nitrosation have been identified. These proteins are involved in nearly all cellular functions. Nevertheless, the structural and *in vivo* functional incidences of this PTM has only been studied for a handful of proteins (Lindermayr and Durner, 2009; Lamotte *et al.*, 2015; Kolbert *et al.*, 2019). By comparison, the *S*-nitrosome of algae has been poorly investigated. In a pioneer study, Morisse *et al.* (2014) reported a large-scale proteomic analysis of proteins undergoing *S*-nitrosation in *C. reinhardtii* cells exposed to GSNO, a physiological NO reservoir and major *S*-nitrosating agent. Almost 500 *S*-nitrosated proteins were identified. Similarly to embryophytes, candidate proteins were related to numerous cellular processes including metabolism, protein synthesis, folding, export and degradation, replication and transcription, cell motility, redox homeostasis, stress responses, circadian rhythm, and signal transduction. Some cellular processes were particularly targeted by this PTM, notably iron assimilation, thus confirming the importance of NO in the regulation of iron homeostasis as reported in other organisms. Overall, almost one-fifth of these proteins were previously identified as candidates for *S*-nitrosation in land plants. The other studies of interest have been focused on specific proteins. Thus, ascorbate peroxidase, GSNOR, the autophagy-related protein ATG8 and a glutathione-*S*-transferase isoform were shown to undergo *S*-nitrosation in *C. reinhardtii* cells facing salt stress (Chen *et al.*, 2016). The authors assumed that the *S*-nitrosation of GSNOR and of the antioxidant enzymes, which leads to their inactivation and an increase of nitrosative and oxidative stress, was correlated to the loss of cell viability. Another relevant example concerns the cytosolic RNA-binding protein NAB1 in *C. reinhardtii* (Berger *et al.*, 2016). NAB1 prevents the translation of certain mRNAs encoding the major light-harvesting proteins at photosystem II. It was found that the repressor activity of NAB1 was suppressed upon *S*-nitrosation of Cys-226 located in the RNA recognition motif of the protein. Interestingly, the *S*-nitrosation status

of NAB1 appeared to be modulated by light intensity. More precisely, the protein became *S*-nitrosated in cells acclimated to limiting light supply, thus allowing an efficient light capture correlated to the higher accumulation of light-harvesting proteins. In contrast, NAB1 underwent a denitrosation in cells cultivated under elevated light conditions. This process involved the denitrosating activity of a thioredoxin isoform and was accompanied by the translational repression of light-harvesting proteins. Therefore, the *S*-nitrosation/denitrosation of NAB1 represents an original mechanism underlying photoacclimation processes in eukaryotic cells. In addition to these studies, the *in vitro* *S*-nitrosation of the chloroplastic triosephosphate isomerase CrTPI from *C. reinhardtii* has been reported (Zaffagnini *et al.*, 2014). Once *S*-nitrosated by GSNO, a partial and reversible inhibition of CrTPI has been measured. Nevertheless, the physiological occurrence and impact of CrTPI *S*-nitrosation are currently unknown.

NO turnover in algae

An important facet of NO signalling regulation relies on the modulation of its turnover through specific enzymes (Fig. 1).

As previously stated, GSNOR is one major regulator of the NO signalling in plants, controlling the pool of SNO (Jahnová *et al.*, 2019). Interestingly, this enzyme is well conserved among the green lineage, since homologues can be retrieved in a vast majority of green algae and land plants (Astier *et al.*, 2019). This observation suggests a common and conserved crucial role for GSNOR in regulating NO signalling. Accordingly, GSNOR was recently shown to regulate the NO-dependent responses triggered by salt stress in *C. reinhardtii* by modulating the SNO pool (Chen *et al.*, 2016).

The oxidoreductase thioredoxin-*h5*, a member of the Trx family, is another enzyme described in Arabidopsis that selectively reduces *S*-nitrosated proteins, participating notably in the regulation of plant immunity (Kneeshaw *et al.*, 2014). Trx proteins are present as expanded multigene families in photosynthetic organisms and can be found throughout the green lineage, including algae (Jacquot *et al.*, 2009). In *C. reinhardtii*, the SNO pool induced by salt stress was shown to be reduced *in vitro* when treated with Trx (Chen *et al.*, 2016). These preliminary results suggest a conserved role for Trx in regulating NO signalling in algae. However, further investigations are needed to confirm this mechanism *in vivo* and the precise molecular actors involved.

The NO content in plant cells is also modulated through the action of phytooglobins (Becana *et al.*, 2020). Indeed, these enzymes scavenge NO using trace oxygen, converting it to nitrate through a NO dioxygenase activity (NOD). This phytoglobin NOD activity is involved in the regulation of various physiological processes, such as symbiotic interactions in which NO is used as a metabolic intermediate to allow the phytoglobin-NO respiration cycle, but also during (a)biotic stress responses in which the modulation of NO content affects the signalling

pathway of several hormones (Becana *et al.*, 2020). Phytoglobins also contribute to NO turnover in algae (Johnson and Lecomte, 2013). For instance, in *C. reinhardtii* the truncated haemoglobin THB1 associates with NR, which keeps it reduced under its ferrous form through its diaphorase activity. This allows the processing of NO to nitrate by THB1 via its NOD activity (Sanz-Luque *et al.*, 2015). This system participates in the regulation of nitrogen assimilation and NO homeostasis (Chamizo-Ampudia *et al.*, 2017).

Concluding remarks and future perspective

Compared with the considerable number of publications dedicated to NO functions in embryophytes, a very limited number of studies have explored this field of research in algae. This is somewhat surprising in regards to the value of algae as biological as well as biotechnical models. Essentially, the basic principles of NO signalling are conserved in both algae and land plants. In particular, the current body of data are supportive of the view that NR and probably NiNOR are central components of the reductive pathways for NO synthesis. Similarly, S-nitrosation is emerging as a conserved central PTM shared by green organisms and also metazoans. In contrast, it is unlikely that algae and embryophytes use a typical animal-type NO/cGMP path for mediating NO actions.

An undisputable but intriguing originality is the finding that few algae possess NOSs. Based on sequence similarities and the first *in vitro* enzymatic assays on OtNOSs (Weisslocker-Schaetzel *et al.*, 2017), the designation 'NOS' is not usurped. Clearly, this discovery raises a number of questions. In particular, at the ecological level, does the presence of NOS give to these algae an evolutionary advantage for their habitat? At the cellular level, what are the processes involving these proteins? How are the reductive pathways and NOS-dependent routes for NO synthesis inter-regulated? How are these proteins regulated at the transcriptional, post-transcriptional, and post-translational levels and, consequently, what are the corresponding triggers up/down-regulating their activities? At the molecular level, could these proteins display specific structural and catalytic features? If so, do these NOSs produce NO and/or other reactive nitrogen species? Answering these questions will require the development of biochemical and genetic tools but also of appropriate algal cultures as several NOS-containing algae are poorly investigated organisms.

Another item deserving particular attention is the prevalence of S-nitrosated proteins dedicated to protein synthesis. This observation remains preliminary and needs to be strengthened by the characterization of additional algal S-nitrosomes. Also, in the studies conducted so far in *C. reinhardtii*, protein S-nitrosation was investigated using NO artificially generated using GSNO. Although informative, such an approach does not take into account the spatiotemporal aspect of NO signalling occurring when NO is endogenously produced. Therefore, the

S-nitrosome of algae in physiological conditions is still an unexplored field of research.

We have only begun to scratch the surface of the mechanisms behind NO production and functions in algae. Undoubtedly, elucidating these mechanisms will open novel routes for understanding the evolution of NO signalling.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Table S1. Occurrence of NO-signalling key enzymes in the 1000 Plants (1KP) international multidisciplinary consortium's transcriptome database (www.onekp.com/) classed by taxonomic divisions.

Acknowledgements

Work in our lab is supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Investissements d'Avenir program, project « Initiatives Science Innovation Territoire Economie en Bourgogne-Franche-Comté » (grant « Structure, Function and Roles of Nitric Oxide Synthases in Algal Responses to Environmental Stresses (NOISELESS) », number RA18041.AEC.IS) and the Agence Nationale de la Recherche (grant « Algae-Nitric Oxide Synthases (ALGAE-NOS) », number 18-CE20-0022-02).

Author contributions

JA: writing original draft, review and editing; JR, PC, AB-B, CR and AK: writing, review, and editing; SJ: conceptualization, supervision, writing, review, and editing; VN-F: conceptualization and writing original draft; DW: conceptualization, funding acquisition, supervision, and writing original draft.

References

- Astier J, Gross I, Durner J. 2018. Nitric oxide production in plants: an update. *Journal of Experimental Botany* **69**, 3401–3411.
- Astier J, Lindermayr C. 2012. Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 15193–15208.
- Astier J, Mounier A, Santolini J, Jeandroz S, Wendehenne D. 2019. The evolution of nitric oxide signalling diverges between animal and green lineages. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4355–4364.
- Barkia I, Saari N, Manning SR. 2019. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs* **17**, 1660–3397.
- Becana M, Yruela I, Sarath G, Catalán P, Hargrove MS. 2020. Plant hemoglobins: a journey from unicellular green algae to vascular plants. *New Phytologist* **227**, 1618–1635.
- Beligni M, Lamattina L. 1999. Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Science* **4**, 299–300.
- Berger A, Boscarri A, Frendo P, Brouquisse R. 2019. Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4505–4520.
- Berger H, De Mia M, Morisse S, Marchand CH, Lemaire SD, Wobbe L, Kruse O. 2016. A light switch based on protein S-nitrosylation fine-tunes photosynthetic light harvesting in *Chlamydomonas*. *Plant Physiology* **171**, 821–832.

- Bethke PC, Badger MR, Jones RL.** 2004. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant cell* **16**, 332–341.
- Bignon E, Rizza S, Filomeni G, Papaleo E.** 2019. Use of computational biochemistry for elucidating molecular mechanisms of nitric oxide synthase. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **17**, 415–429.
- Bouchard JN, Yamasaki H.** 2008. Heat stress stimulates nitric oxide production in *Symbiodinium microadriaticum*: a possible linkage between nitric oxide and the coral bleaching phenomenon. *Plant & Cell Physiology* **49**, 641–652.
- Burlacot A, Richaud P, Gosset A, Li-Beisson Y, Peltier G.** 2020. Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **117**, 2704–2709.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E.** 2017. Nitrate reductase regulates plant nitric oxide homeostasis. *Trends in Plant Science* **22**, 163–174.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas Á, Ocaña-Calahorra F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galván A, Fernández E.** 2016. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell & Environment* **39**, 2097–2107.
- Chang HL, Hsu YT, Kang CY, Lee TM.** 2013. Nitric oxide down-regulation of carotenoid synthesis and PSII activity in relation to very high light-induced singlet oxygen production and oxidative stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & Cell Physiology* **54**, 1296–1315.
- Chen K, Song L, Rao B, Zhu T, Zhang YT.** 2010. Nitric oxide plays a role as second messenger in the ultraviolet-B irradiated green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Folia Microbiologica* **55**, 53–60.
- Chen X, Tian D, Kong X, Chen Q, E F AA, Hu X, Jia A.** 2016. The role of nitric oxide signalling in response to salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **244**, 651–669.
- Chung CC, Hwang SP, Chang J.** 2008. Nitric oxide as a signaling factor to upregulate the death-specific protein in a marine diatom, *Skeletonema costatum*, during blockage of electron flow in photosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6521–6527.
- Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB.** 2020. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews* **40**, 158–189.
- Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB.** 2009a. Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signaling & Behavior* **4**, 920–923.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB.** 2009b. Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* **184**, 9–14.
- Crane BR, Rosenfeld RJ, Arvai AS, Ghosh DK, Ghosh S, Tainer JA, Stuehr DJ, Getzoff ED.** 1999. N-terminal domain swapping and metal ion binding in nitric oxide synthase dimerization. *The EMBO Journal* **18**, 6271–6281.
- Cui B, Pan Q, Clarke D, Villarreal MO, Umbreen S, Yuan B, Shan W, Jiang J, Loake GJ.** 2018. S-nitrosylation of the zinc finger protein SRG1 regulates plant immunity. *Nature Communications* **9**, 4226.
- DeFalco TA, Moeder W, Yoshioka K.** 2016. Opening the gates: insights into cyclic nucleotide-gated channel-mediated signaling. *Trends in Plant Science* **21**, 903–906.
- Del Castello F, Nejamkin A, Cassia R, Correa-Aragunde N, Fernández B, Foresi N, Lombardo C, Ramirez L, Lamattina L.** 2019. The era of nitric oxide in plant biology: Twenty years tying up loose ends. *Nitric Oxide* **85**, 17–27.
- De Mia M, Lemaire SD, Choquet Y, Wollman FA.** 2019. Nitric oxide remodels the photosynthetic apparatus upon S-starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **179**, 718–731.
- de Montaigu A, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E.** 2010. A soluble guanylate cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate reductase in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell* **22**, 1532–1548.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**, 16314–16318.
- Dolch LJ, Lupette J, Tourcier G, et al.** 2017. Nitric Oxide mediates nitrite-sensing and acclimation and triggers a remodeling of lipids. *Plant Physiology* **175**, 1407–1423.
- Domingos P, Prado AM, Wong A, Gehring C, Feijo JA.** 2015. Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants. *Molecular plant* **8**, 506–520.
- Duszyn M, Świeżawska B, Szmjdt-Jaworska A, Jaworski K.** 2019. Cyclic nucleotide gated channels (CNGCs) in plant signalling—Current knowledge and perspectives. *Journal of Plant Physiology* **241**, 153035.
- Estevez MS, Puntarulo S.** 2005. Nitric oxide generation upon growth of Antarctic *Chlorella* sp. cells. *Physiologia Plantarum* **125**, 192–201.
- Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ.** 2017. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **40**, 462–472.
- Feelisch M, Martin JF.** 1995. The early role of nitric oxide in evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 496–499.
- Filina V, Grinko A, Ermilova E.** 2019. Truncated hemoglobins 1 and 2 are implicated in the modulation of phosphorus deficiency-induced nitric oxide levels in *Chlamydomonas*. *Cells* **8**, 947.
- Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC.** 2008. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiology* **147**, 1936–1946.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló 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. *The Plant cell* **22**, 3816–3830.
- Frederickson Matika DE, Loake GJ.** 2014. Redox regulation in plant immune function. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**, 1373–1388.
- Freschi L.** 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398.
- González A, Cabrera Mde L, Henríquez MJ, Contreras RA, Morales B, Moenne A.** 2012. Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess. *Plant Physiology* **158**, 1451–1462.
- Groß F, Rudolf EE, Thiele B, Durner J, Astier J.** 2017. Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **68**, 2149–2162.
- Gross I, Durner J.** 2016. In search of enzymes with a role in 3',5'-cyclic guanosine monophosphate metabolism in plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 576.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT.** 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168.
- Gupta KJ, Kolbert Z, Durner J, et al.** 2020. Regulating the regulator: nitric oxide control of post-translational modifications. *New Phytologist* **227**, 1319–1325.
- Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F.** 2001. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Medical Science Monitor* **7**, 801–819.
- Hancock JT, Neill SJ.** 2019. Nitric oxide: its generation and interactions with other reactive signaling compounds. *Plants* **8**, 41.
- He Y, Tang RH, Hao Y, et al.** 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**, 1968–1971.
- Hemschemeier A, Casero D, Liu B, Benning C, Pellegrini M, Happe T, Merchant SS.** 2013a. Copper response regulator1-dependent and -independent responses of the *Chlamydomonas reinhardtii* transcriptome to dark anoxia. *The Plant Cell* **25**, 3186–3211.
- Hemschemeier A, Duner M, Casero D, Merchant SS, Winkler M, Happe T.** 2013b. Hypoxic survival requires a 2-on-2 hemoglobin in a process involving nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **110**, 10854–10859.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS.** 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**, 150–166.
- Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS.** 2001. S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nature Cell Biology* **3**, E46–E49.

- Horchani F, Prévot M, Boscarri A, et al.** 2011. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiology* **155**, 1023–1036.
- Horst BG, Marletta MA.** 2018. Physiological activation and deactivation of soluble guanylate cyclase. *Nitric Oxide* **77**, 65–74.
- Horst BG, Stewart EM, Nazarian AA, Marletta MA.** 2019. Characterization of a carbon monoxide-activated soluble guanylate cyclase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* **58**, 2250–2259.
- Hsu YT, Lee TM.** 2012. Nitric oxide up-regulates the expression of methionine sulfoxide reductase genes in the intertidal macroalga *Ulva fasciata* for high light acclimation. *Plant & Cell Physiology* **53**, 445–456.
- Isner JC, Olteanu VA, Hetherington AJ, et al.** 2019. Short- and long-term effects of UVA on *Arabidopsis* are mediated by a novel cGMP phosphodiesterase. *Current Biology* **29**, 2580–2585.e4.
- Jacquot JP, Eklund H, Rouhier N, Schürmann P.** 2009. Structural and evolutionary aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. *Trends in Plant Science* **14**, 336–343.
- Jahnová J, Luhová L, Petřivalský M.** 2019. S-nitrosoglutathione reductase—the master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants* **8**, 48.
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S.** 2006. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* **142**, 1246–1255.
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK, Wendehenne D.** 2016. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* **9**, re2.
- Johnson EA, Lecomte JT.** 2013. The globins of cyanobacteria and algae. *Advances in Microbial Physiology* **63**, 195–272.
- Johnson EA, Rice SL, Preimesberger MR, Nye DB, Gilevicius L, Wenke BB, Brown JM, Witman GB, Lecomte JT.** 2014. Characterization of THB1, a *Chlamydomonas reinhardtii* truncated hemoglobin: linkage to nitrogen metabolism and identification of lysine as the distal heme ligand. *Biochemistry* **53**, 4573–4589.
- Khan MI, Shin JH, Kim JD.** 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* **17**, 36.
- Kneeshaw S, Gelineau S, Tada Y, Loake GJ, Spoel SH.** 2014. Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. *Molecular Cell* **56**, 153–162.
- Kolbert Z, Barroso JB, Brouquisse R, et al.** 2019. A forty year journey: the generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide* **93**, 53–70.
- Kováčik J, Klejduš B, Babula P.** 2014. Oxidative stress, uptake and bioconversion of 5-fluorouracil in algae. *Chemosphere* **100**, 116–123.
- Kováčik J, Klejduš B, Babula P, Hedbavny J.** 2015. Nitric oxide donor modulates cadmium-induced physiological and metabolic changes in the green alga *Coccomyxa subellipsoidea*. *Algal Research* **8**, 45–52.
- Lamotte O, Bertoldo JB, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Aimé S, Hichami S, Terenzi H, Wendehenne D.** 2015. Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Frontiers in Chemistry* **2**, 114.
- Lehner C, Kerschbaum HH, Lütz-Meindl U.** 2009. Nitric oxide suppresses growth and development in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Journal of Plant Physiology* **166**, 117–127.
- Li Q, Liang Z, Ge F, Xu Y, Yang L, Zeng H.** 2014. Alleviating CTAC and Flu combined pollution damage in *Chlorella vulgaris* by exogenous nitric oxide. *Chemosphere* **96**, 39–45.
- Lindermayr C, Durner J.** 2009. S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics* **73**, 1–9.
- Lindermayr C, Durner J.** 2015. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide: nitric oxide coordinates reactive oxygen species homeostasis. *Plant Physiology* **167**, 1209–1210.
- Ling T, Bellin D, Vandelle E, Manifard Z, Delledonne M.** 2017. Host-mediated S-nitrosylation disarms the bacterial effector HopAl1 to reestablish immunity. *The Plant Cell* **29**, 2871–2881.
- Liping Z, Hongbo S, Xiaohua L, Zhaopu L.** 2013. Gene regulation of iron-deficiency responses is associated with carbon monoxide and heme oxygenase 1 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* **8**, e53835.
- Mallick N, Mohn FH, Soeder CJ, Grobbelaar JU.** 2002. Ameliorative role of nitric oxide on H₂O₂ toxicity to a chlorophycean alga *Scenedesmus obliquus*. *The Journal of General and Applied Microbiology* **48**, 1–7.
- Mallick N, Rai LC, Mohn FH, Soeder CJ.** 1999. Studies on nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Chemosphere* **39**, 1601–1610.
- Martínez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S.** 2011. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine* **51**, 17–29.
- Morisse S, Zaffagnini M, Gao XH, Lemaire SD, Marchand CH.** 2014. Insight into protein S-nitrosylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Antioxidants & Redox Signaling* **21**, 1271–1284.
- Morton DB, Hudson ML, Waters E, O'Shea M.** 1999. Soluble guanylyl cyclases in *Caenorhabditis elegans*: NO is not the answer. *Current Biology* **9**, R546–R547.
- Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ.** 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* **5**, pls052.
- Nighorn A, Byrnes KA, Morton DB.** 1999. Identification and characterization of a novel beta subunit of soluble guanylyl cyclase that is active in the absence of a second subunit and is relatively insensitive to nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 2525–2531.
- Peng X, Zhang X, Li B, Zhao L.** 2019. Cyclic nucleotide-gated ion channel 6 mediates thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings by regulating nitric oxide production via cytosolic calcium ions. *BMC Plant Biology* **19**, 368.
- Plouviéz M, Wheeler D, Shilton A, Packer MA, McLenachan PA, Sanz-Luque E, Ocaña-Calahorra F, Fernández E, Guieysse B.** 2017. The biosynthesis of nitrous oxide in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* **91**, 45–56.
- Pokora W, Aksmann A, Baścik-Remisiewicz A, Dettlaff-Pokora A, Rykaczewski M, Gappa M, Tukaj Z.** 2017. Changes in nitric oxide/hydrogen peroxide content and cell cycle progression: Study with synchronized cultures of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Plant Physiology* **208**, 84–93.
- Ponmani T, Guo R, Ki JS.** 2015. A novel cyclophilin gene from the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* and its possible role in the environmental stress response. *Chemosphere* **139**, 260–267.
- Poulos TL.** 2006. Soluble guanylate cyclase. *Current Opinion in Structural Biology* **16**, 736–743.
- Qian H, Chen W, Li J, Wang J, Zhou Z, Liu W, Fu Z.** 2009. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. *Aquatic Toxicology* **92**, 250–257.
- 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*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103–110.
- Rosnoblet C, Bègue H, Blanchard C, Pichereaux C, Besson-Bard A, Aimé S, Wendehenne D.** 2017. Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogam-induced immune response in tobacco. *Plant, Cell & Environment* **40**, 491–508.
- Ross C, Küpper FC, Jacobs RS.** 2006. Involvement of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in the wound response of *Dasycladus vermicularis*. *Chemistry & Biology* **13**, 353–364.
- Santolini J.** 2011. The molecular mechanism of mammalian NO-synthases: a story of electrons and protons. *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**, 127–141.
- Santolini J.** 2019. What does “NO-Synthase” stand for? *Frontiers in Bioscience* **24**, 133–171.
- Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D.** 2017. Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? *Nitric Oxide* **63**, 30–38.
- Sanz-Luque E, Ocaña-Calahorra F, de Montaigu A, Chamizo-Ampudia A, Llamas Á, Galván A, Fernández E.** 2015. THB1, a truncated

- hemoglobin, modulates nitric oxide levels and nitrate reductase activity. *The Plant Journal* **81**, 467–479.
- Sanz-Luque E, Ocaña-Calahorra F, Llamas A, Galvan A, Fernandez E.** 2013. Nitric oxide controls nitrate and ammonium assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3373–3383.
- Schmidt HH, Walter U.** 1994. NO at work. *Cell* **78**, 919–925.
- Shen Q, Zhan X, Yang P, Li J, Chen J, Tang B, Wang X, Hong Y.** 2019. Dual activities of plant cGMP-dependent protein kinase and its roles in gibberellin signaling and salt stress. *The Plant Cell* **31**, 3073–3091.
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L.** 2013. Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Reports* **32**, 853–866.
- Singh Ak, Sharma L, Mallick N.** 2004. Antioxidative role of nitric oxide on copper toxicity to a chlorophycean alga, *Chlorella*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**, 223–227.
- Skelly MJ, Malik SI, Le Bihan T, Bo Y, Jiang J, Spoel SH, Loake GJ.** 2019. A role for S-nitrosylation of the SUMO-conjugating enzyme SCE1 in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **116**, 17090–17095.
- Smith BC, Marletta MA.** 2012. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. *Current Opinion in Chemical Biology* **16**, 498–506.
- Sparacino-Watkins CE, Tejero J, Sun B, et al.** 2014. Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 10345–10358.
- Spoel SH, Loake GJ.** 2011. Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 358–364.
- Stamler JS, Hess DT.** 2010. Nascent nitrosylases. *Nature Cell Biology* **12**, 1024–1026.
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC.** 2001. Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675–683.
- Stöhr C, Stremlau S.** 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463–470.
- Stuehr DJ, Haque MM.** 2019. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *British Journal of Pharmacology* **176**, 177–188.
- Świeżawska B, Duszyn M, Jaworski K, Szmidt-Jaworska A.** 2018. Downstream targets of cyclic nucleotides in plants. *Frontiers in Plant Science* **9**, 1428.
- Thompson SE, Taylor AR, Brownlee C, Callow ME, Callow JA.** 2008. The role of nitric oxide in diatom adhesion in relation to substratum properties. *Journal of Phycology* **44**, 967–976.
- Tian Y, Gao S, von der Heyde EL, Hallmann A, Nagel G.** 2018. Two-component cyclase opsins of green algae are ATP-dependent and light-inhibited guanylyl cyclases. *BMC Biology* **16**, 144.
- Torres J, Rivera A, Clark G, Roux SJ.** 2008. Participation of extracellular nucleotides in the wound response of *Dasycladus vermicularis* and *Acetabularia acetabulum* (Dasycladales, Chlorophyta). *Journal of Phycology* **44**, 1504–1511.
- Trapet P, Kulik A, Lamotte O, Jeandroz S, Bourque S, Nicolas-Francès V, Rosnoblet C, Besson-Bard A, Wendehenne D.** 2015. NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochemistry* **112**, 72–79.
- 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 Physiology* **47**, 346–354.
- Vardi A, Formiggini F, Casotti R, De Martino A, Ribalet F, Miralto A, Bowler C.** 2006. A stress surveillance system based on calcium and nitric oxide in marine diatoms. *PLoS Biology* **4**, e60.
- Wang M, Liao W.** 2016. Carbon monoxide as a signaling molecule in plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 572.
- Wei L, Derrien B, Gautier A, et al.** 2014. Nitric oxide-triggered remodeling of chloroplast bioenergetics and thylakoid proteins upon nitrogen starvation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* **26**, 353–372.
- Weisslocker-Schaetzel M, André F, Touazi N, Foresi N, Lembrouk M, Dorlet P, Frelet-Barrand A, Lamattina L, Santolini J.** 2017. The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme. *Plant Science* **265**, 100–111.
- Wendehenne D, Gao QM, Kachroo A, Kachroo P.** 2014. Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 127–134.
- Wijffels RH, Barbosa MJ.** 2010. An outlook on microalgal biofuels. *Science* **329**, 796–799.
- Winger JA, Derbyshire ER, Lamers MH, Marletta MA, Kuriyan J.** 2008. The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase. *BMC Structural Biology* **8**, 42.
- Yamasaki H, Cohen MF.** 2006. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in Plant Science* **11**, 522–524.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S.** 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* **4**, 128–129.
- Yordanova ZP, Iakimova ET, Cristescu SM, Harren FJ, Kapchina-Toteva VM, Woltering EJ.** 2010. Involvement of ethylene and nitric oxide in cell death in mastoparan-treated unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Biology International* **34**, 301–308.
- Yu M, Lamattina L, Spoel SH, Loake GJ.** 2014. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *The New Phytologist* **202**, 1142–1156.
- Zaffagnini M, Michelet L, Sciabolini C, Di Giacinto N, Morisse S, Marchand CH, Trost P, Fermani S, Lemaire SD.** 2014. High-resolution crystal structure and redox properties of chloroplastic triosephosphate isomerase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Plant* **7**, 101–120.
- Zalutskaya Z, Kochemasova L, Ermilova E.** 2018a. Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle. *BMC Plant Biology* **18**, 305.
- Zalutskaya Z, Minaeva E, Filina V, Ostroukhova M, Ermilova E.** 2018b. Regulation of sulfur deprivation-induced expression of the ferredoxin-encoding *FDX5* gene *Chlamydomonas reinhardtii* in aerobic conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* **123**, 18–23.
- Zhan N, Wang C, Chen L, et al.** 2018. S-nitrosylation targets GSNO reductase for selective autophagy during hypoxia responses in plants. *Molecular cell* **71**, 142–154.e6.
- Zhang LP, Mehta SK, Liu ZP, Yang ZM.** 2008. Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant & Cell Physiology* **49**, 411–419.

D. Objectifs de la thèse

Les données présentées plus haut mettent en évidence l'émergence des algues comme modèle biologique dans l'étude de la signalisation du NO. En effet, la présence de NOS aux caractéristiques structurales particulières (*cf.* **CHAPITRE I**) en font des modèles biologiques pertinents.

Mon sujet de thèse s'intègre au sein du projet ANR Algae-NOS (coordonné par Jérôme Santolini, Paris Saclay) visant à caractériser plusieurs NOS d'algues. Ma participation au projet se focalise sur la caractérisation des NOS de *Klebsormidium nitens*. *K. nitens* est une algue verte du groupe des Streptophytes, dont font partie les végétaux terrestres. Cette espèce représente donc un modèle biologique original des étapes de transition précoces des algues aquatiques aux plantes terrestres (Hori *et al.*, 2014) et qui, dans mon travail, permettrait d'approfondir les connaissances sur l'évolution des sources de production du NO et de son rôle signalétique chez les organismes photosynthétiques.

Ce travail de thèse posait comme hypothèse principale que l'étude des interactions entre la NOS et ses partenaires protéiques permettrait d'apporter des connaissances sur le fonctionnement et le rôle de la famille des NOS de *K. nitens*. En effet, il a été démontré chez les mammifères que l'environnement protéique des NOS est déterminant dans la signalisation NO, cette dernière étant dépendante de la concentration en NO mais aussi de la distribution spatiale et temporelle du NO produit (Hess *et al.*, 2005; Wynia-Smith and Smith, 2017). Cependant, des problèmes techniques concernant la production hétérologue de la protéine, nous ont conduits à revoir notre stratégie tout au long de ce travail. Aussi, afin de tenter de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle des NOS de *K. nitens*, j'ai organisé le manuscrit autour de trois axes principaux.

Dans le premier axe, la structure moléculaire des deux NOS identifiées dans le génome de *K. nitens* a été étudiée. Pour ce faire, les séquences primaires nucléotidiques des deux KnNOS ont été vérifiées et les séquences primaires protéiques associées ont été comparées à celles des NOS d'autres algues. Des modèles de prédiction de la structure 3D de chacune des KnNOS ont également été édifiés afin d'étudier la possibilité que les KnNOS soient fonctionnelles. La

position phylogénétique de ces deux NOS a ensuite été établie en comparaison aux autres NOS décrites chez les eucaryotes.

Le second axe de cette thèse a été dédié à la caractérisation de l'expression de deux KnNOS en réponse à différents stress abiotiques. Cette étude a tout d'abord nécessité de déterminer des gènes de référence pour les études de RT-qPCR afin de suivre l'accumulation des ARNm et des protéines KnNOS. Trois conditions de stress abiotiques ont également été mises au point. Ce travail a fait l'objet d'un manuscrit, présenté dans le **CHAPITRE II** et soumis à la revue *Scientific Reports*.

Le troisième axe s'est focalisé sur l'identification des partenaires protéiques des deux KnNOS. Afin d'atteindre cet objectif, une stratégie *in vitro* par pull-down à partir de la protéine recombinante KnNOS suivie d'une analyse par spectrométrie de masse avait été retenue. Cette stratégie nécessite de produire les protéines recombinantes KnNOS et de les fixer sur des billes par affinité. Nos échecs dans les tentatives de production de la protéine recombinante ne nous ont pas permis d'atteindre cet objectif, malgré la diversité de systèmes de production (bactéries, levure, plante) et de conditions expérimentales testées. En parallèle, une étude *in silico* d'identification du réseau d'interaction des NOS humaines a été menée couplée à une analyse d'orthologie *via* OrthoFinder avec pour objectif d'identifier les partenaires d'intérêt des KnNOS pouvant posséder un rôle dans la signalisation NO.

CHAPITRE I

Analyse de la diversité moléculaire des NOS chez la Streptophyte *Klebsormidium nitens*

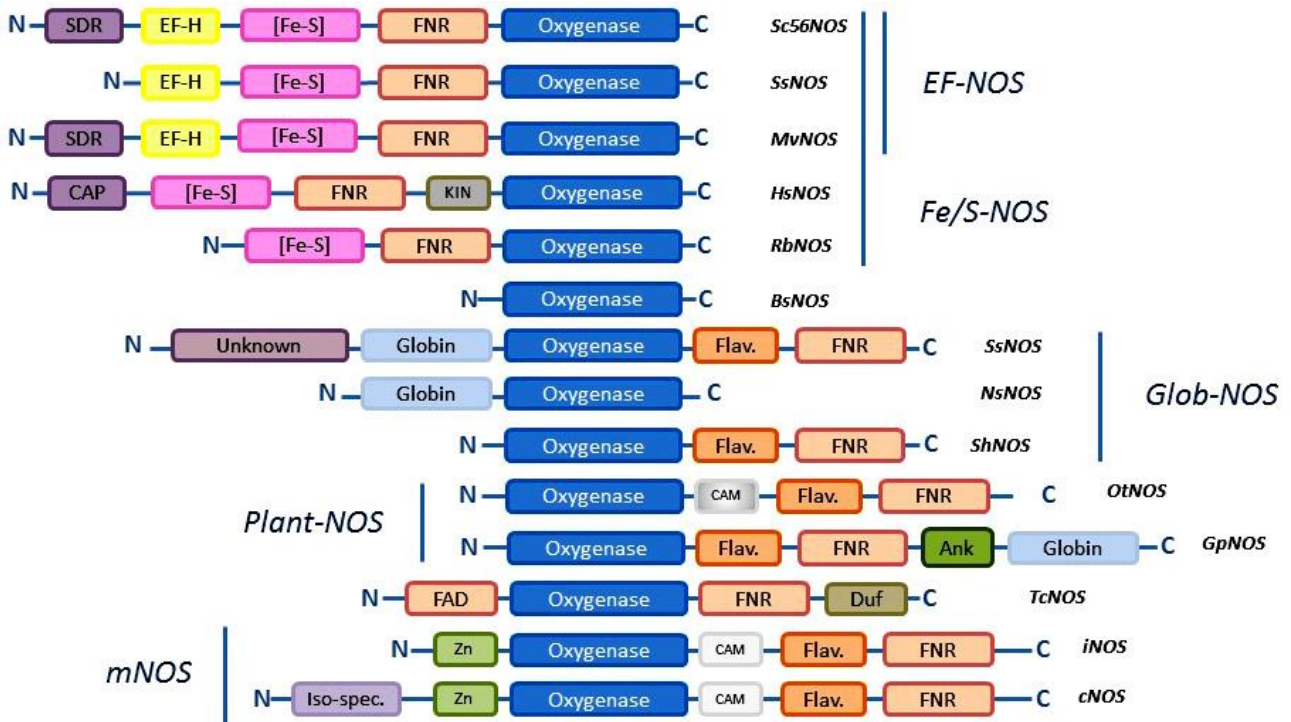


Fig. I.1. Schéma des différentes familles de protéines NOS. Toutes les NOS partagent un domaine oxygénase commun (bleu). Le domaine FMN est représenté par un module Flavodoxin orange foncé (Flav.) tandis que le domaine FAD/NADPH est représenté par une boîte FNR orange clair. La région de liaison de la calmoduline est représentée par un rectangle gris clair (CaM), gris foncé lorsque la région est putative. Le motif Zn/S est associé à une boîte vert clair. Les domaines supplémentaires (voir le texte principal) comprennent un domaine de globine (boîte bleu clair), un motif PEF (EF-H, jaune), un motif de déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR, violet), un domaine de ferr2doxine associé à la bactéroferritine ([Fe-S], rose), un domaine de kinésine (KIN, gris), un domaine CAP-ED (CAP, violet), un domaine de répétition ankyrine (Ank, vert) et quelques domaines de fonction inconnue (Unk, DUF...). Un exemple de NOS a été proposé pour chaque type de structure : *Sorangium cellulosum* (Sc56), *Silicibacter sp. TrichCH4B* (Ss), *Microcoleus vaginatus* (Mv), *Hyphomonas sp. TMED17* (Hs), Rhodospirillaceae bacterium (Rb), *Bacillus subtilis* (Bs), *Nostoc sp. PCC 7107* (Ns), *Scytonema hofmanni* (Sh), *Ostreococcus tauri* (Ot), *Gonium pectorale* (Gp), *Thraustotheca clavata* (Tc), NOS de mammifère inductible (iNOS) et constitutive (cNOS). Santolini et al., (2019).

A. Contexte de l'étude

Les protéines de la famille des NO synthases (NOS), source de production enzymatique de NO, ont fait l'objet de nombreuses études, tant sur leur structure que sur leur fonction (Ignarro, 1990; Campbell *et al.*, 2014). Bien que les recherches aient été principalement réalisées sur les trois isoformes de NOS de mammifères, le développement des techniques de séquençage et la disponibilité de nombreux génomes ont permis d'identifier la présence de NOS chez de nombreux organismes de l'ensemble de l'arbre du vivant. Plus de 1000 protéines NOS ont été identifiées et récemment leur diversité a fait l'objet d'une étude menée par Santolini, (2019 ; **Fig. I.1**).

1. Les NOS dans le monde du vivant

Chez les métazoaires, les NOS ont été identifiées dans de nombreux groupes taxonomiques et présentent des homologies généralement élevées avec la structure ou l'organisation de celles des mammifères (Andreakis *et al.* 2011). Par exemple, plusieurs espèces d'insectes telles que *Apis mellifera*, *Bombyx mori* ou encore *Drosophila melanogaster* ont été identifiées comme possédant au moins une NOS. Les NOS d'insectes présentent une structure proche des NOS constitutives (NOS1 et NOS3) avec un site de fixation de la calmoduline et un fonctionnement dépendant de la concentration en calcium (Müller, 1994, 1997). Une étude menée en 2008 sur les séquences de vingt NOS d'insectes a mis en avant la conservation des acides aminés de la région en doigt de zinc, du site de fixation de la L-arginine et du cofacteur BH₄ confirmant la proximité dans l'organisation et le fonctionnement de ces NOS par rapport au NOS de mammifères (mNOS ; Suman *et al.*, 2008).

A l'inverse, chez les procaryotes, les NOS présentent une structure variée et très différente de celles des mNOS (Sudhamsu and Crane, 2009).

Un premier type de NOS bactérienne, comme celles présentes chez *Bacillus subtilis* ou chez *Deinococcus radiodurans*, sont composées uniquement d'un domaine oxygénase (Adak *et al.*, 2002*b,a*). La partie N-terminale contenant le domaine PDZ pour la NOS1 de mammifères, de même que et le motif Cys-X4-Cys du domaine oxygénase, ne sont pas conservés chez ces NOS bactériennes, par contre les domaines de fixation de l'hème et du cofacteur BH₄ sont bien présents. Cependant, certaines espèces de bactéries ne contiennent pas les gènes codant pour la machinerie de synthèse du BH₄. *A contrario*, elles possèdent les gènes nécessaires à la

synthèse du tétrahydrofolate (TH₄) qui contient le même cycle ptéridine que le BH₄. L'étude menée par Reece *et al.*, (2009) a suggéré que ces NOS bactériennes utilisent le TH₄ comme cofacteur, les données obtenues *in vitro* sur la NOS de *D. radiodurans* ayant confirmé cette hypothèse. Le domaine réductase des mNOS n'étant pas conservé chez ces procaryotes, il semblerait que, contrairement aux protéines de mammifères qui contiennent un module réductase dédié, les NOS bactériennes puissent accepter des électrons de plusieurs réductases différentes (Gusarov *et al.*, 2008).

Un autre type de NOS bactérienne possède toutefois un module réductase mais en N-ter de leur séquence protéique, à la différence des mNOS (**Fig. I.1** ; Sudhamsu and Crane, 2009; Santolini, 2019). La NOS de *Sorangium cellulosum* illustre parfaitement cette organisation. A l'extrémité N-ter, elle présente un motif de déshydrogénases/réductases à chaîne courte, puis un motif EF-Hand (PEF) suggérant une certaine sensibilité au calcium. Le domaine flavodoxine est remplacé par un autre fournisseur d'électrons, vraisemblablement un domaine ferrédoxine associé à la bactérioferritine ([Fe-S]) suivi d'un domaine FNR. La chaîne entière du transfert d'électrons est située sur le côté opposé (N-ter) à celui présent chez les mNOS, suggérant une conformation et un mécanisme moléculaire différent (Santolini, 2019).

Un autre type de NOS, identifié chez la cyanobactérie *Synechococcus* 7335, montre une organisation singulière puisqu'il présente l'adjonction d'un domaine globine en position N-ter (**Fig. I.1** ; Santolini, 2019), Cette NOS (SyNOS) a été produite en système hétérologue et son activité a été étudiée *in vitro* (Picciano and Crane, 2019). La SyNOS, comme les mNOS, est active sous forme dimérique et nécessite la présence d'un cofacteur tel que BH₄ afin de produire du NO depuis la L-arginine. Contrairement aux autres NOS bactériennes, la SyNOS ne peut pas fonctionner avec le TH₄ et nécessite des niveaux élevés de calcium, supérieurs à 200 μM, pour son activation.

Chez les algues, les premières séquences protéiques identifiées présentent, si l'on considère entre autres la présence des domaines oxygénase et réductase, des structures proches de mNOS (Foresi *et al.*, 2010; Jeandroz *et al.*, 2016). Elles montrent néanmoins quelques spécificités. En effet dans l'étude menée par Foresi *et al.*, (2010) il a été mis évidence que sur la séquence de la NOS d'*Ostreococcus tauri* le site de fixation à la CaM n'est que putatif (**Fig. I.1**), la présence de CaM et de calcium ne semble donc pas essentiels au fonctionnement de la OtNOS. De plus, la région N-terminale étendue, dont le domaine en doigt de zinc des mNOS,

Tab. I.1. Liste des amorces utilisées pour le séquençage des séquences des ADNc de la KnNOS1 et de la KnNOS2.

Isoforme	Amorce	Nom	Séquence (5'-3')
KnNOS1	<i>Sens</i>	F1	ATGGGTCCATTTGCGAATTGCTTTG
		F2	TGTGGAATTTGCAGCTGATG
		F3	AGATCATTCGCAACCTGAGC
		F4	GATCGCCGAAATTCAAAGTC
		F5	TCGCCCTGAGAACAAGTAGC
		F6	GCGGTCAAGCCTAAGTACGA
		F7	CACTTTAGCATCCCGCTCTC
		F8	ACCCTCTGGAACCTTGCTCAC
	<i>Antisens</i>	R1	TCATGTTCCATTTGGACCGGTAGG
		R2	TACGCCTTCCGTGAGATAGC
		R3	GAGAGCGGGATGCTAAAGTG
		R4	TCCAACGGGCGAGGACG
		R5	CAAAGACGGAGAACCTCAGC
		R6	CCTGGCGAGTACTCAAACCT
		R7	AAACCATGGGTGGTTAGGG
		R8	GTCTGAAACGCAGGGGATT
KnNOS2	<i>Sens</i>	F1	ATGGAGCAGCACCAATCATGC
		F2	AAGCGGCATGTTACAACGG
		F3	ATGCGGTTTGCCGGATA
		F4	ACAGTTTTGGGTTTGGCAAG
		F5	CGGACGAAGAAGAGCTGACT
		F6	GATCTGCAAGGAGGAAGTCG
		F7	TGGGACTTCATGGAGGGTTC
		F8	GCGTCAAAGTGTTGCGAGA
	<i>Antisens</i>	R1	TTATTCGTAGGCTTTCCTCGC
		R2	CCAGCTCGAATAGGTTCTCG
		R3	TCGACTTCTCCTTGACAGAT
		R4	AGCGCAGTCAGCTTCTTTC
		R5	CGAGAACATCTTGGGCTCGT
		R6	ATAAGCATCTCCGTGAAGGC
R7		TCAGCGGATGCTCAGGAGG	

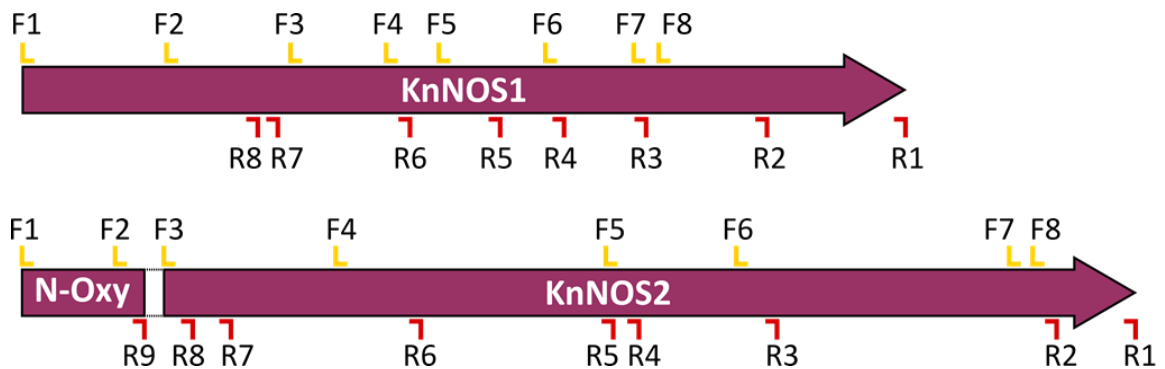


Fig. I.2. Schéma de la position des amorces sur les ADNc de la KnNOS1 et de la KnNOS2. Les amorces sens sont représentées en jaune et les amorces antisens en rouge.

n'est pas conservée. En effet, la OtNOS, et les autres NOS d'algues identifiées, présentent une structure atypique de la région en doigt de zinc de type Cys-X3-Cys au lieu du Cys-X4-Cys des mNOS (Santolini *et al.*, 2017; Santolini, 2019). La OtNOS présente toutefois une capacité de production de NO ultrarapide (Weisslocker-Schaetzel *et al.*, 2017), alors que certaines modifications, présentes chez d'autres NOS d'algues, laissent supposer qu'elles seraient inactives. En effet, les acides aminés de la poche de fixation de l'hème ne sont pas conservés dans les séquences des NOS de *Bolbocoleon piliferum* et *Rhodochaete parvula*. De plus, dans la séquence de la NOS de *B. piliferum*, la cystéine qui coordonne normalement le noyau hémique a été substituée par une leucine ce qui ne permettrait pas à cette NOS d'être active (Santolini *et al.*, 2017).

Certaines NOS d'algues peuvent également présenter l'adjonction d'un domaine globine mais en position C-terminale de leur séquence (**Fig. I.1** ; Santolini, 2019). Contrairement aux NOS de cyanobactéries, aucune NOS d'algues de ce type (portant un domaine globine) n'a été caractérisée d'un point de vue fonctionnel, et leur rôle reste à ce jour à découvrir.

2. *Klebsormidium nitens* comme nouvel organisme modèle

Parmi les algues possédant une NOS, *K. nitens* est évolutivement la plus proche des plantes terrestres. En effet, *K. nitens* appartient à l'embranchement des Charophytes au sein de l'infrarègne des Streptophytes dont font partie les plantes terrestres. La famille des Klebsormidiaceae, contenant *K. nitens* ainsi qu'une vingtaine d'autres espèces, est largement répandue dans des habitats variés tels que des écosystèmes aéroterrestres, terrestres ou hydroterrestres. Il a été établi que *K. nitens* pourrait constituer une algue modèle de l'étude de l'adaptation à la vie terrestre. En effet, elle présente une tolérance à certains stress propres au mode de vie terrestre tels que la dessiccation et le gel (Nagao *et al.*, 2008; Elster *et al.*, 2008; Lin and Wu, 2014; Holzinger *et al.*, 2014).

D'un point de vue génomique, *K. nitens* est caractérisée par la présence de gènes spécifiques aux plantes terrestres (Hori *et al.*, 2014). Ainsi, *K. nitens* possède les informations génétiques nécessaires à l'expression d'un système primitif de protection contre les effets néfastes de la lumière de haute intensité (Hori *et al.*, 2014). De plus, certaines voies de signalisation primitives de différentes hormones seraient également conservées chez cette algue, tout comme le domaine protéique SPARK de certains récepteurs kinase-like associés à la mycorhize à arbuscules chez les plantes vasculaires (Ohtaka *et al.*, 2017; Montero *et al.*, 2021).

Tab. I.2. Liste des polymérase et de leurs caractéristiques utilisées lors de cette étude.
HF : haute fidélité.

Nom	Fournisseur	HF	Hot start	Capacité	Remarque
GoTaq® G2	Promega	non	non	-	-
Phusion	ThermoFisher	oui	oui	7,5 kb	-
Phire II	ThermoFisher	oui	non	7,5 kb	Résistante aux inhibiteurs de PCR contenus dans les échantillons végétaux
Platinum	Invitrogen	oui	oui	14 kb	-
Q5	NEB	oui	oui	10 kb	Fournie avec un <i>GC enhancer</i> pour les matrices riches en GC
VELOCITY	meridian	oui	non	-	Extrêmement rapide, vitesse d'amplification de 15s/Kb
Advantage 2	Clontech	oui	oui	6 kb	Contient un mix de deux enzymes : une Taq polymérase Titanium possédant l'anticorps TaqStart pour permettre un démarrage <i>hot start</i> + une enzyme avec activité correctrice afin d'obtenir un mix d'enzyme plus robuste

MMseqs2 (Uniref + Environmental)

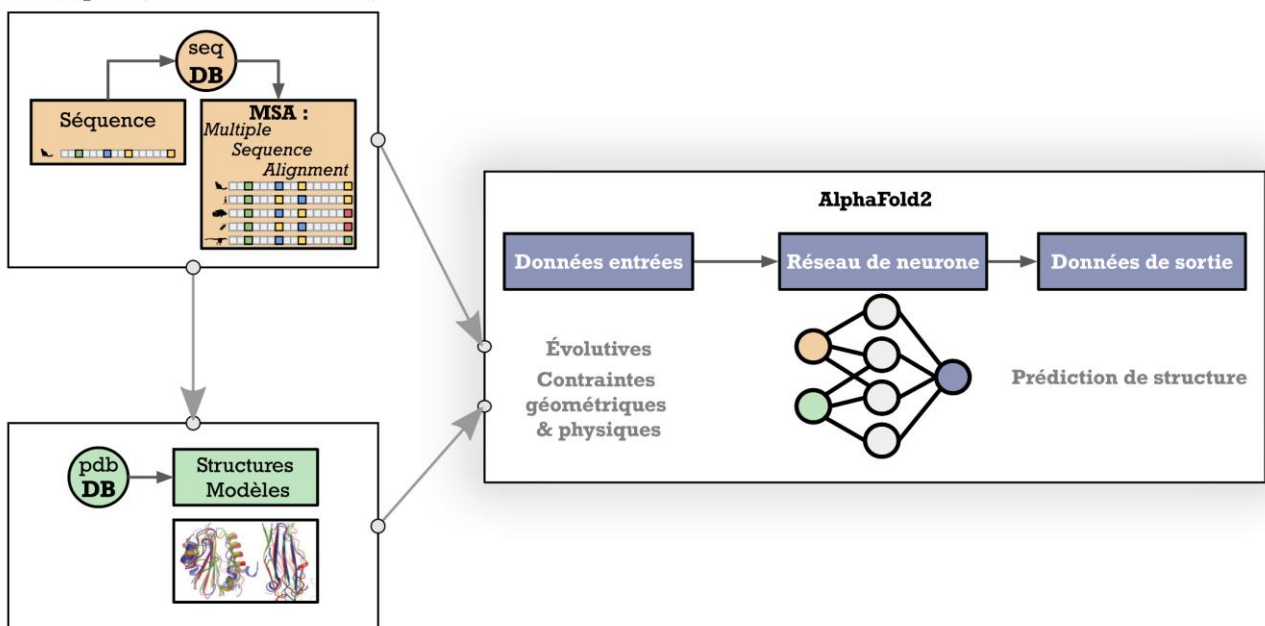


Fig. I.3. Schéma du fonctionnement de ColabFold. La séquence d'intérêt est alignée aux séquences des bases de données *via* l'algorithme MMseqs2. Si possible, les structures de la PDB des séquences proches de la séquence d'intérêt sont regroupées. L'alignement multiple obtenu par MMseqs2 et les données de la PDB sont implémentés dans l'algorithme d'AlphaFold. En prenant en compte ces données, le réseau de neurones établira une prédiction de modèle 3D de la séquence d'intérêt. Seq DB : séquence database ; pdb DB : PDB database.

3. Objectifs

Dans ce chapitre, nous avons cherché à caractériser la structure moléculaire des deux NOS de *K. nitens* en étudiant leurs séquences primaires nucléotidiques et protéiques, leur structure 3D et en les comparant avec d'autres protéines NOS.

Afin d'atteindre cet objectif, la séquence nucléotidique de chacune des KnNOS a été vérifiée par RT-qPCR et séquençage et les structures 3D prédictives des KnNOS ont pu être modélisées via l'algorithme AlphaFold. La position phylogénétique de ces deux NOS a ensuite été établie en comparaison aux autres NOS décrites chez les eucaryotes.

B. Matériels et méthodes

1. Culture de *Klebsormidium nitens*

La souche de *K. nitens* (SAG 335-1a) utilisée au laboratoire provient de la collection de culture d'algues de l'Université de Göttingen en Allemagne. Elle a été cultivée au laboratoire dans deux milieux liquides différents précédemment utilisés par Ohtaka *et al.*, (2017). Un milieu minimum C (*cf.* ANNEXES) a été préféré pour la culture de longue durée. Un milieu plus riche, contenant les solutions B, C et D, adaptées aux mousses et du di-ammonium tartrate et 0,1 % de glucose (m/v) (BCDAT + 0,1 % glc) (*cf.* ANNEXES), a été utilisé afin d'accélérer la croissance de *K. nitens* (Ohtaka, communication personnelle).

Les cultures ont été réalisées dans un volume final de 100 mL, maintenues sous agitation (90 rpm), à température constante (20 °C), sous une photopériode de 16 h jour et 8 h nuit avec une intensité lumineuse de 65 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les cultures ont été entretenues par dilution au demi tous les 15 jours. Les microalgues *K. nitens* ont été récoltées par filtration sous vide sur une membrane en nitrate et acétate de cellulose.

2. Vérification des séquences nucléotidiques des KnNOS

a) Extractions des ARN totaux et synthèses d'ADN complémentaires

Les ARN ont été extraits en utilisant un protocole adapté d'Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa, (2008). Pour chaque condition, 25 mL de suspension de *K. nitens* ont été recueillis par filtration puis congelés dans l'azote liquide et broyés à l'aide d'un vibrobroyeur oscillant MM200 (Retsch) à l'aide de billes en verre de 5 mm de diamètre. Trois cents μL de la solution de lyse (SDS 2 % (m/v), citrate de sodium 68 mM, acide citrique 132 mM, EDTA 1 mM) ont été ajoutés à chaque échantillon encore congelé. Après homogénéisation et 5 min d'incubation à

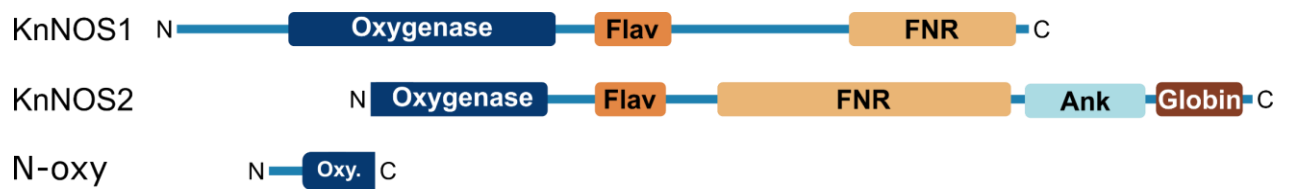


Fig. I.4. Représentation schématique des protéines de *K. nitens* montrant une homologie avec le domaine oxygénase de la NOS d'*Ostreococcus tauri*. Les domaines oxygénase sont représentés en bleu foncé, les domaine FMN (Flav) en orange, les domaines FNR en orange clair, les répétitions ankyrine en bleu clair et le domaine globine en marron.

température ambiante, 100 µL de solution de précipitation ADN-protéine (NaCl 4 M, citrate de sodium 16 mM, acide citrique 32 mM) ont été ajoutés. Après mélange par inversion, les tubes ont été incubés 10 min à 4 °C. La phase aqueuse a été récupérée après 15 min de centrifugation à 16 000 g et à 20 °C, puis les ARN ont été précipités par ajout de 300 µL d'isopropanol. Après une seconde centrifugation de 5 min à 16 000 g, à température ambiante, le surnageant a été éliminé et le culot d'ARN lavé avec 300 µL d'éthanol 75 % (v/v). Les échantillons ont de nouveau été centrifugés (1 min, 16 000 g, 20 °C), le surnageant a été éliminé et les culots d'ARN séchés avant d'être remis en suspension dans 30 µL d'eau exempte de nucléases à 4 °C sur la nuit. Les contaminations potentielles à l'ADN génomique ont été éliminées en utilisant le DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. La pureté, la qualité et l'intégrité des ARNs ont été déterminées à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer) et par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (m/v). Les ADNc ont été synthétisés à partir de 1 µg d'ARN totaux à l'aide du kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Thermo Fisher). Le volume réactionnel final de 20 µL comprend 10 µL de 2 x RT Buffer Mix, 1 µL de RT Enzyme Mix et 1 µg d'ARN totaux. La synthèse d'ADNc a été effectuée durant 60 min à 37 °C puis stoppée par incubation 5 min à 95 °C.

b) Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Afin de vérifier la séquence des ADNc des deux KnNOS, des amplifications par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques de la KnNOS1 et de KnNOS2 (**Tab. I.1**). Différentes amorces ont été élaborées pour chaque KnNOS afin de pouvoir amplifier l'ADNc pleine longueur ou des fragments de chacune des KnNOS (**Fig. I.2**).

Plusieurs polymérases de différents fournisseurs ont été utilisées : GoTaq® G2 DNA Polymerase (Promega), Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher), Phire Hot Start II DNA Polymerase (ThermoFisher), Platinum™ SuperFi™ II DNA Polymerase (Invitrogen), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs), VELOCITY DNA Polymerase (meridian BIOSCIENCE™) et Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech). Chacune de ces polymérases possède des caractéristiques différentes, résumées dans le **Tab. I.2**. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 50 à 200 ng d'ADNc de *K. nitens* en suivant, pour chaque polymérase, les recommandations du fournisseur.

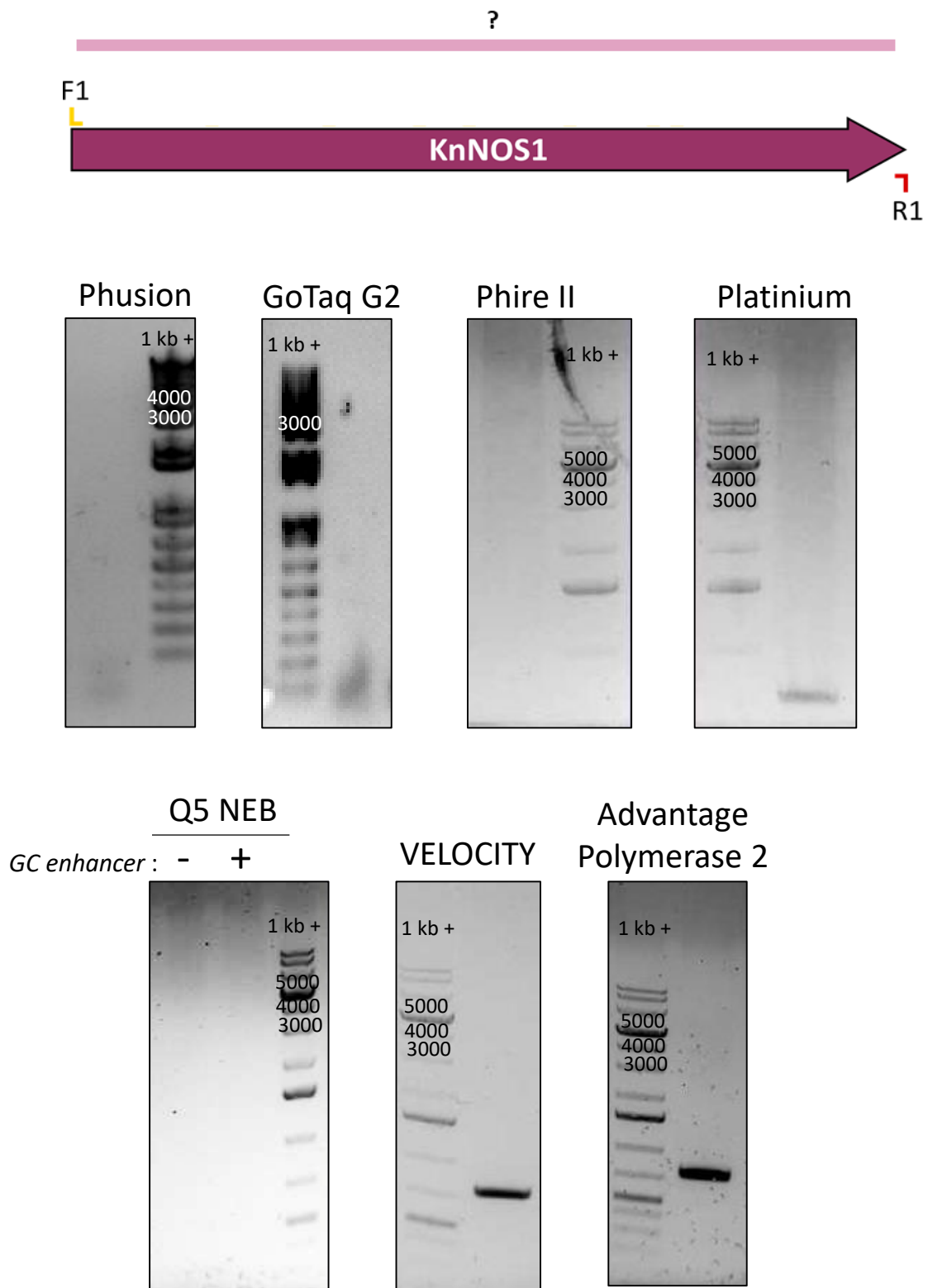


Fig. I.5. Résultat des réactions PCR avec différentes polymérase pour l'obtention de l'ADNc pleine longueur de la KnNOS1. L'amorce sens est représentée en jaune et l'amorce antisens en rouge.

c) *5' et 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR*

Afin d'identifier les séquences non traduites en 5' et en 3' (UTR ; *Untranslated Transcribed Region*) des ADNc des deux KnNOS, nous avons choisi de réaliser une RLM-RACE (*RNA Ligase Mediated-Rapid Amplification of cDNA Ends*) PCR. Cette technique permet l'amplification rapide des extrémités d'un ADNc uniquement depuis les ARNm porteurs d'une coiffe. La 5' RLM-RACE commence par une étape qui consiste à retirer l'extrémité 5'-phosphate des molécules telles que l'ARN ribosomique, l'ARNm fragmenté, l'ARNt et l'ADN génomique contaminant à l'aide d'un traitement par une phosphatase alcaline (CIP : *Calf Intestine Alkaline Phosphatase*). La seconde étape consiste à retirer la coiffe des ARNm intègres à l'aide de la pyrophosphatase acide de tabac : les ARNm ne présentent alors plus de coiffe mais une extrémité 5'monophosphate. Un adaptateur est alors fixé par ligation sur les extrémités 5'-monophosphates des ARNm. Le traitement CIP ayant permis de débarrasser tous les autres ARN de leur extrémité phosphate, l'adaptateur ne pourra donc être fixé que sur les ARNm anciennement coiffés. Les ARNm portant l'adaptateur sont alors rétrotranscrits en ADNc afin de pouvoir réaliser une PCR (dite externe) en utilisant une amorce spécifique de la séquence d'intérêt et une autre spécifique de l'adaptateur. Si aucun produit PCR n'est détecté après électrophorèse sur gel d'acrylamide une deuxième réaction PCR dite interne peut être réalisée en utilisant comme matrice 1 µl de produit PCR de la réaction externe et en utilisant un couple d'amorces compris dans le produit PCR (*cf.* amorce 5I et R8 ; **Fig. I.7**). Le protocole de 3' RLM-RACE est plus simple à mettre en œuvre, puisque l'adaptateur est fixé en même temps que l'étape de rétrotranscription. Comme pour la 5' RLM-RACE, deux amplifications consécutives par PCR (une externe puis une interne) peuvent être réalisées afin d'amplifier les cDNA présents en très faible quantité dans les extraits.

Les 5' et 3' RLM-RACE PCR ont été effectuées à partir du kit FirstChoice® RLM-RACE Kit (Invitrogen) en suivant les recommandations du fabricant.

d) *Purification des produits PCR et séquençage*

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur. Les produits de PCR purifiés ont ensuite été séquencés par le service *SupremeRun Tubes* d'Euofins Genomics.

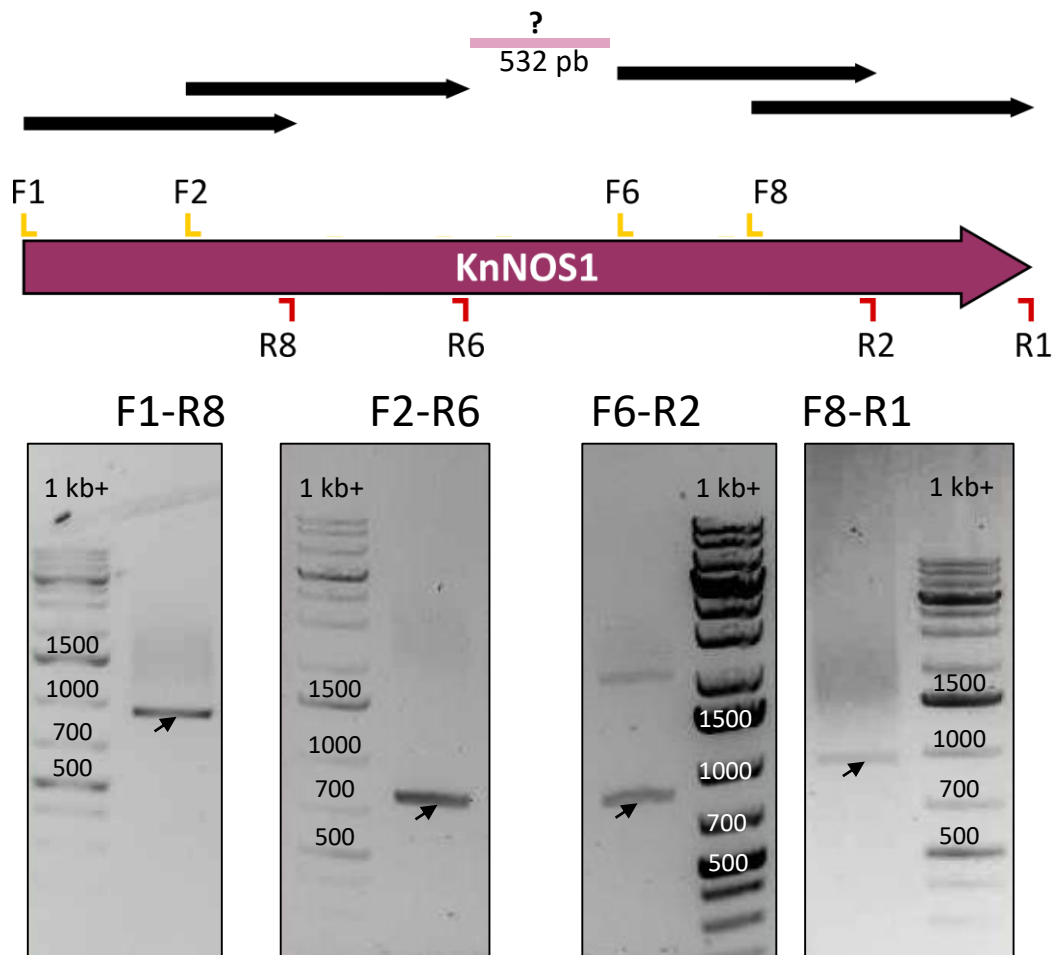


Fig. I.6. Résultat des réactions PCR utilisées pour l'obtention de fragments de l'ADNc de la KnNOS1. Les amorces sens sont représentées en jaune et les amorces antisens en rouge. Les flèches noires indiquent les bandes correspondant à la taille attendue du produit PCR. Les produits PCR séquencés sont représentés par les flèches noires au-dessus de la flèche fuchsia représentant la séquence de l'ADNc de la KnNOS1. Le rectangle rose clair représente la partie de l'ADNc de la KnNOS1 qui n'a pas encore pu être obtenue par PCR ni donc vérifiée par séquençage.

3. Obtention des modèles 3D des KnNOS

Depuis 2020, la société londonienne DeepMind a mis en ligne son algorithme de prédiction des structures 3D répondant aux exigences du CASP14 (*Critical assessment of techniques for protein structure prediction*) en obtenant un score inégalé de 92,4 % (Jumper *et al.*, 2021). AlphaFold a notamment ouvert la porte de la prédiction de structure 3D de protéines à grande échelle. Afin de modéliser la structure des NOS de *K. nitens*, nous avons utilisé l'algorithme ColabFold qui combine la recherche des séquences par homologie de type MMSeqs2 avec la modélisation des structures 3D d'AlphaFold (Mirdita *et al.*, 2022). L'avantage d'utiliser MMSeqs2 au lieu de la recherche par homologie classique utilisée par AlphaFold est le gain de temps procuré par l'utilisation de MMSeqs2, l'analyse étant jusqu'à soixante fois plus rapide (Steinegger and Söding, 2017; Mirdita *et al.*, 2019).

Pour chaque séquence, quatre modèles de structure 3D ont été établis (**Fig. I.3**). Pour chacun des modèles, AlphaFold définit une matrice de PAE (*Predicted Aligned Error*) représentée par une *heat map*. Ainsi, lorsque l'erreur sur la distance en angströms entre deux résidus est importante le repliement obtenu présente de l'incertitude, alors que lorsque l'erreur entre deux résidus est faible le repliement obtenu présente peu d'incertitude.

Les modèles 3D obtenus ont été visualisés avec Chimera (Pettersen *et al.*, 2004). Afin de comparer la structure des KnNOS à celles des NOS de mammifères, les structures des domaines oxygénases des KnNOS obtenues par modélisation AlphaFold ont été alignées avec la structure du domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus* obtenue expérimentalement (PDB : 1NOD ; Crane, 1998) *via* l'outil MatchMaker de Chimera (Meng *et al.*, 2006). La conservation des amino-acides à chaque position dans le domaine oxygénase des KnNOS par rapport au domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus* (1NOD) a été calculée *via* AL2CO dans Chimera.

4. Reconstruction phylogénétique des NOS chez les organismes photosynthétiques

Les séquences NOS des algues utilisées ont été répertoriées dans de précédentes études (Di Dato *et al.*, 2015; Jeandroz *et al.*, 2016; Santolini *et al.*, 2017). De nouvelles séquences de NOS ont également été extraites des bases de données chez différentes espèces : *Mesostigma viride*, *Chlorokybus atmophyticus*, *Edaphochlamys debaryana*, *Chlamydomonas incerta* et *Chlamydomonas scholesseri*. Les protéines NOS ont été alignées avec ClustalW et l'arbre

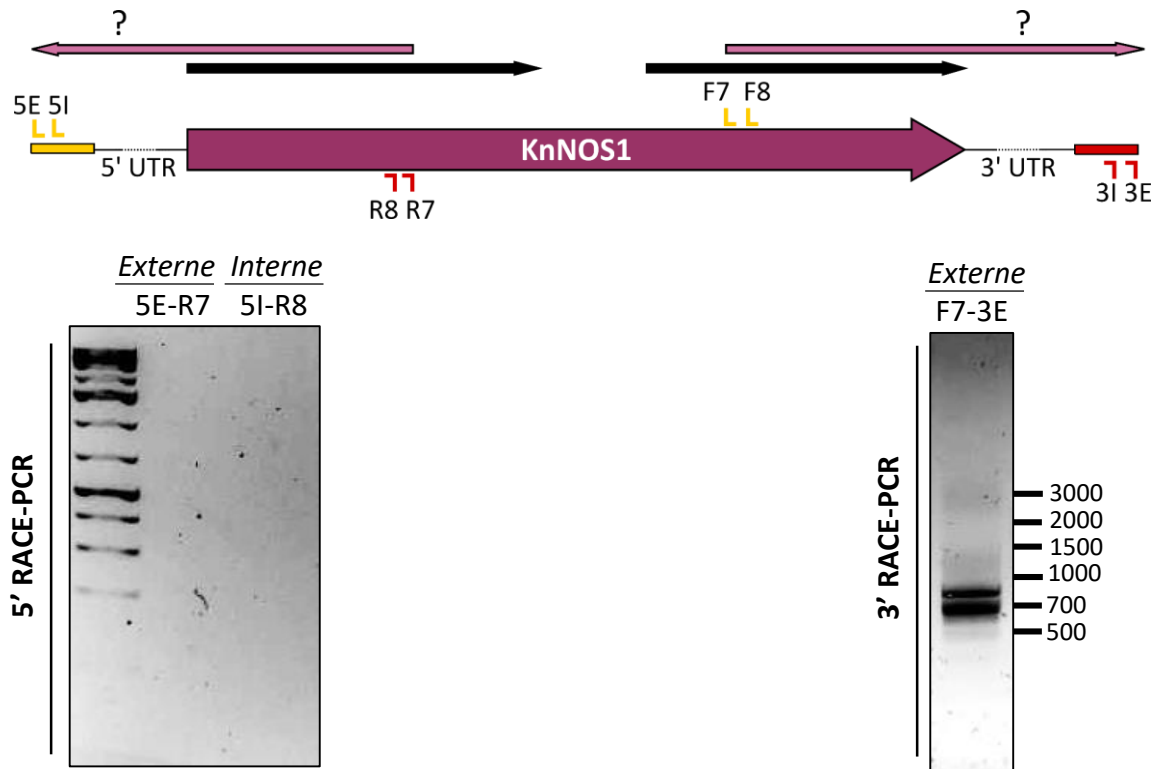


Fig. I.7. Résultats des réactions 5' et 3' RACE-PCR. Dans un premier temps les adaptateurs ont été fixés au extrémité 5' (rectangle jaune) et 3' (rectangle rouge). Dans un second temps, les PCR externes ont été réalisées avec les amorces spécifiques de l'ADNc (R7 pour l'extrémité 5' et F7 pour la 3') et celles spécifiques des adaptateurs fournis par le kit (5E pour l'extrémité 5' et 3E pour l'extrémité 3'). Une deuxième PCR dite interne a été effectuée depuis le produit PCR de réaction externe avec les amorces spécifiques de l'ADNc (R8 pour l'extrémité 5' et F8 pour l'extrémité 3') et celles spécifiques des adaptateurs (5I pour l'extrémité 5' et 3I pour l'extrémité 3'). Les flèches noires épaisses représentent les séquences déjà vérifiées de l'ADNc de la KnNOS1, les flèches rose pâle représentent les séquences qui pourraient être obtenues par 5' et 3'-RACE.

phylogénétique a été construit par la méthode du maximum de vraisemblance en utilisant MEGA (Tamura *et al.*, 2021). Une analyse *bootstrap* a été réalisée (n = 500). Tous les nœuds dont les valeurs de *bootstrap* étaient inférieures à 50 % ont été regroupés en polytomies.

C. Résultats

Dans une précédente étude menée au laboratoire, *K. nitens* a été identifiée comme une des rares Streptophytes possédant une séquence codante pour une protéine de type NOS (Jeandroz *et al.*, 2016). Dans cette étude, la séquence de la NOS d'*Ostreococcus tauri* (OtNOS) a servi de requête à un BLASTp (*protein-protein Basic Local Alignment Search tool*) contre la base de données du NCBI et a permis d'identifier une protéine de type NOS codée par le gène kfl00076_0350 avec une *E-value* de 2^{-175} , un recouvrement de 96 % et un pourcentage d'identité de 35,85 %. Afin d'affiner cette analyse, un nouveau BLASTp a été réalisé en utilisant uniquement la partie oxygénase de la OtNOS comme requête. Plusieurs séquences ont ainsi été identifiées chez *K. nitens* : i) une séquence protéique de 1099 acides aminés codée par le gène kfl00076_0350, annotée *nitric oxide synthase* (appelée KnNOS1 dans notre travail), ii) une seconde séquence protéique de 1205 acides aminés, codée par le gène kfl00646_0015 (appelée KnNOS2), iii) une séquence plus courte de 152 acides aminés codée par le gène kfl00646_0010, appelée N-oxy (**Fig. I.4**). La KnNOS1 présente une architecture classique de NOS de mammifères, soit un domaine oxygénase suivie d'un domaine réductase alors que la KnNOS2 présente une grande extension dans la partie C-terminal qui contient un motif ankyrine et un domaine globine (**Fig. I.4** ; Chatelain *et al.*, 2021). La séquence N-oxy est trop courte pour correspondre à une protéine de type NOS, il est toutefois intéressant de noter que le gène codant la N-oxy est situé en amont du gène codant pour la KnNOS2 sur le même *scaffold* (646). Nous avons ainsi étudié plus en détail les séquences nucléotidiques et protéiques des KnNOS1 et 2.

1. La protéine KnNOS1 : une architecture canonique de NOS

a) Vérification de la séquence nucléotidique de l'ADNc de la KnNOS1

Le génome de *K. nitens* a été séquencé une seule fois et un deuxième séquençage a été réalisé afin d'identifier le transcriptome de *K. nitens* (Hori *et al.*, 2014). L'annotation du génome ainsi obtenue reste prédictive. Il est donc important de vérifier par biologie moléculaire les

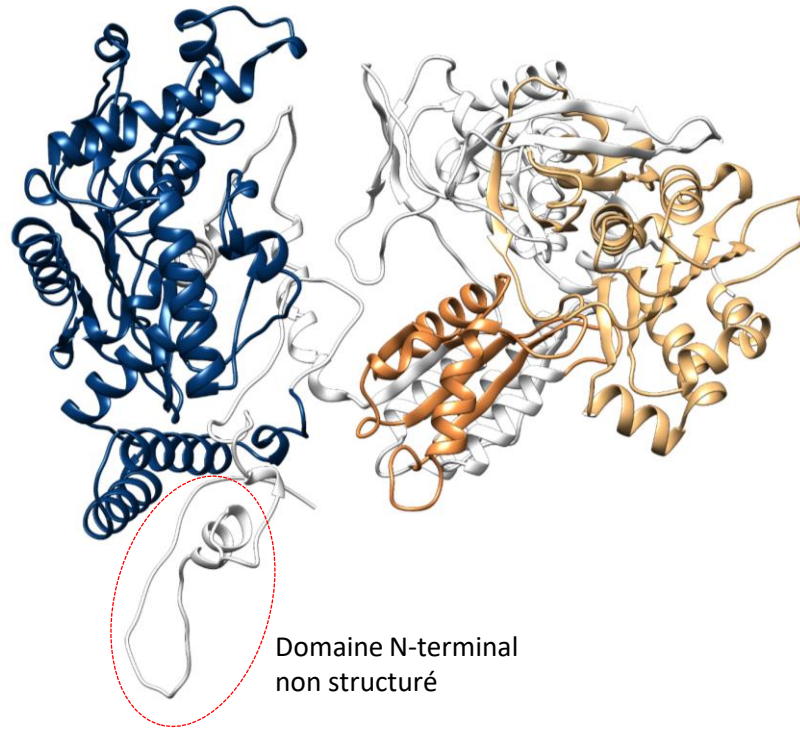
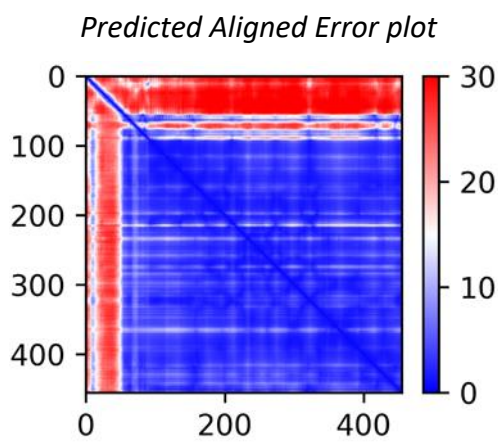
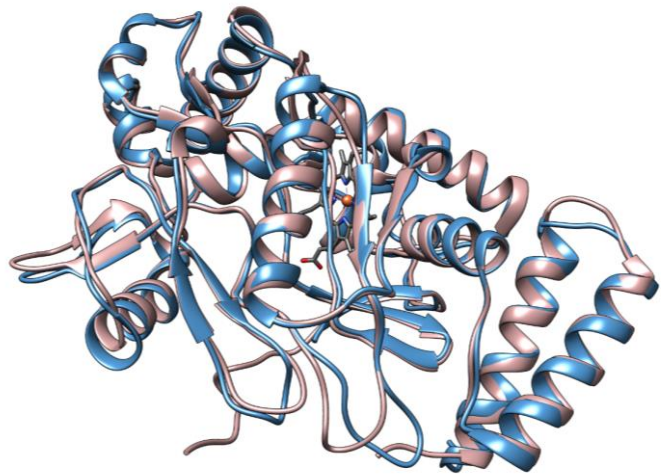
A**B****C**

Fig. 1.8. **A)** Modèle AlphaFold de la protéine KnNOS1. Le domaine oxygénase est représenté en bleu foncé, le domaine FMN en orange, le domaine FNR en orange clair. **B)** Représentation graphique de la prédiction d'erreur d'alignement (*Predicted Aligned Error* ; PAE) calculée par AlphaFold pour la modélisation du domaine oxygénase de la KnNOS1, le rouge correspond à un taux d'erreur important dans la modélisation 3D effectuée par AlphaFold alors que le bleu représente un taux d'erreur faible. **C)** Modèle AlphaFold du domaine oxygénase de la KnNOS1 (bleu clair), aligné avec la structure PDB 1 NOD (rose pâle ; domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus*). L'hème de la 1NOD est représenté en gris.

séquences disponibles dans la base de données de *K. nitens*¹. Afin d'obtenir la séquence codante de la *KnNOS1* nous avons réalisé des RT-PCR avec le couple d'amorces F1-R1 permettant d'amplifier l'ADNc pleine longueur de la *KnNOS1* (**Fig. I.4 ; Tab I.1**). Selon les prévisions de la base de données du projet *K. nitens*, l'ADNc de la *KnNOS1* présenterait une taille de 3,3 kb. Aucune des polymérases testées ne nous a permis d'amplifier l'ADNc pleine longueur de la *KnNOS1* (**Fig. I.5**). Bien que les enzymes sélectionnées présentent des capacités d'amplification supérieure à la taille de l'ADNc de la *KnNOS1*, il se peut que la matrice d'amplification soit trop complexe pour synthétiser 3,3 kb en une seule réaction. Afin de limiter la taille de la séquence à amplifier nous avons utilisé des couples d'amorces intermédiaires (**Tab.I.1 ; Fig.I.2**). Toutes les PCR intermédiaires ont été réalisées avec l'enzyme Phire II (ThermoFisher), cette enzyme ayant donné les meilleurs résultats (elle a notamment permis l'obtention de fragment d'une taille de 950 pb, résultats non montrés). Des réactions utilisant les couples d'amorces F1-R8, F2-R6, F6-R2 et F8-R1 ont été réalisées et les produits PCR ont été séquencés (**Fig. I.6**). Les résultats de séquençage ont confirmé la séquence de l'ADNc présent dans la base de données. Seulement 532 pb entre les amorces R6 et F6 n'ont pu être amplifiées malgré les différents couples d'amorces utilisés (F5-R4, F3-R5, F4-R4, F3-R4 ; **Fig. I.2 ; Tab I.1 ; résultat non montré**).

Lors du séquençage du génome et du transcriptome de *K. nitens*, sur les 17055 gènes prédits¹, seulement 9100 gènes ont été prédits avec les séquences 5'UTR et 3'UTR correspondantes. Les séquences 5'UTR et 3'UTR du gène *KnNOS1* étant inconnues, nous avons réalisé des expériences de 5' et 3' RLM-RACE afin d'identifier les séquences 5'UTR et 3'UTR associées à la *KnNOS1*. La 5' RACE-PCR ne nous a pas permis d'amplifier la séquence 5'UTR (**Fig. I.7**). La 3' RACE-PCR a mené à l'amplification d'un fragment d'environ 800 pb. Cependant, il est peu probable que ce produit PCR corresponde à l'amplicon F7-3E. En effet, comme il y a déjà 1000 pb entre l'amorce F7 et le codon stop de l'ADNc de la *KnNOS1*, nous aurions dû obtenir un produit PCR de taille supérieure à 1000 pb. Après le séquençage de ce fragment, il a été confirmé qu'il ne s'agissait pas d'ADNc de *K. nitens*.

¹ http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/

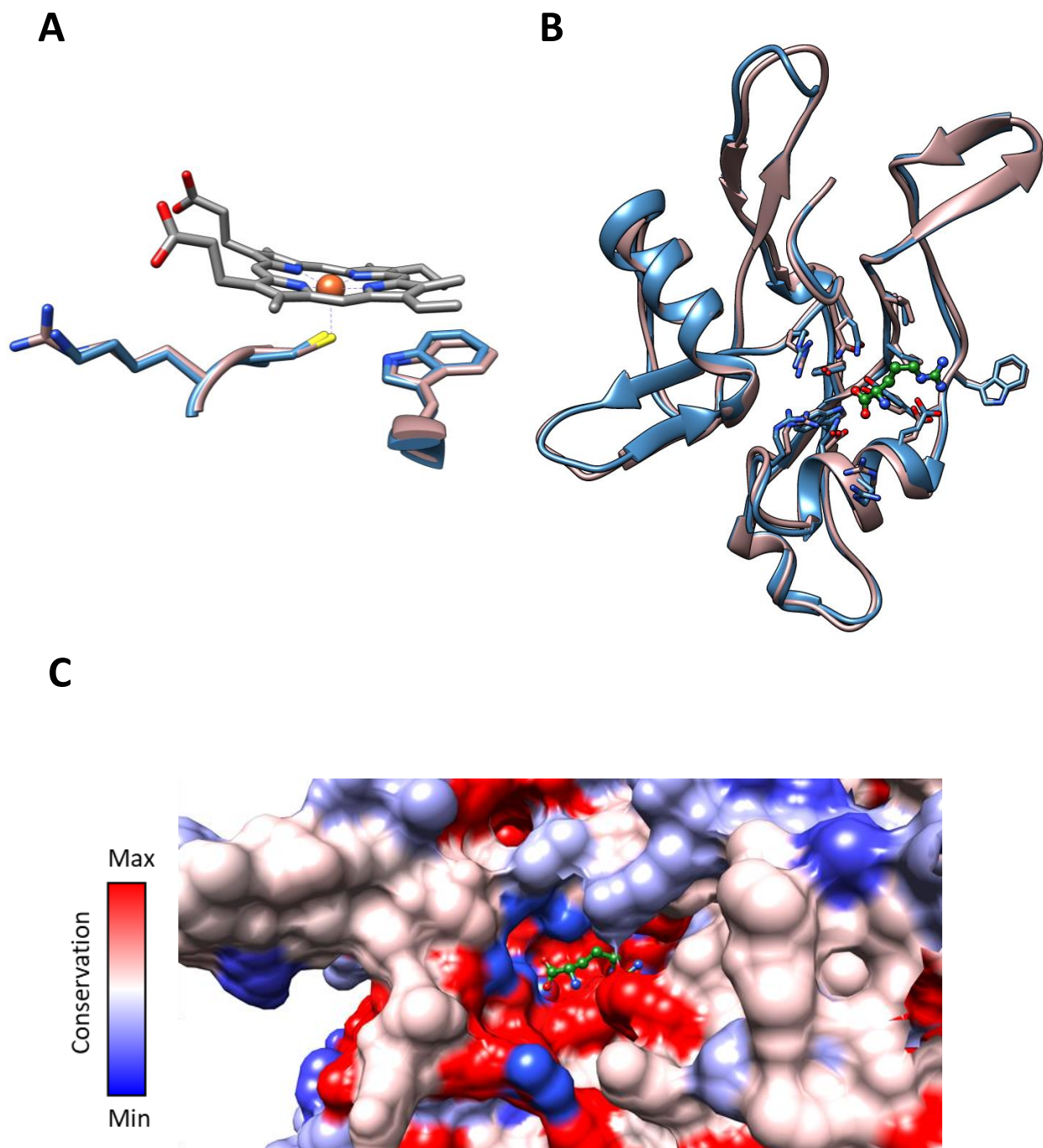


Fig. 1.9. Détails des sites de fixation **A)** de l'hème (gris) et **B)** de la L-arginine (vert) sur l'alignement des domaines oxygénase du modèle 3D de la KnNOS1 (bleu clair) et de la représentation PDB de la 1NOD (rose pâle). **C)** Conservation des acides aminés au niveau du site de fixation de la L-arginine (vert) du modèle 3D de la KnNOS1 par rapport au domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus*. Les acides aminés conservés sont représentés en rouge sur le modèle 3D et ceux non conservés sont représentés en bleu.

b) Obtention des modèles 3D de la KnNOS1

La séquence nucléotidique de la *KnNOS1* ayant été en grande partie vérifiée, nous avons choisi d'étudier la structure 3D de la protéine codée par la *KnNOS1*. Depuis janvier 2022, DeepMind en collaboration avec EMBL-*European Bioinformatics Institute* ont créé une nouvelle base de donnée, AlphaFold DB², afin de rendre accessibles les modèles 3D prédits *in silico* de plus de 360 000 protéines provenant de 21 protéomes différents (Varadi *et al.*, 2022). Le génome et le transcriptome de *K. nitens* ont été déposés sur la GenBank de l'EMBL (Numéro d'accension : DF236950-DF238763). Ainsi, les modélisations 3D des protéines de *K. nitens* sont disponibles sur AlphaFold DB.

La structure 3D de la KnNOS1 a été visualisée sur Chimera et les domaines oxygénase et réductase ont été colorés respectivement en bleu et en orange (**Fig. I.8.A**). Cette organisation domaine oxygénase/domaine réductase est classiquement retrouvé chez les NOS de mammifères (Campbell *et al.*, 2014). Afin de comparer plus en détail la structure 3D prédite de la KnNOS1 à celles des NOS de mammifères, nous avons superposé la structure 3D du domaine oxygénase à celle de la iNOS de *Mus musculus* obtenue expérimentalement et disponible sur la PDB (1NOD ; Crane, 1998). Dans un premier temps, il a été nécessaire d'obtenir le modèle de la structure 3D du domaine oxygénase de la KnNOS1 seul (KnNOS1oxy ; acides aminés 1 à 455). Le modèle de prédiction 3D obtenu est relativement fiable (**Fig. I.8.B**) puisque les zones rouges, qui indiquent une plus forte incertitude, ne correspondent qu'à la partie N-ter désorganisée que l'on retrouve sur le modèle 3D de la structure entière de la KnNOS1 (**Fig. I.8.A**). Dans un second temps, la structure de la KnNOS1oxy a été superposée à la structure du domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus* (1NOD) en omettant la partie N-ter désorganisée (**Fig. I.8.C**). Les deux structures présentent une forte similarité validant le modèle proposé pour la KnNOS1oxy. Majoritairement les structures en hélices alpha et en feuillet bêta de la KnNOS1oxy et de la 1NOD se superposent parfaitement, bien qu'il n'y ait que 35,34 % d'identité entre les séquences primaires de la KnNOS1oxy et de la 1NOD. La iNOS de *Mus musculus* a été cristallisée avec son noyau hémique et liée à son substrat. Lorsqu'on se focalise sur l'hème de la 1NOD, les acides aminés aux alentours de l'hème, ainsi que la structure 3D, apparaissent parfaitement conservés (**Fig. I.9.A**). Par exemple, la cystéine 194 de la 1NOD, qui coordonne l'hème, est conservée chez la KnNOS1oxy (Cystéine 158). Chez les

² <https://alphafold.ebi.ac.uk/>

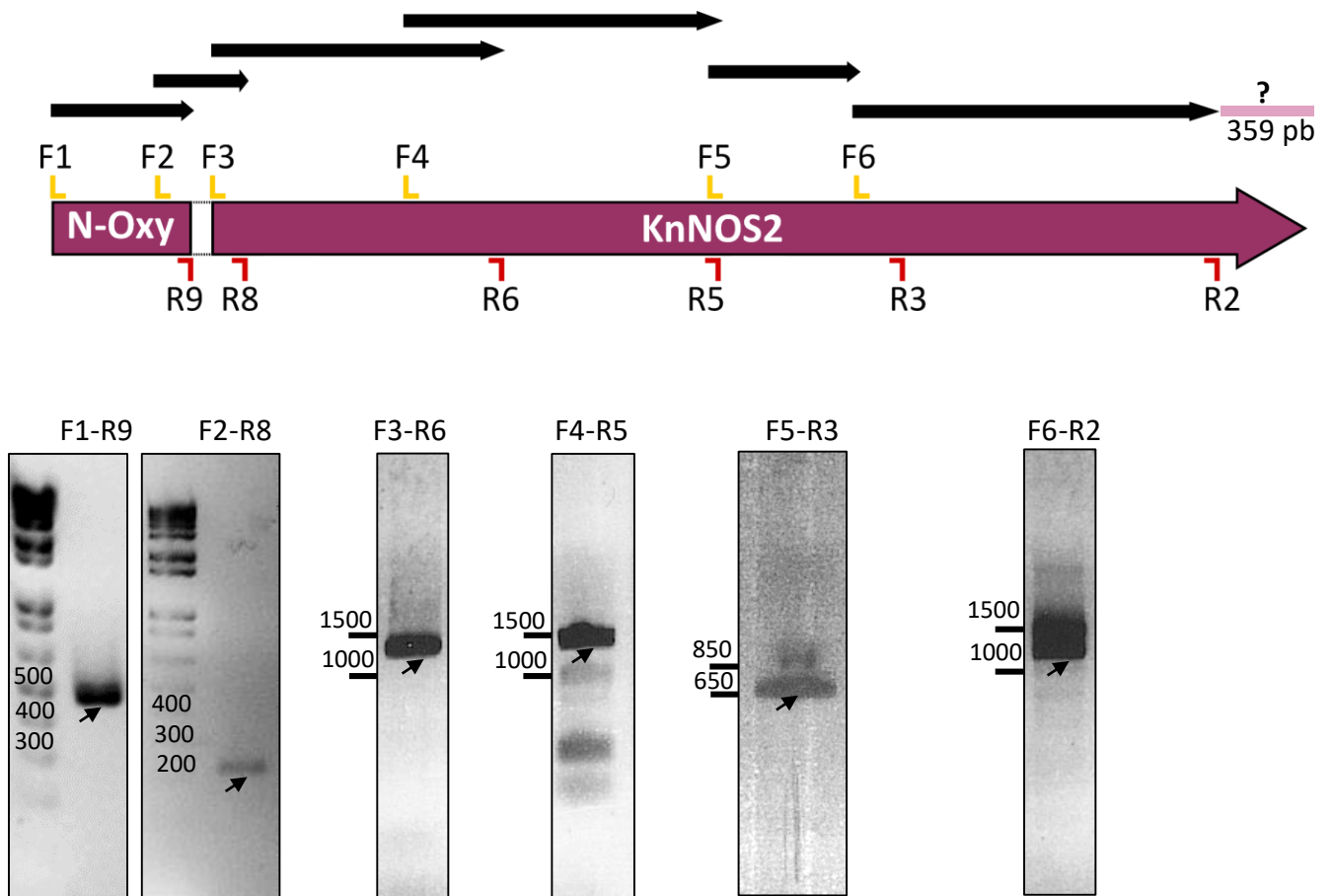


Fig. I.10. Résultat des réactions PCR menées pour l'obtention de fragments de l'ADNc de la KnNOS2. Les amorces sens sont représentées en jaune et les amorces antisens en rouge. Les flèches noires indiquent les bandes correspondant à la taille attendue du produit PCR. Les produits PCR séquencés sont représentés par les flèches noires au-dessus de la flèche fuchsia représentant la séquence de l'ADNc de la KnNOS2. Le rectangle rose clair représente la partie de l'ADNc de la KnNOS2 qui n'a pas encore pu être obtenue par PCR ni donc vérifiée par séquençage.

NOS de mammifères, la cystéine responsable de la coordination de l'hème est comprise dans le motif WRNAPRC, qui est conservée chez les NOS d'algues à l'exception de l'arginine 193 remplacée par une lysine (en position 157 pour l'algue ; **Fig. I.9.A**). La structure du site actif du substrat de la NOS, la L-arginine, est également conservée entre la 1NOD et la KnNOS1oxy (**Fig. I.9.B**). La représentation en surface de la KnNOS1oxy met bien en évidence la conservation de la poche du site actif, la prédominance de la coloration rouge confirme la conservation des acides aminés du site actif de l'enzyme entre la KnNOS1oxy et la 1NOD (**Fig. I.9.C**). La prédiction de la structure 3D de la KnNOS1 permet de supposer que la KnNOS1 pourrait coordonner un noyau hémique et fixer correctement la L-arginine. Nous pouvons ainsi supposer que la KnNOS1 possède une structure lui permettant d'être active et de produire du NO depuis son substrat la L-arginine.

2. La protéine KnNOS2 : une architecture atypique et incomplète de NOS

a) Vérification de la séquence nucléotidique de l'ADNc de la KnNOS2

Tout comme pour la *KnNOS1*, nous avons souhaité séquencer la *KnNOS2*, afin de vérifier la séquence nucléotidique disponible dans la base de données de *K. nitens*. De nouveau, nous avons rencontré des difficultés à amplifier par PCR l'ADNc pleine longueur de la *KnNOS2* (résultats non montrés). Des amorces intermédiaires ont donc été utilisées afin de pouvoir amplifier des fragments de l'ADNc de la *KnNOS2* (**Fig. I.10 ; Tab. I.1**).

Dans un premier temps, nous avons vérifié la présence de l'ADNc codant pour la N-oxy par PCR avec le couple d'amorces F1-R9 (**Fig. I.10**). La séquence du produit PCR obtenu a été déterminée par séquençage, confirmant que le produit PCR obtenu correspondait bien à l'ADNc de la N-oxy. Cependant la présence du gène de la N-oxy en amont du gène de la *KnNOS2* et la complémentarité de leurs séquences protéiques nous ont amenés à supposer qu'il ne s'agissait en réalité que d'un seul gène, codant pour une seule protéine. Une PCR réalisée sur l'ADNc de *K. nitens* avec le couple d'amorces F2-R8 nous a permis de confirmer cette hypothèse, puisque nous avons amplifié la fin de l'ADNc N-oxy ainsi que le début de l'ADNc de la *KnNOS2* dans la même réaction (**Fig. I.10**). Les réactions de PCR réalisées avec les couples d'amorces F3-R6, F4-R5, F5-R3 et F6-R2 ont fonctionné et les produits PCR obtenus ont été séquencés afin de confirmer la séquence de l'ADNc de la *KnNOS2* (**Fig. I.10**). Seules les

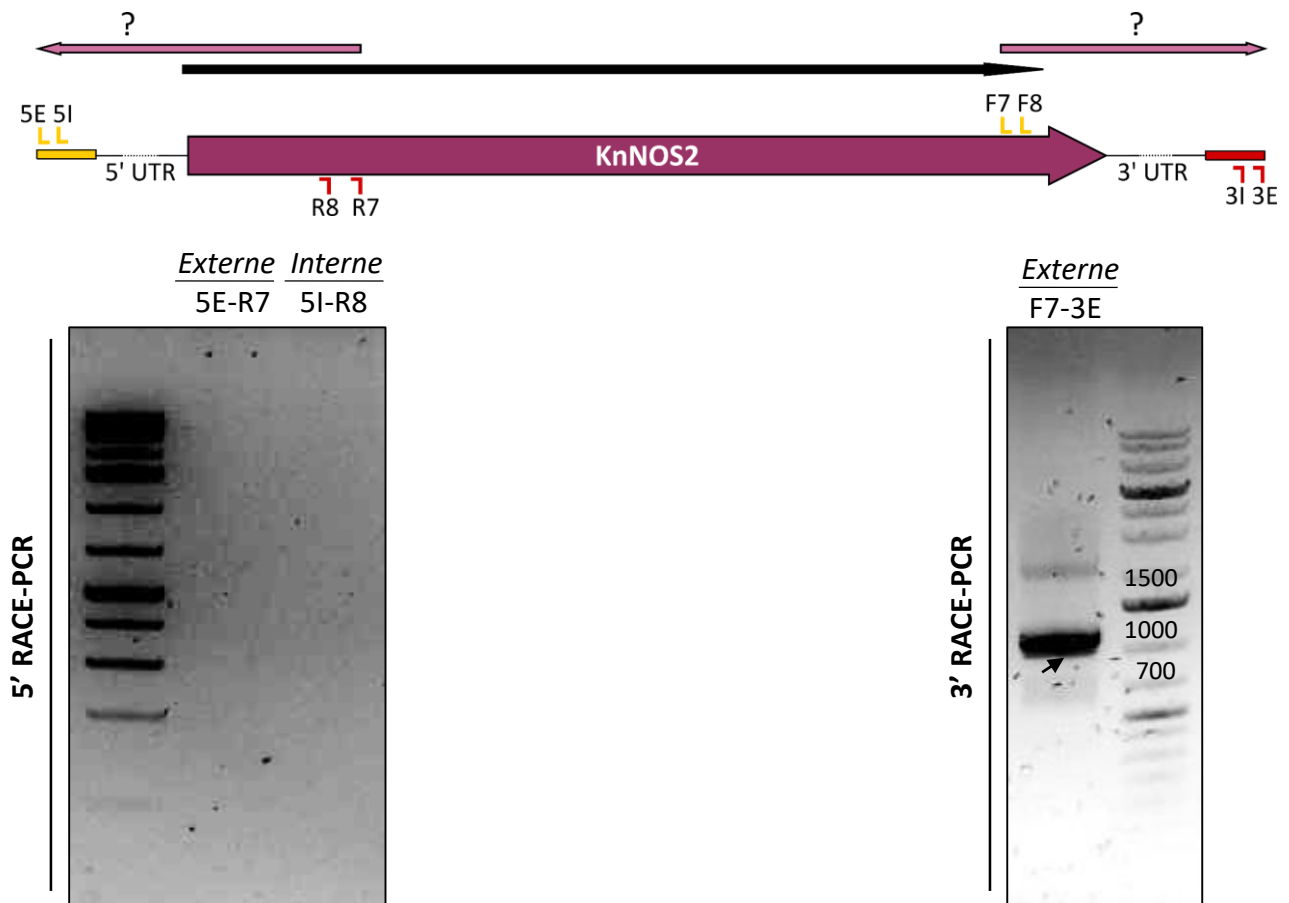


Fig. I.11. Résultats des 5' et 3' RACE-PCR. Dans un premier temps les adaptateurs ont été fixés au extrémité 5' (rectangle jaune) et 3' (rectangle rouge). Dans un second temps, les PCR externes ont été réalisées avec les amorces spécifiques de l'ADNc (R7 pour l'extrémité 5' et F7 pour la 3') et celles spécifiques des adaptateurs fournis par le kit (5E pour l'extrémité 5' et 3E pour l'extrémité 3'). Une deuxième PCR dite interne a pu être réalisée depuis le produit PCR de réaction externe avec les amorces spécifiques de l'ADNc (R8 pour l'extrémité 5' et F8 pour l'extrémité 3') et celles spécifiques des adaptateurs (5I pour l'extrémité 5' et 3I pour l'extrémité 3'). Les flèches noires épaisses représentent les séquences déjà vérifiées de l'ADNc de la KnNOS2, les flèches rose pâle représentent les séquences qui pourraient être obtenues par 5' et 3'-RACE. La flèche noire indique la bande correspondant au produit PCR attendu pour la 3'-RACE PCR.

359 dernières paires de bases en 3' de l'ADNc de la *KnNOS2* n'ont pas pu être amplifiées par PCR.

Dans un second temps, comme pour la *KnNOS1*, nous avons réalisé des expériences de 5' et 3' RLM-RACE afin d'identifier les séquences 5'UTR et 3'UTR associées à la *KnNOS2*. De nouveau, la réaction de 5' RACE-PCR n'a pas fonctionné (**Fig. I.11**). Cependant, la réaction de 3' RACE-PCR a permis d'amplifier un fragment d'environ 1000 pb (**Fig. I.11**). Contrairement à la *KnNOS1*, le produit de PCR obtenu a migré à une taille correspondant à nos attentes puisqu'il devait avoir une taille supérieure à 450 pb. Après séquençage, il a été confirmé qu'il s'agissait de l'extrémité 3' de la *KnNOS2*. Ainsi les 352 pb de l'extrémité 3' de la *KnNOS2* qui n'avaient pas été amplifiées par PCR, ont pu être vérifiées par séquençage du produit de la 3'-RACE PCR. Nous avons également identifié la séquence en 3' UTR de la *KnNOS2* (cf. **ANNEXES**).

b) *Proposition d'un nouveau ORF pour l'ADNc de la KnNOS2*

La séquence protéique de la *KnNOS2* proposée par la base de données de *K. nitens*, codée par le gène kfl00646_0015, présentait une extrémité N-ter très courte par rapport à la *KnNOS1* ou même par rapport aux NOS de mammifères. Cette séquence ne pouvait pas correspondre à une protéine NOS active puisque la cystéine du motif WRNAPKC permettant la coordination de l'hème était absente (**Fig. I.12**). Cependant la séquence N-oxy, codée par le gène kfl00646_0010, présentait ce motif. Les expériences de RT-PCR ont permis de confirmer que les gènes kfl00646_0010 et kfl00646_0015 ne formaient en réalité qu'un seul gène (**Fig. 1.10**). Nous avons proposé un nouvel ORF du gène codant pour la *KnNOS2*, ce qui nous permet d'obtenir la séquence protéique *KnNOS2* présentée dans la **Fig. I.12**. La protéine *KnNOS2* présente une architecture atypique de NOS avec une large extension de la partie C-terminale. Une analyse des domaines protéiques conservés à l'aide de l'outil *CD-Search* du NCBI a révélé un motif ankyrine et un domaine globine dans cette extension du côté C-terminal (Marchler-Bauer *et al.*, 2011). Cette organisation structurale, de type « NOS-Globine », a précédemment été identifiée *in silico* chez l'algue verte *Gonium pectorale* (Santolini *et al.*, 2017).

c) *Obtention des modèles 3D de la KnNOS2*

A partir de la séquence protéique primaire de la *KnNOS2*, un modèle de structure 3D a été prédit *via* l'algorithme de ColabFold (**Fig. I.3**). Le modèle de la structure 3D de la *KnNOS2* a été visualisé sur Chimera et les domaines oxygénase et réductase ont été colorés respectivement en bleu et en orange, alors que le domaine ankyrine a été coloré en bleu clair et le domaine

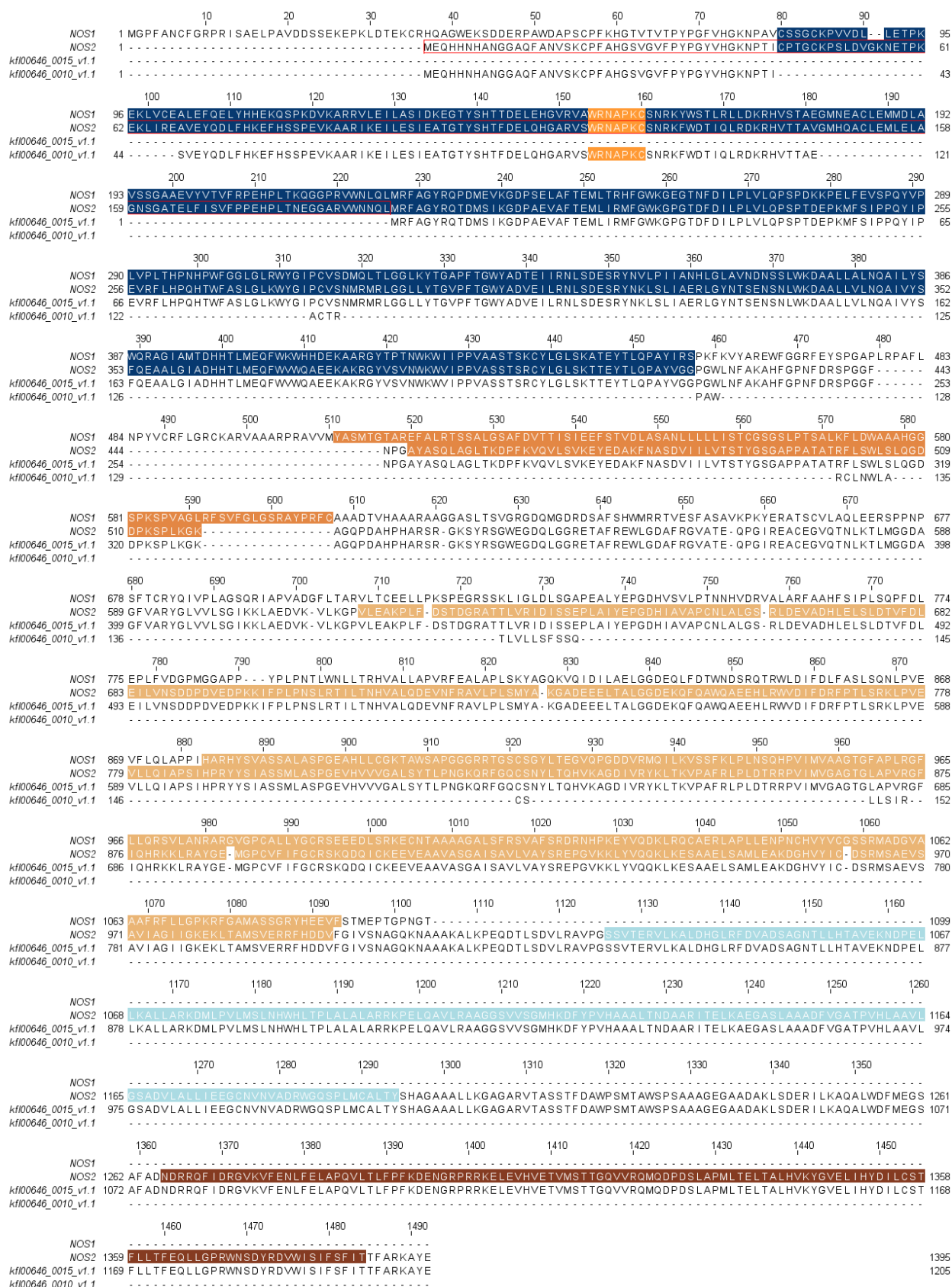


Fig. I.12. Alignement des séquences protéiques de la KnNOS1 (NOS1), du nouvel ORF de la KnNOS2 (NOS2) et des séquences de la KnNOS2 (kfi00646_0015_v1.1) et de la N-oxy (kfi00646_0010_v1.1) présentes dans la base de données de *K. nitens*. Les domaines oxygénase sont représentés en bleu foncé, les domaines FMN en orange, les domaines FNR en orange clair, le domaine ankyrine en bleu clair et le domaine globine en marron. La séquence encadrée en rouge correspond à l'addition de la séquence N-oxy dans l'ORF de la KnNOS2. Le motif de liaison à l'hème WRNAPKC est représenté en orange vif.

globine en marron (**Fig. I.13.A**). Comme la KnNOS1, la KnNOS2 possède les deux domaines classiques retrouvés chez les protéines NOS : le domaine oxygénase et le domaine réductase. Le domaine globine présente une structure caractéristique des globines de la famille T, composé de six hélice alpha, avec la présence de deux résidus histidine distaux et proximaux permettant la coordination du noyau hémique (**Fig. I.13.A** ; Vázquez-Limón *et al.*, 2012). Comme pour la KnNOS1, nous avons superposé la structure 3D du domaine oxygénase à celle de la iNOS de *Mus musculus* obtenue expérimentalement, disponible sur la PDB (1NOD ; Crane, 1998). Dans un premier temps, il a été nécessaire d'obtenir le modèle de la structure 3D du domaine oxygénase de la KnNOS2 seul (KnNOS2oxy ; acide aminés 1 à 421). Le modèle de prédiction 3D obtenu présente très peu d'incertitude puisque la majorité du graphique de PAE est bleu (**Fig. I.13.B**). La séquence N-ter de la KnNOS2 étant plus courte que celle de la KnNOS1, nous ne retrouvons pas dans le graphique PAE la zone rouge correspondant à l'incertitude dans le repliement de la partie N-terminale désorganisée. Dans un second temps, les structures des KnNOS2oxy et 1NOD ont été superposées. De nouveau, les deux structures présentent une forte similarité bien qu'il n'y ait que 35,10 % d'identité entre les séquences primaires de la KnNOS2oxy et de la 1NOD, avec des différences présentes principalement dans les régions désorganisées (**Fig. I.13.C**). Comme pour la KnNOS1, le motif WRNAPKC est retrouvé avec la cystéine 124 qui pourrait permettre la coordination de l'hème (**Fig. I.14.A**). La structure du site de fixation de la L-arginine présente également une forte similarité entre la KnNOS2oxy et la 1NOD avec la conservation des acides aminés nécessaires à la fixation du substrat, notamment l'arginine 375 de la 1 NOD, conservée chez la KnNOS2oxy par l'arginine 308 (Cinelli *et al.*, 2020 ; **Fig. I.14.B**). La représentation en surface de la poche du site actif de la KnNOS2oxy confirme de nouveau la conservation des acides aminés du site actif de l'enzyme entre la KnNOS1oxy et la 1NOD (**Fig. I.14.C**). La prédiction du modèle 3D de la KnNOS2oxy permet de valider la viabilité de la séquence protéique proposée ci-dessus (*cf.* **CHAPITRE I – Résultat.2.b**). Bien que la KnNOS2 présente une structure atypique avec l'adjonction d'un domaine globine en C-terminale, la structure de son domaine oxygénase laisse supposer que cette enzyme possède une structure lui permettant d'être active et de produire du NO depuis son substrat la L-arginine.

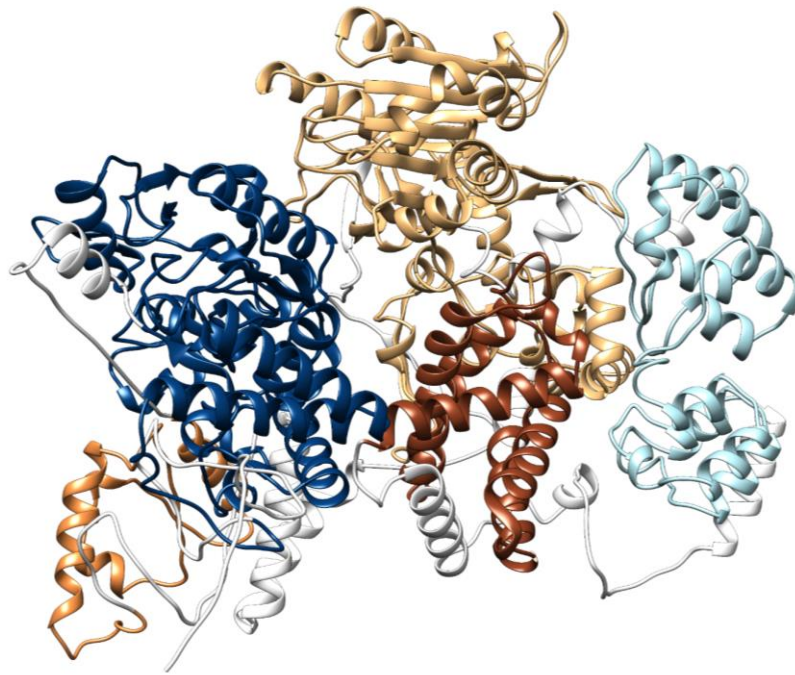
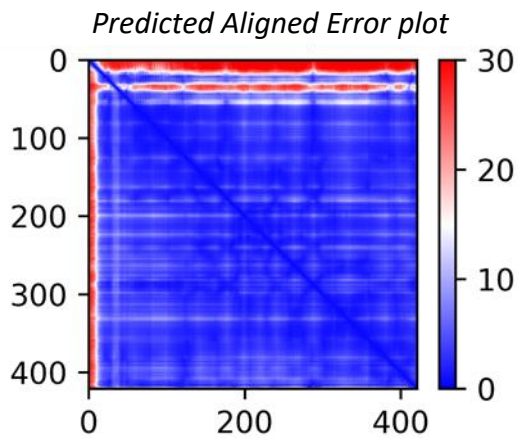
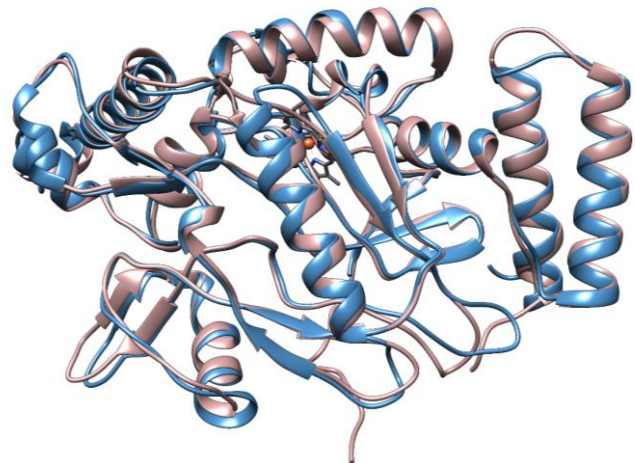
A**B****C**

Fig. I.13. **A)** Modèle AlphaFold de la protéine KnNOS2. Le domaine oxygénase est représenté en bleu foncé, le domaine FMN en orange, le domaine FNR en orange clair, les répétitions ankyrine en bleu clair et le domaine globine en marron. **B)** Représentation graphique de la prédiction d'erreur d'alignement (*Predicted Aligned Error* ; PAE) calculé par AlphaFold pour la modélisation du domaine oxygénase de la KnNOS2. Le rouge correspond à un taux d'erreur important dans la modélisation 3D effectuée par AlphaFold alors que le bleu représente un taux d'erreur faible. **C)** Modèle AlphaFold du domaine oxygénase de la KnNOS2 (bleu clair), aligné avec la structure PDB 1 NOD (rose pâle ; domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus*). L'hème de la 1NOD est représenté en gris.

3. Diversité phylogénétique des NOS chez les organismes photosynthétiques et place des KnNOS dans cette phylogénie

Comme indiqué précédemment, des NOS ont été identifiées chez plusieurs algues au cours des dernières années (Jeandroz *et al.*, 2016; Santolini *et al.*, 2017). Plusieurs NOS d'algues présentent une structure atypique avec notamment l'adjonction d'un domaine globine soit à l'extrémité N-terminale de la protéine ou à l'extrémité C-terminale comme pour la KnNOS2. Afin d'étudier l'évolution des NOS et des différentes organisations chimériques de NOS-Globine ou Globine-NOS, un arbre phylogénétique des protéines NOS a été construit (**Fig. I.15** ; cf. article scientifique n°3 **ANNEXES**). Nous remarquons que les NOS sont retrouvées dans la lignée verte (Streptophytes et Chlorophytes) mais aussi chez les algues rouges, les diatomées, les dinoflagellés et les algues brunes. Nous notons également plusieurs divergences entre la phylogénie des organismes photosynthétiques et celle déduite des protéines NOS. Par exemple, les NOS des Chlorophytes ne sont pas regroupées ensemble, ou encore la lignée verte (Streptophytes et Chlorophytes) ne forme pas un groupe monophylétique, contrairement à la phylogénie végétale, puisque plusieurs NOS de diatomées et d'algues rouges appartiennent aux mêmes clades. Il est également intéressant de noter que les deux KnNOS sont regroupées, la KnNOS2 n'étant pas apparentée aux autres NOS-globines trouvées chez *Edaphochalamys debaryana* et chez les deux espèces de *Chlamydomonas*. *A contrario*, la Globine-NOS présente chez *Skeletonema costatum* (n°2), n'est pas regroupée avec l'autre NOS présente chez *S. costatum* (n°1). En effet, la Globine-NOS de *S. costatum* est regroupée avec la NOS de *Pseudo-nitzschia multistriata* qui présente également une architecture Globine-NOS.

D. Discussion et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons analysé les séquences et les structures protéiques des NOS de *K. nitens* ce qui nous a permis d'émettre des hypothèses quant à leur fonction et leur évolution.

Le génome de *K. nitens* a été séquencé en 2014 (Hori *et al.*, 2014). Cependant, comparativement au génome d'autres organismes eucaryotes modèles comme celui de l'homme, de l'arabette ou encore de la levure, le génome de *K. nitens* n'a été séquencé qu'une fois et son transcriptome qu'une seule fois également, son annotation reste à améliorer. Depuis les années 2000, le nombre de génomes séquencés s'accroît de façon exponentielle.

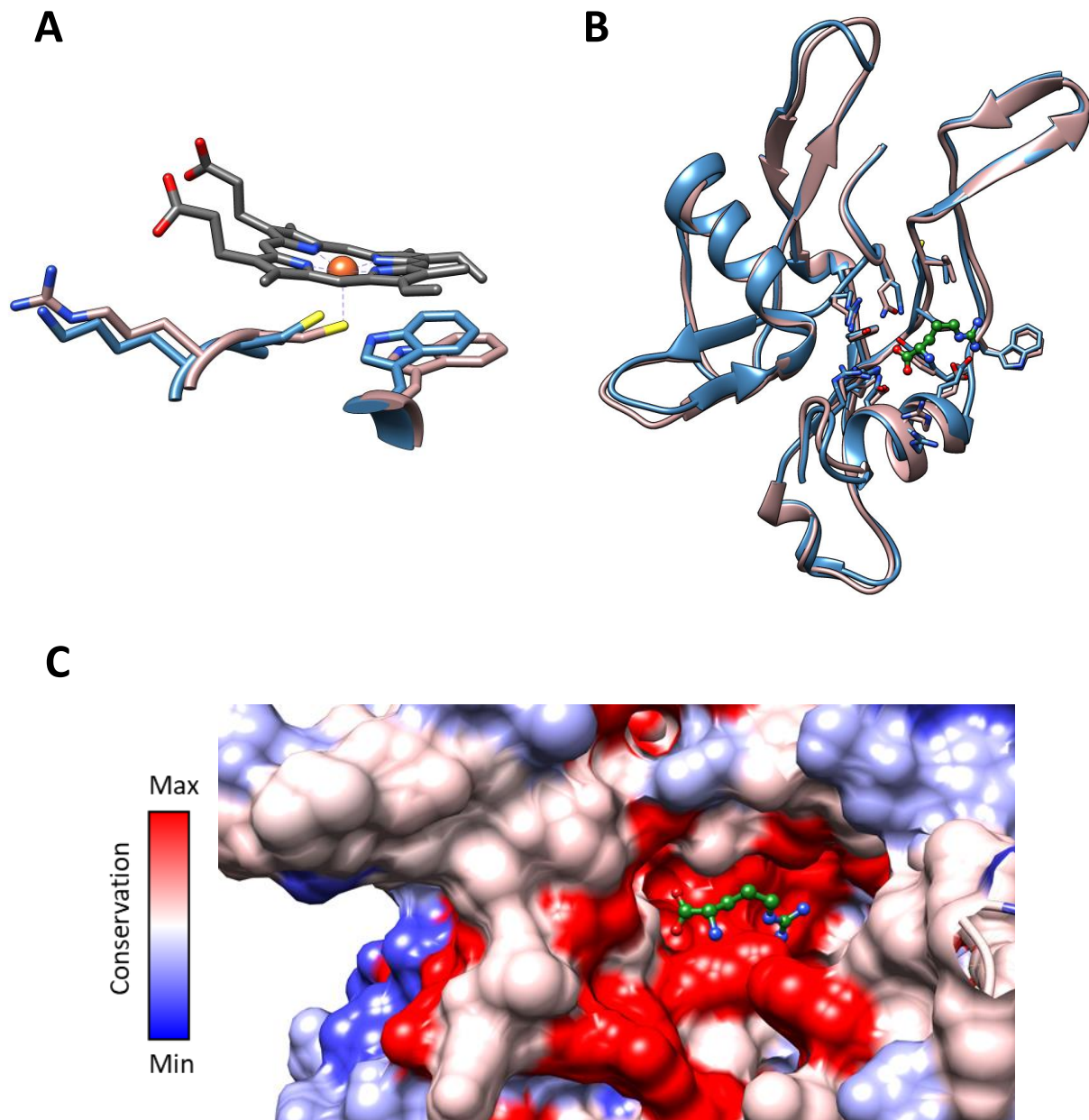


Fig. I.14. Détails des sites de fixation **A)** de l'hème (gris) et **B)** de la L-arginine (vert) sur l'alignement des domaines oxygénase du modèle 3D de la KnNOS2 (bleu clair) et de la représentation PDB de la 1NOD (rose pâle). **C)** Conservation des acides aminés au niveau du site de fixation de la L-arginine (vert) du modèle 3D de la KnNOS2 par rapport au domaine oxygénase de la iNOS de *Mus musculus*. Les acides aminés conservés sont représentés en rouge sur le modèle 3D et ceux non conservés sont représentés en bleu.

Le traitement de toutes les données de génome accumulées a nécessité une automatisation de l'annotation. Cependant, même en utilisant les meilleurs algorithmes de prédiction, des erreurs dans l'annotation proposée restent présentes et plusieurs séquençages sont nécessaires pour arriver à une version définitive (Stein, 2001; Salzberg, 2019). En effet, lorsqu'un génome n'est séquençé qu'une ou deux fois, des erreurs telles que l'introduction de codons stops erronés ou de décalages du cadre de lecture au milieu d'un gène sont possibles. Les logiciels d'annotation ne pouvant pas toujours résoudre ce type d'erreur, il est alors nécessaire de réannoter les gènes concernés sur la base de nouveaux séquençages partiels (Salzberg, 2019). Pour ces raisons, nous avons vérifié les deux séquences nucléotidiques des KnNOS par RT-PCR et séquençage des produits d'amplification.

Les ADNc pleine longueur des KnNOS n'ont cependant pas pu être amplifiés. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les difficultés d'amplification des ADNc pleine longueur des KnNOS. Par exemple, l'instabilité de l'ARNm des KnNOS peut rendre difficile son amplification par PCR et sa détection. En effet, l'ARNm de la iNOS est indétectable en absence de traitement avec des cytokines, en partie en raison de son instabilité (de Vera *et al.*, 1996; Linn *et al.*, 1997). L'instabilité de l'ARNm de la iNOS des mammifères est contrôlée par la région 3' UTR et particulièrement par la présence de motifs redondants AUUUA et AUUUUA (motifs ARE : *Adenylate/uridylate-rich elements*) déjà connus pour déstabiliser l'ARNm de certains proto-oncogènes ou encore de facteurs de transcription (Chen and Shyu, 1995; Pautz *et al.*, 2010). En effet, la stimulation de cellules humaines avec des cytokines conduit à la fixation de la protéine HuR sur les motifs ARE de la région 3' UTR de l'ARNm de la iNOS afin de le stabiliser et de permettre la traduction de la protéine iNOS. En absence de stimuli, c'est la protéine KSRP qui vient se fixer sur ces motifs, ce qui conduit au recrutement de la machinerie de dégradation de l'ARNm (Rodriguez-Pascual *et al.*, 2000). Dans la séquence 3' UTR de la KnNOS2 identifiée par 3' RACE-PCR, nous avons identifié un motif AUUUA distant d'environ 530 pb du codon stop. Dans les données génomiques de *K. nitens* nous avons également retrouvé des motifs AUUUA et AUUUUA en 3' du gène codant pour la KnNOS1, respectivement distant de 280 pb et 600 pb du codon stop du gène de la KnNOS1. Cependant, les régulations transcriptionnelles *via* les motifs ARE ont été décrites uniquement chez les mammifères (Gutiérrez *et al.*, 1999). Bien que le rôle de ces motifs chez les organismes photosynthétiques n'ait pas été démontré, les séquences 3' UTR chez les plantes jouent également un rôle dans

Groupes taxonomiques

- Chlorophyte
- Streptophyte
- Algue rouge
- Algue brune
- Diatomées
- Dinoflagellés
- Champignon
- Metazoaires

NOS Structure

- NOS Domaine oxygénase-réductase
- G Domaine globine

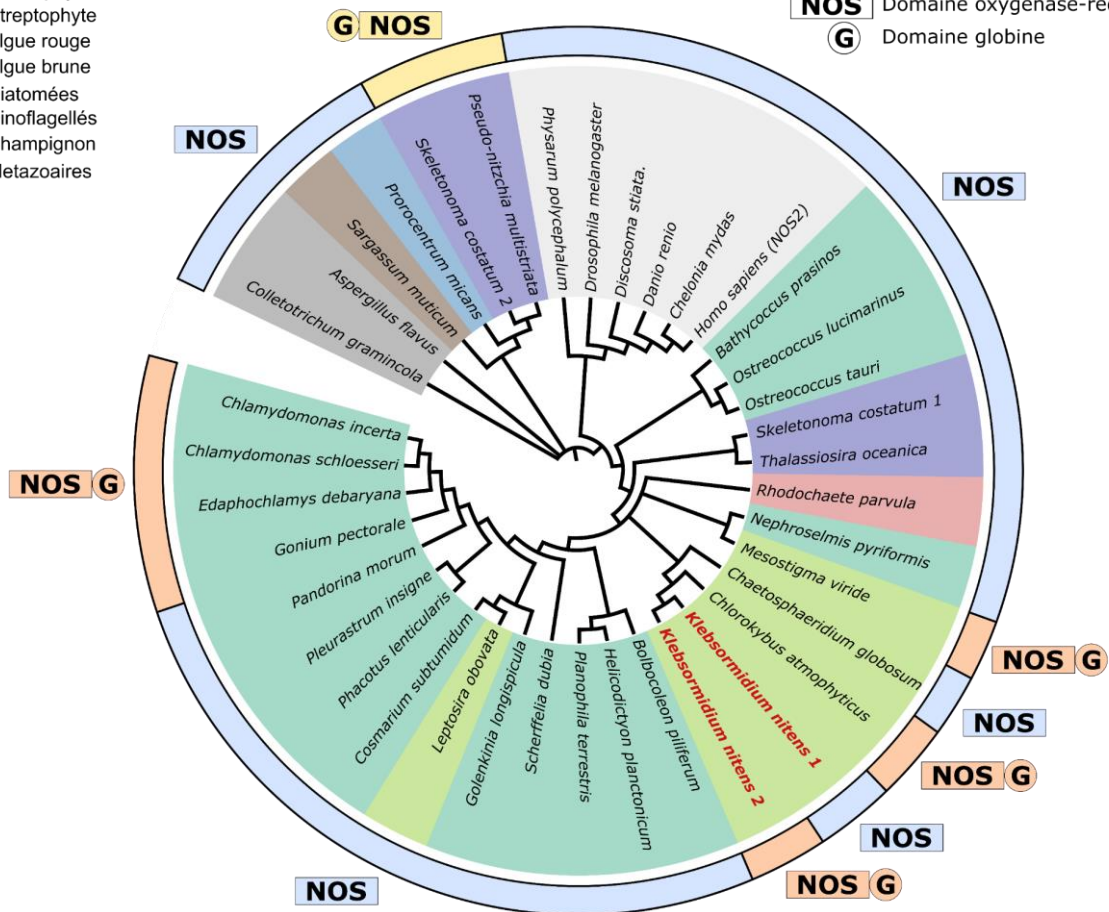


Fig. 1.15. Reconstruction phylogénétique des protéines NOS. Les séquences NOS des algues ont été extraites de bases de données (cf. Santolini *et al.*, 2017). Les protéines NOS ont été alignées avec ClustalW et l'arbre phylogénétique a été construit par la méthode du maximum de vraisemblance en utilisant MEGA. Une analyse *bootstrap* a été réalisée en utilisant 500 répliques. Tous les nœuds dont les valeurs *bootstrap* étaient inférieures à 50 % ont été regroupés en polytomies. L'organisation des domaines protéiques est représentée autour de l'arbre phylogénétique. Les étiquettes orange et jaune indiquent les structures chimériques NOS-Globine (orange) et Globine-NOS (jaune).

la stabilité des ARNm notamment en fonction de leur taille, puisqu'il a été montré que les séquences 3' UTR de plus de 300 nucléotides induisent une instabilité de l'ARNm (Green, 1993; Schwartz *et al.*, 2006). Il est possible que les motifs ARE aient le même impact sur la stabilité de l'ARNm des espèces photosynthétiques. En effet, ces motifs sont fortement représentés dans les génomes et les séquences 3' UTR de *A. thaliana*, *Oryza sativa* et *Zea mays* (Satish and Panwar, 2020). De plus, il a été montré que les transcrits de gènes rapporteurs contenant des motifs ARE dans leur 3' UTR sont dégradés plus rapidement dans les cellules de tabac transformées de manière stable, et présentent une abondance moins élevée dans les plants de tabac transgéniques par rapport aux constructions témoins (Ohme-Takagi *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1999). La voie de dégradation des ARNm médiée par les motifs ARE pourrait ainsi être conservée chez les organismes photosynthétiques, dont les algues et *K. nitens*. La présence de ces motifs en 3' des gènes codant pour les KnNOS permet de supposer que, comme les ARNm des iNOS de mammifères, les ARNm des KnNOS peuvent être instables.

Une autre hypothèse de la difficulté à amplifier par PCR les ADNc pleine longueur des KnNOS serait la présence de région riche en GC. En effet, les régions des matrices riches en résidus GC ont tendance à se replier en structures secondaires complexes qui ne sont pas dénaturées. L'hybridation des amorces, et donc l'amplification de l'ADNc pleine longueur, en seront alors affectées (Green and Sambrook, 2019). L'analyse des séquences des ADNc des KnNOS1 et KnNOS2 montre que celles-ci contiennent en moyenne 62 % de GC, sachant qu'une séquence est définie comme riche en GC à partir d'un taux moyen de 65 % (Hubé *et al.*, 2005). Si nous nous focalisons sur les régions des gènes que nous avons eu le plus de mal à amplifier, soit les 532 pb de la KnNOS1 en milieu de séquence et les 600 dernières paires de bases du côté 3' de la KnNOS2, nous remarquons qu'elles sont particulièrement riches en GC, avec respectivement 67 % et 65 % de GC. Les mêmes difficultés d'amplification ont été rencontrées pour d'autres gènes au sein de l'équipe, et il se peut que le génome entier de *K. nitens* soit riche en GC. Une autre algue, la Chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*, est par ailleurs connue pour posséder un génome riche en GC (Barahimipour *et al.*, 2015). Plusieurs solutions techniques peuvent être adoptées pour améliorer l'amplification de séquence riche en GC : l'utilisation d'*enhancers* commerciaux, l'utilisation d'un protocole de *touchdown* PCR, ou encore l'addition d'additifs tels que la bêtaïne, le DTT, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou l'albumine de sérum bovin (BSA ; Green and Sambrook, 2019). Les deux tests que nous avons

réalisés, soit l'ajout d'un *enhancer* commercial fourni avec la polymérase Q5 de NEB et l'ajout de 3 % (v/v) de DMSO n'ont cependant pas permis d'améliorer l'amplification des ADNc de la KnNOS (résultats non montrés). D'autres concentrations de DMSO pourraient être envisagées afin d'améliorer l'amplification des séquences riche en GC. En effet, le gène humain du rétinoblastome nécessite une concentration de 10 % de DMSO (v/v) pour être amplifié, de même que le gène de fusion de la métallothionéine-1a de mouton, qui nécessite une concentration de DMSO entre 2 à 5 % (v/v ; Varadaraj and Skinner, 1994).

L'amplification de fragment de l'ADNc des KnNOS a toutefois permis de vérifier la séquence nucléotidique de la KnNOS1 à 84 % et la séquence de la KnNOS2 en totalité et a mené à une nouvelle annotation du gène après avoir détecté la présence du fragment codant pour la N-oxy (kfl00646_0010) sur le même ADNc que celui codant pour la KnNOS2 (kfl00646_0015). Il serait néanmoins important de confirmer ces résultats par l'obtention des ADNc pleine longueur. Dans l'optique où les conditions de réactions PCR ne pourraient pas être améliorées, une approche par des expériences haut débit, telles que le séquençage Nanopore ou encore le Ribo-seq, pourrait nous permettre de vérifier la séquence des deux KnNOS. En effet, la technique du Nanopore permettrait de séquencer directement les ARNm pleine longueur de *K. nitens* et le Ribo-seq de définir les sites de fixation des ribosomes ainsi que les codons initiateurs des ARNm précédemment séquencés (Calviello and Ohler, 2017; Workman *et al.*, 2019). Bien que nous n'ayons travaillé que sur deux gènes de *K. nitens*, cette étude a permis d'améliorer l'annotation du génome de *K. nitens*.

L'analyse des séquences primaires des protéines et des structures tridimensionnelles (3D) réalisées par le modèle de prédiction AlphaFold des deux KnNOS, et plus particulièrement de leurs domaines oxygénase, laisse supposer que leurs structures leur permettraient d'être actives et donc de produire du NO. Les séquences primaires des KnNOS, possèdent en effet certaines caractéristiques identifiées chez les NOS de mammifères (site de fixation de L-arginine, site de fixation de l'hème ...). Il faut néanmoins noter qu'elles présentent, comme chez les autres NOS d'algues décrites, certaines spécificités. Par exemple, la région en doigt de zinc, impliquée dans la dimérisation de l'enzyme chez les mammifères, présente une structure atypique de type Cys-X3-Cys, comme chez la NOS fonctionnelle d'*O. tauri* (Santolini *et al.*, 2017). Une autre spécificité a été détectée dans le motif de coordination de l'hème WRNAPRC, où l'arginine 193 est remplacée par une lysine (en position 157 pour l'algue).

Cependant, ce remplacement n'empêche probablement pas la coordination de l'hème, puisque la lysine, comme l'arginine, est un acide aminé chargé positivement. De plus, la NOS d'*Ostreococcus tauri* possède également une lysine à la place de l'arginine dans le motif WRNAPRC ce qui ne l'empêche pas d'être active et de produire du NO (Foresi *et al.*, 2010).

Les modèles de structure 3D présentés suggèrent également que les deux protéines identifiées sont fonctionnelles. Cependant ces analyses restent des prédictions et la résolution expérimentale des structures de NOS d'organismes photosynthétiques par cristallographie ou par résonance magnétique nucléaire (RMN), présenteraient un atout majeur pour l'évolution des connaissances. La mise en œuvre de ces techniques de biochimie structurale requiert toutefois au préalable l'obtention de protéines recombinantes en quantité abondante et exemptes de tout contaminant (*cf.* **CHAPITRE 3**). A ce jour, seules des structures 3D du domaine oxygénase ou du domaine réductase de NOS de mammifères en présence de leurs ligands ont été élucidées expérimentalement. Les premières structures 3D des domaines oxygénase NOS de mammifères ont été réalisées il y a plus de 20 ans (Crane, 1998). Depuis, les domaines oxygénases de NOS de mammifères sont régulièrement cristallisés afin d'étudier l'impact de médicament ou d'inhibiteur sur leur conformation 3D (Grädler *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Vasu *et al.*, 2022).

K. nitens possède la particularité de posséder dans son génome deux séquences nucléotidiques codant potentiellement pour deux protéines, KnNOS1 et KnNOS2. Ces deux KnNOS possèdent des différences structurales importantes. En effet, si la KnNOS1 présente une architecture classique avec un domaine oxygénase et un domaine réductase, la KnNOS2 possède une architecture atypique avec une extension en position C-terminale de la protéine qui contient un domaine ankyrine et un domaine globine. La présence d'un domaine globine, bien que ce soit une différence majeure par rapport au NOS de mammifères, n'empêcherait pas l'activité de cette dernière. Premièrement, la conservation de la structure 3D canonique des NOS pour le domaine oxygénase suggère que l'annotation du gène de la KnNOS2 mènerait à une protéine fonctionnelle. Deuxièmement, l'association d'un domaine globine dans la séquence d'une NOS a en effet déjà été caractérisée chez la cyanobactérie unicellulaire marine *Synechococcus* PCC 7335. Or, dans cette protéine le domaine globine est situé en position N-terminale de la protéine (Correa-Aragunde *et al.*, 2018). Une analyse biochimique a montré que la NOS de *Synechococcus* produit du NO et du NO³⁻ *in vitro* et les données suggèrent que

le domaine globine est principalement responsable de la production de NO³⁻ (Picciano and Crane, 2019). La présence d'un domaine globine pourrait ainsi conférer de nouvelles capacités fonctionnelles pour le métabolisme de l'azote (Correa-Aragunde *et al.*, 2018). En effet, l'expression de SyNOS dans les bactéries favorise la croissance cellulaire dans des milieux contenant de la L-arginine comme seule source d'azote. Plus récemment, il a été démontré que l'expression hétérologue de SyNOS chez *Arabidopsis thaliana* améliore l'efficacité d'utilisation de l'azote et la production de graines (Del Castello *et al.*, 2020).

Nos analyses ont mis en évidence, chez d'autres organismes photosynthétiques, la présence de protéines associant une structure NOS et un domaine Globine. Une organisation chimérique NOS-Globine, a en effet été identifiée chez *Chlorokybus atmophyticus* et *Mesostigma viride* (Charophytes) et chez *Chlamydomonas incerta*, *C. schloesseri* et *Edaphochlamys debaryana* (Chlorophytes). L'étude phylogénétique réalisée indique que cette organisation NOS-Globine semble être significative du point de vue de l'évolution car elle apparaît dans trois des six clades majeurs de Charophytes, les lignées des plus anciennes des Streptophytes. Toutefois, le rôle du domaine globine au sein des protéines NOS-Globine chez les algues reste à élucider. Une organisation différente Globine-NOS a été identifiée chez deux diatomées, *Pseudo-nitzschia multistriata* et *Skeletonema costatum* (Di Dato *et al.*, 2015). Par ailleurs, *S. costatum* et *K. nitens* sont les deux seuls organismes à posséder deux isoformes de NOS.

Si l'on considère l'ensemble des NOS des algues, les divergences entre la phylogénie standard des organismes et celle déduite des protéines NOS répertoriées semblent indiquer des événements de duplication/perte ou des transferts horizontaux de gènes au cours de l'évolution des gènes NOS et par conséquent une homoplasie fonctionnelle putative. Chez les vertébrés, les études phylogénétiques suggèrent également des origines indépendantes pour les NOS entre les infrarègnes des agnathes et des gnathostomes (Andreakis *et al.*, 2011). Trois événements de duplication ont ainsi été proposés afin d'expliquer l'origine des trois isoformes des NOS des tétrapodes (Andreakis *et al.*, 2011).

En conclusion, deux séquences codant pour des NOS ont été identifiées dans le génome de *K. nitens*. Si l'annotation de la KnNOS1 a pu être vérifiée et validée, une nouvelle annotation du gène de la KnNOS2 a été proposée. L'étude des séquences primaires protéiques et des structures des deux KnNOS a mis en évidence des différences entre ces deux NOS, mais celles-

ci seraient potentiellement fonctionnelles. L'étude phylogénétique laisse supposer que les NOS de type NOS-Globine auraient des origines indépendantes chez les algues et que les deux NOS de *K. nitens* pourraient résulter d'un événement de duplication récent.

CHAPITRE II

Analyse de l'expression des deux NOS de *Klebsormidium nitens* en conditions de stress abiotiques

A. Contexte de l'étude

Les travaux menés dans le chapitre I ont permis d'identifier deux isoformes de NOS dans le génome de *K. nitens*. La présence de plusieurs isoformes dans un génome, situation originale chez les algues vertes (cf. **CHAPITRE I**), est communément décrite chez les métazoaires (Andreakis *et al.*, 2011). L'étude des séquences et des structures de ces différentes isoformes de NOS a apporté de nombreux indices sur l'évolution de cette famille d'enzyme. En effet, Andreakis *et al.*, (2011) a proposé plusieurs événements de duplication génique qui seraient à l'origine des trois isoformes de NOS chez les mammifères. Les protéines NOS présentent ainsi des domaines qui leur sont propres en fonction des isoformes. Ainsi, le domaine PDZ existe uniquement sur la NOS1 alors que la boucle auto-inhibitrice n'est retrouvée que sur les deux NOS constitutives (NOS1 et NOS2 ; Campbell *et al.*, 2014). Ce modèle d'évolution considère que ces trois protéines NOS soient sous-fonctionnalisées (sous-spécialisation de fonction). Plus récemment, Annona *et al.*, (2022) ont confirmé cette sous-fonctionnalisation des NOS et la perte réciproque de fonction qui se sont produites dans différentes lignées lors des duplications du génome des vertébrés.

La sous-fonctionnalisation des NOS enrichit la complexité de la signalisation NO, chaque isoforme pouvant donc présenter une spécificité d'expression en fonction de l'environnement et de la réponse physiologique. L'étude de ces spécificités apporte donc des informations sur la compréhension de la signalisation NO.

1. NOS, NO et réponse aux stress

a) La sous-fonctionnalisation des NOS : une réponse adaptée selon le contexte physiologique

Les duplications à l'origine des trois gènes *NOS* de mammifères ont conduit à l'expression de trois isoformes sous-spécialisées, notamment en ce qui concerne leur répartition tissulaire. En effet, la NOS1 est présente en majorité dans les cellules neuronales, mais également dans les muscles squelettiques et le muscle cardiaque (Förstermann and Kleinert, 1995; Gantner *et al.*, 2020). La NOS2 est retrouvée dans de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes, les cellules gliales, les astrocytes, les neurones ou encore les myocytes cardiaques (Förstermann and Kleinert, 1995; Cinelli *et al.*, 2020). La NOS3 est quant à elle majoritairement exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires et gastrointestinales (Förstermann and Kleinert, 1995; Gantner *et*

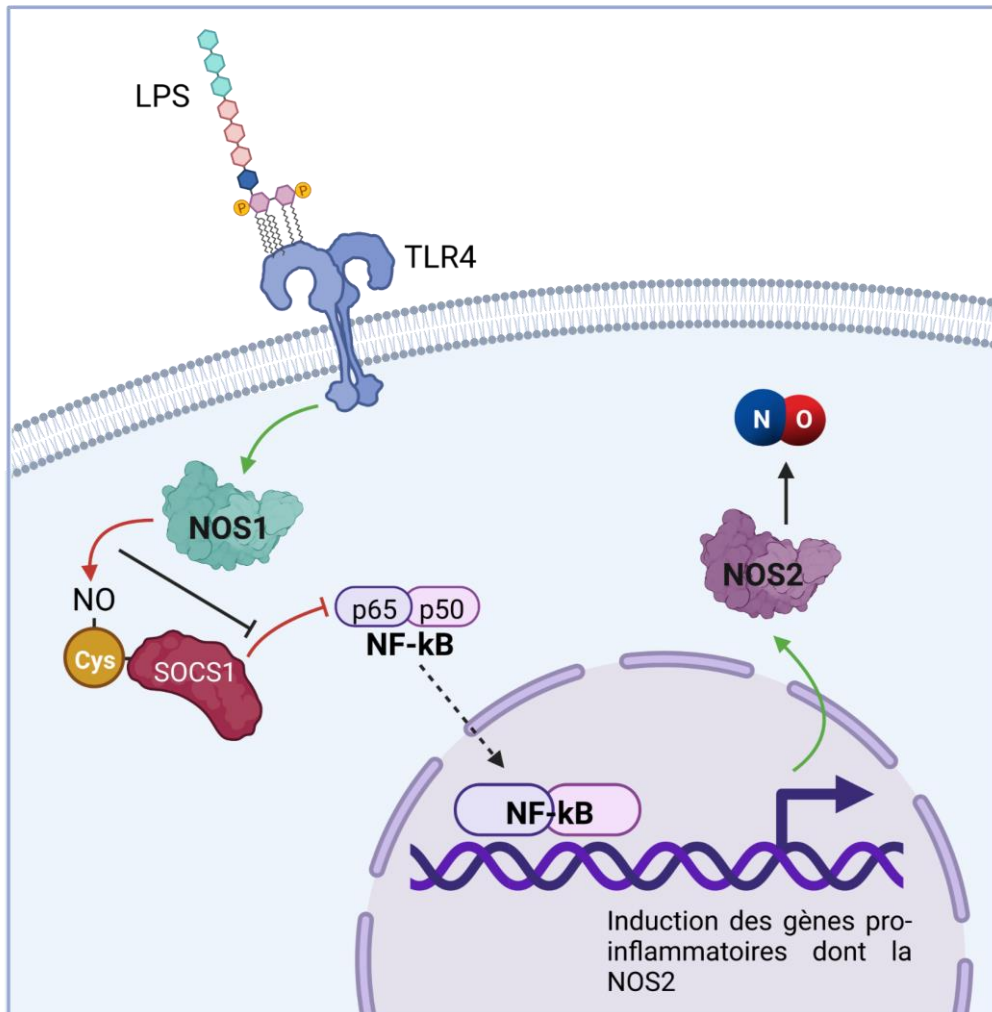


Fig. II.1. Schéma de l'impact de la NOS1 et la NOS2 dans la réponse inflammatoire aux lipopolysaccharides (LPS). Le LPS est reconnu par le récepteur *Toll Like Receptor 4* (TLR4) ce qui active la NOS1. La NO produit par la NOS1 déclenche la S-nitrosation de la protéine SOCS1 qui ne pourra pas hydrolyser la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB. NF-κB est alors transloqué dans le noyau et permet l'induction de gènes pro-inflammatoire dont celui codant pour la NOS2, qui conduit à une forte augmentation de NO.

al., 2020). Des modifications post-transcriptionnelles influencent également la localisation intracellulaire des différentes isoformes de NOS. En effet, la palmitoylation de la cystéine 3 de la NOS2 est nécessaire à son trafic intracellulaire (Navarro-Lérida *et al.*, 2004). La myristoylation et la palmitoylation de la NOS3 favorisent son insertion membranaire dans les calvéoles, des invaginations de la membrane plasmique, ce qui diminue grandement son activité. Si le flux de calcium augmente, la NOS3 sera dissociée de la calvéoline afin d'être active, alors que lorsque le niveau de Ca^{2+} retourne à son niveau basal, la re-palmitoylation de l'enzyme favorise sa réinsertion dans les membranes calvéolaires (Feron *et al.*, 1998).

De plus, la sous-fonctionnalisation des trois isoformes leur confère des réponses spécifiques en fonction des contextes physiologiques. Par exemple, la NOS3 est principalement impliquée dans la vasoconstriction (Villanueva and Giulivi, 2010). Elle est régulée également dans des contextes pathologiques, comme en réponse à une hyperglycémie chez les diabétiques, où son activité est spécifiquement inhibée par l'addition d'une β -N-acétylglucosamine sur la sérine 1177 (Negre-Salvayre *et al.*, 2022). La NOS1 est impliquée dans de nombreuses fonctions au niveau neuronal, et notamment dans la potentialisation à long terme, une forme de plasticité synaptique, jouant un rôle dans la formation de la mémoire dans l'hippocampe. En effet, l'inhibition de la NOS1 altère l'apprentissage et a des effets délétères sur la mémoire (Zhou and Zhu, 2009). La NOS2 est quant à elle principalement impliquée dans la réponse immunitaire (Cinelli *et al.*, 2020). Toutefois, en réponse à certains pathogènes, comme le bacille de la tuberculose ou le VIH, son ARNm s'accumule ce qui conduit à une forte augmentation de son activité dans les tissus du cerveau, pouvant notamment conduire à des dommages neuronaux et à de la démence (Cinelli *et al.*, 2020).

Les trois isoformes peuvent également intervenir au sein d'une même réponse physiologique, mais avec une sous-spécificité fonctionnelle et/ou temporelle. Par exemple, dans la neurogénèse, les trois isoformes de NOS sont exprimées dans les cellules souches neuronales mais à des moments différents (Chong *et al.*, 2018). Par ailleurs, dans la réponse immunitaire déclenchée par des lipopolysaccharides, la NOS1 favorise l'activité du facteur de transcription NF- κ B en inhibant par S-nitrosation la protéine SOCS1 (*suppressor of cytokine signaling protein 1*). Cette inactivation empêche SOCS1 de dégrader la sous-unité p65 du facteur NF- κ B, qui est alors transloqué au noyau et permet l'induction de nombreux gènes pro-inflammatoires dont celui de la NOS2 (**Fig. II.1** ; Baig *et al.*, 2015). Une fois la NOS2 induite, elle génère des quantités

importantes de NO (de l'ordre du μM) qui contribuent à la défense contre les agents pathogènes envahissants. De ce fait, la NOS2 est donc essentielle à la réponse inflammatoire et au système immunitaire inné (Cinelli *et al.*, 2020).

b) *La signalisation NO en réponse aux stress abiotiques chez les espèces chlorophylliennes*

Bien qu'il n'y ait pas de NOS chez les plantes terrestres, la signalisation NO chez les végétaux est ubiquitaire, notamment lors de stress abiotiques (Fancy *et al.*, 2017). En effet à travers son nombre élevé de cibles, le NO module l'expression des gènes et la fonction des protéines à des fins d'adaptation à de nouvelles conditions.

Ainsi, le NO augmente la tolérance de plusieurs espèces végétales au stress salin, comme chez *Populus euphratica*, le blé ou encore le riz, où un traitement avec des donneurs de NO protège la plante et promeut la croissance (Uchida *et al.*, 2002; Fancy *et al.*, 2017). Chez les algues, la signalisation NO a également un impact sur la réponse au stress salin. Une étude protéomique menée chez *C. reinhardtii* a ainsi mis en évidence l'accumulation de 74 protéines lors d'un traitement au NaCl, plusieurs d'entre elles étant associées au métabolisme du NO (*cf. INTRODUCTION*).

De manière similaire, le traitement avec des donneurs de NO réduit les dommages induits par la chaleur dans les plantules de riz, les feuilles de blé et les plantules de maïs (Fancy *et al.*, 2017). De plus, chez plusieurs espèces végétales, comme le tabac ou *Medicago truncatula*, un pic de production de NO apparaît après un stress chaud afin de favoriser l'adaptation de la plante et sa survie (Parankusam *et al.*, 2017). Chez l'algue *Symbiodinium microadriaticum*, l'application d'un stress chaud provoque également une accumulation de NO (Bouchard and Yamasaki, 2009), mais son rôle exact n'est pas connu.

En réponse à la déshydratation, la signalisation NO croisée à la signalisation liée à l'acide abscissique (ABA) favorise la tolérance à la dessiccation de plusieurs espèces végétales, telles que la moutarde brune et l'arabette (Fancy *et al.*, 2017; Sahay *et al.*, 2019). En effet, lors d'un tel stress, l'accumulation d'ABA entraîne l'activation des enzymes NADPH oxydase RBOH, ce qui conduit à une augmentation de la production de H_2O_2 . Il est probable que cette augmentation entraîne à son tour une activation de la nitrate réductase et une accumulation de NO, menant à l'activation de la voie des MAPK puis à la fermeture des stomates, ce qui confère à la plante une résistance à la déshydratation (Fancy *et al.*, 2017).

Ces données indiquent que la signalisation NO intervient dans la réponse aux stress abiotiques chez les organismes photosynthétiques. Nous pouvons ainsi nous questionner sur l'impact de ces stress sur l'expression des deux KnNOS.

2. Les études de transcription chez *K. nitens*

Le suivi de l'abondance des transcrits des deux KnNOS en réponse à un stress chaud, un stress salin et un stress de déshydratation nous permettrait de caractériser une des facettes de l'expression des KnNOS. Jusqu'à présent cependant, peu d'études transcriptomiques ont été réalisées chez *K. nitens*.

Le transcriptome de cette algue modèle a été identifié en 2014 par séquençage et alignement sur son génome de référence (Hori *et al.*, 2014). Depuis, uniquement trois analyses de RNAseq ont été publiées : la première a été réalisée en réponse à un traitement à l'auxine indole-3-acétique acide (Ohtaka *et al.*, 2017). Une seconde, en 2020, a été menée en réponse à un traitement au OPDA (Monte *et al.*, 2020), un précurseur de l'hormone bioactive jasmonoyl-isoleucine. Enfin, la dernière étude en date a été effectuée en 2022 afin d'étudier l'impact d'un stress lumineux sur le transcriptome de *K. nitens* (Serrano-Pérez *et al.*, 2022).

Les analyses de RNAseq ne sont toutefois pas adaptées à l'analyse d'une régulation fine et restent coûteuses. La RT-qPCR reste le moyen le plus efficace d'étudier l'accumulation de l'ARNm de gènes d'intérêt précis. L'analyse de données de RT-qPCR nécessite toutefois l'utilisation de gènes de référence robustes (Bustin *et al.*, 2009). A ce jour, une seule étude a publié des résultats de RT-qPCR sur *K. nitens* (Ohtaka *et al.*, 2017). Dans cette publication, le gène *kfl00009_042*, codant pour une citrate synthase, a été utilisé comme référentiel. Toutefois, de nombreuses études indiquent qu'au sein du même organisme la qualité d'un gène de référence est dépendante des conditions abiotiques. Il apparaît alors nécessaire d'adapter les gènes de références utilisés aux conditions choisies (Schmidt and Delaney, 2010; Dong *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2020b).

3. Objectifs

Dans ce chapitre, à travers l'étude de l'expression des deux KnNOS, nous cherchons à acquérir des connaissances sur les sources de production de NO et sur la signalisation NO chez les organismes chlorophylliens. La présence de différences dans les profils d'accumulation des

ARNm et dans l'abondance des protéines KnNOS pourrait indiquer une sous-fonctionnalisation des deux KnNOS.

Afin de remplir cet objectif, une stratégie par RT-qPCR a été choisie afin de suivre les profils d'accumulation des ARNm des KnNOS en réponse à trois stress abiotiques décrits comme impliquant la signalisation NO, i) un stress chaud, ii) un stress salin, iii) un stress de déshydratation induite par le PEG.

Afin d'analyser les résultats de RT-qPCR il a été nécessaire d'établir une liste de gènes de référence adaptés aux conditions de culture et de stress de l'algue *K. nitens*. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Scientific Reports* (cf. **CHAPITRE II - Résultat 1.b.**).

Pour étudier l'abondance de la protéine KnNOS1 par western blot, un anticorps spécifique de la KnNOS1 a été synthétisé par l'entreprise Agrisera, spécialiste des anticorps dirigés contre les protéines végétales. A l'avenir, la production d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la KnNOS2 est envisagée.

B. Matériels et méthodes

1. Conditions de cultures de *K. nitens*

a) Conditions de cultures basales

La souche de *K. nitens* (SAG 335-1a) utilisée au laboratoire provient de la collection de cultures d'algues de l'université de Göttingen en Allemagne. Elle a été cultivée en milieu minimum C liquide (Ohtaka *et al.*, 2017). Les cultures ont été réalisées dans un volume final de 200 mL, maintenues sous agitation (130 rpm), à température constante (20 °C), sous une photopériode de 16 h jour et 8 h nuit avec une intensité lumineuse de $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Les cultures ont été entretenues par dilution au demi tous les 15 jours.

b) Stress abiotiques

Les stress abiotiques ont tous été menés sur des cultures de *K. nitens* d'un volume de 100 mL et âgées de 15 jours. Les microalgues ont été récoltées par filtration sous vide sur une membrane en nitrate et acétate de cellulose.

Les cultures de *K. nitens* ont été soumises à différents stress abiotiques : salin, hydrique et thermique. Pour le stress salin, 25 mL de la culture de *K. nitens* ont été prélevés afin de représenter le temps 0 h de la cinétique. Puis 7,5 mL de milieu frais supplémentés en NaCl 5

Tab. II.1. Gènes de référence candidats et gènes d'intérêts suivis en RT-qPCR. Les identifiants des gènes de *K. nitens* et des gènes homologues associés aux gènes de référence candidats sont référencés. Les séquences des amorces utilisées, la taille des amplicons et l'efficacité de la RT-qPCR (E) sont indiquées.

Nom du gène	Symbole du gène	Identifiant du gène	Identifiant du gene, espèce	Sequence des amorces (5'-3') sens/anti-sens	Taille (bp)	E
Eukaryotic translation initiation factor 3G	<i>eIF3G</i>	kfl00006_0710	JN885965.1 <i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	AAGCACGGCAGGTTGTAAGT/ AAGGATGAAACGCACCGACA	141	1.899
Eukaryotic translation initiation factor eIF-6	<i>eIF6</i>	kfl00065_0190	KM229561.1 <i>Closterium ehrenbergii</i>	ACATCTTGGTCGGCAGCTAC/ CGACCAGGGGGACTTGTAAAC	114	1.759
Actin and related proteins	<i>ACT</i>	kfl00726_0080	AK100267.1 <i>Oryza sativa L.</i>	AAGCTTGCATATGTGGCCCT/ ATGACTTGGCCGTCAGGAAG	101	1.903
Ubiquitin family protein	<i>UBQ</i>	kfl00037_0290	AK101547.1 <i>O. sativa L.</i>	TCCTCACAAGCAGCGTCAAA/ GCTGTTGGAACCTTGAAGGCG	100	1.890
Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion	<i>Ub/S27</i>	kfl00144_0120	AK061988.1 <i>O. sativa L.</i>	AGTGCGGGTTGACCTATGTG/ TGTGTGTCGAGCTGAAGCAA	136	1.891
40S ribosomal protein S26	<i>S26</i>	kfl00199_0140	XM_001691849.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	GCCTCCACAGTTGCACATTG/ CCGCTGTAAAGTCCGGCAT	112	1.893
Mitochondrial or chloroplast ribosomal protein L34 precursor	<i>L34</i>	kfl00870_0030	XM_001697888.2 <i>C. reinhardtii</i>	GGGTTTTGGCAAGGCGAATC/ GCAAGGTAGTCCCCACTCC	111	1.887
Histone H4	<i>H4</i>	kfl00394_0030	KM229560.1 <i>C. ehrenbergii</i>	AGAATCTACCAGCTCCCGT/ CTTGGTGATGCCCTGGATGT	138	1.867
Histones H3 and H4	<i>H3</i>	kfl00509_0020	JN543390.1 <i>Ulva linza</i>	AAGCCTCATCGTTATCGCCC/ CAATTTCCCTGACAAGGCGC	115	1.885
Beta tubulin	<i>TUB1</i>	kfl00215_0170	JN543388.1 <i>U. linza</i>	CGACCCCACTGGAACATACC/ CCAGATCCATGAGCACAGCA	116	1.865
Alpha tubulin	<i>TUB2</i>	kfl00203_0030	JN543389.1 <i>U. linza</i>	TGCTGAGAAGGCTTACCACG/ ACGCCATGTACTTACCGTGG	113	1.900
Citrate synthase	<i>CitS</i>	kfl00009_0420	-	CAGAAACACGTTCAAGGGCG/ GTGGATGGTGAGGTACAGCC	133	1.896
Nitric oxide synthase 1	<i>KnNOS1</i>	kfl00076_0350	-	AACCTGAGCTGTTTCGAGGTG/ TCTGAAACGCAGGGGATTCC	118	1.836
Nitric oxide synthase 2	<i>KnNOS2</i>	kfl00646_0015	-	TCTCTCGTACACTCTGCCCA/ CTAAATGCCGGGACCTTGGT	120	1.877

M ont été additionnés au 75 mL de culture restant afin d'atteindre une concentration finale en NaCl de 454 mM. Une fiole témoin a été traitée avec seulement 7,5 mL de milieu frais. Vingt-cinq mL de culture liquide de *K. nitens* ont alors été récoltés après 1 h, 3 h et 6 h de traitement.

Pour le stress hydrique induit par déshydratation à l'aide de polyéthylène glycol (PEG), une fiole a été traitée avec 15 g de PEG-6000 et une autre avec 30 g afin d'obtenir respectivement une concentration en PEG de 15 % (m/v) pour un potentiel osmotique (PO) de -0,32 MPa et de 30 % (m/v) pour un PO de -1,05 MPa. Le PO induit par le PEG (ψ) a été calculé en utilisant l'équation formulée par Michel and Kaufmann (1973) :

$$\psi = -(1,18 \times 10^{-2})C - (1,18 \times 10^{-4})C^2 + (2,67 \times 10^{-4})CT + (8,39 \times 10^{-7})C^2T$$

Avec

T : température en °C

C : concentration de PEG en g/kg d'H₂O

Vingt-cinq mL de culture liquide de *K. nitens* ont alors été récoltés après 1 jour, 3 jours et 6 jours de traitement dans une fiole témoin, une fiole à 15 % de PEG et une fiole à 30 % de PEG.

Pour le stress thermique, 25 mL de la culture de *K. nitens* ont été prélevés afin de représenter le temps 0 min de la cinétique. La fiole a été ensuite placée dans un bain-marie à 45 °C, puis 25 mL de culture liquide de *K. nitens* ont été récoltés après 5 min et après 10 min. Le restant de la culture a été replacé en étuve dans les mêmes conditions de croissance qu'avant l'apposition du stress (20 °C) et un dernier prélèvement de 25 mL de *K. nitens* a été réalisé après 30 min.

2. Analyse de l'accumulation de transcrit

a) PCR quantitative en temps réels

Les ARN ont été extraits en utilisant un protocole adapté d'Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa (2008) et rétrotranscrit en ADNc à l'aide du kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (ThermoFisher) comme décrit précédemment (*cf.* **CHAPITRE I – Matériels et méthodes**).

Les réactions de PCR quantitative (qPCR) ont été effectuées dans des plaques 384 puits à l'aide du kit *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega) et de l'appareil *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 5 µL comprenant 2,5 µL de *GoTaq® qPCR Master Mix 2X*, 2 ng d'ADNc et 0,25 µM des amorces sens et antisens.

L'amplification par PCR a été accomplie selon le programme suivant : une première étape de dénaturation (95 °C, 2 min), puis 40 cycles composés d'une étape de dénaturation (95 °C, 15 s), d'une étape d'hybridation (65 °C, 30 s) et d'une étape d'élongation (72 °C, 30 s).

Les amorces utilisées (**Tab. II.1**) ont été élaborées à l'aide du logiciel en ligne Primer3Plus³ et l'efficacité de chacune d'elles a été déterminée *in silico via* le logiciel LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003). La spécificité des amorces a été vérifiée par électrophorèse des produits de qPCR sur un gel d'agarose à 2,0 % (m/v).

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêts ont été calculés d'après la méthode « base commune » de Ganger *et al.*, (2017). Cette méthode permet de pondérer la valeur de quantification de cycle (Cq) par l'efficacité de la réaction de qPCR (E) en calculant la valeur $\Delta Cq^{(w)}$. Afin d'exprimer ces deux valeurs dans la même échelle mathématique, la valeur est E est transformée par une fonction log10. Les données suivent ainsi une distribution normale permettant entre autres, l'utilisation de méthode statistique paramétrique. Le rapport relatif d'expression R et le $\Delta Cq^{(w)}$ ont été calculés avec les formules suivantes :

$$R = 10^{-\Delta\Delta Cq^{(w)}}$$

Avec

$$\Delta\Delta Cq^{(w)} = \Delta Cq_{condition\ d'intérêt}^{(w)} - \Delta Cq_{calibrateur\ interne}^{(w)}$$

$$\Delta Cq^{(w)} = Cq_{gène\ cible}^{(w)} - \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n Cq_{gène\ de\ référence}^{(w)}$$

Avec

$$Cq^{(w)} = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^n \log(E) \cdot Cq$$

Avec

E : efficacité de la réaction de qPCR

Cq : valeur seuil de cycle anciennement appelé Ct (Bustin *et al.*, 2009)

³ <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

Les représentations graphiques ont été obtenues en utilisant les valeurs R, soit le rapport relatif d'expression, ou *fold change*, entre l'expression du gène cible pour une condition d'intérêt et pour une condition témoin.

Les analyses statistiques ont été effectuées sur les valeurs $\Delta Cq^{(w)}$ avec un test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn. Les valeurs de p-value ont été ajustées par la méthode de Holm.

b) Détermination des gènes de référence chez *K. nitens*

La stabilité des différents gènes candidats a été évaluée *in silico via* quatre algorithmes : la méthode du ΔCq (Silver *et al.*, 2006), GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Pfaffl *et al.*, 2004) et BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004).

L'utilisation de différents algorithmes a abouti à différents rangs pour chaque candidat selon la méthode de calcul. Par conséquent un classement final a été déterminé à l'aide du package R RankAggreg qui combine par agrégation les différents classements *via* un algorithme de *Cross-Entropy* (Pihur *et al.*, 2009). Le principal point fort de RankAggreg est qu'il permet une agrégation basée sur le classement, ce qui permet de combiner des listes exprimées dans différentes unités qui ne seraient pas comparables autrement.

3. Analyse de l'abondance des protéines

a) Extraction des protéines solubles de *K. nitens*

Cinquante ou cent mL de culture de *K. nitens* ont été récoltés par filtration après application ou non d'un des trois stress abiotiques testés. Une première lyse mécanique des algues a été réalisée dans l'azote liquide au mortier et au pilon. La lyse cellulaire a été complétée par une lyse chimique en ajoutant 150 μ L de tampon d'extraction (Tris-Cl 50 mM pH 7.4 ; NaCl 100 mM ; glycérol 10 % (v/v) ; EDTA 1 mM ; dithiothréitol (DTT) 1 mM ; cocktail d'inhibiteurs de protéases EDTA *free* (PIC, Roche)) pour 100 mL de culture d'algue. Ce tampon d'extraction a été supplémenté en différents détergents selon les expériences : Igepal CA-630 0,5 % (v/v), sodium dodécyl sulfate (SDS) 2 % (v/v), CHAPS 0,5 % (m/v) ou n-dodécyl- β -D-maltopyranoside (DDM) 5 % (m/v). Les extraits protéiques ont été laissés sur glace 10 min puis centrifugés 20 min à 20 000 g.

b) Séparation des protéines par SDS-PAGE

Afin de dénaturer les protéines, 16 μ L de lysat ont été repris dans 4 μ L de bleu de charge (Tris-Cl 12 mM pH 6,8 ; glycérol 10 % (v/v) ; SDS 0,02 % (m/v) ; DTT 90 mM ; bleu de bromophénol

0,025 % (m/v)) puis chauffés 3 minutes à 100 °C. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, composé d'un gel de concentration (Tris-Cl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1 % (m/v) ; polyacrylamide 4 % (m/v) ; persulfate d'ammonium (APS) 0,1 % (m/v) ; N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) 0,1 % (v/v)) ; puis d'un gel de séparation (Tris-Cl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1 % (m/v) ; polyacrylamide 8 % (m/v) ; APS 0,1 % (m/v) ; TEMED 0,1 % (v/v)). La migration a été effectuée à 160 V dans un tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,8 ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 % (m/v)).

c) *Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose*

Les protéines séparées par SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de pores 0,2 µm (Hybon[®]-ECL[™] nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences) dans un tampon de transfert (Tris 50 mM, glycine 384 mM, éthanol 20 % (v/v), SDS 0,035 % (m/v)) à voltage constant 100 V pendant 1 h à 4 °C. La qualité du transfert et l'homogénéité des dépôts protéiques ont été vérifiées par coloration au Rouge Ponceau 0,1 % (m/v) et acide acétique 5 % (v/v). Après décoloration à l'eau, la saturation a été effectuée 1 h à température ambiante dans un tampon Tris-Cl 50 mM pH 7,6 ; NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % (v/v) (TBST) supplémenté en lait écrémé à 5 % (m/v).

d) *Immunodétection des protéines*

(1) Obtention de l'anticorps anti KnNOS1

Afin de détecter KnNOS1, un anticorps spécifique a été produit *via* le programme *Antibody production* d'Agrisera. L'injection à deux reprises du peptide 966-980 (LLQRSVLNRRARGVG), spécifique de la protéine KnNOS1 (A0A1Y1HXQ9), dans deux lapins (245 et 246), a permis d'obtenir des sérums polyclonaux. Après vérification de la spécificité de chacun des sérums par western blot par comparaison avec le sérum pré-immun, le lapin 245 a été sélectionné pour en faire purifier les IgG par l'entreprise Agrisera.

(2) Western blot

Après l'étape de saturation, les membranes ont été incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps spécifiquement dirigé contre la KnNOS1 endogène dilué à 1:1000^{ème} ou 1:500^{ème} dans du TBST supplémenté en lait écrémé à 5 % (m/v). Après deux lavages de 5 min au TBST, une incubation pendant 1 h à température ambiante a été effectuée avec un anticorps secondaire dilué au 1:20 000^{ème} et couplé à la HRP (*horseradish peroxidase*), dirigé contre les anticorps de lapin (Agrisera AS09 602). Après deux nouveaux lavages de 5 min, la protéine

d'intérêt a été révélée sur films autoradiographiques par chimioluminescence à l'aide du réactif LumiGLO® (Cell Signaling Technology).

(3) Etude des sites de N-myristoylation et de S-palmitoylation

La migration d'une protéine en SDS-page est influencée par les modifications post-traductionnelles qu'elle porte, notamment les ajouts de structures (Greaves *et al.*, 2008). Plusieurs modifications post-traductionnelles de certaines isoformes de NOS humaines ont été décrites, notamment l'ajout de lipides, tels que la S-palmitoylation de la NOS2 et NOS3 humaine (Feron *et al.*, 1998; Navarro-Lérida *et al.*, 2004) ou encore la N-myristoylation de la NOS3 (Liu *et al.*, 1997). Afin de détecter ces sites potentiels de S-palmitoylation ou de N-myristoylation, le logiciel GPS-Lipid v1.0⁴ a été utilisé. GPS-Lipid permet de détecter au sein d'une séquence protéique les potentiels sites de modification post-traductionnelle par ajout d'un lipide, à savoir la S-palmitoylation, la N-myristoylation, la S-farnesylation et la S-geranylgeranylation (Xie *et al.*, 2016).

C. Résultats

1. Détermination de gènes de référence et de gènes marqueurs en réponse à trois stress abiotiques chez *K. nitens*

a) Résultats principaux

Nous avons identifié les gènes de référence les plus adaptés à la normalisation des résultats de qPCR chez *K. nitens* à l'aide de quatre algorithmes : la méthode du ΔCq (Silver *et al.*, 2006), GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Pfaffl *et al.*, 2004) et BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004). Chacun de ces algorithmes ordonne les gènes sélectionnés selon des critères qui lui sont propre. La méthode du ΔCq consiste à comparer l'expression relative, soit les différences de valeurs de Cq obtenues lors des RT-qPCR, pour chaque paire de gènes à tester. L'écart-type moyen (mSD) a été utilisé pour évaluer la stabilité d'expression des 12 gènes candidats. Une valeur mSD faible indique une expression stable. GeNorm est utilisé pour classer les gènes de référence en générant des valeurs de stabilité d'expression (appelé valeurs M) correspondant à la variation moyenne de l'expression d'un gène par rapport à celles des autres gènes à tester. Une faible valeur M indique une expression stable. NormFinder calcule une valeur de stabilité (SV) dépendant de la variation d'expression globale

⁴ <http://lipid.biocuckoo.org/index.php>

Tab. II.2. Valeurs de stabilité d'expression des 12 gènes de référence candidats en réponse à 500 mM de NaCl, 15 et 30 % PEG et 10 min à 45 °C. La stabilité des gènes est déterminée par la valeur M pour le logiciel GeNorm, par la valeur SV (*stability values*) pour NormFinder, par la valeur CV (*coefficient of variation*) pour BestKeeper et par la valeur msd (*mean of standard deviation*) pour la méthode du ΔCq . Plus ces valeurs sont petites plus l'expression du gène est estimée comme stable. Les gènes de références occupant les 1^{ère} et 2^{ème} places dans le classement définis par RankAggreg pour chaque stress sont surlignés en jaune.

Stress abiotiques	Gènes	GeNorm (valeur M)	NormFinder (valeur SV)	BestKeeper (valeur CV)	ΔCq (valeur msd)
500 mM NaCl	ACT	0,75	0,116	3,7	1,14
	CitS	0,62	0,06	1,8	1,13
	H3	0,43	0,08	2,3	1,06
	L34	0,79	0,10	3,8	1,29
	S26	0,99	0,112	4,1	1,34
	TUB1	0,90	0,119	3,3	1,4
	Ub/S27	0,69	0,09	3,9	1,12
	UBQ	0,43	0,06	2,7	1,124
	H4	0,94	0,115	4,8	1,48
	eIF3G	1,23	0,15	6,3	1,85
	eIF6	1,13	0,14	5,8	1,92
	TUB2	0,87	0,13	4,5	1,39
15 % et 30 % PEG	ACT	0,27	0,049	2,67	0,583
	CitS	0,30	0,059	1,7	0,581
	H3	0,27	0,045	2,75	0,59
	L34	0,52	0,092	1,79	0,88
	S26	0,58	0,091	3,26	1,01
	TUB1	0,43	0,088	2,38	0,73
	Ub/S27	0,31	0,045	2,64	0,62
	UBQ	0,37	0,066	1,48	0,709
	H4	0,65	0,097	4,22	1,16
	eIF3G	0,48	0,075	1,76	0,69
	eIF6	0,29	0,026	1,35	0,55
	TUB2	0,46	0,078	1,93	0,71
45 °C	ACT	0,20	0,014	2,06	0,40
	CitS	0,28	0,026	1,71	0,45
	H3	0,33	0,065	2,01	0,53
	L34	0,30	0,052	1,25	0,50
	S26	0,34	0,042	2,22	0,47
	TUB1	0,41	0,07	3,47	0,69
	Ub/S27	0,24	0,041	2,07	0,45
	UBQ	0,46	0,079	3,16	0,78
	H4	0,37	0,064	2,92	0,64
	eIF3G	0,32	0,050	2,12	0,47
	eIF6	0,26	0,029	2,61	0,52
	TUB2	0,20	0,038	2,05	0,43

des gènes candidats, mais également de la variation entre les sous-groupes d'échantillons (*i.e.* NaCl et témoin). Les gènes présentant les SV les plus faibles sont considérés comme les plus stables. BestKeeper calcule la stabilité des gènes de référence candidats en fonction du coefficient de variance (valeur CV) et de l'écart-type des Cq. Le gène de référence avec la CV la plus faible est considéré comme le gène le plus stable. Les résultats bruts obtenus pour chaque algorithme sont résumés dans le **Tab. II.2**. Chaque algorithme a ordonné différemment les gènes candidats sélectionnés en fonction des trois stress abiotiques testés. Un classement définitif pour chaque stress abiotique a été obtenu via RankAggreg afin de ne pas favoriser un critère par rapport à un autre (**Tab. II.2**). Pour compléter ces données, une recherche de gènes marqueurs pour chacun des trois stress abiotiques a été menée. L'ensemble de ces résultats a permis d'identifier les outils moléculaires nécessaires à la réalisation de RT-qPCR en réponse à des stress abiotiques chez l'algue modèle *K. nitens*.

b) *Identification de gènes de référence et de gènes marqueurs en réponse à des stress abiotiques chez K. nitens*

Article scientifique n°2 : article de résultats originaux actuellement en cours de révisions mineures (13 octobre 2022) dans la revue *Scientific Reports*.

Reliable reference genes and abiotic stress marker genes in Klebsormidium nitens

Pauline Chatelain, Cécile Blanchard, Jeremy Astier, Agnès Klinguer, David Wendehenne, Sylvain Jeandroz, Claire Rosnoblet.

Abstract:

Microalgae have recently emerged as a key research topic, especially as biological models. Among them, the green alga *Klebsormidium nitens*, thanks to its particular adaptation to environmental stresses, represents an interesting photosynthetic eukaryote for studying the transition stages leading to the colonization of terrestrial life. The tolerance to different stresses is manifested by changes in gene expression, which can be monitored by quantifying the amounts of transcripts by RT-qPCR. The identification of optimal reference genes for experiment normalization was therefore necessary. In this study, using four statistical algorithms followed by the RankAggreg package, we determined the best reference gene pairs suitable for normalizing RT-qPCR data in *K. nitens* in response to three abiotic stresses: high

salinity, PEG-induced dehydration and heat shock. Based on these reference genes, we were able to identify marker genes in response to the three abiotic stresses in *K. nitens*.

INTRODUCTION

Investigations on microalgae recently appeared as an emerging research topic due to their use in food industry, biofuels and health-related products (Wijffels and Barbosa, 2010; Khan *et al.*, 2018; Barkia *et al.*, 2019). For decades, several microalgae-including *Micrasterias denticulate* (Giddings *et al.*, 1980; Steiner *et al.*, 2021), *Closterium ehrenbergii* (Lippert, 1967; Sathasivam *et al.*, 2016) or *Chlamydomonas reinhardtii* (Spalding and Portis, 1985; Fauser *et al.*, 2022), have been the subject of fundamental research addressing the central question of the physiology and the evolution of photosynthetic eukaryotes. More recently, *Klebsormidium nitens*, a filamentous charophyte green algae, has been described as a new model for investigating the transitional steps leading to terrestrial colonization by aquatic algae (Hori *et al.*, 2014). Indeed, *K. nitens* displays increased resistance to specific stresses of terrestrial life such as desiccation or temperature fluctuations (Nagao *et al.*, 2008; Lin and Wu, 2014; Holzinger *et al.*, 2014). In addition, *K. nitens* possesses primitive cellular pathways related to hormones signaling (Hori *et al.*, 2014; Ohtaka *et al.*, 2017), as well as protein domains of arbuscular mycorrhiza-associated receptors typical of vascularized plants (Montero *et al.*, 2021). *K. nitens* has been also identified as a new potential candidate for biotechnological uses and commercial production of microalgal oils (Stoyneva-Gärtner *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2021). Physiological responses promoting stress tolerance are manifested through adaptive changes in gene expression and modifications of transcripts stability. In this context, transcriptomic approach by RT-qPCR is a powerful tool to quantify transcript amounts and is frequently used to analyze fine-tuning gene expression (Alves *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2021; Windhagauer *et al.*, 2021) thanks to its high sensitivity, specificity, accuracy, and reproducibility (Bustin *et al.*, 2009). Obtaining reliable RT-qPCR data requires the normalization of the results using reference genes whose mRNA amount should remain unchanged under the experimental conditions of interest (Dong *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2017). A selection of suitable reference genes have already been made for various algae under different stress conditions such as *Closterium ehrenbergii* (Lee *et al.*, 2015), *Chlamydomonas* sp. ICE-L (Mou *et al.*, 2015), *Ulva linza* (Dong *et al.*, 2012) or *Chorella pyrenoidosa* (Fan *et al.*, 2016). However, despite the growing interest for *K. nitens* in the scientific community, no studies have been

dedicated to the search of reference genes in this algal species (Ohtaka *et al.*, 2017; Monte *et al.*, 2020; Chatelain *et al.*, 2021; Montero *et al.*, 2021; Serrano-Pérez *et al.*, 2022). Nevertheless, the identification of best reference genes for normalization of RT-qPCR data is definitively required for further analyses.

For this purpose, we determined the best couples of reference genes in *K. nitens* in response to three abiotic stresses: a high salt content, PEG-induced dehydration and heat shock. We selected 12 candidate genes previously cited as reference genes in algae (Simon *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015) or in other plant organisms (Shi *et al.*, 2012b; Moraes *et al.*, 2015) and analyzed their expression stability in response to the abiotic stresses using four statistical algorithms: NormFinder (Pfaffl *et al.*, 2004), GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), the ΔCq calculation method (Silver *et al.*, 2006), and BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004). RankAggreg provided a ranked list of reference genes from most to least suitable (Pihur *et al.*, 2009). Thanks to the selection of optimal reference genes, we then identified marker genes in response to the three abiotic stresses in *K. nitens*. The methodology for selecting reference genes was validated by studying the mRNA accumulation of one of these marker genes, the ATP-binding cassette transporter (ABC) encoding gene, in response to salt stress.

MATERIALS AND METHODS

Algal culture and stress treatments.

Klebsormidium nitens strain NIES 2285 was cultured in liquid C medium (Ichimura, 1971). Cultures were maintained at 20 °C, under stirring (130 rpm), 16 h photoperiod at 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. *K. nitens* cells were harvested by vacuum filtration on cellulose ester membrane of 0.2 μm pores.

All stress treatments were applied after two weeks of cell culture. Cells were transiently exposed to heat shock (10 min, 45 °C) and were returned to control temperature (20 °C). Sampling was carried out during heat shock (0, 5 and 10 min) and 30 min after recovery from heat shock. Salt stress was applied at 500 mM NaCl, or equal volume of C medium as control. PEG-induced dehydration was performed by adding PEG 6000 at 15% (w/v) and 30% (w/v). All harvested cells were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further RNA extraction.

RNA extraction, cDNA synthesis and RT-qPCR.

Frozen cells were ground to a fine powder in liquid nitrogen using a MM200 oscillating vibromill (Retsch) and 5 mm diameter glass beads. Total RNA was isolated according to a protocol from Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa (2008). DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen) was used to remove gDNA contamination. RNA purity and quality were determined using a NanoDrop ND-1000, then RNA integrity was checked through electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg using RNA High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR were performed using GoTaq qPCR Master Mix kit (Promega) and the ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Reactions were performed in a final volume of 5 µL including 2.5 µL of GoTaq® qPCR Master Mix 2x (Promega), 10 ng of cDNA and 0.25 µM of forward and reverse primers. PCR amplification was performed according to the following program: a first denaturation step (95 °C, 2 min) then 40 cycles, each consisting of a denaturation step (95 °C, 15 s), a hybridization step (65 °C, 30 s) and an elongation step (72 °C, 30 s).

Selection of candidate reference genes.

Twelve candidate genes were selected from literature and algae homologous sequences were then identified using BLASTn searches within the *Klebsormidium nitens* NIES-2285 genome project database v1.1 (http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/), including the genome and the transcriptome of *K. nitens* (Table 1). Sequence with at least 70% identity between the species of origins and *K. nitens* were selected. Primers sequences were designed using Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Table 1). Primer specificity was assessed *via* RT-qPCR, melting curve analysis and 2% (w/v) agarose gel electrophoresis of the qPCR products (Supplementary Fig. S1). The PCR amplification efficiency (E) for each primer pair were calculated using the LinRegPCR software (Ramakers *et al.*, 2003).

Analysis of gene expression stability and ranking of candidate reference genes.

The stability of the candidate genes was evaluated *in silico* using four algorithms, GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Pfaffl *et al.*, 2004), BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004), and the ΔCq method (Silver *et al.*, 2006). GeNorm calculation, as Normfinder, are based on fold change values, whereas BestKeeper and the ΔCq methods are based on raw Cq values.

Table 1. Candidate reference genes and associated primers set used in RT-qPCR. *K. nitens* genes ID, the homologous genes and the related publications are referenced. Amplicon size and RT-qPCR efficiency (E) are indicated.

Gene name	Gene symbol	Gene ID	Gene ID Homolog and species	Primer sequence (5'-3') forward/reverse	Size (bp)	E	Reference
Eukaryotic translation initiation factor 3G	<i>elf3G</i>	kfl00006_0710	JN885965.1 <i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	AAGCACGGCAGGTTGTAAGT/ AAGGATGAAACGCACCCGACA	141	1.899	Shi <i>et al.</i> , (2012)
Eukaryotic translation initiation factor eIF-6	<i>elf6</i>	kfl00065_0190	KM229561.1 <i>Closterium ehrenbergii</i>	ACATCTTGGTCGGCAGCTAC/ CGACCAGGGGGACTTGTAAC	114	1.759	Lee <i>et al.</i> , (2015)
Actin and related proteins	<i>ACT</i>	kfl00726_0080	AK100267.1 <i>Oryza sativa L.</i>	AAGCTTGCATATGTGGCCCT/ ATGACTTGGCCGTCAGGAAG	101	1.903	Moraes <i>et al.</i> , (2015)
Ubiquitin family protein	<i>UBQ</i>	kfl00037_0290	AK101547.1 <i>O. sativa L.</i>	TCCTCACAAGCAGCGTCAAA/ GCTGTTGGAAC TTGAAGGCG	100	1.890	Moraes <i>et al.</i> , (2015)
Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion	<i>Ub/S27</i>	kfl00144_0120	AK061988.1 <i>O. sativa L.</i>	AGTGCGGGTTGACCTATGTG/ TGTGTGTCGAGCTGAAGCAA	136	1.891	Moraes <i>et al.</i> , (2015)
40S ribosomal protein S26	<i>S26</i>	kfl00199_0140	XM_001691849.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	GCCTCCACAGTTGCACATTG/ CCGTCTGTAAAGTCCGGCAT	112	1.893	Simon <i>et al.</i> , (2008)
Mitochondrial or chloroplast ribosomal protein L34 precursor	<i>L34</i>	kfl00870_0030	XM_001697888.2 <i>C. reinhardtii</i>	GGGTTTTGGCAAGGCGAATC/ GCAAGGTAGTTCCCACTCC	111	1.887	Simon <i>et al.</i> , (2008)
Histone H4	<i>H4</i>	kfl00394_0030	KM229560.1 <i>C. ehrenbergii</i>	AGAATCTACCAGTCCCGT/ CTTGGTGATGCCCTGGATGT	138	1.867	Lee <i>et al.</i> , (2015)
Histones H3 and H4	<i>H3</i>	kfl00509_0020	JN543390.1 <i>Ulva linza</i>	AAGCCTCATCGTTATCGCCC/ CAATTCCTGACAAGGCGC	115	1.885	Dong <i>et al.</i> , (2012)
Beta tubulin	<i>TUB1</i>	kfl00215_0170	JN543388.1 <i>U. linza</i>	CGACCCACTGGAACATACC/ CCAGATCCATGAGCACAGCA	116	1.865	Dong <i>et al.</i> , (2012)
Alpha tubulin	<i>TUB2</i>	kfl00203_0030	JN543389.1 <i>U. linza</i>	TGCTGAGAAGGCTTACCACG/ ACGCCATGTACTTACCGTGG	113	1.900	Dong <i>et al.</i> , (2012)
Citrate synthase	<i>CitS</i>	kfl00009_0420	-	CAGAAACACGTTCAAGGGCG/ GTGGATGGTGAGGTACAGCC	133	1.896	Ohtaka <i>et al.</i> , (2017)

GeNorm calculates the average pairwise variation of gene expression of each candidate compared to the others. A stability value (M) is then assigned to each gene. This M value must be lower than the threshold of 1.5 set by the software developers. The most stable reference gene has the lowest M value. NormFinder calculates the stability value (SV) based on the overall expression variation of candidate genes for normalization, and also the variation between subgroups of samples. The BestKeeper algorithm calculates the stability of candidate reference genes based on the coefficient of variance and standard deviation of gene expression (CV). The reference gene with the lowest CV is considered as the most stable gene. The ΔCq method consists of comparing the relative expression of each pair of genes. All comparisons for one gene allowed calculation of mean standard deviation (mSD) that was used to assess the stability of the gene expression of the 12 candidates: low mSD value indicated a stable expression. Therefore, a final ranking was determined using the R RankAggreg package which combines the different rankings by aggregation *via* a Cross-Entropy algorithm (Pihur *et al.*, 2009).

Determination of stress marker genes.

Several stress-related genes were selected based on their homologue function described in the literature in *Arabidopsis thaliana*. Algae homologous genes were identified by BLASTn method with the *Klebsormidium nitens* NIES-2285 genome project database v1.1 including the genome and the transcriptome of *K. nitens* (Supplementary Table S1). Relative gene expressions were analyzed using the common base method from Ganger (Ganger *et al.*, 2017). Statistical analyses were performed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn test and p-value were adjusted by Holm method.

RESULTS

Selection of candidate reference genes.

The aim of this work was to identify genes suitable as reference genes in *K. nitens*, showing the most stable expression in response to abiotic stress. The characteristic and primer sequences of the 12 candidate reference genes selected through a bibliographic review are presented in Table 1.

In order to study the stability of their expression during abiotic stress conditions, we first analyzed the amounts of the corresponding mRNAs at basal state and in response to heat shock, high concentration of salt and dehydration, following the quantification cycle (Cq)

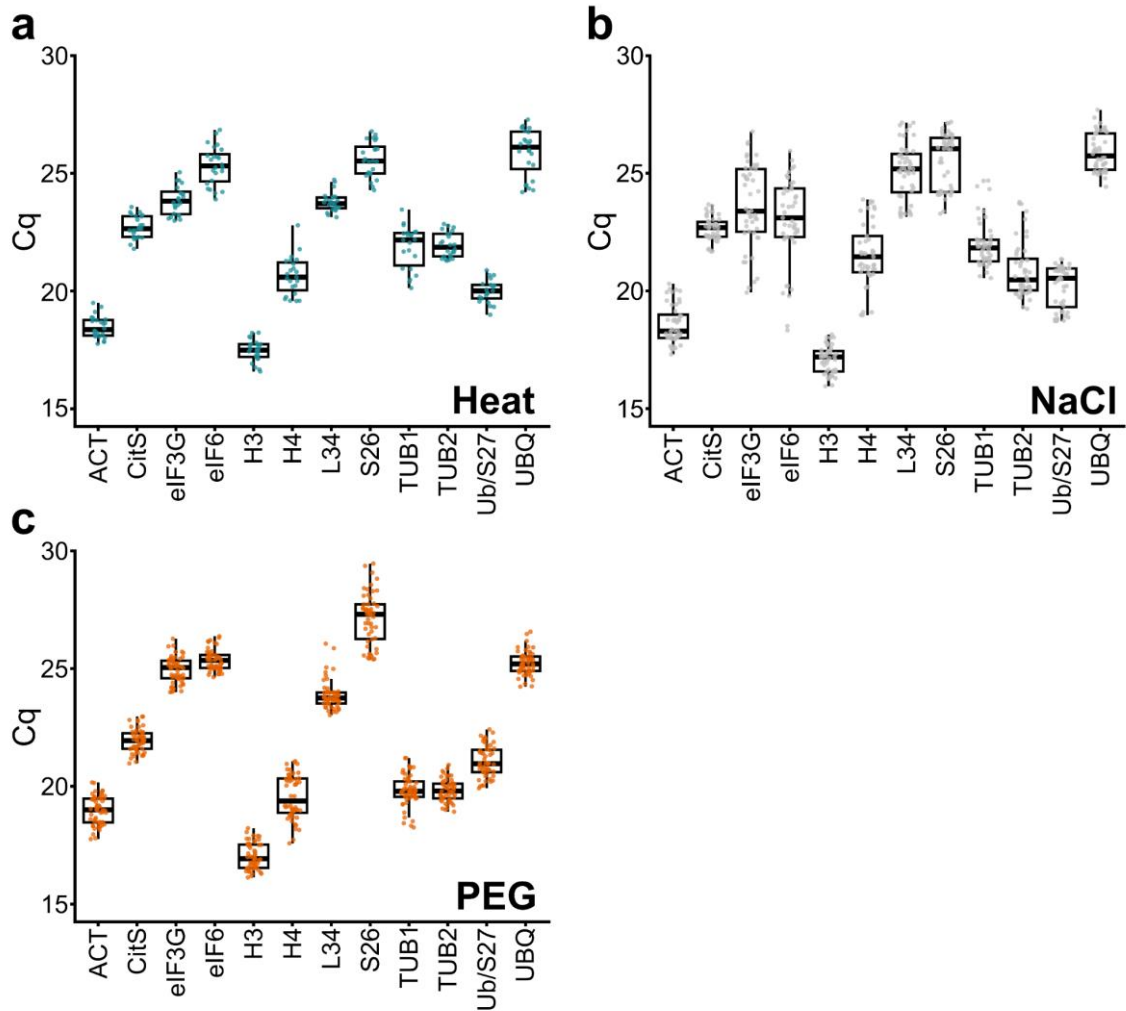


Figure 1. Quantification cycle (Cq) variation of candidate reference genes in each stress condition. Each value of Cq from control and stress samples is represented by a dot. Box indicates the 1st and 3rd quartiles, the ends of vertical line represent the maximum and minimum values. The horizontal line through the box represents the median. Cq from control and stressed samples after: **a.** 5 and 10 of heat shock at 45 °C, then 30 min at 20 °C, **b.** salt stress with 500 mM NaCl during 1, 3 and 6 h and **c.** PEG-induced dehydration at 15 and 30% (w/v) during 1, 3 and 6 days.

value. The Cq value reflected the amount of transcripts (a lower Cq correlated with a higher level of mRNA) and the height of each box and vertical line displayed the variability of the mRNA amounts of control and stressed samples (Fig. 1). Following the three treatments, the Cq values of the potential reference genes ranged from 15.95 to 29.46, with 90% ranging from 18.00 to 26.00 (Fig. 1; Supplementary Dataset 1 and 2). Among all the samples, the least abundant transcripts were those encoding eIF6, S26, and UBQ (mean Cq values over than 25.00 in response to the three stresses), while H3 emerged as the most abundant transcripts (mean Cq values of 17.03, 17.09 and 17.47 in response to PEG, salt, and heat stress, respectively; Fig. 1a, b and c). Concerning the variability of the control and treated sample transcript levels, in response to heat shock L34 showed the lowest variability with Cq between 23.14 and 24.73, while UBQ mRNA content is the most affected (values ranging from 24.20 to 27.28; Fig. 1a). Regarding salt stress, the lowest variability was found for CitS mRNA, while that of eIF6 is the most variable (Fig. 1b; Supplementary Dataset 2). On the contrary, under PEG stress, eIF6 mRNA displayed the lower dispersal of the Cq value and S26 mRNA the highest one (Fig. 1c; Supplementary Dataset 2). These Cq analyzes highlighted the need to identify reference genes adapted to each stress conditions. To obtain a more robust evaluation of candidates, we performed statistical tests to rank genes using four algorithms: NormFinder (Pfaffl *et al.*, 2004), GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), the Δ Cq calculation (dCq; Silver *et al.*, 2006), and BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004).

Expression stability of candidate reference genes.

Several statistical algorithms have been developed to select stably expressed reference genes for accurate normalization of RT-qPCR data. We have chosen four algorithms commonly used in reference gene determination: NormFinder (Pfaffl *et al.*, 2004), GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), dCq (Silver *et al.*, 2006), and BestKeeper (Andersen *et al.*, 2004). Each method led to the ranking of reference genes based on their stability during the conditions tested: from the most (rank 1) to the least (rank 12) stable, calculated from SV (NormFinder), M (GeNorm), mSD (dCq) values and CV (BestKeeper). Each algorithm focused on different criteria to determine stability. Actually, GeNorm did not consider variation in mRNA amounts within samples, while Bestkeeper eliminated candidates with a standard deviation of Cq greater than 1. NormFinder is the only one that considered variations in transcript levels within treatment. The dCq method focused only on the standard deviation of the pairwise difference between

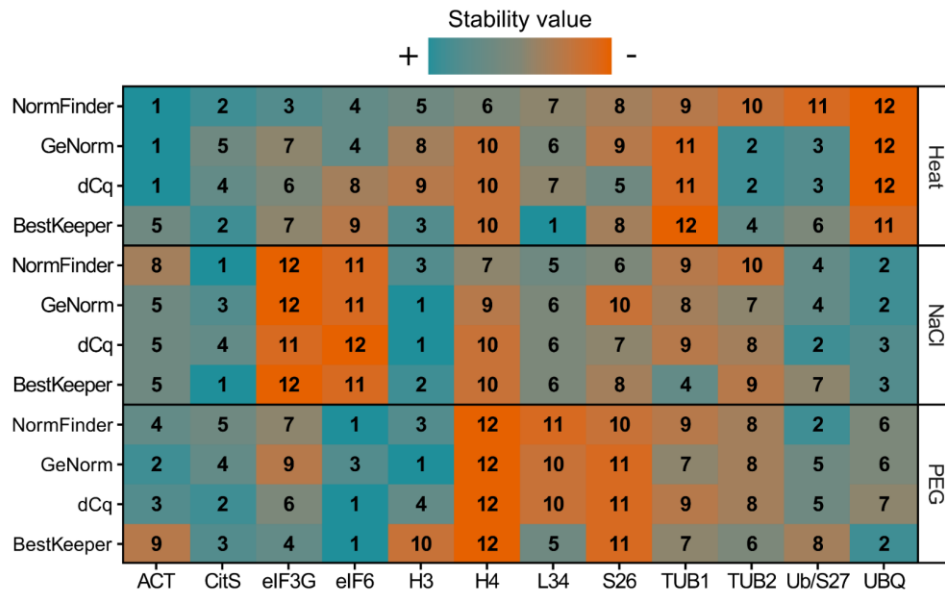


Figure 2. Expression stability and ranking of candidate reference genes for each algorithm, NormFinder, GeNorm, dCq, BestKeeper and in response to heat shock 10 min at 45 °C then 20 °C, salt stress at 500 mM NaCl and 15 and 30% (w/v) PEG-induced dehydration stress. The numbers corresponding to the rank of each candidate were calculated from the SV, M, mSD, CV values for NormFinder, GeNorm, dCq and BestKeeper, respectively.

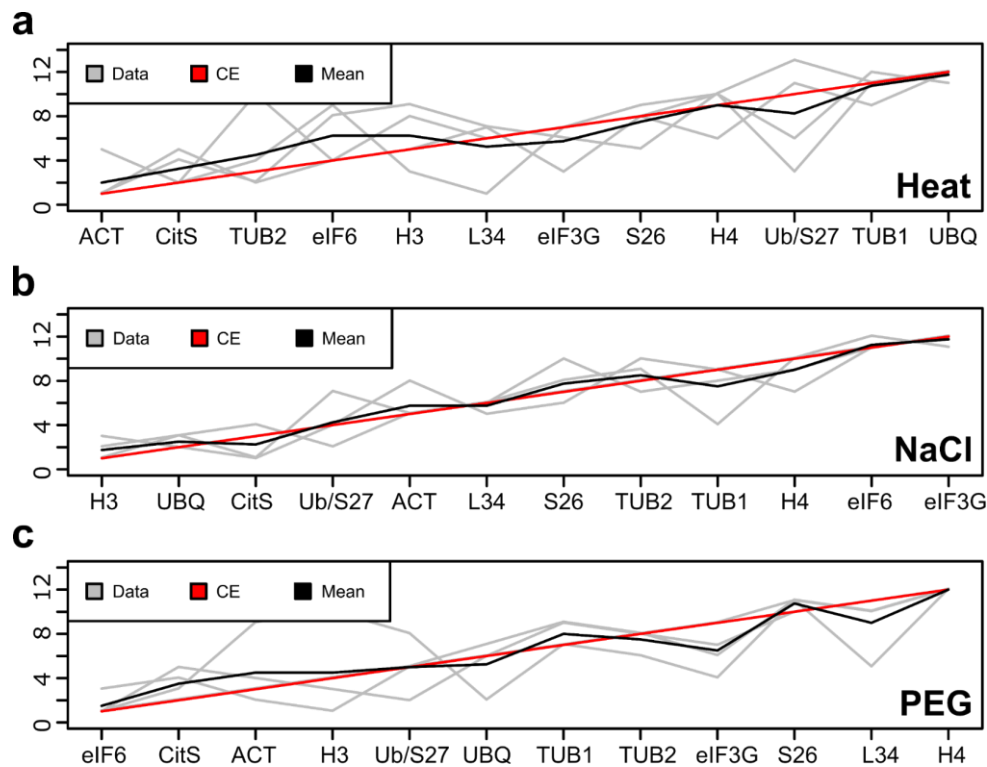


Figure 3. Rank aggregation of candidate reference genes for each algorithm in the three stress condition, **a.** heat shock, **b.** salt stress and **c.** PEG-induced dehydration. Analysis was performed by RankAggreg package in R software. Grey lines corresponding to ranking by NormFinder, GeNorm, dCq and BestKeeper, black line represent the mean rank of each methods and red line the results of best rank combination determine by the Cross-Entropy algorithm (CE).

the Cq of each candidate gene. The information provided by these four methods were complementary. In order to limit biases in the selection of the optimal reference genes in our conditions, the rankings obtained from each algorithm were separately evaluated and summarized in Fig. 2.

Although the classification criteria were different, the rankings obtained with each algorithm shared similarities within each treatment (Fig. 2). For example, ACT was ranked 1 by NormFinder, GeNorm and dCq, and 5 by BestKeeper in response to heat stress, while UBQ were ranked 12 by NormFinder, GeNorm and dCq, and 11 by BestKeeper. Following salt stress, H3 was ranked 3 by NormFinder, 1 by GeNorm and dCq, and 2 by BestKeeper while eIF3G was ranked 12 by NormFinder, GeNorm and BestKeeper, and 11 by dCq. Regarding PEG treatment, eIF6 appeared to rank 1 in the rankings of NormFinder, dCq and BestKeeper, and to rank 3 in the ranking of GeNorm, whereas H4 was ranked 12 by each algorithm (Fig. 2). The rankings described above highlighted the difference in stability of the transcripts and therefore the importance of choosing reference genes which expression was independent of the experimental conditions. While the rank of some candidate genes was similar whatever the algorithm, for others it differed. For instance, discrepancy appeared for L34. It was found to be the most stable gene by BestKeeper under heat stress conditions, while it was only ranked 7, 6, and 7 by NormFinder, GeNorm and dCq, respectively. Also, H3 was reported as stable under PEG treatment by GeNorm (rank 1), NormFinder (rank 3), and dCq (rank 4), while it emerged as unstable with BestKeeper at rank 10 (Fig. 2).

As mentioned above, each method of calculation was complementary and, in order to combine these different rankings together and to overcome any contradictions between some algorithms, the R package RankAggreg (Pihur *et al.*, 2009) was used. This method allowed us to reorganize the ranks independently of the origin of the data (Pihur *et al.*, 2009), thus making it possible to compare the results from the four algorithms. RankAggreg led to the determination of an optimal ranking list in each stress condition (Fig. 3). Thus, in case of heat stress, the most stable expressed gene was ACT (Fig. 3a), the best one for salt stress was H3 (Fig. 3b), while eIF6 displayed the most stability following PEG-induced dehydration (Fig. 3c). Since the use of multiple reference genes allows optimal results (Bustin *et al.*, 2009), we decided to consider two reference genes per condition. Finally, ACT and CitS, H3 and UBQ, and eIF6 together with CitS, were selected as couples of reference genes for RT-qPCR

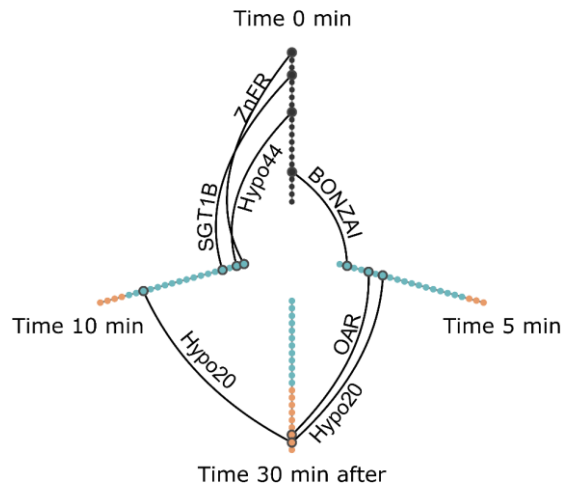


Figure 4. Hive plot depiction of statistical differences of candidate gene marker mRNA abundance depending on the heat shock treatment time. Each axis represents a time point during the heat shock at 45°C: 0 min, 5 min, 10 min then 20 °C for 30 min. Each candidate marker gene is represented by a node and are ordered alphabetically on the top axis. On the other axes nodes are ordered according to their fold change, i.e., their transcript level under heat shock stress conditions compared to the one at time 0. On these axes, nodes represented in blue presented a fold change lower than 1 and those in orange presented a fold change upper than 1. Edges connecting correspond to a statistical difference between the fold change of the two time points for one gene (Kruskal-Wallis followed by Dunn test, $P < 0.05$, $n = 4$).

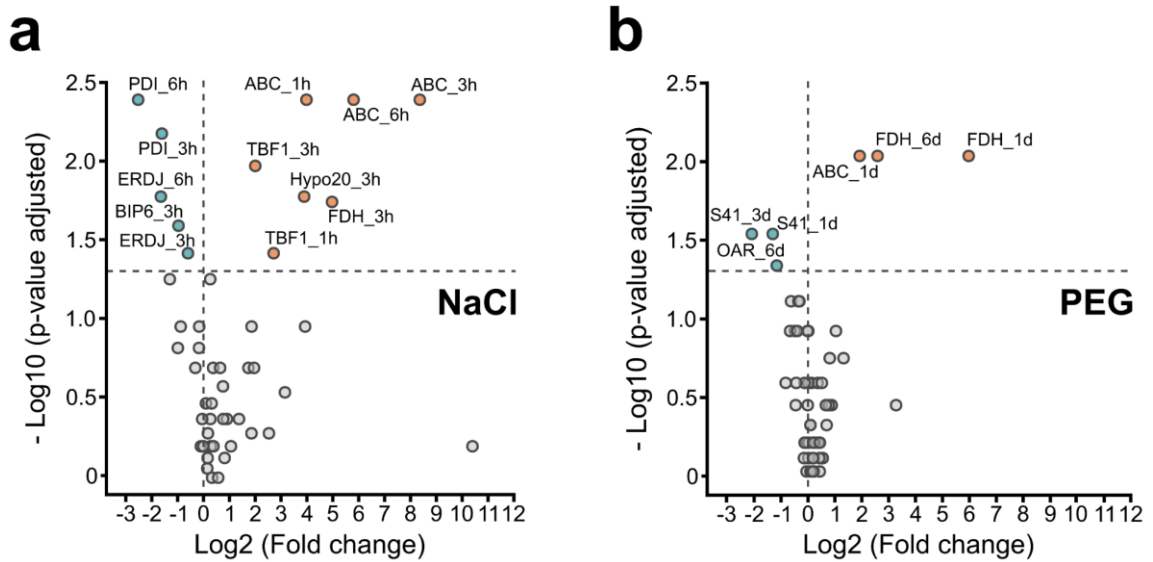


Figure 5. Volcano plot of mRNA level changes of candidate marker gene relative to control, in response to **a.** 500 mM of NaCl (salt stress) **b.** 30% (w/v) PEG-induced dehydration. Each dot represents one gene at one time point labelled: Name_Time point. Gene statistically up-regulated were labelled in orange (positive Log2) and in blue even down-regulated (negative Log2). Statistical differences between treated sample and control were determined using Kruskal-Wallis followed by Dunn test and p-values were adjusted with Holm method ($*P < 0.05$, $n = 5$).

normalization for studies in *K. nitens* species, in conditions of heat shock, salt stress and PEG-induced dehydration stress, respectively (Fig. 3).

Selection of abiotic stress marker genes.

Once suitable reference genes selected, we searched for marker genes of the different abiotic stresses. For this purpose, twenty-six candidate genes exhibiting variations under abiotic stress conditions in *Arabidopsis thaliana* or in a recent RNAseq experiment conducted in *K. nitens* (Monte *et al.*, 2020) were selected (Table S1). The dynamic of expression for these genes in response to heat shock, salt stress and PEG-induced dehydration, were monitored by RT-qPCR.

In case of heat stress, we represented the transcript accumulation at each time point (0 min, 5 min, 10 min + 30 min) relative to time point 0 on a hive plot (Fig. 4). Each node corresponded to a gene and was colored according to its fold change. Genes whose amounts of transcripts significantly increased or decreased were linked between the two relevant time points. During heat shock, the majority of the genes exhibited a trend toward a decreased level of mRNA, illustrated by the prevalence of blue dots in axes of time points 5 min and 10 min (Fig. 4). One gene, BONZAI, coding for a calcium-dependent phospholipid-binding protein, displayed a statistically different decrease during the first 5 min at 45 °C. Likewise, mRNA level of three genes significantly decreased between time zero and 10 min: ZnFR, encoding a zinc finger containing protein, SGT1B for a chaperone binding protein and Hypo44, for a protein showing homology with a cell wall integrity and stress response component in *A. thaliana*. No significant increase in mRNA content was measured for the selected genes at the time point 30 min (Fig. 4). However, two genes encoding the oxidoreductases, Hypo20 and OAR, were down-regulated during a 30 min recovery after heat shock (Fig. 4).

Only seven genes showed an amount of transcripts significantly affected under salt stress (Fig. 5a). Four of them were up-regulated: TBF1, coding for a DNA-binding transcription factor, ABC, Hypo20 and FDH that codes for a mitochondrial formate dehydrogenase while three were down-regulated: PDI (Protein Disulfide Isomerase), ERDJ and BIP6, both coding for heat shock proteins. Hypo20, FDH, BIP6 transcripts accumulation was transiently modulated whereas ABC, TBF1, PDI, ERDJ transcripts showed continuous variations during treatments. Analysis of candidate gene expressions in response to PEG-induced dehydration revealed four genes with statistically different level of transcripts compared to control (Fig. 5b). Indeed, ABC and FDH

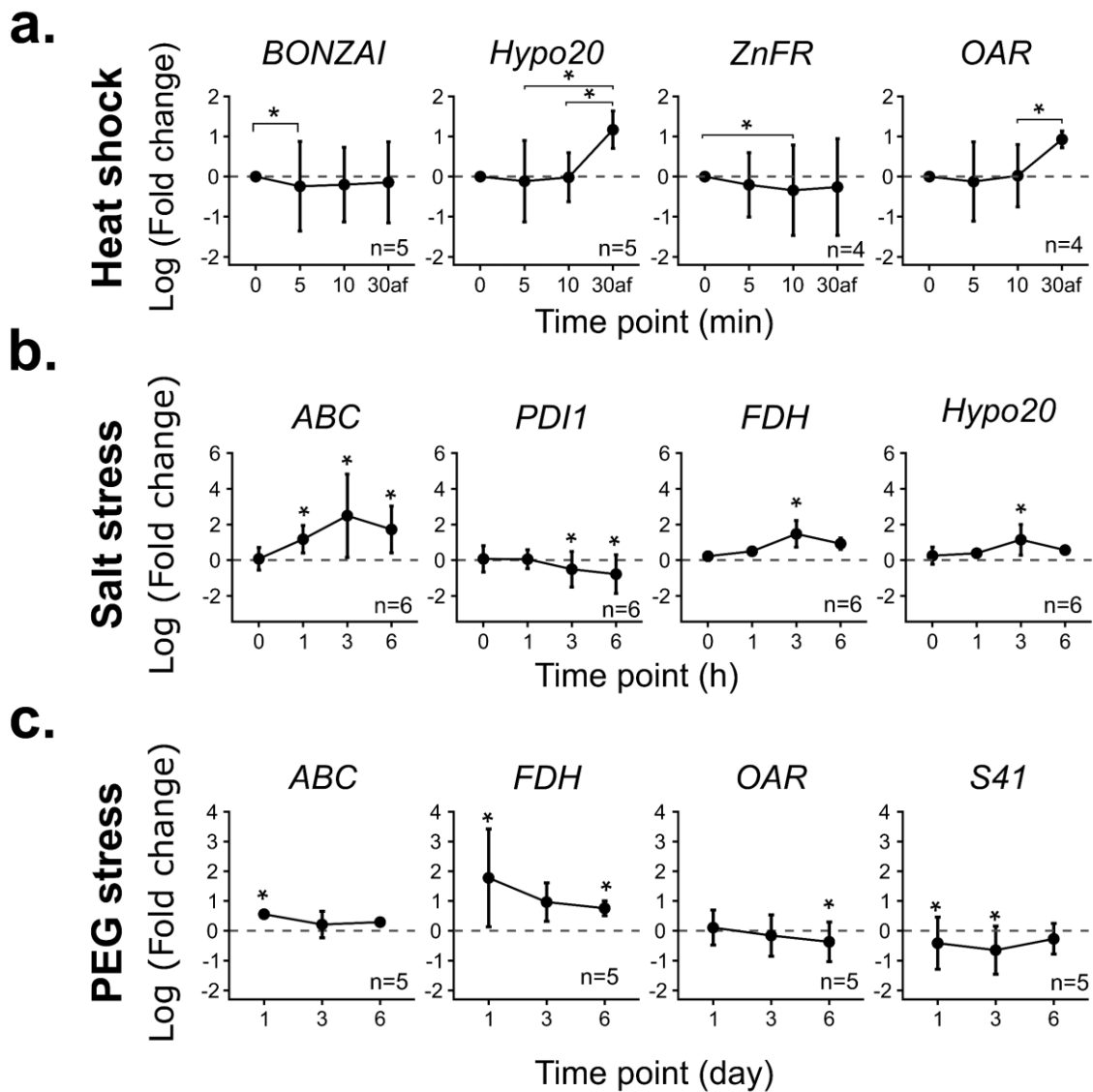


Figure 6. Log transform expression pattern of four marker genes in each abiotic stress normalized to the most adapted pair of reference genes. **a.** *BONZAI*, *Hypo20*, *ZnFR* and *OAR* mRNA amounts relative to control at 0 min were measured in response to heat shock. 30af: 30 min at 20 °C after heat shock. Statistically differences between each time point were determined using Kruskal-Wallis followed by Dunn test (* $P < 0.05$). **b.** *ABC*, *PDI1*, *FDH* and *Hypo20* transcripts accumulation relative to control were calculated in response to salt stress. Statistically differences between treated sample and control were determined using Kruskal-Wallis followed by Dunn test (* $P < 0.05$). **c.** *ABC*, *FDH*, *OAR*, and *S41* mRNA amounts relative to control were quantified in response to 30% (w/v) PEG induced dehydration stress. Statistically differences between treated sample and control were determined using Kruskal-Wallis followed by Dunn test (* $P < 0.05$).

appeared to be up-regulated, while S41, that codes for a peptidase, and OAR genes were down-regulated (Fig. 5b). All genes identified with statistically different fold changes (Fig. 4, 5) could be considered as markers for abiotic stress in *K. nitens*.

The monitoring of the accumulation of transcripts from nine genes (Fig. 6) demonstrated various behaviors according to the gene and the applied stress. Overall, our results provided a useful set of marker genes for studying gene expression in *K. nitens* under different abiotic stress conditions.

Validation of reference genes.

To demonstrate the reliability of the selected reference gene couples, we analyzed the expression level of the ABC gene in response to salt stress (Fig. 6b). In order to highlight the importance of adequate normalization, quantification of KnABC transcripts obtained by RT-qPCR under salt stress were normalized with the most appropriate reference genes pair (H3 + UBQ) and with the most inappropriate reference gene (eIF3G; Fig. 7). With the normalization of RT-qPCR using H3 and UBQ, KnABC mRNA amount statistically increased in the treated samples compared to the control as early as one hour of treatment with a fold change of 11. After three hours of treatment, a maximum fold change of 130 was reached, then half decreased after six hours, but remaining statistically different from the control (Fig. 7).

The normalization using eIF3G as reference gene resulted in differences that could distort interpretations. After 1 h, a statistically different increase was observed compared to control, whatever the reference genes used. After 3 h, the amount of KnABC mRNA reached its maximum fold change but the normalization with eIF3G led to a 4-fold overestimation and considerable spread of standard errors compared to the result obtained with the most appropriate reference genes. Finally, normalization with eIF3G, instead of the one with H3 and UBQ, resulted in the lack of a statistical difference in transcripts accumulation between NaCl-treated samples and controls after 6 hours of treatment (Fig. 7). These results highlighted the need for suitable and optimized reference genes for normalization of RT-qPCR result.

DISCUSSION

Due to its importance as a model organism, studies using *K. nitens* have been increasingly published and have been reported investigations focusing, for instance, on the evolution of auxin (Ohtaka *et al.*, 2017), jasmonate (Monte *et al.*, 2020), nitric oxide signaling (Chatelain *et al.*, 2021), the origin of mycorrhiza (Montero *et al.*, 2021), or the response to high light stress

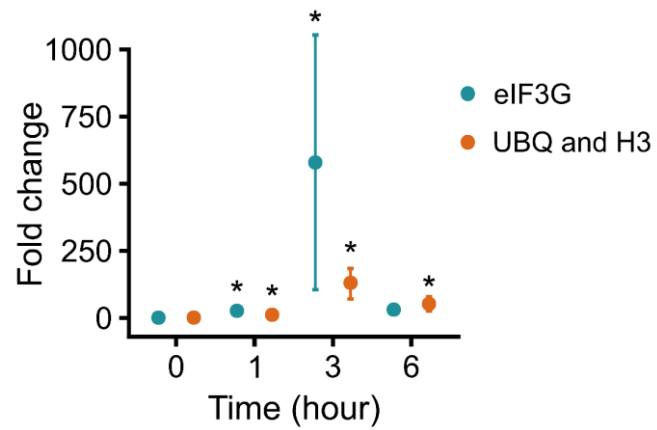


Figure 7. KnABC transcripts accumulation under salt stress condition relative to control. Each dot represent the mean of six biological repetitions, errors bar represent standard errors of the mean. The quantification was normalized with the worst reference gene candidate eIF3G in blue or with the optimal pair of reference gene UBQ and H3 in orange. Statistically differences between NaCl treatment and control were determined using Kruskal-Wallis followed by Dunn test (* $P < 0.01$).

(Serrano-Pérez *et al.*, 2022). Transcriptomic approaches using RT-qPCR are commonly used, because of their simplicity and low cost for laboratories (Bustin *et al.*, 2009). Therefore, one can predict that transcriptional analyses in *K. nitens* could expand in the coming years. Thus, the identification of adapted reference genes for the normalization step in RT-qPCR assay on *K. nitens* appeared necessary in order to obtain reliable results. Moreover, several studies have demonstrated the need of adapting reference genes to the experimental conditions (Dong *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2017). In the present study, we explored the expression stability of 12 candidate reference genes in *K. nitens* in response to salt, heat, and PEG-induced dehydration stresses. Each of the candidate was previously described as a reference gene either in algae (Simon *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015) or in other plant organisms (Shi *et al.*, 2012b; Moraes *et al.*, 2015) in response to different abiotic stresses.

The plot of Cq values gave first information on candidate variability expressions. However, the variability of Cq was not sufficient to determine optimal reference genes, since the stability of the expression but also an expression level above the background were required, according to the developers of Bestkeeper (Andersen *et al.*, 2004).

The most suitable reference genes to normalize our results were selected using 4 algorithms. NormFinder provides a stability value for each reference gene by estimating the intra- and inter-group expression variation. GeNorm recommends selecting genes by pairwise variation between a gene and the average of the other. BestKeeper determines a ranking of gene stability by performing Pearson correlations. The dCq method ranks candidate genes solely based on their expression variability. Interestingly, the rankings obtained for each method and each stress differed, each algorithm using its own calculation method. Such differences led us to use the RankAggreg package, so the ranking lists obtained for each method could be combined into an optimal list of reference genes (Pihur *et al.*, 2009).

Since it has been pointed out that RT-qPCR data normalized with a single reference gene present a bias (Bustin *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2020a; Zhang *et al.*, 2021), we kept the first two genes as the most suitable reference gene pair for normalization of RT-qPCR data in *K. nitens* for each condition tested. This study highlighted ACT and CitS, H3 and UBQ, and finally eIF6 with CitS, in conditions of heat shock, salt stress and PEG-induced dehydration, respectively. These genes were already described as reference gene in other organisms. Indeed, actin has been used for years as a reference gene, especially in Northern blot experiments (Huggett *et*

al., 2005). Its use is recommended in rice in response to salt, or in common bean in response to various abiotic stresses (Borges *et al.*, 2012). Commonly used reference genes often display relatively high mRNA amounts in cells (Huggett *et al.*, 2005), such as genes coding for histones. Accordingly, in *K. nitens*, H3 exhibited a low Cq in response to heat stress. Another criterion for the selection of reference genes is their involvement in basic cellular processes such as protein translation or ubiquitin-dependent protein degradation. For instance, eIF6 and UBQ were used as reference genes in *A. thaliana* (Czechowski *et al.*, 2005) or in tomato leaves (Løvdaal and Lillo, 2009).

Finding citrate synthase as a reference gene was less predictable, since up-regulation of citrate synthase has been observed in maize during germination and in response to light (Eprintsev *et al.*, 2018), or in tea plants under drought stress (Gai *et al.*, 2020). However, citrate synthase has been selected as a reference gene in medicinal plant *Glycyrrhiza* (Li *et al.*, 2020b) and in *K. nitens* in previous RT-qPCR experiments (Ohtaka *et al.*, 2017).

In order to develop a full set of molecular tools for the analysis of *K. nitens* responses to environmental conditions, we investigated genes that were differentially expressed during heat shock, salt stress and PEG-induced dehydration. In response to heat shock, mRNA amounts of Hypo20 and OAR, two oxidoreductases, displayed a statistically significant increase. The induction of OAR (3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase) that participates in lipid metabolism, appeared not so surprising since the composition of membranes is strongly impacted by temperature changes (Zhou *et al.*, 2020). Furthermore, OAR has been previously detected as up-regulated in response to heat stress in the herbaceous peony *Paeonia lactiflora* Pall. (Hao *et al.*, 2016). Following heat shock, the level of ZnFR and BONZAI mRNA significantly decreased, whereas we expected an upregulation of these two genes. Indeed, BONZAI, a calcium-dependent phospholipid-binding Copine protein, has been previously described as being involved in the regulation of Ca²⁺ during osmotic stress (Chen *et al.*, 2020). In case of ZnFR, a Zinc finger RING-type domain containing protein, several proteins of the RING-protein family have been found to be up-regulated in response to heat stress, notably in hot pepper (Zeba *et al.*, 2009) and in *A. thaliana* (Agarwal and Khurana, 2018). In *K. nitens*, Hypo20 and OAR could be reliable indicators of the recovery after heat shock, while ZnFR and BONZAI could be used as early marker genes during heat shock.

During salt stress, ABC, FDH and Hypo20 were up-regulated. As previously shown in rice and *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2015), ATP-binding cassette transporter emerged as

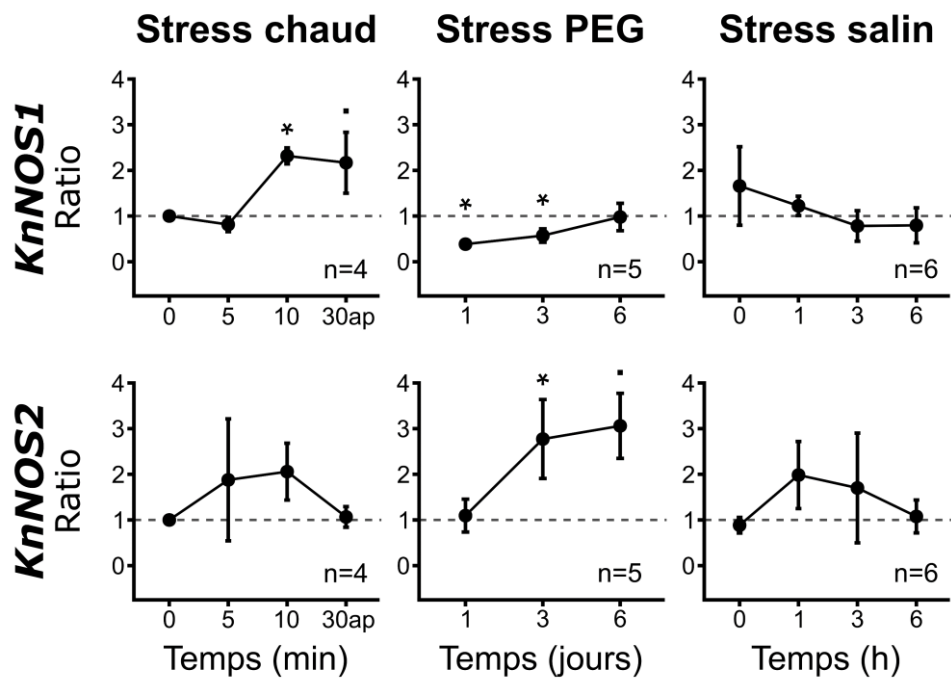


Fig. II.2. Accumulation de l'ARNm des deux KnNOS. Le ratio correspond à l'expression au point de la cinétique par rapport à l'expression du témoin symbolisé par la ligne pointillée. Les différences statistiques entre chaque point et le témoin (ligne pointillée) ont été déterminées à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunn (*P < 0,1 ; *P < 0,05).

the most suitable salt stress marker gene. The mRNA level increase of FDH was also consistent with studies in various plants in response to both biotic and abiotic stresses (McNeilly *et al.*, 2018). During salt stress response in *K. nitens*, a Protein disulfide isomerase 1 (PDI1), involved in the ER stress response (Gupta and Tuteja, 2011), was down-regulated. Nevertheless, the gene expression of this type of enzyme is difficult to predict, since its expression variability is high even within the same species or between ecotypes, as in Chinese cabbage where no less than 32 PDI have been identified and forms a large multigene family (Kayum *et al.*, 2017).

In the case of PEG-induced dehydration stress, ABC and FDH were also found to be up-regulated in *K. nitens*. As salt and heat shock also triggered osmotic stress, it is not surprising to find common marker genes between these stresses. For example, some ABCs genes have been found as up-regulated in response to NaCl and PEG stresses in *Brassica rapa* (Yan *et al.*, 2017). It was also interesting to observe that the decrease of the mRNA levels of OAR and S41 appeared at different time points during the PEG kinetics. OAR would thus indicate long-term dehydration stress while S41 would be indicative of earliest responses.

Finally, to validate the relevance of our methodology for the reference gene selection in *K. nitens*, the transcript level of KnABC was monitored under salt stress conditions and normalized with the most appropriate reference gene pair (H3 + UBQ) and with the most inappropriate reference gene (eIF3G). Misinterpretations and overestimations have resulted from the use of eIF3G in monitoring KnABC transcript level. Previously, several cases of improper evaluation due to the use of inappropriate reference genes have already been reported (Dong *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020a).

This study identified the molecular tools needed to produce reliable RT-qPCR data following abiotic stresses in the model algae *K. nitens*. Given the increasing amount of studies on this model, this work will facilitate further understanding of the biological adaptations that allowed the colonization of land by ancestral plant lineages.

2. Accumulation des transcrits des deux *KnNOS* en réponse à trois stress abiotiques chez *K. nitens*

L'obtention de ces outils moléculaires nous a permis de suivre les profils d'accumulation de l'ARNm des deux *KnNOS* en réponse aux trois stress abiotiques. Les profils d'accumulation de l'ARNm diffèrent entre les deux *KnNOS* et selon les stress appliqués.

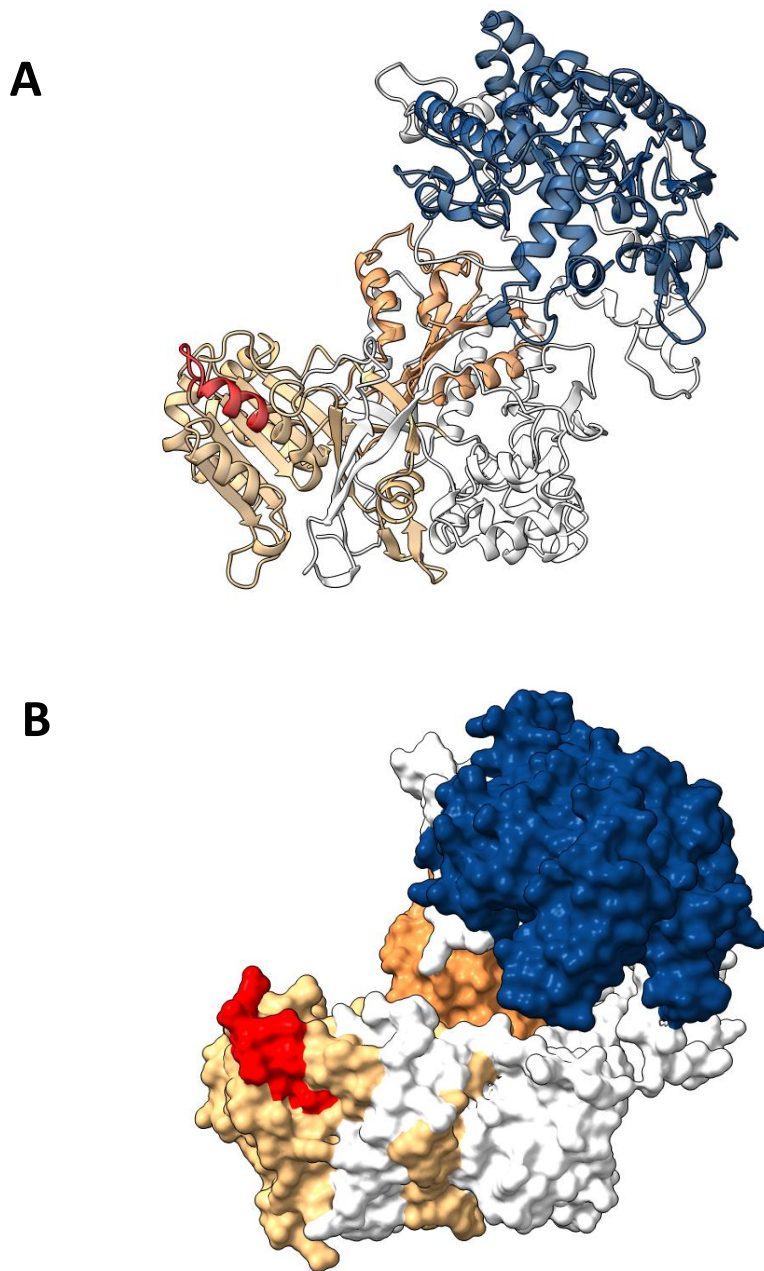


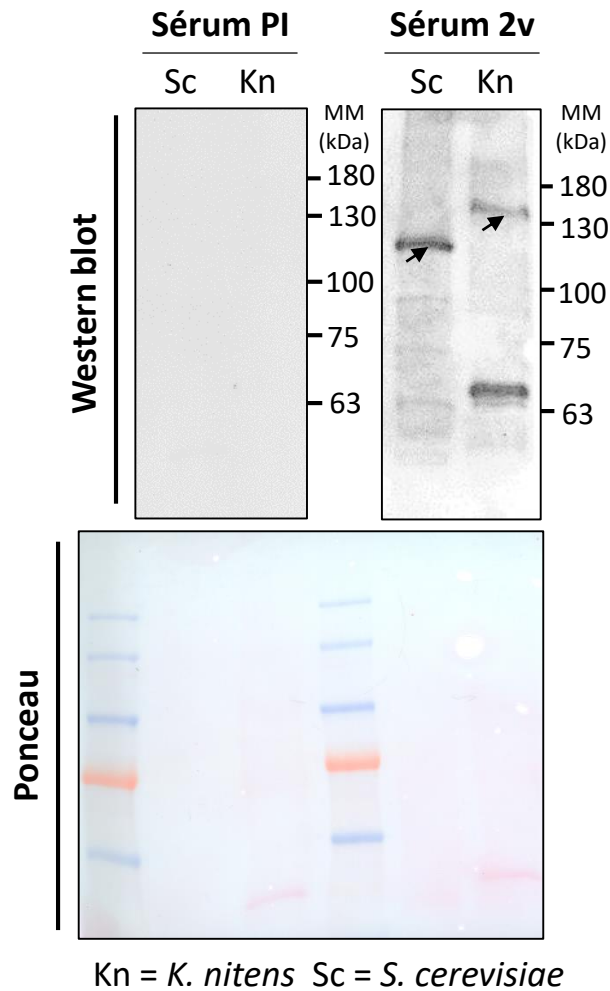
Fig. II.3. Modèle AlphaFold de la protéine KnNOS1. Le domaine oxygénase est représenté en bleu foncé, le domaine FMN en orange, le domaine FNR en orange clair. Les acides aminés en rouge correspondent au peptide utilisé pour la synthèse de l'anticorps spécifique de la KnNOS1. **A)** Vue schématique avec structures secondaires. **B)** Vue avec modélisation de la surface.

Concernant le gène *KnNOS1*, nous avons observé une accumulation significative de son ARNm après 10 min de stress chaud à 45 °C (**Fig. II.2**). La teneur en ARNm *KnNOS1* reste plus élevée de manière significative lorsque les algues sont remises en culture à 20 °C pendant 30 min après la fin du stress chaud. A l'inverse, en réponse à un stress osmotique induit par 30 % (m/v) de PEG une diminution significative de la teneur en ARNm de la *KnNOS1* a été observée après une journée et de manière stable jusqu'à 3 jours de traitement par rapport au niveau d'ARNm de la fiole témoin. Après 6 jours, le niveau d'ARNm de la *KnNOS1* retourne à son niveau basal. En réponse au stress salin, aucun changement significatif dans le niveau d'ARNm de la *KnNOS1* n'a été mesuré. Le profil d'accumulation des ARNm de la *KnNOS2* est nettement différent de celui de la *KnNOS1*. En effet, en réponse au stress chaud aucune accumulation significative de l'ARNm de la *KnNOS2* n'a été observée. Contrairement à la *KnNOS1*, nous avons observé une augmentation significative de l'ARNm de la *KnNOS2* à partir de 3 jours de traitement 30 % (m/v) PEG et ceux jusqu'à 6 jours. En réponse au stress salin, aucune différence significative dans le profil d'accumulation de l'ARNm de la *KnNOS2* n'a été détectée. Ainsi, les *KnNOS1* et 2 présentent des profils d'abondance de transcrits qui diffèrent en fonction du stress appliqué.

3. Détection de la protéine KnNOS1 par western blot

Plusieurs anticorps reconnaissant des NOS de mammifères sont disponibles sur le marché. Ces anticorps sont spécifiques d'une isoforme de NOS et certains peuvent être utilisés chez plusieurs espèces (Coers *et al.*, 1998). La société Sigma a également commercialisé un anticorps dit universel, car capable de reconnaître les trois isoformes de NOS (Sigma-Aldrich, universal NOS N-217). Cet anticorps est dirigé contre le peptide 1113-1122 (DQKRYHEDIFG) de la iNOS et de la nNOS de souris (Q9Z0J4 ; P70313). Toutefois, cet anticorps reconnaît également les NOS de porc, de bœuf, de rat et humaine. Étonnamment, les NOS d'un papillon *Bombyx mori* ont également été détectées par cet anticorps, bien que ces deux NOS ne possèdent que 47 % d'identité avec celles de la souris.

Au laboratoire, nous disposons de deux anticorps dirigés contre des protéines NOS, l'anticorps universel de la société Sigma (universal NOS N-217) et un anticorps dirigé contre la iNOS de souris de la société Abcam (ab205529). Ces deux anticorps ont été testés sur un extrait protéique de *K. nitens* et sur une culture bactérienne surexprimant la KnNOS1 sans toutefois permettre la détection d'une bande spécifique correspondant à l'une des deux NOS



Kn = *K. nitens* Sc = *S. cerevisiae*

Fig. II.4. Test de la spécificité de l'anticorps dirigé contre la KnNOS1 par western blot. Des extraits protéiques d'algue (Kn) et de levure surexprimant la KnNSO1 (Sc) ont été mis en contact du sérum pré-immun (PI) et du sérum après deux injections (2v) du peptide 966-980 (LLQRSVLNRRARGVG) de la protéine KnNOS1 (A0A1Y1HXQ9). Les flèches indiquent les signaux, dont les masses moléculaires correspondent à la KnNOS1.

(résultat non montré). Une immunoprécipitation utilisant l'anticorps universel NOS N-217 de Sigma, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse n'a pas non plus été suivie de l'identification de KnNOS (résultats non montrés).

Afin de suivre l'abondance de la protéine KnNOS1, un anticorps spécifique a été commandé *via* le service dédié de l'entreprise d'Agrisera. Le peptide choisi pour l'immunisation des lapins correspond aux acides aminés 966-980 de la KnNOS1, localisés sur une boucle externe de la protéine afin d'espérer utiliser l'anticorps en immunoprécipitation (**Fig. II.3**). Afin de vérifier que l'anticorps reconnaissait bien uniquement la protéine KnNOS1, un western blot sur un extrait protéique de *K. nitens* et sur un extrait protéique de levure surexprimant la KnNOS1 recombinante (utilisé comme témoin positif ; protocole d'obtention décrit dans le **CHAPITRE III**) a été réalisé avec du sérum de lapin suite à deux injections de peptide (sérum 2v). Aucune bande n'a été visualisée après incubation de la membrane avec le sérum pré-immun (prélevé sur le lapin avant injection du peptide), signifiant qu'avant injection du peptide spécifique de la KnNOS, le lapin ne contenait bien aucun anticorps reconnaissant des protéines de la masse molaire de la KnNOS1. L'utilisation du sérum 2v en western blot a révélé une bande unique correspondant à la masse moléculaire de la KnNOS1 dans les extraits protéiques de levure surexprimant la KnNOS1 (**Fig. II.4**). Dans les extraits protéiques de *K. nitens*, deux signaux immunoréactifs ont été détectés, le signal le plus haut correspond à une protéine d'environ 130 kDa et le plus bas à une protéine d'environ 63 kDa (**Fig. II.4**). D'après les logiciels de prédiction⁵, la masse moléculaire théorique de la KnNOS1 s'élèverait à 120,7 kDa. La présence d'un signal additionnel de masse moléculaire plus faible pourrait être expliquée par une forme clivée de la KnNOS1. En effet, le domaine réductase seul, reconnu par l'anticorps, donnerait un signal aux alentours de 63 kDa. Par ailleurs, la masse moléculaire de la protéine endogène issue de l'extrait protéique de *K. nitens* diffère d'une dizaine de kDa de celle de la protéine KnNOS1 surexprimée chez la levure (120 kDa en levure et 130 kDa chez *K. nitens* ; **Fig. II.4**). Cette augmentation de masse pourrait correspondre à l'ajout de modification post-traductionnelle sur la protéine endogène, telle que des palmitoylations, comme sur la NOS2 et NOS3 humaine (Feron *et al.*, 1998; Navarro-Lérida *et al.*, 2004), ou de la N-myristoylation, observée sur la NOS3 (Liu *et al.*, 1997). Afin d'étayer cette hypothèse, un logiciel de prédiction des sites de N-myristoylation et de S-palmitoylation a été utilisé. Un site de N-myristoylation

⁵ <https://web.expasy.org/protparam/>

1 MGPFFANCFGRPRISAELPAVDDSSSEKEPKLDTEKCRHQAGWEKSSDDERPA 50
 51 WDAPSCPFKHGTVTVTPYPGFVHGKNPAVCSGCKPVVDLLETPEKELVC 100
 101 EALEFQELYHHEKQSPKDVKARRVLEILASIDKEGTYSHTTDELEHGVRV 150
 151 AWRNAPKCSNRKYWSTLRLLDKRHVSTAEGMNEACLEMMDLAVSSGAAEV 200
 201 YVTVFRPEHPLTKQGGPRVWNLQLMRFAGYRQPDMEVKGDPSELAFTTEML 250
 251 TRHFGWKGGEGTNFDILPLVLQPSDPKKPELFEVSPQYVPLVPLTHPNHPW 300
 301 FGGLGLRWYGI PCVSDMQLTLGGLKYTGAPFTGWYADTEIIRNLSDESRV 350
 351 NVLP I IANHLGLAVNDNSSLWKDAALLALNQAILYSWQRAGIAMTDHHTL 400
 401 MEQFWKWHHDEKAARGYTPTNWKWIIPPVAASTSKCYLGLSKATEYTLQP 450
 451 AYIRSPKFKVYAREWFGGRFEYSPGAPLRPAFLNPNYVCRFLGRCKARVAA 500
 501 ARPRAVVMYASMTGTAREFALRTSSALGSADFVTTISIEEFSTVDLASAN 550
 551 LLLLLISTCGSGSLPTSALKFLDWAAAHGGSPKSPVAGLRFVFLGSRV 600
 601 YPRFCAAADTVHAAARAAGGASLTSVGRGDQMGDRDSAFSHWMRRTVESF 650
 651 ASAVKPKYERATSCVLAQLEERSPPNPSFTCRYQIVPLAGSQR IAPVADG 700
 701 FLTARVLTCEELLPKSPEGRSSKLIGLDL SGAPEALYEPGDHVSVLPTNN 750
 751 HVDRVALARFAAHFSIPLSQPFDEPLFVDGPMGGAPPYPLPNTLWNLIT 800
 801 RHVALLAPVRFEALAPLSKYAGQKVQIDILAELGGDEQLFDTWNSRQTR 850
 851 WLDIFDLFASLSQNL PVEVFLQLAPP I HARHYSVASSALASPGEAHLLCG 900
 901 KTAWSAPGGGRRRTGSCSGYLTEGVQPGDDVRMQILKVSSFKLPLNSQHPV 950
 951 IMVAAGTGFAPLRGFLLRQSVLANRARGVGPCALLYGCRSEEDLSRKEC 1000
 1001 NTAAAAGALSFRSVAFSRDRNHPKEYVQDKLRQCAERLAPLLENPNCHVY 1050
 1051 VCGSSRMADGVAAAFRFL LGPKRFGAMASSGRYHEEVFSTMEPTGPNGT 1099

N-Myristoylation ■

S-Palmitoylation ■

Fig. II.5. Prédiction de modifications lipidiques sur la séquence protéique de la KnNOS1. Le domaine oxygénase est représenté en bleu foncé, le domaine FMN en orange, le domaine FNR en orange clair. Le site prédit de N-myristoylation est surligné en rose pâle (glycine 2) et ceux de S-palmitoylation en bleu clair (cystéine 7, 559 et 899).

a été prédit sur la glycine 2 de la KnNOS1 et 3 sites de S-palmitoylation ont été identifiés sur les cystéines 7, 559 et 899 (**Fig. II.5**). L'augmentation de la sélectivité du logiciel mène à l'élimination des sites de S-palmitoylation des cystéines 559 et 899.

La validation du sérum 2v a conduit à la purification de l'anticorps par Agrisera. De nouveaux western blots, avec l'anticorps purifié, ont alors été réalisés. Cependant, même si un signal a bien été détecté à la bonne masse moléculaire dans les extraits protéiques de levure surexprimant la KnNSO1, aucun signal immunoréactif n'a pu être détecté dans les extraits protéiques de *K. nitens* ; et ce quelle que soit la quantité de protéines déposée sur gel (**Fig. II.6A**). L'absence de détection de la KnNOS1 dans les extraits endogènes une fois l'anticorps purifié pourrait s'expliquer par une faible proportion de protéine KnNOS1 par rapport aux protéines extraites. La détection de la KnNOS1 serait plus difficile suite à la purification de l'anticorps, cette purification entraînant nécessairement un gain en qualité mais une perte en quantité d'anticorps. Le tampon d'extraction utilisé contient 0,5 % (v/v) d'Igepal CA-630, un détergent non ionique permettant la solubilisation de protéines et complexes membranaires en conditions natives. Par ailleurs, il a été montré que les KnNOS de mammifères étaient associées aux membranes. Par exemple, la NOS2 de souris est retrouvée sous forme cytosolique mais également sous une forme particulière, c'est-à-dire associée à des vésicules (Vodovotz *et al.*, 1995), alors que la NOS3 est associée aux membranes de l'appareil de Golgi ou aux cavéoles des cellules endothéliales (Liu *et al.*, 1997). Afin d'augmenter la solubilité des protéines liées aux fractions membranaires et de potentiellement augmenter la proportion de la KnNOS1 dans l'extrait protéique, plusieurs détergents ont été testés : le SDS 2 % (v/v), un détergent anionique dénaturant, le CHAPS 0,5 % (m/v), un détergent zwitterionique non dénaturant utilisé pour étudier les récepteurs et protéines membranaires qui rompt les interactions protéine-protéine, et le DDM 5 % (m/v), un détergent non ionique utilisé régulièrement dans l'étude des protéines membranaires qui permet entre autres la stabilisation et la préservation de l'activité des enzymes membranaires. Toutefois, nous n'avons pas immunodétecté la KnNOS1 avec l'anticorps purifié suite aux extractions protéiques réalisées avec ces différents détergents (**Fig. II.6B**).

D. Discussion et perspectives

Cette étude nous a permis de mettre au point des outils nécessaires à la réalisation de RT-qPCR chez le nouvel organisme modèle *K. nitens*. Ainsi, ont été identifiés comme gènes de

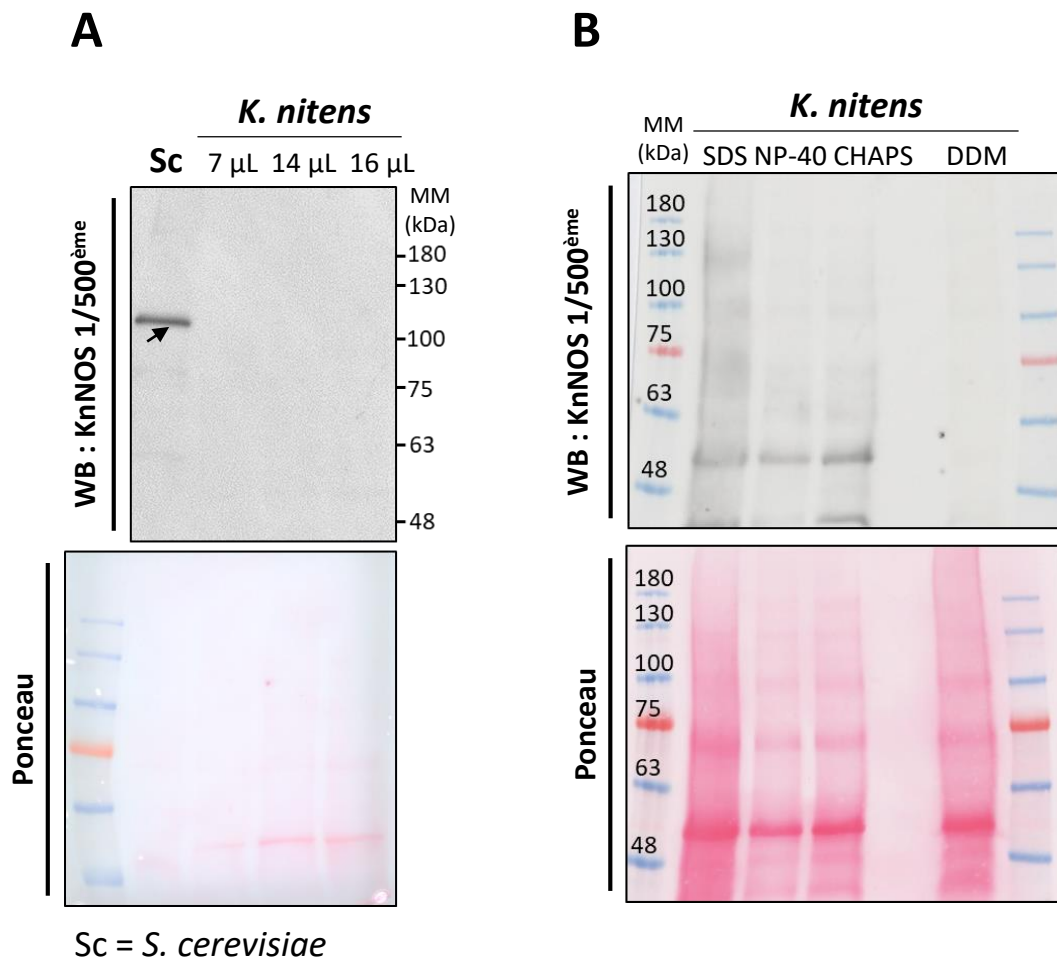


Fig. II.6. Immunodétection de la KnNOS1 via l'anticorps purifié. **A)** Western blot sur des extraits protéiques de levure surexprimant la KnNSO1 (Sc) ainsi que sur des extraits protéiques de *K. nitens*. Différents volumes d'extraits protéiques ont été déposés sur gel. La flèche indique le signal dont la masse moléculaire correspond à la KnNOS1. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 répétitions biologiques indépendantes. **B)** Western blot sur des extraits protéiques de *K. nitens*, différents détergents ont été additionnés au tampon d'extraction : NP-40 0,5 % (v/v), SDS 2 % (v/v), CHAPS 0,5 % (m/v) et DDM 5 % (m/v).

référence les couples ACT /CitS, H3/ UBG, et eIF6 /CitS, respectivement adapté chez *K. nitens* en conditions de stress chaud, de stress salin et de déshydratation induite par le PEG.

L'établissement des conditions d'analyse de RT-qPCR chez *K. nitens* nous a permis d'investiguer les profils d'accumulation de l'ARNm des deux isoformes de *KnNOS* en réponse aux trois stress abiotiques choisis. Aucune des deux *KnNOS* n'a présenté une accumulation d'ARNm en réponse au stress salin. Bien qu'il soit difficile de comparer les modèles biologiques, chez le rat une charge chronique de 2 % (m/v) en NaCl conduit à l'augmentation de l'expression de la NOS1 dans l'hypophyse concomitante à une augmentation de son activité dans l'hypothalamus (Kadowaki *et al.*, 1994). Chez les algues, le NO semble également impliqué dans la réponse à de nombreux stress abiotiques dont le stress salin (Astier *et al.*, 2021), en réponse auquel *C. reinhardtii* arbore un profil spécifique de s-nitrosation des protéines (Chen *et al.*, 2016). Toutefois, ces organismes étant dépourvus de NOS, il est possible que les mécanismes de réponse au stress salin chez *K. nitens* mobilise également des sources de production de NO indépendantes des NOS, ce qui pourrait expliquer les résultats de qPCR.

En réponse à un stress chaud, seule la *KnNOS1* présente une accumulation significative de son ARNm. Chez l'homme au niveau cutané, l'application d'un stress chaud localisé implique uniquement la *NOS3* alors qu'au contraire l'application d'un stress chaud global mobilise la *NOS1* (Kellogg *et al.*, 2009). L'implication spécifique des isoformes de NOS en réponse au stress chaud semble toutefois varier selon la température, la durée du stress et les espèces. Par exemple, chez la chèvre, les ARNm et les protéines des trois isoformes de NOS s'accumulent lors des périodes de fortes chaleurs (Yadav *et al.*, 2016). Enfin, chez l'algue *Symbiodinium microadriaticum*, l'application d'un stress chaud provoque également une accumulation de NO mais dans cette étude, la source enzymatique du NO produit n'a pas pu être déterminée (Bouchard and Yamasaki, 2009).

Contrairement au stress chaud, un stress hydrique induit par le PEG conduit à l'accumulation de l'ARNm de la *KnNOS2* et à une diminution significative du taux d'ARNm de la *KnNOS1*. Chez le rat, l'activité de la NOS augmente chez les animaux déshydratés (Pow, 1992). Chez les organismes chlorophylliens dépourvus de NOS, le NO est également impliqué dans la résistance au stress hydrique. De manière intéressante, chez *A. thaliana*, l'expression d'une NOS de rat conduit à une augmentation de la résistance à la déshydratation (Shi *et al.*, 2012a),

ce qui laisserait penser que les fonctions du NO pourraient être assurées quel que soit les sources de sa production. La présence ou l'absence de NOS chez des algues phylogénétiquement proches pourrait permettre d'étudier cette question.

Ces résultats mettent en avant les différences de profils d'accumulation de l'ARNm des deux *KnNOS*. Nous pouvons supposer que les deux *KnNOS* sont sous-fonctionnalisées, comme c'est le cas pour les trois *NOS* chez les mammifères (Andreakis *et al.*, 2011; Annona *et al.*, 2022). En effet chez les mammifères, si l'ARNm de la *NOS2* s'accumule notamment en réponse aux cytokines, à l'interleukine ou encore aux LPS, les *NOS1* et *NOS3* s'expriment majoritairement de manière constitutive (Förstermann and Kleinert, 1995). Cependant, une induction du gène *NOS1* a été observée en réponse aux œstrogènes ou encore à un stress salin chronique, alors qu'une accumulation d'ARNm du gène *NOS3* a été observée également en réponse aux œstrogènes et aux forces de cisaillement exercées par le sang sur la paroi des vaisseaux sanguins (Förstermann and Kleinert, 1995). De plus, ces isoformes, bien qu'ayant la même fonction (*i.e.* la production de NO), sont exprimées dans des tissus différents (Förstermann and Kleinert, 1995). Il est toutefois difficile de transposer la sous-fonctionnalisation des *NOS* de mammifères à celle de *K. nitens* puisque les conditions d'induction diffèrent et qu'il n'y a un seul type cellulaire chez *K. nitens*. Compléter ces résultats avec les données d'abondance des protéines *KnNOS* permettrait d'étayer notre hypothèse sur la sous-fonctionnalisation des deux *NOS* de *K. nitens*, notamment en étudiant d'éventuelles disparités de dynamique d'abondance des deux *KnNOS* entre les compartiments cellulaires et en fonction des réponses physiologiques.

Les anticorps commerciaux testés sur les extraits protéiques de *K. nitens* n'ayant pas permis de mettre en évidence un signal correspondant à l'une des deux *KnNOS*, nous avons dans un premier temps fait produire un anticorps spécifique de la *KnNOS1*. Le peptide immunogène choisi correspond à la séquence A0A1Y1HXQ9, positionnée en surface de la protéine dans sa structure tridimensionnelle d'après nos simulations afin d'optimiser la possibilité que cet anticorps fonctionne également en immunoprécipitation en conditions natives (*cf.* **CHAPITRE III**). Les résultats obtenus sur les lignées de levure surexprimant la *KnNOS1* (témoin positif de western blot), ainsi que l'absence de signal suite à l'utilisation du sérum pré-immun à la place de l'anticorps (témoin négatif) nous ont permis de vérifier la spécificité de l'anticorps. Cependant, les résultats obtenus sur les extraits protéiques de *K. nitens* sont plus nuancés. Les

western blot réalisés avec le sérum 2v, avant la purification de l'anticorps, révèlent deux signaux majoritaires à 130 kDa, soit environ 10 kDa au-dessus de la masse moléculaire théorique de la KnNOS1, et à 63 kDa, qui pourrait correspondre au résultat d'un clivage de la protéine. L'adjonction de modifications post-traductionnelles sur la protéine endogène peut engendrer un retard de la migration sur gel dû à une masse moléculaire et un encombrement stérique plus important (Greaves *et al.*, 2008). Plusieurs sites d'ajout de lipides ont été détectés dans la séquence de la KnNOS1 : un site de N-myristoylation sur la glycine 2 et 3 sites de S-palmitoylation sur les cystéines 7, 559 et 899. L'hypothèse la palmitoylation pourrait être vérifiée par plusieurs méthodes. Il serait possible de traiter les échantillons protéiques avec une enzyme telle que l'*Acyl-protein Thioesterase 1* (APT1), qui catalyse la dépalmitoylation, son efficacité ayant été confirmée sur la eNOS de mammifères (Yeh *et al.*, 1999). Après traitement avec APT1, si la différence de masse moléculaire est dû à une S-palmitoylation de la protéine endogène, le signal obtenu à partir des extraits de *K. nitens* devrait être détecté à la masse moléculaire de la KnNOS1 produite en levures. Une technique plus difficile à mettre en place serait l'utilisation de radio marquage avec du palmitate[H^3], après avoir cultivé les algues en présence de palmitate[H^3] et extraction des protéines, l'immunoprécipitation de la KnNOS1 puis sa migration sur SDS-PAGE mèneraient la détection du palmitate[H^3] par fluorographie (Resh, 2006). Enfin, cette hypothèse pourrait être vérifiée grâce à l'utilisation de kit de détection des modifications post-traductionnelles, révélant par fluorescence sur gel 1D ou 2D les protéines palmitoylées (Abcam : ab273282) et myristoylées (Abcam : ab273270).

Bien que les résultats obtenus lors de l'utilisation du sérum 2V aient permis de visualiser un signal correspondant à la protéine endogène, aucun signal correspondant à la masse moléculaire de la KnNOS1 n'a été détecté après purification de l'anticorps. Il est envisageable qu'après purification l'anticorps ne soit plus assez concentré pour détecter la KnNOS1, bien qu'utilisé à 1:500^{ème} alors que le sérum 2v a été utilisé à 1:1000^{ème}. De nouvelles optimisations sont nécessaires afin de pouvoir utiliser l'anticorps purifié en western blot pour la détection de la KnNOS1 (concentration protéique, concentration en anticorps ...).

En conclusion, les résultats de RT-qPCR nous ont permis d'émettre l'hypothèse de la sous-fonctionnalisation des protéines KnNOS1 et KnNOS2. Pour le moment, les conditions de western blot ne nous ont malheureusement pas permis de réaliser un suivi de l'abondance de

la KnNOS1 en réponse aux trois stress abiotiques déjà mis en place. L'inactivation spécifique de l'une et de l'autre des isoformes pourrait permettre d'étudier leur fonction respective.

CHAPITRE III

Stratégies d'identification des
partenaires protéiques de la KnNOS1

A. Contexte de l'étude

Les interactions protéine-protéine (IPP) sont des événements cruciaux dans les mécanismes de signalisation cellulaire, que ce soit pour la synthèse de protéines, la dimérisation de récepteur, ou encore la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme. Au vu de la diversité des modes de régulation des IPP, il n'est pas étonnant que les techniques pour les étudier soit en pleine expansion. En effet, depuis les années 2000 de nombreux outils ont été développés, *via* l'utilisation de techniques de biochimie, comme la co-immunoprécipitation et le pull-down, de microscopie, avec le FRET et le BiFC, ou encore de biologie moléculaire, avec la technique du double hybride, ou plus récemment par l'introduction d'acide aminé non naturel dans les protéines d'intérêts afin de fixer de manière covalente leurs interactions les plus labiles par un traitement aux UV (Xing *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2018). Plus récemment, les IPP sont également devenues des cibles moléculaires dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques, en effet dans l'interactome humain, plus de 645 000 IPP ont été décrites comme impliquées dans les maladies (Mabonga and Kappo, 2019).

L'étude des IPP des NOS de mammifères a permis de caractériser différents mécanismes de régulation des NOS et de mieux appréhender la signalisation NO, notamment à travers l'étude de la S-nitrosation des partenaires des NOS (Hess *et al.*, 2005). En effet, il a été mis en évidence que les trois isoformes de la NOS, à travers la formation de complexes protéiques, orientent la S-nitrosation vers des cibles spécifiques (Wynia-Smith and Smith, 2017). Au sein de ces complexes protéiques, certains partenaires influencent également la signalisation NO en régulant l'activité des NOS elles-mêmes (Cinelli *et al.*, 2020).

1. Les NOS, actrices de complexes protéiques

a) Un environnement favorable aux modifications post-traductionnelles

Les NOS, en participant à des complexes protéiques, influencent la S-nitrosation et donc la signalisation NO, la génération de nitrosothiols étant contrôlée dans l'espace et dans le temps (Wynia-Smith and Smith, 2017). De plus, la S-nitrosation requiert des changements dans la conformation de la protéine cible, que ce soit dans l'environnement électrostatique, l'hydrophobie ou la contiguïté et de l'orientation des chaînes latérales aromatiques, rendant ainsi les thiols cibles accessibles. Des IPP peuvent contrôler ces changements et promouvoir ainsi la S-nitrosation (Hess *et al.*, 2005). Chaque isoforme de NOS, en participant à des

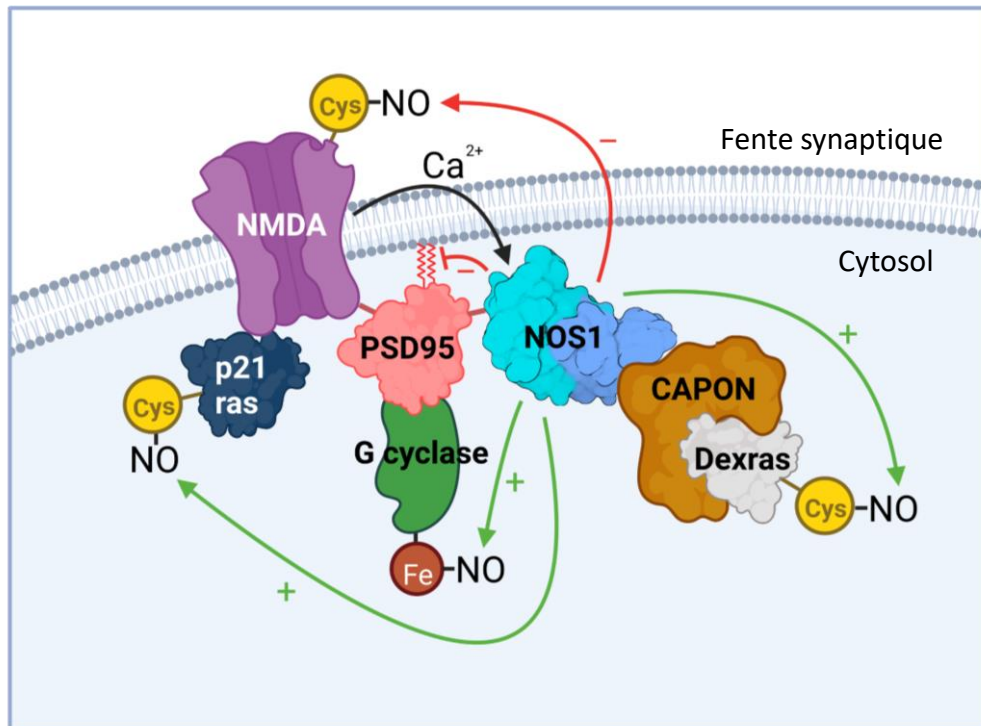


Fig. III.1. Représentation schématique du module de signalisation multi-composants de la NOS1 et du récepteur NMDA. Le récepteur NMDA est lié à la NOS1 par une protéine d'échafaudage PSD95 *via* son ancrage à la membrane par S-palmitoylation (zig-zag rose). NMDA en contrôlant l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule, active la NOS1 ce qui conduit à une augmentation locale de la production de NO. Plusieurs protéines de ce complexe sont régulées par le NO produit par la NOS1, la protéine G Dexras est activée par S-nitrosation tout comme la protéine p21 ras et de manière indépendante. PSD95 permet également le recrutement d'une guanylate cyclase qui est activée par métal-nitration. NMDA est inhibé par S-nitrosation ce qui permet la mise en place d'un rétrocontrôle négatif. La dépalmytolation de la protéine PSD95 par une palmitoyl-thioestérase recrutée par NMDA libère les cystéines normalement palmitoylées de la PSD95 qui seront S-nitrosées, conduisant à la dissociation du complexe protéique NMDA, PSD95 et NOS1. Adaptée de Stamler *et al.*, (2001).

complexes, favorise la S-nitrosation de certains de ces partenaires de manière spécifique. En effet, des études protéomiques comparant des souris sauvages à des souris mutantes n'exprimant pas la NOS1 ou la NOS3 ont permis d'identifier plus de 100 sites de S-nitrosation sur les protéines cibles. Or, la majorité de ces sites sont spécifiques d'une seule isoforme (Doulias *et al.*, 2013; Raju *et al.*, 2015).

Une étude menée par Wynia-Smith (2017) a établi une liste non exhaustive de protéine S-nitrosées interagissant avec chacune des trois isoformes de NOS. Ainsi, la cyclo-oxygénase 2, l'arginase 1 ou encore l'intégrine $\alpha 6$ interagissent avec la NOS2. La dynamine 2, la β -arrestine 2 ou encore HSP90 interagissent avec la NOS3 ; alors que la glukokinase, la protéine OGT (*O-linked N-acetylglucosamine transferase*), la protéine PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) ou encore la protéine Dexras interagissent avec la NOS1. Parmi ces exemples, l'interaction de la NOS1 avec la protéine PSD95 et Dexras, constitue une illustration remarquable de l'aspect spatio-temporel de la signalisation du NO. En effet, dans les neurones, la NOS1 participe à un complexe protéique dont l'association et la dissociation sont régulées par S-nitrosation (**Fig. III. 1**). La NOS1 est en grande partie liée à la membrane due à son interaction avec la protéine PSD95 qui, lorsqu'elle est palmitoylée, est associée de manière stable à la membrane. Le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) se lie également à PSD95 et se trouve ainsi à proximité de la NOS1. NMDA contrôle l'entrée de Ca^{2+} dans les neurones, le flux de Ca^{2+} entrant active la NOS1 par liaison du Ca^{2+} au domaine CaM. Ceci conduit à une augmentation locale de la production de NO qui va inhiber NMDA *via* la S-nitrosation de cystéines des sous-unités régulatrices NR2a et NR1 (Stamler *et al.*, 2001). Ce mécanisme permet notamment de contrôler l'activité du récepteur NMDA. En plus du contrôle négatif par S-nitrosation des sous-unités NR2a et NR1, NMDA promeut la dépalmitoylation de PSD95, et sa proximité avec la NOS1 conduit à la S-nitrosation des cystéines normalement palmitoylée, ce qui entraîne la dissociation du complexe NMDA, PSD95 et NOS1 (Ho *et al.*, 2011). La formation de ce complexe protéique également permettra l'activation de plusieurs protéines recrutées par les différents partenaires. En effet, la NOS1 est également liée par la protéine adaptatrice CAPON à la petite protéine G Dexras, qui est S-nitrosée et activée par la stimulation de la NOS1 médiée par le récepteur NMDA. La protéine p21 ras, qui interagit avec le récepteur NMDA, est également régulée par S-nitrosation indépendamment de Dexras (Stamler *et al.*, 2001). En

plus de la S-nitrosation, ce complexe protéique permet également l'activation par métylation d'une guanylate cyclase recrutée par PSD95 (Stamler *et al.*, 2001).

Une autre modification post-traductionnelle également induite par le NO est la Tyrosine-nitration. Celle-ci possède, au même titre que la S-nitrosation, un rôle de signalisation (Bottari, 2015). L'impact des IPP dans la réaction de Tyr-nitration est moins bien documenté, toutefois parmi les partenaires des NOS, la cyclo-oxygénase 2 est connue pour être Tyr-nitrée (Eligini *et al.*, 2001) ce qui laisse penser qu'un complexe protéine cible-NOS est nécessaire à la réaction.

b) *Un environnement favorable aux régulateurs des NOS*

A travers leurs différentes IPP, les NOS peuvent également être régulées. Un des exemples les plus documentés est la fixation de la calmoduline sur la NOS1 et sur la NOS2 qui permet, en présence de Ca^{2+} , de faciliter le transfert des électrons et ainsi de permettre l'activité de ces NOS dites calcium dépendantes (Campbell *et al.*, 2014). L'activité de la NOS, soit la production de NO, peut être optimisée par une protéine partenaire qui facilite l'acheminement de son substrat, comme c'est le cas pour la NOS3 dans les cavéolines où elle interagit avec le transporteur d'arginine CAT1 (Kone, 2000). Certaines IPP peuvent également inhiber l'activité enzymatique de NOS. Par exemple, la déstabilisation de la structure dimérique, active, de la NOS, ou la prévention de sa dimérisation par IPP conduit à son inactivation. En effet, la fixation de la protéine PIN dans la partie N-terminale de la NOS1 déstabilise le dimère et conduit à l'inhibition de la NOS1 par la perte de sa forme dimérique active (Zhou and Zhu, 2009). De manière similaire, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de la protéine kalirine prévient la dimérisation de la NOS2 et conduit à une inhibition de son activité et à un dérèglement de la réponse immunitaire (Cinelli *et al.*, 2020). La signalisation NO étant dépendante de la distribution spatiale et temporelle du NO, l'activité de la NOS peut également être régulée *via* des protéines partenaires influençant la localisation intracellulaire de la NOS. En effet, la liaison de la NOS3 avec la protéine NOSIP conduit à sa dissociation des cavéoles de la membrane plasmique (Dedio *et al.*, 2001).

2. Objectifs

Dans ce chapitre, nous émettons l'hypothèse que l'identification des protéines partenaires des KnNOS permettrait de mieux comprendre le rôle et le fonctionnement des NOS chez *K. nitens* et plus généralement, apporterait de nouvelles connaissances sur la signalisation de NO dans les organismes photosynthétiques.

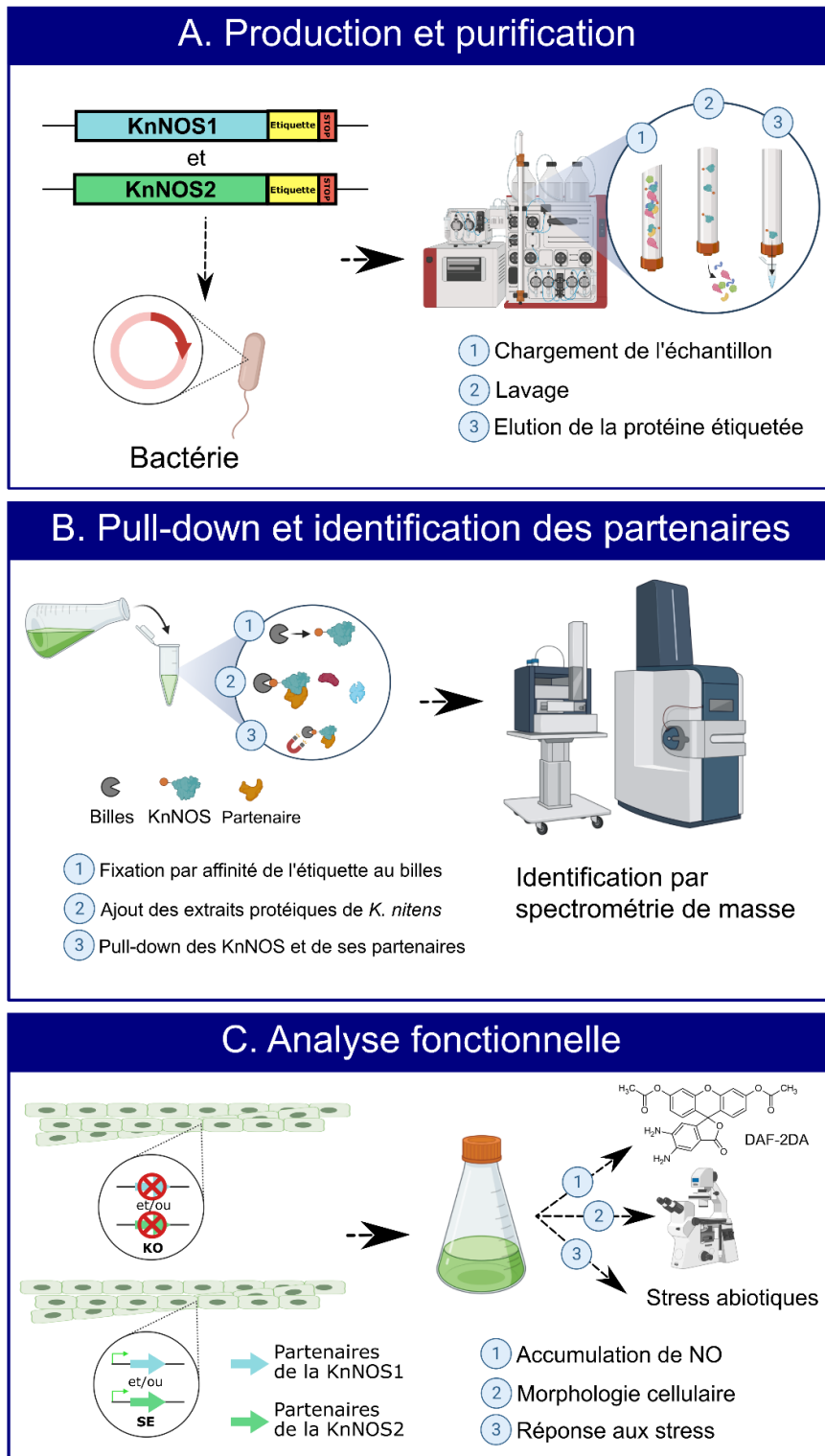


Fig. III.2. Représentation schématique de la stratégie d'identification des partenaires protéiques des NOS et de leur caractérisation. **A)** Ajout d'une étiquette par ingénierie moléculaire aux séquences codant pour KnNOS1 et KnNOS2. Clonage de chaque insert dans un vecteur suivi de la production des deux protéines recombinantes dans un système hétérologue. Purification des protéines recombinantes KnNOS1 et KnNOS2 par chromatographie d'affinité. **B)** Purification et fixation des protéines KnNOS1 et KnNOS2 sur des billes magnétiques. Précipitation des KnNOS et de leurs partenaires par pull-down et identification des partenaires par spectrométrie de masse. **C)** Analyse fonctionnelle utilisant des approches génétiques ciblées permettant de caractériser les fonctions physiologiques des KnNOS par l'étude de leurs protéines partenaires.

Afin de remplir cet objectif une stratégie par pull-down de la protéine recombinante KnNOS1 portant une étiquette histidine suivie d'une analyse par spectrométrie de masse a été retenue. Cette stratégie nécessite de produire la protéine recombinante KnNOS1 dans un système hétérologue et de la fixer sur des billes par affinité. En contact avec un extrait cellulaire, les partenaires de KnNOS1 se fixeront sur cette dernière et seront alors identifiables par spectrométrie de masse (**Fig. III.2.A-B**). Si cette stratégie permet d'identifier les partenaires de la KnNOS1, elle pourra également être adoptée pour identifier les partenaires de la KnNOS2. L'identification des partenaires des KnNOS nous permettra à l'avenir d'étudier l'impact de la surexpression ou sous-expression de ces partenaires sur la physiologie de *K. nitens* et sur la régulation des KnNOS (**Fig. III.2.C**).

En cas d'échec des expériences de pull-down, une stratégie d'identification des partenaires protéiques de la KnNOS1 endogène a également été envisagée puisque nous disposons d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la KnNOS1.

En parallèle des expérimentations d'identification des partenaires des KnNOS, une approche *in silico* de recherche des protéines interagissant avec les NOS humaines (HsNOS) a été menée. Cette étude, couplée à une analyse d'orthologie, a permis d'établir un réseau d'IPP des HsNOS et d'identifier les partenaires des HsNOS conservés chez *K. nitens*. Une étude bibliographique a également été réalisée afin d'identifier, parmi les partenaires des HsNOS conservés, ceux qui sont décrits comme ayant un rôle régulateur de l'activité des NOS. Cette liste nous permettra, une fois les partenaires des NOS identifiés expérimentalement, de présélectionner les partenaires d'intérêts pour l'analyse fonctionnelle et de vérifier si leur activité régulatrice des NOS est conservée chez *K. nitens* (**Fig. III.2.C**).

B. Matériels et méthodes

1. Production de la protéine recombinante KnNOS1 en système hétérologue

a) Construction plasmidique et technique de clonage

- (1) Vecteur d'entrée pET-24(b)+ et vecteur donneur pDONR 221

Aux vues des difficultés rencontrées à amplifier par PCR les ADNc pleine longueur codant pour la KnNOS1 (*cf.* **CHAPITRE I**), un gène synthétique a été cloné dans le vecteur d'expression pET-

Tab. III.1. Amorces PCR pour l'amplification de l'ADNc KnNSO1 avec ou sans étiquette poly-histidine depuis le pET-24b(+) et encadrée des séquences attB. Les séquences correspondant au site de clonage attB1 (amorce sens) et attB2 (amorce antisens) sont représentées en bleu, la séquence Kozak est représentée en orange. Les acides nucléiques spécifiques de la matrice sont en italique, le codon méthionine et le codon stop sont soulignés et les codons codant pour l'étiquette poly-histidine sont en rouge.

Nom	ID	Séquence 5'-3'
Amorce sens KnNOS1 attB1	A1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGGTCATTGCGAATTGC
Amorce antisens KnNOS1 attB2	A2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGTTCCATTGGACCGGTAGGC
Amorce sens KnNOS1-HIS attB1	A3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT <u>ACCA</u> TGGGTCATTGCGAATTGCTTT
Amorce antisens KnNOS1-HIS attB2	A4	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT <u>TCA</u> GTGGTGGTGGTGGTGGTCTC

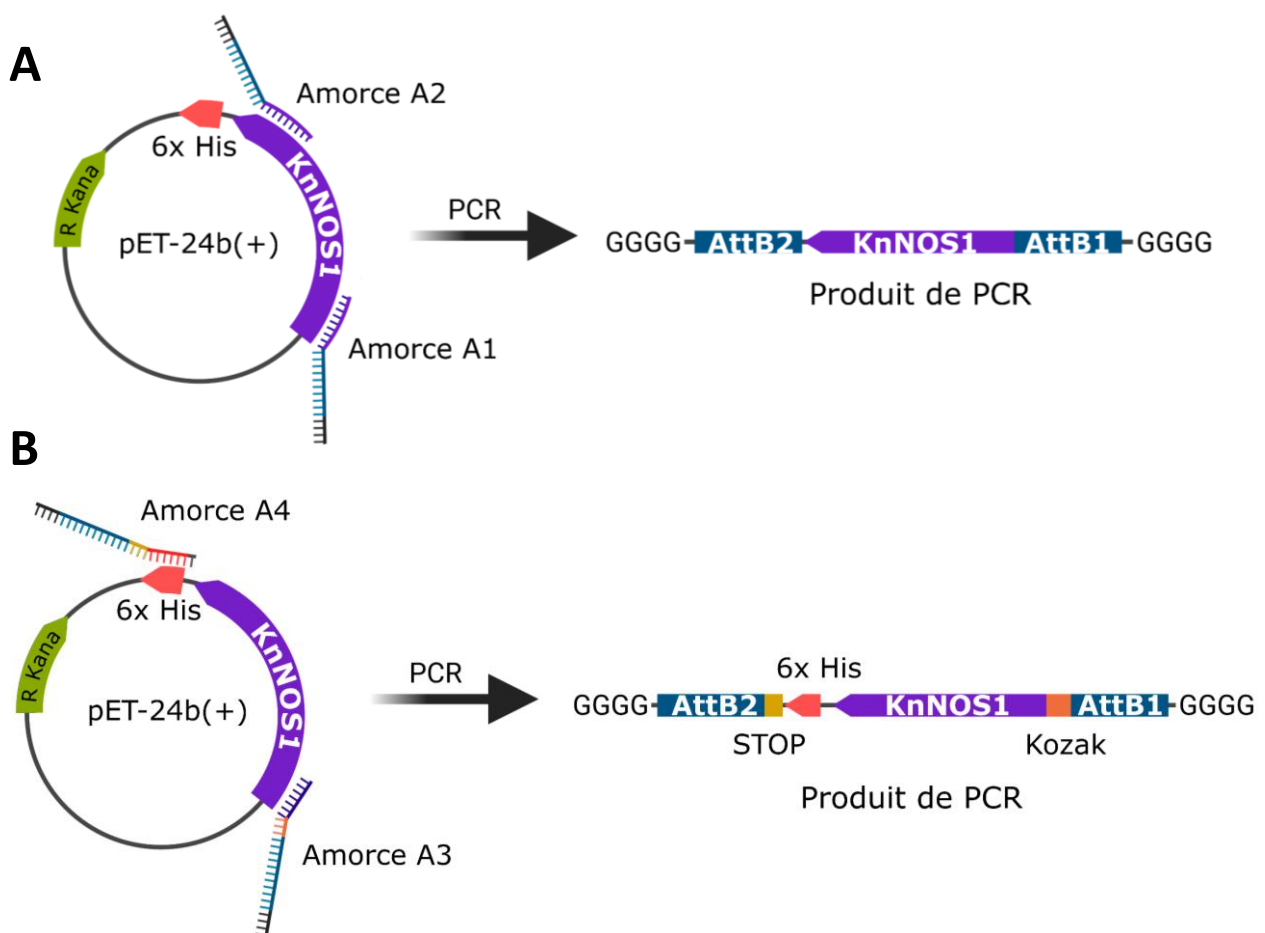


Fig. III.3. Schéma des PCR avec les amorces A1-A2 et A3-A4 depuis la matrice pET-24b(+). Le vecteur pET-24b(+) utilisé comme matrice pour la PCR porte un gène conférant une résistance à la kanamycine, la séquence codante de la KnNOS1 avec une étiquette poly-histidine en 3'. **A)** Le produit PCR obtenu lors de l'utilisation des amorces A1 et A2 est composé de la séquence KnNOS1 encadrée par les sites de clonage attB1 et attB2 afin de pouvoir cloner le produit dans d'autres vecteurs *via* la technique Gateway. **B)** Le produit PCR obtenu lors de l'utilisation des amorces A3 et A4 est composé de la séquence KnNOS1 avec une étiquette poly-histidine en 3'. La séquence Kozak permet la fixation du ribosome chez les cellules eucaryotes. La séquence est encadrée par les sites de clonage attB1 et attB2 afin de pouvoir cloner le produit dans d'autres vecteurs *via* la technique Gateway.

24b, permettant la production d'une protéine recombinante avec une étiquette poly-histidine en C-terminal de la protéine, par une entreprise (GenScript).

Afin d'introduire la séquence KnNOS1 dans un plasmide compatible avec la méthode de clonage Gateway® (Invitrogen), couramment utilisée au laboratoire, deux réactions de PCR ont été réalisées à partir du plasmide pET-24b(+) contenant la séquence KnNOS1, l'une avec les amorces A1 et A2 et la seconde avec les amorces A3 et A4 (**Tab. III.1**). Ces PCR ont permis d'obtenir un ADNc pleine longueur de la séquence codant la KnNOS1 avec et sans étiquette poly-histidine en 3' (KnNOS1-His ; **Fig. III.3**). Les produits PCR obtenus ont été purifiés à l'aide du kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Les séquences KnNOS1 et KnNOS1-His obtenues par PCR avec les couples d'amorces A1-A2 et A3-A4 ont été clonées à l'aide du système Gateway® (Invitrogen) par réaction BP dans le vecteur pDONR 221 (Thermofischer) conformément aux recommandations du fabricant afin de les cloner dans différents vecteurs destination (**Fig. III.4, Fig. III.5**).

(2) Vecteur destination pP7FWG2, pDEST24, pDEST15, pEAQ-HT-DEST-1 et pDRf1-GW

Depuis le pDONR 221_KnNOS1 et à l'aide du système de clonage Gateway® (Invitrogen), la séquence KnNOS1 a été intégrée par LR clonase dans les vecteurs de destinations pP7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002), pDEST24 et pDEST15 (Invitrogen) afin de produire la protéine recombinante KnNOS1 avec une étiquette GFP en C-ter et pour une expression du gène en tabac, mais également avec des étiquettes GST en C-ter et GST en N-ter pour une expression du gène en bactérie (**Fig. III.4, Fig. III.6**).

A partir du pDONR 221_KnNOS1-His et à l'aide du système de clonage Gateway® (Invitrogen), la séquence KnNOS1 avec une étiquette poly-histidine en C-ter a été intégrée par LR clonase dans les vecteurs de destination pEAQ-HT et pDRf1-GW permettant l'expression de la KnNOS-His respectivement en tabac et en levure. (**Fig. III.5, Fig. III.6**).

Les séquences insérées dans ces différents vecteurs d'expression ont été vérifiées par séquençage.

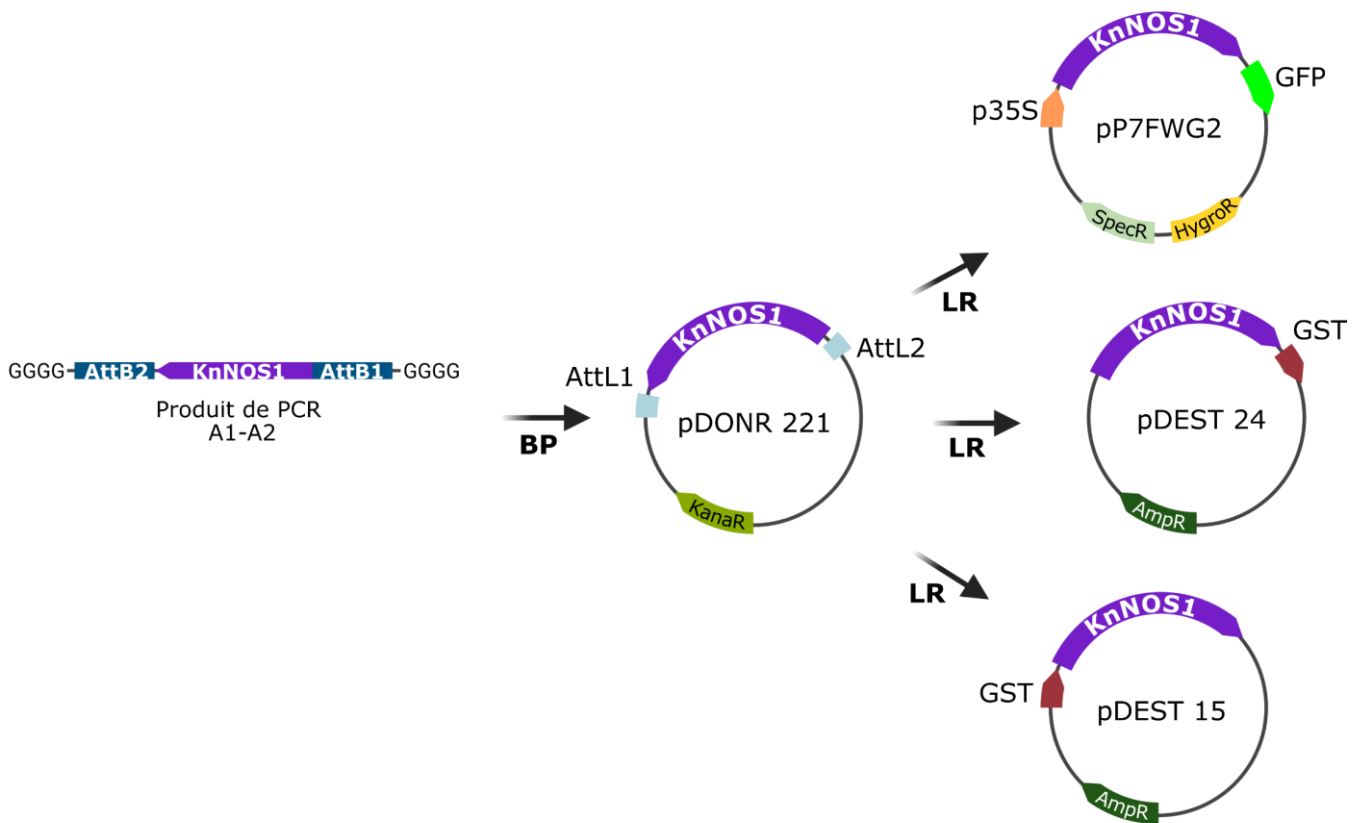


Fig. III.4. Schéma de la réaction BP réalisée avec le produit PCR des amorces A1-A2 permettant l'obtention du pDONR 221 avec pour insert la séquence KnNOS1. Depuis ce pDONR 221 trois plasmides de destination ont été obtenus par réaction LR, le pP7FWG2 permettant la production de la KnNOS1 avec un étiquette GFP en C-ter en plante, le pDEST24 permettant la production en bactérie de la KnNOS1 avec une étiquette GST en N-ter et le pDEST15 permettant la production en bactérie de la KnNOS1 avec une étiquette GST en C-ter. AttL1, AttL2 : site de recombinaison de la réaction LR ; GFP : étiquette GFP ; GST : étiquette GST ; KanaR : gène de résistance à la kanamycine pour l'expression en bactérie ; HygroR : gène de résistance à l'hygromycine en plante ; SpecR : gène de résistance à la spectinomycine en bactérie ; AmpR : gène de résistance à l'ampicilline en bactérie ; p35S : promoteur 35S.

b) *Système hétérologue bactérien*

(1) Transformation des bactéries *Escherichia coli* BL21 et Rosetta II

Les vecteurs pET-24(b)+, pDEST 15 et pDEST 24 permettent l'expression du gène puis la production de la protéine en bactérie (**Fig. III.6**). Ces vecteurs d'expression sont porteurs d'un gène de résistance à un antibiotique, permettant la sélection des bactéries transformées, et du promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 sous la dépendance de l'opérateur de l'opéron lactose contrôlant la transcription de la séquence d'intérêt en aval. Le laboratoire possède deux souches d'*Escherichia coli* développées pour la production de protéines recombinantes, la souche BL21 et la souche dérivée Rosetta IITM (Novagen), capable de traduire les codons rarement rencontrés chez *E. coli*. Ces deux souches bactériennes possèdent une copie du gène de la T7-RNA polymérase. La transformation des bactéries puis l'ajout à la culture d'un inducteur synthétique de l'opéron lactose, l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), déclenche la fixation de la T7 RNA polymérase sur le promoteur du vecteur. La séquence génique clonée dans le vecteur est alors transcrite, puis l'ARNm traduit, ce qui conduit à la production de la protéine codée par l'insert.

Les deux souches d'*E. coli* ont été transformées par choc thermique avec les vecteurs de production en système bactérien (**Fig. III.6**). Pour ce faire, 4 ng de plasmide ont été mis en contact avec 50 μ L de bactéries et laissés sur glace pendant au moins 30 minutes. Les bactéries ont ensuite été placées dans un bain-marie à 42 °C pendant 45 secondes puis immédiatement transférées sur glace. Après 45 minutes d'agitation dans 200 μ L de milieu riche S.O.C (Invitrogen), les bactéries ont étéensemencées en milieu gélosé *Lysogeny Broth*-Lennox supplémenté en kanamycine à 50 μ g/mL (LB-Kana) ou en ampicilline à 100 μ g/mL (LB-Amp) selon le gène de résistance porté par le vecteur (**Fig. III.6**), permettant la sélection des bactéries transformées après une nuit à 37 °C.

(2) Production de la KnNOS1

Une unité formant colonie (UFC) de bactérie transformée a été cultivée dans 500 mL de milieu LB supplémenté avec l'antibiotique requis pour le maintien de la pression de sélection, à 37 °C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) à 600 nm comprise entre 1 et 1,5. La synthèse de la protéine KnNOS a alors été induite par 500 μ M d'IPTG. Parallèlement, le milieu a été supplémenté en plusieurs composants propres à la production de NOS : 3 μ M

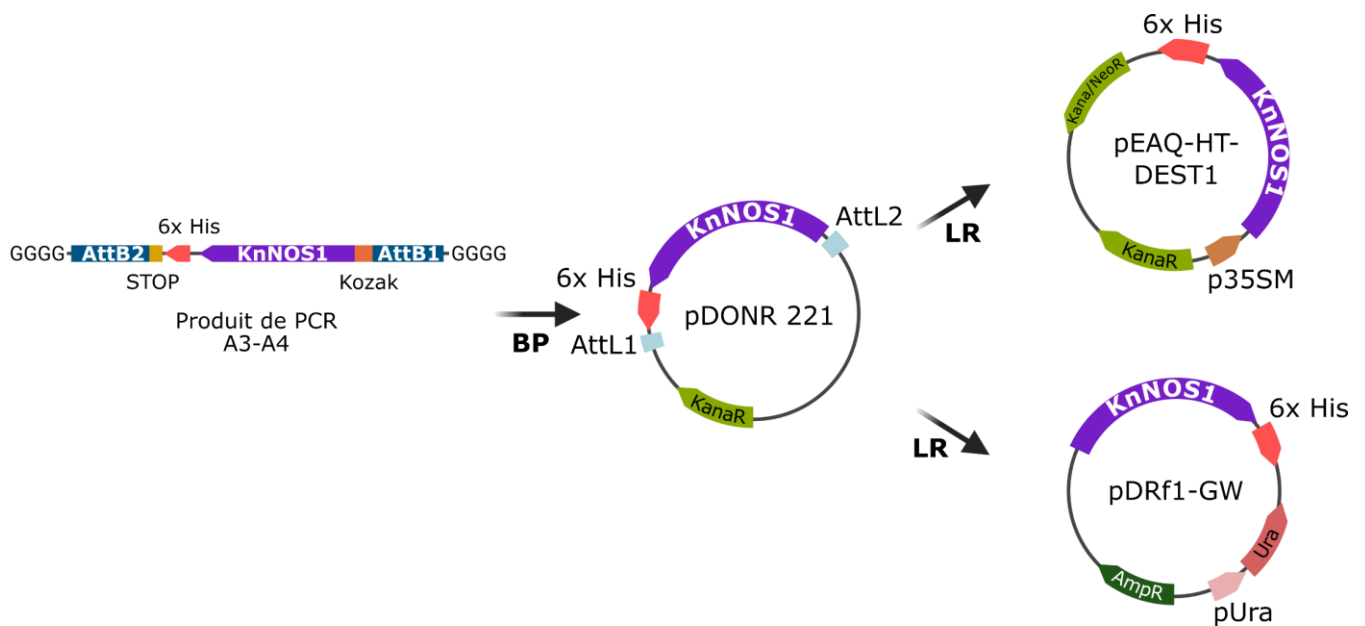


Fig. III.5. Schéma de la réaction de BP réalisée avec le produit PCR des amorces A3-A4 permettant l'obtention du pDONR 221 avec pour insert la séquence KnNOS1 portant une étiquette 6x histidine (KnNOS1-His). Depuis ce pDONR 221 deux plasmides de destination ont été obtenus par réaction LR : le pEAQ-HT-DEST1, permettant la production de la KnNOS1-His en plante et le pDRf1-GW, permettant la production en levure de la KnNOS1-His. AttL1, AttL2 : site de recombinaison de la réaction LR ; 6x His : étiquette poly-histidine ; KanaR : gène de résistance à la kanamycine pour l'expression en bactérie ; Kana/NeoR : gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine en plante ; AmpR : gène de résistance à l'ampicilline en bactérie ; p35SM : promoteur 35S minimal ; pUra : promoteur du gène Ura ; Ura : gène de synthèse de l'uracile en levure.

de riboflavine (précurseur de co-enzymes), 450 μM d'acide δ -aminolevulinique (précurseur de l'hème) et 1 mM de L-arginine (substrat de NOS), afin de favoriser le repliement de la NOS sous sa conformation fonctionnelle (Weisslocker-Schaetzel *et al.*, 2017).

Après 3 h d'induction à 37 °C sous agitation, le milieu de culture a été centrifugé à 3500 g pendant 30 minutes à 4 °C, puis le culot bactérien a été repris dans 20 mL de tampon de lyse ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (NaPi) 50 mM pH 7,5 ; NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM ; Glycérol 10 % (v/v), Triton X-100 1 % (v/v), 7,8-Dihydro-L-biopterine (BH_2) 10 μM , FAD 2 μM , FMN 2 μM , L-arginine 5 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Roche), lysozyme 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DNase 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et RNase 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La lyse a été complétée par 4 cycles de 4 minutes de sonication à 80 % *on*, 20 % *off* (Vibra Cell 500, Sonics and Materials). Enfin, les protéines ont été récupérées dans le surnageant après 30 min de centrifugation à 20 000 g et à 4 °C.

Afin d'optimiser la production de la KnNOS, différentes conditions de cultures ont été testées pour chaque vecteur. Ainsi le milieu de culture a été remplacé par du *Terrific Broth* (TB), un milieu plus riche favorisant la production des protéines recombinantes (Tripathi *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2013; Couto *et al.*, 2017). Plusieurs volumes de culture, DO d'induction, durées d'induction et températures de production ont été testés, de même que l'addition de 2 % (v/v) d'EtOH, afin de favoriser la production de protéines chaperonnes, ou encore d'urée 8 M dans le tampon de lyse.

(3) Purification de la protéine KnNOS1

(a) KnNOS-His

La protéine recombinante KnNOS-His a été purifiée par affinité pour les ions Ni^{2+} par chromatographie liquide (*fast protein liquid chromatography*, FPLC) sur colonne His-Trap® à l'aide d'un AKTA Purifier® (Cytivia). Le surnageant filtré à 0,22 μm a été chargé à 0,5 mL/min sur la colonne équilibrée dans un tampon de chargement (NaPi 20 mM pH 7,2 ; NaCl 500 mM). Après 30 mL de lavage au tampon de chargement, les protéines retenues par la phase stationnaire ont été éluées par un gradient de 0 à 100 % de tampon d'éluion (NaPi 20 mM pH 7,2 ; NaCl 500 mM ; imidazole 500 mM) pendant 20 minutes dans des fractions de 1 mL. Les fractions contenant la protéine recombinante KnNOS-His ont été sélectionnées sur SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie.

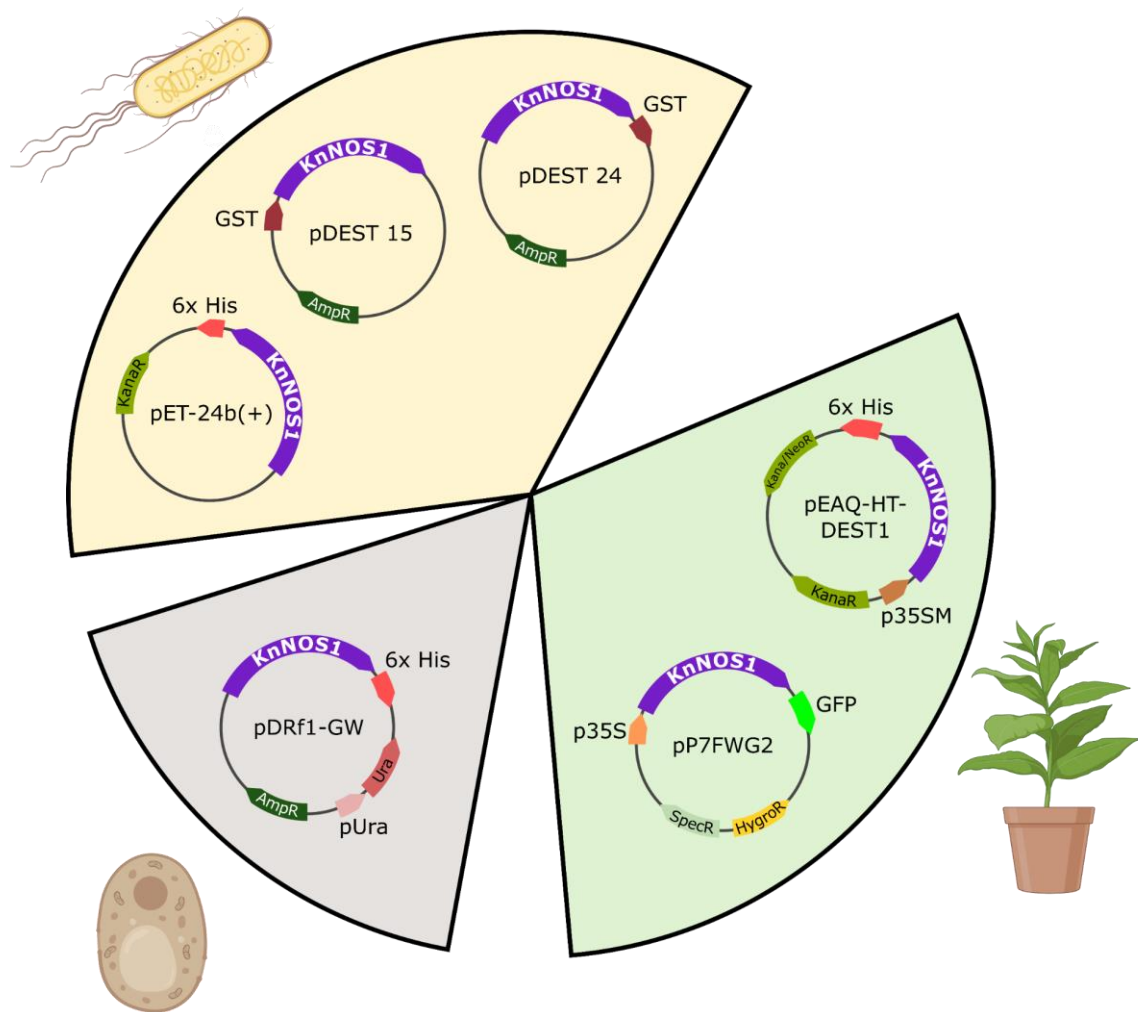


Fig. III.6. Schéma des différents vecteurs de destination permettant la production de la KnNOS dans différents systèmes hétérologue et avec différentes étiquettes. 6x His : étiquette poly-histidine ; Kana^R : gène de résistance à la kanamycine pour l'expression en bactérie ; Kana/Neo^R : gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine en plante ; Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline en bactérie ; p35SM : promoteur 35S minimal ; pUra : promoteur du gène Ura ; Ura : gène de synthèse de l'uracile en levure.

(b) GST-KnNOS et KnNOS-GST

La protéine recombinante KnNOS étiquetée GST a été purifiée par FPLC sur colonne GST-Trap® à l'aide d'un AKTA Purifier® (Cytiva) ou sur paillasse en tube à l'aide de billes d'agarose *Glutathione Sepharose 4B GST-tagged protein purification resin* (Cytiva) selon les recommandations du fournisseur.

Pour la purification par FPLC le surnageant a été filtré à 0,22 µm puis chargé à 0,5 mL/min sur la colonne équilibrée dans un tampon de chargement (Na₂PO₄ 10 mM pH 7,3 ; KCl 2,7 mM ; NaCl 140 mM). Après 30 mL de lavage au tampon de chargement, les protéines retenues par la phase stationnaire ont été éluées par un gradient de 0 à 100 % de tampon d'éluion (Tris 50 mM pH 8 ; glutathion réduit 10 mM) pendant 20 minutes dans des fractions de 1 mL.

c) *Système hétérologue en plante*

(1) Transformation des *Agrobacterium tumefaciens*

Afin de produire la KnNOS-His et la KnNOS-GFP dans des feuilles de tabac, la méthode par agro-infiltration a été retenue avec la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Les agrobactéries ont été transformées par choc thermique. Pour chaque construction, 0,5 µg de plasmide ont été mis en contact de 120 µL d'*A. tumefaciens*, l'ensemble a été laissé sur glace 5 minutes, transféré dans l'azote liquide pendant 5 minutes avant d'être replacé à 37 °C pendant 5 minutes.

(2) Culture et agro-infiltration

Les agrobactéries transformées ont été incubées à 28 °C sous agitation pendant 3 heures dans 250 µL de milieu S.O.C, puis ensemencées sur gélose LB supplémentée en gentamycine (50 µg/mL) qui permet le maintien du plasmide Ti désarmé, en rifampicine (50 µg/mL), qui sélectionne la souche d'agrobactérie, et soit en spectinomycine (100 µg/mL) dont la résistance est portée par le plasmide pP7FWG2, soit en kanamycine (50 µg/mL) lors de l'utilisation du plasmide pEAQ-HT-DEST1 (**Fig. III.6**). Une UFC a été cultivée (48 h, 28 °C sous agitation) dans 10 mL de LB supplémenté en antibiotiques (selon le plasmide utilisé) et en acétosyringone (20 µM), un composé phénolique permettant d'augmenter l'efficacité d'infection (induction des gènes de virulence d'*A. tumefaciens*). Après centrifugation de la culture (15 min, 3500 g), les culots ont été dissouts dans du tampon (MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, acétosyringone 100 µM) de manière à obtenir une DO à 600 nm égale à 1. Pour finir, les bactéries transformées ont été

incubées 4 h à température ambiante, puis infiltrées avec une seringue sur la face inférieure des feuilles de tabacs.

(3) Purification de la protéine KnNOS-His

Les feuilles de tabac surexprimant la KnNOS-His ont été récoltées 7 et 9 jours après agroinfiltration puis ont été broyées au mortier et au pilon dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine. Après extraction des protéines dans un tampon glycérol 10 % (v/v), KCl 2,7 mM, NaCl 140 mM, NaPi 50 mM pH 7,5, triton 1 % (v/v), BH₂ 10 μM, FAD 2 μM, FMN 2 μM et L-arginine 5 mM, l'extrait protéique a été laissé 10 min sur glace. Après centrifugation (20 min, 20 000 g, 4 °C), le surnageant a été récupéré et filtré à 0,22 μm.

La protéine recombinante KnNOS-His a été purifiée par affinité pour les ions Ni²⁺ par FPLC sur colonne His-Trap® à l'aide d'un AKTA Purifier® (Cytiva) dans les mêmes conditions que celle produite en *E. coli*.

d) *Système hétérologue en levure*

(1) Transformation des levures et production de la KnNOS-His

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A, déficiente dans la synthèse de l'uracile, a été transformée selon un protocole adapté de Dohmen *et al.*, (1991). Pour ce faire, 2 μg de plasmide ainsi que 50 μg d'ADN de sperme de saumon dénaturé ont été mis en contact de 200 μL de levure encore congelée. Le tout a été décongelé à 37 °C sous agitation douce. Après addition d'1 mL de solution B (Bicine-KOH 200 mM (pH 8,35), PEG-1000 40 % (m/v)) le mélange a été placé en étuve 1 h sans agitation à 30 °C. Après centrifugation (5 min, 3000 g, température ambiante), le surnageant a été jeté et le culot lavé dans 800 μL de solution C (Bicine-KOH 10 mM (pH 8,35), NaCl 150 mM). Pour finir, le culot a été repris dans 100 μL de solution C et étalé en boîte de Petri sur milieu sélectif *Yeast Nitrogen Base* (YNB), 2 % glucose (m/v ; Glc), *Synthetic Drop out* sans Uracile (SD-Ura). En effet, le plasmide pDRf1-GW permet la complémentarité pour la synthèse de l'uracile et ainsi la sélection des levures transformées sur YNB + 2 % Glc + SD-Ura.

(2) Purification de la KnNOS-His

En première intention, une procédure appelée « extraction rapide » a été suivie. Pour ce faire une UFC a été reprise dans 5 mL de YNB + 2 % Glc + SD-Ura. Après une nuit à 30 °C, le milieu

Tab. III.2. Liste des anticorps primaires dirigés contre les étiquettes des différentes protéines KnNOS recombinantes et les anticorps secondaires associés

Anticorps	Cible	Type	Dilution	Tampon de dilution	Fournisseur
<i>Primaire</i>	α -His	Monoclonal Souris	1:1000	TBST, lait 5 % (m/v)	Cell signaling (2366S)
<i>Primaire</i>	α -GFP	Polyclonal Lapin	1:20 000	TBST, BSA 2 % (m/v)	Abcam (ab6556)
<i>Secondaire</i>	α -Ig Souris		1:3000	TBST	Biorad (170-6516)
<i>Secondaire</i>	α -Ig Lapin		1:20 000	TBST	Agrisera (AS09 602)

de culture a été centrifugé (20 000 g, 5 min, 25 °C) et le culot de levure a été lysé dans du bleu de charge, soumis à sonication et chauffé à 80 °C.

Un protocole de « lyse complète » a ensuite été mis au point. Après 4 jours à 30 °C sur boîte, une UFC a été reprise dans 3 mL de YNB + 2 % Glc + SD-Ura et mise en culture la nuit à 30 °C. Les 3 mL de la pré-culture ont été utilisés pour ensemercer une culture de 100 mL de YNB + 2 % Glc + SD-Ura (30 °C, 200 rpm). Lorsque la DO à 600 nm a atteint la valeur de 1,5, le milieu de culture a été centrifugé (4500 g, 10 min, 25 °C), puis le culot a été repris dans 10 mL de tampon de lyse (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (NaPi) 50 mM pH 7,5 ; NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM ; Glycérol 10 % (v/v), Triton X-100 1 % (v/v), 7,8-Dihydro-L-biopterine (BH₂) 10 μM, FAD 2 μM, FMN 2 μM, L-arginine 5 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Roche)). La lyse a été effectuée à l'aide d'ajout de 8 g de billes de verre (diamètre 0,25 à 0,55 mm ; Retsch) à l'extrait de levure, vigoureusement mélangés au vortex 4 fois 1 min en alternant avec des périodes de refroidissement (1 min, 4 °C). Enfin, les protéines ont été récupérées dans le surnageant après centrifugation (15 min, 20 000 g, 4 °C).

De nouveau, la protéine recombinante KnNOS-His a été purifiée par affinité pour les ions Ni²⁺ par FPLC sur colonne His-Trap® à l'aide d'un AKTA Purifier® (Cytiva) dans les mêmes conditions que celles produites en *E. coli*.

e) *Suivi de la purification*

La vérification de l'efficacité de production de la KnNOS a également été suivie sur gel coloré au bleu de Coomassie ou par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine ou GFP portée par la KnNOS1 recombinante (**Tab. III.2**).

A chaque étape de la production puis de la purification de la protéine, un aliquot a été prélevé. Concernant les échantillons de culture bactérienne avant lyse, afin de déposer une quantité de protéine similaire et visible en SDS-PAGE, le volume à prélever dans la culture avant et après induction a été estimé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Volume à prélever (mL)} = \frac{0,1}{DO_{600 \text{ nm}}}$$

Si ce volume était supérieur à 20 μL, le prélèvement a été centrifugé 5 min à 5000 g et le culot repris dans du bleu de charge. Pour les échantillons solubles après la lyse bactérienne et la purification, 4 μL de chaque échantillon a été additionné de bleu de charge. Pour les

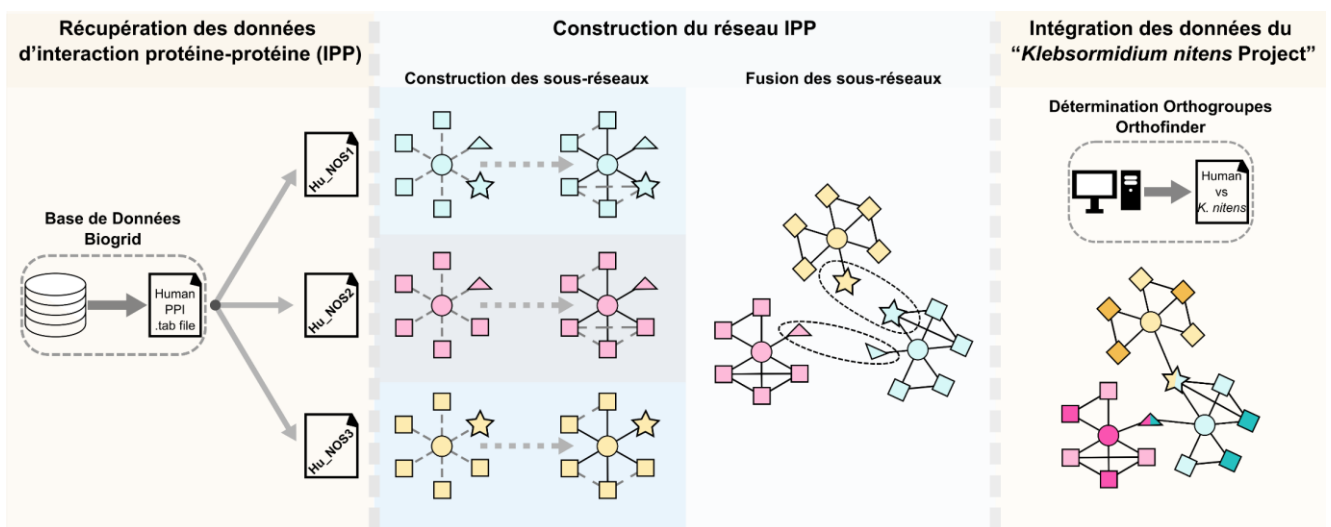


Fig. III.7. Schéma de la procédure d'obtention du réseau d'interaction protéines-protéines des NOS humaines.

échantillons solubles après la lyse des levures et des feuilles de tabac, 16 µL de chaque échantillon a été additionné de bleu de charge. Pour chaque échantillon les protéines ont été dénaturées à 100 °C pendant 3 minutes puis séparées par SDS-PAGE.

2. Identification des partenaires de la KnNOS1 par co-immunoprécipitation suivie d'analyse en spectrométrie de masse

Une expérience de co-immunoprécipitation a été réalisée afin d'isoler la KnNOS1 endogène et ses partenaires. La co-immunoprécipitation a été réalisée sur des extraits protéiques issus de 200 mL de cultures de *K. nitens*. Après extraction des protéines dans 300 µL tampon adapté à la préservation des interactions protéiques (Tris-Cl 50 mM pH 7.4 ; NaCl 100 mM ; glycérol 10 % (v/v) ; EDTA 1 mM ; DTT 1 mM ; Nonidet P-40 0,5 % (v/v) ; cocktail d'inhibiteurs de protéases EDTA *free* (PIC, Roche) ; Na₃VO₄ 1 mM, Na pyrophosphate 5 mM), la totalité de l'extrait protéique a été incubée avec 20 µL de billes magnétiques *Protein A Mag Sepharose* (Cytiva) et 10 µg de l'anticorps dirigé contre la KnNOS1 sous agitation douce sur la nuit à 4 °C. Après plusieurs lavages dans le même tampon, les protéines retenues sur les billes ont été éluées dans 50 µL de tampon MS (Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 5 % (m/v), DTT 25 mM, glycérol 5 % (v/v) pendant 5 minutes à 100 °C. Cette expérience a été réalisée sur trois réplicats biologiques indépendants, ainsi que sur trois autres où l'anticorps anti-KnNOS n'a pas été ajouté (témoin négatif).

L'alkylation des échantillons, la digestion trypsique ainsi que le séquençage par nano-chromatographie liquide à haute performance suivie de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont ensuite été effectués sur la plateforme protéomique de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS) de Toulouse. Pour chaque échantillon, deux injections dans le spectromètre de masse ont été réalisées (réplicats techniques). L'identification des protéines a été effectuée avec le logiciel MASCOT à l'aide de la banque de données *Klebsormidium nitens NIES-2285 genome project*⁶ regroupant toutes les séquences protéiques identifiées chez *K. nitens* à ce jour.

⁶ http://www.plantmorphogenesis.bio.titech.ac.jp/~algae_genome_project/klebsormidium/

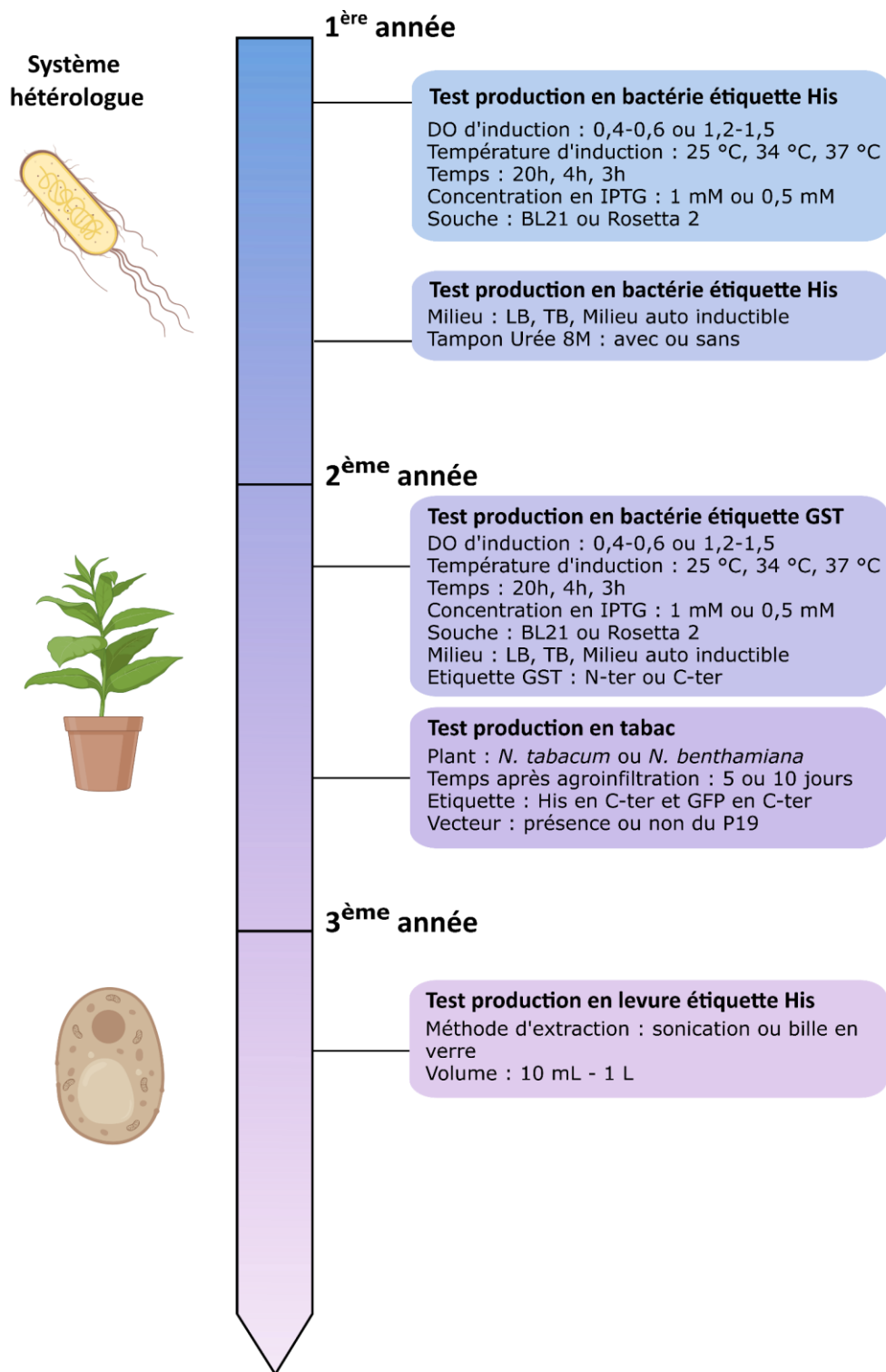


Fig. III.8. Frise chronologique des différents tests de production de la protéine KnNOS1 recombinante dans trois différents systèmes hétérologues : bactérie, tabac et levure.

3. Détermination *in silico* de l'interactome des NOS humaines et conservation chez *K. nitens*

a) Détermination de l'interactome des NOS humaines

BioGRID (Biological General Repository for Interaction Datasets) est une base de données publique qui archive et diffuse des données sur les interactions protéiques provenant d'organismes modèles et de l'homme. Grâce à cette base de données (Version 4.4.200 ; Chatr-aryamontri *et al.*, 2017) nous avons récupéré les listes des partenaires protéiques des trois NOS d'*Homo sapiens*. Seules les interactions validées expérimentalement entre NOS et leurs partenaires ont été conservées pour cette étude.

A l'aide d'un pipeline élaboré au laboratoire dans le langage de programmation Python (version 3.9.7; Bassi, 2007) les données d'interactions ont été converties au format GML (*Graph modelling language*), qui a permis d'obtenir une représentation graphique des trois réseaux d'interaction pour chacune des isoformes de HsNOS (**Fig. III.7** ; Bègue *et al.*, 2019). Les redondances entre certains partenaires des trois NOS ont permis de relier les trois sous-réseaux afin de former un réseau unique d'interactions protéines-protéines des NOS humaines à l'aide du logiciel libre Gephi (version 0.9.2). Nous avons attribué une couleur à chaque isoforme de NOS humaine et à ses partenaires : jaune pour la HsNOS1, bleu pour la HsNOS2 et rose pour la HsNOS3 (**Fig. III.7**). Chaque nœud représente une protéine et chaque lien entre deux nœuds représente une interaction. La taille des nœuds est proportionnelle au nombre de partenaires du nœud.

b) Identification des orthologues chez *K. nitens*

Afin d'identifier d'éventuels partenaires protéiques des NOS chez *K. nitens*, les orthogroupes pour entre *H. sapiens* et *K. nitens* ont été définis *via* OrthoFinder (version 2.5.4 ; Emms and Kelly, 2015). Les protéines partenaires des HsNOS possédant un orthologue chez *K. nitens* ont été représentées sur le réseau (**Fig. III.7**).

C. Résultats

1. Production de la protéine hétérologue KnNOS1

L'identification des partenaires potentiels de la KnNOS1 a tout d'abord été entreprise par une approche par pull-down suivi d'analyses par spectrométrie de masse, nécessitant la production et la purification de la protéine recombinante. La production de la protéine KnNOS1 a représenté un véritable défi. Les difficultés rencontrées tout au long de mes trois

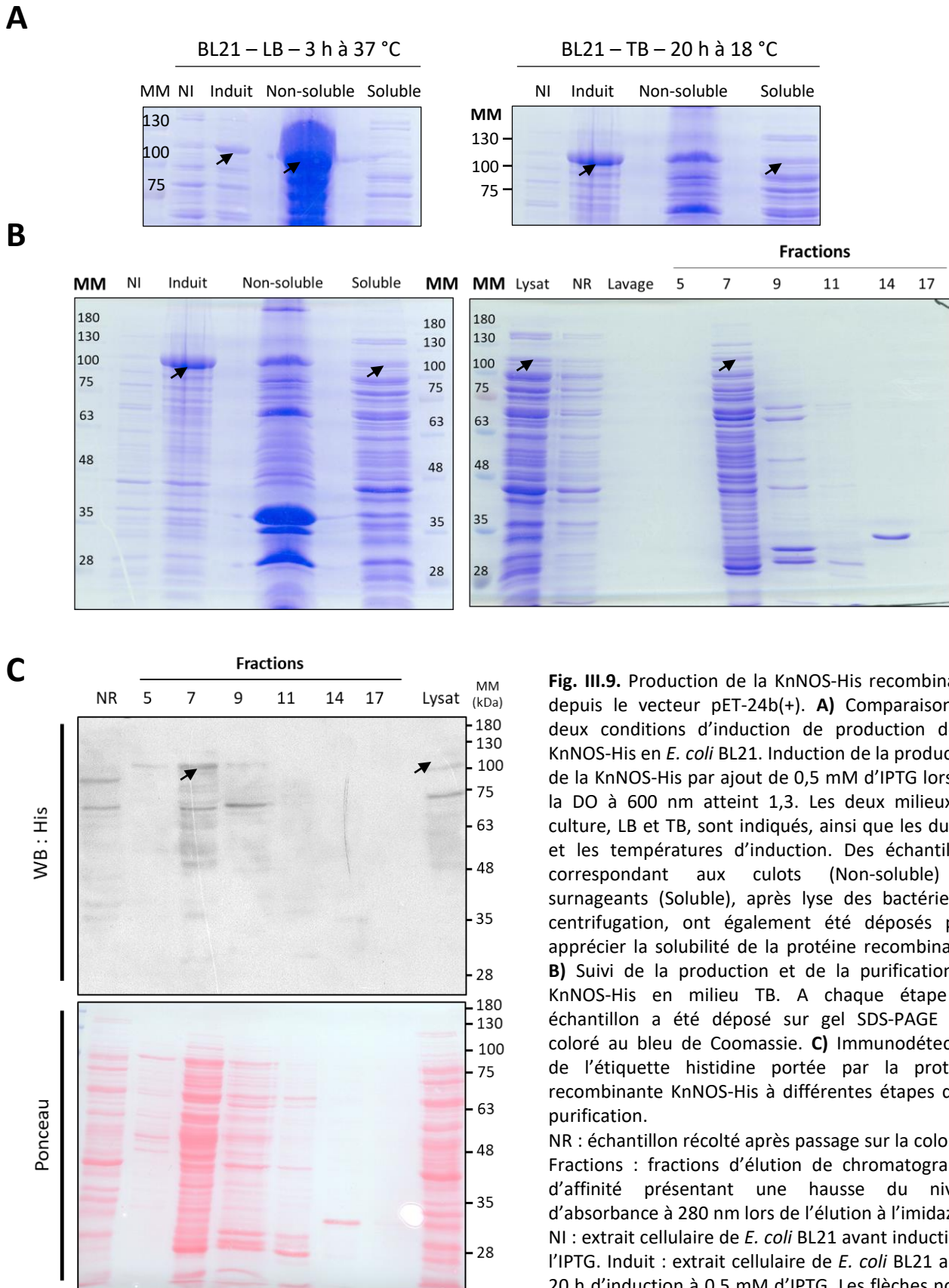


Fig. III.9. Production de la KnNOS-His recombinante depuis le vecteur pET-24b(+). **A)** Comparaison de deux conditions d'induction de production de la KnNOS-His en *E. coli* BL21. Induction de la production de la KnNOS-His par ajout de 0,5 mM d'IPTG lorsque la DO à 600 nm atteint 1,3. Les deux milieux de culture, LB et TB, sont indiqués, ainsi que les durées et les températures d'induction. Des échantillons correspondant aux culots (Non-soluble) et surnageants (Soluble), après lyse des bactéries et centrifugation, ont également été déposés pour apprécier la solubilité de la protéine recombinante. **B)** Suivi de la production et de la purification de KnNOS-His en milieu TB. A chaque étape un échantillon a été déposé sur gel SDS-PAGE puis coloré au bleu de Coomassie. **C)** Immunodétection de l'étiquette histidine portée par la protéine recombinante KnNOS-His à différentes étapes de la purification. NR : échantillon récolté après passage sur la colonne. Fractions : fractions d'éluion de chromatographie d'affinité présentant une hausse du niveau d'absorbance à 280 nm lors de l'éluion à l'imidazole. NI : extrait cellulaire de *E. coli* BL21 avant induction à l'IPTG. Induit : extrait cellulaire de *E. coli* BL21 après 20 h d'induction à 0,5 mM d'IPTG. Les flèches noires indiquent les bandes apparaissant à la taille correspondant à la KnNOS-His. MM : marqueur de masse moléculaire en kDa.

années de thèses nous ont obligés à multiplier les solutions techniques afin d'essayer de produire et de purifier la KnNOS1 (**Fig. III.8**).

a) *Protéine recombinante KnNOS1 en système bactérien*

(1) KnNOS1 avec une étiquette poly-histidine en C-ter

Les premiers tests réalisés ont permis d'identifier la souche d'*E. coli* ainsi que les conditions de culture idéales à l'induction de la production de la KnNOS-His. En effet, une meilleure induction de KnNOS-His a été observée dans la souche BL21 classique par rapport à la souche Rosetta II (résultat non montré). De plus, une induction en phase de saturation de croissance (DO à 600 nm entre 1,3 et 1,7) a conduit à une production plus importante de la KnNOS-His en comparaison à une induction en phase exponentielle de croissance (résultat non montré ; Galloway *et al.*, 2003). L'utilisation d'un milieu de culture riche de type TB peut également favoriser la production de protéine recombinante soluble (Collins *et al.*, 2013; Couto *et al.*, 2017). Après induction, une bande d'environ 120 kDa apparaît sur gel SDS-PAGE et pourrait correspondre à l'expression de la KnNOS1 (**Fig. III.9.A**). Cette bande est plus intense lors de l'utilisation d'un milieu de culture TB par rapport au milieu LB ce qui indiquerait une augmentation du niveau d'induction de la KnNOS1-His lors de l'utilisation du milieu TB (**Fig. III.9.A**). Parallèlement au milieu de culture, la température et la durée d'induction ont également été optimisées, la bande la plus nette ayant été obtenue suite à une induction déclenchée par 0,5 mM d'IPTG, à 18 °C pendant 20 h (**Fig. III.9.A**). Cependant, suite à la centrifugation permettant d'éliminer les protéines insolubles, seul un faible signal résiduel est détecté dans la fraction soluble, la bande à 120 kDa apparaissant suite à l'induction étant majoritairement détectée dans la fraction Non-soluble. La fraction soluble a alors été purifiée sur une colonne His-Trap® par chromatographie d'affinité, puis le contenu des fractions ayant conduit à une augmentation de l'absorbance à 280 nm lors de l'élution a été analysé par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (**Fig. III.9.B**). Aucune bande majoritaire correspondant à la KnNOS-His n'a été obtenue dans les fractions d'élution, révélant un échec de la purification. Toutefois, il se peut que la KnNOS-His soit bien présente dans les fractions d'élution mais en quantité insuffisante pour être détectée en bleu de Coomassie, puisque déjà en faible quantité dans la fraction soluble. Afin de vérifier que la KnNOS-His est réellement absente de nos fractions d'élution, la présence de la protéine recombinante KnNOS-His a été analysée à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine (**Fig. III.9.C**). Une bande

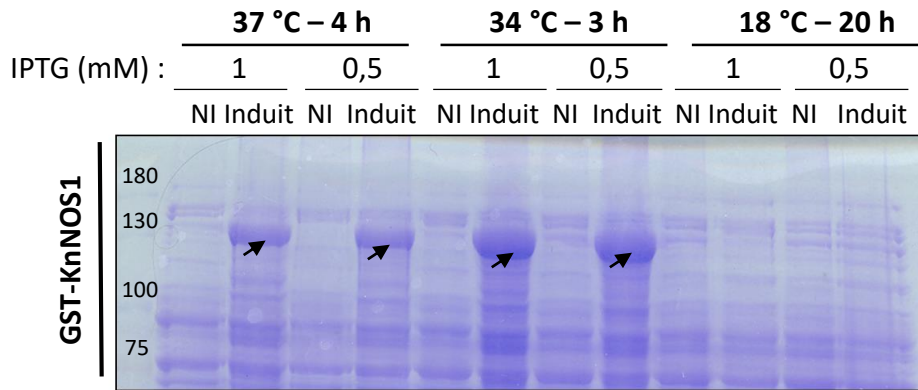
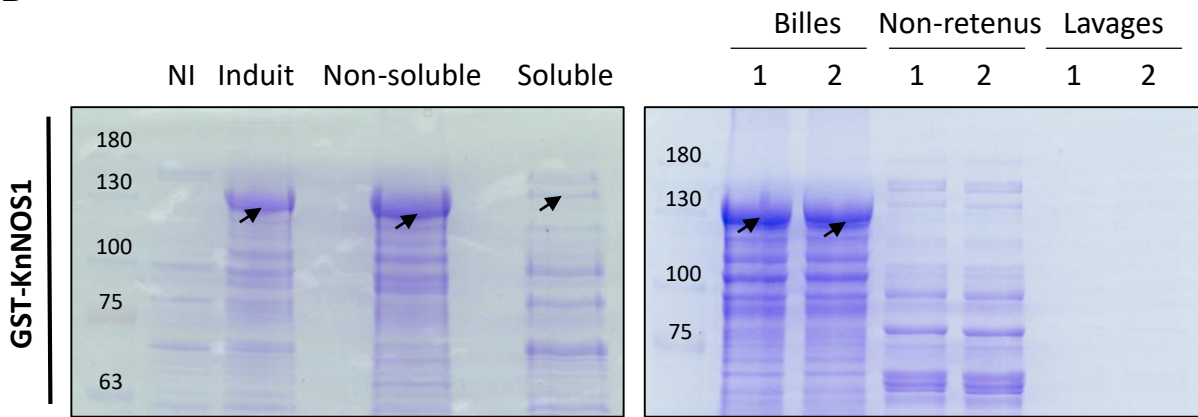
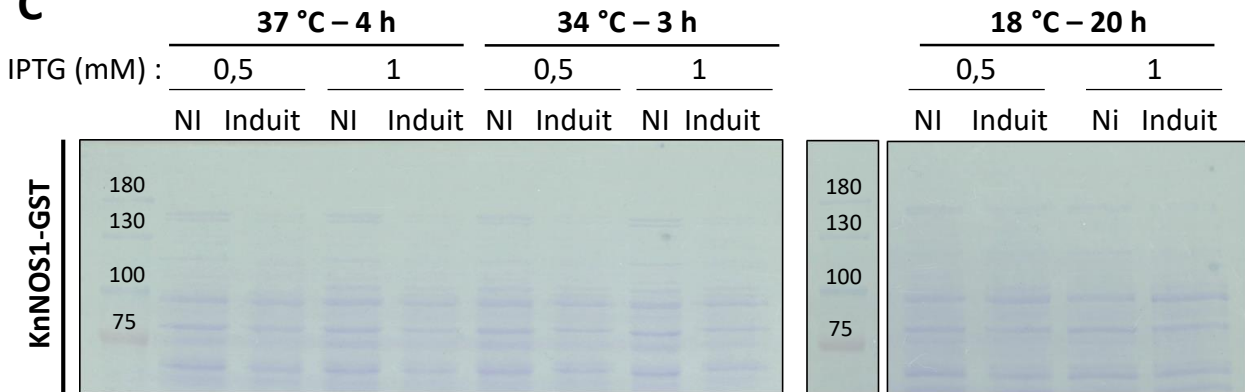
A**B****C**

Fig. III.10. Production de la KnNOS portant une étiquette GST depuis le vecteur pDEST15 (GST en N-ter) et pDEST24 (GST en C-ter). **A)** Comparaison de conditions d'induction de la production de la GST-KnNOS en *E. coli* souche Rosetta II. **B)** Suivi de la production et de la purification de la GST-KnNOS en Rosetta II, induction avec 0,5 μ M d'IPTG pendant 4 h à 34 °C. Les fractions non-induites (NI) ont été récupérées avant ajout de l'IPTG, et les fractions induites 4 h après ajout de l'IPTG. La fraction insoluble correspond à un prélèvement dans le culot obtenu après lyse cellulaire et centrifugation. La fraction soluble correspond à 4 μ L de surnageant après lyse cellulaire et centrifugation. Les billes correspondent à 20 μ L de billes de glutathion éluées après incubation avec les lysats bactériens. **C)** Comparaison de conditions d'induction de la production de la KnNOS-GST en *E. coli* souche Rosetta II. Les flèches noires indiquent les bandes apparaissant à la masse moléculaire correspondant à la KnNOS étiquetée GST. MM : Marqueur de masse moléculaire.

immunoréactive correspondant à la masse moléculaire de la KnNOS-His a été détectée dans les fractions 5, 7 et 9, confirmant l'hypothèse de la purification de KnNOS-His en faible quantité.

Bien que les quantités de milieux de culture aient été augmentées jusqu'à 4 litres (résultats non montrés), nous n'avons jamais réussi à purifier la KnNOS1-His produite en *E. coli* BL21 en quantité suffisante. Afin d'augmenter la proportion de protéine soluble, nous avons décidé de produire et purifier la KnNOS portant une étiquette GST. En effet, l'addition d'une GST à la séquence protéique peut augmenter la solubilité de la protéine à produire (Harper and Speicher, 2008).

(2) KnNOS1 avec une étiquette GST en N-ter et en C-ter

Contrairement à ce qui a été obtenu pour la construction KnNOS1-His, l'induction de la production de la GST-KnNOS1 a été plus efficace dans la souche Rosetta II qu'en BL21 classique (résultats non montrés). La comparaison des températures et durées d'induction, ainsi que des concentrations en IPTG, a révélé des conditions optimales d'induction à 37 °C dans 500 mL de TB jusqu'à une DO_{600nm} de 1,2 environ et de production de la protéine recombinante avec 0,5 μ M d'IPTG pendant 3 h à 34 °C. Ces conditions mènent à l'apparition sur gel SDS-PAGE d'une bande de 125 kDa, qui correspondrait à la GST-KnNOS1 dans la fraction induite (**Fig. III.10.A**). Après lyse et centrifugation, bien que majoritairement présente dans la fraction insoluble, une faible bande est également détectée dans la fraction soluble du lysat bactérien (**Fig. III.10.B**). Une purification par affinité sur billes de glutathion a été effectuée sur paillasse et la GST-KnNOS1 a bien été retenue sur les billes par affinité. Après fixation sur les billes, la protéine recombinante est encore faiblement visible dans le lysat non retenu révélant une déplétion partielle du lysat après fixation sur les billes. Cependant, l'absence de signal dans le lavage indique que la GST-KnNOS1 est fixée solidement aux billes. Cependant de nombreuses bandes ont été détectées à des masses moléculaires inférieures à celles de la GST-KnNOS1 (**Fig. III.10.B**), indiquant soit une purification sur bille peu spécifique, soit la présence de produits de dégradation, ou encore la présence de KnNOS1 partiellement synthétisée. De plus, la bande correspondant à la GST-KnNOS1 (150 kDa) migre à une position légèrement plus basse que celle attendue. Bien qu'on puisse supposer que cela soit dû aux propriétés physico-chimiques de la GST-KnNOS1, nous ne pouvons pas écarter la possibilité d'une synthèse incomplète. En effet, l'étiquette d'affinité étant positionnée en N-terminal de

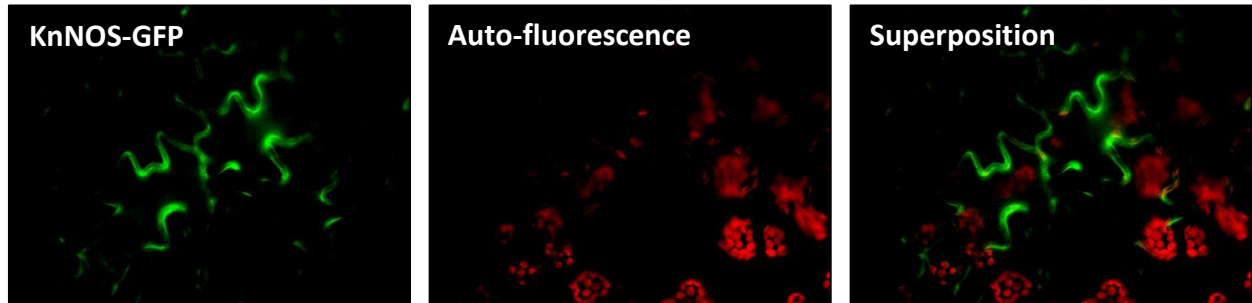
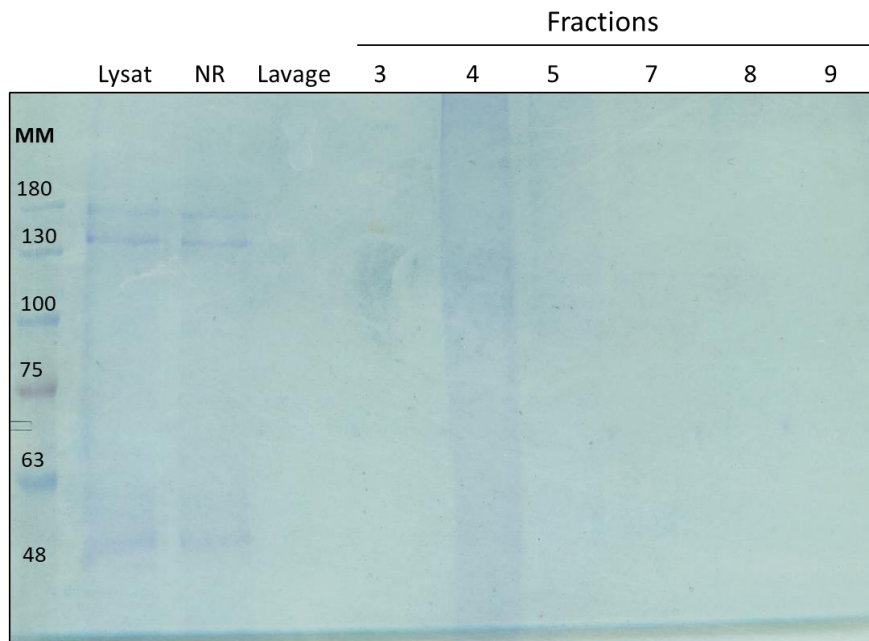
A**B**

Fig. III.11. Production de la KnNOS recombinante depuis le vecteur pP7FWG2 et le pEAQ-HT-DEST1. **A)** Image de la localisation de la KnNOS-GFP produite dans des feuilles tabac au microscope à fluorescence. Excitation de la GFP à 488 nm et émission dans un filtre [500-520] nm. **B)** Suivi de la production et de la purification de la KnNOS-His exprimée dans des feuilles de *Nicotiana tabacum*. Le lysat a été chargé sur la colonne de purification *His-trap*[®]. Une fraction des protéines non retenues (NR) sur la colonne a été déposée sur gel. La fraction Lavage correspond à un échantillon récolté pendant le lavage de la colonne. Un échantillon de chacune des fractions d'éluion de chromatographie d'affinité présentant une hausse du niveau d'absorbance à 280 nm lors du gradient d'imidazole a été déposé.

la protéine et la KnNOS1 étant de masse molaire importante, les bactéries pourraient effectuer des synthèses partielles qui n'empêcheraient en rien la fixation des portions de protéines aux billes de glutathion. La solution la plus simple pour éliminer l'hypothèse de synthèse partielle a été de produire la KnNOS1 étiquetée GST en position C-terminale. Contrairement à la GST-KnNOS1, nous ne sommes pas parvenus à induire la production de la KnNOS1-GST (**Fig. III.10.C**), ni à la purifier quelles que soient nos tentatives pour augmenter la solubilité de la KnNOS1-GST (variation du volume de culture, de la DO, de la durée et de la température d'induction ; résultats non montrés).

Les difficultés rencontrées lors de la production de la GST-KnNOS1 et de la KnNOS1-GST posent la question de l'utilisation du système hétérologue bactérien pour la production de la protéine KnNOS1. En effet il est envisageable que cette protéine, de par sa taille imposante et sa probable instabilité, soit mal conformée lors de sa production en bactérie, ce qui diminue grandement sa solubilité. Nous ne pouvons pas non plus exclure que des modifications post-traductionnelles, absentes des cellules procaryotes, puissent être nécessaires à la stabilité de la KnNOS1.

b) *Protéine recombinante KnNOS1 en système tabac*

Les difficultés de production de la KnNOS1 en système bactérien, notamment concernant la solubilité de la protéine, peuvent être expliquées par le nombre réduit de modifications post-traductionnelles réalisées chez les procaryotes. En effet, des modifications post-traductionnelles peuvent être requises pour le repliement correct et donc pour la solubilité de protéines eucaryotes. Nous avons donc choisi de produire la KnNOS1 dans des cellules de tabac, *Nicotiana tabacum*, un système hétérologue eucaryote photosynthétique, évolutivement plus proche de *K. nitens* que les procaryotes, et disponible au laboratoire.

Dans un premier temps, nous avons choisi de produire la KnNOS1-GFP afin de pouvoir suivre en microscopie l'expression et la production de la KnNOS1-GFP. La fluorescence rouge détectée correspond à l'auto-fluorescence des chloroplastes (**Fig. III.11.A** ; Kodama, 2016). Plusieurs zones de fluorescence verte ont confirmé la présence de la KnNOS1-GFP dans le cytosol des cellules de *N. tabacum*, validant l'efficacité de notre système de production de la protéine d'algue étiquetée GFP dans des feuilles de tabac. Cependant, les western blot dirigés contre l'étiquette GFP réalisés sur les extraits protéiques de feuille de tabac surexprimant la KnNOS1-GFP n'ont jamais permis de révéler une bande correspondant à la taille de la KnNOS1-GFP (résultat non montré). La sensibilité

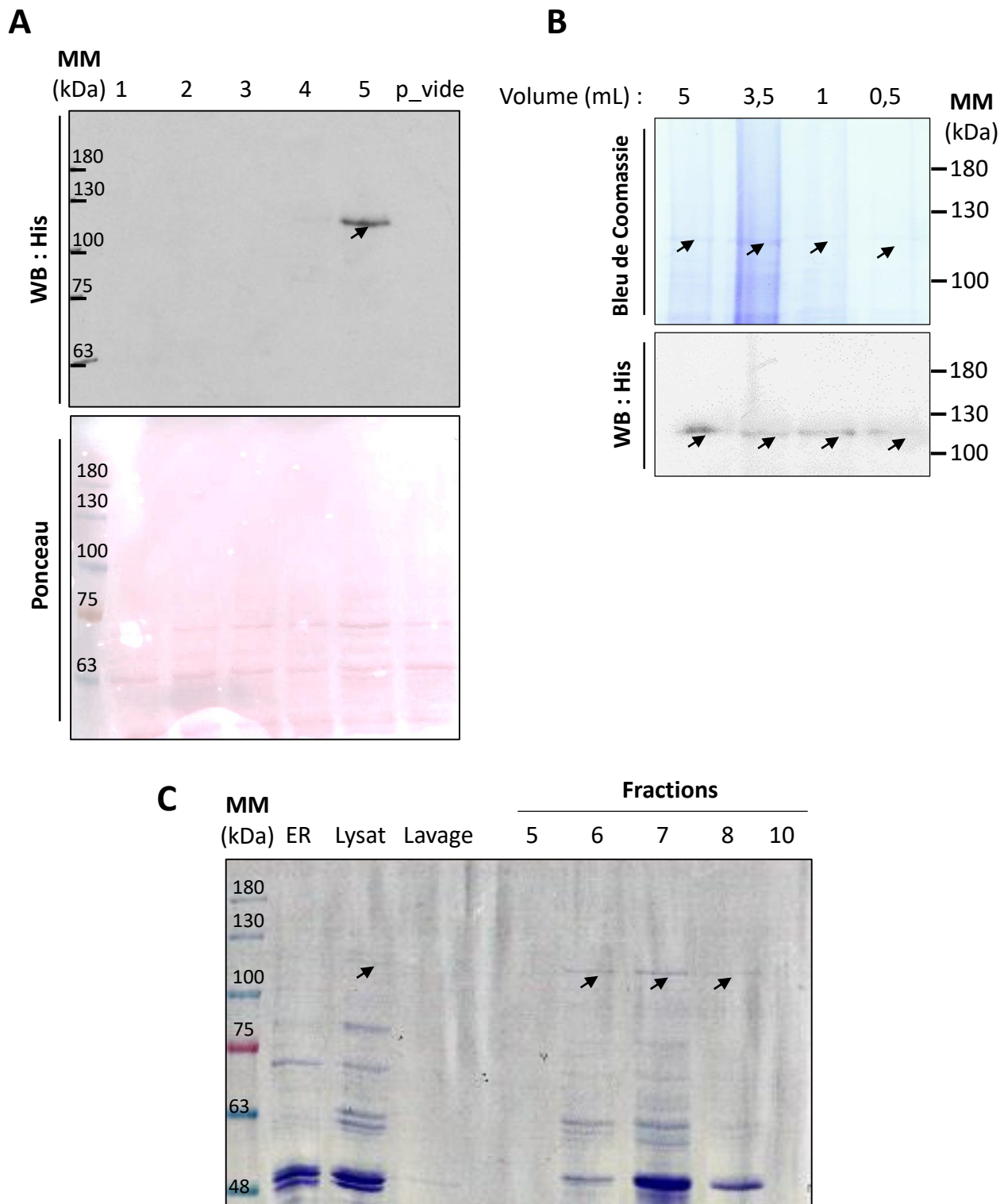


Fig. III.12. Production de la KnNOS recombinante depuis le vecteur pDRf1-GW. **A)** vérification de la production de la KnNOS-His par western blot à partir d'une culture de 1 mL depuis une UFC. p_vide : plasmide vide, témoin négatif de transformation. **B)** Impact du volume de culture sur la production de la KnNOS-His en levure. **C)** Suivi de la production et de la purification de la KnNOS-His produite en levure. Trois mL de cultures ont été centrifugés et le culot a été repris dans du bleu de charge 2X (extraction rapide : ER). Une extraction complète a été réalisée sur 100 mL de culture (lysate). Après filtration à 0,22 μm , le lysate a été chargé sur la colonne de purification *His-trap*[®]. Une fraction de lavage de la colonne avant élution de la protéine a été déposée. Un échantillon de chacune des fractions d'élution présentant une hausse du niveau d'absorbance à 280 nm lors du gradient d'imidazole a été prélevé. Les flèches noires indiquent les bandes apparaissant à la masse moléculaire correspondant à la KnNOS-His.

de détection des fluorophores en microscopie est effectivement plus élevée que la chimioluminescence, mais ces résultats laissent supposer une trop faible production de KnNOS1-GFP en feuilles de tabac pour espérer purifier la protéine. Nous avons donc décidé d'utiliser un système d'expression adapté à une production de protéine en tabac à grande échelle : le système pEAQ-HT-DEST1.

Le plasmide pEAQ-HT-DEST1 utilise le système d'expression CPMV-HT (*cowpea mosaic virus hypertranslational*) du virus de la mosaïque du niébé, qui permet d'augmenter l'efficacité de traduction par rapport au système d'expression classique avec un promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Les plasmides utilisant le CPMV-HT permettent notamment d'obtenir des rendements élevés de protéine recombinante lors de la production en tabac (Peyret and Lomonosoff, 2013). De plus, le plasmide pEAQ-HT-DEST1 exprime en même temps que la séquence d'intérêt, le répresseur p19 du *silencing* des gènes, permettant d'éviter la répression de la transcription de la séquence d'intérêt. La séquence KnNOS1-His a donc été intégrée à ce plasmide (**Fig. III.5**) afin de pouvoir purifier la protéine par affinité sur une colonne de nickel His-Trap® après production en feuilles de tabac. Cependant, après lyse et purification, aucun signal correspondant à la protéine KnNOS1-His n'a été détecté sur gel SDS-PAGE (**Fig. III.11.B**).

c) Protéine recombinante en système levure

Les échecs de production de la KnNOS1 recombinante en *E. coli* et en *N. tabacum* nous ont amenés à changer de système hétérologue de production. La disponibilité du plasmide d'expression en levure pDRf1-GW ainsi que de la souche de *S. cerevisiae* W303-1A au laboratoire a permis de tester la production de protéine recombinante en levure. Dans un premier temps, les levures transformées avec le plasmide permettant l'expression de la KnNOS1-His ont été sélectionnées sur milieu déplété en uracile. Afin de tester la production de la KnNOS1-His, cinq UFC ont été repiquées dans cinq tubes de culture liquide et la production de la KnNOS1-His a été vérifiée par western blot *via* un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine (**Fig. III.12.A**). Une bande immunoréactive de 120 de kDa a été détectée uniquement dans l'extrait protéique obtenu depuis la colonie n° 5. En raison du faible taux d'efficacité de transformation, des stocks en glycérol à - 80 °C ont été réalisés depuis une culture liquide issue de la colonie n° 5 afin de pouvoir produire à nouveau la KnNOS1-His sans recommencer la transformation des levures ainsi que la sélection des colonies productrices de la KnNOS1-His. Dans un second temps, des tests en petit volume nous ont permis de perfectionner le protocole d'extraction rapide en optimisant le volume de culture (**Fig.**

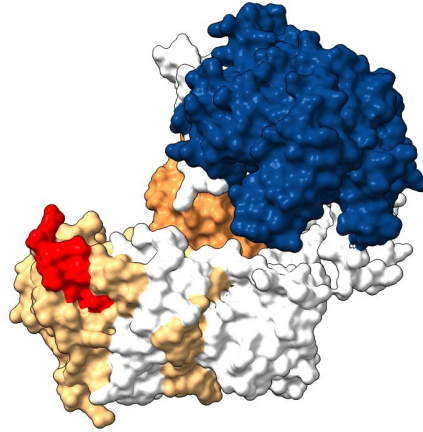
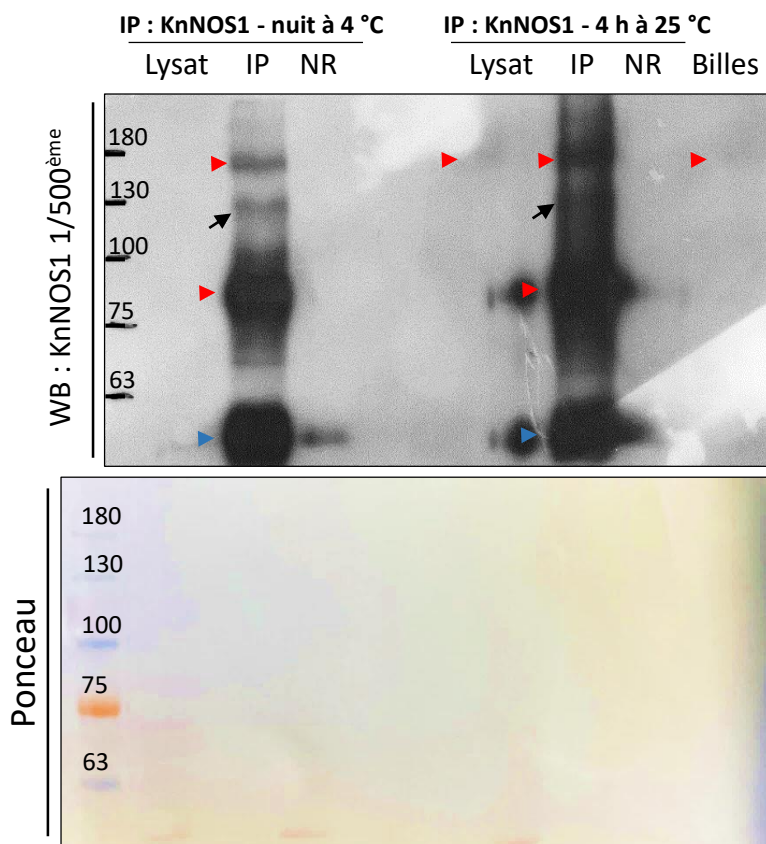
A**B**

Fig. III.13. A) Modèle AlphaFold de la protéine KnNOS1. Le domaine oxygénase est représenté en bleu foncé, le domaine FMN en orange clair, le domaine FNR en orange. Les acides aminés en rouge correspondent au peptide immunogène utilisé pour la synthèse de l'anticorps spécifique de la KnNOS1. **B)** Immunoprécipitation (IP) de la KnNOS1 suivie d'un western blot dirigé contre la KnNSO1. NR : fraction non retenues sur les billes, lysat : extrait protéique total, Billes : témoin négatif d'IP en l'absence d'anticorps. Les flèches noires indiquent les bandes apparaissant à la masse moléculaire correspondant à la KnNOS-His. Les triangles rouges indiquent les bandes aspécifiques immunodétectées par l'AC anti KnNOS1. Les triangles bleus indiquent les chaînes lourdes de l'anticorps.

III.12.B). Ainsi, une analyse par SDS-PAGE après une extraction rapide a mis en avant la présence d'une faible bande correspondant à la masse molaire de la KnNOS1-His (120 kDa) pour tous les volumes testés (**Fig. III.12.B**). Cette bande n'étant pas majoritaire, une immunodétection via un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine a été réalisée. Un signal de masse moléculaire identique à celui détecté sur SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie a bien été révélé par l'anticorps anti-His, nous permettant de conclure à la présence de la KnNOS1-His dans le lysat cellulaire (**Fig. III.12.B**). Ces premiers résultats nous ont encouragés à augmenter le volume de culture à 100 mL. Après application du protocole de lyse complète puis purification par affinité, les fractions d'élution présentant une augmentation de l'absorbance à 280 nm ont été analysées par SDS-PAGE (**Fig. III.12.C**). Une nouvelle fois, une bande de masse molaire 120 kDa, correspondant à la KnNOS1-His, a été mise en évidence au bleu de Coomassie, bien que minoritaire.

2. Identification de partenaires de la KnNOS1 par co-immunoprécipitation

En parallèle des tentatives de production et de purification de la KnNOS1 recombinante pour réaliser les expériences de pull-down, une approche d'identification des partenaires protéiques de la KnNOS1 par co-immunoprécipitation de la protéine endogène suivie d'analyse en spectrométrie de masse a été entreprise. En effet, comme mentionné dans le chapitre II, l'anticorps commandé à façon chez Agrisera a été obtenu à partir d'un peptide situé sur une boucle externe de la KnNOS1 afin d'espérer l'utiliser dans des expériences d'immunoprécipitation de la protéine endogène en conditions natives (**Fig. III.13.A**). Nous avons tout d'abord immunoprécipité la KnNOS1 avec l'anticorps anti-KnNOS1 en testant deux durées d'incubation à deux températures différentes (**Fig. III.13.B**). Dans les lysats totaux, aucun signal immunoréactif n'a été détecté, certainement en raison de la trop faible quantité en protéines déposées sur gel, aucun signal n'étant visible sur la coloration de la membrane au rouge Ponceau (**Fig. III.13.B**). Après immunoprécipitation, en plus de signaux immunoréactifs à 180 kDa et à 80 kDa, une bande de 120 kDa, correspondant à la masse moléculaire de la KnNOS1-His, a été détectée quelles que soient les températures et durées d'incubation.

Nous avons ainsi réalisé des expériences d'immunoprécipitations de la KnNOS1 endogène, suivies d'analyses d'identification par spectrométrie de masse, en trois exemplaires,

Tab. III.3. Nombre de partenaires protéiques identifiés pour chaque NOS répertoriée dans la base de données BioGRID

Espèce	Isoforme	Partenaires
<i>Homo sapiens</i>	NOS1	35
	NOS2	175
	NOS3	50
<i>Mus musculus</i>	NOS1	22
	NOS2	9
	NOS3	1
<i>Rattus norvegicus</i>	NOS1	17
<i>Bos taurus</i>	NOS3	1
<i>Drosophila melanogaster</i>	NOS	5
<i>Sus scrofa</i>	NOS3	3

accompagnées des témoins négatifs en l'absence de l'anticorps. Malheureusement, les analyses de spectrométrie de masse ont révélé l'absence de peptide correspondant à la KnNOS1 suite aux immunoprécipitations. De ce fait, l'anticorps anti-KnNOS1, malgré le choix du peptide cible localisé en surface de la protéine, n'est pas apte à immunoprécipiter la protéine.

3. Identification de partenaires candidats des KnNOS par une approche *in silico*

Afin d'établir une liste de partenaires protéiques potentiels des KnNOS, nous nous sommes intéressés aux partenaires connus de NOS des métazoaires. Grâce à la base de données BioGRID, qui répertorie l'ensemble des interactions protéiques mises en évidence expérimentalement, les partenaires protéiques de 10 NOS de six espèces différentes, dont *H. sapiens*, ont été répertoriées (**Tab. III.3**). Comme les trois isoformes des NOS humaines sont celles qui possèdent le plus de partenaires protéiques décrits, nous avons choisi d'établir le réseau d'interactions protéines-protéines (IPP) des trois HsNOS *in silico* (**Fig. III.14**). Le réseau d'IPP obtenu est composé de trois sous-réseaux, le sous-réseau NOS1 (en jaune), le sous-réseau NOS2 (en bleu) et le sous-réseau NOS3 (en rose). Certains partenaires interagissent avec plus d'une NOS humaine et permettent l'interconnexion des trois sous-réseaux. Le sous-réseau NOS2 présente le plus grand nombre de partenaires avec 175 nœuds, comparé aux sous-réseaux NOS1 et NOS3 avec 16 et 46 nœuds respectivement. Chacune des trois NOS humaines interagit avec elle-même, ce qui était attendu puisque les NOS sont actives sous forme dimérique. En effet, des expériences de double hybride ont déjà montré que les monomères des NOS humaine interagissent avec eux-mêmes (Venema *et al.*, 1997).

Afin d'identifier des protéines partenaires potentielles des NOS de *K. nitens*, nous avons recherché les orthologues de chaque partenaire des NOS humaines. Parmi les protéines partenaires des NOS1, NOS2 et NOS3 humaines, 6,25 %, 58,3 % et 45,8 % sont respectivement conservées dans le protéome de *K. nitens*. Ces protéines conservées sont représentées en tons foncés dans le réseau IPP alors que celles qui n'ont pas d'orthologue sont en teinte pastel (**Fig. III.14**). Parmi les protéines conservées chez *K. nitens*, l'interaction de huit d'entre elles avec les HsNOS conduit notamment à un contrôle de l'activité de la NOS, la dégradation de la NOS par le protéasome ou encore au changement de la localisation cellulaire de la NOS limitant ainsi son action (**Tab. III.4**). Ces partenaires représentent donc des candidats d'intérêt

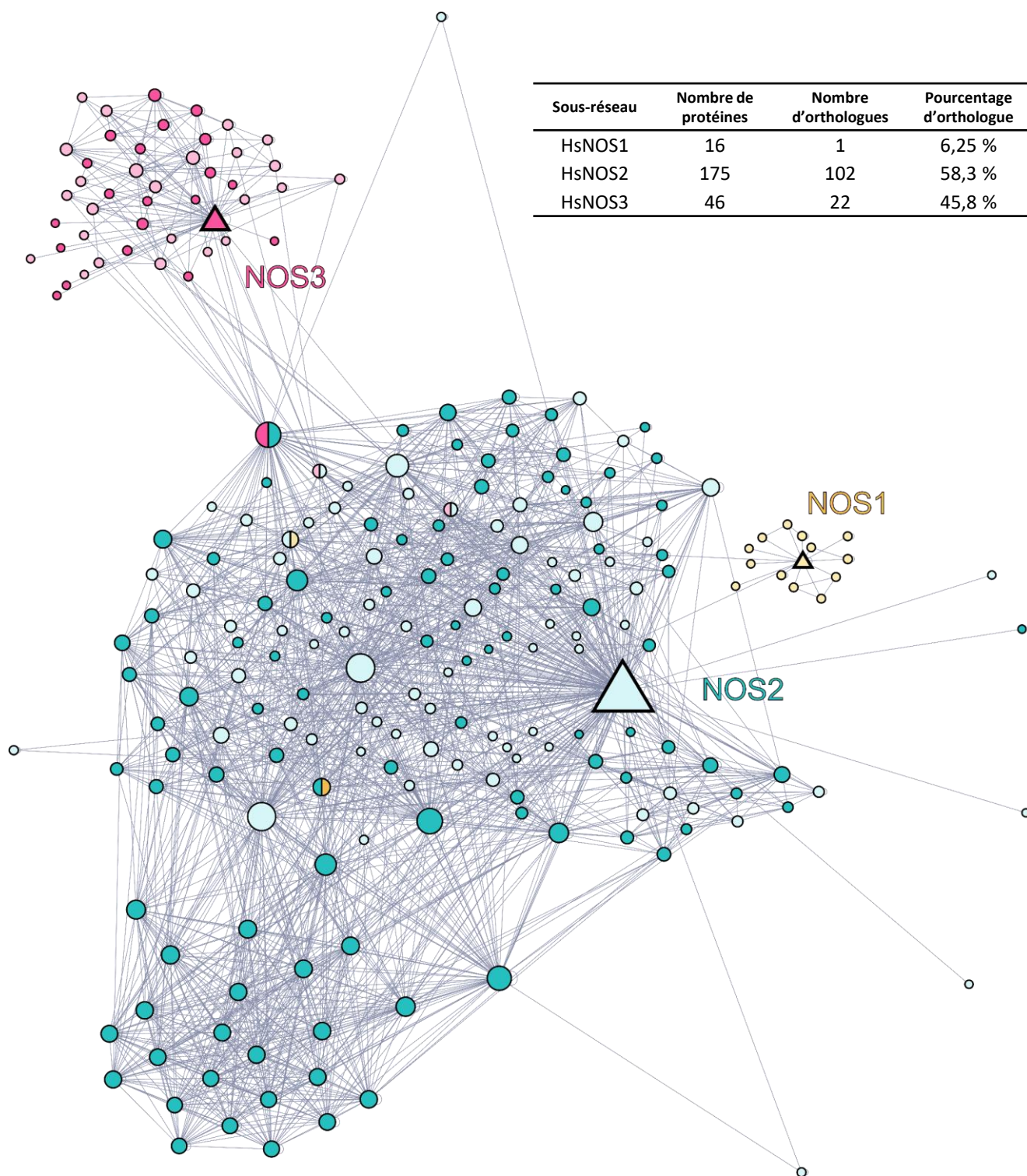


Fig. III.14. Réseau d'interaction protéine-protéine (PPI) de la NOS1 (NOS neuronale ; P29475), de la NOS2 (NOS inductible ; P35228) et de la NOS3 (NOS endothéliale ; P29474) humaines. Les données ont été téléchargées à partir de la base de données BioGRID et la représentation graphique a été réalisée à l'aide du logiciel Gephi. Chaque nœud représente une protéine, et la taille des nœuds est proportionnelle au nombre de connexions avec d'autres nœuds. Les liens entre les nœuds représentent les interactions physiques entre les protéines. Les nœuds en forme de triangle représentent les trois NOS, en jaune pour la NOS1, en bleu pour la NOS2 et en rouge pour la NOS3. Les nœuds en forme de cercle représentés en bleu sont des partenaires de la NOS2, ceux en rose sont des partenaires de la NOS3 et ceux en jaune sont des partenaires de la NOS1. Les nœuds représentés en teinte pastel n'ont pas d'orthologues chez *K. nitens* tandis que ceux en couleurs sombres sont conservés chez *K. nitens*.

pour la suite de notre étude sur les NOS de *K. nitens*. En effet, il sera intéressant de vérifier ensuite si ces protéines sont également identifiées expérimentalement par pull-down. Leur fonction dans la signalisation cellulaire et moléculaire pourra alors être étudiée afin de vérifier si leur rôle régulateur de NOS est conservé chez *K. nitens*.

D. Discussion et perspectives

Un objectif majeur du travail de thèse était l'identification des partenaires protéiques de la KnNOS afin d'acquérir de nouvelles connaissances sur son fonctionnement et son rôle dans la signalisation par le NO. A cette fin, nous avons choisi une stratégie d'identification des partenaires par pull-down qui nécessite la production de protéine recombinante. La production de la protéine nous permettait d'envisager également d'étudier l'activité enzymatique des KnNOS, leur affinité pour la L-arginine ou pour leurs différents co-facteurs. En première intention, les tests de production de la protéine recombinante n'ont concerné que la KnNOS1 (qui était lors du début de la thèse la seule protéine de *K. nitens* identifiée par homologie de séquence comme une NOS).

L'utilisation de système hétérologue bactérien reste le moyen le plus rapide et le moins couteux pour produire en quantité des protéines recombinantes (Desai *et al.*, 2010), nous avons donc choisi de produire la KnNOS1 en *E. coli*. De plus, plusieurs études de production de NOS de mammifères en système bactérien avaient été publiées au cours des vingt dernières années (Gerber and Montellano, 1995; Roman *et al.*, 1995; Fossetta *et al.*, 1996; Adak *et al.*, 1999; Konas *et al.*, 2004). Plus récemment la NOS d'*Ostreococcus tauri* avait également été produite chez la bactérie *E. coli* (Foresi *et al.*, 2010). Cependant, nous avons été tout d'abord confrontés à un problème de solubilité de la protéine KnNOS1-His. En effet, la grande majorité de la protéine KnNOS1-His se retrouvait dans la fraction insoluble et ceci, quelles que soient les optimisations des conditions expérimentales effectuées, classiquement décrites dans la littérature pour augmenter la solubilité des protéines lors de leur production. Nos tentatives de purification ont révélé dans les fractions d'élution, en plus d'une bande en très faible quantité dont la taille correspondait à la KnNOS1-His, une deuxième bande d'environ 70 kDa et également détectée par l'anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidine. Cette bande pourrait correspondre à un fragment de la KnNOS1-His. En effet lors de la production et purification d'une NOS de rat en *E. coli*, une équipe a mis en évidence par western blot la présence d'un produit hydrolytique de la NOS de rat à une taille correspondant

Tab. III.4. Liste des partenaires des NOS humaines identifiés à partir de la base de données BioGRID et leurs orthologues dans le génome de *Klesormidium nitens*.

Protéine <i>Homo sapiens</i>		Orthologue chez <i>Klesormidium nitens</i>		Interaction avec	Action sur HsNOS
Nom	Accession UniProtKB	Nom	Accession UniProtKB		
HSP90	P07900	HSP	AOA1Y1HY34	NOS2/NOS3	Augmentation de l'activité
		HSP	AOA1Y1HT80		
		HtpG	AOA1Y1HL34		
β -actin	P60709	Actin	AOA1Y1IK53	NOS3	Rétrocontrôle négatif
STUB1	Q9UNE7	STUB1	AOA0U9HIG1	NOS1/NOS2	Dégradation protéasomale
Elongin C	Q15369	Elongin C	AOA1Y1IDM0	NOS2	Dégradation protéasomale
ADRM1	Q16186	Rpn13	AOA1Y1HR80	NOS2	Dégradation protéasomale
UCH37	Q9Y5K5	UCH	AOA1Y1HNS5	NOS2	Dégradation protéasomale
Rac2	P15153	Ras	AOA1Y1IHY9	NOS2	Distribution cellulaire
NOSIP	Q9Y314	RING	AOA1Y1HYP3	NOS3	Distribution cellulaire

à 70 kDa (Gerber and Montellano, 1995). La KnNOS1-His produite en *E. coli* semblait peu stable et la production n'était pas assez importante pour purifier la protéine. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser une étiquette GST au lieu de l'étiquette poly-histidine.

L'addition d'une protéine GST à la séquence protéique peut augmenter la solubilité de la protéine à produire (Harper and Speicher, 2008). La construction GST-KnNOS1 a été purifiée par affinité sur des billes His-Trap en quantité a priori satisfaisante. Cependant cette purification s'est révélée peu spécifique, de nombreuses bandes étant présentes sur l'analyse SDS-PAGE. De plus, la protéine GST-KnNOS1 montre une distance de migration supérieure à celle attendue (125 kDa au lieu de 150 kDa), ce qui suggère soit une synthèse incomplète de la GST-KnNOS1, soit une hydrolyse de la protéine après sa synthèse générant des produits de dégradation. Afin de supprimer la possibilité de la synthèse de produit incomplet, nous avons utilisé un vecteur permettant l'addition d'une étiquette GST en position C-ter à la KnNOS1. Malheureusement, la protéine recombinante KnNOS1-GST n'a pu être produite en *E. coli* dans aucune des conditions testées. Afin d'éliminer les protéines de synthèse partielle ou les produits de dégradation et d'augmenter la pureté nous avons envisagé d'ajouter une deuxième étape de purification, telle qu'une chromatographie d'exclusion moléculaire. Seulement nous ne sommes pas parvenus à éluer la GST-KnNOS1 des billes de glutathion. Une des solutions pour éluer la KnNOS1 aurait été de cliver la protéine au niveau du site de jonction entre la KnNOS1 et la GST. Cependant il aurait été nécessaire d'ajouter les codons correspondant au site de reconnaissance d'une protéase, telle que la TEV (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Glu/Ser), dans les amorces A1 et/ou A2 ayant servi à l'obtention de la séquence attB1-KnNOS1-attB2. Ainsi, la TEV protéase nous aurait permis de séparer la protéine recombinante de l'étiquette GST et d'éluer la protéine sans étiquette, directement à partir des billes de glutathion. En effet dans une étude menée en 2003 par Evans *et al.*, la séquence de la TEV a été ajoutée aux amorces ayant servi au clonage de la protéine Cezanne avant insertion dans le pDEST15, le plasmide que nous avons utilisé pour l'obtention de la GST-KnNOS1 (Evans *et al.*, 2003).

D'autres options de production en système bactérien auraient pu être testées. Par exemple, l'induction de la production de protéine recombinante à basse température permet d'augmenter la solubilité de la protéine produite. En effet, pour la KnNOS1-His les meilleurs résultats ont été obtenus lors d'une induction à 18 °C sur la nuit et la température peut être

diminuée de manière encore plus drastique. Cependant, la production de protéine recombinante à très basse température nécessite des souches adaptées, telles que la souche d'*E. coli* ArticExpress ou encore Rosetta-Gami2 qui a permis la production de protéine à 8 °C (Song *et al.*, 2012).

Une des hypothèses pouvant justifier nos difficultés de production de la KnNOS1 en bactérie est la conformation prise par la KnNOS1 lors de sa synthèse, qui pourrait diminuer sa stabilité et mener à son accumulation dans la fraction insoluble. En effet, pour certaines protéines hétérologues, *E. coli* ne peut pas effectuer correctement le repliement de la protéine. Lors de la production en bactérie, plusieurs facteurs peuvent conduire à un mauvais repliement de la protéine hétérologue : i) l'absence de modifications post-traductionnelles, ii) la présence dans l'insert de séquences agissant comme des signaux de terminaison chez *E. coli* et conduisant à la terminaison prématurée et à la perte de l'expression du gène, iii) l'incapacité des bactéries à établir des ponts disulfures présents dans les protéines eucaryotes et nécessaires à la structure de la protéine (Porro *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2016). En ce qui concerne la KnNOS1, ProtParam⁷, un outil d'analyse permettant de calculer des paramètres physico-chimiques depuis la structure primaire des protéines disponible sur le serveur ExPASy (Gasteiger *et al.*, 2005), a calculé un temps de demi-vie de moins de 10 heures de la KnNOS1 en *E. coli* alors que ce temps de demi-vie passe à 20 heures en levures et à 30 heures dans les réticulocytes des cellules de mammifères. Nous avons donc choisi à cette étape de concentrer nos efforts sur la production en cellule eucaryote afin d'augmenter les chances de produire la KnNOS1 dans une conformation favorisant sa stabilité et son activité.

La KnNOS1 a alors été produite dans des cellules de tabac qui possèdent la machinerie nécessaire au bon repliement des protéines hétérologues eucaryotes et sont considérées comme un bon modèle pour produire des protéines recombinantes (Tremblay *et al.*, 2010; Desai *et al.*, 2010; Massa *et al.*, 2019). Cette stratégie ne nous a pas permis de purifier la KnNOS1, ce qui peut s'expliquer par plusieurs phénomènes. D'un côté, les gènes sous contrôle d'un promoteur fort ont tendance à être réprimés par les cellules afin d'éviter l'accumulation de protéines, ce qui est justement le cas du plasmide utilisé pour la production de la KnNOS1-His en tabac. Toutefois, le pEAQ-HT-DEST1 permet l'expression de la protéine P19 qui vient

⁷ <https://web.expasy.org/protparam/>

inhiber ces phénomènes de répression de la transcription (Sainsbury *et al.*, 2009; Peyret and Lomonossoff, 2013). D'un autre côté, l'accumulation de protéines dans le cytosol va conduire à la dégradation de cet excès de protéine. C'est pourquoi certains systèmes d'expression en cellules de tabac favorisent l'accumulation des protéines produites dans la lumière du réticulum endoplasmique. En effet, dans le réticulum endoplasmique, les protéines hétérologues sont exclues du renouvellement physiologique normal, le niveau de protéase étant très faible, ce qui permet d'augmenter le rendement de la production (Desai *et al.*, 2010; Conley *et al.*, 2011).

La production de la KnNOS1-His en tabac ayant échoué, une production de la KnNOS1 en levure a été mise en place, dont les premiers résultats étaient plutôt encourageants, puisque la KnNOS1-His était bien présente dans les fractions d'élution après purification. Les quantités de KnNOS1-His produites restent néanmoins pour le moment trop faibles pour fixer la protéine sur billes et pour envisager la réalisation d'expérience de pull-down. Cependant, les résultats d'immunoprécipitation *via* l'anticorps spécifique anti-KnNOS1 n'ayant pas permis d'immunoprécipiter la KnNSO1, poursuivre l'optimisation de la production de la protéine recombinante KnNOS1 semble être la meilleure option pour identifier les partenaires des KnNOS1. Il serait donc intéressant de produire la KnNOS1-His en levure dans des volumes plus importants afin d'obtenir les quantités requises en protéine purifiée pour la suite des expériences.

D'autres systèmes hétérologues de production pourraient également être envisagés comme les cellules d'insectes ou encore des réticulocytes de cellules de mammifères. La production en cellule d'insecte avec un système d'infection baculovirus permet dans de nombreux cas d'obtenir des protéines recombinantes solubles (Gomes *et al.*, 2016). Les systèmes d'expression utilisant des cellules de mammifères favorisent également le repliement correct des protéines, notamment par leur capacité à réaliser des modifications transcriptionnelles. De plus, les protéines peuvent être sécrétées, ce qui facilite leur purification (Gomes *et al.*, 2016). Cependant, le laboratoire ne possède pas les outils nécessaires à la mise en place de ces techniques. Des partenariats pourraient être envisagés en cas d'échec de la production de la KnNOS1 en levure.

En parallèle, des expérimentations menées pour identifier *in vitro* et *in vivo* des partenaires protéiques des NOS de *K. nitens*, nous avons développé une stratégie qui nous permettait de

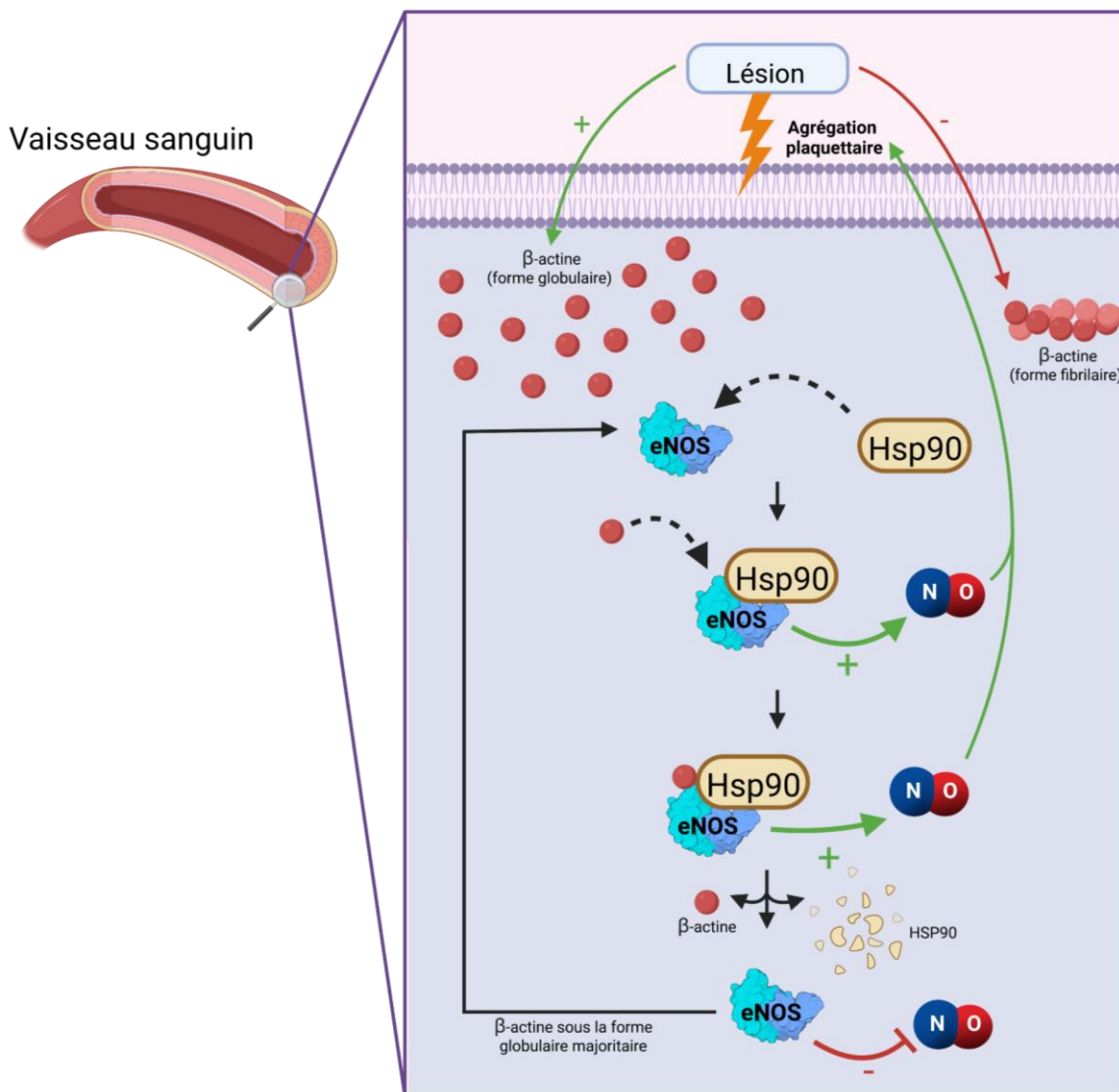


Fig. III.15. Schéma de la régulation de la production de NO de la NOS3 par ses interactions protéine-protéine (IPP) dans les plaquettes chez l'homme. Lorsque la forme globulaire de la β -actine est favorisée par rapport à la forme fibrillaire (e.g. dans le cas d'une lésion), la NOS va former un complexe protéique avec la protéine HSP90, ce qui conduit à une augmentation de son activité. La fixation de la HSP90 sur la NOS3 va augmenter l'affinité de ce complexe pour la forme globulaire de la β -actine. La liaison de la β -actine va favoriser la dissociation de HSP90 du complexe et mener à sa dégradation, ce qui va conduire à la diminution de la production du NO et ainsi éviter une accumulation trop importante de ce dernier. La dissociation du complexe NOS3-HSP90 va également conduire à une diminution de l'affinité pour la β -actine qui va se détacher de la NOS3. La NOS3 libre pourra alors former un nouveau complexe avec la HSP90 si la forme globulaire de la β -actine est toujours supérieure à la forme fibrillaire.

lister des protéines partenaires candidates à partir des données d'IPP dans la base BioGrid. Pour cela, un réseau d'IPP des HsNOS a été réalisé *in silico* puis couplé à une analyse d'orthologie afin d'identifier de potentiels partenaires des KnNOS. Ces données ont fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Plant Science* (cf. **ANNEXES**). Depuis, le nombre de partenaires identifiés sur BioGRID de la HsNOS1 et HsNOS3 a augmenté (**HsNOS1** : 35 partenaires sur BioGRID, 16 dans le réseau d'IPP ; **HsNOS3** : 50 partenaires sur BioGRID, 46 dans le réseau d'IPP). Cette différence provient du fait que la base de données BioGRID est en constante évolution, en particulier sur les données humaines. En effet, une étude récente sur l'interactome de deux lignées cellulaires humaines a enrichi les données disponibles sur BioGRID, notamment concernant et les interactions entre la HsNOS1, la HsNOS3 et de nouveaux partenaires protéiques ont été mise en évidence (Huttlin *et al.*, 2021).

L'analyse d'orthologie a permis d'identifier des partenaires potentiels des KnNOS possédant un rôle régulateur sur les HsNOS. En effet, la HSP90 et la β -actine ont été retrouvées parmi les partenaires des HsNOS conservés chez *K. nitens*, or l'activité de la NOS peut être augmentée par la formation d'un complexe ternaire avec HSP90 et la β -actine globulaire. Premièrement, HSP90 se lie à la HsNOS3 ce qui entraîne une augmentation de l'activité de la NOS ainsi qu'une augmentation de l'affinité pour la β -actine. Deuxièmement, la liaison de la β -actine entraîne une augmentation de la dégradation de HSP90, et de la dissociation du complexe ternaire, limitant ainsi dans le temps l'activation de la HsNOS3. Ce mécanisme augmente la production de NO lorsque la forme globulaire de la β -actine est favorisée par rapport à la forme fibrillaire tout en maintenant un rétrocontrôle négatif (**Fig. III.15** ; Ji *et al.*, 2007). D'autres partenaires inhibent l'activité de la NOS en déclenchant sa dégradation par le protéasome. STUB1 par exemple, *via* son activité ubiquitine ligase, déclenche la dégradation de la HsNOS1 en ubiquitylant la NOS au niveau du site de liaison à la calmoduline (Clapp *et al.*, 2012). Un mécanisme similaire a été décrit pour l'Elongin C qui interagit et conduit à l'ubiquitylation de la HsNOS2. Ce motif ubiquitine est ensuite reconnu par la sous-unité ADRM1 du protéasome 19S, suivi du recrutement de la protéine UCH37, conduisant à la dégradation protéasomale de la HsNOS2 (Mazumdar *et al.*, 2010; Nishiya *et al.*, 2011). Parmi les partenaires conservés chez *K. nitens* des régulateurs de NOS *via* leur relocalisation intracellulaire ont également été identifiés. Ainsi, Rac2, dont la localisation est périnucléaire, induit l'augmentation de l'activité de la HsNOS2 au cours de la réponse inflammatoire par

redistribution spatiale dans la cellule (Kuncewicz *et al.*, 2001). Dans le cas de la NOS3, la liaison de NOSIP avec son domaine C-terminal chez l'homme inhibe son activité en la découplant des cavéoles de la membrane plasmique (Dedio *et al.*, 2001). Puisque les protéines orthologues sont susceptibles de partager une même fonction, nous sommes en mesure d'émettre des hypothèses sur le rôle biologique des orthologues de *K. nitens* (Emms and Kelly, 2015). Ainsi, notre approche *in silico* préliminaire a mis en évidence la présence de nombreux partenaires candidats des KnNOS ayant potentiellement un rôle régulateur de l'activité NOS.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Mon travail de thèse s'est inscrit dans l'étude de la compréhension et de l'évolution de la signalisation NO dans la lignée verte. L'objectif principal de mon travail était de comprendre le rôle de la protéine NO synthase chez l'algue Streptophyte *K. nitens*. L'hypothèse posée au départ était que l'identification des partenaires protéiques de cette enzyme apporterait des informations sur les voies de signalisation NOS – dépendantes. L'objectif initial n'a pas été atteint suite aux problèmes liés à la production de la protéine NOS recombinante, discutés plus haut dans ce mémoire. Néanmoins, ce travail de thèse peut être considéré comme novateur, d'une part, par l'utilisation d'un modèle biologique peu étudié, d'autre part, par l'étude de protéines NOS dont la fonction chez les organismes photosynthétiques reste à élucider.

Premièrement, les connaissances sur les algues, bien qu'en pleine expansion, restent fragmentaires. Les algues représentent aujourd'hui des organismes d'intérêt économique, de par leur importance dans le développement de biotechnologies notamment en ce qui concerne la production de biocarburants et de produits liés à la santé (Wijffels and Barbosa, 2010; Khan *et al.*, 2018; Barkia *et al.*, 2019). Cependant le transfert vers une production industrielle n'est encore que très limité. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le peu d'applications est dû au manque de connaissances fondamentales (Kamalanathan and Quigg, 2020), même si les algues vertes sont utilisées comme modèle d'étude en biologie cellulaire et physiologie depuis plusieurs dizaines d'années. En effet, les principaux résultats de recherche, acquis sur un nombre limité de modèles (*e.g. Closterium ehrenbergii*, *Chlamydomonas reinhardtii*), ne sont certainement pas généralisables à l'ensemble de ce groupe taxonomique qui montre une très grande diversité d'organisation, de fonctionnement et d'adaptations physiologiques. Ceci renforce l'intérêt fondamental et appliqué de s'intéresser à d'autres modèles qui, comme *K. nitens*, phylogénétiquement proche des plantes terrestres, présentent des caractéristiques génétiques, physiologiques et écologiques particulières. Nos travaux ont permis de générer des connaissances sur la génomique de *K. nitens* (confirmation de la présence de deux NOS et des orthologues de leurs partenaires protéiques potentiels) et de fournir des outils de biologie moléculaire nécessaires aux analyses d'expression de gènes (identification de gènes de référence et de gènes marqueurs en condition de stress abiotiques chez *K. nitens*).

Deuxièmement, la caractérisation des séquences primaires nucléotidiques et protéiques de deux KnNOS dans le génome de *K. nitens*, la prédiction de leur structure 3D, les travaux exploratoires menés sur leur expression dans différentes conditions de stress abiotiques, l'identification de protéines partenaires candidates ainsi que les outils développés (production de protéines recombinantes, anticorps anti-KnNOS) a permis d'enrichir les connaissances disponibles sur les protéines de la famille des NOS. Ainsi, nos résultats préliminaires pourraient contribuer à une meilleure compréhension du rôle des NOS chez les algues et de la signalisation NO. La distribution singulière de la NOS dans la lignée verte en fait un bon modèle d'étude pour étudier l'évolution du rôle du NO chez les organismes photosynthétiques, où les voies de biosynthèse du NO restent énigmatiques, et plus globalement dans le monde vivant. En effet, le NO apparaît comme une des premières molécules de signalisation et a probablement joué un rôle crucial dans les premiers stades de l'évolution de la vie (Feelisch and Martin, 1995).

Plusieurs perspectives s'ouvrent suite à ces travaux de thèse. Bien que la production et la purification de la protéine recombinante KnNOS1 n'aient pas abouti, les nombreux tests effectués ont permis de nous orienter vers le système de production hétérologue en levure, qui semble le plus adapté à la production et à la purification de la KnNOS1. Après vérification de l'ORF proposée pour la KnNOS2, il sera également possible de produire cette protéine dans un système hétérologue dans les conditions précédemment déterminées. Le réseau d'interaction des NOS humaines, en plus de répertorier toutes les interactions connues, a permis d'identifier de futurs candidats d'étude intéressants. Ainsi dès que les partenaires des KnNOS auront été identifiés par pull-down suivi d'analyse par spectrométrie de masse, il sera intéressant de vérifier si leur rôle régulateur des NOS est conservé chez *K. nitens*.

L'obtention des deux protéines recombinantes permettra d'étudier l'activité *in vitro* des deux KnNOS. Afin de caractériser l'activité oxygénase et réductase des KnNOS, plusieurs tests seront réalisés. L'activité oxygénase pourra être contrôlée par un test de Griess afin de suivre la production de nitrite (Feng *et al.*, 1999), l'activité réductase pourra être mesurée en suivant la disparition du NADPH à 340 nm (Adak *et al.*, 1999). Enfin, la réalisation d'un test oxyhémoglobine permettra de quantifier la production de NO de la KnNOS, cette méthode ayant entre autres été appliquée à la NOS d'*O. tauri* (Murphy and Noack, 1994; Foresi *et al.*, 2010). En cas de difficulté, ces techniques pourront être réalisées avec l'aide de l'équipe du

Dr. Jérôme Santolini, notre collaborateur au sein de l'ANR algae-NOS (Weisslocker-Schaetzel *et al.*, 2017).

Il serait également intéressant d'explorer la structure quaternaire des deux NOS. Dès que les protéines recombinantes auront été produites, des mesures de dichroïsme circulaire pourront être effectuées. Couplées aux modélisations 3D déjà obtenues, ces mesures permettront d'étayer l'hypothèse d'une dimérisation des deux KnNOS. Dans ce sens, nous avons pris contact avec l'équipe du Dr. Fabrice Neiers du CSGA de Dijon qui possède le matériel et l'expertise nécessaire pour ce genre d'analyse (Laffitte *et al.*, 2022). Toujours dans l'objectif de travailler sur l'élucidation de la structure quaternaire des deux KnNOS, des expériences de filtration sur gel et des migrations en condition native pourront être effectuées, ces deux techniques étant maîtrisées par l'équipe (Rosnoblet *et al.*, 2017, 2021; Bègue *et al.*, 2019a).

D'un point de vue physiologique, il est pour le moment difficile d'étudier l'impact des KnNOS sur *K. nitens*, en effet les outils et protocoles nécessaires à la transformation de *K. nitens* ne sont pas encore maîtrisés. En attendant, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'expression des KnNOS chez d'autres organismes chlorophylliens comme cela a été réalisé pour la NOS d'*Ostreococcus tauri* (Foresi *et al.*, 2015). A cette fin, nous avons profité de la construction KnNOS1-GFP sous contrôle du promoteur 35S pour transformer des cellules de tabac afin d'obtenir une lignée stable surexprimant la KnNOS1 portant une étiquette GFP. Des plants de tabac ont également été régénérés depuis la lignée cellulaire transformée. La production de NO des cellules transformées pourra être mesurée en réponse à différents stress. Le laboratoire possède également les outils nécessaires à la mise en place de stress biotiques chez le tabac (Lamotte *et al.*, 2004), ce qui n'était pas envisageable chez *K. nitens*. Ces outils permettront d'investiguer l'impact de la surexpression de la KnNSO1 chez le tabac et donc de donner des informations sur sa fonction. En effet, les études d'expression hétérologue de la NOS d'*O. tauri* et de la NOS de *Synechococcus PCC 7335*, respectivement dans des cellules de tabac et d'*A. thaliana*, ont généré des résultats intéressants sur leur activité (Nejamkin *et al.*, 2020; Del Castello *et al.*, 2021). Une stratégie identique pourrait être mise en place pour étudier la fonction de la KnNOS2.

CONTRIBUTION

Le projet CDC48

A. Contexte du projet CDC48

1. Historique de l'équipe sur l'étude de CDC48

Mon équipe d'accueil est l'une des équipes pionnières dans l'étude de la signalisation NO en réponse au stress chez les plantes. En effet, elle a démontré que le NO était l'une des molécules de signalisation cellulaire mobilisée rapidement lors des réponses de défenses chez les végétaux (Lamotte *et al.*, 2004; Besson-Bard *et al.*, 2008*b,a*). Afin d'approfondir les connaissances sur la signalisation liée au NO en réponse au stress biotique, le laboratoire a identifié les protéines S-nitrosées dans les premières étapes de la réponse des cellules de tabac confrontées à un facteur de virulence, la cryptogéine. La cryptogéine est une protéine globulaire produite par l'oomycète *Phytophthora cryptogea*, qui déclenche des réponses de défense chez le tabac. Les protéines spécifiquement S-nitrosées dans les cellules de tabac en réponse à la cryptogéine ont été isolées par la technique du biotine-switch (Aimé *et al.*, 2018) puis identifiées par spectrométrie de masse (Astier *et al.*, 2012). Cette étude a permis d'identifier la protéine *Cell Division Cycle 48* (CDC48) comme étant spécifiquement S-nitrosée sur la cystéine 526 en réponse à la cryptogéine. *In vitro*, deux autres résidus d'acides aminés cibles du NO ont été identifiés : les cystéines 110 et 664, et il a été montré que la S-nitrosation possédait un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de CDC48. En effet, la cystéine 526 étant positionnée dans le motif Walker A, responsable de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP, sa S-nitrosation pourrait générer un encombrement stérique responsable de l'empêchement de l'interaction et/ou de l'hydrolyse de l'ATP (Astier *et al.*, 2012). Par la suite, il a été montré que seule une très faible proportion de CDC48 était effectivement nitrosée *in vivo* en réponse à la cryptogéine (Rosnoblet *et al.*, 2017). De ce fait, la conséquence biologique de cette modification post-traductionnelle interroge et oriente davantage sur une fonction de signalisation (Rosnoblet *et al.*, 2016).

CDC48 est une protéine cytosolique et nucléaire hautement conservée chez les eucaryotes. De la famille des AAA+ ATPases (*ATPases Associated with diverse cellular Activities* ; Stolz *et al.*, 2011), elle est impliquée dans de nombreuses voies de régulation cellulaires telles que le contrôle qualité des protéines et le système ubiquitine protéasome (UPS), le trafic intracellulaire et la fusion membranaire, les dégradations associées au RE, Golgi, Ribosomes, mitochondries, chloroplastes, la réparation et la réplication de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et l'expression des gènes, l'apoptose et l'autophagie (Andersen, 2005; Meyer *et al.*,

2012; van den Boom and Meyer, 2018). Dans la plupart de ces processus, CDC48 possède un rôle de ségrégase : elle extrait des protéines substrats polyubiquitinés de complexes protéiques, de membranes, ou de la chromatine afin de les délivrer au protéasome pour leur dégradation. Elle catalyse également le remodelage des protéines mal conformées pour les conduire au protéasome sous une forme facilitant leur dégradation (Meyer *et al.*, 2012). A travers l'ensemble de ces fonctions, CDC48 est essentielle à la viabilité cellulaire. Lors de la réponse de défense chez le tabac, une accumulation de CDC48 est observée. Or la surexpression de CDC48 dans des suspensions cellulaires de tabac accélère et amplifie le phénomène de mort cellulaire observé lors des réponses de défenses (Rosnoblet *et al.*, 2017). CDC48 interagit avec des partenaires, des cofacteurs ou adaptateurs (Buchberger *et al.*, 2015), ainsi que des cibles, qui diffèrent en fonction de la voie de signalisation dans laquelle elle est impliquée. Identifier les protéines interagissant avec CDC48 chez le tabac en réponse à la cryptogéine permettrait ainsi de caractériser le rôle de CDC48 dans la réponse immunitaire des plantes. Mon équipe d'accueil a identifié les protéines interagissant avec CDC48 par co-immunoprécipitation suivie d'analyse en spectrométrie de masse (Rosnoblet *et al.*, 2017). Par la suite, une étude bio-informatique a permis d'établir l'interactome *in silico* de CDC48 chez les plantes (Bègue *et al.*, 2019b).

Parmi les protéines identifiées comme partenaires protéiques de CDC48, certaines sont spécifiques aux végétaux, telle que la protéine APX impliquée dans la détoxification des formes réactive de l'oxygène et de l'azote (Bègue *et al.*, 2019a), alors que d'autres sont communes aux mammifères, telles que la nucléoline, impliquée dans la synthèse des ARN ribosomiques, la protéine du trafic intracellulaire ARF ou encore les protéines de l'UPS (Rosnoblet *et al.*, 2017). Différentes études ont mis en avant le rôle de l'UPS dans les réponses de défenses chez les végétaux, les voies de dégradation des protéines mal conformées et dont la cellule n'a plus besoin étant particulièrement mobilisées lors d'attaques par des microorganismes pathogènes (Spoel *et al.*, 2009). Par exemple, en réponse à la cryptogéine, les cellules de tabac accumulent des sous-unités α et β du protéasome 20S (Petitot *et al.*, 1997; Dahan *et al.*, 2001). Le protéasome peut également moduler la mise en place de la mort cellulaire programmée en dégradant des cyclines qui régulent la progression du cycle cellulaire (Ohno *et al.*, 2011; Marino *et al.*, 2012). CDC48 et le protéasome étant tous deux des acteurs des réponses de défenses des plantes, mon équipe d'accueil s'est interrogée sur l'impact de l'interaction de

CDC48 sur le protéasome dans le modèle cryptogéine-tabac. L'objectif de ce travail a été d'améliorer la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'UPS dans l'immunité.


2. Contribution à l'étude de l'interaction entre CDC48 et le protéasome

Lors de mon stage de master 2, j'ai travaillé sur l'étude du rôle de la protéine CDC48 dans l'UPS lors de la réponse de défense des plantes. Pendant ma thèse, j'ai pu participer à la finalisation de ce travail qui a abouti à une publication dans la revue *Plant Cell Environnement*. Dans cette publication, j'ai contribué aux expériences de confirmation de l'interaction de CDC48 avec le protéasome, *in vitro* par des expériences de pull-down et *in planta* par des expériences de FRET-FLIM. J'ai également participé aux analyses de filtration sur gel afin de confirmer que la sous-unité du protéasome Rpn3 portant une étiquette GFP ou YFP faisait bien partie d'un complexe protéique de la masse moléculaire du protéasome. J'ai également réalisé le suivi de la mort cellulaire des lignées surexprimant CDC48 en microscopie à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium révélant spécifiquement les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. La perte de cette intégrité représente une des caractéristiques de la mort cellulaire. Enfin, j'ai réalisé les analyses de RT-qPCR afin de suivre l'accumulation des transcrits de plusieurs sous-unités du protéasome dans les lignées sauvages et surexprimant CDC48 en réponse à la cryptogéine.

B. La protéine chaperonne CDC48 régule le système ubiquitine protéasome chez les plantes

Article scientifique n°3 : article de résultats paru en avril 2021 dans la revue *Plant Cell Environnement*

The chaperone-like protein Cdc48 regulates ubiquitin-proteasome system in plants

Claire Rosnoblet¹  | Pauline Chatelain¹ | Agnès Klinguer¹ | Hervé Bègue^{1,2} | Pascale Winckler³ | Carole Pichereaux^{4,5} | David Wendehenne¹

¹Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université de Bourgogne, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

²Laboratory of Parasitology and Mycology, Dijon University Hospital, Dijon, France

³Plateforme DimaCell, PAM UMR A 02.102, Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, Dijon, France

⁴Fédération de Recherche (FR3450), Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité (AIB), CNRS, Toulouse, France

⁵Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Université de Toulouse UPS, CNRS, Toulouse, France

Correspondence

Claire Rosnoblet, Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université de Bourgogne, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.
Email: claire.rosnoblet@u-bourgogne.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ALGAE-NOS; ISITE-BFC, Grant/Award Number: NOISELESS; La Région Bourgogne Franche-Comté, Grant/Award Number: RHINO

Abstract

The degradation of misfolded proteins is mainly mediated by the ubiquitin-proteasome system (UPS). UPS can be assisted by the protein Cdc48 but the relationship between UPS and Cdc48 in plants has been poorly investigated. Here, we analysed the regulation of UPS by Cdc48 in tobacco thanks to two independent cell lines overexpressing Cdc48 constitutively and plant leaves overexpressing Cdc48 transiently. In the cell lines, the accumulation of ubiquitinated proteins was affected both quantitatively and qualitatively and the number of proteasomal subunits was modified, while proteolytic activities were unchanged. Similarly, the over-expression of Cdc48 *in planta* impacted the accumulation of ubiquitinated proteins. A similar process occurred in leaves overexpressing transiently Rpn3, a proteasome subunit. Cdc48 being involved in plant immunity, its regulation of UPS was also investigated in response to cryptogein, an elicitor of immune responses. In the cell lines stably overexpressing Cdc48 and in leaves transiently overexpressing Cdc48 and/or Rpn3, cryptogein triggered a premature cell death while no increase of the proteasomal activity occurred. Overall, this study highlights a role for Cdc48 in ubiquitin homeostasis and confirms its involvement, as well as that of Rpn3, in the processes underlying the hypersensitive response.

KEYWORDS

cryptogein, plant immunity, proteasome, ubiquitinome

1 | INTRODUCTION

The protein biogenesis and degradation machineries are highly regulated to maintain the precise abundance of each protein within the proteome, avoiding misfolding and accumulation of toxic aggregates. Cellular proteome guardians maintain protein homeostasis through protein refolding and/or degradation (Harper & Bennett, 2016; Rodrigo-Brenni & Hegde, 2012). In animals, the dysregulation of protein homeostasis, as observed in some pathologies, leads to proteotoxic stress due to proteome imbalance (Cheng et al., 2018). Actors of the regulation of protein homeostasis include the protein Cdc48 (Cell

Division Cycle 48, or VCP for valosin-containing protein in animals), an abundant AAA+ ATPase (ATPases Associated with diverse cellular Activities). Cdc48/VCP is involved in numerous cellular pathways and, more particularly, in the protein degradation through the ubiquitin-proteasome system (UPS; Meyer, Bug, & Bremer, 2012; Bègue, Jeandroz, Blanchard, Wendehenne, & Rosnoblet, 2017). More precisely, Cdc48/VCP structurally remodels ubiquitinated proteins before delivering them to the proteasome for degradation (Van den Boom & Meyer, 2018), for instance in the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway (Neal, Mak, Bennett, & Hampton, 2017). The active structure of Cdc48/VCP is a barrel-shaped homohexamer

with a central pore, each monomer being composed of two ATPase domains D1 and D2. Thanks to the energy of ATP hydrolysis and associated cofactors (Richly et al., 2005), Cdc48/VCP recognizes and segregates misfolded ubiquitinated proteins from their environment (Van den Boom & Meyer, 2018) then remodelled by translocation through the Cdc48 central pore. Cooperation between Cdc48/VCP and deubiquitinases (DUB) allows the partial deubiquitination of the substrates before their proteasomal degradation (Bodnar & Rapoport, 2017; Twomey et al., 2019). The C-terminal part of Cdc48 includes a peptide motif consisting of a hydrophobic residue, tyrosine and any residue (HbYX) that mediates proteasome docking (Barthelme & Sauer, 2012). A second set of residues at the bottom of the D2 domain appears to stabilize Cdc48-proteasome complexes (Barthelme & Sauer, 2013).

Cdc48 is evolutionally conserved in yeast and plants. In these latter, a growing number of studies pointed out a role for Cdc48 in UPS. For instance Cdc48 functions in an ERAD-related plant quality control mechanism in *A. thaliana* (Marshall et al., 2008; Müller et al., 2005). Some actors of the UPS pathway have also been identified as plant Cdc48 partners (Gallois et al., 2013; Kretzschmar et al., 2018; Rosnoblet et al., 2017), as well as UFD1-NPL4, the cofactor of Cdc48 in ERAD (Stach & Freemont, 2017).

In eukaryotes, the 26S proteasome is a 2.5 MDa multicatalytic complex that mainly recognizes misfolded proteins targeted for degradation (Budenholzer, Cheng, Li, & Hochstrasser, 2017). It comprises two functionally distinct sub-particles: the 20S core protease (CP) and the 19S regulatory particle (RP) (Finley, 2009). The 20S results from the assembly of two outer heptameric rings formed by alpha subunits (alpha1-7) and two inner heptameric rings of beta subunits (beta1-7) enclosing catalytic sites inside cavities for protein degradation provided by the beta1, beta2 and beta5 subunits (Baumeister, Walz, Zühl, & Seemüller, 1998). The 20S is capped at one or both ends by the sub-complex 19S that includes the base and the lid. The base is constituted by a barrel-shaped structure of six ATPases (Rpt1-6) plus three non-ATPase (Rpn1, Rpn2 and Rpn13) subunits, and the lid incorporates nine additional non-ATPase subunits (Rpn3, Rpn5-9, Rpn11-12 and 15; Budenholzer et al., 2017).

The regulation of protein turnover in plants can be affected by pathogen attack and numerous UPS actors are modulated during immune responses (Copeland & Li, 2019). For instance, both mRNA and proteins of 20S accumulated in tobacco cells elicited by cryptogin, a protein produced by the oomycete *Phytophthora cryptogea* that triggers an immune response in tobacco (Suty et al., 2003). The regulation of one proteasomal subunit was linked to the hypersensitive response (HR) corresponding to localized programmed cell death (PCD) of cells infected by microbial pathogens (Coll, Epple, & Dangl, 2011; Hatsugai et al., 2009). The turnover of the plant immune co-activator nonexpressor of pathogenesis-related (PR) genes (NPR1) is also regulated in a proteasome-dependent manner (Skelly, Furniss, Grey, Wong, & Spoel, 2019; Spoel et al., 2009).

The involvement of Cdc48/VCP as a host factor in biotic stress has also been reported, especially in mammals, where pathogens often

take advantage of VCP (Lin, Prendergast, & Grey, 2017; Watkinson, Tam, Vaysburd, & James, 2013). In plants, several investigations attributed a role for Cdc48 in plant immunity particularly through interaction with defense-related proteins (Saracco et al., 2009). Moreover, an investigation highlighted a regulatory role for one Cdc48 isoform of *A. thaliana* in the turnover of SNC1, an immune-related intracellular receptor (Copeland, Woloshen, Huang, & Li, 2016). Importantly, we recently reported that Cdc48 displays a regulatory function in the HR induced by cryptogin (Rosnoblet et al., 2017). Furthermore, a search for Cdc48 partners and the subsequent establishment of the plant Cdc48 interactome led to the finding that Cdc48 interacts with UPS components including proteasomal subunits (Bègue, Mounier, Rosnoblet, & Wendehenne, 2019).

In the present study, we attempted to provide a first insight into the regulation of UPS by Cdc48 in tobacco cell suspensions and in leaves undergoing or not an immune response triggered by cryptogin. Our results showed that the stable overexpression of Cdc48 in cell suspensions impacts the accumulation and composition of ubiquitinated proteins and UPS actors, especially as regards to proteasomal subunits. Accordingly, we found that Cdc48 interacts with the proteasome subunit Rpn3. Furthermore, its stable overexpression significantly affected the abundance of proteasomal subunits without disturbing proteasomal activities. In addition, in response to cryptogin treatment, cells overexpressing Cdc48 did not show an increase of proteasomal activities compared to wild-type cells. *In planta*, the transient overexpression of Cdc48 and/or of Rpn3 also impacted the accumulation of ubiquitinated proteins and accelerated the HR triggered by cryptogin as observed in the cell lines overexpressing Cdc48.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Treatments

Nicotiana tabacum cv Xanthi Wild type (WT), Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell suspensions were maintained in the growth exponential phase as described previously (Besson-Bard, Griveau, Bedioui, & Wendehenne, 2008) and subcultured 1 day before use. Cryptogin was purified according to Bonnet, Bourdon, Ponchet, Blein, and Ricci (1996) and stored at -20°C . Tobacco cells and leaves were treated with a concentration of 100 nM.

2.2 | Electrophoresis and immunoblot

Tobacco cells were broken in proteasome buffer (50 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 1 mM EDTA, 20% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM ATP, 0.04% Igepal-CA630, protease cocktail inhibitors without EDTA: PIC, Roche). Proteins (20 μg) were resolved by 10 or 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot. We used antibodies targeting the full-length ubiquitin ([Ubi-1], 1/2000, Abcam), His-tag (1/1000, Cell Signalling), GFP-tag (1/20000, Abcam) and Cdc48/VCP (1/1000,

Abcam). Moreover, antibodies raised against the product of the RPN6 gene: the non-ATPase regulatory subunit 11 homolog (Q9LP45, AOA1S4B826 in tobacco, 1/1000, Agrisera), the 20S subunits beta type-6 (P93395) and alpha type-4 (Q93X39, all 1/1000 from Suty et al., 2003) were also used. The relative quantifications, levelled with each track of the corresponding Ponceau and calculated as a percentage of the highest signal, were performed using the IMAGEJ software.

2.3 | Pull-down of polyubiquitinated proteins

Pull-down has been performed according to Tandem Ubiquitin Binding Entities (TUBEs) manufacturer's instructions (LifeSensors). Three independent experiments were performed for each condition. Briefly, control and cryptogin-treated WT and Cdc48-TAP cells were broken in lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal-CA630, 10% glycerol, 50 μ M PR-619, 5 mM O-phenanthroline, PIC) and centrifuged 10 min at 14,000 g. Supernatants (1.4 mg) were incubated with 85 μ L of TUBEs2, previously washed with TBST (20 mM Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% tween-20), overnight at 4°C. Following wash with TBST, pulled-down proteins were reduced and eluted from TUBEs in loading buffer containing 80 mM DTT then cysteines were alkylated by 160 mM of chloroacetamide for 30 min. Eluted proteins were resolved on 12% (w/v) SDS-PAGE. Once proteins have reached the running gel, bands were excised then prepared for proteomics analysis.

2.4 | Sample preparation for proteomics analysis

Gel bands were washed twice with 50 mM ammonium bicarbonate-acetonitrile (1:1, v:v) and once with acetonitrile. Proteins were in-gel digested by 100 μ L of a solution of modified sequencing grade trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate (10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, sequence grade, Promega). The mixture was incubated at 37°C overnight. The resulting peptides were extracted from the gel by one round of incubation (15 min, 37°C) in 1% formic acid-acetonitrile (40%) and two rounds of incubation (15 min each, 37°C) in 1% formic acid-acetonitrile (1:1). The extracted fractions were air-dried. Tryptic peptides were resuspended in 14 μ L of 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid for MS analysis.

2.5 | NanoLC-MS/MS and bioinformatics analysis

Peptide mixtures were analysed by nanoLC-MS/MS using a nanoRSUHPLC system (Dionex) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Each biochemical replicate (three per condition) sample was analysed twice. Five microliters of each sample were loaded on a C18 pre-column (5 mm \times 300 μ m; Dionex) at 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ in 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, the pre-column was switched online with the analytical C18 column (50 cm \times 75 μ m inner diameter; in-house

packed with Reprosil C18) equilibrated in 95% of solvent A (5% acetonitrile, 0.2% formic acid) and 5% of solvent B (80% acetonitrile + 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5–50% gradient of B for 105 min at a 300 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with Xcalibur software. Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300–2000 m/z range with the resolution set to a value of 60,000. The 20 most intense ion survey scans were selected for CID (collision-induced dissociation) fragmentation, and the resulting fragments were analysed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

Acquired MS and MS/MS data as Raw MS files were converted to the mzdb format and were processed with the mzdb-access library (<https://github.com/mzdb>) to generate peaklists. Data were searched with Mascot (version 2.6.1, <http://matrixscience.com>) against a custom-made database containing all *Nicotiana* entries from the UniProtKB database (Swiss-Prot/TrEmbl release 20,190,401, 25,575 entries). Specificity of digestion was set for cleavage after lysine or arginine for trypsin-digested samples, and one missed cleavage was allowed. The mass tolerance was set to 5 ppm for the precursor ion. It was set to 0.8 Da for fragment ions in CID mode (detection in the ion trap). Validation of identifications was performed through a false-discovery rate set to 1% at protein and peptide-sequence match level, determined by target-decoy search using the in-house-developed software Proline software version 1.6 (<http://proline.profioproteomics.fr/>). Raw MS signal extraction of identified peptides was performed with Proline across samples. For all comparison, statistical analysis was applied to the abundance values (sum of all specific peptide raw abundances) with Perseus Tools (Tyanova et al., 2016). The first step was the filtering on valid value (at least 2 valid values per condition), then missing value with a random selection in a normal distribution was implemented to get low signal, Student T test was computed and variant protein was determined with a *p*-value < .05 truncated by Benjamini and Hochberg Test set at 5%. *Nicotiana tabacum* proteins were classified by gene ontology (GO term) thanks to Protein Analysis THrough Evolutionary Relationship (PANTHER) Classification System.

2.6 | Cloning and RT-qPCR

After amplification of inserts from reverse-transcribed mRNA of tobacco, Rpn3 construction were obtained using BP and LR donase kits from GATEWAY technology (Invitrogen) with the following plasmids: pDON221, pHGWA (Nter-His tag fusion), pH7WGY2 (Nter YFP tag fusion) and pH7WGF2 (Nter-GFP tag fusion), all from Plant System Biology, Ghent, Belgium (Karimi, De Meyer & Hilson 2005). Following primers were used: Rpn3pDONRstop-F:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGACTCAA
GACGTGGAG-3' and Rpn3pDONRstop-R:

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCATCAG
AAATCATCATCATCC-3'. His-Cdc48, GFP-Cdc48 and CFP-CdC48 plasmids were previously built in the lab (Bègue et al., 2019; Bègue, Mounier, et al., 2019; Rosnoblet et al., 2017).

RNAs were extracted according to Oñate-Sánchez and Vicente-Carbajosa (2008) and followed by DNase treatment using DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen). RNA purity, quality and integrity were determined using a NanoDrop ND-1000 then via electrophoresis on 1% agarose gel. First-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using a High-Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed using ViiA 7 realtime PCR system (Applied Biosystems) and GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Relative gene expression was calculated according to Ganger, Dietz, and Ewing (2017) method and normalized to L25-control (Schmidt & Delaney, 2010). Height independent experiments were performed then the statistical analysis was done by Kruskal-Wallis test followed by Fisher's least significant difference test. p -value < .01 was adjusted with Holm test. Primers used are listed in Table S1.

2.7 | In vitro interactions

His-Cdc48 beads were obtained as previously described (Bègue, Besson-Bard, et al., 2019; Bègue, Mounier, et al., 2019). His-tagged Rpn3 was produced in *E. coli* (Rosetta II) cells grown at 37°C in Luria-Bertani medium. Protein production was induced with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside during 4 h before purification using Ni²⁺-affinity fast protein liquid chromatography (FPLC) on AKTA Purifier® (GE Healthcare). Fractions containing His-Rpn3 were dialyzed against 40 mM Tris-Cl pH 7.4, 500 mM NaCl then incubated with Ni-NTA beads (GE Healthcare). After extensive wash with storage buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), His-Rpn3 linked beads were stored with PIC. Tobacco leaves producing GFP-Cdc48, GFP and GFP-Rpn3 were obtained as previously described (Rosnoblet et al., 2017). An amount of 2 mg of proteins extracted from leaves in IP buffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 4 mM EGTA, 4 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 10% sucrose, 0.3% Igepal-CA630, PIC, 100 µM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate) were incubated with 200 µL of beads, overnight at 4°C. In vitro immunoprecipitation (IP) was performed overnight at 4°C in a reaction mixture containing 150 µg of His-Cdc48, 60 µg of His-Rpn3 in IP buffer with 1 mM ATP, 0.4 µg of Cdc48-antibody and 20 µL of protein A Mag-sepharose (GE Healthcare).

2.8 | Gel filtration

Lysis were performed in a gel filtration buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.6, 5% glycerol, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, PIC). After centrifugation 10 min at 20,800 g and 4°C, 500 µg of extracts were fractionated by size exclusion chromatography on a Superose 6 10/300 GL column (GE Healthcare), carried out on FPLC using ÄKTA purifier (GE Healthcare). Fractions were precipitated in trichloroacetic acid (20%), separated by SDS-PAGE then examined by immunoblots or through Coomassie blue staining (0.125%, 30% ethanol, 10% acetic acid).

2.9 | FRET-fluorescence life time microscopy (FLIM)

Experiments were performed according to Bègue, Besson-Bard, et al. (2019); Bègue, Mounier, et al. (2019). Briefly, *Agrobacterium tumefaciens* strain (GV3101) was transformed with CFP-Cdc48 (donor) or YFP-Rpn3 (acceptor). Four days later, after (co-)infiltration in *Nicotiana tabacum* leaves, FLIM images were collected with a time-correlated single-photon counting (TCSPC) module (Picoquant) on a Nikon A1-MP microscope. Imaging was carried out with $\times 60$ Apo IR objective (NA: 1.27, Water Immersion, Nikon). Bi-photonic 820 nm excitation was provided by an IR laser (Chameleon, Coherent) delivering femtosecond pulses at a repetition rate of 80 MHz. A Single-Photon Avalanche Diode detector collected fluorescence emission of CFP using a band-pass emission filter FF01-494+/-20 (Semrock). TCSPC lifetime recording was performed over 200 temporal channels (final resolution 0.64 ps). We performed a lifetime analysis on ROI of the FLIM images using Symphotime software. The efficiency of energy transfer (FRET %) was given by the following equation: $E = 1 - FDA/FD$, with relative fluorescence lifetime of the donor in the presence (FDA) or absence (FD) of the acceptor.

2.10 | Generation of GFP-Cdc48 cell line

Agrobacterium transformed with GFP-Cdc48 were grown at 28°C with gentamycin (50 µg.mL⁻¹) and rifampicin (50 µg.mL⁻¹) for strain, plus spectinomycin (100 µg.mL⁻¹) for plasmid. Next, transformed bacteria in 10 mM MES, 10 mM MgCl₂ and 100 µM acetosyringone were infiltrated in *Nicotiana tabacum* vitroplants. Leaf fragments were incubated for 48 h in Murashige & Skoog media, pH 5.7 (3 mg.L⁻¹ M 0256, Duchefa; 30 g/L⁻¹ sucrose; 200 mg.L⁻¹ glutamine, 3 mg.L⁻¹ calcium pantothenate, 100 µg.mL⁻¹ spectinomycin, 300 µg.mL⁻¹ cefotaxime) enriched with growth regulators (0.5 mg.L⁻¹ naphthaleneacetic acid, 2 mg.L⁻¹ 6-benzylaminopurine), later replaced by 100 mM of kinetin and 2,4-dichlorophenoxyacetate. After 5 months, callus were transferred into liquid medium under agitation.

2.11 | Proteasomal activities

20S proteasome activity assay kit® (Chemicon International) was used according to manufacturer instructions with following specifications. Proteins from WT, Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell lines, or from leaves, were extracted in proteasome buffer and 40 µg were freshly used for assays with 50 µM of the beta5 substrate Suc-LLVY-AMC (N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amino-4-methylcoumarin, chymotrypsin-like activity) or 10 µM of the beta1 substrate Z-LLE-AMC (N-CBZ-Leu-Leu-Glu-7-amino-4-methylcoumarin, peptidylglutamyl-peptide [PGPH]-like activity) or 50 µM of the beta2 substrate BOC-LSTR-AMC (Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amino-4-methylcoumarin, trypsin-like activity), 2 h at 37°C. AMC release was monitored by measuring

fluorescence intensity (FI) from the hydrolysis of the above substrates with an Infinite-M200PRO fluorimeter (Tecan) (351 nm excitation and 430 nm emission). Inhibition was performed with 25 μ M lactacystin. Free AMC was also used to generate standard curves (with $FI = a[AMC] + b$) in a sample of each cell line in order to calculate proteasomal activity in μ M of AMC without sample quenching interference (Figure S7). Auto-fluorescence of each sample has also been deduced. Finally, the fluorescence of substrate alone (SFI), levelled according to calibration curves of each cell line, was deduced from AMC amounts. Proteolytic activities were calculated from three to six biological repetitions for each sample and each condition according to:

$$\text{Release [AMC]} = [\text{AMC}]_{2\text{h}} - [\text{AMC}]_{t_0}$$

$$\text{with } [\text{AMC}] = \frac{([\text{FI} - b]/a) - \text{SFI corrected}}{=} \\ = \frac{(\text{SFI} - b)/a, \text{ each for } t_0 \text{ and after 2h.}}$$

3 | RESULTS

3.1 | Cdc48 overexpression affects ubiquitination profile

In animal and yeast, Cdc48 is linked to the proteasome machinery through the delivery of ubiquitinated proteins (Bodnar & Rapoport, 2017). To understand the relationship between Cdc48 and the UPS in plants, we first compared the amount of ubiquitinated proteins through immunoblots between tobacco wild-type (WT) and Cdc48-TAP cells, a previously characterized cell line over-expressing Cdc48 (Rosnoblet et al., 2017). In these experiments, neither the cells nor the protein extracts were treated by proteasome inhibitors in order to follow ubiquitination without disturbing the UPS machinery. In protein extracts from WT cells, an immunoreactive smear of ubiquitin ranging from 50 kDa to high molecular weight was noticeable (Figure 1). In Cdc48-TAP cells, the smear signal appeared weaker and ranged from around 80 kDa to high molecular weight. Furthermore, another signal with a molecular weight of about 20 kDa was clearly detected. Therefore, the overexpression of Cdc48 affects the profile of Ub-proteins.

3.2 | Cdc48 overexpression modifies ubiquitinome composition

In order to better assess the incidence of Cdc48 overexpression on protein ubiquitination, the Ub-related proteome (named ubiquitinome) of the WT and Cdc48-TAP cell lines was investigated. Ub-proteins were isolated thanks to Ub-binding associated domains linked to beads (TUBEs). The efficiency of the TUBEs affinity was checked using immunoblot against Ub (Figure S1). Finally, proteins linked to TUBEs were identified and quantified through mass spectrometry analysis.

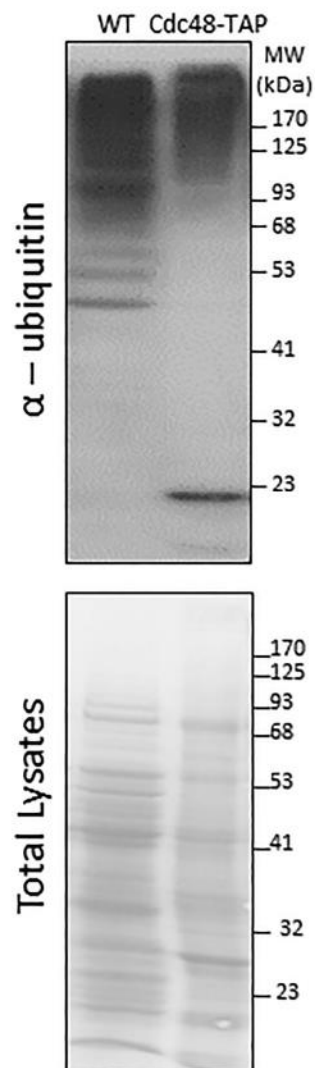


FIGURE 1 Protein ubiquitination profile is affected by the overexpression of Cdc48. Proteins from wild type (WT) and Cdc48-TAP cells were extracted then 20 μ g were separated by 10% (w/v) SDS-PAGE. Ubiquitinated protein amounts were analysed by immunoblot. Proteins loading was checked using Ponceau staining shown on bottom panel. Results shown are one from three representative experiments

Experiment having been carried out under native conditions, the ubiquitinome of each cell line comprises all Ub-proteins (intended for degradation or not), as well as their partners. Overall, 2,264 proteins were identified. Amongst those, 1,661 were found in a similar relative amount whatever the cell line ("invariant proteins", Table S2a). These latter were classified using the PANTHER database, which orders protein sequences by GO term. Invariant proteins are related to various biological processes, a majority being involved in metabolic processes (40%), in cellular processes (33%) and in the subcellular localization (14%) (Figure 2a). The distribution by cellular components (Figure 2b) highlighted the abundance of proteins from organelles (29%) and the presence of proteins related to complexes (10%). Interestingly, this latter category includes ribonucleoprotein complexes which comprises

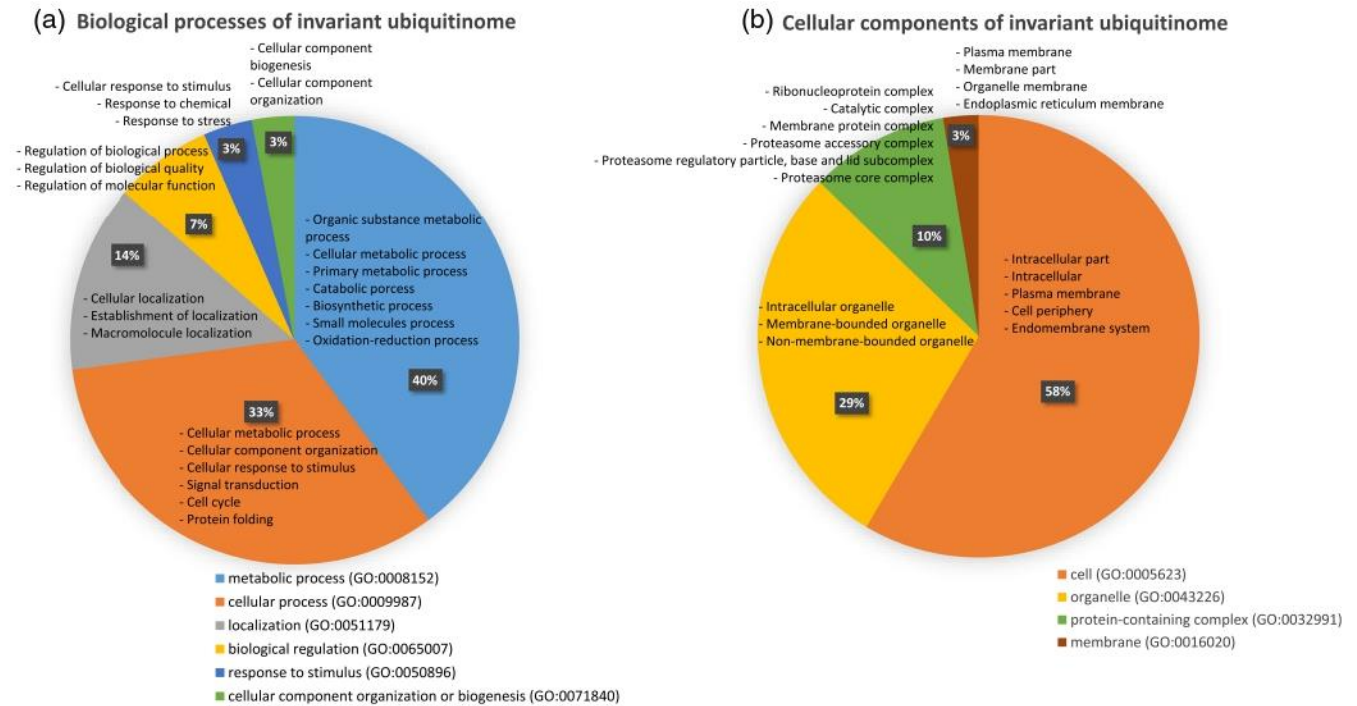


FIGURE 2 Description of the invariant ubiquitinome via Gene Ontology analysis. Pie charts represent the biological processes (a) and cellular components (b) related to the ubiquitinome shared by WT and Cdc48-TAP cell lines. The main subcategories are listed in each part, in decreasing order of abundance. The analysis was performed thanks to the PANTHER database classification tool

ribosomes that regulate Ub pool homeostasis (Park & Ryu, 2014) and some 26S proteasomal subunits. Moreover, some UBX domain-proteins and Npl4, recurring intermediaries between Cdc48 and Ub-substrates, as well as Rad23 and E4 that connect Ub-substrate to proteasome through Cdc48 (Richly et al., 2005), were also identified in the invariant ubiquitinome (Table S2a).

The comparison of ubiquitinomes between WT and Cdc48-TAP cell lines revealed that the relative abundance of 600 proteins was significantly different between both lines ('variant proteins', Table S2b). Among these proteins, 307 and 293 were quantified as more or less abundant, respectively, in the Cdc48-TAP line as compared to the WT line (Figure 3a). According to PANTHER analysis, variant proteins are involved in the same biological processes and have subcellular localizations similar to the invariant ones (data not shown). The most represented protein classes in the two cell lines are those of oxidoreductases, hydrolases, transferases and nucleic acid binding. However, our data highlighted that the variant ribosomal proteins are all less abundant in the ubiquitinome of Cdc48-TAP cells compared to that of WT cells (Figure 2b). In addition, although variant proteins of the UPS machinery were found in both Cdc48-TAP and WT cells (Figure 2b), the function of some of them was different. Indeed, while E2 and E3 enzymes, which sequentially catalyse conjugation and ligation of Ub on the substrate, appeared more or less abundant in both cell lines, all proteasomal 20S variant subunits were more abundant in the ubiquitinome of Cdc48-TAP cells, as well as

the 19S non-ATPase regulatory subunits 10 and 4 (Table 1). Conversely, the levels of the non-ATPase regulatory subunit 11, as well as two DUBs (the thioesterases) and the cullin-1, were less abundant when Cdc48 is overexpressed. Interestingly, Cdc48 is more abundant in the ubiquitinome of the WT cells compared to the Cdc48-TAP line.

Since Cdc48 is involved in the immune response and in redox regulation in plants (Bègue et al., 2017; Bègue, Besson-Bard, et al., 2019; Bègue, Mounier, et al., 2019) we further focused our analysis on the variant proteins that contribute to these processes (Figure 3b and Table 2). The amount of three variant proteins of redox control (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and monodehydroascorbate reductase), as well as 10 proteins involved in disease response were more abundant in the ubiquitinome of Cdc48-TAP cells. It is worth mentioning that some of these proteins are related to the regulation of cell death including the protein phosphatase 2A and 2C and the PCD protein 4-like. Others are associated with the shikimate pathway (shikimate dehydrogenase, chorismate mutase and synthase) which leads to chorismate, a key precursor of the defence hormone salicylic acid (SA). Similarly, the metacaspase-4 was shown to be involved in the maturation of immunomodulatory peptides (Hander et al., 2019) whereas the PR1 is a classical SA-dependent PR protein.

Thus, the overexpression of Cdc48 strongly modifies the ubiquitinome composition including proteins related to the UPS machinery as well as members of redox regulation and biotic stress.

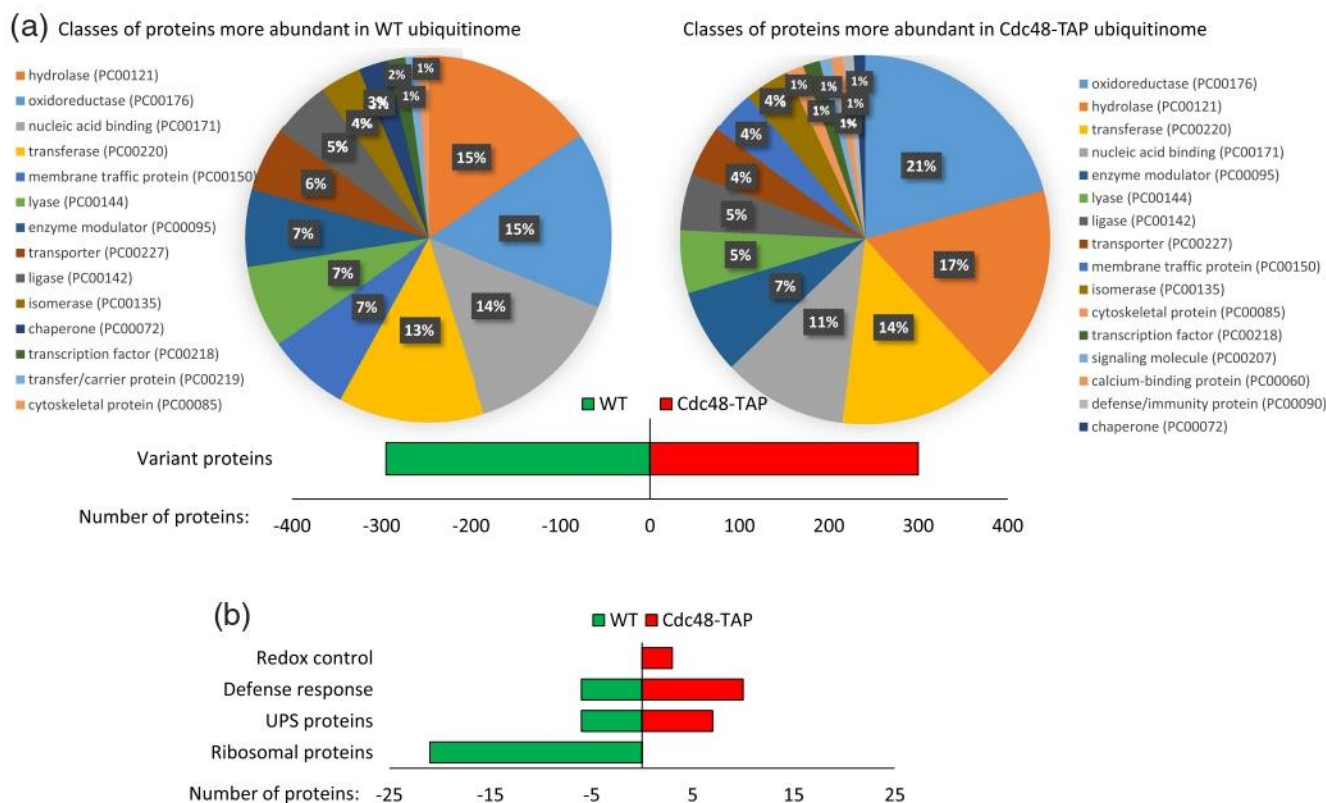


FIGURE 3 Variant proteins of ubiquitinomes between Cdc48-TAP and WT cells. (a) Distribution of the amount of whole variant proteins and distribution according to protein classes via Gene Ontology analysis. The analysis was performed thanks to the PANTHER database classification tool. (b) Distribution of the amount of variant proteins belonging to the redox control, defense response, UPS and ribosomal sub-categories between the more abundant proteins in the ubiquitinome of WT cells (green) and those more abundant in the ubiquitinome of Cdc48-TAP cells (red). Identifications then quantifications and comparisons have been performed thanks to Proline then Perseus softwares [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.3 | Interaction between Cdc48 and the proteasome with the proteasomal subunit Rpn3

Previously, we identified the 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 (Rpn3) as putative partner of Cdc48 (Figure S2, Rosnoblet et al., 2017). We therefore further investigated the interaction between Cdc48 and Rpn3 in order to confirm the possibility that Cdc48 could interact with the proteasome. We first studied this interaction in vitro using pull-down strategy. Therefore, a His-tagged Rpn3 recombinant protein was produced in *E. coli*, purified and then fixed by affinity on beads. Next, these beads were incubated with proteins extracted from leaves that transiently express GFP-Cdc48 or GFP alone as a negative control (Figure 4a). As expected, through immunoblot against the His tag, the recombinant protein His-Rpn3 was only detected in His-Rpn3-linked beads. An immunoblot directed against GFP tag showed a weak signal corresponding to GFP-Cdc48 only in total lysate from agro-infiltrated leaves and in pull-down with His-Rpn3 (Figure 4a). Accordingly, this signal was not observed in leaves producing GFP alone or after incubation with free beads, even though other signals appeared after incubation between GFP-producing leaves and His-Rpn3-beads. Conversely, another pull-down between recombinant His-Cdc48 and proteins extracted from leaves producing

GFP-Rpn3 also revealed that GFP-Rpn3 was caught only by His-Cdc48 protein, although a weaker signal was also detected after incubation with free beads (Figure 4b). Despite the weakness of the signals, these data support the possibility that Rpn3 and Cdc48 interact in vitro. We also studied whether GFP-Rpn3 was integrated to the proteasome or remained free in the cell. Using gel filtration in native conditions, GFP-Rpn3 from agro-infiltrated leaves was mostly detected in fractions 3–4 that correspond to the endogenous size of the 26S proteasome of 2,500 kDa (Budenholzer et al., 2017, Figure 4c). This data reinforces our hypothesis that Cdc48 interacts with the 26S proteasome. In vitro interaction were also studied between purified recombinant proteins His-Cdc48 and His-Rpn3 (Figure S3). In co-IP experiments, His-Rpn3 did not co-immunoprecipitated with His-Cdc48 (Figure S3a), suggesting that both proteins do not interact directly. Moreover, gel filtration analysis highlighted that, as expected, His-Cdc48 is assembled in a complex which size corresponds at least to the hexameric form of the protein (fractions 5–6, Figure S3b; Rosnoblet et al., 2017). However, His-Rpn3, which is poorly detectable because of the poor stability of the isolated recombinant subunit during the separation, was found in fractions 8–10 corresponding to the molecular weight of His-Rpn3 alone or in intermediate complexes, but not in the Cdc48-hexameric

TABLE 1 Variant UPS components between Cdc48-TAP and WT cell lines

Accession	Protein name	Function	N: Student's T-test difference abundance (fold change)
A0A1S4ACV7	Proteasome subunit beta 4	20S component	4.80994
A0A1S3XTA8	Proteasome subunit alpha 4	20S component	4.70918
A0A1S3YNV5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10-like	19S component	4.40075
A0A1S4AET6	Proteasome subunit alpha 2	20S component	4.13993
A0A1S3YPR6	Proteasome subunit beta 7	20S component	3.98578
A0A1S4B105	Proteasome subunit alpha 7	20S component	3.79705
A0A1S4BQK3	Proteasome subunit beta 1	20S catalytic activity	3.75142
A0A1S4D5F8	Proteasome subunit beta 5	20S catalytic activity	3.31783
A0A1S4BQH6	Proteasome subunit beta 6	20S component	3.01989
A0A1S3Z4U1	Proteasome subunit alpha 3	20S component	2.2356
A0A1S3YNP2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1D isoform X1	Ub conjugating enzyme	1.8128
A0A1S4AJL5	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 homolog	19S component	1.20
W0KML3	Ubiquitin conjugating enzyme	Ub conjugating enzyme	0.996
A0A1S4CFV1	E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like	Ub ligase activity	0.65
A0A1S4B826	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 homolog	19S component	-1.121
A0A1S4ARU0	Ubiquitin thioesterase	DUB activity	-1.80986
A0A1S3YP84	Cullin-1-like	Ub ligase binding	-2.003690
A0A1S4DCW8	Ubiquitin thioesterase OTU1-like	DUB activity (Cdc48 associated)	-3.17131
A0A1S4AT67	RING-type E3 ubiquitin transferase	Ub-protein transferase activity	-4.86233
A0A1S3ZVE8	Cell division cycle protein 48 homolog	ATPase associated with various cellular activities	-5.32808

Note: The bars, whose lengths are proportional to the abundances, are black in case of over-abundance in Cdc48-TAP cells (positive digits) or grey in case of over-abundance in WT cells (negative digits).

fractions. Consequently, both proteins belong to different complexes and do not directly interact *in vitro*. This data suggest that Rpn3 should be integrated into the proteasome to interact with Cdc48.

The interaction between Rpn3 and Cdc48 was also studied *in planta* using FRET experiment with FLIM analysis. CFP-Cdc48 and YFP-Rpn3 were transiently expressed in tobacco leaves thanks to agro-infiltration. The subcellular localizations of Rpn3 and Cdc48 were first studied through two-photon excitation (Figure 5a-c). The proteasomal subunit YFP-Rpn3 was detected only in the cytoplasm, while CFP-Cdc48 localized both in the cytoplasm and in the nucleus as previously reported (Bègue, Besson-Bard, et al., 2019; Bègue, Mounier, et al., 2019). The co-localization of both proteins in the cytoplasm allowed the analysis of their interaction through fluorescence lifetime measurements of the CFP. As some epidermal cell areas express only CFP-Cdc48 without YFP-Rpn3, measurements of the fluorescence lifetime (τ) of CFP-Cdc48 alone or in the presence of YFP-Rpn3 were performed on the same leaf samples (Figure 5c,d). A mean lifetime of 3.18 ns was measured in subcellular regions expressing CFP-Cdc48 alone (Figure 5d,e). However, a significant reduction of the CFP lifetime to 2.2 ns was measured in regions of

leaves co-expressing CFP-Cdc48 and YFP-Rpn3, highlighting the interaction between both proteins in the cytoplasm. Moreover, as proceeded for GFP-Rpn3, we verified that YFP-Rpn3 produced in agro-infiltrated leaves participates in a complex whose molecular weight is similar to that of the proteasome. Using gel filtration in native conditions, YFP-Rpn3 was mostly detected in the fractions 3, corresponding to the 26S proteasome molecular weight (Figure 5f). These results confirmed that Cdc48 could interact with the proteasome *in planta*.

3.4 | Cdc48 regulates proteasomal subunits amounts

The comparison of the WT and Cdc48-TAP cell ubiquitinomes revealed several proteasomal subunits within variant proteins (Table 1). Based on this observation, we decided to focus on the cellular impact of this discrepancy. Thus, we analysed the amount of several endogenous proteasomal subunits through immunoblots in the different cell lines. For this purpose, a second line, that stably over-expresses

TABLE 2 Variant proteins related to immunity and Redox regulation between Cdc48-TAP and WT cell lines

Accession	Protein name	Function	N: Student's T-test difference abundance
A0A1S3ZND3	Probable WRKY transcription factor 57	Transcription factor, defence response	7.9087
A0A1S3XCV7	Calmodulin-like	Calcium binding, defence response	4.28978
A0A1S4D1D3	PP2A regulatory subunit TAP46	Regulation of signal transduction, defence response	3.24513
A0A1S3XTH4	Basic form of pathogenesis-related protein 1-like	Defence response	2.8082
A0A1S3ZHV6	Probable protein phosphatase 2C 59	Protein serine/threonine phosphatase activity, defence response	2.37664
A0A1S3ZWB9	Bifunctional 3-dehydroquinate dehydratase/shikimate dehydrogenase, chloroplastic-like	Salicylic acid synthesis, defence response	2.14
A0A1S3Z992	Putative disease resistance protein At1g50180	ATP binding, defence response	1.67
A0A1S3XNR7	Glutathione peroxidase	Redox regulation	1.51
A0A1S4DIN0	Superoxide dismutase	Redox regulation	1.47
A0A1S3ZNK5	Chorismate mutase	Salicylic acid synthesis, defence response	1.06
A0A1S4CLD7	Monodehydroascorbate reductase 5, mitochondrial-like isoform X1	Redox regulation	0.9
A0A1S3YQ08	Programmed cell death protein 4-like	Negative regulation of transcription, defence response	0.8
A0A1S3X9C0	Probable protein phosphatase 2C 11	Protein serine/threonine phosphatase activity, defence response	0.5
A0A1S4AZ48	Probable protein phosphatase 2C 39 isoform X1	Protein serine/threonine phosphatase activity, defence response	-1.03
A0A1S3X4L3	Probable protein phosphatase 2C 55	Protein serine/threonine phosphatase activity, defence response	-1.19
A0A1S4BRD0	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase-like	Methionine biosynthesis, SAM pathway, defence response	-1.28
A0A1S4CZK1	Metacaspase-4-like	Cystein protease, defence response	-1.41
A0A1S3XC54	S-adenosylmethionine synthase	SAM biosynthesis, defence response	-2.577
A0A1S3XXI4	Chorismate synthase	Salicylic acid synthesis, defence response	-4.28017

Note: The bars, whose lengths are proportional to the abundances, are black in case of over-abundance in Cdc48-TAP cells (positive fold changes) or grey in case of over-abundance in WT cells (negative fold changes).

Abbreviation: SAM, S-adenosylmethionine.

Cdc48 with a green fluorescent tag at the N-terminal tail (GFP-Cdc48), was generated in order to check the validity of the data. In response to cryptogin treatment, GFP-Cdc48 cells display premature cell death, adopting the same behaviour than Cdc48-TAP cells (Figure S4a). Importantly, gel filtration analysis revealed that GFP-Cdc48 was detected in the same fractions as endogenous Cdc48, with a molecular mass around 669 kDa (Figure S4b). This size corresponds to the active Cdc48 hexamer as previously observed for the Cdc48-TAP cell line (Rosnoblet et al., 2017).

We first studied the amount of the 20S subunit beta6, more abundant in the Cdc48-TAP cells ubiquitinome. Antibody specifically raised against this isoform in tobacco was generated previously in the laboratory (Suty et al., 2003). In control condition, the beta6 subunit was more abundant in both over-expressing lines as compared to WT cells (Figure 6a,b). Interestingly, immunoblot experiments performed against alpha4, another 20S subunit more abundant in the Cdc48-TAP ubiquitinome (Table 1), gave similar data. Indeed, alpha4 amount was

higher in Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cells as compared to WT cells (Figure S5). Similar experiments were then performed against the 19S non-ATPase regulatory subunit 11, which was less abundant in the ubiquitinome of Cdc48-TAP cells. Contrary to beta6 and alpha4, the amount of subunit 11 appeared higher in WT than in both over-expressing cells (Figure 6c,d). Consequently, Cdc48 overexpression negatively impacts the accumulation of subunit 11.

How does Cdc48 regulate the amounts of proteasomal subunits? In order to check whether such regulation takes place at the gene expression level, we performed RT-qPCR analyses (Figure S6). According to statistical analysis, the amount of 19S non-ATPase regulatory subunit 11 mRNA was significantly reduced in Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell lines as compared to WT cells, indicating that the accumulation of 19S proteins is correlated to gene expression. However, mRNA abundances of BETA6 and ALPHA4 were slightly higher in WT than in overexpressing cells. Consequently, unlike the 19S subunit-11, both 20S BETA6 and ALPHA4 transcripts accumulation is not

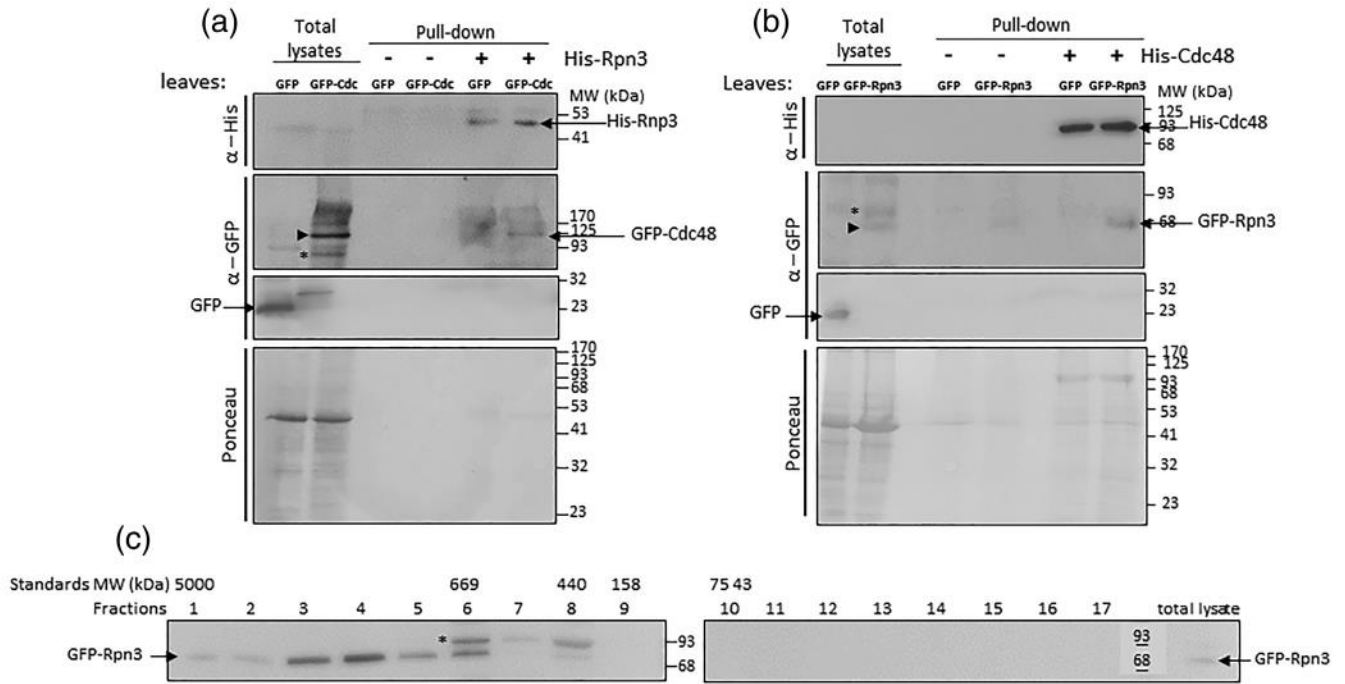


FIGURE 4 Rpn3 and Cdc48 interacts in vitro. (a) Pull-down of GFP-Cdc48 with His-Rpn3 beads. His-Rpn3 recombinant proteins were fixed on Ni-NTA affinity slurry and incubated with total proteins extracted from leaves previously agro-infiltrated with plasmids coding GFP-Cdc48 or GFP tag alone as negative control. Additional negative controls have been performed with Ni-NTA beads without His-Rpn3. Total lysates have been loaded in gels in order to check the production of GFP and GFP-Rpn3 proteins. Proteins have been detected thanks to immunoblot raised against His and GFP tags. Ponceau staining of membrane before GFP antibody incubation (lower panel). (b) Opposite pull-down between GFP-Rpn3 and His-Cdc48 beads. (c) Gel filtration analysis of native GFP-Rpn3 structure in infiltrated leaves. Proteins (500 µg) extracted from leaves overexpressing GFP-Rpn3 after agro-infiltration were separated by gel filtration chromatography. GFP-Rpn3 was detected by immunoblot against GFP tag. Star points out a non-specific signal detected in immunoblot against GFP in protein extracted from leaves

correlated to differential protein amounts. Overall, the data indicate that the overexpression of Cdc48 impacts the amounts of proteasome subunits with contrasting effects between 19S and 20S.

3.5 | Proteasomal catalytic subunits activities are not affected by Cdc48 overexpression

As the overexpression of Cdc48 led to an over-accumulation of two catalytic subunits in the ubiquitinome, we checked whether this process could affect the activity of protein degradation. Proteasomal activities were measured in WT, Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell lines using AMC-coupled substrates for proteolysis activities of beta1 (PGPH-like activity), beta2 (trypsin-like) and beta5 (chymotrypsine-like activity). Activities were measured according to the ability of endogenous subunits to cleave the corresponding AMC-coupled substrates. Moreover, the release of AMC was normalized using standard curves performed in each cell line in order to avoid sample quenching (Figure S7a) and the effectiveness of the assay was checked using lactacystin (Figure S7b). Whatever the substrate, according to statistical analysis, the proteasomal catalytic subunits displayed the same level of proteolysis activities in the different lines, (Figure 7). Consequently, the higher amount of 20S subunits in Cdc48-overexpressing cells was not accompanied by an enhanced activity of catalytic subunits.

3.6 | Cryptogein elicitation slightly affects protein ubiquitination

Cdc48 and the UPS are mobilized in plant immunity (Copeland & Li, 2019; Rosnoblet et al., 2017). Moreover, several proteins involved in defense response were detected among variants proteins between ubiquitinomes of WT and Cdc48-TAP cells (Table 2). Based on these observations, we further analysed the regulation of UPS by Cdc48 in tobacco cells undergoing and immune response triggered by cryptogein.

First, we studied the amount of Ub-proteins in the three cell lines during elicitation. In cryptogein-treated WT cells, the level of Ub-proteins increased from 6 h and thereafter (Figure 8). In both Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cells exposed to cryptogein, the ubiquitination signal increased transiently from 4 to 12 h. As well as without treatment (Figure 1), the low molecular signal of 20 kDa was predominant and showed a transient increase in over-expressing cells. Therefore, cryptogein triggered an enhanced amount of Ub-proteins and the overexpression of Cdc48 affects the kinetics of their accumulation.

Next, to better assess the incidence of cryptogein treatment on relative amounts of Ub-proteins on both WT and Cdc48-TAP cell lines, the ubiquitinome of the WT and Cdc48-TAP cell lines elicited with cryptogein for 6 h was investigated. This treatment time was

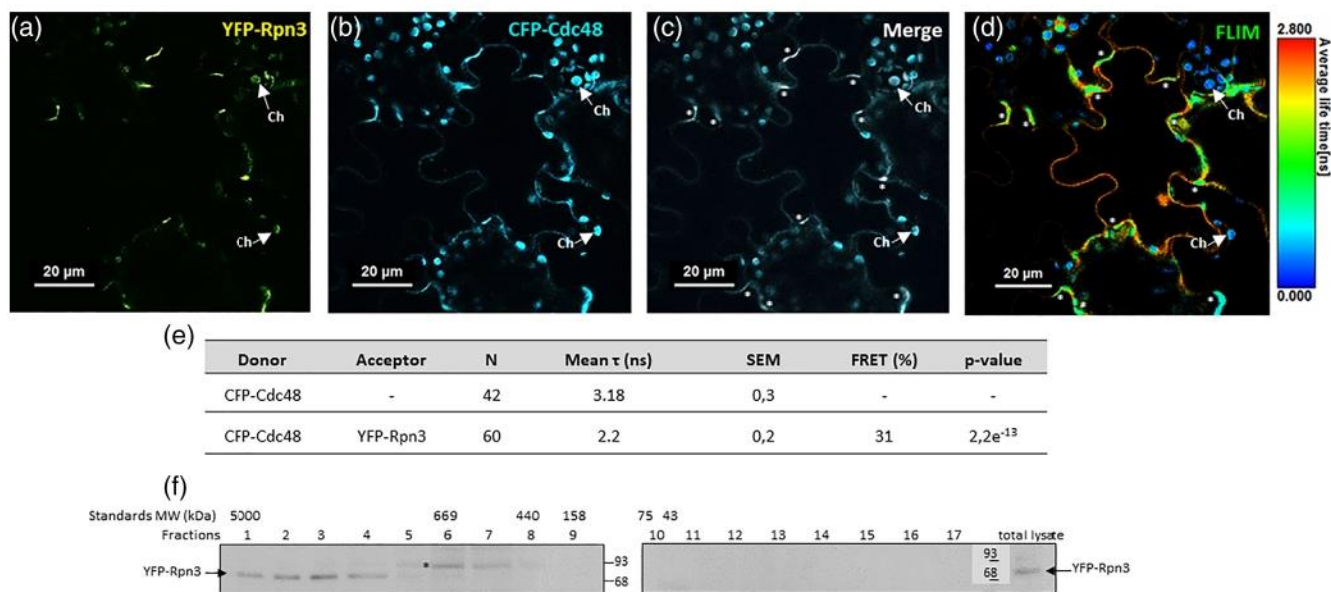


FIGURE 5 Rpn3 and Cdc48 interact in tobacco leaves through fluorescence resonance energy transfer–fluorescence lifetime imaging (FRET–FLIM). Confocal microscopy shows the subcellular co-localization (c) between Rpn3 and Cdc48 in tobacco leaves double-agro-infiltrated with YFP-Rpn3 (a) and CFP-Cdc48 (b). Excitation has been performed with two photon excitation wavelength of 800 nm and emission collection with [500–550] nm filter for YFP and excitation wavelength of 820 nm and emission collection with [474–514] nm filter for CFP. Co-localization areas were indicated with stars. d. Corresponding FLIM image of cells expressing the donor CFP-Cdc48 and the acceptor. The scale on the left indicates the cyan fluorescent protein (CFP) lifetime, ranging from 0 to 4 ns. Ch = chloroplast, arrows indicate the life of fluorescence signal of the autofluorescence. (e) FLIM analysis of CFP-Cdc48 alone and together with YFP-Rpn3. N, number of measurements; Average τ , CFP mean lifetime; SEM, standard error of the mean; FRET (%), percentage of FRET efficiency. Statistical analysis was carried out using a *t*-test. (f) Gel filtration analysis of native YFP-Rpn3 structure in infiltrated leaves. Proteins (500 μ g) extracted from leaves overexpressing YFP-Rpn3 after agro-infiltration were separated by gel filtration chromatography. YFP-Rpn3 was detected by immunoblot against GFP tag able to recognize YFP. Star points out a non-specific signal detected in immunoblot against GFP in protein extracted from leaves [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

chosen because of the higher amount of Ub-proteins detected in both cell lines (Figure 8). We compared the relative levels of Ub-proteins between control and cryptogeiin-elicited cells, in both cell lines. In WT cells, only three variant Ub-proteins were differentially abundant in the ubiquitome from cryptogeiin-treated cells as compared to control cells (Tables 3 and S2c). All are mitochondrial proteins and showed a reduced amount after elicitation. Two have peptidase activity, and the third one, cytochrome *c*1-1, is released into the cytoplasm following various stress, including biotic (Livaja, Palmieri, von Rad, & Durner, 2008). In the Cdc48-TAP line, the comparison of the ubiquitome between cryptogeiin-treated and control cells led to the identification of five Ub-proteins showing differential relative amounts (Tables 4 and S2d). These proteins differed from the three variant ones of elicited WT cells. Among them, only SEC12 (Sar family guanine nucleotide exchange factor), involved in the reticulo-golgian traffic, is less abundant in the ubiquitome of cryptogeiin-treated cells. Interestingly, three of the more abundant proteins in the elicited Cdc48-TAP cells are related to immunity: an ATP citrate synthase, a phosphatase 2C and a long chain acyl-CoA synthase (Bolton, 2009; Tang, Simonich, & Innes, 2007; Tao, Rao, Bhattacharjee, & Gelvin, 2004). Contrary to the overexpression of Cdc48, cryptogeiin elicitation at 6 h has very little effect on the composition of ubiquitome.

3.7 | Overexpression of Cdc48 impacts cryptogeiin-induced proteasomal activities

At the basal state, Cdc48 overexpression differentially affects the amounts of some 20S and 19S proteasomal subunits (Figure 6). We therefore checked whether cryptogeiin treatment impacts this regulation. As previously reported (Suty et al., 2003), through immunoblot analysis the beta6 subunit slightly accumulated at late time points in WT cells elicited by cryptogeiin (Figure 9a,b). This increased accumulation was also noticed in the Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell lines, in which the amount of beta6 was already higher without treatment (Figure 6a,b). Similar results were observed concerning the other 20S subunit alpha4 (Figure S8). As regards to 19S component, in WT cells the amount of subunit 11 decreased during cryptogeiin treatment (Figure 9c,d). In over-expressing cells, as the signal is already faintly detectable, the decrease of subunit 11 amount was not visible in Cdc48-TAP cells but appeared from 2 h in GFP-Cdc48 cells. Such 20S subunits increase and 19S subunit decrease did not occur in control cells (Figure S9), demonstrating that the increased accumulation of proteasomal 20S subunits, and decrease of the 19S one, are related to the biotic stress.

Finally, proteolysis activities of beta1, beta2 and beta5 were measured in WT, Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell lines elicited with

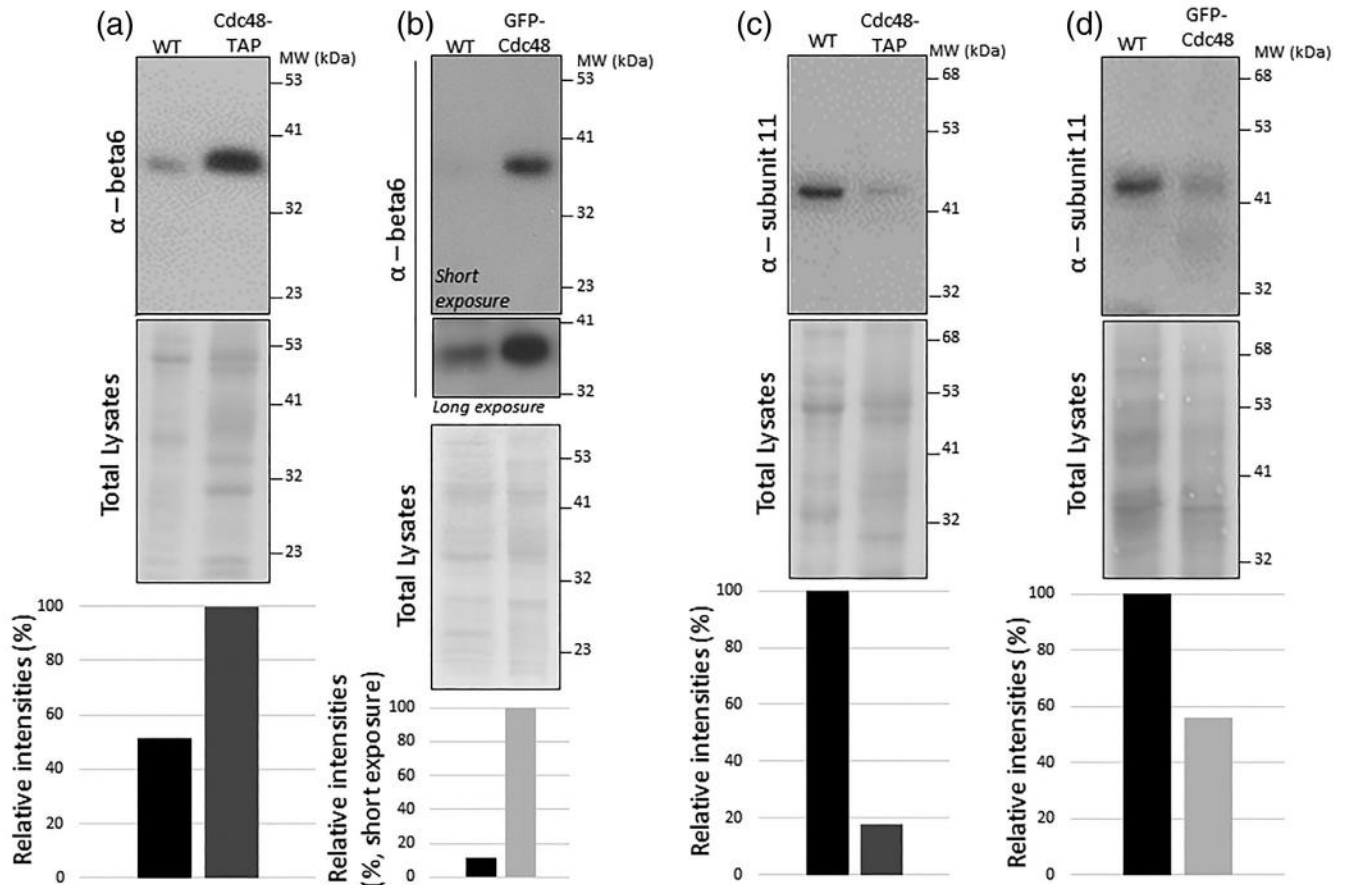


FIGURE 6 The amounts of proteasomal subunits are affected by the overexpression of Cdc48. For each sample from wild type (WT), Cdc48-TAP (a, c) and GFP-Cdc48 (b, d) cell lines, 20 µg of extracted proteins were separated by SDS-PAGE and 20S beta6 (a, b) or 19S non-ATPase regulatory subunit 11 (c, d) amounts were analysed by immunoblot against endogenous proteins. Proteins loading was checked using Ponceau staining shown on each bottom panel. Results shown are one from at least three representative experiments. Relative amounts of signal intensities, levelled with each Ponceau track, were measured using IMAGEJ software

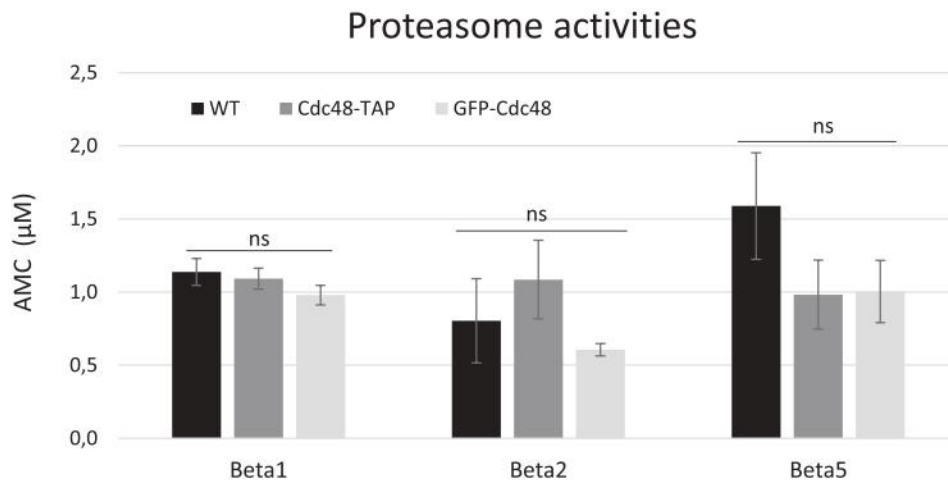


FIGURE 7 Proteasome activity is not affected by Cdc48 overexpression. For each sample from WT, Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cells, 40 µg of proteins were incubated with the fluorogenic substrates specific for PGPH-like activity of beta1 proteasomal subunit (Z-LLE-AMC), or for trypsin-like activity of beta2 proteasomal subunit (BOC-LSTR-AMC), or for chymotrypsin-like activity of beta5 proteasomal subunit (Suc-LLVY-MCA). Proteasome activities are expressed as AMC released during 2 h at 37°C (µM, ± S.E.) Results are means of at least six independent experiments. Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test between cell lines for each substrate (ns: not significant)

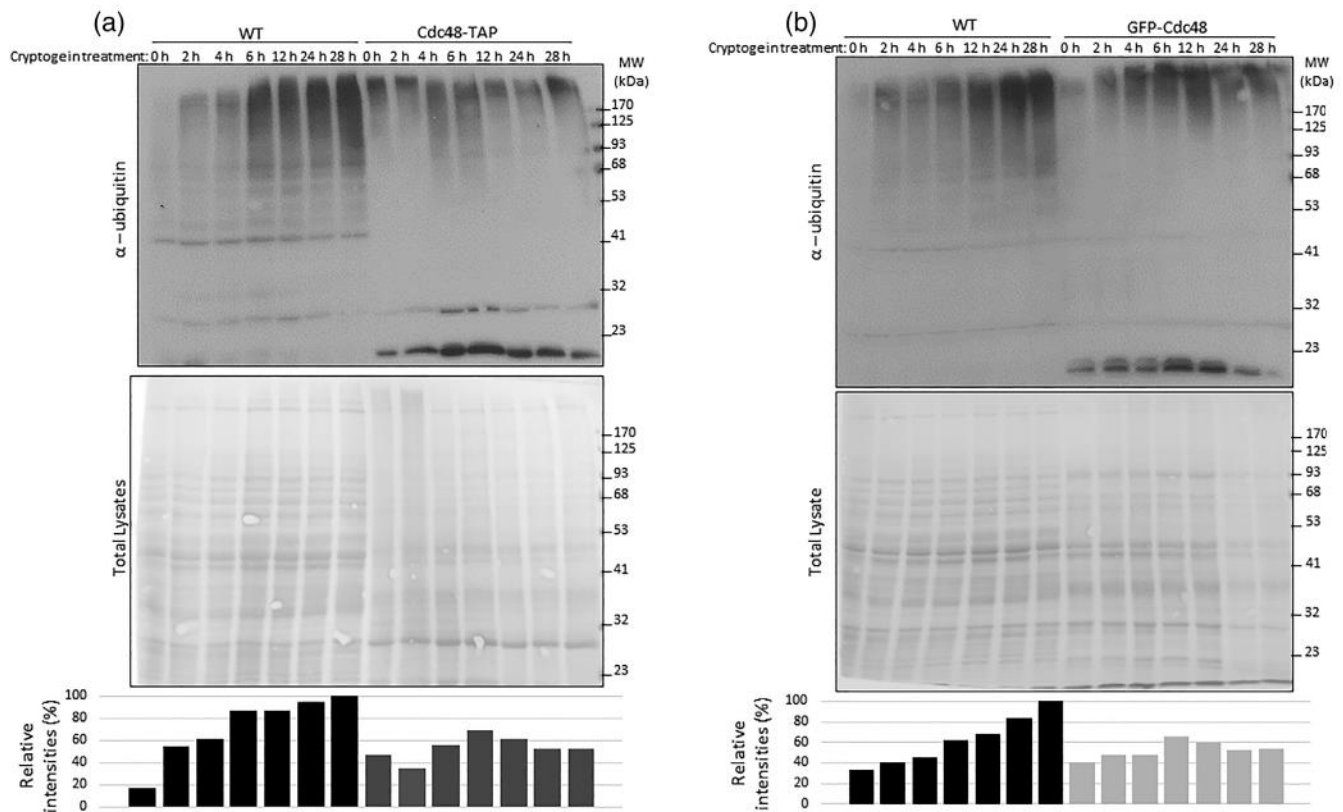


FIGURE 8 Protein ubiquitination profile during cryptogeiin treatment. Time course ubiquitinated proteins accumulation. Wild type (WT), Cdc48-TAP (a) and GFP-Cdc48 (b) cells were treated with 100 nM cryptogeiin. For each sample, 20 μ g of extracted proteins were separated by 10% (w/v) SDS-PAGE and ubiquitinated protein amounts were analysed by immunoblot. Proteins loading was checked using Ponceau staining shown on each bottom panel. Results shown are one from at least three representative experiments. Relative amounts of signal intensities, levelled with each Ponceau track, were measured using IMAGEJ software

TABLE 3 Variant proteins between ubiquitinomes of WT cells treated or not with cryptogeiin

Accession	Protein name	Localization	Function	Student's T-test difference abundance (fold change)
A0A1S4CQP0	Uncharacterized protein LOC107821453 blast with: Putative mitochondrial inner membrane protease subunit 2-like of <i>Solanum chacoense</i>	Mitochondria	Peptidase activity	-4.0881
A0A1S3YU22	Cytochrome c1-1, heme protein	Mitochondria	Electron transfer activity	-4.70191
A0A1S4ABI5	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta	Mitochondria	Metalloendopeptidase activity	-5.08

Note: Cells have been treated by cryptogeiin, or with water as control, during 6 h before extraction. The bars, whose lengths are proportional to the abundances, are black in case of over-abundance in elicited cells (positive digits) or grey in case of reduced amount in treated cells (negative digits).

cryptogeiin. This latter induced an increase in proteasomal activities in WT cells from 4 to 12 h until 28 h (Figure 10). Nevertheless, this increase was not observed in Cdc48 overexpressing cells, except for beta1 proteasomal activity which was significantly higher in GFP-Cdc48 cells at 24 h of cryptogeiin treatment (Figure 10a). Therefore, the overexpression of Cdc48 negatively impacts the increase of beta1, beta2 and beta5 proteolysis activities induced by cryptogeiin.

3.8 | Cdc48 and/or Rpn3 transient overexpression impacts the accumulation of ubiquitinated proteins and accelerate HR

Data described above indicated that in cell lines stably overexpressing Cdc48, the ubiquitination of proteins is affected both quantitatively and qualitatively. The content of proteasomal subunits is also modified. However, apart from elicitation, proteasomal

TABLE 4 Variant proteins between ubiquitinomes of Cdc48-TAP cells treated or not with cryptogein

Accession	Protein name	Localization	Function	N: Student's T-test difference abundance (fold change)
A0A1S4CXA6	Vesicle-associated membrane protein 724-like	ER	Vesicle-mediated transport	7.18772
A0A1S3YHK3	ATP-citrate synthase alpha chain protein 2-like	Mitochondria	ATP binding	7.02985
A0A1S4BW99	Protein phosphatase 2C 29-like	Nucleus	Protein serine/threonine phosphatase activity	5.08229
A0A1S4DS12	Long chain acyl-CoA synthetase 9, chloroplastic-like	Chloroplast	Catalytic activity	1.38
A0A1S3YXH0	SEC12-like protein 1	ER	ER-Golgi vesiclemediated transport	-4.60253

Note: Cells have been treated by cryptogein, or with water as control, during 6 h before extraction. The bars, whose lengths are proportional to the abundances, are black in case of over-abundance in elicited cells (positive digits) or grey in case of reduced amount in treated cells (negative digits).

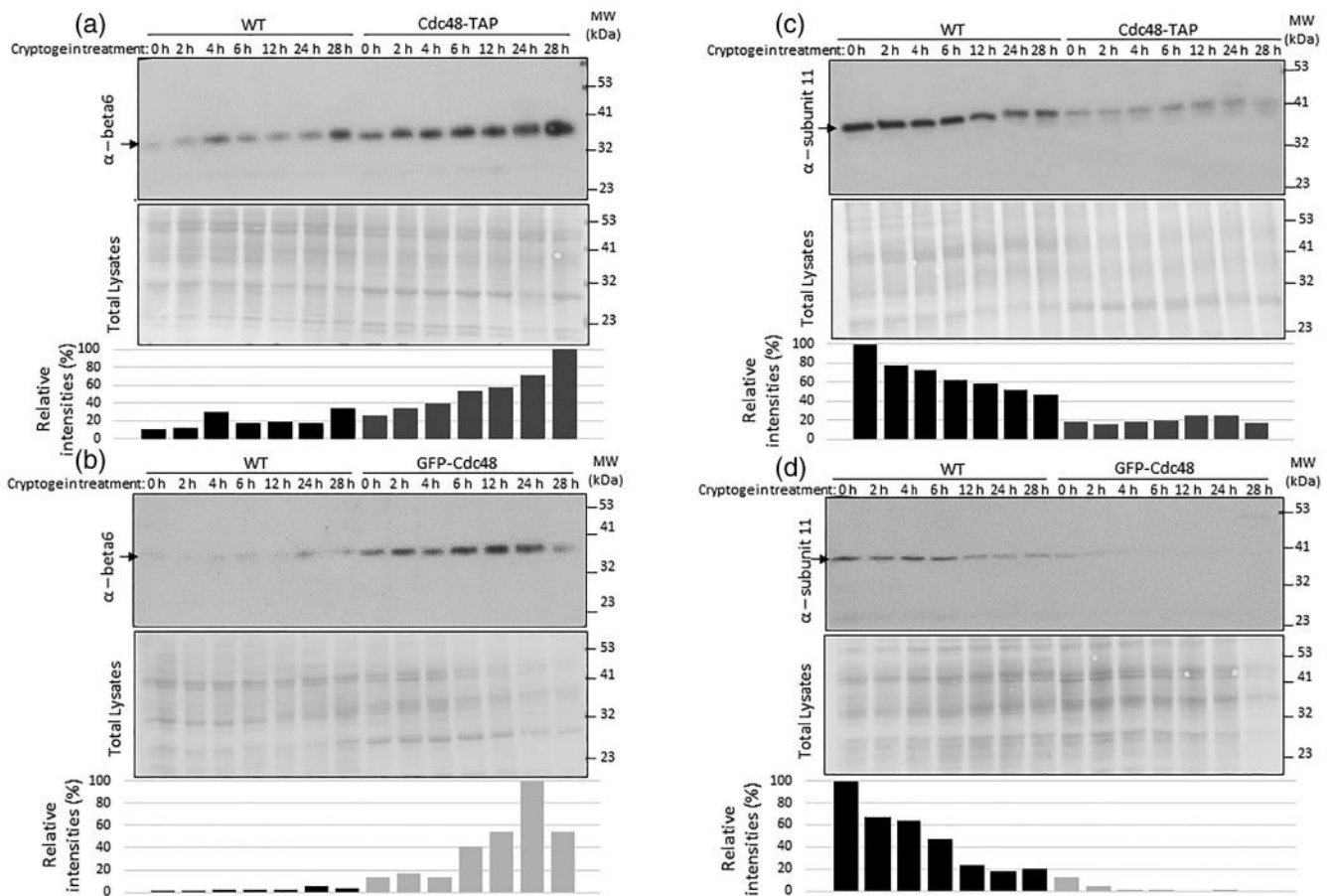


FIGURE 9 The amounts of proteasomal subunit beta6 and subunit 11 are affected by cryptogein treatment. Time course of the 20S beta6 subunit and non-ATPase regulatory subunit 11 accumulations. Wild type (WT), Cdc48-TAP (a, c) and GFP-Cdc48 (b, d) were treated with 100 nM cryptogein. For each sample, 20 μ g of extracted proteins were separated by SDS-PAGE and subunits amounts were analysed by immunoblot against endogenous protein. Proteins loading was checked using Ponceau staining shown on each bottom panel. Results shown are one from at least three representative experiments. Relative amounts of signal intensities, levelled with each Ponceau track, were measured using IMAGEJ software

activities are unchanged compared to WT cells, suggesting that the transgenic cell lines implemented a regulation to keep a proper proteasome activity despite the incidence of Cdc48 overexpression on UPS actors. During cryptogein treatment, cell lines

overexpressing Cdc48 showed a premature cell death, a disturbed accumulation of Ub-proteins and a lack of proteasomal activity increase. We did not exclude the possibility that the observed modifications resulted from an adaptive process caused by the

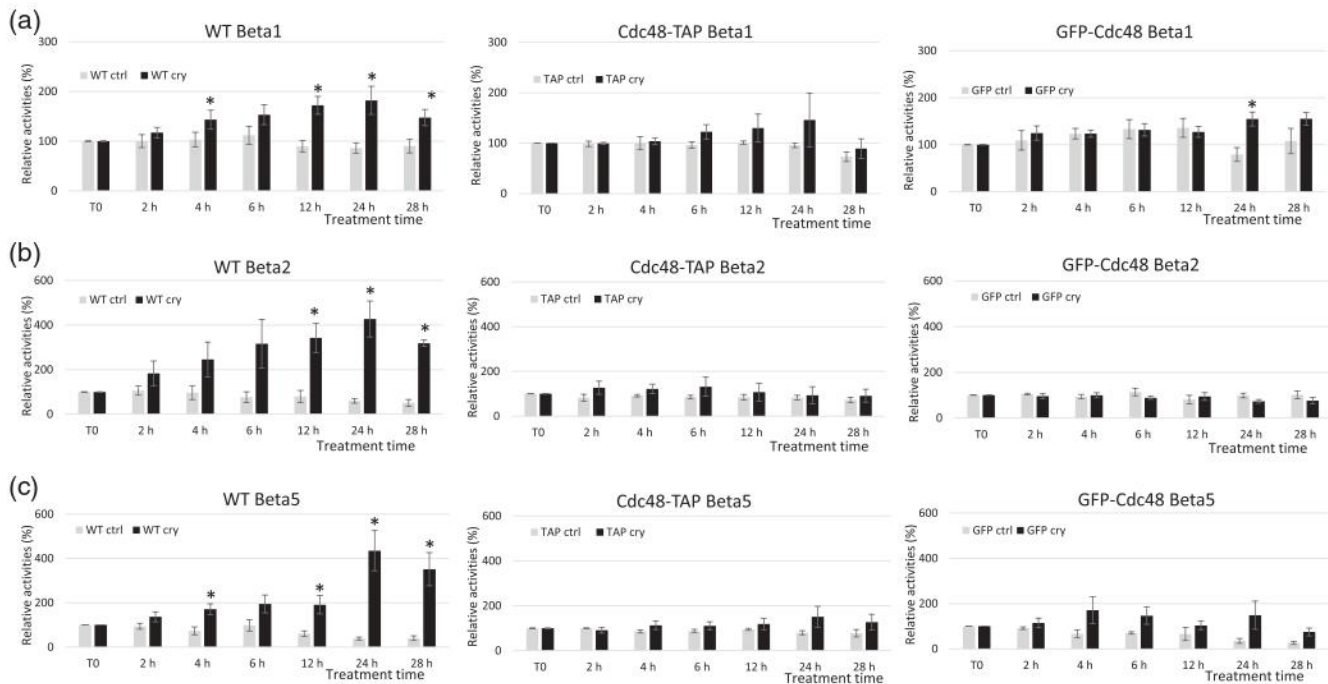


FIGURE 10 Cryptogein treatment affects proteasomal activities differently across cell lines. WT, Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cells were incubated with 100 nM cryptogein or with equivalent amount of water as control (Ctrl). For each sample, 40 μ g of proteins were incubated with the fluorogenic substrates specific for: (a), PGPH-like activity of beta1 proteasomal subunit (Z-LLE-AMC), or (b), trypsin-like activity of beta2 proteasomal subunit (BOC-LSTR-AMC), or (c), chymotrypsin-like activity of beta5 proteasomal subunit (Suc-LLVY-MCA). Proteasome activities were expressed as relative AMC released during 2 h at 37°C (% of each T0 value \pm S.E). Results are means of at least three independent experiments. Statistical analysis between incubation times was carried out by Kruskal-Wallis test (* $p \leq .05$)

constitutive aspect of Cdc48 overexpression. To verify this possibility, as well as to further understand the biological significance of the interaction between Cdc48 and the proteasome, we next investigated the impact of Cdc48 and/or Rpn3 transiently expressed.

More precisely, GFP-Cdc48 and/or YFP-Rpn3 were transiently overexpressed in tobacco leaves in which an immune response was elicited or not by cryptogein. Next, the development of the HR, the accumulation of Ub-proteins and the proteasomal activities were analysed (Figures 11 and S10). In leaves overexpressing Cdc48 and Rpn3, alone or together, the HR was observed within 3 to 6 h after cryptogein infiltration and became stronger thereafter (Figure 11a). By comparison, in the controls leaf areas, necrosis were only observed after 9 h of cryptogein. Therefore, the overexpression of Cdc48 and/or Rpn3 accelerated the development of HR.

Regarding the accumulation of ubiquitinated proteins, without cryptogein treatment an accumulation of Ub-proteins occurred concomitantly with the transient overexpression of Cdc48, alone or together with Rpn3 (Figure 11b). Nevertheless, the ubiquitination profiles differed from those of the cell lines stably overexpressing Cdc48 (Figure 1). Interestingly, a similar accumulation of Ub-proteins occurred also concomitantly with Rpn3 overexpression, indicating that the level of Rpn3 expression also impacts the regulation of protein ubiquitination. In cryptogein-treated non-transformed leaves, a slight accumulation of Ub-proteins occurred from 3 hours of treatment and increased with longer time, in accordance with the data obtained in cell lines (Figures 8 and 11c). In leaves overexpressing the proteins of interest, an induced accumulation of Ub-proteins was also observed

but was concomitant to the accumulation of Cdc48 and/or Rpn3 as found in non-elicited tissues.

The overexpression of Cdc48, Rpn3 or both did not impact the proteasomal activities of beta1, beta2 and beta5 in non-elicited plants (Figure S10a–c). In response to cryptogein treatment, a slight and transient increase of beta1 activity was observed in the non-transformed and transformed lines (Figure S10d). Similarly, a transient increase of beta5 activity was also noticed but only in non-transformed leaves (Figure S10f). However, these tendencies were not statistically significant. Finally, the amounts of proteasomal subunits were not modified in leaves transiently expressing Cdc48 and/or elicited by cryptogein (data not shown).

Taken together, these data highlight that the transient expression of Cdc48 and/or of its partner Rpn3, impacts the accumulation of Ub-proteins and accelerates the cell death triggered by cryptogein. In contrast, the proteasomal activities were not affected during the immune response and/or in leaves transiently overexpressing Cdc48. Interestingly, overexpression of Cdc48 or Rpn3 or both of them leads to the same results, suggesting that both proteins act together in the same biological regulatory pathway leading to Ub-protein accumulation and HR or PCD.

4 | DISCUSSION

This investigation aimed at elucidating the role of Cdc48 on the regulation of UPS in tobacco. First, the comparison of the ubiquitination

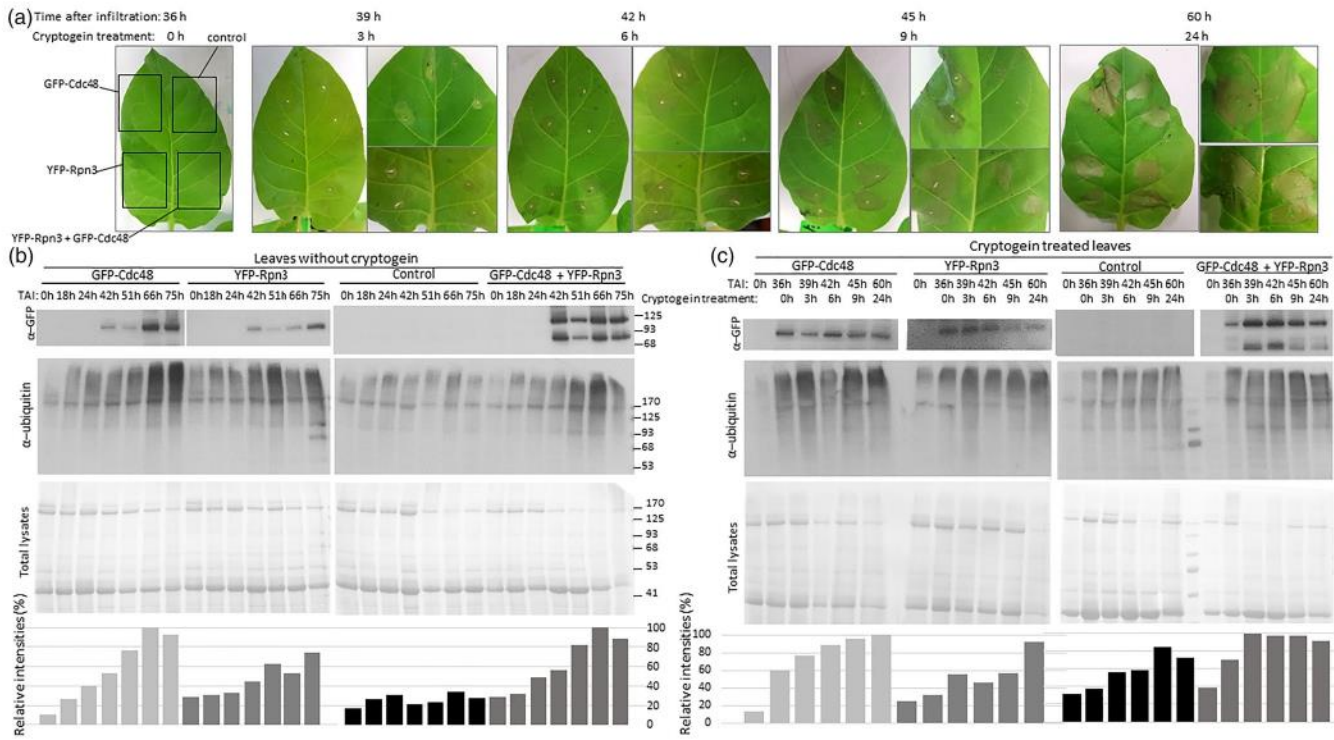


FIGURE 11 Transient Cdc48 and Rpn3 overexpressions trigger premature HR and ubiquitinated proteins accumulation in tobacco leaves. Tobacco leaves were infiltrated by GFP-Cdc48 and/or YFP-Rpn3 thanks to agro-infiltration, controls were performed with buffer infiltration. In elicited leaves, cryptogeyn were added 36 hours after agro-infiltration. At each time point, the appearance of necrosis were followed (a) and samples were removed so as to perform immunoblots against overexpressed proteins thanks to GFP antibody and ubiquitin in untreated (b) and in elicited (c) leaves. TAI: time after infiltration. Relative amounts of Ub signal intensities, levelled with each Ponceau track, were measured using IMAGEJ software [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

profiles between the WT and Cdc48-TAP lines showed that the stable overexpression of Cdc48 impacts this process, a lower level of Ub-proteins being observed in the surexpressor. In addition, a predominant signal of about 20 kDa immuno-reacting with the antibodies anti-Ub was predominant in the Cdc48-TAP line as well as in GFP-Cdc48 cells. Although hypothetical, this molar mass could correspond to Ub chains preassembled prior to its substrate attachment (Van Nocker & Vierstra, 1993). If so, their predominance in cells overexpressing Cdc48, together with the lower accumulation of Ub-proteins, could result from a slowdown of the ubiquitination process. In contrast, an induced accumulation of ubiquitinated proteins was observed in leaves overexpressing Cdc48 transiently. Overall, these data suggest that plant cells adapt the ubiquitination process according to the level and probably the duration of Cdc48 expression and accumulation. The involvement of Cdc48 in ubiquitin homeostasis seems not specific to plants. For instance, Higgins et al. (2020) recently reported that in yeast, Cdc48 deficiency triggers an elevated protein ubiquitination levels and decreased the free ubiquitin pool. According to the authors, these data highlight a role for Cdc48 in ensuring the regeneration of mono-ubiquitin which appears to be essential for normal cellular function including the degradation of misfolded proteins.

Analyses of the ubiquitinome led to the identification of 2,264 proteins. These latter probably cover all different lysine linkages, but

also mono-ubiquitinated proteins that have rather a regulatory role (Kwon & Ciechanover, 2017), as well as Ub-proteins partners. Amongst the proteins, 1,661 were commonly found in WT and Cdc48-TAP cells, elicited or not with cryptogeyn. This number is comparable to yeast ubiquitinome (1,075 proteins, Peng et al., 2003) but higher than that of *A. thaliana* seeds, isolated thanks to an anti-Ub antibody (251 proteins, Igawa et al., 2009). In our study, proteins involved in metabolic processes were predominant, the turnover of metabolic proteins being particularly intense (Harper & Bennett, 2016).

Besides the invariant proteins, the comparison of the ubiquitomes of Cdc48-TAP and WT resting cells revealed 600 variant proteins. Therefore, the overexpression of Cdc48 significantly impacts the ubiquitinome of tobacco cells and strongly affects the proteasomal subunits amount, both in the ubiquitinomes and at cellular level. How the overexpression of Cdc48 impacts the amount of proteasomal subunits is unknown but this process could differ between 19S and 20S. Both proteins and transcripts of the 19S subunit 11 were down-regulated in Cdc48-TAP and GFP-Cdc48 cell lines, suggesting that Cdc48 overexpression decreases the expression of the corresponding gene. In contrast, the accumulation of 20S subunits as not correlated to mRNA amounts in cell lines. Observation that the proteasome activities of the lines overexpressing Cdc48 were similar to those of WT cells in resting conditions is also particularly relevant. Notably,

this data suggests that cells adapt the activity of the proteasome in order to limit the risk of improper protein turnover/degradation due to Cdc48 overexpression.

Proteins related to the redox status and defence responses were differentially abundant between WT and Cdc48-TAP cells ubiquitinomes. Those involved in Redox control, more abundant in the overexpressor, are particularly relevant as Cdc48 has been shown to interact with and to regulate cytosolic ascorbate peroxidase activity and glutathione amounts (Bègue, Besson-Bard, et al., 2019; Bègue, Mounier, et al., 2019). Most of defence related proteins, for instance WRKY, PR-1 and several enzymes belonging to the synthesis pathway of SA (Breen, Williams, Outram, Kobe, & Solomon, 2017; Eulgem & Somssich, 2007; Shine et al., 2016), were also found in higher amount in the Cdc48-TAP cells ubiquitinome. Conversely, the two enzymes involved in the synthesis of S-adenosylmethionine, at the origin of biosynthetic pathways mobilized in plant immunity, were both found in higher amount in the ubiquitinome of WT cells (Nascimento, Rossi, & Glick, 2018). This imbalance in resting cells pointed out a Cdc48 involvement in the regulation of immunity pathways, in accordance with previous studies (Bègue, Mounier, et al., 2019; Copeland et al., 2016; Rosnoblet et al., 2017).

We therefore extended our investigation to cells elicited by cryptogein. This study was motivated by our previous work demonstrating that the PCD induced by cryptogein is faster and amplified in cells over-expressing Cdc48 (Rosnoblet et al., 2017). We confirmed this finding *in planta*, thus reinforcing the hypothesis that Cdc48 as well as Rpn3, contribute to the cellular mechanisms leading to cell death. In this regard, it is particularly noticeable that the co-overexpression of Cdc48 and Rpn3 did not trigger amplification of either premature HR or accumulation of Ub-proteins, suggesting that both partners work in a similar pathway. Immunoblot analyses indicated that cryptogein only slightly affects the accumulation of the proteasomal subunit whatever the cell lines, although differently between 19S and 20S. Nevertheless, in WT cells cryptogein treatment triggered an increase of proteasomal activities. Our data support those of Sun et al. (2013) who reported an increase of proteasomal activities in *A. thaliana* cells exposed to the pathogen-associated molecular pattern flg22 derived from bacterial flagellin. Interestingly, the cryptogein-induced enhancement of proteasomal proteolytic activities was suppressed in cell line overexpressing Cdc48, suggesting a role for Cdc48 in the regulation of the proteasomal activity. It is worth noting that in contrast the cryptogein treatment of tobacco leaves, non-transformed or transformed by Cdc48, Rpn3 or both, was not accompanied by a statistically significant changes of beta1, beta2 and beta5 proteolytic activities. Although speculative, this discrepancy might be due to the biological models (plants versus cell suspensions) which could behave differently in response to cryptogein treatment. In particular, some features of PCD observed in cell lines differ from the confine HR of leaves, especially concerning gene expression (Swidzinski, Sweetlove, & Leaver, 2002) and the rapid modification of ion fluxes occurring during the establishment of the HR (Ma & Berkowitz, 2007).

Overall, our finding raises the question of the functional relationship between proteasomal activity and cell death. According to Dahan, Etienne, and Petitot (2001) some proteasomal subunits could contribute to specific proteolysis mechanism leading to HR while Hatsugai et al. (2009) observed a correlation between proteasomal subunit amount and HR. In contrast, Kim et al. (2003) showed that dysfunction of UPS by gene silencing of proteasome subunits activates a PCD in plants. More recently, Ueno, Kashiwagi, Kanekatsu, Marubashi, and Tetsuya (2019) reported that the PCD triggered by a cold stress in hybrid tobacco cells expressing hybrid lethality was related to an impairment of proteasomal activities and an accumulation of insoluble protein, including proteasomal subunits. We similarly observed that the overexpression of Rpn3 triggered premature HR in cryptogein treated leaves while the cell lines overexpressing Cdc48 showed a premature cell death, a disturbed accumulation of proteasomal subunits and a suppression of cryptogein-induced proteasomal activities. Whether these latter events contribute to cell death remain enigmatic but a causal relationship can be suggested. Another point to be considered is that the balance of protein abundance between promoters and suppressors of PCD is regulated by proteasome-dependent degradation (Furniss & Spoel, 2015). For instance, the removal of the cell survival promoter NPR1 is required for successful PCD (Fu et al., 2012; Rate & Greenberg, 2001) while, in contrast, the accumulation of intracellular nucleotide-binding/leucine-rich repeat domain containing (NLR) immune receptors triggers PCD response. Thus, a reduced amount of a Cullin-1 protein, an UPS component that recruits NLR for its proteasomal degradation (Furniss & Spoel, 2015), was also observed in the ubiquitinome of Cdc48-TAP cells (Table 1).

Detailed comparison of ubiquitinomes of cells treated or not treated with cryptogein revealed only few proteins with significantly different amounts. Among the three variant proteins of ubiquitinomes of WT cells, cytochrome c1-1 appeared in reduced quantity after 6 h of cryptogein treatment. Mitochondrial cytochrome c1-2 was also less abundant in the ubiquitinome of untreated Cdc48-TAP cells compared to WT cells (Table S2b). Cytochrome c is an actor of apoptotic degradation in mammals through the activation of caspases (Garrido et al., 2006). In plants, it has been described as excreted from mitochondria in response to stress leading to PCD (Curtis & Wolpert, 2002; Vacca, 2006; Livaja et al., 2008.). In the ubiquitinome of the Cdc48-TAP line elicited by cryptogein, four proteins were more abundant as compared to untreated cells. Amongst those, three have been shown to be involved in plant immunity. Their highest abundance suggests an increase of their degradation or an acceleration of their turnover following cryptogein treatment. These proteins include the particularly interesting phosphatase 2C. Of interest, a phosphatase 2C isoform has been described as involved in the tobacco nuclear import of the *Agrobacterium tumefaciens* virulence protein VirD2 linked to bacterial DNA (Tao et al., 2004). Moreover, in *A. thaliana*, phosphatase 2C was shown to act as a negative regulator of defence responses, including HR (Schweighofer et al., 2007). Similarly, in rice, the protein phosphatase 2C XB15 negatively regulates cell death and innate immunity (Park et al., 2008). Regarding its role in the control of

cell death, the greater amount of phosphatase 2C in the ubiquitinome of cryptogein-treated Cdc48-TAP cells displaying a faster cell death is particularly relevant and warrants further research.

A deeper investigation was conducted on proteasomal subunits, for which significant imbalance was measured between WT and Cdc48-overexpressing cells ubiquitinomes. First, we confirmed the interaction between Cdc48 and the proteasomal subunit Rpn3. According to *in vitro* experiments, the interaction with Cdc48 would require the incorporation of Rpn3 into the proteasome. Structurally, Rpn3 is positioned in the lid and interacts with Rpn7, while its C-terminal part protrudes into the Rpt ATPase ring (Schweitzer et al., 2016). Moreover, Rpn3 would fulfil a coordination function between substrate and the Rpt ring and consequently does not display isolated role. Because the overexpressed tagged Rpn3 participates in a proteasome size complex, and according to the ability of fluorophore-tagged proteasomal subunits to fully integrate within their appropriate sub-complexes (Marshall & Vierstra, 2019), we assume that the interaction with Cdc48 occurs at the proteasome level. This result is in accordance with previous studies reporting the physical interactions between Cdc48 and both 19S and 20S subunits in *A. thaliana* (Méraï et al., 2014). The FRET-FLIM experiments was particularly informative. First, FRET is detectable if both fluorophores are less than 10 nm apart. As the proteasome is 11 nm in diameter (Hegerl, Pfeifer, Pühler, Dahlmann, & Baumeister, 1991), Cdc48 could interact with the lid indirectly through another 19S subunit (Xing, Wallmeroth, Berendzen, & Grefen, 2016), especially because both isolated recombinant proteins did not interact directly together. This interaction may also require an intermediate, as previously shown with escort factors of ubiquitinated substrates, such as RAD23/DSK2, whose six isoforms were identified in the invariant ubiquitinome (Table S2a, Richly et al., 2005). Such shuttling Ub receptors have been described to target Cdc48 substrates to the proteasome (Förster, Schuller, Unverdorben, & Aufderheide, 2014). Second, FRET indicated that the Cdc48/Rpn3 interaction takes place in the cytosol. As Cdc48 and the 26S proteasome also localized in the nucleus (Gallagher, Candadai, & Gardner, 2014; Vallon & Kull, 1994), a nuclear interaction between CFP-Cdc48 and YFP-Rpn3 could be expected (Marshall & Vierstra, 2019). The absence of nuclear interaction in our investigation could highlight a cytosol specific mechanisms or, alternatively, that the overexpressed YFP-Rpn3 isoform was not translocated into the nucleus.

As a conclusion, overexpression of Cdc48 significantly modifies the cellular ubiquitinome and, depending on the overexpression biological model, proteasome composition. These data reveal that Cdc48 carries out a regulatory activity on different actors of the UPS and, more particularly, that it is involved in ubiquitin homeostasis. In cells and leaves exposed to cryptogein, the overexpression of Cdc48 triggered premature PCD and HR. Taken together, these results support the assumption that UPS disruption contributes to cell death in plants.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Emmanuelle Mouton for mass spectrometry data processing, Françoise Simon-Plas for the gift of antibodies against

20S proteasome subunits and Gabriele Sorci for advice in the processing of statistical data.

AUTHOR'S CONTRIBUTION

DW and CR conceived the project and wrote the manuscript. DW contributed to the funding acquisition. CR and PC performed the experiments and analysed the results. AK maintained cell lines. HB contributes to some statistical analysis of data. PW performed FRET-FLIM data acquisitions, and CP performed mass spectrometry analysis.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare to have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Claire Rosnoblet  <https://orcid.org/0000-0002-1906-0922>

REFERENCES

- Barthelme, D., & Sauer, R. T. (2012). Identification of the Cdc48•20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine. *Science*, 337(6096), 843–846.
- Barthelme, D., & Sauer, R. T. (2013). Bipartite determinants mediate an evolutionarily conserved interaction between Cdc48 and the 20S peptidase. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 110(9), 3327–3332.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., & Seemüller, E. (1998). The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92(3), 367–380.
- Bègue, H., Besson-Bard, A., Blanchard, C., Winckler, P., Bourque, S., Nicolas, V., ... Rosnoblet, C. (2019). Chaperone-like protein CDC48 regulates ascorbate peroxidase in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 70(10), 2665–2681.
- Bègue, H., Jeandroz, S., Blanchard, C., Wendehenne, D., & Rosnoblet, C. (2017). Structure and functions of the Chaperone-like p97/CDC48 in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(1 Pt A), 3053–3060.
- Bègue, H., Mounier, A., Rosnoblet, C., & Wendehenne, D. (2019). Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant Science*, 279, 34–44.
- Besson-Bard, A., Griveau, S., Bedioui, F., & Wendehenne, D. (2008). Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany*, 59(12), 3407–3414.
- Bodnar, N. O., & Rapoport, T. A. (2017). Molecular mechanism of substrate processing by the Cdc48 ATPase complex. *Cell*, 169(4), 722–735.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense—Fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 487–497.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.-P., & Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology*, 102(2), 181–192.
- Breen, S., Williams, S. J., Outram, M., Kobe, B., & Solomon, P. S. (2017). Emerging insights into the functions of Pathogenesis-Related protein 1. *Trends in Plant Science*, 22(10), 871–879.
- Budenholzer, L., Cheng, C. L., Li, Y., & Hochstrasser, M. (2017). Proteasome structure and assembly. *Journal of Molecular Biology*, 429(22), 3500–3524.
- Cheng, J. I., North, J. N., Zhang, T., Dai, X., Tao, K., Guo, J., & Wei, W. (2018). The emerging roles of protein homeostasis-governing pathways in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 17(5), e12801.

- Coll, N. S., Epple, P., & Dangl, J. L. (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1247–1256.
- Copeland, C., & Li, X. (2019). Regulation of plant immunity by the proteasome. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 343, 37–63.
- Copeland C., Woloshen V., Huang Y. & Li X. (2016). AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor. *Plant Journal*, 88 (2), 294–305.
- Curtis, M. J., & Wolpert, T. J. (2002). The oat mitochondrial permeability transition and its implication in victorin binding and induced cell death. *Plant Journal*, 29(3), 295–312.
- Dahan, J., Etienne, P., & Petitot, A.-S. (2001). Cryptogin affects expression of alpha3, alpha6 and beta1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, 52(362), 1947–1958.
- Eulgem, T., & Somssich, E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4), 366–371.
- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 477–513.
- Förster, F., Schuller, J. M., Unverdorben, P., & Aufderheide, A. (2014). Emerging mechanistic insights into AAA complexes regulating proteasomal degradation. *Biomolecules*, 4(3), 774–794.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228–232.
- Furniss, J. J., & Spoel, S. H. (2015). Cullin-RING ubiquitin ligases in salicylic acid-mediated plant immune signalling. *Frontiers in Plant Sciences*, 6, 154.
- Gallagher, P. S., Candada, S. V. C., & Gardner, R. G. (2014). The requirement for Cdc48/p97 in nuclear protein quality control degradation depends on the substrate and correlates with substrate insolubility. *Journal of Cell Science*, 127(Pt 9), 1980–1991.
- Gallois, J. L., Drouaud, J., Lécureuil, A., Guyon-Debast, A., Bonhomme, S., & Guerche, P. (2013). Functional characterization of the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein AtPUX7 in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 526(2), 299–308.
- Ganger, M. T., Dietz, G. D., & Ewing, S. J. (2017). A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 534.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., & Kroemer, G. (2006). Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 13(9), 1423–1433.
- Hander, T., Fernández-Fernández, Á. D., Kumpf, R. P., Willems, P., Schatowitz, H., Rombaut, D., et al. (2019). Damage on plants activates Ca²⁺-dependent metacaspases for release of immunomodulatory peptides. *Science*, 363(6433), eaar7486.
- Harper, J. W., & Bennett, E. J. (2016). Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature*, 537(7620), 328–338.
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., ... Hara-Nishimura, I. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes & Development*, 23(21), 2496–2506.
- Hegerl, R., Pfeifer, G., Pühler, G., Dahmann, B., & Baumeister, W. (1991). The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Letters*, 283(1), 117–121.
- Higgins, R., Kabbaj, M.-H., Sherwin, D., Howell, L. A., Hatcher, A., Tomko, R. J., Jr., & Wang, Y. (2020). The Cdc48 complex alleviates the cytotoxicity of misfolded proteins by regulating ubiquitin homeostasis. *Cell Reports*, 32(2), 107898.
- Igawa, T., Fujiwara, M., Takahashi, H., Sawasaki, T., Endo, Y., Seki, M., ... Yanagawa, Y. (2009). Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 60 (11), 3067–3073.
- Karimi, M., De Meyer, B., & Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science*, 10(3), 103–105.
- Kim, M., Ahn, J.-W., Jin, U.-H., Choi, D., Paek, K.-H., & Pai, H.-S. (2003). Activation of the programmed cell death pathway by inhibition of proteasome function in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 19406–19415.
- Kretzschmar, F. K., Mengel, L. A., Müller, A. O., Schmitt, K., Blerch, K. F., Valerius, O., ... Ischebeck, T. (2018). PUX10 is a lipid droplet-localized scaffold protein that interacts with CELL DIVISION CYCLE48 and is involved in the degradation of lipid droplet proteins. *The Plant Cell*, 30 (9), 2137–2160.
- Kwon, Y. T., & Ciechanover, A. (2017). The ubiquitin code in the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Trends in Biochemical Sciences*, 42 (11), 873–886.
- Lin, Y.-T., Prendergast, J., & Grey, F. (2017). The host ubiquitin-dependent segregase VCP/p97 is required for the onset of human cytomegalovirus replication. *PLoS Pathogens*, 13(5), e1006329.
- Livaja, M., Palmieri, M. C., von Rad, U., & Dumer, J. (2008). The effect of the bacterial effector protein harpin on transcriptional profile and mitochondrial proteins of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics*, 71(2), 148–159.
- Ma, W., & Berkowitz, G. A. (2007). The grateful dead: Calcium and cell death in plant innate immunity. *Cellular Microbiology*, 9(11), 2571–2585.
- Marshall, R. S., Jolliffe, N. A., Ceriotti, A., Snowden, C. J., Lord, J. M., Frigerio, L., & Roberts, L. M. (2008). The role of CDC48 in the retrotranslocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(21), 15869–15877.
- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2019). Dynamic regulation of the 26S proteasome: From synthesis to degradation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 40.
- Mérai, Z., Chumak, N., García-Aguilar, M., Hsieh, T.-F., Nishimura, T., Schoft, V. K., et al. (2014). The AAA-ATPase molecular chaperone Cdc48/p97 disassembles sumoylated centromeres, decondenses heterochromatin, and activates ribosomal RNA genes. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 111(45), 16166–16171.
- Meyer, H., Bug, M., & Bremer, S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology*, 14(2), 117–123.
- Müller, J., Piffanelli, P., Devoto, A., Miklis, M., Elliott, C., Ortmann, B., ... Panstruga, R. (2005). Conserved ERAD-like quality control of a plant polytopic membrane protein. *The Plant Cell*, 17(1), 149–163.
- Nascimento, F. X., Rossi, M. J., & Glick, B. R. (2018). Ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in plant-bacterial interactions. *Frontiers Plant Sciences*, 9, 114.
- Neal, S., Mak, R., Bennett, E. J., & Hampton, R. (2017). A “retrochaperone” function for Cdc48: The Cdc48 complex is required for retrotranslocated ERAD-M substrate solubility. *Journal of Biological Chemistry*, 292(8), 3112–3128.
- Oñate-Sánchez, L., & Vicente-Carbajosa, J. (2008). DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes*, 1, 93.
- Park, C. J., Peng, Y., Chen, X., Dardick, C., Ruan, D., Bard, R., ... Ronald, P. C. (2008). Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS Biology*, 6(9), e231.
- Park, C.-W., & Ryu, K.-Y. (2014). Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis. *BMB Reports*, 47(9), 475–482.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., ... Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature Biotechnology*, 21(8), 921–926.
- Rate, D. N., & Greenberg, J. T. (2001). The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and

- reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant Journal*, 27(3), 203–211.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegen, C., & Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, 120(1), 73–84.
- Rodrigo-Brenni, M. C., & Hegde, R. S. (2012). Design principles of protein biosynthesis coupled quality control. *Developmental Cell*, 23(5), 896–907.
- Rosnoblet, C., Bègue, H., Blanchard, C., Pichereaux, C., Besson-Bard, A., Aimé, S., & Wendehenne, D. (2017). Functional characterization of the chaperone-like protein Cdc48 in cryptogem-induced immune response in tobacco. *Plant Cell and Environment*, 40(4), 491–508.
- Saracco, S. A., Hansson, M., Scalf, M., Walker, J. M., Smith, L. M., & Vierstra, R. D. (2009). Tandem affinity purification and mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 59(2), 344–358.
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., ... Meskiene, I. (2007). The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(7), 2213–2224.
- Schweitzer, A., Aufderheide, A., Rudack, T., Beck, F., Pfeifer, G., Plietzko, J. M., ... Baumeister, W. (2016). Structure of the human 26S proteasome at a resolution of 3.9 Å. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 113(28), 7816–7821.
- Schmidt, G. W., & Delaney, S. K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(3), 233–241.
- Shine, M. B., Yang, J. W., El-Habbak, M., Nagyabhyru, P., Fu, D. Q., Navarre, D., ... Kachroo, A. (2016). Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochorismate synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. *New Phytologist*, 212(3), 627–636.
- Skelly, M. J., Furniss, J. J., Grey, H., Wong, K. W., & Spoel, S. H. (2019). Dynamic ubiquitination determines transcriptional activity of the plant immune coactivator NPR1. *Elife*, 8, pii:e47005.
- Spoel, S. H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N. W., Genschik, P., & Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137(5), 860–872.
- Stach, L., & Freemont, P. S. (2017). The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochemical Journal*, 474(17), 2953–2976.
- Sun, H. H., Fukao, Y., Ishida, S., Yamamoto, H., Maekawa, S., Fujiwara, M., ... Yamaguchi, J. (2013). Proteomics analysis reveals a highly heterogeneous proteasome composition and the post-translational regulation of peptidase activity under pathogen signaling in plants. *Journal of Proteome Research*, 12(11), 5084–5095.
- Suty, L., Leque, J., Lançon, A., Etienne, P., Petitot, A.-S., & Blein, J.-P. (2003). Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: Towards the characterization of “plant defense proteasomes.”. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(5), 637–650.
- Swidzinski, J. A., Sweetlove, L. J., & Leaver, C. J. (2002). A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 30(4), 431–446.
- Tang, D., Simonich, M. T., & Innes, R. W. (2007). Mutations in LACS2, a long-chain acyl-coenzyme a synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 144(2), 1093–1103.
- Tao, Y., Rao, P. K., Bhattacharjee, S., & Gelvin, S. B. (2004). Expression of plant protein phosphatase 2C interferes with nuclear import of the *Agrobacterium* T-complex protein VirD2. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 101(14), 5164–5169.
- Twomey, E. C., Ji, Z., Wales, T. E., Bodnar, N. O., Ficarro, S. B., Marto, J. A., ... Rapoport, T. A. (2019). Substrate processing by the Cdc48 ATPase complex is initiated by ubiquitin unfolding. *Science*, 365(6452), pii:eaax1033.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M., Geiger, T., ... Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13(9), 731–740.
- Ueno, N., Kashiwagi, M., Kanekatsu, M., Marubashi, W., & Tetsuya, T. (2019). Accumulation of protein aggregates induces autolytic programmed cell death in hybrid tobacco cells expressing hybrid lethality. *Scientific Reports*, 9, 10223.
- Vacca, R. A. (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco bright-yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiology*, 141(1), 208–219.
- Vallon, U., & Kull, U. (1994). Localization of proteasomes in plant cells. *Protoplasma*, 182(1–2), 15–18.
- Van den Boom, J., & Meyer, H. (2018). VCP/p97-mediated unfolding as a principle in protein homeostasis and signaling. *Molecular Cell*, 69(2), 182–194.
- Van Nocker, S., & Vierstra, R. D. (1993). Multiubiquitin chains linked through lysine 48 are abundant *in vivo* and are competent intermediates in the ubiquitin proteolytic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 268(33), 24766–24773.
- Watkinson, R. E., Tam, J. C., Vaysburd, M. J., & James, L. C. (2013). Simultaneous neutralization and innate immune detection of a replicating virus by TRIM21. *Journal of Virology*, 87(13), 7309–7313.
- Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K. W., & Grefen, C. (2016). Techniques for the analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Plant Physiology*, 171(2), 727–758.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Rosnoblet, C., Chatelain, P., Klinguer, A., Bègue, H., Winckler, P., Pichereaux, C., & Wendehenne, D. (2021). The chaperone-like protein Cdc48 regulates ubiquitin-proteasome system in plants. *Plant, Cell & Environment*, 44(8), 2636–2655. <https://doi.org/10.1111/pce.14073>

C. Conclusion

Les résultats de cette étude ont mis en évidence l'impact de la surexpression de CDC48 sur le profil d'ubiquitination des protéines. Une activité régulatrice de CDC48 sur les différents acteurs de l'UPS a été mise en évidence plus particulièrement sur l'homéostasie de l'ubiquitine et des sous-unités protéasomales. De plus la surexpression de CDC48 a déclenché une mort cellulaire programmée dans les cellules de tabac et dans les feuilles de tabac surexprimant transitoirement CDC48 et/ou la sous-unité protéasomale Rpn3, révélant de ce fait des voies de signalisation communes. Ces résultats viennent étayer l'hypothèse que CDC48 en perturbant l'UPS contribue à la mort cellulaire chez les plantes.

Bien que cette étude soit assez éloignée de mon sujet de thèse, il est intéressant de constater comment l'identification de protéine modifiée par le NO a permis d'enrichir les connaissances sur les défenses des plantes et notamment sur la mise en place de la mort cellulaire.

ANNEXES

A. Liste des productions scientifiques et activités complémentaires

1. Publications internationales

Astier J, Rossi J, Chatelain P, Klinguer A, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Jeandroz S, Nicolas-Francès V, Wendehenne D. 2021. Nitric oxide production and signalling in algae. *Journal of Experimental Botany* **72**, 781–792.

Rosnoblet C, Chatelain P, Klinguer A, Bègue H, Winckler P, Pichereaux C, Wendehenne D. 2021. The chaperone-like protein Cdc48 regulates ubiquitin-proteasome system in plants. *Plant, Cell & Environment* **44**, 2636–2655.

Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Rosnoblet C, Jeandroz S. 2021. Identification of Partner Proteins of the Algae *Klebsormidium nitens* NO Synthases: Toward a Better Understanding of NO Signaling in Eukaryotic Photosynthetic Organisms. *Frontiers in Plant Science* **12**, 3068.

Chatelain P, Blanchard C, Astier J, Klinguer A, Wendehenne D, Rosnoblet C, Jeandroz S. 2022. Reliable reference genes and abiotic stress marker genes in *Klebsormidium nitens*. *Scientific Reports* (en révisions mineure).

2. Participations conférences

1. Congrès annuel de la SFBBM, Paris, FRANCE - les 1 et 2 juillet 2021 : **Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Jeandroz S, Rosnoblet C.** Role of nitric oxide synthase (NOS) of *Klebsormidium nitens*: Identification and characterization of partners (POSTER)

2. Forum des jeunes chercheurs 2021, Dijon, FRANCE - le 23 juin 2021 : **Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Rosnoblet C, Jeandroz S.** Role of nitric oxide synthase (NOS) of *Klebsormidium nitens*: Identification and characterization of partners (ORAL)

3. Forum des jeunes chercheurs 2022, Dijon, FRANCE - le 16 juin 2022 : **Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Jeandroz S, Rosnoblet C.** Role of nitric oxide synthase (NOS) of *Klebsormidium nitens*: Structure and identification of partners (ORAL)

4. Congrès annuel de la SFBBM, Paris, FRANCE - les 4 et 5 juillet 2022 : **Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Jeandroz S, Rosnoblet C.** Role of nitric oxide synthase (NOS) of *Klebsormidium nitens*: first structural characterization and partners identification (POSTER)

5. Redox Biology Congress 2022, Gand, BELGIQUE - le 24-26 août 2022 : **Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Rosnoblet C, Jeandroz S.** Role of nitric oxide synthase (NOS) of *Klebsormidium nitens*: first structural characterization and partners identification (POSTER)

3. Activité complémentaire d'enseignement

Année 2020-2021 – Contrat doctoral : 64 h, CNU section Biochimie Biologie Moléculaire (64), UFR Sciences Vie Terre et Environnement.

Licence 1ère année :

- **24 heures TD** (8 h de TD pour trois groupes de 25 étudiants) : Structure des protéines et enzymologie. Structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines, techniques d'analyse, cinétique enzymatique Michaelienne, inhibiteurs compétitifs et non-compétitifs.

Licence 2ème année :

- **20 heures de TD** (10 h de TD pour 4 groupes de 30 étudiants) : Biochimie métabolique. Glycolyse, néoglucogenèse, voie des pentoses, biosynthèse et beta-oxydation des acides gras, cycles de Krebs et phosphorylation oxydative.

- **16 heures de TP** (4 h de TP pour 4 groupes de 15 étudiants) : Biochimie métabolique « Etude de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase ».

- **4 heures de TP** (1 groupe de 15 étudiants) : Techniques en Biochimie et Biologie Moléculaire « Acides nucléiques ». Digestion plasmidique et migration sur gel d'agarose.

Année 2021-2022 – Vacation : 28 h, CNU section Biochimie Biologie Moléculaire (64), UFR Sciences Vie Terre et Environnement.

Licence 1ère année :

- **16 heures TD** (8 h de TD pour deux groupes de 25 étudiants) : Structure des protéines et enzymologie. Structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire des protéines, techniques d'analyse, cinétique enzymatique Michaelienne, inhibiteurs compétitifs et non-compétitifs.

- **16 heures de TP** (3 h de TP pour 4 groupes de 25 étudiants) : Structure des protéines et enzymologie « Etude de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline ».

B. Résultat séquençage produit de PCR de la 3'RACE de la KnNOS2

catgggggcccaggtGCTcCCCTggtTTCCCTTCAGGACGAGAACGGAAGACCGCGCCGGAAGGAGCTG
GAAGTGCACGTGGAGACGGTCATGTCAACCACCGGGCAGGTGGTCCGCCAGATGCAGGACCCGGA
CTCGCTGGCGCCGATGCTGACGGAGCTGACAGCGCTCCACGTCAAGTACGGCGTGGAAGTACTGATTCAT
TACGACATTTTGTGCTCCACGTTCTGCTGACGTTTCGAGCAGCTGCTGGGGCCCCGGTGGAAACAGCG
ACTACCGCGACGTGTGGATCTCCATCTTTTCGTTTCATCACGACCTTCGCGAGGAAAGCCTACGAATAA
CGCGCGGGAGCGGGGACGTTATTGGTTATTTGTACAAGAGTTGCAAGAGCGGGGATGCGGATGGA
CTCCGTATAAGCTCACCAGCCGCGAGGGTCGTTGGTTGGGAGTGCATGTATCACGCAAAAAGCAG
AGCATGAGCAGACGATGCGATCAAGAGCTCATGCGTGCCCGTTTATTTGGTCGGTCGCGGGTCTTTT
AAAACGGTGCGGTTGATCTTCGTGTTGGGGTTGCGTAGTACGTCTACAGTAGTATGATTATACGGGT
GGTGATTGCAATCATTGGTCCCAATGGCACTTACGGTTGCTGCACTCTCACGCATAGATTATTAGGT
TGAATGTTACGTAGGTGCTAACGCGGTGGTTAAGTTTTGCTGGAATGCTCTACAGGGAACCGTCTGT
GTCACGCGAAGACGGTTTCAAAGTTTGATAAGGGTCAGGAGGGAATACTGGCAAAAAACCAGCTT
AGATATAAGCAGCGGGCCGGTGTGATTGCAAGATGTTAGTTTCGACGGGTTGGCACAGCGTCAAAT
ATCTGCATGGATAGCGTCGGCTGGATTACACTTGGACCGGACTCAAAAAGCATCCTGCGGTTGTGTC
AGATTTAAGGAACCAATTATCGTTTTgcAAAAAAaagAtaacat

C. Milieu de culture pour les algues

1. Milieu de culture C

Macroéléments	Masse pour 1 L	Concentration finale
Tris base	500 mg	4,13 mM
KNO ₃	100 mg	0,989 mM
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	150 mg	0,635 mM
Na ₂ β-glycérophosphate, 5H ₂ O	50 mg	0,163 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	40 mg	0,162 mM

Microéléments	Masse pour 1 L	Concentration
Na ₂ -EDTA	1 g	8,06 μM
FeCl ₃ , 6H ₂ O	194 mg	2,15 μM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	50 mg	0,546 μM
ZnCl ₂	10,44 mg	0,230 μM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	12,62 mg	0,156 μM
CoCl ₂ , 6H ₂ O	4,04 mg	0,0509 μM

Vitamines	Masse pour 1 L	Concentration
Thiamines, HCl	10 mg	0,0297 μM
Biotine	0,1 mg	0,409 nM
Cyanocobalamine	0,1 mg	0,0738 nM

2. Milieu BCDAT + Glucose 0,1 % (m/v)

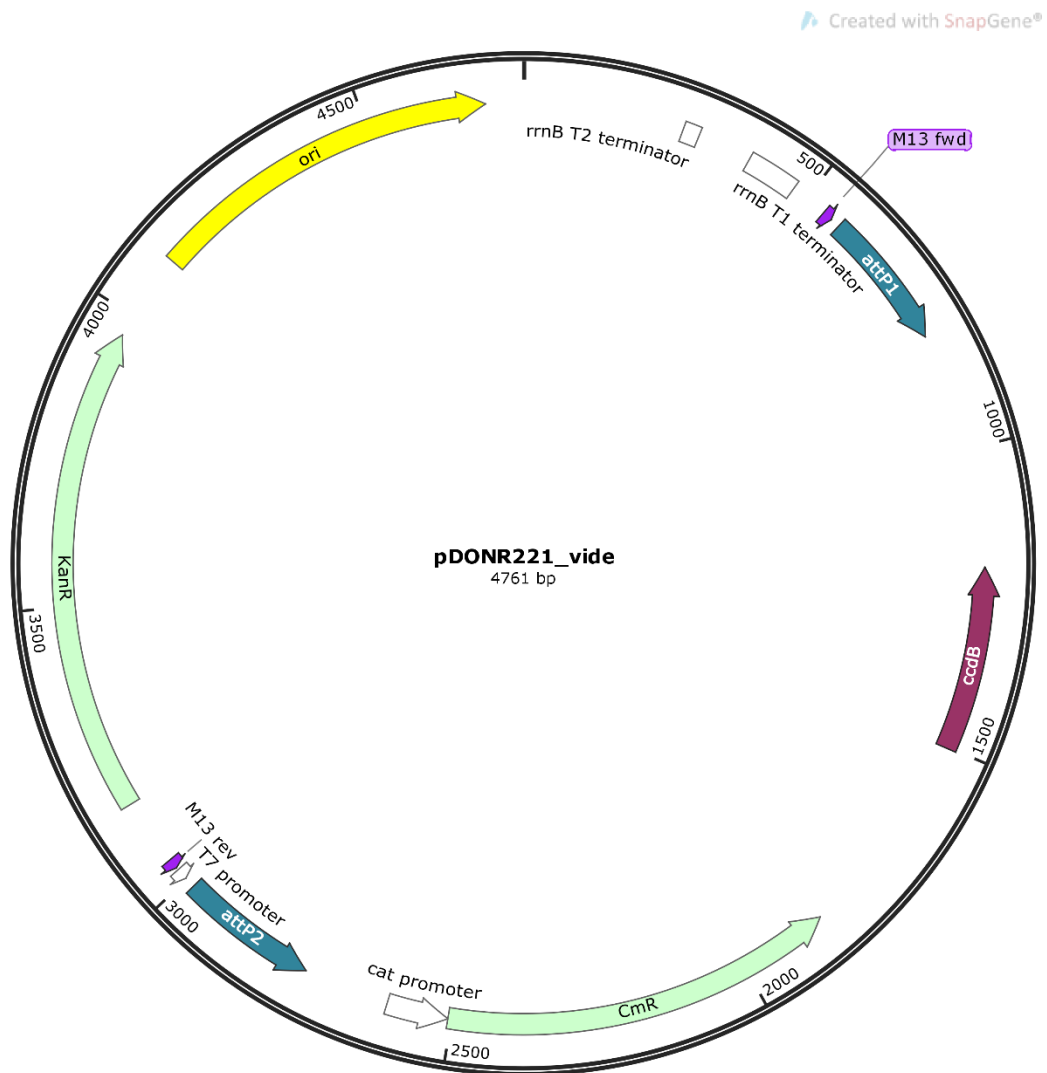
Macroéléments	Masse pour 1 L	Concentration
Glucose	1 g	0,1 % (m/v)
Diammonium (+-tartrate)	18,6 mg	5 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	247 mg	1 mM
KNO ₃	1 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	310 mg	1,8 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	147 mg	1 mM

Microéléments	Masse pour 1 L	Concentration
H ₃ BO ₃	0,62 mg	0,10 µM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,4 mg	2 µM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,055 mg	0,22 µM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,055 mg	0,19 µM
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,024 mg	0,10 µM
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,030 mg	0,23 µM
KI	0,034 mg	0,17 µM

Fe-EDTA	Masse pour 1 L	Concentration
FeSO ₄ , 7H ₂ O	13,9 mg	0,0297 µM
Na ₂ -EDTA	18,6 mg	0,409 nM

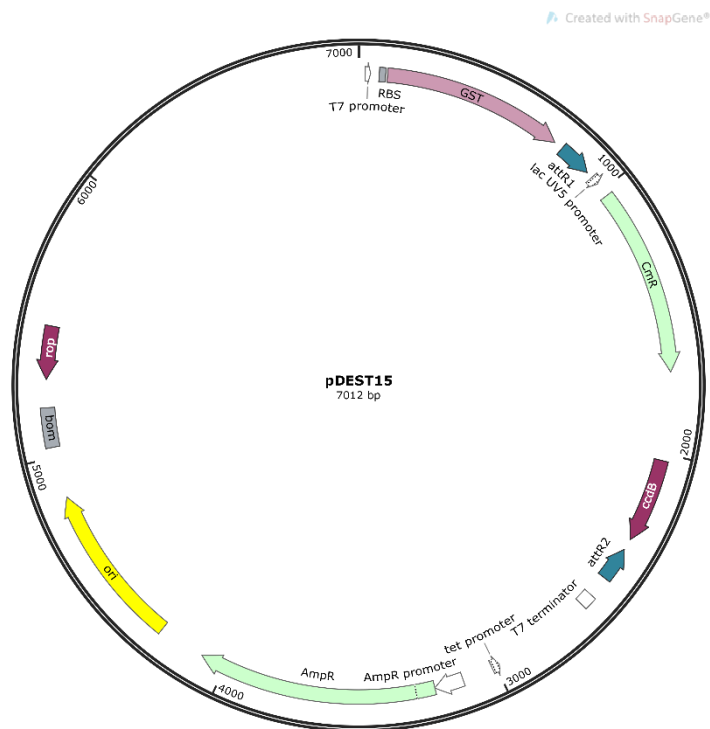
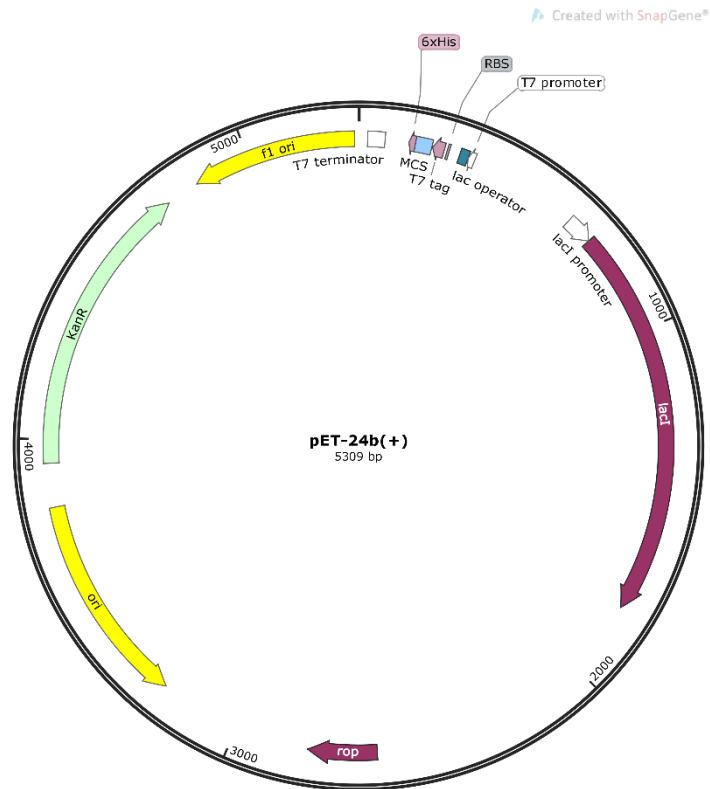
Vitamines	Masse pour 1 L	Concentration
Thiamines, HCl	10 mg	0,0297 µM
Biotine	0,1 mg	0,409 nM
Cyanocobalamine	0,1 mg	0,0738 nM

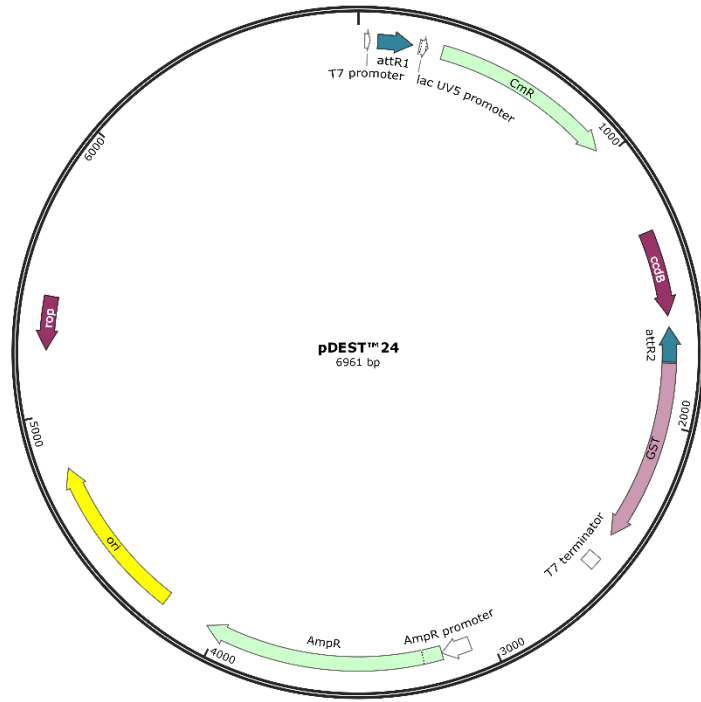
D. Cartes des plasmides
1. Plasmide donneur



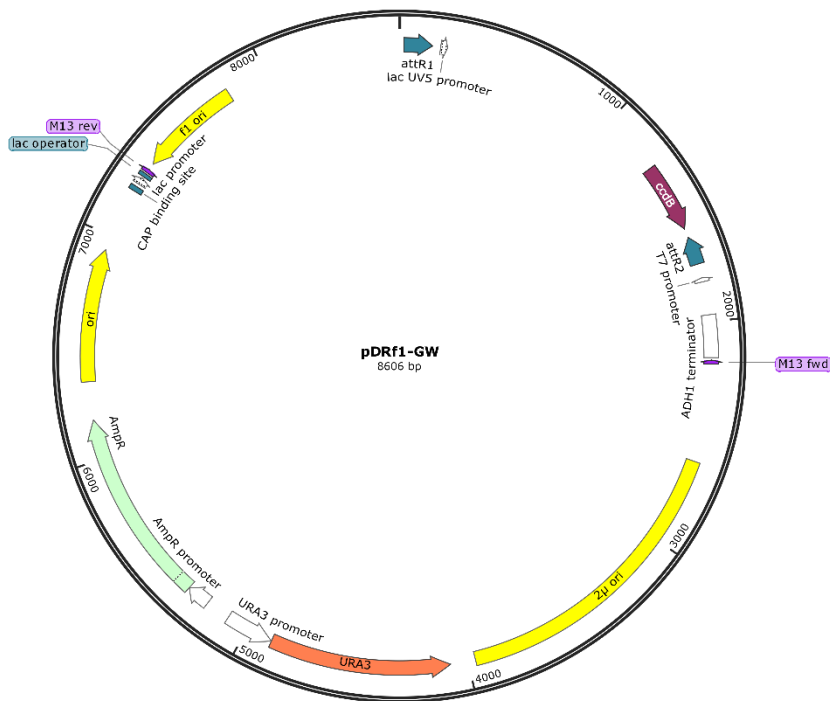
2. Plasmides destinations

a) *Système d'expression bactérien*



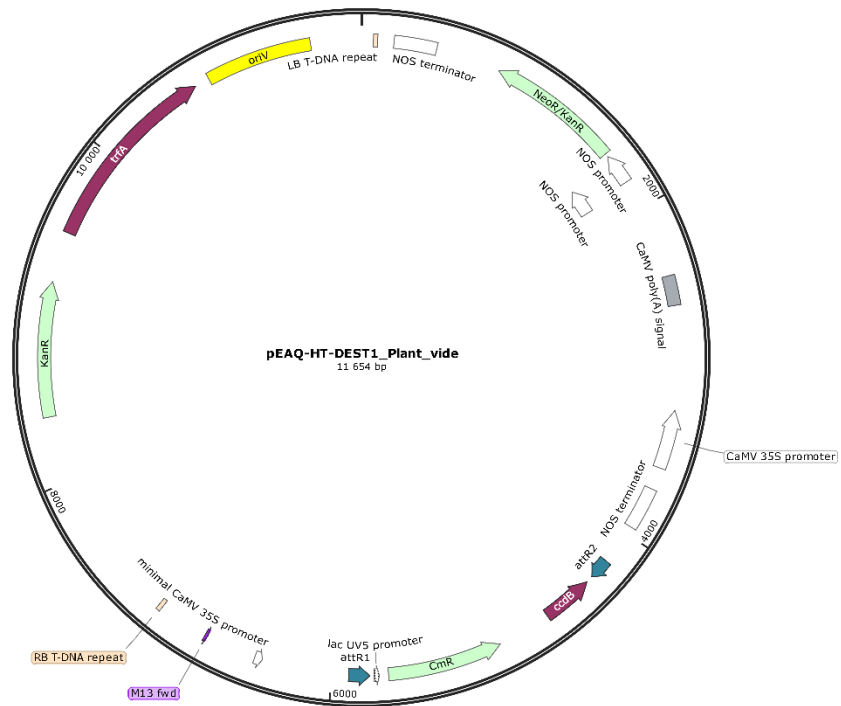


b) *Système d'expression en levure*

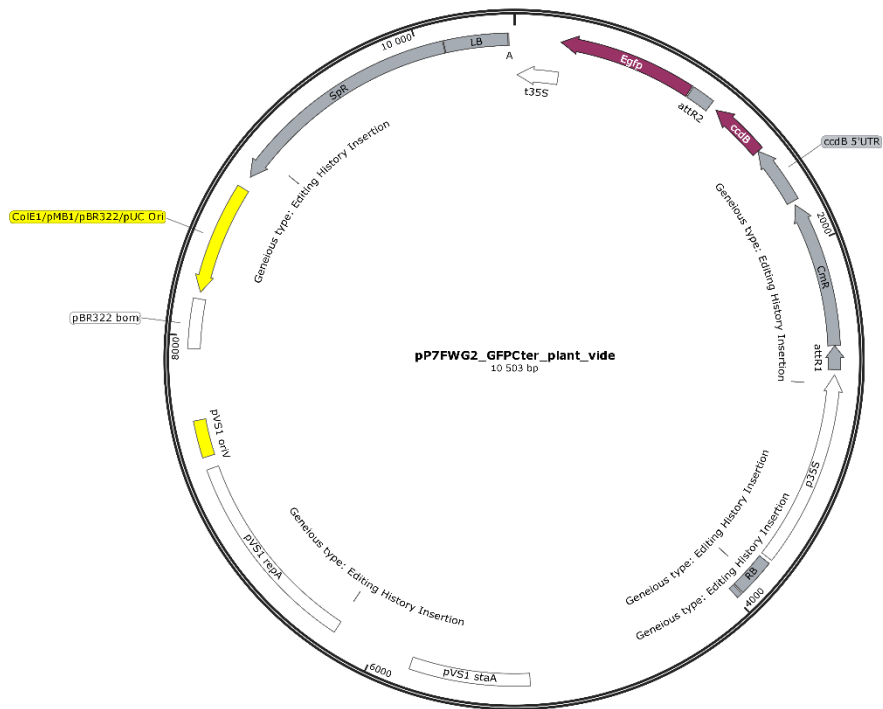


c) *Système d'expression en plante*

Created with SnapGene®



Created with SnapGene®



E. Article scientifique n°4



Identification of Partner Proteins of the Algae *Klebsormidium nitens* NO Synthases: Toward a Better Understanding of NO Signaling in Eukaryotic Photosynthetic Organisms

Pauline Chatelain, Jeremy Astier, David Wendehenne, Claire Rosnoblet and Sylvain Jeandroz*

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Noelia Foresi,
CONICET Mar del Plata, Argentina

Reviewed by:

Mirko Zaffagnini,
University of Bologna, Italy
Koichi Hori,
Tokyo Institute of Technology, Japan

*Correspondence:

Sylvain Jeandroz
sylvain.jeandroz@agrosupdijon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 18 October 2021

Accepted: 30 November 2021

Published: 22 December 2021

Citation:

Chatelain P, Astier J, Wendehenne D,
Rosnoblet C and Jeandroz S (2021)
Identification of Partner Proteins of
the Algae *Klebsormidium nitens* NO
Synthases: Toward a Better
Understanding of NO Signaling in
Eukaryotic Photosynthetic
Organisms.
Front. Plant Sci. 12:797451.
doi: 10.3389/fpls.2021.797451

In animals, NO is synthesized from L-arginine by three isoforms of nitric oxide synthase (NOS) enzyme. NO production and effects have also been reported in plants but the identification of its sources, especially the enzymatic ones, remains one of the critical issues in the field. NOS-like activities have been reported, although there are no homologs of mammalian NOS in the land plant genomes sequenced so far. However, several NOS homologs have been found in algal genomes and transcriptomes. A first study has characterized a functional NOS in the chlorophyte *Ostreococcus tauri* and the presence of NOS homologs was later confirmed in a dozen algae. These results raise the questions of the significance of the presence of NOS and their molecular diversity in algae. We hypothesize that comparisons among protein structures of the two KnNOS, together with the identification of their interacting partner proteins, might allow a better understanding of the molecular diversification and functioning of NOS in different physiological contexts and, more generally, new insights into NO signaling in photosynthetic organisms. We recently identified two NOS homologs sequences in the genome of the streptophyte *Klebsormidium nitens*, a model alga in the study of plant adaptation to terrestrial life. The first sequence, named KnNOS1, contains canonical NOS signatures while the second, named KnNOS2, presents a large C-ter extension including a globin domain. In order to identify putative candidates for KnNOSs partner proteins, we draw the protein-protein interaction networks of the three human NOS using the BioGRID database and hypothesized on the biological role of *K. nitens* orthologs. Some of these conserved partners are known to be involved in mammalian NOSs regulation and functioning. In parallel, our methodological strategy for the identification of partner proteins of KnNOS1 and KnNOS2 by *in vitro* pull-down assay is presented.

Keywords: nitric oxide synthase, algae, NO signaling, protein partners, interactome

INTRODUCTION

Nitric Oxide and Its Biosynthesis

NO is a ubiquitous signaling gaseous molecule which regulates a wide array of physiological, biochemical, and molecular events in animals, plants, and microbes. In mammals, NO is mainly synthesized from L-arginine by three isoforms of nitric oxide synthases (NOSs, EC 1.14.13.39): neuronal NOS (nNOS) or NOS1, inducible NOS (iNOS) or NOS2, and endothelial NOS (eNOS) or NOS3 (Stuehr et al., 2004). Each NOS is a modular enzyme that consists of an N-terminal oxygenase domain and a C-terminal reductase domain, both domains being connected by a short calmodulin binding site (Poulos et al., 1998). In addition to this latter, NOS contains binding sites for NADPH, flavin mononucleotide (FMN), flavin adenine dinucleotide (FAD), tetrahydrobiopterin (BH_4), and a heme group. Functional NOSs are active as homodimer and transfer electrons from NADPH to their heme center via FMN and FAD, where L-arginine is oxidized to L-citrulline and NO (Poulos et al., 1998; Wendehenne et al., 2003). Mechanism for NO catalysis is presented in **Figure 1**. NOS is present in all kingdoms. In metazoans, phylogenetic and syntenic analyses support the view that NOS was recurrently duplicated in different lineages, acquiring new structural configurations through gains and losses of protein motifs (Andreakis et al., 2011).

In plants, NO production and effects have been reported in many physiological processes even if unresolved issue concerns its enzymatic sources (Besson-Bard et al., 2008; Astier et al., 2018; León and Costa-Broseta, 2020). Indeed, we observe a

multiplicity of NO sources, from reductive pathways, to oxidative pathways. Besides nitrite-dependent pathway involving nitrate reductase, NOS-like activities, L-arginine-dependent, and sensitive to mammalian NOS inhibitors, have been reported, although there are no homologs of mammalian NOS in the land plant genomes sequenced so far (Astier et al., 2018).

NO in Algae

Several reports have suggested that algae from different lineages, such as chlorophytes, charophytes, red algae, or diatoms, could produce NO (Mallick et al., 1999, 2000; Sakihama et al., 2002; Tischner et al., 2004; Chung et al., 2008; Vardi et al., 2008; Chow et al., 2013), and a review of the relevant literature indicates that NO is involved in various functions in algae (Kumar et al., 2015; Astier et al., 2021). Briefly, NO contributes to stress responses, particularly to abiotic ones (e.g., hypoxia, wounding, UV or visible light irradiation, chemicals, heat stress, high concentrations of salt, and metal). NO is also involved in cell physiology (development and metabolism) and could participate in greenhouse gas emission through the reduction of NO into N_2O in *Chlamydomonas reinhardtii* (Burlacot et al., 2020). As already described in land plants, NO can interact with other signaling molecules, such as hydrogen peroxide and calcium for effective cellular signaling as exemplified in the marine macroalga *Ulva compressa* during the response to copper stress (González et al., 2012).

NOS-like activity has been detected using NOS inhibitors in various marine algae, such as *Ulva compressa* (Chlorophytes), *Chattonella marina* (Ochrophyta), or *Symbiodinium microadriaticum* (Dinoflagellates; Kumar et al., 2015), raising

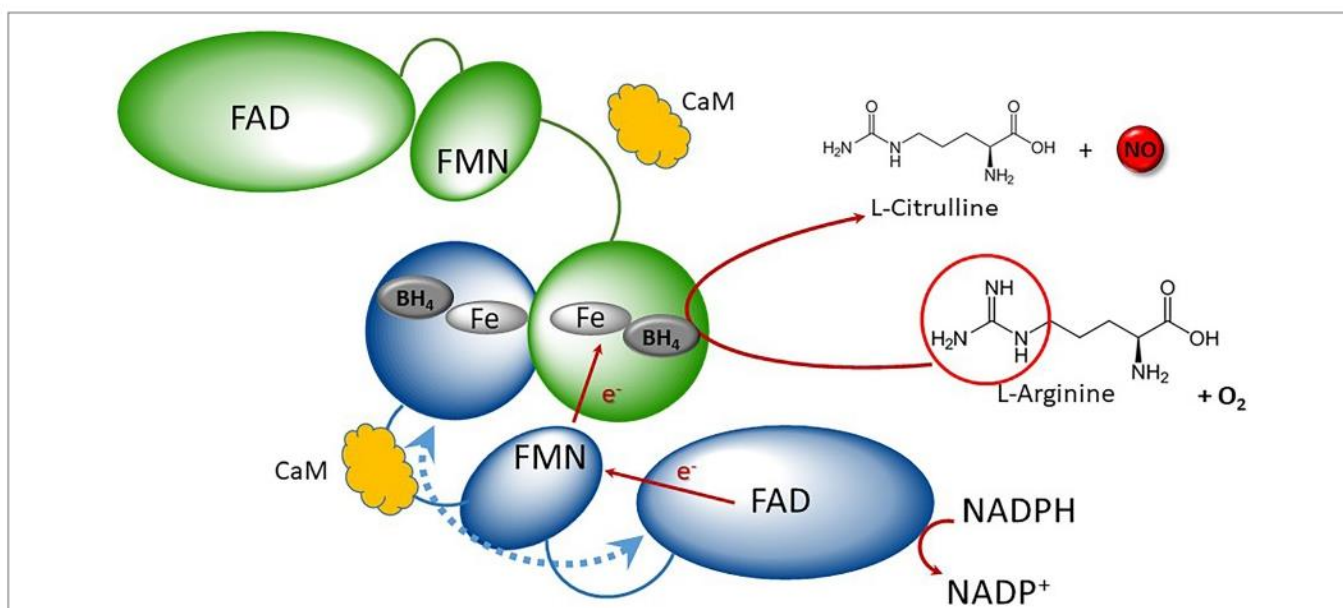


FIGURE 1 | Schematic representation of canonical NOS catalytic mechanism. Canonical NOSs display homodimeric quaternary structure (blue and green monomers). NOS monomers consist of two main domains: the N-terminal oxygenase (round-shaped) and the C-terminal reductase, containing FNR (ellipse) and flavodoxin (small ellipse). They both shelter different redox cofactors: FAD, FMN, heme, and BH_4 . Reductase and oxygenase domains are interconnected by a Calmodulin (CaM, orange cloud)-binding domain. Electrons are purveyed by NADPH and are shuttled to the flavodoxin via the FAD. Upon Cam binding, electron transfer then occurs from the FMN of one monomer (blue) to the heme of the second one (green), resulting to the oxidation of Arginine in presence of oxygen into Citrulline + NO. Adapted from Santoliri (2019).

the question of the presence of NOS. A first study conducted by Foresi et al. (2010) characterized one functional NOS in the chlorophyte *Ostreococcus tauri* (see also Weisslocker-Schaetzel et al., 2017). In the last decade, massive genome and transcriptome sequencing in plants have revealed several NOS homologs in algae (Jeandroz et al., 2016; Santolini et al., 2017). These NOS are distributed in different phylogenetic groups, in the green lineage but also in the more distant diatoms and dinoflagellates. As described in an exhaustive way by Santolini (2019), the diversity of NOS proteins resides not only in the organismal diversity in which these genes/proteins could be found but also in the number and types of NOSs that are present in any organisms. Indeed, besides the “archetypal” or “standard” NOS, firstly defined in mammals, we now have to consider several different groups of NOSs, corresponding to different architectural types of proteins and perhaps different functions.

Taken together, these results raise questions: why did NOS homologs disappear in land plants during evolution? Why NOS homologs remained in algae and what is the meaning of the NOS molecular diversity in photosynthetic organisms? The characterization and functional analyses of these algal NOSs could provide first answers to these questions.

WORKING HYPOTHESIS: NO SYNTHASES INTERACT WITH PARTNER PROTEINS THAT COULD MODULATE THEIR ACTIVITIES AND SPECIFICITIES

Protein–protein interactions (PPI) are the crucial events in cellular signaling mechanisms. In mammals, the three identified NOS isoforms display specific profiles of expression, cellular/subcellular localization, regulation, or catalytic properties. Emerging evidence indicates a role for PPI as a regulator of NOS activity and therefore specificity. For instance, destabilization of the active NOS dimeric structure or preventing its dimerization by PPI leads to its inactivation (Zhou and Zhu, 2009; Cinelli et al., 2020) while NOS activity (NO production) can be optimized by a partner protein which facilitates the delivery of its substrate (Kone, 2000). Moreover, specific interaction of the PDZ N-ter domain with the dystrophin complex is responsible for human NOS1 subcellular distribution (Brenman et al., 1995). PPI are also at the origin of multiple component signaling modules, associating NOS, scaffolding, and S-nitrosated protein. For instance, the NOS2 interaction with the protein PSD95, leading to the regulation of the NMDA receptor by S-nitrosylation, constitutes a noteworthy illustration of the spatiotemporal aspect of NO signaling (Stamler et al., 2001).

We hypothesize that comparisons among protein structures of the NOS, together with the identification of their partner proteins, might allow a better understanding of the molecular diversification and functioning of NOS in different physiological contexts and, more generally, new insights into NO signaling in photosynthetic organisms.

In order to test this hypothesis, we use the charophyte (streptophytes) *Klebsormidium nitens* as a biological model to

investigate these NOSs and their structural and functional diversity. *K. nitens* presents two interests. Firstly, its complete genome sequence has revealed several keys signaling modules, known to interact with NO in land plants (e.g., phytohormones) and required for plant terrestrial adaptation (Hori et al., 2014). Secondly, BLAST searches using OtNOS revealed the presence of two protein sequences showing specific NOS molecular patterns but different architectures (domain organization), which makes it possible to address the question of the structure/activity relationships of NOS.

MOLECULAR DIVERSITY OF KnNO SYNTHASES AND THEIR RELATIVES IN ALGAE

Two Putative KnNOSs Are Found in the *K. nitens* Genome

KnNOS1, The “Standard” Model

This protein of 1099 aa (GAQ81306.1) shares 36% of identity with OtNOS, the first NOS characterized in algae (Foresi et al., 2010). KnNOS1 possesses classical mammalian NOS architecture consisting of oxygenase and reductase domains (**Figure 2A**). Globally, KnNOS1 structure is close to the other NOSs described in green algae (Santolini et al., 2017). Compared to mammalian NOSs, these algal NOSs lack the key conserved residues of the N-ter hook as well as those involved in binding the dihydroxypropyl side chain of BH₄. A structural analysis of the NOS_{oxy} domain shows that algal NOSs conserve the key structural features of mammalian, including the proximal heme ligand Cys, the L-Arg- and BH₄-binding residues, and a modified helical lariat and helical T region that are involved in binding the pterin cofactor and in the interactions between monomers that help stabilize the homodimer (**Figure 2B**). They also possess an atypical putative zinc-binding region (Cys-X3-Cys instead of the typical Cys-X4-Cys; Santolini et al., 2017).

KnNOS2, The “NOS-Globin” Model

we identified in the *K. nitens* genome a second putative NOS sequence showing a large C-ter extension of approximately 380 residues (GAQ90485.1). Conserved protein domain analysis using CD-Search in NCBI (Marchler-Bauer et al., 2011) reveals an ANK motif and a globin domain. The globin domain belongs to the M family globin domain and shows a characteristic α -helical secondary structure with two distal and proximal His residues involved in the coordination of heme-Fe (Vázquez-Limón et al., 2012). The combination of a globin domain to a NOS protein in the C-ter end has already been identified by Santolini (2019) in the green algae *Gonium pectorale* (Chlorophytes; **Figure 3**). Interestingly, we recently identified other NOS proteins showing the chimeric NOS-Globin organization in two other charophytes (*Chlorokybus atmophyticus* and *Mesostigma viride*) and three chlorophytes *Chlamydomonas incerta*, *C. schloesseri* et *Edaphochlamys debaryana* (**Figures 2, 3**). This NOS-Globin organization seems to be evolutionary significant as it appears in three of the six major clades of charophytes, the earliest

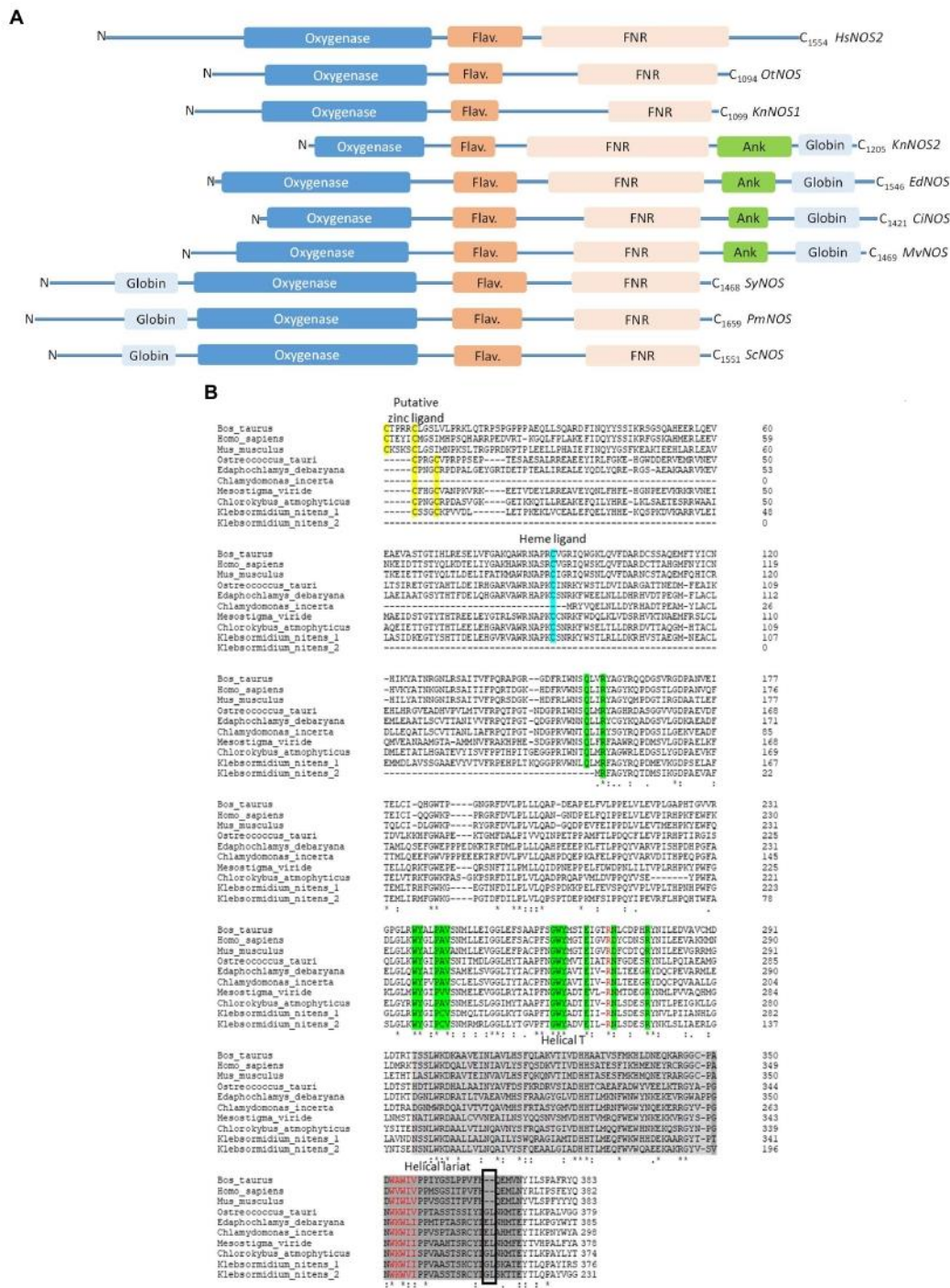


FIGURE 2 | (A) Schematic representation of primary sequences of NOS-like proteins from *Homo sapiens* (*HsNOS2*, AAB60654), *Ostreococcus tauri* (*OtNOS*, OUS45267), *Klebsormidium nitens* (*KnNOS1*, KFL_000760350 at the top and *KnNOS2*, KFL_006460015 at the bottom), *Edaphochlamys debaryana* (*EdNOS*, KAG2495438), *Chlamydomonas incerta* (*CinOS*, KAG2438015), *Mesostigma viride* (*MvNOS*, Mv7497-RA-2, Joint Genome Institute PhytoCosm), *Synechococcus* sp. (*SyNOS*, WP_006458277), *Pseudo-nitzschia multistriata* (*PmNOS*), and *Skeletonema costatum* (*ScNOS*). Three NOSs share a common oxygenase domain (blue). The FMN domain is represented by a dark orange flavodoxin module (Flav.) and the FAD/NADPH domain is represented by a light orange FNR box. Additional domains comprise a globin domain (light blue box), an ankyrin-repeat domain (Ank, green). Conserved domains have been identified thanks to NCBI and domains alignment analyzed through Clustal Omega. **(B)** Comparative analysis of NOS oxygenase domains from *Bos Taurus* (AAA30669.1), *Homo sapiens* (*HsNOS2*, AAB60654), *Mus musculus* (AAA39834.1), *Ostreococcus tauri* (OUS45267), *Edaphochlamys debaryana* (KAG2495438), *Chlamydomonas incerta* (KAG2438015), *Mesostigma viride* (*MvNOS*, Mv7497-RA-2, Joint Genome Institute PhytoCosm), *Chlorokybus atmophyticus* (*CaNOS*, chrsp63S00556, Joint Genome Institute PhytoCosm), and *K. nitens* (1, KFL_000760350 and 2, KFL_006460015). Arginine binding residues are colored in green. The black box highlights the insert observed in the helicalariat of non-mammalian NOSs. Alignment has been performed through Clustal Omega.

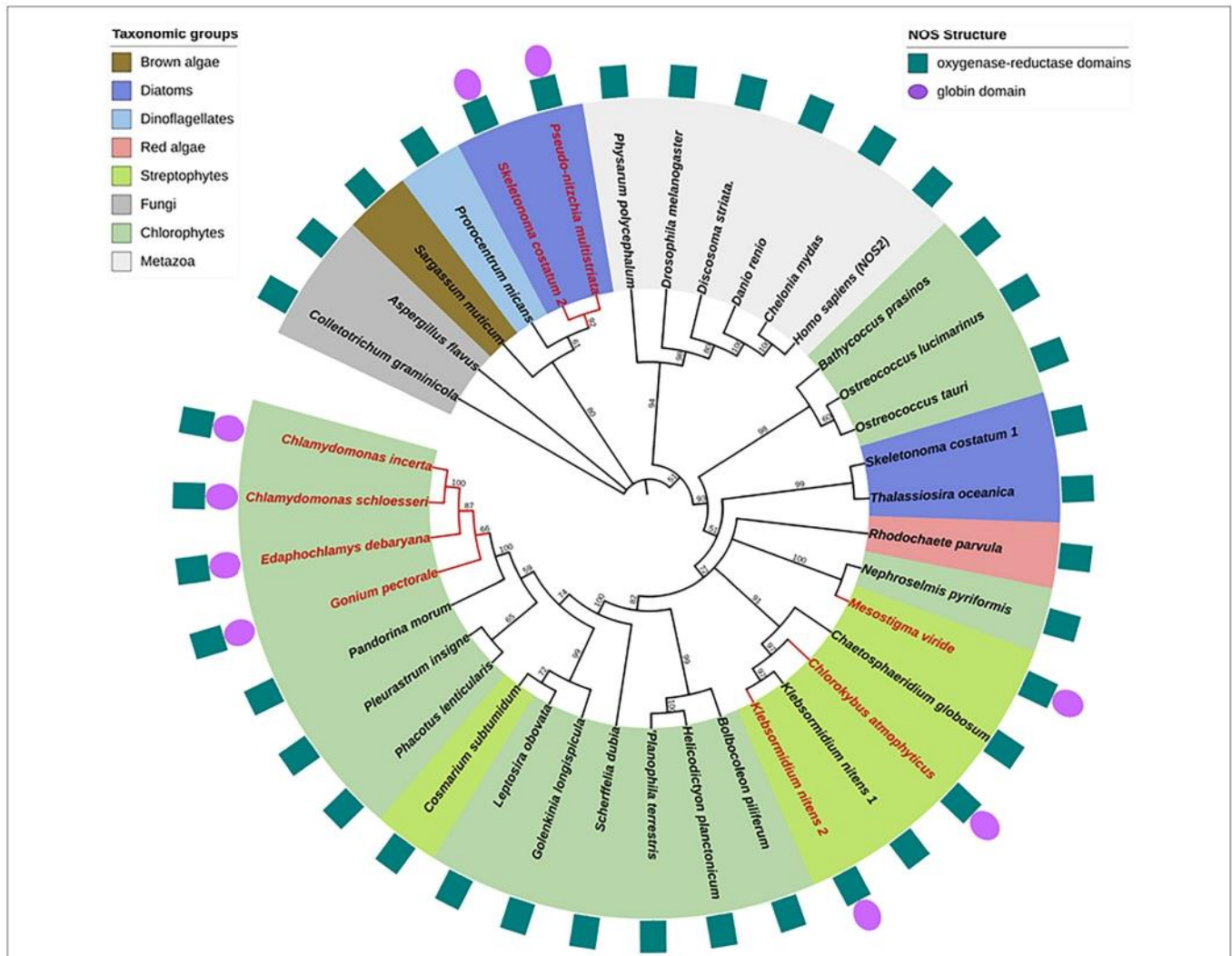


FIGURE 3 | Phylogenetic reconstruction of NOS proteins. Algal NOS sequences were extracted from databases (see Santolini et al., 2017). NOS proteins were aligned with ClustalW and the phylogenetic tree was constructed by maximum likelihood method using MEGA (Tamura et al., 2021). Bootstrap analysis was carried out using 500 replicates. All nodes with bootstrap values less than 50% were collapsed into polytomies. Branches and labels in red indicate chimeric structures. Protein domain organization is depicted around the phylogenetic tree.

diverging lineages of extant streptophytes. Biological functions of these proteins need to be studied to validate their role in algal physiology. The association of globin and NOS domains has been firstly characterized in the free-living marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7335 (Correa-Aragunde et al., 2018), but in this protein, the globin domain is located at the N-ter of the protein (Globin-NOS). Biochemical analysis showed that SyNOS produces NO and NO₃⁻ *in vitro* and data suggest that the globin domain is mainly responsible for NO₃⁻ production (Picciano and Crane, 2019). It is proposed that the globin domain in SyNOS could confer new functional capabilities for N metabolism (Correa-Aragunde et al., 2018). Interestingly, chimeric globin-NOSs similar to SyNOS appear in some diatom genomes, such as *Pseudo-nitzschia multistriata* (PmNOS) and *Skeletonema costatum* (ScNOS; Di Dato et al., 2015; Figure 2A).

Phylogenetic Diversity of NO Synthases in Photosynthetic Organisms

As previously reported, algal NOSs are unequally distributed in the photosynthetic organism phylogeny (Jeandroz et al., 2016; Santolini et al., 2017). They were found in the green lineage (streptophytes and chlorophytes) but also in red algae, diatoms, dinoflagellates, and brown algae (Figure 3). Several discrepancies between the standard plant phylogeny and the one deduced from NOS proteins are noticed, indicating duplication/loss events or horizontal gene transfers along NOS gene evolution and consequently putative functional homoplasy. For examples, chlorophytes NOSs are not grouped together and the green lineage (streptophytes and chlorophytes) is not, contrary to plant phylogeny, a monophyletic group since several diatoms and red algae NOS belong to the same clade. Interestingly, both KnNOSs are grouped

together, and KnNOS2 is not related to other NOS-Globin found in *E. debaryana* and in the two *Chlamydomonas* species. This indicates that the NOS-globin chimeric organization, found in seven species, could have independent origins. The Globin-NOS organization, firstly characterized in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7335, is restricted to the two diatoms *P. multistriata* and *S. costatum*. Noticeably, this latter species harbors a second NOS, with a classical organization, which is distantly related from the NOS-Globin in the phylogenetic tree.

PUTATIVE NO SIGNALING ACTORS IN *K. nitens* GENOME SEQUENCE

In mammals, the biological effects of NO are mediated notably via a NO/cGMP depending cascade which requires the mobilization of soluble guanylyl cyclases (sGCs), cGMP, cGMP-dependent protein kinases (PKGs), and cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs; Martínez-Ruiz et al., 2011). We recently investigated the presence of these major NO-signaling cascade components in the green lineage (Astier et al., 2019). None of the +1000 species tested harbored all the required enzymes necessary for the classical NO/cGMP depending cascade. However, a few homologs of soluble guanylate cyclases, cGMP-dependent protein kinases, cyclic nucleotide-gated channels, and cGMP-regulated PDEs were identified punctually in some of the organisms tested, mainly algae.

Interestingly, among the candidates identified, some were further characterized, such as the sGCs CYG12, CYG56, and CYG11 from *C. reinhardtii*. CYG12 protein shares 40 to 50% identity with animal GCs and an initial structural analysis demonstrated that its conformation allows a functional cyclase activity (Winger et al., 2008). Recently, the enzyme was demonstrated to be functional and to participate in hypoxia responses in *C. reinhardtii* (Düner et al., 2018). Interestingly, NO is also involved in hypoxia responses (Gupta et al., 2020; Manrique-Gil et al., 2021). However, *in vitro* approaches using NO donors on the recombinant protein failed to demonstrate an increase of the enzymatic activity (Düner et al., 2018). Therefore, *in vivo* approaches are required to further confirm or invalidate the involvement of CYG12 in a NO/cGMP signaling cascade. Another guanylate cyclase, CYG56, was found to be involved in the regulation of nitrate assimilation, through its participation in the NO/cGMP-dependent signaling cascade mediating nitrate reductase repression induced by ammonium (de Montaigu et al., 2010). However, similarly to CYG12, CYG56 cyclase activity did not show NO sensitivity *in vitro*. Concerning CYG11, the protein displays unique features as compared to other described eukaryotic guanylate cyclases (Horst et al., 2019). Structurally, this enzyme possesses two HNOX domains and is active as a homodimer. Interestingly, its activity is increased upon carbon monoxide (CO) exposure, rather than NO exposure. Based on its enzymatic parameters, CO may represent the physiological ligand of CYG11, making this enzyme a CO-sensing protein in *C. reinhardtii*, although the confirmation of this hypothesis will require further investigations. The characterization of these three guanylate cyclases demonstrates the importance

of cGMP-dependent signaling in algae, although a direct link with NO-dependent signaling remains to be clearly established.

The first proper biochemical characterization of a plant cGMP/cAMP-dependent protein kinase was only reported recently in rice (Shen et al., 2019). Presenting atypical features compared to animal ones, notably the coexistence of a phosphatase and a kinase domain within the sequence, this PKG was found to be involved in gibberellin (GA) signaling and salt stress responses, two pathways where NO acts as a signaling molecule. Nevertheless, the corresponding molecular actors, particularly those related to NO and cGMP synthesis, remain to be identified to confirm the existence of a GA/NO/cGMP signaling cascade in rice. Interestingly, homologs of this rice PKG are generally present in single copy and well distributed among the green lineage, in algae and land plants. Concerning the cGMP turnover, the presence of PDEs related to NO signaling in the green lineage is yet to be demonstrated. A unique description of a putative class I PDE has been reported in *C. reinhardtii* (Gross and Durner, 2016), but its activity is yet to be characterized. Additionally, the first functional cGMP-activated PDE from plants was recently described in *Arabidopsis thaliana* (Isner et al., 2019). However, here again, no information about the NO-dependency of this protein activity, related to UV-A responses, has been reported.

Similarly, the relation between NO and CNGCs is not fully elucidated in plants. Out of our bioinformatic analyses, no NO-signaling-related CNGC homologs were found in the green lineage (Astier et al., 2019). Accordingly, no regulation of plant or algae CNGCs by NO-dependent mechanisms has been reported so far.

A closer search on the putative NO-signaling modules that can be found in *K. nitens* revealed the presence of some candidates. If no homologs of animal type NO-dependent sGC of CNGCs could be retrieved, the search for protein homologs of the putative CrPDE (XP_001689825.1) and rice PKG (Q6K3D4_ORY5), with a minimum of 30% identity on 60% of the query length, leads to the identification of, respectively, 3 (GAQ77586.1, GAQ86043.1, and GAQ84593.1) and 1 (GAQ83023.1) candidates. The determination of their respective roles in *K. nitens* together with their potential link with NO signaling and KnNOSs activities constitutes a promising axis of investigation.

IDENTIFICATION AND ROLE OF NOSs INTERACTING PARTNER PROTEINS

In order to identify putative candidates for putative KnNOSs partner proteins, we first draw the PPI network of the three human NOS isoforms using the BioGRID database, which congregates PPI data based on experimental approaches (Figure 4). This network reconstruction indicates specific interactions between each of the three isoforms with privileged partners. NOS2 presents the largest numbers of interactors with 175 nodes, compared to NOS1 and NOS3 with 16 and 46 nodes, respectively. Some partners interact with more than one human NOS and allow the interconnection of the three subnetworks. Each of the three NOS interacts with itself, as suggested by the active dimeric form of NOS (Venema et al., 1997).

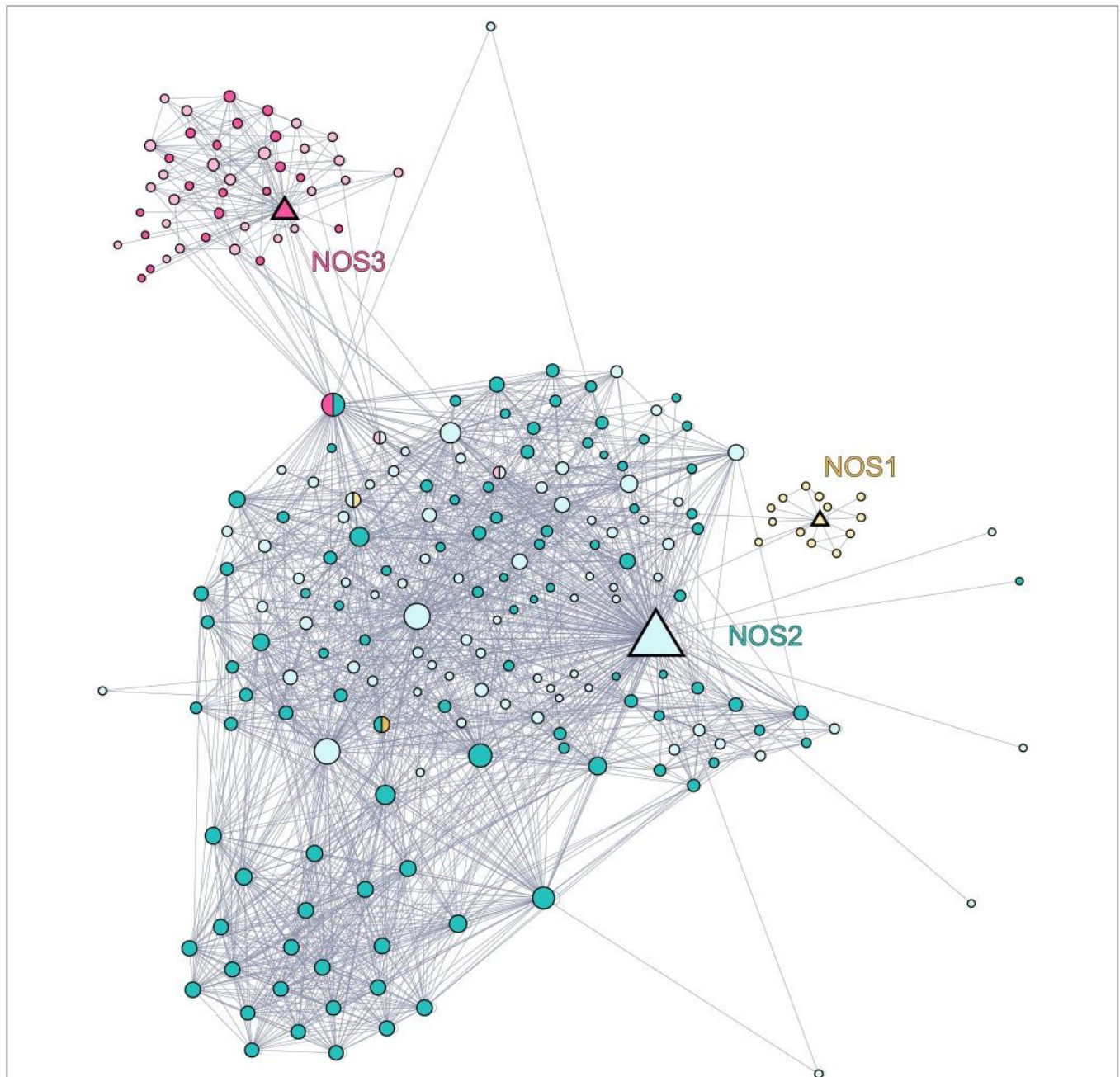


FIGURE 4 | Network of the protein-protein interaction network of human NOS1 (neuronal NOS; P29475), NOS2 (inducible NOS; P35228), and NOS3 (endothelial NOS; P29474). Data were downloaded from the BioGRID database and graphical representation was carried out using Gephi software. Each node represents a protein, and the size of the nodes is proportional to the number of connections with other nodes. The links between nodes represent physical interactions between proteins. The triangle-shaped nodes represent the three NOSs, yellow for NOS1, blue for NOS2, and red for NOS3. The circles-shaped nodes represented in blue are partners of NOS2, those in red are partners of NOS3, and those in yellow are partners of NOS1. Nodes represented in pastel shade do not have orthologs in *K. nitens* while those in dark colors are conserved in *K. nitens*.

Starting from this confirmed NOS interacting protein list identified in humans, we then look for the presence of their orthologs in *K. nitens*. We developed an *in silico* approach using OrthoFinder, a powerful tool which allows whole-genome comparisons (Emms and Kelly, 2019). Among partner proteins of human NOS1, NOS2, and NOS3, 6.25,

58.3, and 45.8% are conserved in the proteome of *K. nitens*, respectively. These conserved proteins are represented in dark shades in PPI network (**Figure 4**). Since orthologous proteins are more likely to share the same function, we are able to hypothesize on the biological role of *K. nitens* orthologs (Emms and Kelly, 2015). Some of these conserved

partners are known to be involved in mammalian NOSs regulation and functioning. Several interesting candidates were identified and detailed below.

Control of NOS Activity: The Role of HSP90 and Actin

NOS activity can be enhanced by formation of a ternary complex with HSP90 and globular β -actin (Table 1). Firstly, HSP90 binds to NOS which results in an increase in NOS activity as well as an increase in affinity for β -actin. Secondly, binding of β -actin results in an increase of HSP90 degradation, and in the dissociation of the ternary complex, thus limiting the time in which NOS3 is active. This mechanism increases the production of NO when the globular form of β -actin is favored over the fibrillar form while maintaining a negative feedback (Ji et al., 2007).

Proteasomal Degradation of NOS: The Role of STUB1, Elongin C, ADRM1, and UCH37

Binding of partners with NOS could trigger the proteasomal degradation of the relevant NOS isoform and could constitute another level of regulation (Table 1). For example, in human cells, it has been shown that STUB1, via its ubiquitin ligase activity triggers the degradation of NOS1 by ubiquitinating the calmodulin binding site (Clapp et al., 2012). A similar mechanism has been described for Elongin C which interacts and ubiquitinylates NOS2. This ubiquitin motif is then recognized by the 19S proteasome subunit ADRM1, followed by the recruitment of UCH37, leading to proteasomal degradation of NOS2 (Mazumdar et al., 2010; Nishiya et al., 2011).

Changes of NOSs Intracellular Distribution: The Role of Rac2 and NOSIP

Isoform-specific regulators of NOS intracellular distribution have been identified (Table 1). In the case of NOS2, interaction with Rac2 during inflammatory response leads to an increase of NOS activity through spatial redistribution within the cell (Kuncewicz et al., 2001). In the case of NOS3, the binding of NOSIP in C-terminal domain negatively modulates NOS

activity by uncoupling NOS3 from plasma membrane caveolae (Dedio et al., 2001).

Thereby, our preliminary *in silico* approach highlights the promising presence of two NOSs and putative numerous NOS interacting partners in the genome of *K. nitens*. We hypothesize that these enzymes would participate in a complex signaling networks, as the ones described in animals, and we seek to determine its specificities and roles.

Identification and Functional Analysis of KnNOS Partner Proteins

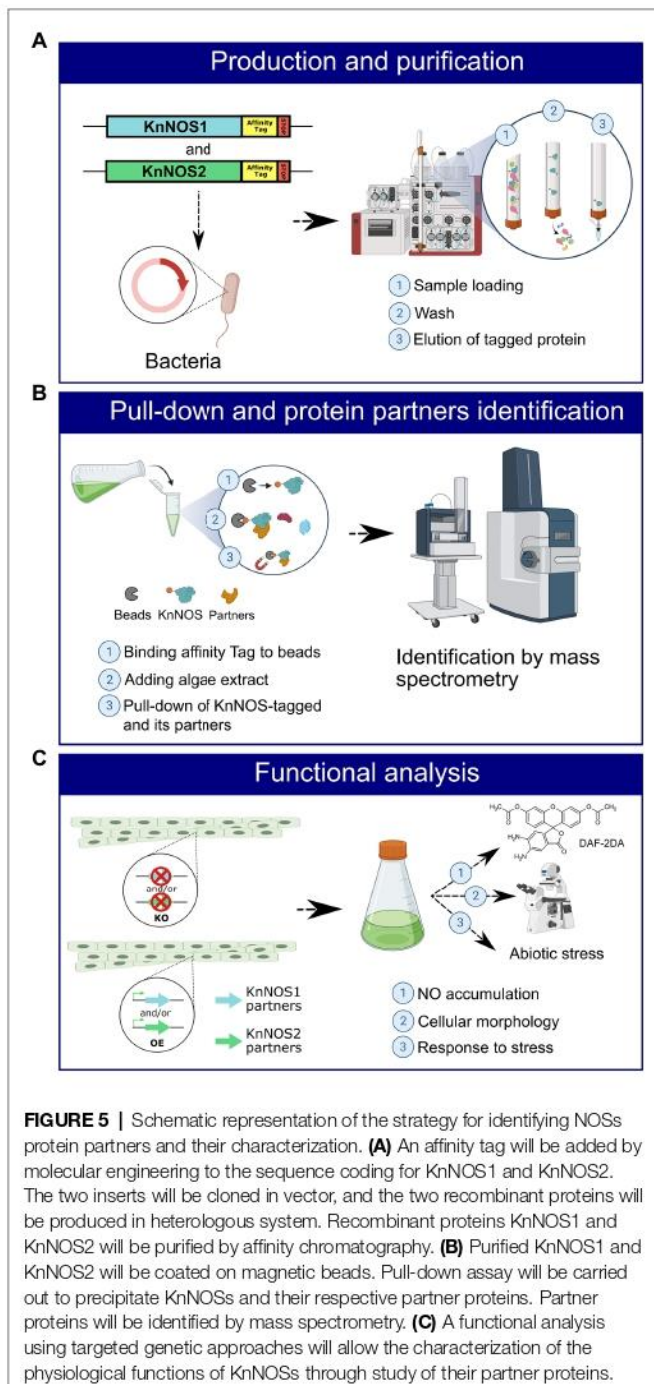
Our methodological strategy for the identification of partner proteins is presented in Figure 5.

The first step will be to produce KnNOS1 and KnNOS2 proteins in heterologous bacterial system (Figure 5A). Once the two tagged recombinant proteins produced by bacteria, purified and then fixed on beads by affinity for the tag, *in vitro* pull-downs will be carried out through incubations with native extracts of algae proteins. Partners pulled-down through tagged KnNOSs will be then identified by nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis (Figure 5B). Negative control will be performed using protein extracts incubated with the tag alone fixed on beads. The list of identified protein partners will be compared to the one obtained with the *in silico* analysis in order to choose the most promising candidates.

The second step will be a functional analysis of the protein partners. It will consist in genetic approaches implying the generation of knock-out and overexpressing *K. nitens* mutant lines for several candidate partners (Figure 5C). Different methods of transformation could be tested. The electroporation method is operational in several algal strains and particularly in charophytes (Kawai et al., 2021). If unsuccessful, we will test an *Agrobacterium tumefaciens*-based approach. This latter was efficiently adapted for transformation of microalgae (Doron et al., 2016). The functional consequences of these mutations will be based on the analysis of (1) NO production by fluorimetry with DAF-2DA, (2) cellular morphology by microscopy, and (3) algae responses to abiotic stress.

TABLE 1 | List of human NOSs partners identified from the BioGRID database and their orthologs in *Klebsormidium nitens* genome.

Hs protein		Ortholog in Kn		Interaction with	Action on HsNOSs
Name	UniProtKB accession	Name	UniProtKB accession		
HSP90	P07900	HSP	A0A1Y1HY34	NOS2/NOS3	Increase activity
		HSP	A0A1Y1HT80		
		HtpG	A0A1Y1HL34		
β -actin	P60709	Actin	A0A1Y1IK53	NOS3	Negative feedback
STUB1	Q9UNE7	STUB1	A0A0U9HIG1	NOS1/NOS2	Proteasomal degradation
Elongin C	Q15369	Elongin C	A0A1Y1IDM0	NOS2	Proteasomal degradation
ADRM1	Q16186	Rpn13	A0A1Y1HR80	NOS2	Proteasomal degradation
UCH37	Q9Y5K5	UCH	A0A1Y1HNS5	NOS2	Proteasomal degradation
Rac2	P15153	Ras	A0A1Y1IHY9	NOS2	Cellular distribution
NOSIP	Q9Y314	RING	A0A1Y1HYP3	NOS3	Cellular distribution



REFERENCES

- Andreakis, N., D'Aniello, S., Albalat, R., Patti, F. P., Garcia-Fernández, J., Procaccini, G., et al. (2011). Evolution of the nitric oxide synthase family in metazoans. *Mol. Biol. Evol.* 28, 163–179. doi: 10.1093/molbev/msq179
- Astier, J., Gross, I., and Durner, J. (2018). Nitric oxide production in plants: an update. *J. Exp. Bot.* 69, 3401–3411. doi: 10.1093/jxb/erx420
- Astier, J., Mounier, A., Santolini, J., Jeandroz, S., and Wendehenne, D. (2019). The evolution of nitric oxide signalling diverges between animal and green lineages. *J. Exp. Bot.* 70, 4355–4364. doi: 10.1093/jxb/erz088

CONCLUSION

The discovery of two NOS isoforms in the *K. nitens* genome confirms the already observed molecular diversity of these proteins, illustrated by intra-domain amino-acid polymorphisms as well as recombination of protein domains. This diversity reflects the complex evolution of NO signaling in photosynthetic organisms. A first analysis, conducted *in silico*, has confirmed the presence of putative partner proteins of NOS in the *K. nitens* genome. Now, the use of *in vitro* assays followed by functional characterization of candidate proteins, in different physiological contexts, will certainly help us to improve our understanding on NOSs regulation and their roles in algae.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, and further inquiries can be directed to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PC, JA, and SJ conducted the *in silico* analyses. SJ, CR, and DW conceived the study. All authors wrote and edited the manuscript.

FUNDING

Work in our lab is currently supported by the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, Investissements d'Avenir program, project ISITE-BFC NOISELESS (contract ANR-15-IDEX-0003; grant NOISELESS-RA18041.AEC.IS) and the Agence Nationale de la Recherche, project ALGAE-NOS (grant ANR-18-CE20-0022-02).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Arnaud Mounier for helping on OrthoFinder analysis.

- Astier, J., Rossi, J., Chatelain, P., Klinguer, A., Besson-Bard, A., Rosnoblet, C., et al. (2021). Nitric oxide production and signalling in algae. *J. Exp. Bot.* 72, 781–792. doi: 10.1093/jxb/eraa421
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 21–39. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092830
- Brennan, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D. S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743–752. doi: 10.1016/0092-8674(95)90471-9

- Burlacot, A., Richaud, P., Gosset, A., Li-Beisson, Y., and Peltier, G. (2020). Algal photosynthesis converts nitric oxide into nitrous oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 2704–2709. doi: 10.1073/pnas.1915276117
- Chow, F., Pedersen, M., and Oliveira, M. C. (2013). Modulation of nitrate reductase activity by photosynthetic electron transport chain and nitric oxide balance in the red macroalga *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.* 25, 1847–1853. doi: 10.1007/s10811-013-0005-8
- Chung, C.-C., Hwang, S.-P. L., and Chang, J. (2008). Nitric oxide as a signaling factor to upregulate the death-specific protein in a marine diatom, *Skeletonema costatum*, during blockage of electron flow in photosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6521–6527. doi: 10.1128/AEM.01481-08
- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P., and Silverman, R. B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. *Med. Res. Rev.* 40, 158–189. doi: 10.1002/med.21599
- Clapp, K. M., Peng, H.-M., Jenkins, G. J., Ford, M. J., Morishima, Y., Lau, M., et al. (2012). Ubiquitination of neuronal nitric-oxide synthase in the Calmodulin-binding site triggers proteasomal degradation of the protein. *J. Biol. Chem.* 287, 42601–42610. doi: 10.1074/jbc.M112.412494
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., Del Castello, F., and Lamattina, L. (2018). A singular nitric oxide synthase with a globin domain found in *Synechococcus* PCC 7335 mobilizes N from arginine to nitrate. *Sci. Rep.* 8:12505. doi: 10.1038/s41598-018-30889-6
- de Montaigu, A., Sanz-Luque, E., Galván, A., and Fernández, E. (2010). A soluble Guanylate Cyclase mediates negative signaling by ammonium on expression of nitrate Reductase in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* 22, 1532–1548. doi: 10.1105/tpc.108.062380
- Dedio, J., König, P., Wohlfart, P., Schroeder, C., Kummer, W., and Müller-Esterl, W. (2001). NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J.* 15, 79–89. doi: 10.1096/fj.00-0078com
- Di Dato, V., Musacchia, F., Petrosino, G., Patil, S., Montresor, M., Sanges, R., et al. (2015). Transcriptome sequencing of three pseudo-nitzschia species reveals comparable gene sets and the presence of nitric oxide synthase genes in diatoms. *Sci. Rep.* 5:12329. doi: 10.1038/srep12329
- Doron, L., Segal, N., and Shapira, M. (2016). Transgene expression in microalgae—From tools to applications. *Front. Plant Sci.* 7:505. doi: 10.3389/fpls.2016.00505
- Düner, M., Lambert, J., Mügge, C., and Hemschemeier, A. (2018). The soluble guanylate cyclase CYG12 is required for the acclimation to hypoxia and trophic regimes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 93, 311–337. doi: 10.1111/tj.13779
- Emms, D. M., and Kelly, S. (2015). OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biol.* 16:157. doi: 10.1186/s13059-015-0721-2
- Emms, D. M., and Kelly, S. (2019). OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. *Genome Biol.* 20, 238. doi: 10.1186/s13059-019-1832-y
- Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Caló, G., Salerno, G., and 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. doi: 10.1105/tpc.109.073510
- González, A., Cabrera, M., de Los, Á., Henríquez, M. J., Contreras, R. A., Morales, B., et al. (2012). Cross talk among calcium, hydrogen peroxide, and nitric oxide and activation of gene expression involving Calmodulins and calcium-dependent protein kinases in *Ulva compressa* exposed to copper excess. *Plant Physiol.* 158, 1451–1462. doi: 10.1104/pp.111.191759
- Gross, I., and Durner, J. (2016). In search of enzymes with a role in 3', 5'-cyclic Guanosine monophosphate metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* 7:576. doi: 10.3389/fpls.2016.00576
- Gupta, K. J., Kolbert, Z., Durner, J., Lindermayr, C., Corpas, F. J., Brouquisse, R., et al. (2020). Regulating the regulator: nitric oxide control of post-translational modifications. *New Phytol.* 227, 1319–1325. doi: 10.1111/nph.16622
- Hori, K., Maruyama, F., Fujisawa, T., Togashi, T., Yamamoto, N., Seo, M., et al. (2014). *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Comm.* 5, 3978–3979. doi: 10.1038/ncomms4978
- Horst, B. G., Stewart, E. M., Nazarian, A. A., and Marletta, M. A. (2019). Characterization of a carbon monoxide-activated soluble Guanylate Cyclase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* 58, 2250–2259. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00190
- Isner, J.-C., Olteanu, V.-A., Hetherington, A. J., Coupel-Ledru, A., Sun, P., Pridgeon, A. J., et al. (2019). Short- and long-term effects of UVA on Arabidopsis are mediated by a novel cGMP Phosphodiesterase. *Curr. Biol.* 29, 2580–2585. doi: 10.1016/j.cub.2019.06.071
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D. J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., et al. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* 9:re2. doi: 10.1126/scisignal.aad4403
- Ji, Y., Ferracci, G., Warley, A., Ward, M., Leung, K.-Y., Samsuddin, S., et al. (2007). Beta-actin regulates platelet nitric oxide synthase 3 activity through interaction with heat shock protein 90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8839–8844. doi: 10.1073/pnas.0611416104
- Kawai, J., Kanazawa, M., Suzuki, R., Kikuchi, N., Hayakawa, Y., and Sekimoto, H. (2021). Highly efficient transformation of the model zygematophycean alga *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex by square-pulse electroporation. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.17763 [Epub Ahead of Print]
- Kone, B. C. (2000). Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases: protein interaction with NOS isoforms. *Acta Physiol. Scand.* 168, 27–31. doi: 10.1046/j.1365-201x.2000.00629.x
- Kumar, A., Castellano, I., Patti, F. P., Palumbo, A., and Buia, M. C. (2015). Nitric oxide in marine photosynthetic organisms. *Nitric Oxide* 47, 34–39. doi: 10.1016/j.niox.2015.03.001
- Kuncewicz, T., Balakrishnan, P., Snuggs, M. B., and Kone, B. C. (2001). Specific association of nitric oxide synthase-2 with Rac isoforms in activated murine macrophages. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 281, F326–F336. doi: 10.1152/ajprenal.2001.281.2.F326
- León, J., and Costa-Broseta, Á. (2020). Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. *Plant Cell Environ.* 43, 1–15. doi: 10.1111/pce.13617
- Mallick, N., Mohn, F.-H., Rai, L., and Soeder, C.-J. (2000). Impact of physiological stresses on nitric oxide formation by green alga, *Scenedesmus obliquus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 300–306.
- Mallick, N., Rai, L. C., Mohn, F. H., and Soeder, C. J. (1999). Studies on nitric oxide (NO) formation by the green alga *Scenedesmus obliquus* and the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena Doliolum*. *Chemosphere* 39, 1601–1610. doi: 10.1016/S0045-6535(99)00058-2
- Manrique-Gil, I., Sánchez-Vicente, I., Torres-Quezada, I., and Lorenzo, O. (2021). Nitric oxide function during oxygen deprivation in physiological and stress processes. *J. Exp. Bot.* 72, 904–916. doi: 10.1093/jxb/eraa442
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., et al. (2011). CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39, D225–D229. doi: 10.1093/nar/gkq1189
- Martínez-Ruiz, A., Cadenas, S., and Lamas, S. (2011). Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 17–29. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.010
- Mazumdar, T., Gorgun, F. M., Sha, Y., Tyryshkin, A., Zeng, S., Hartmann-Petersen, R., et al. (2010). Regulation of NF- κ B activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13854–13859. doi: 10.1073/pnas.0913495107
- Nishiya, T., Matsumoto, K., Maekawa, S., Kajita, E., Horinouchi, T., Fujimuro, M., et al. (2011). Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 9009–9019. doi: 10.1074/jbc.M110.190678
- Picciano, A. L., and Crane, B. R. (2019). A nitric oxide synthase-like protein from *Synechococcus* produces NO/NO₃– from L-arginine and NAPDH in a tetrahydrobiopterin- and Ca²⁺-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 294, 10708–10719. doi: 10.1074/jbc.RA119.008399
- Poulos, T. L., Raman, C., and Li, H. (1998). NO news is good news. *Structure* 6, 255–258. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00028-8
- Sakihama, Y., Nakamura, S., and Yamasaki, H. (2002). Nitric oxide production mediated by nitrate Reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* 43, 290–297. doi: 10.1093/pcp/pcf034
- Santolini, J. (2019). What does “NO-synthase” stand for. *Front. Biosci.* 24, 133–171. doi: 10.2741/4711
- Santolini, J., André, F., Jeandroz, S., and Wendehenne, D. (2017). Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? *Nitric Oxide* 63, 30–38. doi: 10.1016/j.niox.2016.09.005

- Shen, Q., Zhan, X., Yang, P., Li, J., Chen, J., Tang, B., et al. (2019). Dual activities of plant cGMP-dependent protein kinase and its roles in gibberellin signaling and salt stress. *Plant Cell* 31, 3073–3091. doi: 10.1105/tpc.19.00510
- Stamler, J. S., Lamas, S., and Fang, F. C. (2001). Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675–683. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00495-0
- Stuehr, D. J., Santolini, J., Wang, Z.-Q., Wei, C.-C., and Adak, S. (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. *J. Biol. Chem.* 279, 36167–36170. doi: 10.1074/jbc.R400017200
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 38, 3022–3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
- Tischner, R., Planchet, E., and Kaiser, W. M. (2004). Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett.* 576, 151–155. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.004
- Vardi, A., Bidle, K. D., Kwityn, C., Hirsh, D. J., Thompson, S. M., Callow, J. A., et al. (2008). A diatom gene regulating nitric-oxide signaling and susceptibility to diatom-derived aldehydes. *Curr. Biol.* 18, 895–899. doi: 10.1016/j.cub.2008.05.037
- Vázquez-Limón, C., Hoogewijs, D., Vinogradov, S. N., and Arredondo-Peter, R. (2012). The evolution of land plant hemoglobins. *Plant Sci.* 191, 71–81. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.04.013
- Venema, R. C., Ju, H., Zou, R., Ryan, J. W., and Venema, V. J. (1997). Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase: Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J. Biol. Chem.* 272, 1276–1282. doi: 10.1074/jbc.272.2.1276
- Weisslocker-Schaetzl, M., André, F., Touazi, N., Foresi, N., Lembrouk, M., Dorlet, P., et al. (2017). The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme. *Plant Sci.* 265, 100–111. doi: 10.1016/j.plantsci.2017.09.019
- Wendehenne, D., Lamotte, O., and Pugin, A. (2003). Plant iNOS: conquest of the holy grail. *Trends Plant Sci.* 8, 465–468. doi: 10.1016/j.tplants.2003.09.003
- Winger, J. A., Derbyshire, E. R., Lamers, M. H., Marletta, M. A., and Kuriyan, J. (2008). The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase. *BMC Struct. Biol.* 8:42. doi: 10.1186/1472-6807-8-42
- Zhou, L., and Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20, 223–230. doi: 10.1016/j.niox.2009.03.001
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Chatelain, Astier, Wendehenne, Rosnoblet and Jeandroz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

RÉFÉRENCES

- Adak S, Aulak KS, Stuehr DJ.** 2002a. Direct Evidence for Nitric Oxide Production by a Nitric-oxide Synthase-like Protein from *Bacillus subtilis**. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 16167–16171.
- Adak S, Bilwes AM, Panda K, Hosfield D, Aulak KS, McDonald JF, Tainer JA, Getzoff ED, Crane BR, Stuehr DJ.** 2002b. Cloning, expression, and characterization of a nitric oxide synthase protein from *Deinococcus radiodurans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 107–112.
- Adak S, Ghosh S, Abu-Soud HM, Stuehr DJ.** 1999. Role of Reductase Domain Cluster 1 Acidic Residues in Neuronal Nitric-oxide Synthase: CHARACTERIZATION OF THE FMN-FREE ENZYME. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22313–22320.
- Agarwal P, Khurana P.** 2018. Characterization of a novel zinc finger transcription factor (TaZnF) from wheat conferring heat stress tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Stress and Chaperones* **23**, 253–267.
- Aimé S, Hichami S, Wendehenne D, Lamotte O.** 2018. Analysis of Recombinant Protein S-Nitrosylation Using the Biotin-Switch Technique. In: Mengel A,, In: Lindermayr C, eds. *Methods in Molecular Biology. Nitric Oxide: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer, 131–141.
- Alves GSC, Torres LF, Déchamp E, Breitler J-C, Joët T, Gatineau F, Andrade AC, Bertrand B, Marraccini P, Etienne H.** 2017. Differential fine-tuning of gene expression regulation in coffee leaves by CcDREB1D promoter haplotypes under water deficit. *Journal of Experimental Botany* **68**, 3017–3031.
- Andersen RA (Ed.).** 2005. *Algal culturing techniques*. Burlington, Mass: Elsevier/Academic Press.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF.** 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research* **64**, 5245–5250.
- Andreakis N, D’Aniello S, Albalat R, Patti FP, Garcia-Fernández J, Procaccini G, Sordino P, Palumbo A.** 2011. Evolution of the Nitric Oxide Synthase Family in Metazoans. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 163–179.
- Annona G, Sato I, Pascual-Anaya J, et al.** 2022. Evolution of the nitric oxide synthase family in vertebrates and novel insights in gill development. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **289**, 20220667.
- Arnett DC, Bailey SK, Johnson CK.** 2018. Exploring the conformations of nitric oxide synthase with fluorescence. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **23**, 2133–2145.
- Astier J, Besson-Bard A, Lamotte O, Bertoldo J, Bourque S, Terenzi H, Wendehenne D.** 2012. Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogam signalling in tobacco cells. *Biochemical Journal* **447**, 249–260.
- Astier J, Lindermayr C.** 2012. Nitric Oxide-Dependent Posttranslational Modification in Plants: An Update. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 15193–15208.
- Astier J, Rossi J, Chatelain P, Klinguer A, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Jeandroz S, Nicolas-Francès V, Wendehenne D.** 2021. Nitric oxide production and signalling in algae. *Journal of Experimental Botany* **72**, 781–792.

- Baig MS, Zaichick SV, Mao M, et al.** 2015. NOS1-derived nitric oxide promotes NF- κ B transcriptional activity through inhibition of suppressor of cytokine signaling-1. *Journal of Experimental Medicine* **212**, 1725–1738.
- Barahimipour R, Strenkert D, Neupert J, Schroda M, Merchant SS, Bock R.** 2015. Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal* **84**, 704–717.
- Barkia I, Saari N, Manning SR.** 2019. Microalgae for High-Value Products Towards Human Health and Nutrition. *Marine Drugs* **17**, 304.
- Bassi S.** 2007. A Primer on Python for Life Science Researchers. *PLOS Computational Biology* **3**, e199.
- Bègue H, Besson-Bard A, Blanchard C, Winckler P, Bourque S, Nicolas V, Wendehenne D, Rosnoblet C.** 2019a. The chaperone-like protein CDC48 regulates ascorbate peroxidase in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **70**, 2665–2681.
- Bègue H, Mounier A, Rosnoblet C, Wendehenne D.** 2019b. Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant Science* **279**, 34–44.
- Besson-Bard A, Griveau S, Bedioui F, Wendehenne D.** 2008a. 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.
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D.** 2008b. New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21–39.
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL.** 2004. Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *The Plant Cell* **16**, 332–341.
- van den Boom J, Meyer H.** 2018. VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell* **69**, 182–194.
- Borges A, Tsai SM, Caldas DGG.** 2012. Validation of reference genes for RT-qPCR normalization in common bean during biotic and abiotic stresses. *Plant Cell Reports* **31**, 827–838.
- Bottari SP.** 2015. Protein tyrosine nitration: A signaling mechanism conserved from yeast to man. *PROTEOMICS* **15**, 185–187.
- Bouchard JN, Yamasaki H.** 2009. Implication of nitric oxide in the heat-stress-induced cell death of the symbiotic alga *Symbiodinium microadriaticum*. *Marine Biology* **156**, 2209–2220.
- Brouquisse R.** 2019. Multifaceted roles of nitric oxide in plants. *Journal of Experimental Botany* **70**, 4319–4322.
- Buchberger A, Schindelin H, Hänzelmann P.** 2015. Control of p97 function by cofactor binding. *FEBS Letters* **589**, 2578–2589.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al.** 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611–622.

- Calviello L, Ohler U.** 2017. Beyond Read-Counts: Ribo-seq Data Analysis to Understand the Functions of the Transcriptome. *Trends in Genetics* **33**, 728–744.
- Campbell MG, Smith BC, Potter CS, Carragher B, Marletta MA.** 2014. Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E3614–E3623.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E.** 2017. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science* **22**, 163–174.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas Á, Ocaña-Calahorra F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galván A, Fernández E.** 2016. A dual system formed by the ARC and NR molybdoenzymes mediates nitrite-dependent NO production in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell & Environment* **39**, 2097–2107.
- Chatelain P, Astier J, Wendehenne D, Rosnoblet C, Jeandroz S.** 2021. Identification of Partner Proteins of the Algae *Klebsormidium nitens* NO Synthases: Toward a Better Understanding of NO Signaling in Eukaryotic Photosynthetic Organisms. *Frontiers in Plant Science* **12**, 3068.
- Chatr-aryamontri A, Oughtred R, Boucher L, et al.** 2017. The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Research* **45**, D369–D379.
- Chen K, Gao J, Sun S, et al.** 2020. BONZAI Proteins Control Global Osmotic Stress Responses in Plants. *Current Biology* **30**, 4815-4825.e4.
- Chen C-YA, Shyu A-B.** 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 465–470.
- Chen X, Tian D, Kong X, Chen Q, E.F. A, Hu X, Jia A.** 2016. The role of nitric oxide signalling in response to salt stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **244**, 651–669.
- Chong C-M, Ai N, Ke M, Tan Y, Huang Z, Li Y, Lu J-H, Ge W, Su H.** 2018. Roles of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Neurogenesis. *Molecular Neurobiology* **55**, 2645–2652.
- Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB.** 2020. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews* **40**, 158–189.
- Clapp KM, Peng H-M, Jenkins GJ, Ford MJ, Morishima Y, Lau M, Osawa Y.** 2012. Ubiquitination of Neuronal Nitric-oxide Synthase in the Calmodulin-binding Site Triggers Proteasomal Degradation of the Protein *. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 42601–42610.
- Coers W, Timens W, Kempinga C, Klok PA, Moshage H.** 1998. Specificity of Antibodies to Nitric Oxide Synthase Isoforms in Human, Guinea Pig, Rat, and Mouse Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **46**, 1385–1391.
- Collins T, Azevedo-Silva J, da Costa A, Branca F, Machado R, Casal M.** 2013. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation. *Microbial Cell Factories* **12**, 21.
- Conley AJ, Joensuu JJ, Richman A, Menassa R.** 2011. Protein body-inducing fusions for high-level production and purification of recombinant proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 419–433.
- Corpas FJ, Barroso JB.** 2017. Nitric oxide synthase-like activity in higher plants. *Nitric Oxide* **68**, 5–6.

- Correa-Aragunde N, Foresi N, Del Castello F, Lamattina L.** 2018. A singular nitric oxide synthase with a globin domain found in *Synechococcus* PCC 7335 mobilizes N from arginine to nitrate. *Scientific Reports* **8**, 12505.
- Couto MR, Rodrigues JL, Rodrigues LR.** 2017. Optimization of fermentation conditions for the production of curcumin by engineered *Escherichia coli*. *Journal of The Royal Society Interface* **14**, 20170470.
- Crane BR.** 1998. Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate. *Science* **279**, 2121–2126.
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible W-R.** 2005. Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **139**, 5–17.
- Dahan J, Etienne P, Petitot A-S.** 2001. Cryptogein affects expression of a3, a6 and b1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1947–1958.
- Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W.** 2001. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *The FASEB Journal* **15**, 79–89.
- Del Castello F, Foresi N, Nejamkin A, Lindermayr C, Buegger F, Lamattina L, Correa-Aragunde N.** 2021. Cyanobacterial NOS expression improves nitrogen use efficiency, nitrogen-deficiency tolerance and yield in *Arabidopsis*. *Plant Science* **307**, 110860.
- Del Castello F, Nejamkin A, Foresi N, Lamattina L, Correa-Aragunde N.** 2020. Chimera of Globin/Nitric Oxide Synthase: Toward Improving Nitric Oxide Homeostasis and Nitrogen Recycling and Availability. *Frontiers in Plant Science* **11**, 1461.
- Desai PN, Shrivastava N, Padh H.** 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances* **28**, 427–435.
- Di Dato V, Musacchia F, Petrosino G, Patil S, Montresor M, Sanges R, Ferrante MI.** 2015. Transcriptome sequencing of three *Pseudo-nitzschia* species reveals comparable gene sets and the presence of Nitric Oxide Synthase genes in diatoms. *Scientific Reports* **5**, 12329.
- Dohmen RJ, Strasser AWM, Höner CB, Hollenberg CP.** 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691–692.
- Dong M, Zhang X, Chi X, Mou S, Xu J, Xu D, Wang W, Ye N.** 2012. The validity of a reference gene is highly dependent on the experimental conditions in green alga *Ulva linza*. *Current Genetics* **58**, 13–20.
- Doulias P-T, Tenopoulou M, Greene JL, Raju K, Ischiropoulos H.** 2013. Nitric Oxide Regulates Mitochondrial Fatty Acid Metabolism Through Reversible Protein S -Nitrosylation. *Science Signaling* **6**.
- Eligini S, Habib A, Lebret M, Créminon C, Lévy-Toledano S, Maclouf J.** 2001. Induction of cyclo-oxygenase-2 in human endothelial cells by SIN-1 in the absence of prostaglandin production. *British Journal of Pharmacology* **133**, 1163–1171.
- Elster J, Degma P, Kováčik Ľ, Valentová L, Šramková K, Pereira AB.** 2008. Freezing and desiccation injury resistance in the filamentous green alga *Klebsormidium* from the Antarctic, Arctic and Slovakia. *Biologia* **63**, 843–851.

- Emms DM, Kelly S.** 2015. OrthoFinder: solving fundamental biases in whole genome comparisons dramatically improves orthogroup inference accuracy. *Genome Biology* **16**, 157.
- Eprintsev AT, Fedorin DN, Dobychnina MA, Igamberdiev AU.** 2018. Regulation of expression of the mitochondrial and peroxisomal forms of citrate synthase in maize during germination and in response to light. *Plant Science* **272**, 157–163.
- Evans PC, Smith TS, Lai M-J, Williams MG, Burke DF, Heyninck K, Kreike MM, Beyaert R, Blundell TL, Kilshaw PJ.** 2003. A Novel Type of Deubiquitinating Enzyme*. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 23180–23186.
- Fan J, Xu H, Li Y.** 2016. Transcriptome-based global analysis of gene expression in response to carbon dioxide deprivation in the green algae *Chlorella pyrenoidosa*. *Algal Research* **16**, 12–19.
- Fancy NN, Bahlmann A-K, Loake GJ.** 2017. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment* **40**, 462–472.
- Fausser F, Vilarrasa-Blasi J, Onishi M, et al.** 2022. Systematic characterization of gene function in the photosynthetic alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature Genetics* **54**, 705–714.
- Feelisch M, Martin JF.** 1995. The early role of nitric oxide in evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **10**, 496–499.
- Feng Q, Fortin AJ, Lu X, Malcolm J, Arnold O.** 1999. Effects of L-arginine on endothelial and cardiac function in rats with heart failure. *European Journal of Pharmacology* **376**, 37–44.
- Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T.** 1998. The Endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Regulatory Cycle *. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3125–3128.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló 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[C][W][OA]. *The Plant Cell* **22**, 3816–3830.
- Foresi N, Mayta ML, Lodeyro AF, Scuffi D, Correa-Aragunde N, García-Mata C, Casalongué C, Carrillo N, Lamattina L.** 2015. Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **82**, 806–821.
- Förstermann U, Kleinert H.** 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **352**, 351–364.
- Fossetta JD, Niu XD, Lunn CA, Zavodny PJ, Narula SK, Lundell D.** 1996. Expression of human inducible nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **379**, 135–138.
- Gai Z, Wang Y, Ding Y, et al.** 2020. Exogenous abscisic acid induces the lipid and flavonoid metabolism of tea plants under drought stress. *Scientific Reports* **10**, 12275.
- Galloway CA, Sowden MP, Smith HC.** 2003. Increasing the Yield of Soluble Recombinant Protein Expressed in *E. coli* by Induction during Late Log Phase. *BioTechniques* **34**, 524–530.
- Ganger MT, Dietz GD, Ewing SJ.** 2017. A common base method for analysis of qPCR data and the application of simple blocking in qPCR experiments. *BMC Bioinformatics* **18**, 534.

- Gantner BN, LaFond KM, Bonini MG.** 2020. Nitric oxide in cellular adaptation and disease. *Redox Biology* **34**, 101550.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A.** 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press, 571–607.
- Gerber NC, Montellano PRO de.** 1995. Neuronal Nitric Oxide Synthase EXPRESSION IN ESCHERICHIA COLI, IRREVERSIBLE INHIBITION BY PHENYLDIAZENE, AND ACTIVE SITE TOPOLOGY. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 17791–17796.
- Giddings TH, Brower DL, Staehelin LA.** 1980. Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. *Journal of Cell Biology* **84**, 327–339.
- Gomes AR, Byregowda SM, Veeregowda BM, Balamurugan V.** 2016. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* **4**, 346–356.
- Grädler U, Fuchß T, Ulrich W-R, Boer R, Strub A, Hesslinger C, Anézo C, Diederichs K, Zaliani A.** 2011. Novel nanomolar imidazo[4,5-b]pyridines as selective nitric oxide synthase (iNOS) inhibitors: SAR and structural insights. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 4228–4232.
- Greaves J, Salaun C, Fukata Y, Fukata M, Chamberlain LH.** 2008. Palmitoylation and Membrane Interactions of the Neuroprotective Chaperone Cysteine-string Protein *. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 25014–25026.
- Green PJ.** 1993. Control of mRNA Stability in Higher Plants. *Plant Physiology* **102**, 1065–1070.
- Green MR, Sambrook J.** 2019. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates. *Cold Spring Harbor Protocols* **2019**, pdb.prot095141.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT.** 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* **16**, 160–168.
- Gupta KJ, Stoimenova M, Kaiser WM.** 2005. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, in vitro and in situ. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2601–2609.
- Gupta D, Tuteja N.** 2011. Chaperones and foldases in endoplasmic reticulum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 232–236.
- Gusarov I, Starodubtseva M, Wang Z-Q, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ, Nudler E.** 2008. Bacterial Nitric-oxide Synthases Operate without a Dedicated Redox Partner *. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 13140–13147.
- Gutiérrez RA, MacIntosh GC, Green PJ.** 1999. Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends in Plant Science* **4**, 429–438.
- Hao Z, Wei M, Gong S, Zhao D, Tao J.** 2016. Transcriptome and digital gene expression analysis of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) to screen thermo-tolerant related differently expressed genes. *Genes & Genomics* **38**, 1201–1215.

- Harper S, Speicher DW.** 2008. Expression and Purification of GST Fusion Proteins. In: Coligan JE,, In: Dunn BM,, In: Speicher DW,, In: Wingfield PT, eds. Current Protocols in Protein Science. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 6.6.1-6.6.26.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS.** 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 150–166.
- Ho GPH, Selvakumar B, Mukai J, Hester LD, Wang Y, Gogos JA, Snyder SH.** 2011. S-Nitrosylation and S-Palmitoylation Reciprocally Regulate Synaptic Targeting of PSD-95. *Neuron* **71**, 131–141.
- Hollingsworth SA, Holden JK, Li H, Poulos TL.** 2016. Elucidating nitric oxide synthase domain interactions by molecular dynamics. *Protein Science* **25**, 374–382.
- Holzinger A, Kaplan F, Blaas K, Zechmann B, Komsic-Buchmann K, Becker B.** 2014. Transcriptomics of Desiccation Tolerance in the Streptophyte Green Alga *Klebsormidium* Reveal a Land Plant-Like Defense Reaction (WL Araujo, Ed.). *PLoS ONE* **9**, e110630.
- Horchani F, Prévot M, Boscari A, et al.** 2011. Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules. *Plant Physiology* **155**, 1023–1036.
- Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, et al.** 2014. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nature Communications* **5**, 3978.
- Hubé F, Reverdiau P, Iochmann S, Gruel Y.** 2005. Improved PCR Method for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *Molecular Biotechnology* **31**, 081–084.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A.** 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity* **6**, 279–284.
- Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, et al.** 2021. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell* **184**, 3022-3040.e28.
- Ichimura T.** 1971. Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*. International Symposium on Seaweed Research, 7th, Sapporo.
- Ignarro LJ.** 1990. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* **16**, 477–483.
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK-S, Wendehenne D.** 2016. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* **9**, re2–re2.
- Ji Y, Ferracci G, Warley A, et al.** 2007. beta-Actin regulates platelet nitric oxide synthase 3 activity through interaction with heat shock protein 90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8839–8844.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al.** 2021. Applying and improving AlphaFold at CASP14. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **89**, 1711–1721.
- Kadowaki K, Kishimoto J, Leng G, Emson PC.** 1994. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophysial system after chronic salt

loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. *Endocrinology* **134**, 1011–1017.

Kamalanathan M, Quigg A. 2020. Physiological Limitations and Solutions to Various Applications of Microalgae. In: Vítová M, ed. *Microalgae - From Physiology to Application*. IntechOpen, .

Karimi M, Inzé D, Depicker A. 2002. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**, 193–195.

Kayum MdA, Park J-I, Nath UK, Saha G, Biswas MK, Kim H-T, Nou I-S. 2017. Genome-wide characterization and expression profiling of PDI family gene reveals function as abiotic and biotic stress tolerance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *BMC Genomics* **18**, 885.

Kellogg DL, Zhao JL, Wu Y. 2009. Roles of nitric oxide synthase isoforms in cutaneous vasodilation induced by local warming of the skin and whole body heat stress in humans. *Journal of Applied Physiology* **107**, 1438–1444.

Khan MI, Shin JH, Kim JD. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* **17**, 36.

Kim D-Y, Jin J-Y, Alejandro S, Martinoia E, Lee Y. 2010. Overexpression of AtABCG36 improves drought and salt stress resistance in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **139**, 170–180.

Kim S, Park J, Kim D, Choi S, Moon H, Young Shin J, Kim J-E, Son H. 2021. Development of a versatile copper-responsive gene expression system in the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant Pathology* **22**, 1427–1435.

Klepper L. 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment (1967)* **13**, 537–542.

Kodama Y. 2016. Time Gating of Chloroplast Autofluorescence Allows Clearer Fluorescence Imaging In Planta. *PLoS ONE* **11**.

Kolbert Z, Barroso JB, Brouquisse R, et al. 2019. A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. *Nitric Oxide* **93**, 53–70.

Konas DW, Zhu K, Sharma M, Aulak KS, Brudvig GW, Stuehr DJ. 2004. The FAD-shielding Residue Phe¹³⁹⁵ Regulates Neuronal Nitric-oxide Synthase Catalysis by Controlling NADP⁺ Affinity and a Conformational Equilibrium within the Flavoprotein Domain. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 35412–35425.

Kuncewicz T, Balakrishnan P, Snuggs MB, Kone BC. 2001. Specific association of nitric oxide synthase-2 with Rac isoforms in activated murine macrophages. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **281**, F326–F336.

Laffitte A, Belloir C, Neiers F, Briand L. 2022. Functional Characterization of the Venus Flytrap Domain of the Human TAS1R2 Sweet Taste Receptor. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 9216.

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 Physiology* **135**, 516–529.

- Lee M-A, Guo R, Ebenezer V, Ki J-S.** 2015. Evaluation and selection of reference genes for ecotoxicogenomic study of the green alga *Closterium ehrenbergii* using quantitative real-time PCR. *Ecotoxicology* **24**, 863–872.
- Li H, Jamal J, Delker S, Plaza C, Ji H, Jing Q, Huang H, Kang S, Silverman RB, Poulos TL.** 2014. The Mobility of a Conserved Tyrosine Residue Controls Isoform-Dependent Enzyme–Inhibitor Interactions in Nitric Oxide Synthases. *Biochemistry* **53**, 5272–5279.
- Li L, Li N, Fang H, Qi X, Zhou Y.** 2020a. Selection and Validation of Reference Genes for Normalisation of Gene Expression in *Glehnia littoralis*. *Scientific Reports* **10**, 7374.
- Li Y, Liang X, Zhou X, Wu Z, Yuan L, Wang Y, Li Y.** 2020b. Selection of Reference Genes for qRT-PCR Analysis in Medicinal Plant *Glycyrrhiza* under Abiotic Stresses and Hormonal Treatments. *Plants* **9**, 1441.
- Lin C-S, Wu J-T.** 2014. Tolerance of soil algae and cyanobacteria to drought stress. *Journal of Phycology* **50**, 131–139.
- Linn SC, Morelli PJ, Edry I, Cottongim SE, Szabo C, Salzman AL.** 1997. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line. *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology* **272**, G1499–G1508.
- Lippert BE.** 1967. Sexual Reproduction in *Closterium Moniliferum* and *Closterium Ehrenbergii*1. *Journal of Phycology* **3**, 182–198.
- Liu J, Hughes TE, Sessa WC.** 1997. The First 35 Amino Acids and Fatty Acylation Sites Determine the Molecular Targeting of Endothelial Nitric Oxide Synthase into the Golgi Region of Cells: A Green Fluorescent Protein Study. *Journal of Cell Biology* **137**, 1525–1535.
- Løvdaal T, Lillo C.** 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry* **387**, 238–242.
- Ma R, Xu S, Zhao Y, Xia B, Wang R.** 2016. Selection and Validation of Appropriate Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in *Lycoris aurea*. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Mabonga L, Kappo AP.** 2019. Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophysical Reviews* **11**, 559–581.
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, et al.** 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research* **39**, D225–D229.
- Marino D, Peeters N, Rivas S.** 2012. Ubiquitination during Plant Immune Signaling1. *Plant Physiology* **160**, 15–27.
- Massa S, Presenti O, Benvenuto E.** 2019. Engineering Plants for the Future: Farming with Value-Added Harvest. In: Cánovas FM,, In: Lüttge U,, In: Matyssek R,, In: Pretzsch H, eds. *Progress in Botany. Progress in Botany Vol. 80*. Cham: Springer International Publishing, 65–108.
- Mazumdar T, Gorgun FM, Sha Y, Tyryshkin A, Zeng S, Hartmann-Petersen R, Jørgensen JP, Hendil KB, Eissa NT.** 2010. Regulation of NF- κ B activity and inducible nitric oxide synthase by regulatory particle non-ATPase subunit 13 (Rpn13). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 13854–13859.

- McNeilly D, Schofield A, Stone SL.** 2018. Degradation of the stress-responsive enzyme formate dehydrogenase by the RING-type E3 ligase Keep on Going and the ubiquitin 26S proteasome system. *Plant Molecular Biology* **96**, 265–278.
- Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE.** 2006. Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. *BMC Bioinformatics* **7**, 339.
- Meyer H, Bug M, Bremer S.** 2012. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology* **14**, 117–123.
- Michel BE, Kaufmann MR.** 1973. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiology* **51**, 914–916.
- Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M.** 2022. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods* **19**, 679–682.
- Mirdita M, Steinegger M, Söding J.** 2019. MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches. *Bioinformatics* **35**, 2856–2858.
- Monte I, Kneeshaw S, Franco-Zorrilla JM, Chini A, Zamarreño AM, García-Mina JM, Solano R.** 2020. An Ancient COI1-Independent Function for Reactive Electrophilic Oxylipins in Thermotolerance. *Current Biology* **30**, 962-971.e3.
- Montero H, Lee T, Pucker B, Ferreras-Garrucho G, Oldroyd G, Brockington SF, Miyao A, Paszkowski U.** 2021. A mycorrhiza-associated receptor-like kinase with an ancient origin in the green lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **118**, e2105281118.
- Moraes GP, Benitez LC, do Amaral MN, Vighi IL, Auler PA, da Maia LC, Bianchi VJ, Braga EJB.** 2015. Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress. *Genetics and Molecular Research* **14**, 2384–2398.
- Mou S, Zhang X, Miao J, Zheng Z, Xu D, Ye N.** 2015. Reference genes for gene expression normalization in *Chlamydomonas* sp. ICE-L by quantitative real-time RT-PCR. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **24**, 276–282.
- Müller U.** 1994. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Nitric Oxide Synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Neuroscience* **6**, 1362–1370.
- Müller U.** 1997. THE NITRIC OXIDE SYSTEM IN INSECTS. *Progress in Neurobiology* **51**, 363–381.
- Murphy ME, Noack E.** 1994. [24] Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part C. Methods in Enzymology*. Academic Press, 240–250.
- Nagao M, Matsui K, Uemura M.** 2008. *Klebsormidium flaccidum*, a charophycean green alga, exhibits cold acclimation that is closely associated with compatible solute accumulation and ultrastructural changes. *Plant, Cell & Environment* **31**, 872–885.
- Navarro-Lérida I, Corvi MM, Barrientos AÁ, Gavilanes F, Berthiaume LG, Rodríguez-Crespo I.** 2004. Palmitoylation of Inducible Nitric-oxide Synthase at Cys-3 Is Required for Proper Intracellular Traffic and Nitric Oxide Synthesis *. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 55682–55689.

- Negre-Salvayre A, Swiader A, Guerby P, Salvayre R.** 2022. Post-translational modifications of endothelial nitric oxide synthase induced by oxidative stress in vascular diseases. *Redox Experimental Medicine* **2022**, R139–R148.
- Nejamkin A, Foresi N, Mayta ML, Lodeyro AF, Castello FD, Correa-Aragunde N, Carrillo N, Lamattina L.** 2020. Nitrogen Depletion Blocks Growth Stimulation Driven by the Expression of Nitric Oxide Synthase in Tobacco. *Frontiers in Plant Science* **11**, 312.
- Nguyen T-A, Cigler M, Lang K.** 2018. Expanding the Genetic Code to Study Protein–Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* **57**, 14350–14361.
- Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S.** 2011. Regulation of Inducible Nitric-oxide Synthase by the SPRY Domain- and SOCS Box-containing Proteins *. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 9009–9019.
- Ohme-Takagi M, Taylor CB, Newman TC, Green PJ.** 1993. The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 11811–11815.
- Ohno R, Kadota Y, Fujii S, Sekine M, Umeda M, Kuchitsu K.** 2011. Cryptogein-Induced Cell Cycle Arrest at G2 Phase is Associated with Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases, Suppression of Expression of Cell Cycle-Related Genes and Protein Degradation in Synchronized Tobacco BY-2 Cells. *Plant and Cell Physiology* **52**, 922–932.
- Ohtaka K, Hori K, Kanno Y, Seo M, Ohta H.** 2017. Primitive Auxin Response without TIR1 and Aux/IAA in the Charophyte Alga *Klebsormidium nitens*. *Plant Physiology* **174**, 1621–1632.
- Oñate-Sánchez L, Vicente-Carbajosa J.** 2008. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes* **1**, 93.
- Parankusam S, Adimulam SS, Bhatnagar-Mathur P, Sharma KK.** 2017. Nitric Oxide (NO) in Plant Heat Stress Tolerance: Current Knowledge and Perspectives. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1582.
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H.** 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* **23**, 75–93.
- Petitot A-S, Blein J-P, Pugin A, Suty L.** 1997. Cloning of two plant cDNAs encoding a -type proteasome subunit and a transformer-2-like SR-related protein: early induction of the corresponding genes in tobacco cells treated with cryptogein. *Plant Molecular Biology* **35**, 261–269.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE.** 2004. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605–1612.
- Peyret H, Lomonossoff GP.** 2013. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. *Plant Molecular Biology* **83**, 51–58.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP.** 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509–515.

- Picciano AL, Crane BR.** 2019. A nitric oxide synthase–like protein from *Synechococcus* produces NO/NO₃⁻ from l-arginine and NADPH in a tetrahydrobiopterin- and Ca²⁺-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 10708–10719.
- Pihur V, Datta S, Datta S.** 2009. RankAggreg, an R package for weighted rank aggregation. *BMC Bioinformatics* **10**, 62.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D.** 2005. Recombinant protein production in yeasts. *MOLECULAR BIOTECHNOLOGY* **31**, 15.
- Poulos TL, Raman C, Li, H.** 1998. NO news is good news. *Structure* **6**, 255–258.
- Pow DV.** 1992. NADPH-Diaphorase (Nitric Oxide Synthase) Staining in the Rat Supraoptic Nucleus is Activity-Dependent: Possible Functional Implications. *Journal of Neuroendocrinology* **4**, 377–380.
- Priestley J.** 1772. XIX. Observations on different kinds of air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **62**, 147–264.
- Raju K, Doulias P-T, Evans P, et al.** 2015. Regulation of brain glutamate metabolism by nitric oxide and S-nitrosylation. *Science Signaling* **8**.
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM.** 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**, 62–66.
- Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinssot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S.** 2012. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **35**, 1483–1499.
- Reece SY, Woodward JJ, Marletta MA.** 2009. Synthesis of Nitric Oxide by the NOS-like Protein from *Deinococcus radiodurans* : A Direct Role for Tetrahydrofolate. *Biochemistry* **48**, 5483–5491.
- Resh MD.** 2006. Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods* **40**, 191–197.
- Rodriguez-Pascual F, Hausding M, Ihrig-Biedert I, Furneaux H, Levy AP, Förstermann U, Kleinert H.** 2000. Complex Contribution of the 3'-Untranslated Region to the Expressional Regulation of the Human Inducible Nitric-oxide Synthase Gene INVOLVEMENT OF THE RNA-BINDING PROTEIN HuR. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 26040–26049.
- Roman LJ, Sheta EA, Martasek P, Gross SS, Liu Q, Masters BS.** 1995. High-level expression of functional rat neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 8428–8432.
- Rosnoblet C, Bègue H, Blanchard C, Pichereaux C, Besson-Bard A, Aimé S, Wendehenne D.** 2017. Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced immune response in tobacco: Role of Cdc48 in plant immunity. *Plant, Cell & Environment* **40**, 491–508.
- Rosnoblet C, Bourque S, Nicolas-Francès V, Lamotte O, Besson-Bard A, Jeandroz S, Wendehenne D.** 2016. NO Signalling in Plant Immunity. In: Lamattina L,, In: García-Mata C, eds. *Signaling and Communication in Plants. Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling*. Cham: Springer International Publishing, 219–238.

- Rosnoblet C, Chatelain P, Klinguer A, Bègue H, Winckler P, Pichereaux C, Wendehenne D.** 2021. The chaperone-like protein Cdc48 regulates ubiquitin-proteasome system in plants. *Plant, Cell & Environment* **44**, 2636–2655.
- Rümer S, Gupta KJ, Kaiser WM.** 2009. Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2065–2072.
- Saha J, Sengupta A, Gupta K, Gupta B.** 2015. Molecular phylogenetic study and expression analysis of ATP-binding cassette transporter gene family in *Oryza sativa* in response to salt stress. *Computational Biology and Chemistry* **54**, 18–32.
- Sahay S, Khan E, Gupta M.** 2019. Nitric oxide and abscisic acid protects against PEG-induced drought stress differentially in Brassica genotypes by combining the role of stress modulators, markers and antioxidants. *Nitric Oxide* **89**, 81–92.
- Sainsbury F, Thuenemann EC, Lomonossoff GP.** 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 682–693.
- Salzberg SL.** 2019. Next-generation genome annotation: we still struggle to get it right. *Genome Biology* **20**, 92.
- Santolini J.** 2019. What does ‘NO-Synthase’ stand for. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **24**, 133–171.
- Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D.** 2017. Nitric oxide synthase in plants: Where do we stand? *Nitric Oxide* **63**, 30–38.
- Sathasivam R, Ebenezer V, Guo R, Ki J-S.** 2016. Physiological and biochemical responses of the freshwater green algae *Closterium ehrenbergii* to the common disinfectant chlorine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **133**, 501–508.
- Satish D, Panwar A.** 2020. Genome-wide comparisons and extrapolations of AU-rich elements in Plants with *Homo sapiens*. , 2020.04.28.066589.
- Schmidt GW, Delaney SK.** 2010. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* **283**, 233–241.
- Schmidt HHHW, Walter U.** 1994. NO at work. *Cell* **78**, 919–925.
- Schopfer FJ, Baker PRS, Freeman BA.** 2003. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 646–654.
- Schwartz AM, Komarova TV, Skulachev MV, Zvereva AS, Dorokhov YuL, Atabekov JG.** 2006. Stability of plant mRNAs depends on the length of the 3′-untranslated region. *Biochemistry (Moscow)* **71**, 1377–1384.
- Serrano-Pérez E, Romero-Losada AB, Morales-Pineda M, García-Gómez ME, Couso I, García-González M, Romero-Campero FJ.** 2022. Transcriptomic and Metabolomic Response to High Light in the Charophyte Alga *Klebsormidium nitens*. *Frontiers in Plant Science* **13**.

- Shi H-T, Li R-J, Cai W, Liu W, Wang C-L, Lu Y-T.** 2012*a*. Increasing Nitric Oxide Content in *Arabidopsis thaliana* by Expressing Rat Neuronal Nitric Oxide Synthase Resulted in Enhanced Stress Tolerance. *Plant and Cell Physiology* **53**, 344–357.
- Shi J, Liu M, Shi J, Zheng G, Wang Y, Wang J, Chen Y, Lu C, Yin W.** 2012*b*. Reference gene selection for qPCR in *Ammopiptanthus mongolicus* under abiotic stresses and expression analysis of seven ROS-scavenging enzyme genes. *Plant Cell Reports* **31**, 1245–1254.
- Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL.** 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* **7**, 1–9.
- Simon DF, Descombes P, Zerges W, Wilkinson KJ.** 2008. Global expression profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to trace levels of free cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**, 1668–1675.
- Song JM, An YJ, Kang MH, Lee Y-H, Cha S-S.** 2012. Cultivation at 6–10°C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **82**, 297–301.
- Spalding MH, Portis AR.** 1985. A model of carbon dioxide assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **164**, 308–320.
- Spoel SH, Mou Z, Tada Y, Spivey NW, Genschik P, Dong X.** 2009. Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* **137**, 860–872.
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC.** 2001. Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism. *Cell* **106**, 675–683.
- Stein L.** 2001. Genome annotation: from sequence to biology. *Nature Reviews Genetics* **2**, 493–503.
- Steinegger M, Söding J.** 2017. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nature Biotechnology* **35**, 1026–1028.
- Steiner P, Buchner O, Andosch A, Holzinger A, Lütz-Meindl U, Neuner G.** 2021. Winter survival of the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*: insights from field monitoring and simulation experiments. *Protoplasma* **258**, 1335–1346.
- Stöhr C, Stremmlau S.** 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463–470.
- Stolz A, Hilt W, Buchberger A, Wolf DH.** 2011. Cdc48: a power machine in protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 515–523.
- Stoyneva-Gärtner M, Uzunov B, Gärtner G, Radkova M, Atanassov I, Atanasova R, Borisova C, Draganova P, Stoykova P.** 2019. Review on the biotechnological and nanotechnological potential of the streptophyte genus *Klebsormidium* with pilot data on its phycoprospecting and polyphasic identification in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **33**, 559–578.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang Z-Q, Wei C-C, Adak S.** 2004. Update on Mechanism and Catalytic Regulation in the NO Synthases *. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36167–36170.

- Sudhamsu J, Crane BR.** 2009. Bacterial nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends in Microbiology* **17**, 212–218.
- Suman S, Seth RK, Chandna S.** 2008. Role of nitric oxide synthase in insect cell radioresistance: an in-silico analysis. *Bioinformation* **3**, 8–13.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S.** 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 3022–3027.
- Tang X, Zhang N, Si H, Calderón-Urrea A.** 2017. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress. *Plant Methods* **13**, 85.
- Tremblay R, Wang D, Jevnikar AM, Ma S.** 2010. Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* **28**, 214–221.
- Tripathi NK, Shrivastva A, Biswal KC, Rao PVL.** 2009. METHODS: Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli*. *Industrial Biotechnology* **5**, 179–183.
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE.** 2006. Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant and Cell Physiology* **47**, 346–354.
- Uchida A, Jagendorf AT, Hibino T, Takabe T, Takabe T.** 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science* **163**, 515–523.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research0034.1.
- Varadaraj K, Skinner DM.** 1994. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* **140**, 1–5.
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, et al.** 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* **50**, D439–D444.
- Vasu D, Li H, Hardy CD, Poulos TL, Silverman RB.** 2022. 2-Aminopyridines with a shortened amino sidechain as potent, selective, and highly permeable human neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **69**, 116878.
- Vázquez-Limón C, Hoogewijs D, Vinogradov SN, Arredondo-Peter R.** 2012. The evolution of land plant hemoglobins. *Plant Science* **191–192**, 71–81.
- Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ.** 1997. Subunit Interactions of Endothelial Nitric-oxide Synthase: COMPARISONS TO THE NEURONAL AND INDUCIBLE NITRIC-OXIDE SYNTHASE ISOFORMS *. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 1276–1282.
- de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Billiar TR, Geller DA.** 1996. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 1054–1059.

- Villanueva C, Giulivi C.** 2010. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radical Biology and Medicine* **49**, 307–316.
- Vodovotz Y, Russell D, Xie QW, Bogdan C, Nathan C.** 1995. Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages. *The Journal of Immunology* **154**, 2914–2925.
- Wang M, Wang Q, Zhang B.** 2013. Evaluation and selection of reliable reference genes for gene expression under abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Gene* **530**, 44–50.
- Weisslocker-Schaetzel M, André F, Touazi N, Foresi N, Lembrouk M, Dorlet P, Frelet-Barrand A, Lamattina L, Santolini J.** 2017. The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme. *Plant Science* **265**, 100–111.
- Wijffels RH, Barbosa MJ.** 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science* **329**, 796–799.
- Windhagauer M, Abbriano RM, Ashworth J, Barolo L, Jaramillo-Madrid AC, Pernice M, Doblin MA.** 2021. Characterisation of novel regulatory sequences compatible with modular assembly in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research* **53**, 102159.
- Workman RE, Tang AD, Tang PS, et al.** 2019. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome. *Nature Methods* **16**, 1297–1305.
- Wynia-Smith SL, Smith BC.** 2017. Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases. *Nitric Oxide* **63**, 52–60.
- Xie L, Quan X, Zhang J, et al.** 2019. Selection of Reference Genes for Real-time Quantitative PCR Normalization in the Process of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Infecting Wheat. *The Plant Pathology Journal* **35**, 11–18.
- Xie Y, Zheng Y, Li H, et al.** 2016. GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites. *Scientific Reports* **6**, 28249.
- Xing S, Wallmeroth N, Berendzen KW, Grefen C.** 2016. Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant Physiology*, pp.00470.2016.
- Xu Z, He Q, Gong Y, Wang Y, Chi Q, Liu G, Hu Z, Zhang C, Hu Q.** 2021. Assessment of a Novel Oleaginous Filamentous Microalga *Klebsormidium* sp. Lgx80 (Streptophyta, Klebsormidiales) for Biomass and Lipid Production1. *Journal of Phycology* **57**, 1151–1166.
- Yadav VP, Dangi SS, Chouhan VS, Gupta M, Dangi SK, Singh G, Maurya VP, Kumar P, Sarkar M.** 2016. Expression analysis of NOS family and HSP genes during thermal stress in goat (*Capra hircus*). *International Journal of Biometeorology* **60**, 381–389.
- Yan C, Duan W, Lyu S, Li Y, Hou X.** 2017. Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Analysis of the ATP-Binding Cassette Transporter Gene Family in *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science* **8**.
- Yeh DC, Duncan JA, Yamashita S, Michel T.** 1999. Depalmitoylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by Acyl-protein Thioesterase 1 Is Potentiated by Ca²⁺-Calmodulin*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 33148–33154.

- Zeba N, Isbat M, Kwon N-J, Lee MO, Kim SR, Hong CB.** 2009. Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annuum* enhances growth of transgenic tobacco. *Planta* **229**, 861.
- Zeidler D, Zähringer 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15811–15816.
- Zhang B-B, Shen X, Li X-J, Tian Y-B, Ouyang H-J, Huang Y-M.** 2021. Reference gene selection for expression studies in the reproductive axis tissues of Magang geese at different reproductive stages under light treatment. *Scientific Reports* **11**, 7573.
- Zhou D, Li T, Yang Y, et al.** 2020. OsPLS4 Is Involved in Cuticular Wax Biosynthesis and Affects Leaf Senescence in Rice. *Frontiers in Plant Science* **11**.
- Zhou L, Zhu D-Y.** 2009. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* **20**, 223–230.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is an important cellular signaling molecule regulating various physiological processes, in both animals and plants. In animals, NO synthesis is mainly catalyzed by NO synthase (NOS) enzymes. In plants, NOS-like activities sensitive to mammalian NOS inhibitors have been measured, although no sequences encoding mammalian NOS have been found in land plants. Interestingly, we identified NOS-like sequences in about twenty algae species. These latter include the filamentous Charophyta green algae *Klebsormidium nitens*, a biological model to study the early transition step from aquatic algae to land plants. Currently, two NOS were identified in *K. nitens* genome: i) KnNOS1 which possesses classical mammalian NOS architecture consisting of oxygenase and reductase domains, ii) KnNOS2 displaying a large C-ter extension containing a globin domain.

The presence of NOS of great molecular diversity in several algal species while absent from terrestrial plants raises questions about the evolution of this enzyme family in photosynthetic organisms.

We initiated the functional characterization of KnNOS by analyzing their primary sequences. From the protein primary sequences, predictive models of the 3D structure of KnNOS were made *via* AlphaFold and comparison with existing models of mammalian NOS suggested that both KnNOS are functional. Study of the phylogenetic position of KnNOS in comparison to other NOS described in eukaryotes, indicate that both NOS of *K. nitens* could result from a recent duplication event. The study of their mRNA abundance in response to different abiotic stresses revealed differences suggesting a subfonctionnalisation of these two proteins. In order to study protein partners of KnNOS a pull-down strategy was chosen, requiring the production of recombinant KnNOS1 and KnNOS2. Although the production of KnNOS has not yet been completed, promising results have been obtained in a heterologous yeast system. In parallel, we also built the *in silico* protein–protein interaction network of human NOS using the BioGRID database and human NOS interaction data. Interestingly, genes encoding orthologs of several of these candidates were found in *K. nitens* genome. Some of these conserved partners are known to be involved in mammalian NOS regulation and represent interesting candidates for further study.

This work has provided new information on the NOS family, notably by characterizing the two NOS isoforms of *K. nitens* and by highlighting putative differences in their function. Molecular tools developed in this study open the way for a deeper characterization of these proteins and will facilitate future investigations of NO signaling in the green lineage.

Keywords: Algae, Nitric Oxide, NO Synthase, Abiotic stress, Heterologous production, Protein-protein interactions

RÉSUMÉ

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule de signalisation cellulaire ubiquitaire. Chez les animaux, la synthèse du NO est principalement catalysée par une famille d'enzyme : les NO synthase (NOS). Chez les plantes, des activités de type NOS sensibles aux inhibiteurs de NOS de mammifères ont été mesurées, bien qu'aucune séquence codant pour des NOS similaires n'y ait été trouvée. De manière intéressante, des séquences NOS-like ont été identifiées chez une vingtaine d'espèces d'algues, et présentent une intéressante diversité structurale en comparaison aux NOS de mammifères. L'algue verte charophyte filamenteuse *Klebsormidium nitens*, un modèle biologique pour étudier l'adaptation au mode de vie terrestre, a été identifiée au laboratoire comme possédant deux NOS : i) la KnNOS1, qui présente une architecture canonique domaine oxygénase/domaine réductase ii) la KnNOS2, qui possède une structure atypique avec l'adjonction d'un domaine globine dans la partie C-terminale de la protéine.

La présence de NOS d'une grande diversité moléculaire au sein de plusieurs espèces d'algue alors qu'elles sont absentes des plantes terrestres questionne sur l'évolution de cette famille d'enzyme chez les organismes photosynthétiques.

La caractérisation fonctionnelle des KnNOS a été initiée par l'analyse de leurs séquences primaires nucléotidique et protéique. Depuis les séquences primaires protéiques, des modèles de prédiction de la structure 3D des KnNOS ont été réalisés *via* AlphaFold et la comparaison avec les modèles existants des NOS de mammifères a suggéré que les deux KnNOS soient fonctionnelles. L'étude de la position phylogénétique des KnNOS en comparaison aux autres NOS décrites chez les eucaryotes indique que les deux NOS de *K. nitens* pourraient résulter d'un événement de duplication récent. L'étude de l'abondance de leurs ARNm en réponse à différents stress abiotiques a mis en évidence des différences suggérant une sous-fonctionnalisation de ces deux protéines. Afin d'étudier les interactions des KnNOS une stratégie par pull-down a été retenue, nécessitant la production de la protéine recombinante KnNOS1 et KnNOS2. Bien que la production hétérologue des KnNOS n'ait pas encore abouti, des résultats prometteurs ont été obtenus en système hétérologue en levure. En parallèle, nous avons également construit le réseau *in silico* d'interactions protéine-protéine des NOS humaines en utilisant la base de données BioGRID et les données d'interactions des NOS humaines. Il est intéressant de noter que des gènes codant pour des orthologues de plusieurs de ces candidats ont été trouvés dans le génome de *K. nitens*. Certains de ces partenaires conservés sont connus pour être impliqués dans la régulation des NOS des mammifères et représentent des candidats intéressants pour une étude plus approfondie.

Ce travail de thèse a apporté de nouvelles informations sur la famille des enzymes NOS notamment en caractérisant les deux isoformes de NOS de *K. nitens* et en mettant en avant des différences dans leur fonctionnement. Les outils moléculaires développés dans ce travail ouvrent la voie vers une caractérisation plus approfondie de ces protéines et va faciliter de futures recherches sur la signalisation NO dans la lignée verte.

Mots clés : Algue, Monoxyde d'azote, NO Synthase, Stress abiotique, Production hétérologue, Interactions protéine-protéine