

TITRE DU PROJET (limité chacun à 255 caractères) Identification et caractérisation fonctionnelle de protéines S-nitrosées végétales et fongiques impliquées dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR :

Nom : BESSON-BARD

Prénom : Angélique

Section CNU : 64

Grade : MCF HC

HDR : Date de soutenance 21/06/2023 **Discipline :** Biochimie Biologie Moléculaire

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : angelique.besson-bard@ube.fr ; 03.80.69.31.78

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : UMR 1347 Agroécologie, Institut Agro Dijon - INRAE - Université Bourgogne Europe, directeur : Fabrice MARTIN-LAURENT

Co-directeur de thèse éventuel :

Nom : NICOLAS-FRANCES

Prénom : Valérie

Section CNU : 64

Grade : MCF classe exceptionnelle

HDR : non ☐ oui ☒ **Date de soutenance** 17/01/2008 **Discipline :** Biochimie Biologie Moléculaire

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : valerie.nicolas@ube.fr ; 03.80.69.31.78

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : UMR 1347 Agroécologie, Institut Agro Dijon - INRAE - Université Bourgogne Europe, directeur : Fabrice MARTIN-LAURENT

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- nom et label de l'unité de recherche (ainsi que l'équipe interne s'il y a lieu)

UMR Agroécologie, INRAE, Institut Agro Dijon, Université Bourgogne Europe, pôle IPM (Mécanismes et gestion des Interactions Plantes-Microorganismes), équipe Santé des plantes : défenses et mycorhizes

- localisation

17 rue Sully, Dijon, France

- nom du directeur de thèse et du co-directeur s'il y a lieu

Angélique BESSON-BARD et Valérie NICOLAS

¹ ATTENTION : selon l'article 16 de l'arrêté du 25 mai 2016, le total d'encadrants ne peut pas dépasser 2, sauf si l'un des encadrants appartient au monde socio-économique, qui peut venir en sus, ou en cas de co-tutelle; Le décompte des co-encadrements se fera au prorata du nombre d'encadrants : 1 pour 1 encadrant, ½ pour deux encadrants.

- adresse courriel du contact scientifique

angelique.besson-bard@ube.fr

- titre du projet

Identification et caractérisation fonctionnelle de protéines S-nitrosées végétales et fongiques impliquées dans la symbiose mycorhizienne à arbuscules

- description du projet (2 pages maximum)

Contexte de l'étude

Chez les plantes, des travaux initiés à la fin des années 1990 ont mis en évidence le rôle clé du monoxyde d'azote (NO) dans des processus physiologiques variés tels que la croissance des racines, la fermeture des stomates, la floraison, le contrôle de la synthèse de phytohormones et la réponse aux stress. Notre équipe a notamment contribué à démontrer l'importance du NO dans la réponse immunitaire des plantes aux microorganismes pathogènes (Berger *et al.*, 2025 ; Jeandroz *et al.*, 2016 ; Nicolas-Francès *et al.*, 2022). Le NO joue également un rôle clé dans les interactions entre les plantes et les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA), qui établissent avec les plantes une symbiose mutualiste essentielle à leur croissance et à leur adaptation aux stress environnementaux abiotiques et biotiques. Cette symbiose est étudiée depuis longtemps au laboratoire, notamment pour son rôle dans la nutrition et la santé des plantes (Noceto *et al.*, 2021 ; Sportès *et al.*, 2021 ; Wipf *et al.*, 2019). Or, cette symbiose repose sur un dialogue moléculaire complexe, où le NO joue un rôle central, tant dans l'initiation que dans le maintien de l'association bénéfique (Martínez-Medina *et al.*, 2019a).

En effet, dès les premières minutes suivant l'exposition aux exsudats fongiques, les racines végétales réagissent par une production rapide de NO, principalement *via* l'activité de la nitrate réductase (NR). Cette production a été montrée chez des plantes de *Medicago truncatula* inoculées par les CMA *Gigaspora margarita* (Calcagno *et al.*, 2012), *Rhizoglyphus irregularis* (Martínez-Medina *et al.*, 2019b) ou *Trifolium repens* (Zhang *et al.*, 2013). L'inhibition de la production ou le piégeage du NO bloquent d'ailleurs la colonisation fongique, confirmant le rôle indispensable du NO dans la phase pré-symbiotique (Calcagno *et al.*, 2012).

Au-delà de la phase précoce, le NO continue de jouer un rôle clé pendant la colonisation des racines. Par exemple, des travaux réalisés sur *Citrus trifoliata* ont révélé que des niveaux soutenus de NO, 21 jours après l'inoculation avec *Diversispora versiformis*, contribuent à la pérennité de la symbiose (Zou *et al.*, 2017). Le NO pourrait être impliqué dans le contrôle de plusieurs processus tels que le remodelage de la paroi cellulaire, le développement des racines latérales et la modulation de la défense de l'hôte (Fiorilli *et al.*, 2024).

Le NO s'impose donc comme un acteur clé pour l'établissement et le fonctionnement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules en agissant à la fois comme un signal précoce et comme un régulateur à long terme. Néanmoins, son mécanisme d'action reste encore très peu connu.

Objectif de la thèse

L'objectif du projet de thèse proposé est d'identifier, puis de caractériser d'un point de vue fonctionnel, des protéines végétales ou fongiques régulées au niveau post-traductionnel par le NO. Plus précisément, nous nous intéresserons à la S-nitrosation (ou S-nitrosylation). Dans ce processus, le NO établit de façon réversible une liaison covalente avec l'atome de soufre de résidus cystéine réduits. Ce mécanisme est induit par des agents nitrosants tels que le nitrosoglutathion (GSNO) ou l'ion nitrosonium (NO⁺), ou par des protéines S-nitrosées

transférant le groupe NO sur une protéine cible (Chaudron *et al.*, 2025). La S-nitrosation impacte les protéines de différentes façons : activation ou inhibition de leur activité, translocation dans d'autres compartiments cellulaires, association ou dissociation de complexes protéiques par exemple. L'identification de protéines S-nitrosées puis leur caractérisation permettra d'étudier de façon fine le rôle fonctionnel du NO dans les interactions plantes-CMA. Nous souhaitons travailler dans ce projet sur la symbiose entre la plante modèle *Medicago truncatula* et le champignon modèle *Rhizophagus irregularis*. En effet, l'équipe maîtrise parfaitement le système de culture et a récemment montré que l'activité du système ubiquitine-protéasome (UPS) est essentielle à l'établissement et au fonctionnement de la symbiose mycorhizienne à arbuscules en modulant l'ubiquitination des protéines (Inès *et al.*, 2025). La thèse demandée assurera le continuum de ces travaux.

Organisation de la thèse et démarche expérimentale : La thèse sera organisée en trois axes.

Axe 1 : Identification de protéines S-nitrosées dans les interactions plantes-CMA

Après établissement de la symbiose mycorhizienne, les tissus végétaux (racines colonisées ou non d'une part et tissus aériens d'autre part) seront récupérés et congelés dans l'azote liquide à des temps courts (quelques heures) ou plus tardifs (plusieurs jours). Les protéines totales seront extraites et parmi celles-ci, les protéines S-nitrosées seront purifiées par la méthode du *Biotin-Switch* consistant à convertir la liaison NO-Cys en liaison biotine-Cys puis à enrichir celles-ci par affinité sur billes de streptavidine. Le système de culture et la technique du *Biotin-Switch* sont parfaitement maîtrisés par l'équipe. Les protéines recueillies seront identifiées par spectrométrie de masse par la plateforme de protéomique de Toulouse (ProtéoToul).

Axe 2 : Analyse du rôle du NO sur la structure/fonction des protéines cibles

L'axe 1 permettra d'identifier des protéines potentiellement S-nitrosées. Seules les protéines identifiées dans 3 expériences biologiques indépendantes seront présélectionnées. Pour la suite des expériences et sur la base de notre expertise actuelle, nous sélectionnerons au maximum 3 protéines. Nous nous attacherons à préférentiellement sélectionner des protéines pour lesquelles le(s) résidu(s) cystéine identifié(s) joue(nt) potentiellement un rôle catalytique ou structural. Outre une étude bibliographique, des approches de modélisation structurale *in silico* devraient aiguiller cette sélection.

Une fois sélectionnées, les protéines seront produites en système hétérologue et leur S-nitrosation sera étudiée *in vitro*. Il s'agira d'étudier l'impact du NO sur leur activité (si mesurable) et leur structure (en particulier par dichroïsme circulaire et analyse de l'émission de fluorescence des résidus tryptophane). En parallèle, le ou les résidus S-nitrosés seront identifiés par mutagenèse dirigée et spectrométrie de masse quantitative.

Axe 3 : Etude de l'incidence de la S-nitrosation *in vivo*

L'axe 2 permettra de comprendre l'incidence de la S-nitrosation sur la fonction et la structure des protéines d'intérêt. L'axe 3 étendra cette analyse *in vivo*. Nous utiliserons des méthodes de transformation de l'hôte végétal afin de pouvoir développer des approches de surexpression ou d'inactivation de l'expression de gènes d'intérêt (approche CRISPR/CAS9 notamment, Lawrenson *et al.*, 2023).

Pour chaque protéine sélectionnée dans l'axe 2, l'objectif sera d'obtenir une lignée de plante invalidée dans l'expression du gène correspondant. Sur ce fond génétique, nous surexprimerons ensuite soit la protéine sauvage, soit la protéine mutée sur le/les résidu(s) Cys régulés par S-nitrosation. L'efficacité de la mycorhization sera ensuite étudiée de même que l'effet de la S-nitrosation de la protéine d'intérêt.

Berger *et al.*, 2025, *New Phytologist* 244:2008-2023 ; Calcagno *et al.*, 2012, *Mycorrhiza* 22:259-69 ; Chaudron *et al.*, 2025, *Plant Science* 112472 ; Fiorilli *et al.*, 2024, *Annual Review of Phytopathology* 62(1):127-156 ; Inès *et al.*, 2025, *Mycorrhiza* 35(5):54 ; Jeandroz *et al.*, 2016, *Science Signaling* pp. re2 ; Lawrenson *et al.*, 2023, *Methods in Molecular Biology* 2653:221-252 ; Martínez-Medina *et al.*, 2019a, *New Phytologist* 223:1560-1574 ;

Martínez-Medina *et al.*, 2019b, *Journal of Experimental Botany* 70(17):4489-4503 ; Nicolas-Francès *et al.*, 2022, *Frontiers in Plant Science* 13:807249 ; Noceto *et al.*, 2021, *Mycorrhiza* 31(6):655-669 ; Sportes *et al.*, 2021, *Mycorrhiza* 31(6):637-653 ; Wipf *et al.*, 2019, *New Phytologist* 223(3):1127-1142 ; Zhang *et al.*, 2013, *Journal of Plant Physiology* 170(1):74-9 ; Zou *et al.*, 2017, *Scientific Reports* 7:41134.

- Financement du projet – partie Recherche (montants acquis, type de contrat)

Les consommables et les prestations du projet seront notamment financées grâce aux fonds du projet ANR Infinity (80 K€), du PARSADA Get-up (90 K€) ainsi que sur les prestations de service de l'équipe (10 K€/an).

- connaissances et compétences requises

Les étudiants intéressés par le projet devront posséder des compétences en biochimie des protéines, en biologie cellulaire et moléculaire, en signalisation cellulaire et en physiologie végétale.

- Résumé

Le monoxyde d'azote (NO) joue un rôle central dans la physiologie des plantes, par exemple dans la réponse immunitaire ou dans la mise en place et le maintien de la symbiose avec les champignons mycorrhiziens à arbuscules. Cette symbiose, essentielle pour la croissance et l'adaptation de très nombreuses plantes aux stress environnementaux, repose sur un dialogue moléculaire où le NO agit à la fois comme signal précoce et régulateur à long terme. Il est produit rapidement par les racines en réponse aux exsudats fongiques et participe à la colonisation racinaire, au remodelage cellulaire et à la modulation des défenses végétales. Cependant, ses mécanismes d'action restent mal connus.

L'objectif de la thèse sera d'identifier et de caractériser des protéines végétales ou fongiques régulées par S-nitrosation (modification post-traductionnelle réversible dans laquelle le NO se lie à certains résidus cystéine de protéines cibles). Cette étude visera à élucider le rôle fonctionnel du NO dans la symbiose entre la plante modèle *Medicago truncatula* et le champignon modèle *Rhizophagus irregularis*.

La démarche expérimentale sera articulée en 3 axes :

Axe 1 : Identification des protéines S-nitrosées dans les racines colonisées ou non et les tissus aériens, à différents stades de la symbiose, *via* la technique du *Biotin-Switch* (remplacement du NO par une étiquette biotine) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

Axe 2 : Analyse *in vitro* de l'impact du NO sur la structure (dichroïsme circulaire, fluorescence) et la fonction (tests d'activité) des protéines cibles produites en système hétérologue.

Axe 3 : Validation *in vivo* par transformation génétique (CRISPR/Cas9, surexpression de protéines sauvages ou mutées) pour étudier l'effet de la S-nitrosation sur l'efficacité de la mycorhization.

Ce projet s'appuie sur l'expertise de l'équipe relative à la signalisation du NO et à la culture symbiotique, et est destiné à mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulés par le NO lors de la symbiose mycorrhizienne à arbuscules.

Abstract

Nitric oxide (NO) plays a central role in plant physiology, for example in the immune response or in establishing and maintaining symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. This symbiosis, which is essential for the growth and adaptation of many plants to environmental stresses, is based on a molecular dialogue in which NO acts both as an early signal and a long-term regulator. It is rapidly produced by roots in response to fungal exudates and participates in root colonization, cell remodeling, and the modulation of plant defenses. However, its mechanisms of action remain poorly understood.

The objective of the thesis will be to identify and characterize plant or fungal proteins regulated by S-nitrosation (a reversible post-translational modification in which NO binds to certain cysteine residues of target proteins). This study will aim to elucidate the functional role of NO in the symbiosis between the model plant *Medicago truncatula* and the model fungus *Rhizophagus irregularis*.

The experimental approach will be structured around three areas:

Area 1: Identification of S-nitrosated proteins in colonized and non-colonized roots and aerial tissues at different stages of symbiosis, using the Biotin-Switch technique (replacement of NO with a biotin label) followed by mass spectrometry analysis.

Axis 2: *In vitro* analysis of the impact of NO on the structure (circular dichroism, fluorescence) and function (activity tests) of target proteins produced in a heterologous system.

Axis 3: *In vivo* validation by genetic transformation (CRISPR/Cas9, overexpression of wild-type or mutated proteins) to study the effect of S-nitrosation on the efficiency of mycorrhization.

This project draws on the team's expertise in NO signaling and symbiotic culture, and aims to better understand the molecular mechanisms regulated by NO during arbuscular mycorrhizal symbiosis.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous :

2 choix possibles maximum – les intitulés sont ceux d'ABG).

Ex : vous ne pouvez pas sélectionner uniquement informatique lorsqu'il est indiqué informatique, électronique :

- **Biochimie**
- **Biologie**

Indiquez quelques mots clés concernant votre sujet) :

Monoxyde d'azote, S-nitrosation, symbiose mycorhizienne à arbuscules, interactions bénéfiques