

Thèse : Gao XING-HUANG

Titre de la thèse

Analyse biochimique et protéomique des glutarédoxines et de la glutathionylation chez *Chlamydomonas reinhardtii*

Résumé

La glutathionylation est une modification post-traductionnelle réversible se produisant au cours d'un stress oxydatif et/ou nitrosatif et qui joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires. Des données récentes ont suggéré que cette modification pourrait constituer un mécanisme important de régulation et de signalisation chez les organismes photosynthétiques. La réaction inverse, appelée déglutathionylation, est principalement catalysée par les glutarédoxines. Nous avons d'abord analysé les propriétés biochimiques de 4 des 6 GRXs de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les paramètres cinétiques ont été déterminés pour l'oxydoréduction de ponts disulfure, la réduction du déshydroascorbate mais aussi pour la déglutathionylation de substrats artificiels et protéiques. Les résultats indiquent que les GRXs propriétés catalytiques différentes, principalement liées à la classe de GRX considérée, mais aussi à d'autres facteurs, dont le pKa de la cystéine catalytique N-terminale. En outre, nous avons pu montrer que les protéines glutathionylées présentent des réactivités différentes avec les GRXs. Ces résultats suggèrent que glutathionylation pourrait permettre un réglage fin du métabolisme cellulaire en conditions de stress. Aucune méthode fiable n'étant disponible pour l'analyse à grande échelle des protéines glutathionylation dans des conditions physiologiques, nous avons développé une nouvelle approche protéomique pour analyser et identifier simultanément les protéines et glutathionylées et nitrosylées *in vivo*. 46 cibles glutathionylées ont été identifiées dans des conditions de culture normales dans *Chlamydomonas*. La plupart de ces protéines se trouvent dans les chloroplastes et n'ont jamais été trouvées précédemment dans les cellules végétales. En outre, cette méthode a révélé que des profils distincts de glutathionylation peuvent être observés dans différentes conditions de croissance ou de stress. Enfin, notre méthode a été utilisée pour analyser les protéines et glutathionylées et nitrosylée sous différentes conditions de stress. Les résultats indiquent l'existence d'interférences entre ces deux types de modification post-traductionnelle redox.

.....

Thesis title

Biochemical and proteomic analysis of glutaredoxins and glutathionylation in *Chlamydomonas reinhardtii*

Abstract

Protein glutathionylation is a reversible post-translational modification promoted by oxidative and nitrosative stresses which plays an important role in many cellular processes. Recently, emerging evidence suggested that this modification could constitute an important mechanism of regulation and signaling in photosynthetic organisms. The reverse reaction, called deglutathionylation, is mainly catalyzed by glutaredoxins. We have first analyzed the biochemical properties of 4 of the 6 different GRXs of *Chlamydomonas reinhardtii*. Kinetic parameters were determined for disulfide and dehydroascorbate reduction but also for deglutathionylation of artificial and protein substrates. The results indicate that GRXs exhibit striking

differences in their catalytic properties, mainly linked to the class of GRX considered but also to other factors, including the pKa of the N-terminal catalytic cysteine.. Furthermore, glutathionylated proteins were found to exhibit distinct reactivities with GRXs. These results suggest that glutathionylation may allow a fine tuning of cell metabolism under stress conditions. No reliable method being available for large scale analysis of protein glutathionylation under physiological conditions, we have developed a new proteomic approach to analyze and identify glutathionylated and nitrosylated proteins simultaneously *in vivo*. 46 glutathionylated targets have been identified under normal culture conditions in *Chlamydomonas*. Most of these proteins are located in chloroplasts and were never found previously in plant cells. Moreover, this method revealed that distinct profiles of protein glutathionylation can be observed under different growth or stress conditions. Finally, our method was used to analyze protein glutathionylation and nitrosylation under different stress conditions. The results indicate the existence of crosstalk between these two different redox-based protein modifications.

Composition du jury/Comitee members :

Dr. Nicolas Rouhier (Rapporteur) Université Nancy 1

Pr. Paolo Trost (Rapporteur) – University of Bologna

Pr. Graham Noctor (Examineur) – Université Paris-Sud 11

Dr. Olivier Vallon (Examineur) - Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC)/CNRS

Dr. Stéphane Lemaire (Examineur) - - Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC)/CNRS