

## Résumé

**Subject: Proteomic and biochemical analysis of nitrosylation and glutathionylation in the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii***

Living cells have evolved a complex network of signaling pathways which enable them to adapt to diverse environmental challenges. Our increasing understanding of the molecular mechanism of cell signaling has revealed that reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) act as signaling molecules to transfer extracellular or intracellular information and elicit specific responses. ROS/RNS mainly act through a set of reversible post-translational modifications of thiol residues on proteins among which nitrosylation and glutathionylation have emerged as key elements playing a major role in numerous fundamental cell processes and implicated in a broad spectrum of human diseases. Despite ROS and RNS are present in photosynthetic organisms, such modifications have been less studied.

The aim of my project was to investigate in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, the *in vivo* dynamics of nitrosylation and glutathionylation, using a combination of multidisciplinary approaches including proteomic, biochemistry and molecular biology. In response to nitrosative stress, 492 *in vivo* S-nitrosylated proteins and 392 sites of nitrosylation were identified by mass spectrometry. These proteins were found to participate in a wide range of biological processes and pathway such as photosynthesis, stress response and carbohydrate metabolism. Employing a similar strategy, analysis of glutathionylation in response to physiological stresses, specifically high light and heat stress revealed specific stress dependent targeted pathways. In a second part, the redox dependence of the underlying molecular mechanisms was examined for the cytoplasmic GAPDH and ICL, but also the chloroplastic TPI and PGK.

This work has highlighted the existence of a strong interplay between these redox modifications. Unraveling the importance of this crosstalk by characterizing the underlying mechanisms and structural determinants, and its dynamics by quantitative and time-resolved analysis certainly constitute the next step to improve the comprehension of this complex redox network

**Sujet: Analyse protéomique et biochimique de la S-nitrosylation et de la S-glutathionylation chez l'organisme photosynthétique *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Les cellules vivantes ont développé un réseau complexe de voies de signalisation qui leur permet de s'adapter à diverses contraintes environnementales. Notre compréhension croissante des mécanismes moléculaires de signalisation cellulaire a révélé que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les espèces réactives de l'azote (RNS) agissent comme des molécules signal transférant des informations extracellulaires ou intracellulaires et induisant des réponses spécifiques. Les ROS/RNS agissent principalement par le biais d'un ensemble de modifications post-traductionnelles réversibles des résidus thiols sur les protéines parmi lesquelles la nitrosylation et la glutathionylation apparaissent comme des éléments clés qui jouent un rôle important dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux et qui sont impliqués dans un large éventail de maladies humaines. Bien que les ROS et RNS soient présents chez les organismes photosynthétiques, ces modifications ont été moins étudiées.

Le but de mon projet était d'étudier, *in vivo*, chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la dynamique de la nitrosylation et de la glutathionylation, en utilisant une combinaison d'approches multidisciplinaires incluant protéomique, biochimie et biologie moléculaire. En réponse au stress nitrosatif, 492 protéines S-nitrosylées *in vivo* et 392 sites de nitrosylation ont été identifiés par spectrométrie de masse. Ces protéines participent à un large éventail de processus biologiques tels que la photosynthèse, la réponse au stress et le métabolisme du carbone. En employant une stratégie similaire, l'analyse de la glutathionylation en réponse à des contraintes physiologiques, notamment de forte lumière et de choc thermique, a révélé des voies spécifiques de réponse au stress. Dans une deuxième partie, la dépendance redox des mécanismes moléculaires sous-jacents a été examinée pour la GAPDH cytoplasmique et l'isocitrate lyase, mais aussi la triosephosphate isomérase et la phosphoglycérate kinase chloroplastiques.

Ce travail a mis en évidence l'existence d'une forte interaction entre ces modifications redox. Démêler l'importance de ces interactions en caractérisant les mécanismes sous-jacents, ses déterminants structuraux et sa dynamique par des analyses quantitatives et résolues en temps constituera certainement la prochaine étape pour améliorer notre compréhension de ce réseau redox complexe.

**Key words/mots clés: *Chlamydomonas reinhardtii*, S-nitrosylation, S-glutathionylation, biotin-switch, SNOSID, mass spectrometry, redox regulation, ICL, GAPDH, PGK, TPI.**