> Le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur physiologique associé à divers processus chez les animaux, dont l'immunité. Des travaux conduits récemment montrent que les plantes, confrontées à l'attaque d'agents pathogènes, produisent également du NO. Le NO est donc un acteur des voies de signalisation cellulaire activées en réponse à la reconnaissance par les plantes d'agresseurs extérieurs. L'étude des molécules cibles du NO et, plus particulièrement, la caractérisation de protéines S-nitrosylées, a permis d'avoir un premier aperçu des mécanismes fins inhérents à ses fonctions. Le NO serait ainsi impliqué dans l'activation ainsi que dans la désensibilisation des voies de signalisation mobilisées lors de l'immunité chez les plantes. <

Chez les animaux, le monoxyde d'azote (NO) est un médiateur physiologique impliqué dans des fonctions biologiques essentielles dont l'immunité. Sa synthèse est principalement catalysée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) dont trois isoformes ont été identifiées chez l'homme. Les travaux conduits depuis plus d'une vingtaine d'années ont démontré que le NO exerce ses effets en partie par la modification post-traductionnelle de protéines. Trois principales modifications ont été décrites : la métal-nitrosylation, un processus dans lequel le NO réagit avec le métal d'hémo-protéines et de protéines à centres fer-soufre ; la tyrosine nitration qui conduit à la formation de résidus 3-nitro-tyrosine et s'opère via le dioxyde d'azote (NO₂), un radical généré notamment par le peroxynitrite (ONOO⁻) résultant de la réaction entre le NO et l'anion superoxyde (O₂⁻) ; et la S-nitrosylation [1]. Ce dernier mécanisme, aujourd'hui exploré par de nombreuses équipes, désigne la formation réversible d'un nitrosothiol (S-NO) issu de l'établissement d'une liaison covalente entre un groupement thiolate d'un résidu cystéine (Cys) et le NO [2]. La S-nitrosylation revêt un intérêt grandissant dans l'analyse des voies de signalisation cellulaire impliquant le NO. Plus d'une centaine de protéines régulées par S-nitrosylation a pu être identifiée.

Le monoxyde d'azote

Un acteur de l'immunité chez les plantes

Emmanuel Koen^{1,2}, Olivier Lamotte¹,
Angélique Besson-Bard¹, Stéphane Bourque¹,
Valérie Nicolas-Francis¹, Sylvain Jeandroz¹,
David Wendehenne¹

¹UMR 1347 Agroécologie AgroSup
Dijon/Inra/université
de Bourgogne, pôle mécanisme
et gestion des interactions
plantes-microorganismes,
ERL CNRS 6300, 7, rue Sully,
21000 Dijon, France ;
²AgroParisTech, ENGREF,
19, avenue du Maine,
75015 Paris, France.
wendehen@dijon.inra.fr

Les plantes sont également capables de produire du NO et certains de ses dérivés comme le peroxynitrite et le nitrosogluthation (GSNO), un réservoir naturel de NO formé entre le glutathion et le NO [3]. D'importants progrès dans la compréhension des fonctions physiologiques du NO chez les plantes ont été accomplis ces dernières années. Le déroulement de processus aussi divers que la germination, la croissance des racines, la fermeture des stomates, la floraison et la réponse adaptative aux stress abiotiques et biotiques requièrent du NO [4]. Bien qu'encore sujet à controverse, le concept selon lequel le NO pourrait agir comme un acteur des voies de signalisation émerge des nombreuses études consacrées à son rôle chez les plantes. Dans cette revue, nous allons décrire brièvement les mécanismes associés à la synthèse de NO chez les plantes, puis présenter une vue d'ensemble de ses fonctions dans l'immunité, en insistant sur l'importance du processus de S-nitrosylation.

Synthèse de NO chez les plantes

La nitrate réductase (NR) est une enzyme clé de la voie d'assimilation du nitrate. Principalement localisée dans le cytosol, elle catalyse la réduction du nitrate en nitrite en utilisant le NAD(P)H comme source d'électrons. Des travaux débutés dans les années 1980, puis confirmés une décennie plus tard, ont démontré que la nitrate réductase était également capable de réduire le nitrite en NO [5]. L'utilisation de mutants invalidés pour l'expression de la nitrate réductase a permis de confirmer l'implication de celle-ci comme source enzymatique de NO dans divers contextes

Figure 1. Signalisation cellulaire dans l'immunité chez les plantes. **A.** PTI (PAMP-triggered immunity) : la reconnaissance de l'attaque par un pathogène s'effectue via l'interaction directe entre des PAMP (pathogen-associated molecular patterns) microbiens et des récepteurs PRR (pattern recognition receptors). Ces derniers, transmembranaires, comportent des motifs LRR (leucine-rich repeat) ou LysM (lysine motif) impliqués dans l'interaction moléculaire avec les PAMP. La perception des PAMP déclenche une cascade de signalisation dont les acteurs incluent notamment des protéines kinases dont des MAP kinases, des seconds messagers incluant le Ca^{2+} et des nucléotides cycliques, des lipides, des FAO (formes actives de l'oxygène) et le NO. Ces événements aboutissent à une reprogrammation génique qui se manifeste par l'accumulation de nombreux transcrits. Les gènes correspondants, communément appelés gènes de défense, codent pour des protéines présentant des activités antimicrobiennes, des protéines associées à la synthèse de métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne (comme les phytoalexines), ou impliquées dans le renforcement des parois cellulaires. Les produits des gènes de défense sont également impliqués dans le métabolisme primaire, la signalisation cellulaire et la protection contre le stress oxydant. L'ensemble de ces événements concourt à l'inhibition du développement de l'agent infectieux, et l'interaction entre ce dernier et la plante est dite incompatible. Les microorganismes pathogènes sont capables d'éluder ou de désactiver la PTI grâce à la production d'effecteurs ou de facteurs de virulence (Avr) codés par des gènes Avr microbiens. Les effecteurs ont des fonctions variées (par exemple activités protéases, phosphatases, ou ubiquitine ligase) altérant l'activité de protéines de l'hôte (cibles de pathogénicité) et jouant un rôle clé dans la PTI. La désactivation de cette dernière conduisant à la maladie, la réaction entre la plante et le microorganisme est dite compatible. ETI (effector-triggered immunity) : au cours de l'évolution, les plantes ont développé des systèmes de reconnaissance des effecteurs. Ceux-ci impliquent les protéines R codées par des gènes de résistance. Les protéines R sont principalement cytosoliques et possèdent des domaines de fixation de nucléotides (NBS) (nucleotide binding site) et des motifs LRR. Elles interagissent directement avec les effecteurs ou, suivant les modèles d'étude, reconnaissent ceux-ci indirectement. Dans la reconnaissance indirecte, les protéines R sont activées suite à l'interaction entre l'effecteur et sa cible de pathogénicité, interaction conduisant par exemple à la phosphorylation, l'ubiquitination ou le clivage de cette dernière. La protéine R interagit alors avec le complexe formé entre l'effecteur et la cible de pathogénicité altérée. Ce mécanisme déclenche des événements de signalisation conduisant aux réponses de défense et, par la même, à une interaction incompatible. **B.** Réponse hypersensible : dans l'exemple présenté, des feuilles de tabac ont été infiltrées par la cryptogée, une protéine produite par l'oomycète *Phytophthora cryptogea* qui déclenche une réponse immunitaire. La zone nécrotique, ou RH, témoigne de la mort des cellules directement en contact avec la cryptogée [37]. Lors de l'établissement de la RH, les cellules qui n'ont pas été en contact avec la cryptogée (tissus adjacents à la zone nécrotique ou distants de celle-ci) sont placées dans un état de veille défensive permettant à la plante de résister efficacement à une attaque ultérieure par *Phytophthora cryptogea* ou d'autres agents pathogènes.

Protéine	Espèce végétale	Activité/fonction	Incidence de la S-nitrosylation sur l'activité/fonction	Incidence physiologique de la S-nitrosylation	Réf.
Peroxyredoxine II E	<i>A. thaliana</i>	Peroxynitrite réductase	Inhibition	Accumulation de peroxynitrite	[20]
SABP3 (<i>salicylic-acid binding protein III</i>)	<i>A. thaliana</i>	Anhydrase carbonique	Inhibition de l'activité enzymatique et de la fixation de l'acide salicylique	Non déterminée	[23]
NPR1 (<i>nonexpressor of pathogenesis-related gene 1</i>)	<i>A. thaliana</i>	Activateur du facteur de transcription TGA1	Inhibition par oligomérisation des monomères	Régulation négative de l'induction de gènes de défense	[25]
TGA1	<i>A. thaliana</i>	Facteur de transcription	Activation	Induction de l'expression de gènes de défense	[26]
AtRBOHD (<i>respiratory burst oxidase homolog D</i>)	<i>A. thaliana</i>	NADPH oxydase	Inhibition par blocage de la fixation du cofacteur FAD	Régulation négative de la production de FAO et du développement de la RH	[18]
CDC48 (<i>cell division cycle 48</i>)	Tabac	ATPase	Inhibition de l'activité enzymatique (probablement par blocage de la fixation de l'ATP par encombrement stérique)	Non déterminée	[27]
Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase (GAPDH)	<i>A. thaliana</i> , Tabac	Glycolyse	Inhibition de l'activité enzymatique	Implication dans la RH suspectée mais non démontrée	[22, 36]
Métacaspase AtMC9	<i>A. thaliana</i>	Protéase	S-nitrosylation constitutive maintenant la protéine sous sa forme zymogène inactive	Non déterminée	[21]
Méthionine adénosyltransférase (MAT1)	<i>A. thaliana</i>	Synthèse de S-adenosylméthionine	Inhibition	Implication dans l'inhibition de la synthèse d'éthylène suspectée mais non démontrée	[28]

Tableau 1. Protéines S-nitrosylées caractérisées et impliquées (potentiellement) dans l'immunité chez les plantes.

physiologiques, comme par exemple la fermeture des stomates induite par l'hormone acide abscissique [4]. Outre la nitratre réductase, divers arguments expérimentaux sont en faveur de l'existence d'une enzyme catalysant une activité NOS chez les plantes [6] : d'une part, des activités NOS sont mesurées dans des extraits tissulaires et des organites purifiés, notamment le noyau et les peroxysomes ; et d'autre part, diverses études soulignent la capacité d'inhibiteurs de NOS animales à réduire significativement la synthèse de NO constitutive ou induite par des stimulus variés chez différentes espèces végétales. Une NOS fonctionnelle présentant 40 % de similitude avec les NOS humaines a récemment été caractérisée chez *Ostreococcus tauri*, une algue verte classée dans le règne des plantes [7]. En revanche, dans les génomes des plantes terrestres séquencés à ce

jour, aucun gène possédant une identité de séquence avec les gènes animaux codant pour les NOS n'a pu être identifié. De manière plus générale, les différentes approches entreprises pour identifier le ou les enzymes susceptibles de catalyser une activité NOS chez les plantes supérieures ont échoué [8]. Ce constat est à l'origine de controverses quant à l'existence même d'une protéine à activité NOS chez les plantes supérieures [8, 9].

Signalons que d'autres voies de synthèse de NO, enzymatiques ou non, et utilisant des polyamines ou le nitrite comme substrats, ont également été rapportées [3, 4]. Pour l'essentiel, ces voies restent énigmatiques.

Figure 2. Rôle du NO dans les voies de signalisation cellulaire inhérentes à l'immunité chez la plante modèle *A. thaliana*. Suite à la reconnaissance de l'agent infectieux, le NO est produit via la NOS, NR et/ou une activité NOS. Cette production est dépendante du Ca^{2+} et implique le canal cationique CNGC2 (cyclic nucleotide-gate channel 2) et une ou plusieurs calmodulines (CaM). Le NO produit est un composant des voies de signalisation régulant positivement la production de formes actives de l'oxygène catalysée par la NADPH oxydase RBOHD (respiratory burst oxidase homologue D), la production/mobilisation des seconds messagers GMPc et Ca^{2+} , et l'activation de protéines kinases incluant des MAPK, des protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} (CDPK) et des protéines kinases SnRK

(SnF1-related protein kinase) apparentées aux protéines kinases dépendantes de l'AMP des animaux. Ces processus conduisent à l'expression de gènes de défense, les mécanismes sous-jacents n'étant toutefois pas identifiés. En parallèle, le GSNO active le facteur de transcription TGA1 en promouvant la S-nitrosylation et/ou la glutathionylation de 2 résidus Cys engagés dans un pont disulfure lorsque la protéine est inactive. Le complexe TGA1/NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related gene 1) régule ensuite positivement l'expression de gènes de défense. Le NO participe également à la désensibilisation des voies de signalisation en inhibant l'activité de RBOHD par S-nitrosylation, et en favorisant l'oligomérisation des monomères NPR1 en oligomères inactifs. D'autres cibles protéiques de S-nitrosylation ont été identifiées (Tableau 1). L'incidence physiologique de leur S-nitrosylation est à peine connue. Un rôle dans la synthèse de phytohormones impliquées dans les réponses de défense (en particulier l'éthylène) et dans la RH a été proposé sans être encore démontré. THX : thioredoxine.

Le NO, un acteur de la réponse immunitaire chez les plantes

Les deux types de réponse immunitaire après une interaction hôte/pathogène

Les plantes sont confrontées aux agressions de virus et de microorganismes pathogènes, incluant des bactéries, des champignons et des oomycètes. Bien que ne possédant pas de cellules spécialisées dans la reconnaissance et l'élimination des agresseurs, elles sont capables de s'opposer efficacement aux infections. L'attaque par l'agent pathogène peut, en effet, être détectée via la reconnaissance par les cellules végétales de motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Cette reconnaissance, assurée par des récepteurs PRR (pattern recognition

receptors), déclenche une réponse immunitaire basale ou PTI (PAMP-triggered immunity) [10] au site d'infection (Figure 1A). La PTI se manifeste, notamment, par la production de formes actives de l'oxygène (FAO) et l'expression de gènes de défense, dont les protéines correspondantes vont contribuer à endiguer l'infection [11]. Lors de l'interaction hôte/pathogène, certains microorganismes pathogènes produisent des effecteurs, produits de gènes d'avirulence (Avr), capables de désactiver la PTI [12]. Suivant le modèle d'étude considéré, ces derniers peuvent être reconnus, directement ou indirectement, par des protéines de l'hôte végétal codées par des gènes de résistance (R) (Figure 1A)

[11]. Ce second type d'immunité, nommé ETI (*effector-triggered immunity*), se manifeste généralement par la mort des cellules végétales au site d'infection, processus nommé réponse hypersensible (RH) (*Figure 1B*) [12]. Certains des mécanismes moléculaires associés à cette mort cellulaire sont similaires à ceux mis en place lors de la mort cellulaire programmée décrite chez les animaux. Ils impliquent notamment les formes actives de l'oxygène. Plus généralement, la réponse hypersensible aurait pour fonction de confiner l'agresseur à son site de pénétration afin de bloquer son accès aux cellules saines [13]. Précisons enfin que l'ETI, comme la PTI, déclenche la mise en place d'une résistance systémique s'exprimant dans l'ensemble de la plante (*Figure 1A*). Ce mécanisme, à peine élucidé, confère une résistance effective contre un large spectre de microorganismes pathogènes [14]. La possibilité d'activer cette résistance systémique par le traitement direct de plantes d'intérêt agronomique par des PAMP est, depuis plusieurs années, un axe de recherche important dans le domaine de la phytoprotection.

Le mécanisme d'ETI témoigne donc de la coévolution entre les deux protagonistes de l'interaction. Il faut cependant noter que la classification entre PTI et ETI, entre effecteurs et PAMP, entre PRR et protéines R demeure discutable, un PAMP pouvant par exemple se comporter comme un effecteur et déclencher une ETI chez certaines espèces végétales [15].

NO et voies de signalisation cellulaire de l'immunité

Les recherches accomplies au cours des 25 dernières années ont permis d'appréhender les voies de signalisation cellulaire activées lors des réponses immunitaires. De nombreuses protéines médiatrices, de même que des seconds messagers et des phytohormones impliquées dans ces voies, ont été identifiés, et leurs fonctions partiellement caractérisées [11]. Il est d'ailleurs remarquable de constater que certains de ces acteurs de signalisation, par exemple les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), la NADPH oxydase, le GMP cyclique (GMPc) ou le Ca^{2+} sont communs à ceux qui sont mobilisés dans les cellules animales lors de la réponse à de nombreux stimulus. Parmi ceux-ci figure le NO, dont les premières études relatives à son implication dans les processus d'immunité chez les plantes ont été publiées en 1998 [16, 17]. Ces travaux, de même que les nombreuses études publiées ultérieurement, ont démontré que la reconnaissance de l'agent pathogène déclenche une production rapide de NO simultanée à celle des formes actives de l'oxygène [17, 18]. Selon le modèle d'étude, le NO est produit en premier lieu dans les chloroplastes, le noyau ou le cytosol, puis diffuse rapidement dans le milieu extracellulaire et peut être détecté dans l'atmosphère environnant la plante infectée [4]. La nitrate réductase, de même que des activités catalysées par des NOS potentielles, ont été associées à cette synthèse mais très peu de données sont disponibles quant à leur régulation. Celle-ci semble toutefois sous le contrôle de flux calciques opérant du milieu extracellulaire au cytosol. Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ce processus implique CNGC2, un canal cationique potentiellement régulé par les nucléotides cycliques, et est relayé par une ou plusieurs calmodulines (CaM) [19, 20] (*Figure 2*).

Quelles sont les fonctions du NO produit par les cellules végétales confrontées à l'attaque d'agents pathogènes ? Ce questionnement a principalement été abordé par l'analyse des conséquences d'une modification du taux de NO sur les réponses de défense de la plante. On a utilisé trois principales approches : approche pharmacologique utilisant des inhibiteurs de NOS, de la nitrate réductase et des piègeurs de NO ; approche génétique utilisant des plantes invalidées pour l'expression de la nitrate réductase ou surexprimant des protéines métabolisant le NO (hémoglobine, GSNO réductase) ; approche basée sur l'apport exogène de NO *via* des donneurs de NO ou la fumigation des plantes par du NO gazeux. Considérés dans leur ensemble, les résultats obtenus ont démontré que le NO est impliqué dans la résistance des plantes aux microorganismes pathogènes. Par exemple, la suppression de la production de NO induite chez le tabac et *A. thaliana* en réponse au microorganisme pathogène *Botrytis cinerea* s'accompagne d'une plus grande sensibilité de la plante à l'infection [19, 21]. Concernant les mécanismes mis en jeu, les données accumulées convergent vers un rôle dans la communication cellulaire du NO. Celui-ci semble une composante des voies de signalisation opérant en amont de l'activation de protéines kinases, de la production de formes actives de l'oxygène et de la mobilisation des seconds messagers Ca^{2+} et GMPc, et de l'expression de gènes de défense, certains jouant un rôle clé dans la résistance aux pathogènes [4, 20, 22] (*Figure 2*). La possibilité que ces voies gouvernent le développement de la réponse hypersensible a également été proposée [17, 18]. En revanche, la possibilité que le NO puisse exercer une action cytotoxique sur les agents pathogènes a été peu appréhendée.

Identification et premières analyses fonctionnelles des protéines S-nitrosylées

Les résultats résumés ci-dessus ont apporté un premier regard sur les fonctions potentielles du NO dans l'immunité chez les plantes. Bien qu'informatifs, ils n'ont toutefois pas permis d'établir précisément les mécanismes moléculaires sous-jacents à ses fonctions. De plus, compte tenu du manque de spécificité de certaines des approches développées, par exemple l'utilisation de composés pharmacologiques dont les cibles suspectées n'ont pas été formellement identifiées chez les plantes, le concept que le NO puisse agir comme acteur de signalisation a été et reste sujet à controverses [9]. Face à ce constat, une recherche active des protéines directement régulées par le NO *via* le mécanisme de S-nitrosylation a été entreprise ces dernières années. Celle-ci a grandement bénéficié de la mise au

Figure 3. Technique du biotin switch. Dans l'exemple présent, les résidus cystéine sont représentés sous forme réduite (SH), oxydée (pont disulfure S-S) ou S-nitrosylée. Dans une première étape, les thiols libres sont bloqués par un agent alkylant (formation d'une liaison -S-R où R désigne par exemple un groupement méthyle). Le S-méthyl méthaneethiosulfonate et l'iodoacétamide sont les plus couramment utilisés. Cette étape est réalisée à l'obscurité, la liaison S-nitrosothiol étant photolabile. Après élimination de l'excès d'agent alkylant, les résidus S-nitrosylés sont sélectivement réduits par l'ascorbate. Les thiols libres correspondants sont ensuite marqués par une étiquette biotine. Généralement, les étapes de réduction et de biotinylation se font simultanément. Les

protéines ainsi biotinylées sont ensuite purifiées par affinité, et peuvent être immunodétectées à l'aide d'anticorps dirigés contre la biotine ou directement identifiées par spectrométrie de masse. Le marquage par la biotine permet également de cribler les résidus S-nitrosylés par analyse en spectrométrie de masse. Plusieurs variantes de cette méthode ont été proposées afin d'augmenter sa sensibilité et sa spécificité [38]. Précisons que des sites potentiels de S-nitrosylation sont prédictibles par une analyse informatique (voir par exemple <http://sno.biocuckoo.org/online.php>). La S-nitrosylation peut en effet être favorisée au niveau des motifs hydrophobes des protéines, et par la présence de résidus acides et basiques, dans un environnement de 8 Å cernant le résidu Cys S-nitrosylable [39]. Il ne s'agit toutefois pas d'une règle générale, et il n'existe pas *stricto sensu* de séquence consensus de S-nitrosylation (adapté de [23]).

point par l'équipe de S.H. Snyder de la technique du *biotin switch* [23] (Figure 3). Cette technique consiste à substituer au groupement NO engagé dans la liaison S-nitrosothiol une étiquette biotine. Une fois biotinylées, les protéines initialement S-nitrosylées sont purifiées par affinité, puis analysées par spectrométrie de masse pour identification. Cette technique résout en partie le problème lié à la labilité de la liaison S-nitrosothiol, qui constitue un frein important à l'étude des protéines S-nitrosylées. Sur la base de cette technique, on a développé principalement deux stratégies afin d'identifier des protéines S-nitrosylées dans les processus d'immunité chez les plantes : approche ciblée sur des protéines d'intérêt, et approche sans *a priori* à partir de tissus ou de suspensions cellulaires exposés à des microorganismes pathogènes, des PAMP ou des effecteurs. À ce jour, une cinquantaine de protéines S-nitrosylées a ainsi été identifiée, dont une dizaine ont fait l'objet d'études fonctionnelles approfondies (Tableau 1). Il ressort de ces études que la S-nitrosylation module l'activité de ces protéines en ciblant directement des résidus Cys de sites actifs [24-28], en promouvant la formation de ponts disulfures [29, 30], et en bloquant la fixation de cofacteurs (FAD ou ATP) par encombrement stérique [31, 32]. Les données acquises pour les protéines NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related gene 1*) et RBOHD (*respiratory burst oxidase homologue D*) sont détaillées ci-dessous à titre d'exemple (Figure 2).

NPR1

NPR1 est une protéine centrale des voies de signalisation cellulaire associées à l'immunité chez les plantes. Cette protéine a été identifiée

lors d'un criblage de mutants d'*A. thaliana* n'exprimant plus le gène *PR* (*pathogenesis-related*)-1 codant pour une protéine marqueur des réponses de défense [33]. Le mutant correspondant, *npr-1*, présente une sensibilité accrue à divers agents pathogènes. Dans les cellules non infectées, NPR1 est présente dans le cytosol sous forme d'homo-oligomères inactifs. Les monomères formant le complexe sont associés par des ponts disulfures impliquant cinq résidus (Cys-82, Cys-150, Cys-155, Cys-160 et Cys-216). Lors de la stimulation des réponses de défense, l'oligomère est dissocié en monomères par une réduction des ponts disulfures grâce à une thioredoxine [29]. Les monomères sont ensuite transloqués dans le noyau où ils interagissent et activent le facteur de transcription TGA1 régulant positivement l'expression de différents gènes de défense, dont *PR-1* [30]. Tada *et al.* [29] ont rapporté que le GSNO S-nitrosyle les monomères NPR1 *in vitro*. Ce mécanisme, ciblé sur le résidu Cys-156, favorise leur assemblage en oligomères inactifs (Figure 2). Les auteurs suspectent que la S-nitrosylation du résidu Cys-156 pourrait promouvoir un changement de conformation facilitant la formation des ponts disulfures entre monomères.

Ce modèle a été complété par l'étude de l'incidence du NO sur le facteur de transcription TGA1 [30]. Ce dernier comporte quatre résidus Cys formant deux

ponts disulfures intramoléculaires (Cys-260 et Cys-266 ; Cys-172 et Cys-287), maintenant la protéine sous forme inactive. *In vitro*, le GSNO provoque la S-nitrosylation et/ou la glutathionylation des résidus Cys-172 et Cys-287 et favorise sa fixation sur la région promotrice de certains gènes de défense, ce processus étant facilité par la protéine NPR1 sous sa forme monomérique (Figure 2). D'après les auteurs de cette étude, le GSNO induirait un changement de conformation permettant une plus forte interaction avec l'ADN. Ils n'ont toutefois pas pu établir laquelle des deux modifications post-traductionnelles induites par le GSNO, S-nitrosylation ou glutathionylation, était responsable de la fixation accrue aux régions promotrices. De plus, le mécanisme sous-jacent à la réduction du pont disulfure engagé entre les résidus Cys-172 et Cys-287 n'a pas été caractérisé.

Les observations selon lesquelles le NO active TGA1 et inactive NPR1 ne sont pas forcément contradictoires. Elles suggèrent davantage l'existence d'une hiérarchie dans la succession des événements impliquant le NO : celui-ci pourrait d'abord favoriser l'activation de TGA1 puis, dans une seconde phase, exercer un contrôle négatif sur l'expression des gènes cibles de TGA1 en induisant l'oligomérisation des monomères NPR1 en oligomères inactifs.

RBOHD

Les protéines RBOH sont les homologues de la sous-unité gp91phox des NADPH oxydases de mammifères [40]. Ces protéines sont ancrées dans la membrane plasmique via six domaines transmembranaires, les régions amino et carboxy-terminales étant cytosoliques. Elles catalysent la réduction à un électron de l'oxygène extracellulaire en O_2^- en utilisant le NADPH cytosolique comme donneur d'électron [34]. O_2^- est ensuite rapidement réduit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La plante modèle *A. thaliana* comporte 10 gènes codant pour des protéines RBOH, l'isoforme AtRBOHD constituant l'une des principales sources de formes actives de l'oxygène en réponse à une attaque pathogène [35]. Récemment, Yun *et al.* [31] ont apporté des arguments en faveur d'un rôle du NO comme régulateur physiologique de l'activité d'AtRBOHD. Plus précisément, ces auteurs ont démontré qu'AtRBOHD est S-nitrosylée *in vitro* suite à l'exposition de la protéine au GSNO, mais également *in vivo* lors de l'infection de feuilles d'*A. thaliana* par la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. La S-nitrosylation inhibe l'activité de l'enzyme et porte sur le résidu Cys-890 localisé dans la région carboxy-terminale. Une prédiction structurale suggère que la S-nitrosylation du résidu Cys-890 modifie la position spatiale du résidu Phe-921 inclus dans le site de fixation du FAD et impliqué dans le transfert de l'électron du NADPH à l'oxygène. Ce mécanisme empêcherait la fixation du FAD ou déstabiliserait ce dernier.

En termes fonctionnels, il a été proposé que l'inhibition de AtRBOHD par S-nitrosylation de Cys-890 constituerait un mécanisme qui permet de moduler négativement le taux de FAO produit lors des interactions plante/pathogène et, en conséquence, le développement de la réponse hypersensible. Dans la mesure où le NO est également l'un des événements requis pour l'activation de RBOHD (Figure 2), de façon similaire à la voie de signalisation NPR1/TGA1, il serait impliqué à la fois dans le contrôle positif et négatif de la production de formes actives de

l'oxygène, catalysée par cette NADPH oxydase. Là encore, ces données renforcent le concept d'une action temporelle du NO dans la régulation des acteurs de signalisation cellulaire. D'une façon plus générale, l'observation que le résidu Cys homologue à Cys-890 chez les NADPH oxydases de l'homme et de la drosophile est S-nitrosylable *in vitro* suggère que cette modification post-traductionnelle pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de la réponse immunitaire dans les règnes animaux et végétaux [31].

Conclusion et perspectives

Les résultats présentés dans cette synthèse étayent le concept selon lequel le NO est un acteur des voies de signalisation inhérentes au processus d'immunité chez les plantes. Dans ce contexte, l'apport de l'identification et de la caractérisation fonctionnelle des protéines S-nitrosylées est incontestable, et les études correspondantes ont contribué à une meilleure compréhension des fonctions du NO. Elles soulignent, notamment, un rôle de ce dernier à la fois dans l'induction des voies de signalisation, par exemple à travers l'activation de TGA1, mais aussi dans leur régulation négative, en particulier par l'inhibition de la NADPH oxydase et de NPR1. D'une façon plus générale, les recherches accomplies ont montré que les mécanismes de signalisation impliquant le NO reposent sur des stratégies similaires chez les plantes et chez les animaux.

Malgré les importants progrès réalisés ces dernières années, de nombreuses questions restent en suspens, en particulier celles relatives aux sources enzymatiques de NO et à l'incidence fonctionnelle de la S-nitrosylation sur les nombreuses protéines identifiées. Outre la S-nitrosylation, l'implication du processus de tyrosine nitration dans la réponse des plantes aux stress biotiques n'a été que peu appréhendée [18]. Au-delà de leur intérêt en termes de connaissances fondamentales, ces recherches pourraient également aboutir au développement de nouvelles approches de protection des plantes cultivées contre les parasites. ♦

SUMMARY

Nitric oxide is a major player in plant immune system

In animals, nitric oxide (NO) functions as a ubiquitous signaling molecule involved in diverse physiological processes such as immunity. Recent studies provided evidence that plants challenged by pathogenic microorganisms also produce NO. The emerging picture is that NO functions as a signal in plant immunity and executes

part of its effects through posttranslational protein modifications. Notably, the characterization of S-nitrosylated proteins provided insights into the molecular mechanisms by which NO exerts its activities. Based on these findings, it appears that NO is involved in both the activation and the negative control of the signaling pathways related to plant immunity. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Nous souhaitons remercier l'Agence nationale de la recherche, la région Bourgogne, l'université de Bourgogne et le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche pour le soutien de nos activités de recherche.

RÉFÉRENCES

- Martínez-Ruiz A, Cadenas S, Lamas S. Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2011 ; 51 : 17-29.
- Hess DT, Stamler JS. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 4411-8.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT. On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci* 2011 ; 16 : 160-8.
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2008 ; 59 : 21-39.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci* 1999 ; 4 : 128-9.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB. Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol* 2009 ; 184 : 9-14.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, et al. 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* 2010 ; 22 : 3816-30.
- Fröhlich A, Durner J. The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Sci* 2011 ; 181 : 401-4.
- Planchet E, Kaiser WM. Nitric oxide production in plants: facts and fictions. *Plant Signal Behav* 2006 ; 1 : 46-51.
- Monaghan J, Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 2012 ; 15 : 349-57.
- Bernoux M, Ellis JG, Dodds PN. New insights in plant immunity signaling activation. *Curr Opin Plant Biol* 2011 ; 14 : 512-8.
- Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. *Nature* 2006 ; 444 : 323-9.
- Coll NS, Epple P, Dangl JL. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* 2011 ; 18 : 1247-56.
- Spoel SH, Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* 2012 ; 25 : 89-100.
- Thomma BP, Nürnberger T, Joosten MH. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 2011 ; 23 : 4-15.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 10328-33.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998 ; 394 : 585-8.
- Vandelle E, Delledonne M. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci* 2011 ; 181 : 534-9.
- Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, et al. Nitric oxide production mediates oligogalacturonides-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 2012 ; 35 : 1483-99.
- Ma W, Berkowitz GA. Ca^{2+} conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol* 2011 ; 190 : 566-72.
- Asai S, Yoshioka H. Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* 2009 ; 22 : 619-29.
- Gaupels F, Kurthukulangarakoola GT, Durner J. Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Curr Opin Plant Biol* 2011 ; 14 : 707-14.
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2001 ; 3 : 193-7.
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, et al. S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 2007 ; 19 : 4120-30.
- Belenghi B, Romero-Puertas MC, Vercammen D, et al. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 1352-8.
- Wawer I, Bucholtz M, Astier J, et al. Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem J* 2010 ; 429 : 73-83.
- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, et al. S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 2131-7.
- Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J. Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 4285-91.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, et al. Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 2008 ; 321 : 952-6.
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, et al. Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* 2010 ; 22 : 2894-907.
- Yun BW, Feechan A, Yin M, et al. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 2011 ; 478 : 264-8.
- Astier J, Besson-Bard A, Lamotte O, et al. Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogam signaling in tobacco cells. *Biochem J* 2012 ; 447 : 249-60.
- Dong X. NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 2004 ; 7 : 547-52.
- Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* 2012 ; 17 : 9-15.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD. *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 517-22.
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Matte A, et al. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* 2008 ; 8 : 1459-69.
- Bourque S, Dutarte A, Hammoudi V, et al. Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol* 2011 ; 192 : 127-39.
- Forrester MT, Foster MW, Benhar M, Stamler JS. Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radic Biol Med* 2009 ; 46 : 119-26.
- Marino SM, Gladyshev VN. Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *J Mol Biol* 2010 ; 395 : 844-59.
- Stasia MJ. La granulomatose chronique X^e: un fabuleux modèle d'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 526-32.

TIRÉS À PART

D. Wendehenne

Tarifs d'abonnement m/s - 2013

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 330 dans ce numéro de m/s**