

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉTERMINER L'IMPACT DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE ET
D'UNE INFECTION VIRALE SUR LES PORES NUCLÉAIRES
DE CELLULES VÉGÉTALES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

PAR
JOËLLE RANCOURT

JANVIER 2022

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier grandement mon directeur de maîtrise, Dr Hugo Germain, pour m'avoir accueillie à bras ouverts dans son laboratoire. Il m'a offert la chance de faire mes premiers pas en recherche par l'entremise de stages et d'un poste comme assistante de recherche lors de la fin de mes études de premier cycle. Par la suite, il m'a donné l'opportunité de continuer de travailler avec sa merveilleuse équipe sous la forme d'une maîtrise. Je n'aurai pu rêver d'un meilleur directeur de recherche ou d'un projet plus intéressant sur lequel travailler durant ces dernières années. Merci de m'avoir proposé un projet si passionnant et de m'avoir fait confiance pour le mener à terme. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa disponibilité, son soutien et tous ces conseils.

Merci au Dr Lionel Berthoux d'avoir accepté d'être mon co-directeur de maîtrise. Son expertise et ses nombreuses connaissances en virologie ont été essentielles au bon déroulement du projet. Je tiens spécialement à le remercier de toujours amener ces étudiants à produire du travail de qualité. Merci d'avoir porté un regard critique sur les résultats obtenus et de soulever des idées novatrices quant à la façon d'expliquer ces résultats.

Je ne peux continuer mes remerciements sans dire un énorme merci à Mélodie B. Plourde, professionnelle de recherche au sein du laboratoire. Elle a été d'un grand soutien au cours des dernières années et elle était toujours prête à m'aider. Son expertise en travail de laboratoire est sans égal. Elle avait constamment des solutions pour surmonter les différents obstacles survenus lors du projet. Je tiens à la remercier pour sa gentillesse, son écoute et tous ses encouragements.

Un merci spécial à tous mes collègues de laboratoire et à l'équipe du Dr Isabel Desgagné-Penix. J'aimerais les remercier pour leurs appuis constants autant au niveau scientifique qu'émotionnel. Ils ont fourni une ambiance de travail joyeuse et pleine de rires. Je veux dire un merci particulier à Ingrid Benerice Sanchez, une amie et collègue.

Elle a été d'une grande aide tout au long de ma maîtrise. Notamment, elle a apporté une contribution considérable lors de l'optimisation du protocole d'extraction.

Je veux remercier mes parents, Denis Rancourt et Olivyne Paradis, de m'avoir encouragé à poursuivre mes études au cycle supérieur. Merci aussi à mon conjoint, Samuel Laporte, pour son soutien et support moral.

Je tiens à dire merci aux différents organismes subventionnaires. En premier lieu, je souhaite remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) qui a subventionné mes stages de premier cycle dans le laboratoire du Dr Hugo Germain. Ce support financier m'a permis de découvrir mon intérêt envers la recherche et a contribué à ma décision de continuer mes études au niveau de la maîtrise. Je veux aussi remercier le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQNT) pour le financement de mes travaux de maîtrise. Leurs aides financières m'a permis de me concentrer pleinement sur mes travaux de recherche et de mener le projet à terme.

RÉSUMÉ

Les pores nucléaires végétaux sont composés de 33 protéines différentes du nom de nucléoporines. Ils possèdent plusieurs copies d'une même nucléoporine dus à leur symétrie octogonale. Par conséquent, il y a plusieurs centaines de nucléoporines dans chaque pore. Leur fonction principale consiste à médier les échanges entre le noyau et le reste de la cellule. Cependant, des études récentes ont démontré que les pores nucléaires végétaux sont impliqués dans plusieurs autres fonctions comme la régulation de l'expression des gènes, la mitose et la réponse immunitaire. Effectivement, il a été établi que des nucléoporines spécifiques sont nécessaires pour le bon fonctionnement de la résistance aux maladies chez les plantes. Cela est sensé compte tenu du rôle primordial du transport nucléocytoplasmique lors de la réponse de défense végétale. Toutefois, l'effet de la réponse immunitaire sur chaque nucléoporine est encore méconnu. De plus, il a été démontré que divers virus humains modifient les pores nucléaires de leur hôte afin de faciliter le processus d'infection. Pourtant, l'effet des phytovirus sur les nucléoporines végétales n'a jamais été investigué auparavant.

Cela nous a menés à rechercher l'effet d'une infection par *Plantago asiatica mosaic virus* et de l'activation de réponse de défense sur les pores nucléaires végétaux de l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*. Nous avons posé comme hypothèse que ces stress affecteraient des nucléoporines spécifiques et que ces impacts seraient détectables par spectrométrie de masse. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons inoculé des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* avec *Plantago asiatica mosaic virus* ou activé la réponse de défense via un signal hormonal. Les noyaux des feuilles traitées ont été extraits puis analysés par spectrométrie de masse. Cela a permis de déterminer de façon quantitative les différences au niveau des nucléoporines entre des plants contrôles, infectés par le phytovirus ou en réponse de défense.

Au cours du projet, nous avons optimisé un protocole d'extraction de noyaux permettant de détecter 30 nucléoporines végétales sur 33 par spectrométrie de masse. Nous avons démontré que *Plantago asiatica mosaic virus* diminuait significativement l'abondance de la nucléoporine Nup1 dans le noyau des feuilles infectées. Nous avons aussi découvert que les nucléoporines Aladin, Nup214 et Seh1 étaient significativement moins abondantes dans le protéome nucléaire suivant l'activation de la réponse de défense révélant de nouvelles nucléoporines d'intérêt en relation avec la réponse immunitaire végétale.

Mots-clés : Nucléoporine, noyau, protéome, virus, immunité, *Arabidopsis thaliana*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	viii
LISTE DES SYMBOLES.....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1 Situation actuelle dans le domaine de l'agriculture.....	1
1.1.1 Augmentation de la demande	1
1.1.2 Les phytopathogènes, un obstacle incontestable	2
1.1.3 Solutions actuelles pour contrer les phytovirus	4
1.2 La réponse immunitaire végétale.....	5
1.3 Les pores nucléaires végétaux	7
1.3.1 Transport nucléocytoplasmique.....	7
1.3.2 Structure.....	9
1.3.3 Fonctions autres que le transport nucléocytoplasmique	13
1.4 Projet de recherche	15
1.4.1 Problématique, objectifs et hypothèse	15
1.4.2 Choix du modèle et des approches expérimentales	17
CHAPITRE II	
L'INFECTION PAR <i>PLANTAGO ASIATICA MOSAIC VIRUS</i> ET L'ACTIVATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE AFFECTENT LES PORES NUCLÉAIRES D'<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>.....	21
2.1 Contribution des auteurs.....	21
2.2 Résumé de l'article	21
2.3 Article scientifique	23
Abstract.....	24
Introduction	25

Results	27
An optimized nuclear extraction protocol provides samples enriched in nuclear proteins while limiting damage to nuclear envelopes.....	27
The nuclear proteomes of <i>A. thaliana</i> leaves vary according to treatments.....	28
Mass spectrometry detection of 30 different nucleoporins displaying diverse abundance levels	29
Nup1/Nup136 is less abundant in nuclear proteomes of PIAMV-infected leaves.....	31
Aladin, Nup214 and Seh1 are less abundant in nuclear proteomes of INA treated leaves	31
Nucleoporins with a significant quantitative change are located at NPC's extremities	32
Discussion.....	32
Materials and methods.....	37
Plant materials and growth conditions.....	37
PIAMV-GFP inoculation	37
INA treatment	38
Nuclear extraction.....	38
Mass spectrometry	39
Protein identification and data analysis	40
Protein detection by immunoblotting	41
qRT-PCR	41
Acknowledgements	42
References	42
Figure descriptions	49
Figure	52
CHAPITRE III	
DISCUSSION	63
3.1 Retour sur les résultats obtenus	63
3.2 Conclusion.....	70
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	73

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Prédiction de la croissance de la population mondiale.....	1
1.2	Schéma d'un pore nucléaire imbriqué dans l'enveloppe nucléaire.	8
1.3	Cycle du transport nucléocytoplasmique sélectif.	10
1.4	Transport des karyophérines via les liaisons avec le domaine FG des nucléoporines.....	11
1.5	Comparaison des nucléoporines formant les pores nucléaires chez les organismes végétaux et vertébrés.....	12
1.6	Cycle de vie de l'organisme modèle végétal <i>A. thaliana</i>	18
1.7	Plant de <i>Nicotiana benthamiana</i> infecté par PLAMV-GFP.	19

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CP	Protéine de capsides
DAPI	4,6-diamidino-2-phénylindole
DDA	Data dependent acquisition
DTT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
emPAI	Exponentially modified protein abundance index
ETI	Effector-triggered immunity
EtOH	Éthanol
ES MS/MS	Electrospray mass spectrometry
FDR	False discovery rate
FG	Motif répétitif de phénylalanine-glycine
FRQNT	Fonds de recherche du Québec en Nature et Technologies
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Protéine fluorescente verte
GTP	Guanosine triphosphate
HCl	Chlorure d'hydrogène
HSP70c	Heat shock protein 70 cytoplasmic
INA	Acide 2,6-dichloroisocotinique

KCl	Chlorure de potassium
LB	Luria-Bertani
LFQ	Label-free quantification
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MS	Mass spectrometry
NanoLC	Nanoscale capillary liquid chromatography
NE	Nuclear envelope
NES	Signal d'exportation nucléaire
NLS	Signal de localisation nucléaire
NPC	Nuclear pore complexes
NRB	Nuclear resuspension buffer
Nup	Nucléoporine
OGM	Organisme génétiquement modifié
PCR	Polymerase chain reaction
PIAMV	<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PR	Protéines associées à la pathogenèse
PTI	Pattern-triggered immunity
PVDF	Polyvinylidene difluoride
p-value	Probability value
qRT-PCR	Quantitatif real-time polymerase chain reaction
q-value	Benjamini Hochberg adjusted probability value
RP	Reversed-phase
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WT Col-0	Wild type ecotype Colombia

LISTE DES SYMBOLES

%	Pour cent
°C	Degré Celsius
e	ième
g	Gramme
h	Heure
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
L	Litre
m	Mètre
M	Molaire
mg	milligramme
Min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
nm	Nanomètre
pH	Potentiel hydrogène
rpm	Révolutions par minute
s	Seconde
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µmol	Micromolaire
x g	Times gravity

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Situation actuelle dans le domaine de l'agriculture

1.1.1 Augmentation de la demande

La recherche scientifique est fondamentale. Elle a permis de multiples découvertes autant au niveau technologique que médicale. Ces découvertes ont, entre autres, contribué à nous donner de meilleures conditions de vie et à faciliter notre existence. L'expérience de vie des êtres humains s'est vue augmenter et la mortalité infantile a diminué. Du même coup, le taux de naissances est devenu considérablement plus élevé que le taux de mortalité contribuant à une croissance exponentielle de la population mondiale (Van Bavel 2013). Au début de l'an 2021, le nombre de personnes sur terre avoisinait 7,8 milliards. Selon les prédictions, ce nombre s'élèverait à 9,7 milliards de personnes d'ici 2050 et atteindrait un record de 10,9 milliards en 2100 (Figure 1.1) (United Nations 2019).

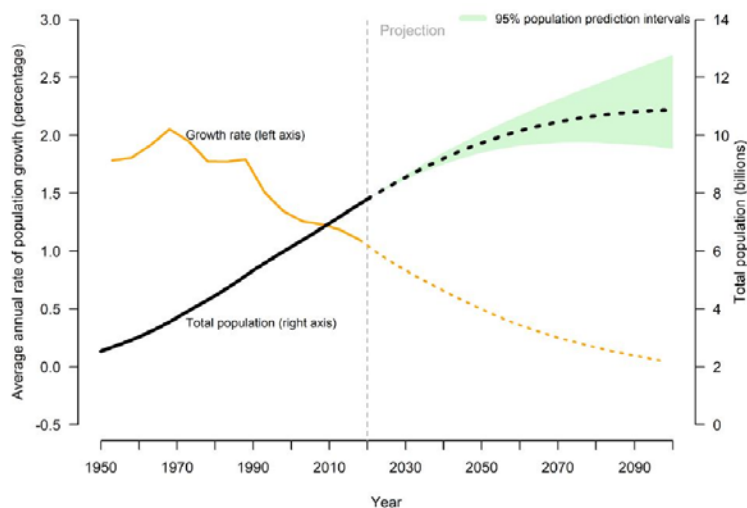


Figure 1.1 Prédiction de la croissance de la population mondiale.
Figure tirée de (United Nations 2019).

Avec cette augmentation constante du nombre d'êtres humains sur terre, il est essentiel de trouver des façons efficaces et novatrices pour subvenir aux besoins de toutes ces nouvelles bouches à nourrir. Selon les estimations, la production mondiale de nourriture en 2050 devra être 60 % plus élevée que celle des années 2005/2007 si nous voulons subvenir à la nouvelle demande prévue (Alexandratos et Bruinsma 2012). Pour ce faire, il est nécessaire de développer des techniques pour augmenter la productivité des cultures tout en diminuant la quantité de nourriture perdue en raison de causes externes (facteurs environnementaux, maladies, insectes, animaux, etc.). L'une ne va pas sans l'autre puisque l'augmentation de la productivité des cultures est généralement associée à une plus grande susceptibilité aux causes externes (Wang et Wang 2014; Ning, Liu, et Wang 2017).

1.1.2 Les phytopathogènes, un obstacle incontestable

Une de ces causes externes est les maladies causées par les phytopathogènes. Ces derniers peuvent, par exemple, se présenter sous la forme de virus, bactéries et mycètes. Les phytopathogènes ont un impact significatif sur la perte de rendement des cultures. Effectivement, ils occasionnent une perte moyenne de rendement de 16 % en prenant en compte tous les types de cultures confondues (Oerke 2006).

Dans certains cas, les phytopathogènes peuvent causer la perte complète d'une récolte ou une baisse sévère du rendement. Cela peut avoir des conséquences humaines catastrophiques. Un des meilleurs exemples est la Grande Famine en Irlande dans les années 1850. À cette période, approximativement 30 % de la population irlandaise avait un régime alimentaire à base de pommes de terre et de lait. Le rendement des récoltes de patates a été gravement affecté par le mildiou de la pomme de terre, une maladie causée par un phytopathogène portant le nom de *Phytophthora infestans*. Cette baisse massive de rendement a coûté la vie à 12 % de la population de l'Irlande, soit un million de morts environ (Garrow 2002). La baisse de rendement dû aux phytopathogènes n'affecte pas seulement la quantité de nourriture disponible dans certains pays, mais a des conséquences significatives sur le plan économique. En effet, les maladies végétales occasionnent une

perte annuelle de plus de 220 milliards de dollars américains à la grandeur du globe (International Plant Protection Convention Secretariat 2021). Parmi ce montant, une perte annuelle globale d'au moins 30 milliards de dollars américains serait due seulement aux phytovirus (Nicaise 2014).

Les phytovirus sont des joueurs majeurs lorsqu'il est question des maladies causées aux cultures. Effectivement, les virus comptent pour presque la moitié des agents pathogènes occasionnant des maladies aux végétaux. Parmi les différentes familles de phytovirus, ceux à acide ribonucléique (ARN) simple brin positif constituent le groupe le plus dommageable économiquement. Actuellement, ils sont la source de plusieurs épidémies dans les cultures autant au niveau des plantations de fruits, de légumes et de végétaux cultivés à des fins d'alimentation animale (Nicaise 2014; He et Creasey Krainer 2020). Un bon exemple est le *Barley yellow dwarf luteovirus*. Il engendre la maladie virale la plus répandue mondialement chez les céréales. Ce phytovirus touche autant les cultures de maïs, de riz, d'orge, d'avoine et de blé, tous des types de céréales présentement essentielles pour subvenir aux besoins alimentaires de la population mondiale (Miller, Liu, et Beckett 2002). Le maïs, le blé et le riz sont considérés, à l'heure actuelle, comme les cultures les plus consommées chez les êtres humains suivi de près par les pommes de terre (King et Slavin 2013; Wale, Platt, et Cattlin 2008). La pomme de terre est largement ciblée par le *Potato leafroll polerovirus*. Celui-ci conduit à une perte annuelle globale de plus de 20 millions de tonnes de pommes de terre amenant un coût dépassant 100 millions de dollars américains en considérant seulement les États-Unis (Nicaise 2014; Wale, Platt, et Cattlin 2008). Un autre exemple est le *Citrus tristeza closterovirus*, un virus affectant divers plants d'agrumes. Il aurait engendré la mort de plus de 100 millions d'arbres fruitiers globalement, détruisant presque des industries complètes et limitant continuellement la production d'agrumes dans de nombreuses régions propices à leur culture (Dawson et al. 2013). Un des phytovirus à ARN simple brin positif le plus connu est le *Papaya ringspot virus*. Ce dernier a engendré des dommages majeurs dans l'industrie de la papaye et aurait pu mener à l'extinction complète de l'espèce dans certains pays. Il a été possible d'éviter des conséquences aussi désastreuses grâce à l'intervention humaine et à l'utilisation de la biotechnologie (Azad, Amin, et Sidik 2014).

1.1.3 Solutions actuelles pour contrer les phytovirus

Il est présentement impossible de soigner un plant infecté par un virus. Les phytovirus sont des parasites intracellulaires obligatoires, c'est-à-dire qu'ils dépendent de la machinerie de leurs hôtes afin de se répliquer et de se propager. Ainsi, ils sont à l'abri à l'intérieur de leur hôte et ne peuvent pas être détruits par des agents chimiques. Cela rend les infections virales particulièrement difficiles à contrôler dans les champs. Les solutions actuelles pour contrer les phytovirus restent encore la destruction des plants infectés puisqu'ils ne peuvent pas être soignés et l'utilisation de mesures préventives (Rubio, Galipienso, et Ferriol 2020; Nicaise 2014).

Ainsi, une étape cruciale dans la protection des cultures face au phytovirus est l'utilisation de mesures préventives. Par exemple, il est possible de s'assurer de la pureté des graines avant de les mettre en terre, c'est-à-dire vérifier l'absence de contamination par des phytovirus autant à l'extérieur qu'à l'intérieur de la graine avant de les semer. Il est aussi possible de sélectionner et cultiver des variétés naturellement résistantes à certains virus. Cependant, la mesure préventive la plus utilisée contre les phytovirus reste encore l'application de pesticides de façon excessive afin de contrôler la population d'organismes vecteurs. Cela prend en compte l'utilisation d'insecticides et d'herbicides afin de détruire les organismes pouvant être porteurs de différents phytovirus (Rubio, Galipienso, et Ferriol 2020; Nicaise 2014). Toutefois, des alternatives à l'utilisation de pesticides sont de plus en plus privilégiées dû au développement de résistances (Hawkins et al. 2018), aux préoccupations concernant leurs effets sur la santé humaine (Nicolopoulou-Stamati et al. 2016; Damalas et Eleftherohorinos 2011) et à la toxicité environnementale associée à certains de ceux-ci (Damalas et Eleftherohorinos 2011; Aktar, Sengupta, et Chowdhury 2009). Ces alternatives incluent, entre autres, l'utilisation d'organisme génétiquement modifié (OGM) afin d'obtenir des variétés de plants résistants à diverses maladies (Nicaise 2014). Les OGM ont déjà fait leurs preuves en ce qui concerne la protection des cultures face aux phytovirus. L'utilisation de plants transgéniques de papayer résistant au *Papaya ringspot virus* en est un bon exemple. Ces plants transgéniques constituent la solution actuelle la plus avancée

technologiquement pour protéger les cultures de papayes face à ce virus. Ils ont eu un impact socioéconomique bénéfique qui s'avère majeur dans certains pays et ils ont démontré l'efficacité des plants transgéniques pour contrer les phytovirus (Azad, Amin, et Sidik 2014). De plus en plus d'alternatives permettant de diminuer l'utilisation de pesticides pour la protection des cultures voient le jour, plus les avancées en biotechnologies évoluent et plus les connaissances sur les relations hôtes-phytopathogènes progressent (Nazarov et al. 2020; Borrelli et al. 2018; Simon-Mateo et Garcia 2011). Cela montre l'importance de la recherche fondamentale permettant de mieux comprendre les mécanismes régissant la réponse immunitaire des plantes et l'infection par les phytovirus.

1.2 La réponse immunitaire végétale

La rivalité entre les végétaux et leurs pathogènes est souvent comparée à une course à l'armement. Une coévolution antagoniste oppose les deux. D'un côté, les phytopathogènes évoluent constamment afin d'éviter la détection par leur hôte ou pour manipuler la réponse de défense des végétaux à leur avantage. En parallèle, les plantes doivent développer des nouvelles stratégies afin de détecter les organismes envahisseurs qui tentent d'échapper à leur système immunitaire (Anderson et al. 2010; Dodds et Rathjen 2010). Si un pathogène est reconnu par la plante, celle-ci va déclencher ses mécanismes de défense afin de combattre l'envahisseur. Dans ce cas, la plante est dite résistante au pathogène puisqu'elle va résister à l'infection et essayer par divers moyens de combattre ce dernier. Une diminution de la croissance du phytopathogène va être observable. Au contraire, un pathogène peut ne pas être reconnu par l'hôte lors de l'infection, ce qui ne conduit pas à une réponse de défense. Ici, l'organisme végétal est dit susceptible au pathogène puisque ce dernier va être capable de l'infecter facilement, et ce, sans entraves. Une augmentation de la quantité de pathogènes dans l'organisme hôte va être observable au fil du temps (Toyoda et al. 2002).

Les végétaux sont dépourvus de cellules immunitaires spécialisées et de système immunitaire adaptatif, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de fabriquer des anticorps.

Ainsi, leur réponse immunitaire repose entièrement sur un système de défense innée. Ils peuvent ressentir la présence de pathogènes et les effets d'une infection de manière directe ou indirecte à l'aide de récepteurs. Par exemple, des récepteurs extracellulaires permettent de détecter des motifs moléculaires associés aux organismes envahisseurs lorsque ces derniers sont présents à la surface des cellules végétales. La détection de ces motifs induit une cascade de signaux conduisant à l'activation de la réponse immunitaire de type PTI (acronyme pour le terme anglais *pattern-triggered immunity*) (Bigeard, Colcombet, et Hirt 2015). Les végétaux possèdent aussi des récepteurs intracellulaires possédant la capacité de détecter des protéines spécifiques excrétées par certains pathogènes afin de faciliter le processus d'infection. Ces protéines portent le nom d'effecteurs. Lorsqu'un effecteur ou les perturbations cellulaires causés par ce dernier sont détectés, une réponse immunitaire de type ETI (acronyme pour le terme anglais *effector-triggered immunity*) est induite (Khan et al. 2018; Surico 2013). Les réponses immunitaires de type PTI et ETI travaillent ensemble de manière collaborative pour assurer une réponse de défense efficace. Bien que l'intensité de la réponse immunitaire et les mécanismes d'activation initiaux suivant la détection par le récepteur diffèrent entre les deux, ils finissent par converger vers de nombreuses réponses similaires en aval. Ces réponses incluent, entre autres, une cascade de protéines kinases, un influx d'ion calcium, une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène, la production de phytohormones comme l'acide salicylique et la reprogrammation des gènes exprimés (Yuan et al. 2021).

La reprogrammation des gènes exprimés dans les cellules végétales suite à la détection d'un organisme pathogène est essentielle lors de la réponse immunitaire. Divers facteurs de transcription associés à la réponse de défense doivent passer à travers les pores nucléaires afin d'atteindre l'intérieur du noyau. Une fois à l'intérieur, ces facteurs de transcriptions interagissent avec le matériel génétique sous forme d'acide désoxyribonucléique (ADN) pour induire la transcription de plusieurs gènes de défense. Ces gènes, maintenant sous la forme d'acide ribonucléique messager (ARNm), sont exportés vers le cytoplasme et traduits afin de produire diverses protéines jouant un rôle dans la réponse de défense (Yuan et al. 2021; Deslandes et Rivas 2011). Parmi ces

protéines, il y a celles associées à la pathogenèse (PR). Comme leur nom l'indique, les protéines PR permettent de combattre les phytopathogènes sous différents angles. Certaines possèdent des propriétés antimicrobiennes, capables d'attaquer directement la paroi des bactéries tentant d'envahir l'organisme végétal. D'autres ont la capacité de reprendre les signaux d'une infection vers les cellules voisines. Cela permet l'activation de la réponse immunitaire chez ces cellules avant même que les pathogènes les attaquent pour empêcher la propagation de l'infection. Par conséquent, la détection d'une quantité accrue de protéines PR dans les cellules végétales est considérée comme une manifestation de l'activation de la réponse immunitaire (Ali et al. 2018).

Ainsi, la communication entre l'intérieur du noyau et le reste de la cellule est un élément clé de la réponse immunitaire végétale. Une modification drastique du protéome nucléaire est ainsi observée à la suite de différents stress, dont une diminution de la température (Bae et al. 2003) et l'activation de la réponse immunitaire de type PTI via des motifs moléculaires associés aux organismes envahisseurs (Fakih et al. 2016; Ayash et al. 2021). Il est donc logique que certains effecteurs excrétés par les phytopathogènes se localisent à l'intérieur du noyau de leur hôte où ils peuvent cibler différentes protéines impliquées dans la réponse de défense végétale (Canonne et Rivas 2012; Schornack et al. 2010; Khan et al. 2018). Par conséquent, le transport nucléocytoplasmique régulé par les pores nucléaires joue un rôle majeur lors des interactions hôtes-phytopathogènes (Deslandes et Rivas 2011).

1.3 Les pores nucléaires végétaux

1.3.1 Transport nucléocytoplasmique

Le noyau est séparé du reste de la cellule par une double membrane, c'est-à-dire l'enveloppe nucléaire. Cette dernière comprend une multitude de pores nucléaires ayant comme rôle principal de médier les échanges entre le cytoplasme et l'intérieur du noyau (Figure 1.2). Ils gouvernent le transit de matière et d'énergie entre l'extérieur du noyau et le nucléoplasme, permettant entre autres la circulation d'informations (Kahms et al. 2011).

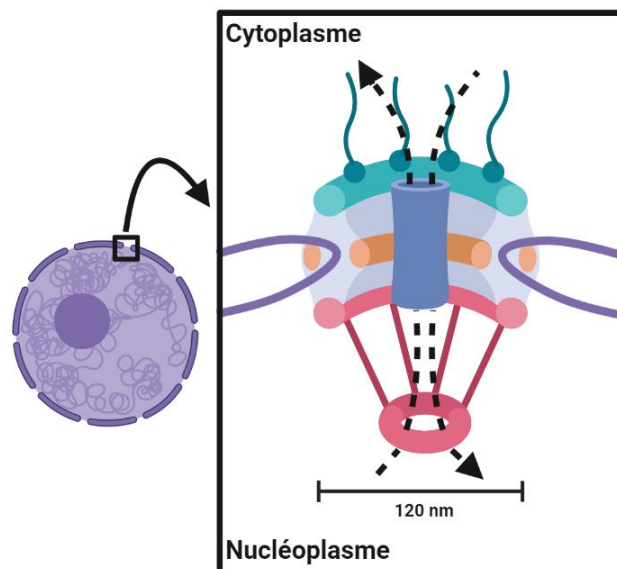


Figure 1.2 Schéma d'un pore nucléaire imbriqué dans l'enveloppe nucléaire.
Schéma réalisé avec le logiciel BioRender.

Le transport à travers les pores nucléaires est formidablement rapide. Effectivement, il peut y avoir jusqu'à 1500 molécules traversant un pore nucléaire à chaque seconde. Les pores nucléaires possèdent un diamètre total de 120 nanomètres (nm) et leur canal central présente un diamètre de 50 nm. Les petites molécules de moins de 5 nm peuvent passer librement à travers le canal central des pores nucléaires par diffusion passive. Cela comprend des ions, des molécules d'eau, des petites protéines et autres petites molécules. Cependant, toutes les molécules plus massives que 5 nm doivent passer par un transport sélectif. Ce transport sélectif permet le déplacement de molécules allant jusqu'à un maximum de 40 nm à travers le canal central des pores nucléaires. Ces plus grosses molécules incluent l'ARN et diverses protéines. Le transport sélectif est, entre autres, essentiel pour le passage de protéines impliquées dans la réplication, la transcription et la structure de l'ADN. Il permet aussi le passage de divers facteurs de transcriptions dont plusieurs impliqués dans la réponse de défense végétale (Kahms et al. 2011).

Les molécules plus larges passant par le transport nucléocytoplasmique sélectif portent le nom de cargo et ce transport est fortement contrôlé par les pores nucléaires. Pour rentrer à l'intérieur du noyau, les cargos doivent généralement contenir un signal de localisation nucléaire (NLS). Le NLS est constitué d'une séquence en acides aminés

pouvant être comparée à une étiquette. Bien que la séquence exacte en acides aminés diverge d'un NLS à l'autre, elle est plus communément hydrophile (Lu et al. 2021). Similairement, les cargos désirant sortir du noyau pour atteindre le cytoplasme doivent généralement porter une étiquette constituée d'un signal d'exportation nucléaire (NES) (Di Ventura et Kuhlman 2016). Le passage d'un cargo requiert l'association de ce dernier avec une protéine de transport du nom de karyophérine. Les protéines de transports permettant à un cargo de rentrer à l'intérieur du noyau sont appelées importines. Au contraire, celles permettant l'export d'un cargo vers le cytoplasme sont appelées exportines. Les importines et exportines se lient respectivement au NLS ou au NES d'un cargo. Elles possèdent un mécanisme d'action similaire. Expliqué de manière simplifiée, les karyophérines utilisent l'énergie relâchée par l'hydrolyse d'un guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP) pour lier un cargo, le transporter à travers les pores nucléaires et le relâcher par la suite. Une fois le cargo relâché, une karyophérine peut se lier à un autre cargo et répéter le cycle (Figure 1.3) (Wente et Rout 2010).

1.3.2 Structure

Les pores nucléaires sont parmi les plus grands complexes protéiques cellulaires. Chez les végétaux, ces pores sont constitués de 33 protéines différentes portant le nom de nucléoporines (Tamura et Hara-Nishimura 2013). Ils possèdent une symétrie octogonale ce qui signifie que chaque nucléoporine se retrouve théoriquement en multiple de huit dans chacun des pores (ex : 8, 16, 24 ou 32 copies). Ainsi, chaque pore nucléaire contient approximativement de 500 à 1000 nucléoporines au total (Beck et Hurt 2017). Les pores nucléaires sont composés de trois types différents de nucléoporines. Les premières sont les nucléoporines transmembranaires. Elles permettent l'ancrage du complexe protéique à l'enveloppe nucléaire. Les deuxièmes sont les protéines de structure. Elles sont essentielles pour établir la forme tridimensionnelle du pore. Les troisièmes sont les nucléoporines possédant un domaine contenant un motif répétitif de phénylalanine-glycine (FG) (Meier et Brkljacic 2010; Wente et Rout 2010).

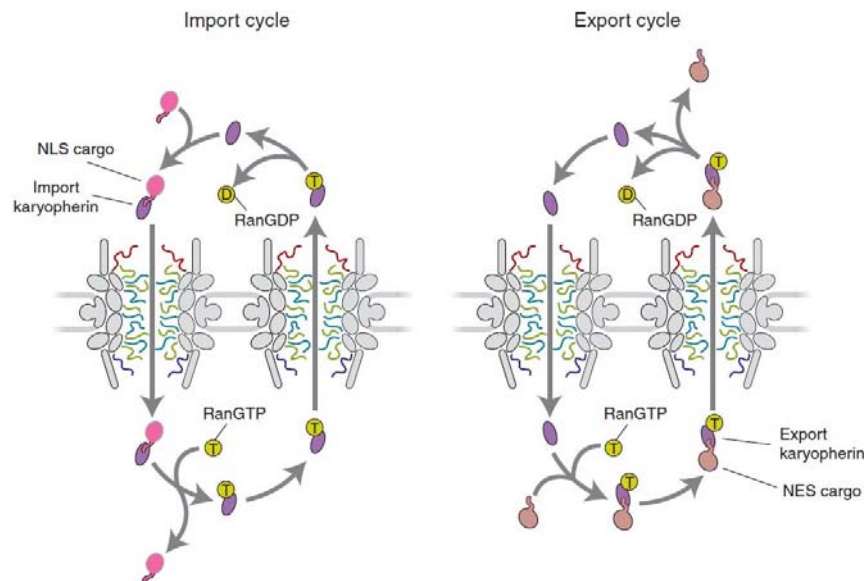


Figure 1.3 Cycle du transport nucléocytoplasmique sélectif.
Figure tirée de (Wente et Rout 2010).

Le domaine FG est essentiel pour le passage sélectif des plus grosses molécules. En effet, elles reconnaissent les karyophérines transportant les cargos et les autorisent à circuler à travers du pore nucléaire. Pour ce faire, les nucléoporines à domaine FG présentent une séquence dépliée d'acides aminés avec répétitions de phénylalanine-glycine entourée d'acides aminés plus hydrophiles. Cette séquence est un site de liaison directe avec les karyophérines porteur d'un cargo. Étant donné que la phénylalanine est un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe, le domaine FG permet le transport dynamique et rapide des karyophérines à travers le canal central du pore nucléaire via des interactions hydrophobes (Figure 1.4). Par conséquent, les nucléoporines à domaine FG régulent le transport nucléocytoplasmique et confèrent aux pores nucléaires sa perméabilité (Walde et Kehlenbach 2010; Terry et Wente 2009; Moussavi-Baygi et al. 2011).

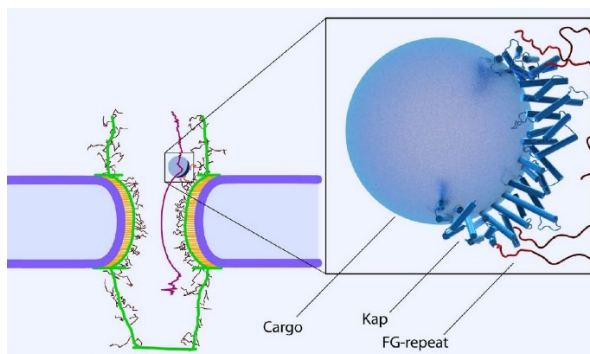


Figure 1.4 Transport des karyophérines via les liaisons avec le domaine FG des nucléoporines.

Figure tirée de (Moussavi-Baygi et al. 2011).

Six différents sous-complexes protéiques s'associent ensemble pour former un seul pore nucléaire végétal (Figure 1.5). Le premier est l'anneau transmembranaire contenant les nucléoporines transmembranaires gp210 et NDC1. Ce sous-complexe est fortement lié à l'enveloppe nucléaire et permet l'ancrage du pore nucléaire. Il est directement associé à l'anneau interne contenant majoritairement des nucléoporines de type structurales. Chez les végétaux, ce sous-complexe comprend les nucléoporines Nup35, Nup93a/b, Nup155, Nup188 et Nup205. Celui-ci est associé au troisième sous-complexe portant le nom de canal central. Ce dernier est composé des nucléoporines à domaine FG Nup54, Nup58 et Nup62. Il est fortement impliqué dans la régulation du transport nucléocytoplasmique dû à son contenu élevé en nucléoporines à domaine FG. Le sous-complexe de l'anneau interne et du canal central forment une liaison avec le sous-complexe de l'anneau externe. Celui-ci est particulier puisqu'il est le seul sous-complexe du pore nucléaire à se retrouver en double, un du côté cytoplasmique et l'autre du côté nucléoplasmique. De plus, l'anneau externe est le sous-complexe contenant le plus grand nombre de nucléoporines différentes. Celui du côté extérieur du noyau est lié au sous-complexe formant les filaments cytoplasmiques. Comme le nom l'indique, ces filaments s'étendent du côté cytoplasmique et sont formés des nucléoporines Aladin, CG1, GLE1, Nup88 et Nup214. Le dernier sous-complexe est celui du panier nucléaire. Il est lié à l'anneau externe situé du côté intérieur du noyau et se déploie vers le nucléoplasme. Il est composé des nucléoporines NUA, Nup1/Nup136 et Nup50a/b chez les végétaux

(Boruc, Zhou, et Meier 2012; Meier et Brkljacic 2010; Tamura et Hara-Nishimura 2013; Tamura et al. 2010).

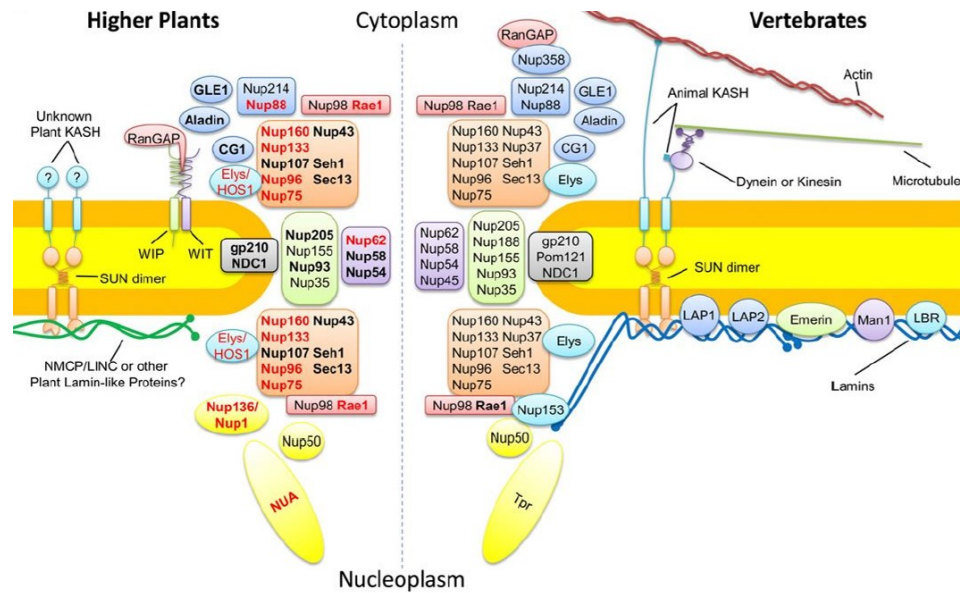


Figure 1.5 Comparaison des nucléopores formant les pores nucléaires chez les organismes végétaux et vertébrés.

Figure tirée de (Boruc, Zhou, et Meier 2012).

Un fait fascinant concernant les pores nucléaires est que ce complexe protéique est hautement conservé chez les organismes eucaryotes. En effet, la structure du pore nucléaire est comparable parmi tous ces organismes. Les trois types de nucléopores, l'assemblage selon les six sous-complexes et la structure spatiale du pore nucléaire sont conservés au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Cependant, le nombre exact de nucléopores différents varient d'un organisme à l'autre (Tamura et Hara-Nishimura 2013). Des études effectuées chez la levure, les végétaux et les vertébrés ont démontré une similarité plus élevée entre les pores nucléaires des plantes et ceux des vertébrés. Bien que la séquence en acides aminés de chacune des nucléopores varie entre ces deux organismes, la plupart des nucléopores des végétaux possèdent un homologue fonctionnel chez les vertébrés. Ces nucléopores homologues sont positionnées au même emplacement au sein des pores nucléaires et sont majoritairement désignées par un nom identique (Figure 1.5). Cependant, il est certain que quelques nucléopores sont

spécifiques aux végétaux et d'autres aux animaux (Tamura et al. 2010; Boruc, Zhou, et Meier 2012).

1.3.3 Fonctions autres que le transport nucléocytoplasmique

Comme mentionné précédemment, la fonction principale des pores nucléaires est la médiation du transport nucléocytoplasmique. Cependant, plusieurs études réalisées dans les deux dernières décennies ont révélé que les pores nucléaires jouent un rôle beaucoup plus divers dans les cellules. Effectivement, les pores nucléaires et les nucléoporines, qui les composent, sont impliqués dans plusieurs fonctions indépendantes du transport nucléocytoplasmique. À ce jour, il est démontré que les pores nucléaires jouent un rôle dans l'organisation et la condensation de la chromatine, la régulation de l'expression des gènes, la réparation de l'ADN et l'organisation du génome (Strambio-De-Castillia, Niepel, et Rout 2010; Ibarra et Hetzer 2015; Capelson et al. 2010). Ils sont aussi impliqués dans le processus de mitose et la régulation du cycle cellulaire (Makhnevych et al. 2003). Par exemples, certaines nucléoporines, dont la nucléoporine animale Nup153, possèdent la capacité de se lier avec des protéines interagissant avec l'ADN résultant en des changements physiques au niveau du degré de compaction de la chromatine. Le passage de la forme compacte de la chromatine (hétérochromatine) en celle peu compacte (euchromatine) favorise la transcription des gènes maintenant accessibles et *vice versa*. Par ce fait, certaines nucléoporines sont fortement impliquées dans la régulation de l'expression des gènes (Kuhn et Capelson 2019; Kadota et al. 2020). D'autres nucléoporines, dont celles du sous-complexe de l'anneau externe, sont essentielles dans l'assemblage des kinétochores lors de la mitose et la ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire (Salina et al. 2003; Rasala et al. 2006).

Des études, réalisées dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, ont révélé le rôle essentiel de certaines nucléoporines végétales lors des interactions hôtes-phytopathogènes. Comme stipulé précédemment, le transport nucléocytoplasmique joue un rôle clé dans la réponse immunitaire végétale. Il est donc sensé que des nucléoporines spécifiques soient nécessaires pour maintenir l'intégrité de la réponse de défense des

plantes. Cela est, entre autres, le cas de la nucléoporine végétale Nup75/Nup85. Cette dernière module la réponse de l'organisme contre certains stress abiotiques comme une concentration de sels trop élevée dans l'environnement ou la présence d'acide abscissique, une hormone végétale impliquée dans la réponse au stress environnemental (Zhu et al. 2017). La nucléoporine Nup88/MOS7 est, quant à elle, essentielle pour l'intégrité de la réponse immunitaire végétale et pour l'accumulation nucléaire de protéines impliquées dans la régulation de la réponse de défenses (Cheng et al. 2009). Les nucléoporines Nup160 (Wiermer et al. 2012; Roth et Wiermer 2012), Seh1 (Wiermer et al. 2012; Roth et Wiermer 2012), NUp98a/b (Genencher et al. 2016), Nup75/Nup85 (Ohtsu et al. 2014) et Nup96/MOS3 (Zhang et Li 2005) sont toutes nécessaires pour la résistance des plantes aux maladies et la défense contre certains phytopathogènes. Effectivement, il est démontré que certaines nucléoporines jouent un rôle dans la réponse de l'hôte végétal face aux bactéries, oomycètes et pathogènes fongiques (Ohtsu et al. 2014; Genencher et al. 2016). Une mutation ou une suppression de ces nucléoporines conduit généralement à une plus grande susceptibilité de la plante face à l'organisme envahisseur. Dû au rôle clé des nucléoporines dans le transport nucléocytoplasmique et la réponse immunitaire végétale, il serait logique que certains pathogènes affectent les pores nucléaires lors du processus d'infection. Cependant, aucune étude ne s'est concentrée sur l'impact des phytopathogènes sur les pores nucléaires végétaux.

Cela n'est pas le cas chez les organismes animaux. En effet, diverses études sur le sujet ont été réalisées avec des pathogènes infectant les cellules animales. Il a été démontré que de multiples virus humains affectent significativement les pores nucléaires de leur hôte afin de faciliter le processus d'infection. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Monette, Pante, et Moulard 2011; Kane et al. 2018; Bhargava, Lahaye, et Manel 2018; Woodward et al. 2009), de l'hépatite B (Schmitz et al. 2010), de l'herpès (Copeland, Newcomb, et Brown 2009), de l'influenza (Konig et al. 2010) et de nombreux adénovirus (Trotman et al. 2001) utilisent à leur avantage des nucléoporines spécifiques pour atteindre l'intérieur du noyau de leur hôte et pouvoir se répliquer. D'autres virus occasionnent la dégradation ou le réarrangement des pores nucléaires lors de l'infection. Certains provoquent une modification dans la composition des pores ou une diminution de

l'abondance de certaines nucléoporines dans le complexe afin d'affecter le transport nucléocytoplasmique de l'hôte (Cohen, Etingov, et Pante 2012; Gustin et Sarnow 2002, 2001; Park et al. 2008; Ghildyal et al. 2009).

1.4 Projet de recherche

1.4.1 Problématique, objectifs et hypothèse

L'augmentation croissante de la population mondiale, et de la demande en nourriture en résultant, est une problématique à laquelle notre génération et les générations futures devront faire face. L'augmentation de la production de nourriture à base végétale et l'augmentation des rendements tout en diminuant la susceptibilité des plantes aux maladies permettront de répondre en grande partie à ce problème. Il a déjà été démontré que l'utilisation de la biotechnologie est une solution efficace pour protéger les végétaux contre certains organismes envahisseurs (Nicaise 2014). Cependant, cela nécessite des connaissances fondamentales considérables sur les mécanismes régissant les interactions entre les plantes et les phytopathogènes.

Étant donné l'importance du pore nucléaire lors de la réponse de défense végétale, il est primordial d'investiguer et de mieux comprendre le rôle de ces pores dans les interactions hôtes-phytopathogènes. Plusieurs nucléoporines spécifiques ont été identifiées comme étant essentielles lors de la réponse de défense des plantes. Cependant, ces nucléoporines ont été principalement identifiées en utilisant des mutations non spécifiques (Cheng et al. 2009; Zhang et Li 2005). Aucune étude générale non ciblée ne s'est intéressée aux rôles des nucléoporines lors des réactions immunitaires. De plus, aucune étude n'a porté sur l'effet que ces dernières pourraient avoir sur les pores nucléaires. En outre, il serait logique que certains organismes envahisseurs affectent les pores nucléaires végétaux au cours de l'infection dû au rôle clé des nucléoporines et du transport nucléocytoplasmique lors de la réponse de défense. Comme mentionné précédemment, de nombreuses études chez les cellules animales ont démontré que divers virus humains ciblent des nucléoporines spécifiques afin de faciliter le processus

d'infection. Dans de multiples cas, une diminution d'abondance de certaines nucléoporines animales pouvait être observée au cours de l'infection virale (Monette, Pante, et Mouland 2011; Cohen, Etingov, et Pante 2012; Gustin et Sarnow 2002). Pourtant, aucune étude semblable n'a été réalisée chez les organismes végétaux. En effet, l'effet que certains phytopathogènes pourraient avoir sur les pores nucléaires de leur hôte lors de l'infection reste méconnu.

Cela nous a mené à investiguer l'impact d'une infection par *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) et de l'activation de la réponse de défense sur les pores nucléaires végétaux de l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*). Nous avons posé l'hypothèse que des nucléoporines végétales spécifiques vont être affectées lors de l'infection virale par ce phytovirus et lors de la réponse immunitaire. Nous avons aussi posé comme hypothèse qu'au moins une partie de ces changements serait structurelle détectable par spectrométrie de masse. Notamment, les études réalisées dans les organismes animaux nous portaient à croire que ces stress pourraient occasionner une variation significative de l'abondance de certaines nucléoporines.

Pour vérifier ces hypothèses et atteindre notre objectif principal, nous avons établi deux objectifs spécifiques. Le premier était d'optimiser un protocole d'extraction de noyaux de feuilles d'*A. thaliana* permettant de détecter la majorité des nucléoporines végétales d'intérêt par spectrométrie de masse. Les études réalisées chez les organismes animaux suggèrent que certains virus ciblent une ou deux nucléoporines différentes (Gustin et Sarnow 2001; Trotman et al. 2001; Schmitz et al. 2010). Il est donc essentiel de détecter la majorité des nucléoporines végétales pour ne pas passer à côté de celles qui sont spécifiquement ciblées par le phytovirus utilisé. Cependant, les protocoles d'extraction de noyaux disponible au moment de commencer le projet de recherche permettaient de détecter un maximum de 13 différentes nucléoporines chez *A. thaliana* sur un total de 33 (Goto et al. 2019). Le deuxième objectif spécifique consistait à déterminer de façon quantitative les différences au niveau des nucléoporines entre des plants contrôles, infectés par le phytovirus PIAMV ou réagissant à un signal hormonal connu pour activer la réponse de défense.

1.4.2 Choix du modèle et des approches expérimentales

A. thaliana est l'organisme modèle végétal utilisé au cours de ce projet de recherche. Elle est une petite plante annuelle à fleurs apparentée à divers plants de légumes et d'épices dont le chou et la moutarde. Une moyenne de six semaines est requise à cette plante pour passer de l'état d'une graine à l'étape de production de nouvelles graines (Figure 1.6). Par conséquent, son cycle de vie complet peut-être facilement étudié en un court laps de temps. Sa capacité à s'autoféconder et à être résistante à différents stress en fait un organisme de choix pour l'étude en laboratoire. *A. thaliana* est un organisme modèle utilisé depuis le milieu du 20^e siècle et est la première plante à avoir eu son génome complet séquencé. L'accumulation des connaissances sur *A. thaliana* et la disponibilité de nombreux protocoles utilisant cette plante en a fait un organisme modèle de choix pour notre projet de recherche (Kramer 2015; Wixon 2001; Van Norman et Benfey 2009).

À titre de modèle d'infection virale, nous avons choisi d'infecter cet organisme modèle végétal avec le phytovirus PIAMV. Ce dernier est un virus à ARN simple brin positif. Son matériel génétique linéaire de 6.13 kilobases (kb) est encapsulé dans un arrangement hélicoïdal façonné de 1000 à 1500 protéines de capsid (CP) (Solovyev et al. 1994; Komatsu et al. 2008). Sa particule virale, ou virion, fait 290 à 530 nm de long et 11 à 13 nm de large. Sa transmission se fait rapidement à partir d'un sol contaminé par l'absorption des virions par les racines. Les virions de PIAMV possèdent une grande stabilité dans la terre ce qui facilite la propagation du virus et rend l'infection virale difficile à combattre. PIAMV s'avère capable d'infecter plusieurs plantes dont le plantain et le lys. Il occasionnerait jusqu'à 80 % de pertes dans les serres commerciales dédiées à la production de fleurs coupées. PIAMV possède une large gamme d'hôtes expérimentaux, dont la plante modèle *A. thaliana*, et aucun vecteur animal ne lui est connu à ce jour (Hammond 2018). Cela fait de PIAMV un bon organisme viral modèle pour l'étude des interactions hôtes-phytovirus.

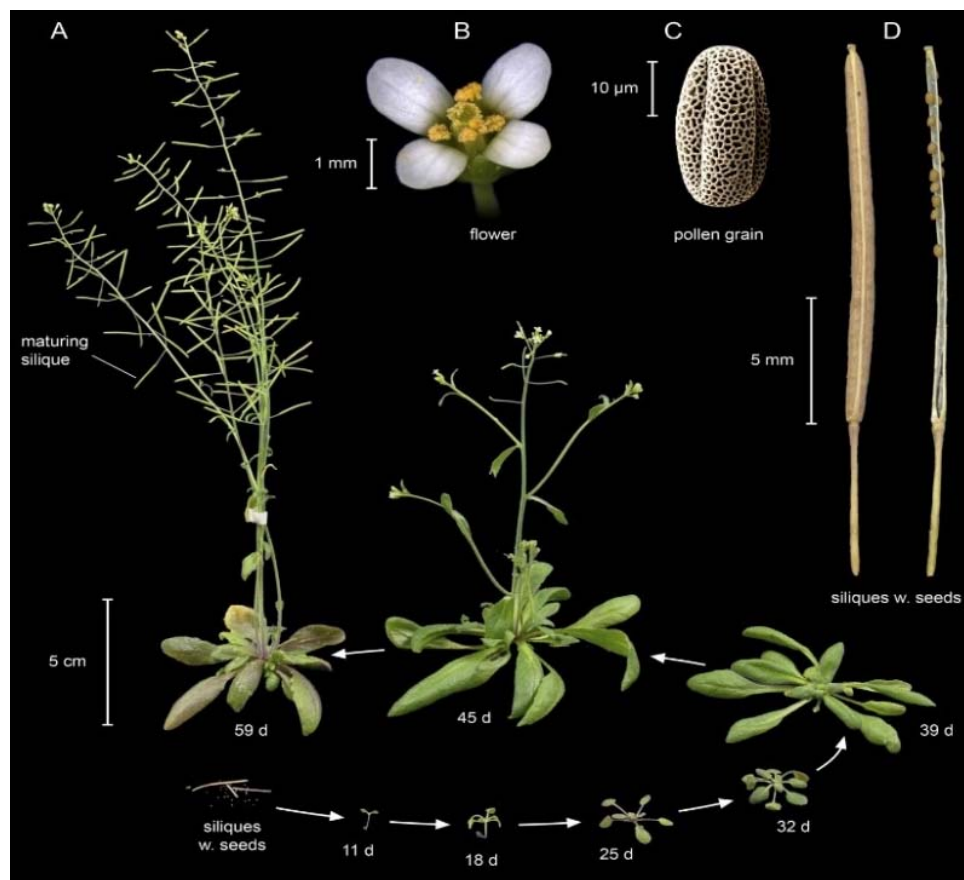


Figure 1.6 Cycle de vie de l'organisme modèle végétal *A. thaliana*.
Figure tirée de (Kramer 2015).

L'utilisation de ce virus modèle a permis de découvrir plusieurs protéines végétales ayant un rôle majeur dans les voies cellulaires impliquées dans la réponse contre les phytovirus (Hashimoto et al. 2016; Yamaji et al. 2012; Brosseau et al. 2016). L'utilisation de PIAMV a aussi permis d'élucider le rôle de plusieurs protéines virales dans le processus d'infection (Ozeki et al. 2009; Ozeki et al. 2006). Il est important de noter qu'*A. thaliana* est susceptible à ce virus donc, PIAMV n'active pas la réponse de défense de cette plante et il est capable de se propager facilement. Nous avons choisi de travailler avec PIAMV puisqu'une version transgénique du virus exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) est disponible. Cela simplifie le suivi de l'infection dans les plants d'*A. thaliana*. En effet, la transmission de l'infection dans les plants est observable à l'œil nu seulement en plaçant la plante infectée par PIAMV-GFP sous une lampe à ultraviolet (UV) (Figure 1.7) (Hashimoto et al. 2016; Minato et al. 2014).



Figure 1.7 Plant de *Nicotiana benthamiana* infecté par PIAMV-GFP.
Figure tirée de (Minato et al. 2014).

Comme mentionné précédemment, le premier objectif spécifique consistait à optimiser un protocole d'extraction de noyaux de feuilles d'*A. thaliana* permettant de détecter la majorité des nucléoporines végétales d'intérêt par spectrométrie de masse. À la base, un protocole simple et efficace avait déjà fait ses preuves dans l'étude du protéome nucléaire. Ce protocole inclut une étape de broyage des feuilles dans l'azote liquide, de lyse cellulaire, de filtration, de centrifugation des noyaux et de lavage (Fakih et al. 2016; Cheng et al. 2009; Xu et Copeland 2012). Cependant, des essais préliminaires nous ont permis de constater que ce protocole occasionnait des dommages à l'enveloppe nucléaire des noyaux isolés et aux pores nucléaires que cette enveloppe contient. Il était donc essentiel d'optimiser les étapes de ce protocole afin de limiter au maximum les dommages portés à l'enveloppe nucléaire. Pour faciliter les étapes d'optimisation, une lignée transgénique d'*A. thaliana* exprimant la nucléoporine RAE1 liée à la GFP a été utilisée (Tamura et al. 2010). Cette lignée permet de suivre la présence des pores nucléaires au fur et à mesure des différentes étapes d'extraction grâce à la GFP. Cette lignée permet aussi de vérifier par microscopie confocale l'intégrité de l'enveloppe nucléaire des noyaux isolés. De plus, des échantillons prélevés à chaque étape de l'extraction ont été analysés par Western Blot afin de vérifier l'enrichissement en protéine nucléaire et l'absence de contaminations cytoplasmiques. Il est important de noter que la lignée transgénique d'*A. thaliana* RAE1-GFP a seulement été utilisée pour la mise au point du protocole d'extraction. Pour le reste de l'étude, une lignée sauvage a été privilégiée.

Une fois le protocole optimisé, nous pouvions passer au deuxième objectif spécifique. Ce dernier consistait à déterminer de façon quantitative les différences au niveau des nucléoporines entre des plants contrôles, infectés par le phytovirus PIAMV ou en réponse de défense face à un signal hormonal choisi. Pour ce faire, nous avons inoculé des feuilles d'*A. thaliana* avec PIAMV ou activé la réponse de défense via l'application d'acide 2,6-dichloroisonicotinique (INA). L'acide salicylique est une molécule de signalisation dans la réponse immunitaire végétale PTI et ETI (An et Mou 2011). Ainsi, une solution d'INA, un homologue fonctionnel de cette hormone végétale, est couramment appliquée sur les feuilles d'*A. thaliana* afin d'activer et d'étudier la réponse de défense (Bektas et Eulgem 2014; Choi et al. 2012). Bien entendu, des plants traités avec une solution tampon ne contenant ni PIAMV ni INA ont été utilisés comme contrôles. Les feuilles traitées ont été prélevées puis les noyaux ont été extraits. Les échantillons obtenus ont été envoyés pour analyse par spectrométrie de masse au Centre Hospitalier Universitaire de Québec. L'utilisation d'une technique quantitative de spectrométrie de masse permet de détecter les différences au niveau du protéome nucléaire de feuilles infectées par PIAMV, en réponse de défense et contrôle. Une fois les données analysées par bio-informatique, les différences au niveau de l'abondance des nucléoporines peuvent être déterminées.

CHAPITRE II

L'INFECTION PAR *PLANTAGO ASIATICA MOSAIC VIRUS* ET L'ACTIVATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE AFFECTENT LES PORES NUCLÉAIRES D'*ARABIDOPSIS THALIANA*

Le contenu de ce chapitre est en préparation pour être soumis prochainement à un journal scientifique à évaluation par les pairs.

2.1 Contribution des auteurs

La première ébauche du manuscrit a été rédigée par Joëlle Rancourt. L'analyse des échantillons par spectrométrie de masse a été réalisée par nos collaborateurs à la Plateforme de Protéomique du Centre de Recherche du CHU de Québec, soit Victor Fourcassié, Sylvie Bourassa et Arnaud Droit. Le graphique présenté à la figure 2.b a été réalisé par ces mêmes collaborateurs. Toutes les autres figures, graphiques et tableaux présentés ont été réalisés par Joëlle Rancourt. La totalité des expériences a été réalisée par Joëlle Rancourt avec une aide substantielle par Ingrid Berenice Sanchez Carrillo et Valeria Paola Parra Gutiérrez. Mélodie B. Plourde a contribué à la conception des expériences au cours du projet de recherche. Hugo Germain et Lionel Berthoux ont supervisé les travaux de recherche. Tous les auteurs ont lu le manuscrit et participé à la version finale de celui-ci.

2.2 Résumé de l'article

Les pores nucléaires végétaux jouent un rôle clé dans les interactions hôtes-phytopathogènes. Ainsi, il est primordial de mieux comprendre comment les nucléoporines composant ces pores nucléaires sont affectées au cours de ces interactions. Il a été démontré que des nucléoporines végétales spécifiques sont requis pour une réponse immunitaire efficace et pour combattre certaines bactéries, oomycètes ou pathogènes

fongiques. Cependant, l'impact de la réponse de défense végétale sur chaque nucléoporine est encore méconnu. De plus, il a été démontré que plusieurs virus humains modifient les pores nucléaires ou ciblent des nucléoporines spécifiques de leur hôte afin de faciliter le processus d'infection et de se répliquer. Cependant, l'impact d'une infection virale sur les pores nucléaires des végétaux n'a jamais été investigué auparavant. Cela nous a menés à rechercher l'impact d'une infection par PIAMV et l'activation de la réponse de défense sur les pores nucléaires végétaux de l'organisme modèle *A. thaliana*. Pour ce faire, une approche de protéomique a été employée. Les noyaux de feuilles traitées ont été extraits tout en préservant l'intégrité de leur enveloppe nucléaire. Puis, ils ont été analysés par spectrométrie de masse quantitative sans marquage. Nous avons détecté 30 nucléoporines différentes sur un total de 33. Parmi ces nucléoporines, seulement la nucléoporine Nup1/Nup136 diminuait significativement d'abondance au cours de l'infection virale. De plus, nous avons démontré que l'activation de la réponse de défense via un signal hormonal réduisait de manière significative l'abondance des nucléoporines Aladin, Nup214 et Seh1 révélant un rôle possible de ces nucléoporines dans la réponse immunitaire végétale.

2.3 Article scientifique

***Plantago asiatica mosaic virus* infection and plant immune response impact *Arabidopsis thaliana* nuclear pore complexes**

Joëlle Rancourt¹, Ingrid Berenice Sanchez Carrillo¹, Valeria Paola Parra Gutiérrez¹,
Mélodie B. Plourde¹, Victor Fourcassié³, Sylvie Bourassa³, Arnaud Droit³,
Lionel Berthoux² & Hugo Germain^{1*}

¹ Groupe de Recherche en Biologie Végétale, Department of chemistry, biochemistry and physics, Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada.

² Groupe de Recherche en Signalisation Cellulaire, Department of medical biology, Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), Trois-Rivières, QC, G9A 5H7, Canada.

³ Proteomics Platform, Centre de recherche du CHU de Québec, Faculty of Medicine, Université Laval, Québec City Québec, G1V 4G2, Canada.

*Correspondence to Hugo Germain,
Email: hugo.germain@uqtr.ca

Abstract

Nuclear pore complexes play a fundamental role during host-phytopathogens interactions by mediating exchanges between the nucleus and the cytoplasm. Therefore, it is necessary to better understand how nuclear pore-associated proteins, named nucleoporins, are modulated upon such interactions. Specific plant nucleoporins are known to be required for disease resistance. However, the impact of plant immune responses on nucleoporins has never been thoroughly investigated. Moreover, it has been shown that several human viruses alter their host's nuclear pore complexes to facilitate the infection process. Yet, effects of phytoviruses on plant nucleoporins still remain unknown. In this study, we looked at the impact of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) infection and plant defense activation on *Arabidopsis thaliana* nuclear pore complexes using an unbiased proteomic approach. We collected nuclei from treated and control leaves, while preserving the integrity of nuclear envelopes. We detected, with various abundance levels, 30 out of the 33 *Arabidopsis* nucleoporins by mass spectrometry. Through label-free quantification, we showed that PIAMV decreases Nup1/Nup136 abundance in leaves nuclear proteomes, suggesting that the virus might modulate the host's nucleocytoplasmic transport during infection. We further demonstrate that defense activation decreases the amounts of Aladin, Nup214 and Seh1 in leaves nuclei, revealing a possible role in plant immunity.

Keywords: Nucleoporins, phytovirus, proteomic, Nup1, Nup136, Aladin, Seh1, Nup214

Introduction

A critical step in evolution is the transition from prokaryotic to eukaryotic cells. A major difference between the two is the presence of membrane-bound organelles performing specific functions in eukaryotes. Of these organelles, the largest and perhaps most important is the nucleus. Its main role is to separate most of the genetic material from the rest of the cell, thus separating translation from transcription (Devos, Graf, and Field 2014) and protecting the genetic information. This containment is achieved by a double membrane named the nuclear envelope (NE), whereas some openings are present at junctions between the inner and the outer membranes called nuclear pores (Beck and Hurt 2017).

Nuclear pore complexes (NPCs) are large protein structures embedded in the NE that form nuclear pores. The principal function of NPCs is to mediate exchanges between the nucleoplasm and the cytosol. Molecules smaller than 5 nm such as water, ions, and small proteins move freely inside NPCs. However, larger molecules, including RNAs, transcription factors and proteins implicated in DNA replication, transcription, and organization (Kahms et al. 2011), travel through NPCs by highly selective transport involving cargo recognition by soluble nuclear transport receptors and receptors interaction with proteins of the NPCs to carry their cargos across the NE. NPCs contain approximately thirty different proteins named nucleoporins, which are present in multiple copies and assembled in an eightfold rotational symmetry (Wolf and Mofrad 2008). Therefore, there are several hundred nucleoporins in each pore. Overall, these proteins are classified in three groups (Walde and Kehlenbach 2010). The first one is composed of transmembrane nucleoporins; their role is to anchor NPCs in the NE. The second group consists of nucleoporins containing a domain with multiple repeats of phenylalanine and glycine and are therefore named FG-Nups. These are highly implicated in the transport function of NPCs and they have the capacity to form flexible bounds with nuclear transport receptors linked to cargos (Moussavi-Baygi et al. 2011; Terry and Wentz 2009). The rest of the NPC proteins form the third group named structural nucleoporins. They form a scaffold that interacts with and link the other two groups.

As indicated previously, the NPCs' main role is to conduct exchanges between the nucleus and the cytosol. However, numerous studies have discovered that NPCs are implicated in several other functions. Taking part in chromatin condensation and organization, regulation of gene expression, DNA repair and genome organization (Strambio-De-Castilla, Niepel, and Rout 2010), and are also implicated in mitosis and cell cycle regulation (Makhnevych et al. 2003). It has been shown that various human viruses affect their host's NPCs to facilitate the infection process. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV) (Monette, Pante, and Mouland 2011; Kane et al. 2018), influenza virus (Konig et al. 2010), hepatitis B virus (Schmitz et al. 2010), herpes simplex virus (Copeland, Newcomb, and Brown 2009) and adenoviruses (Trotman et al. 2001) use specific nucleoporins to reach the inside of the nucleus to be able to replicate. On the other hand, some viruses are known to cause the degradation or the rearrangement of NPCs or to decrease the levels of specific nucleoporins in the complex during infection (Cohen, Etingov, and Pante 2012).

One fascinating fact about NPCs is that their structure is highly conserved among the Eukaryota domain. Minor evolutionary changes in the overall composition and structure indicate that NPC-associated transport mechanisms are highly conserved in eukaryotes (Devos, Graf, and Field 2014). Recent identification of nucleoporins in plants by proteomic and genetic studies showed that even though the amino acid composition of nucleoporins is highly divergent between mammals and plants, their secondary structure and position in NPCs are greatly conserved. This is why a majority of nucleoporins bear the same name in these two kingdoms (Tamura and Hara-Nishimura 2013; Boruc, Zhou, and Meier 2012; Tamura et al. 2010). Homologies between plant and mammalian NPCs have recently driven plant biologists to study whether plant NPCs may have other functions aside from transport. They discovered that plant nucleoporins are implicated in fertilization, flowering regulation (Tamura et al. 2010) and plant growth (Parry 2014). Also, specific plant nucleoporins mediate plant response to abiotic stress, like high salt concentration, and plant hormones, like abscisic acid and salicylic acid (Zhu et al. 2017; Tamura et al. 2017). Certain nucleoporins are required for plant innate immunity (Cheng et al. 2009; Roth and Wiermer 2012; Zhang and Li 2005), whereas some are involved in

plant resistance against fungal (Genencher et al. 2016) or oomycete (Ohtsu et al. 2014) pathogens. However, the impact of plant immunity activation on each nucleoporin is still unknown. Furthermore, involvement of nucleoporins in plant viral infection has never been investigated. Considering that NPCs determine, via their selective transport, what goes inside the nucleus, we hypothesized that plant NPCs could be impacted in a fashion similar to human NPCs upon viral infection. Investigating whether plant nucleoporins are affected during viral infection and plant immune response could provide further insights into host-virus interactions in plants and thus help develop ways to protect plants against phytoviruses.

In this work, we study the impact of *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV) infection and plant defense activation on *Arabidopsis thaliana* NPCs through an unbiased proteomics approach. Samples infected and not infected with PIAMV were enriched in nuclear proteins and analysed by label-free quantification mass spectrometry. 30 out of 33 plant nucleoporins were detected with diverse abundance levels. Nup1/Nup136 was the only nucleoporin to show a significant decrease following PIAMV inoculation, suggesting the virus might impact leaves nucleocytoplasmic transport during infection. We also observed that defense activation decreased the abundance of Aladin, Nup214 and Seh1 in nuclear proteomes, revealing two new nucleoporins of interest (Aladin and Nup214) in regard to plant immunity.

Results

An optimized nuclear extraction protocol provides samples enriched in nuclear proteins while limiting damage to nuclear envelopes

In order to be able to detect nucleoporins by mass spectrometry, plant cell fractionation and nuclear fraction enrichment are essential. It is also necessary that the nuclear extraction process does not disrupt the NE, which contains the proteins of interest. Toward this aim, we optimized a nuclear extraction protocol from the protocol of Xu, F. and C. Copeland (2012) using transgenic *A. thaliana* RAE1-GFP plants, expressing the nucleoporin RAE1 linked to GFP. After optimization, we were able to obtain nuclear

fractions containing isolated nuclei with undamaged NE, as observed by confocal microscopy (Fig. 1.a). The presence of a rounded nucleus, visible with DAPI staining, and surrounded by an intact NE, made visible by the presence of RAE1-GFP, suggests that our optimized protocol did not disrupt the NE. Furthermore, nuclear proteins enrichment and low amounts of cytosolic contaminants in the nuclear fraction were observed by immunoblotting using Histone H3 as a nuclear marker and Heat shock protein 70 cytoplasmic (HSP70c) as a cytosolic marker (Fig. 1.b). Therefore, we established that our optimized nuclear extraction protocol produces fractions enriched in nuclear proteins without impairing NE integrity.

*The nuclear proteomes of *A. thaliana* leaves vary according to treatments*

Once the nuclear extraction protocol was optimized, we inoculated *A. thaliana* Col-0 leaves with PIAMV-GFP to investigate the impact of the virus on its host's nuclear pore complexes. A modified plant virus expressing GFP was used to facilitate monitoring of the infection. Another set of plants were treated with an isonicotinic acid (INA) solution to examine variation of nuclear pore complexes during plant defense. At the same time, other plants were mock treated as control.

Prior to protein extraction, we used immunoblotting to verify that PIAMV-GFP virions were only present in virus inoculated leaves without cross-contamination in control and INA treated leaves (Fig. S1.a). Using qRT-PCR, we also confirmed that only INA treated plants displayed elevated defense genes expression (Fig. S1.b). Although virus inoculated material was harvested at 24h post-infection, virus infected leaves were monitored for a period of 15 days to validate that PIAMV-GFP was able to replicate and propagate in inoculated plants (Fig. S2.a and Fig. S2.b). *A. thaliana* Col-0 plants are susceptible to PIAMV-GFP (Yamaji et al. 2012; Hashimoto et al. 2016), consequently, infected leaves did not display signs of a hypersensitive response nor any visible sign of defense response as observed by qRT-PCR (Fig. S1.b). Due to this susceptibility, changes in host's nucleoporins abundance following PIAMV-GFP inoculation should not be in response to an activated immune reaction.

Following nuclear extraction, all nuclear fractions were analyzed by immunoblotting and shown to be enriched in nuclear proteins (Fig. 2.a). Furthermore, all replicates had similar band intensities for the nuclear marker Histone H3, showing consistency during nuclear extraction. Nuclear fractions still contained small amounts of cytosolic contaminants, as evidenced by the detection of HSP70c. In this study, we tolerated a slight cytosolic contamination as it meant limiting damage on NE and being able to detect more nucleoporins by mass spectrometry. Interestingly, more HSP70c was detected in nuclear fractions obtained from INA treated leaves (Fig. S3). Overall, we found our nuclear fractions to be uniformly enriched in nuclear proteins.

Nuclear fraction preparations were analyzed by mass spectrometry. Proteins were identified to generate nuclear proteomes of *A. thaliana* leaves under each experimental condition, which were compared using a principal component analysis (Fig. 2.b). All five replicates for each condition grouped together, showing similar proteomic profiles and low variation between replicates. Moreover, ellipses grouping replicates for each experimental condition did not overlap and were positioned far from one another, indicating a high level of difference in protein content between groups. Thus, experimental condition can be distinguished based on their nuclear proteomic profiles.

Mass spectrometry detection of 30 different nucleoporins displaying diverse abundance levels

Among those leaves' nuclear proteomic profiles; we were able to identify the vast majority of *A. thaliana* nucleoporins. Indeed, we detected 30 of 33 known nucleoporins (Table 1). Mean peptide sequence coverage ranged from 7.13% to 36.78%, with no obvious correlation with nucleoporins molecular weight. The three nucleoporins that were not detected at a false discovery rate of 1% (FDR) were Nup98b, Nup50a and Nup50b. All three are part of the nuclear basket. As these nucleoporins are situated on the nuclear side of the NPC, it is improbable that we lost them during the nuclear extraction process. It is more likely that they were not present in our samples, or were present in amounts below the detection threshold of the mass spectrometer. This last explanation makes

particular sense for Nup98b since it is known to be expressed weakly when its counterpart Nup98a is highly expressed and *vice versa* (Gallemi et al. 2016).

Previous studies performed in yeast (Rajoo et al. 2018) and human cell line (Ori et al. 2013) have demonstrated that not all nucleoporins are present in equal quantity within the NPC. Hence, we assessed the abundance's level of each *A. thaliana* nucleoporin detected in our control sample. Identified nucleoporins presented various abundance levels. Similarly to their human counterpart, plant nucleoporins within the same NPC subcomplex exhibited different exponentially modified protein abundance index (emPAI) values in control leaves (Fig. 3). Some nucleoporins from the same subcomplexes were present in different copy numbers. For instance, outer ring and cytoplasmic filament proteins had various emPAI values indicating different number of copies within those portions of the NPC. However, identified nucleoporins within the outer ring that are not part of the Nup107-160 subcomplex showed similar abundance. In further detail, the nuclear basket seemed to possess two times more NUA than NUP1/NUP136. A similar comparison can be made in the central channel with Nup54 and Nup62 relative to Nup58. In the transmembrane ring subcomplex, the amount of NDC1 was less than half that of gp120, whereas the inner ring showed the highest variation between the least abundant nucleoporins (Nup93b and Nup188) compared to the more abundant ones (Nup155, Nup205, Nup35 and Nup93a). Yet, it is important to note that NPC proteins with the smallest emPAI values in this study are located in the cytoplasmic filaments. It is possible that we lost some nucleoporins positioned in the cytoplasmic side of the NPC during the nuclear extraction process but we were still able to detect all cytoplasmic filament nucleoporins with our protocol. Furthermore, each of those proteins showed low variation in abundance values between replicates, suggesting consistency during the nuclear extraction. Taken together, our results demonstrate that plant nucleoporins are present in different quantities in the nuclear proteome and might suggest that these nucleoporins display distinct number of copies within the same NPC subcomplex.

Nup1/Nup136 is less abundant in nuclear proteomes of PLAMV-infected leaves

We have performed a labeled free proteomics quantitative experiment on nuclear extract of leaves infected with PLAMV versus control leaves (Fig. 4.a) and looked at the differential abundance of the 30 identified nucleoporins. Nup1/Nup136 protein was detected, with a 34% decrease in the nuclear proteomes following PLAMV infection. This reduction of Nup1/Nup136 during PLAMV infection was consistent throughout replicates (Fig. 4.b), and this difference was considered statistically significant (p-value = 0.0012). Therefore, we conclude that PLAMV induced a significant decrease of Nup1 in leaves nuclear proteomes during infection.

Furthermore, we investigated whether viral proteins were present in the nuclear proteomes following PLAMV inoculation. Proteins detected by mass spectrometry in nuclear fractions of PLAMV-infected leaves were compared to the available proteome database for this phytovirus. There was a match for PLAMV coat protein (CAPSD_PLAMV, Q07506), a small protein of only 21.8 kDa belonging to the potexvirus capsid protein family. This protein is known to interact with PLAMV TGB1 helicase to form ribonucleoprotein complexes containing viral RNA (Park, Jeong, and Kim 2014). However, neither the helicase nor any other viral protein were identified in the leaves nuclear proteomes following PLAMV inoculation. Thus, PLAMV coat protein was the only viral protein detectable by mass spectrometry in host nuclear proteomes following inoculation. Mass spectrometry data and quantification results are publicly available on ProteomeXchange repository (www.proteomexchange.org).

Aladin, Nup214 and Seh1 are less abundant in nuclear proteomes of INA treated leaves

We compared INA-treated leaves with mock treated leaves, this analysis revealed that three nucleoporins out of the 30 identified in this study were less abundant in leaves nuclear proteomes following INA treatment, Aladin, Nup214 and Seh1, showed reduced fold changes of 1,47 (p-value = 0.0012), 1,38 (p-value = 0.0034) and 1,27 (p-value = 0.0093) respectively (Fig. 5). It is important to note that those changes were probably not due to an alteration in plant transcriptome since no variation in transcripts level for these

genes were uncovered in already available transcriptomic data acquired after similar treatments (Fig. S4). Therefore, we determined that plant defense induction by INA treatment causes a significant decrease of Aladin, Nup214 and Seh1 abundances in leaves nuclear proteomes.

Nucleoporins with a significant quantitative change are located at NPC's extremities

The four nucleoporins (Nup1/Nup136, Aladin, Nup214 and Seh1) that presented a decrease in abundance following treatments are all positioned on either the nuclear or cytoplasmic side of the NPC. Nup1/Nup136 is part of the nuclear basket, Aladin and Nup214 are positioned at the cytoplasmic filaments and Seh1 is part of the Nup107-160 subcomplex in NPC's outer rings (Fig. 6). Meanwhile, nucleoporins positioned in the core of the NPC had a stable abundance with no significant fold change despite treatments. Indeed, no significant variation was detectable in the inner rings, transmembrane ring, and central channel sub-complexes after PIAMV or INA treatments (Fig. 6). This implied that nucleoporins localized at the center of the NPC are less prone to abundance variation than those located at NPC's extremities under the conditions tested in this study

Discussion

NPCs play a fundamental role during host-phytopathogens interactions by mediating communication between the nucleus and the rest of the cell (Deslandes and Rivas 2011). Thus, it is primordial to examine what happens to nucleoporins while those interactions occur. Specific nucleoporins like Nup88 (Cheng et al. 2009) and Nup96 (Zhang and Li 2005) were already identified in prior studies as being required for plant defense. However, repercussions of plant immunity on the different nucleoporins have never been investigated using an unbiased proteomics approach. Moreover, recent studies in animal cells determined that NPCs are affected during infection by multiple human viruses (Cohen, Etingov, and Pante 2012). Yet, impacts of phytoviruses on plant NPCs have never been investigated before. Using label-free mass spectrometry quantification, we showed that a model plant virus, PIAMV, alters the host's NPCs by reducing

Nup1/Nup136 abundance in *A. thaliana* nuclear proteome. We also demonstrated that plant defense activation leads to a decrease of three distinct nucleoporins (Aladin, Nup214 and Seh1) in nuclear extracts.

A. thaliana NPCs is known to be composed of multiples copies of 33 different nucleoporins (Tamura et al. 2010; Tamura and Hara-Nishimura 2013) from which 30 were detected by mass spectrometry using our optimized nuclear extraction protocol (Table 1). This is more in comparison to similar investigations studying plant NE and nuclear proteomes. 27 out of 33 nucleoporins were identified by mass spectrometry using a protocol specific for plant nuclear membrane isolation (Tang, Huang, and Gu 2020). This method detected fewer nucleoporins but is ideal for studying NE proteomes without the nucleoplasmic proteins. This was not our objective as detection of viral proteins in the nuclear proteomes was an integral part of the investigation. A previous study on *A. thaliana* using a different nuclear extraction method detected 13 nucleoporins by mass spectrometry (Goto et al. 2019). Their method is more elaborate, suggesting nuclear extracts of higher purity which could be better for other applications. In contrast, the protocol presented in this study is preferable for investigating nuclear proteomes and NPCs as a whole. The only nucleoporins not detected were Nup98b, Nup50a and Nup50b (Table 1). As mentioned previously, it is unlikely that they were lost during the nuclear extraction process since those nucleoporins are currently known to be present on the nuclear side of the NPC (Boruc, Zhou, and Meier 2012). We suggest that they were probably absent in *A. thaliana* leaves nuclei or present in a lower quantity than the mass spectrometer detection threshold. This hypothesis makes sense considering that their peptide sequence is not an obstacle to mass spectrometry detection. Furthermore, Nup98b, Nup50a and Nup50b were also not detected in the two previously cited studies (Goto et al. 2019; Tang, Huang and Gu 2020). In fact, all three of them were detected in other studies on *A. thaliana* that did not focus on leaves nuclear proteomics (Furtauer et al. 2019; Wu et al. 2019; Mergner et al. 2020), the cellular accumulation could be organ or tissue specific, this would be interesting to investigate.

In this study, we observed that the detected nucleoporins displayed various abundance levels, with nucleoporins that are part of the same complexes showing different copy numbers (Fig. 3). Similar observations were previously made in human (Ori et al. 2013) and yeast cells (Rajoo et al. 2018). For example, we observed that the two nucleoporins forming the transmembrane ring subcomplex had different number of copies, NCD1 being less abundant than gp210, while the same tendency was found in human NPCs (Ori et al. 2013). Furthermore, Nup188 and Nup155 were respectively the least and most abundant nucleoporins in our proteomes of *A. thaliana*, as they were in the human inner ring subcomplex (Ori et al. 2013). Interestingly, some differences in nucleoporin abundance relative to one another seemed specific to plant NPCs. For instance, *A. thaliana* nuclei contained two times more copies of NUA than of Nup1/Nup136 while both of them are part of the nuclear basket subcomplex. This difference does not occur for their human or yeast counterparts (Rajoo et al. 2018; Ori et al. 2013). It is well established that nucleoporins structures and functions are highly conserved between higher plants and vertebrates (Boruc, Zhou, and Meier 2012; Tamura and Hara-Nishimura 2013). Our results suggest that some relative abundances of specific nucleoporins are also conserved in both organisms. Also, even though a targeted mass spectrometry method was used to study human NPCs stoichiometry (Ori et al. 2013), similar trends were observed in plant cell using label-free quantification.

We also showed that PIAMV infection decreased Nup1/Nup136 abundance in *A. thaliana* nuclear proteomes (Fig. 4). Previous studies highlighted Nup1/Nup136 involvement in plant growth, flowering, reproduction, cell division and nuclear shape (Tamura et al. 2010; Bao et al. 2019) but, the only known role of Nup1/Nup136 in regard to plant host-pathogen interactions is an implication in salicylic acid dependent defense response (Tamura et al. 2017). It is possible that PIAMV specifically affects Nup1/Nup136 because of its function in plant defense activation. Another explanation for the virus repercussion on Nup1/Nup136 is the importance of this nucleoporin in nuclear shape and transport. Indeed, Nup1/Nup136 quantity is directly correlated with *A. thaliana* nuclear morphology and a change of its abundance affects the NE shape integrity (Tamura and Hara-Nishimura 2011). Plant Nup1/Nup136 is presumed to be a functional homologue

of vertebrate Nup153 (Tamura et al. 2010). Similar to Nup1/Nup136, Nup153's depletion results in abnormal NE structure in animal cells (Zhou and Pante 2010). Several human viruses alter Nup153, thus affecting nucleocytoplasmic transports (Le Sage and Mouland 2013). For instance, human poliovirus (Gustin and Sarnow 2001; Park et al. 2008) and rhinoviruses (HRV2, HRV14 and HRV16) (Gustin and Sarnow 2002; Ghildyal et al. 2009) use their own protease to degrade Nup153, causing nuclear import inhibition. This disruption occurs even though these are positive-strand RNA viruses like PIAMV and do not enter the nuclei during their replication cycle. It is hypothesized that inhibiting nuclear import could help human poliovirus and rhinoviruses evade host immune defenses by blocking signal transduction to the nucleus or could result in cytoplasmic accumulation of multiple host nuclear proteins useful for viral replications. Similar mechanisms might occur in plants during PIAMV infection. It would be interesting to investigate the process and consequences of Nup1/Nup136 diminution in host nuclear proteomes following PIAMV inoculation.

We determined that the activation of the plant defense response using INA decreases Aladin, Nup214 and Seh1 levels in nuclear proteomes (Fig. 5). Furthermore, those changes didn't appear to come from an alteration in plant transcriptome (Fig. S4) showing the importance of conducting studies at a proteomic level. Discrepancies between cell transcriptome and proteomes exist (Gunawardana and Niranjana 2013), and studying the transcriptome doesn't consider post-translational modifications or alteration in mRNA translations for instance. Thus, conducting research on the proteomes is important to reveal novel proteins related to many biological processes like plant immunity. Of the three downregulated nucleoporins, only Seh1 is currently known to have a direct relation with plant immunity. Seh1 takes part in plant defense against pathogens (Wiermer et al. 2012) and is required for disease resistance in *A. thaliana* (Roth and Wiermer 2012). Yet, no study mentions a link between host-phytopathogen interactions and Aladin or Nup214. Further investigations on those two nucleoporins are needed to understand why their nuclear abundance decreases following plant defense activation and determine if they are actively involved in plant immunity.

In this study, we established that four different nucleoporins (Nup1/Nup136, Aladin, Nup214 and Seh1) displayed a significant drop of their abundance in the nuclear proteomes following treatments (Fig. 4 and Fig. 5). Two of those proteins (Nup1/Nup136 and Nup214) are directly involved in nucleocytoplasmic transport due to their FG repeat domains (Tamura and Hara-Nishimura 2013). Therefore, they play an important role in providing a selective barrier for macromolecule nuclear transports through interactions between their FG repeat domains and cell nuclear transport receptors (Terry and Went 2009). Despite the fact that Aladin and Seh1 don't bear FG repeat domains, they are crucial to their sub-complexes structural integrity. Consequently, they are an integral part of NPC cytoplasmic filaments and outer ring Nup107-160 sub-complex functions. Thus, a change in one of them could have repercussions on nucleocytoplasmic transports as a whole.

Ours results showed a lower abundance of Aladin, Nup214 and Seh1 in leaves nuclei when plant immunity is activated, revealing two new nucleoporins of interest for plant defense (Aladin and Nup214). Further investigations are needed on those two proteins to understand the mechanisms implicated in their nuclear abundance decline and to know if they are actively involved in plant immunity. With the observation of Nup1/Nup136's diminution in host nuclear proteomes following PIAMV inoculation, our study is also the first to give some evidence that plant NPCs are modified during viral infection, further establishing a link between plant and human viral infection. Additional research is needed to understand the consequences of Nup1/Nup136's depletion as well as the mechanisms behind it. Overall, our proteomic data shows that plant NPCs are mostly stable complexes even under viral infection or defense elicitation, with the exception of 4 nucleoporins, two of which were not known to have a role in plant immunity.

Materials and methods

Plant materials and growth conditions

Transgenic *Arabidopsis thaliana* RAE1-GFP seeds were obtained from Dr. Ikuko Hara-Nishimura (Tamura et al. 2010). Three-week-old RAE1-GFP plants constitutively expressing nucleoporin RAE1 linked to GFP were used to optimize nuclear extraction. Six-week-old *Nicotiana benthamiana* plants were used for PIAMV-GFP production. Three-week-old wild type *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia (WT Col-0) plants were used for PIAMV-GFP inoculation, INA treatment and all mass spectrometry experiments.

Seeds were stratified at 4°C in the dark for three days, then sown in soil and transferred to a growth chamber maintained at 21°C with 70% relative humidity in a 10h light/14h dark photoperiod with 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ light intensity. Before being stratified, RAE1-GFP heterozygous seeds were surface-sterilized in sterilization solution (1% bleach and 0.1% Tween-20), washed once with EtOH 95% and twice with sterile distilled water. Afterwards, RAE1-GFP plants were selected on Murashige and Skoog medium plates containing Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and then transplanted in soil.

PIAMV-GFP inoculation

Agrobacterium tumefaciens C58C1 line containing a vector allowing the production of PIAMV-GFP viruses was obtained from Dr. Peter Moffett (Brosseau and Moffett 2015). *A. tumefaciens* line was grown overnight at 28°C in Luria-Bertani (LB) broth solution containing Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Tetracyclin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) before agroinfiltration in *N. benthamiana* as previously described (Li 2011). After five days, presence of PIAMV-GFP in agroinfiltrated leaves was observed under UV light and infected leaves were ground in cold 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 (2 ml/g of leaves). Sap containing PIAMV-GFP virions was collected following centrifugation (4000 rpm for 10 min at 4°C) and stored at -80°C. Presence of PIAMV-GFP in sap was verified using

immunoblotting against the PIAMV coat protein (see section Protein detection by immunoblotting).

Inoculations of *A. thaliana* leaves were performed by rub-inoculation of the sap (15 µl/leaf) as described (Jaubert et al. 2011). Mock inoculations were performed as a control using cold 0.1 M phosphate buffer pH 7.4.

INA treatment

INA solution (0.65 mM isonicotinic acid) was prepared in cold 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 with Sylgard 309 (100 µl/L). The solution was freshly made 1 h prior to leaves treatment and conserved at 4°C. *A. thaliana* leaves were treated with INA solution (15 µl/leaf) using rub-inoculation. This method was chosen so INA treated leaves could be compared with control leaves and PIAMV-GFP infected leaves.

Nuclear extraction

PIAMV inoculation, mock inoculation and INA treatment were administered in parallel on the same batch of *A. thaliana* plants. *A. thaliana* leaves used for nuclear extraction were flash frozen in liquid nitrogen 24h after treatments and stored at -80°C. Five biological replicates were obtained for each experimental condition, and nuclear extraction was conducted separately for each replicate. At the same time, leaf samples were collected and stored at -80°C for quality control purposes (see section Protein detection by immunoblotting and qRT-PCR).

Nuclei were obtained according to the method described by Xu and Copeland (2012) with some modifications. Briefly, 1.5 g of frozen *A. thaliana* leaves were ground in liquid nitrogen. Tissues were re-suspended in 5 ml of extraction buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 25% glycerol, 20 mM KCl, 2 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, 1 mM PMSF and 1 mM DTT), then passed successively through 60 µm and 30 µm nylon filter meshes (Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, Can) with help of a short centrifugation

(100 x g for 1 min at 4°C). Nuclei were pelleted as described by Xu and Copeland (2012), washed gently once with 15 ml of nuclear resuspension buffer (NRB) with 0.2% Triton X-100 and once with 15 ml of NRB without Triton X-100. Nuclei-enriched pellet was re-suspended in NRB without Triton X-100. Integrity of nuclei contained in the final extract was verified by confocal microscopy using DAPI (0.5 µg/ml 4',6-diamidino-2-phénylindole). Fractions were collected to use as control for nuclear protein enrichment and purity of the nuclear extract.

Nuclear extractions were done in five replicates for each treatment. Proteins in each nuclear extract were precipitated using acetone and re-suspended in the protein extraction buffer (50 mM ammonium bicarbonate and 1% sodium deoxycholate). Acetone precipitation was done by adding four times the sample volume of cold acetone (-20°C) to the nuclear extract followed by an overnight incubation at -20°C, centrifugation (16000 x g for 15 min at 4°C) and drying of the pellet under the hood (5 min).

Mass spectrometry

Nuclear extract samples were sent for analysis to the Proteomics platform of the CHU de Québec Research Center where they were further processed. Samples were reduced using DTT (0.2 mM at 37°C for 30 min.), alkylated with iodoacetamide (0.8 mM at 37°C for 30 min.) and digested using trypsin (0.3 µg 1:50 protease/protein ratio). Tryptic peptides were desalted, vacuum dried and re-suspended in a 0.1% formic acid solution. Peptide quantities were estimated using the Nanodrop assay (205 nm absorbance).

Samples (1.0 µg) (five biological replicates) were analysed by nanoLC/MSMS using a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific) connected to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Peptides were separated on a Pepmap Acclaim column (ThermoFisher) 50 cm x 75µm internal diameter separation column with a linear gradient from 5-40% solvent B (A: 0,1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 90 minutes,

at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Thermo XCalibur software version 4.1.50.

Protein identification and data analysis

Mass spectra were searched against the UniProt *Arabidopsis thaliana* Reference proteomes database (UP000006548 version of August 24, 2020) and the Uniprot *Plantago Asiatica mosaic virus* (PIAMV) Reference proteomes database (UP000009190 version of August 19, 2020) using the search engine Andromeda integrated into MaxQuant software (version 1.6.17.0). Cysteine carbamidomethylation was set as fixed modification. Protein N-terminal acetylation and methionine oxidation were set as variable modifications. For protein validation, a false discovery rate (FDR) of 1% was allowed at peptide and protein level based on a target/decoy search. Label-free quantification (LFQ) was done with MaxQuant using a minimum of 2 razor unique peptides. LFQ normalized intensity values were calculated with the same software.

Text files generated by MaxQuant were analysed using the R software (version 4.0.4). For data processing, only LFQ intensities from the proteinGroups.txt file were considered. Decoy proteins and potential contaminants were excluded from the analysis. For each sample, a noise value corresponding to the 0.01 percentile of all LFQ intensities of said sample were calculated. This noise value was imputed when an intensity value was missing from a sample. Only proteins detected in all biological replicates of at least one experimental condition were considered as quantifiable proteins and kept for further analysis. Among these proteins, only those identified with at least two razor unique peptides were considered as quantified proteins and kept in the analysis. The average LFQ intensity values from each experimental condition were calculated for each protein. The average LFQ intensity values of PIAMV infected leaves or INA treated leaves were divided by the average LFQ intensity values of control leaves. The Limma statistical test was performed to determine the probability value (p-value) and the Benjamini Hochberg adjusted probability value (q-value) of variation for each protein. Proteins with a q-value

of less than 0.05 were considered to have a significant quantitative change between experimental conditions.

The exponentially modified protein abundance index (emPAI) values were determined by performing a Mascot search (Matrix Science) and analysis using Scaffold software (version 4.11.1, Proteomes Software Inc., Portland, USA).

Protein detection by immunoblotting

Antibodies against histone H3 (Agrisera, Vännäs, SWEDEN, 1:5000), a nuclear marker, were used to verify nuclear proteins enrichment in our samples. Presence of cytoplasmic protein contaminants in our nuclear extracts was verified using antibodies against the cytoplasmic heat shock protein 70 (Agrisera, Vännäs, SWEDEN, 1:3000), a cytoplasmic marker. Antibodies against the PIAMV coat protein (Adgia, Elkhart, IN, USA, 1:2000) were used to investigate the presence of PIAMV-GFP virions in our sap extract and in *A. thaliana* leaves after inoculation.

Protein concentration was determined using the Bio-Rad DC Protein Assay Kit. For Western blotting, proteins were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and electrotransferred to PVDF membranes. Membranes were blocked 1h at room temperature with defatted dry-milk solution (2.5%), incubated overnight at 4°C with primary antibodies and incubated 1h at room temperature with secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (immune-star goat anti-rabbit GAR-HRP conjugate, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada, 1:20000). Chemiluminescent development (clarity western ECL substrate, Bio-Rad, Mississauga, ON, Can) was used to detect proteins of interest.

qRT-PCR

Total RNA from leaves (40 mg) was extracted using Geneaid Genezol TriRNA Pure Kit with in column DNase I digestion. RNA was quantified by Nanodrop assay and its

quality was assessed by migration on agarose gel. cDNA was synthesized from RNA (1 µg) with M-MuLV reverse transcriptase using Oligo(dT) primers. Resulting cDNA was used as template for qRT-PCR. Amplification was undertaken using SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit (Bioline, London, U.K.) with a CFX Connect Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad, Mississauga, ON, Can). Three biological replicates were analysed for each treatment. The reference gene PDF2 (At1g13320) was used to normalize transcript levels (Czechowski et al. 2005; Lilly et al. 2011; Lu et al. 2018). Gene expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Primers sequences for PDF2 (At1g13320), PR1 (At2g14610) and PR2 (At3g57260) were as described (Lilly et al. 2011; Jin et al. 2018).

Acknowledgements

We thank Dr. Ikuko Hara-Nishimura for granting us access to his transgenic *Arabidopsis thaliana* RAE1-GFP seeds. We are thankful to Dr. Peter Moffett for the gift of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 line containing a vector allowing the production of PIAMV-GFP viruses and for their help concerning PIAMV-GFP production and inoculation. This research was supported by funds from the Fonds de recherche du Québec en Nature et Technologies (FRQNT), the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canada Research Chairs. All authors declare no conflict of interest.

References

- Ahyayauch, H., M. Bennouna, A. Alonso, and F. M. Goni. 2010. 'Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena', *Langmuir*, 26: 7307-13.
- Bao, S., G. Shen, G. Li, Z. Liu, M. Arif, Q. Wei, and S. Men. 2019. 'The Arabidopsis nucleoporin NUP1 is essential for megasporogenesis and early stages of pollen development', *Plant Cell Rep*, 38: 59-74.
- Beck, M., and E. Hurt. 2017. 'The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 73-89.

- Boruc, J., X. Zhou, and I. Meier. 2012. 'Dynamics of the plant nuclear envelope and nuclear pore', *Plant Physiol*, 158: 78-86.
- Brosseau, C., and P. Moffett. 2015. 'Functional and Genetic Analysis Identify a Role for Arabidopsis ARGONAUTE5 in Antiviral RNA Silencing', *Plant Cell*, 27: 1742-54.
- Capelson, M., Y. Liang, R. Schulte, W. Mair, U. Wagner, and M. W. Hetzer. 2010. 'Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes', *Cell*, 140: 372-83.
- Cheng, Y. T., H. Germain, M. Wiermer, D. Bi, F. Xu, A. V. Garcia, L. Wirthmueller, C. Despres, J. E. Parker, Y. Zhang, and X. Li. 2009. 'Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in Arabidopsis', *Plant Cell*, 21: 2503-16.
- Cohen, S., I. Etingov, and N. Pante. 2012. 'Effect of viral infection on the nuclear envelope and nuclear pore complex', *Int Rev Cell Mol Biol*, 299: 117-59.
- Copeland, A. M., W. W. Newcomb, and J. C. Brown. 2009. 'Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment', *J Virol*, 83: 1660-8.
- Czechowski, T., M. Stitt, T. Altmann, M. K. Udvardi, and W. R. Scheible. 2005. 'Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 139: 5-17.
- Deslandes, L., and S. Rivas. 2011. 'The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens', *Plant Signal Behav*, 6: 42-8.
- Devos, D. P., R. Graf, and M. C. Field. 2014. 'Evolution of the nucleus', *Curr Opin Cell Biol*, 28: 8-15.
- Furtauer, L., L. Kustner, W. Weckwerth, A. G. Heyer, and T. Nagele. 2019. 'Resolving subcellular plant metabolism', *Plant J*, 100: 438-55.
- Galleme, M., A. Galstyan, S. Paulisic, C. Then, A. Ferrandez-Ayela, L. Lorenzo-Orts, I. Roig-Villanova, X. Wang, J. L. Micol, M. R. Ponce, P. F. Devlin, and J. F. Martinez-Garcia. 2016. 'DRACULA2 is a dynamic nucleoporin with a role in regulating the shade avoidance syndrome in Arabidopsis', *Development*, 143: 1623-31.
- Genencher, B., L. Wirthmueller, C. Roth, M. Klenke, L. Ma, A. Sharon, and M. Wiermer. 2016. 'Nucleoporin-Regulated MAP Kinase Signaling in Immunity to a Necrotrophic Fungal Pathogen', *Plant Physiol*, 172: 1293-305.

- Ghildyal, R., B. Jordan, D. Li, H. Dagher, P. G. Bardin, J. E. Gern, and D. A. Jans. 2009. 'Rhinovirus 3C protease can localize in the nucleus and alter active and passive nucleocytoplasmic transport', *J Virol*, 83: 7349-52.
- Goto, C., S. Hashizume, Y. Fukao, I. Hara-Nishimura, and K. Tamura. 2019. 'Comprehensive nuclear proteome of Arabidopsis obtained by sequential extraction', *Nucleus*, 10: 81-92.
- Gunawardana, Y., and M. Niranjana. 2013. 'Bridging the gap between transcriptome and proteome measurements identifies post-translationally regulated genes', *Bioinformatics*, 29: 3060-6.
- Gustin, K. E., and P. Sarnow. 2001. 'Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition', *EMBO J*, 20: 240-9.
- Gustin, K. E. and P. Sarnow. 2002. 'Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus', *J Virol*, 76: 8787-96.
- Hashimoto, M., Y. Neriya, T. Keima, N. Iwabuchi, H. Koinuma, Y. Hagiwara-Komoda, K. Ishikawa, M. Himeno, K. Maejima, Y. Yamaji, and S. Namba. 2016. 'EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in Arabidopsis thaliana', *Plant J*, 88: 120-31.
- Jaubert, M., S. Bhattacharjee, A. F. Mello, K. L. Perry, and P. Moffett. 2011. 'ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against Potato virus X in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 156: 1556-64.
- Jin, H., S. M. Choi, M. J. Kang, S. H. Yun, D. J. Kwon, Y. S. Noh, and B. Noh. 2018. 'Salicylic acid-induced transcriptional reprogramming by the HAC-NPR1-TGA histone acetyltransferase complex in Arabidopsis', *Nucleic Acids Res*, 46: 11712-25.
- Kahms, M., J. Huve, R. Wesselmann, J. C. Farr, V. Baumgartel, and R. Peters. 2011. 'Lighting up the nuclear pore complex', *Eur J Cell Biol*, 90: 751-8.
- Kalverda, B., H. Pickersgill, V. V. Shloma, and M. Fornerod. 2010. 'Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm', *Cell*, 140: 360-71.
- Kane, M., S. V. Rebersburg, M. A. Takata, T. M. Zang, M. Yamashita, M. Kvaratskhelia, and P. D. Bieniasz. 2018. 'Nuclear pore heterogeneity influences HIV-1 infection and the antiviral activity of MX2', *Elife*, 7.

- Konig, R., S. Stertz, Y. Zhou, A. Inoue, H. H. Hoffmann, S. Bhattacharyya, J. G. Alamares, D. M. Tscherne, M. B. Ortigoza, Y. Liang, Q. Gao, S. E. Andrews, S. Bandyopadhyay, P. De Jesus, B. P. Tu, L. Pache, C. Shih, A. Orth, G. Bonamy, L. Miraglia, T. Ideker, A. Garcia-Sastre, J. A. Young, P. Palese, M. L. Shaw, and S. K. Chanda. 2010. 'Human host factors required for influenza virus replication', *Nature*, 463: 813-7.
- Le Sage, V., and A. J. Mouland. 2013. 'Viral subversion of the nuclear pore complex', *Viruses*, 5: 2019-42.
- Leclerc, D., Y. Chapdelaine, and T. Hohn. 1999. 'Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein', *J Virol*, 73: 553-60.
- Li, X. 2011. 'Infiltration of *Nicotiana benthamiana* Protocol for Transient Expression via *Agrobacterium*', *Bio-101*, 1.
- Lilly, S. T., R. S. Drummond, M. N. Pearson, and R. M. MacDiarmid. 2011. 'Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*', *Mol Plant Microbe Interact*, 24: 294-304.
- Liu, H., M. I. Boulton, C. L. Thomas, D. A. Prior, K. J. Oparka, and J. W. Davies. 1999. 'Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA', *Mol Plant Microbe Interact*, 12: 894-900.
- Lu, X., Y. Liu, L. Zhao, Y. Liu, and M. Zhao. 2018. 'Selection of reliable reference genes for RT-qPCR during methyl jasmonate, salicylic acid and hydrogen peroxide treatments in *Ganoderma lucidum*', *World J Microbiol Biotechnol*, 34: 92.
- Makhnevych, T., C. P. Lusk, A. M. Anderson, J. D. Aitchison, and R. W. Wozniak. 2003. 'Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex', *Cell*, 115: 813-23.
- Matreyek, K. A., S. S. Yucel, X. Li, and A. Engelman. 2013. 'Nucleoporin NUP153 phenylalanine-glycine motifs engage a common binding pocket within the HIV-1 capsid protein to mediate lentiviral infectivity', *PLoS Pathog*, 9: e1003693.
- Mergner, J., M. Frejno, M. List, M. Papacek, X. Chen, A. Chaudhary, P. Samaras, S. Richter, H. Shikata, M. Messerer, D. Lang, S. Altmann, P. Cyprys, D. P. Zolg, T. Mathieson, M. Bantscheff, R. R. Hazarika, T. Schmidt, C. Dawid, A. Dunkel, T. Hofmann, S. Sprunck, P. Falter-Braun, F. Johannes, K. F. X. Mayer, G. Jurgens, M. Wilhelm, J. Baumbach, E. Grill, K. Schneitz, C. Schwechheimer, and B. Kuster. 2020. 'Mass-spectrometry-based draft of the *Arabidopsis* proteome', *Nature*, 579: 409-14.

- Monette, A., N. Pante, and A. J. Mouland. 2011. 'HIV-1 remodels the nuclear pore complex', *J Cell Biol*, 193: 619-31.
- Moussavi-Baygi, R., Y. Jamali, R. Karimi, and M. R. Mofrad. 2011. 'Brownian dynamics simulation of nucleocytoplasmic transport: a coarse-grained model for the functional state of the nuclear pore complex', *PLoS Comput Biol*, 7: e1002049.
- Ohtsu, M., Y. Shibata, M. Ojika, K. Tamura, I. Hara-Nishimura, H. Mori, K. Kawakita, and D. Takemoto. 2014. 'Nucleoporin 75 is involved in the ethylene-mediated production of phytoalexin for the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*', *Mol Plant Microbe Interact*, 27: 1318-30.
- Ori, A., N. Banterle, M. Iskar, A. Andres-Pons, C. Escher, H. Khanh Bui, L. Sparks, V. Solis-Mezarino, O. Rinner, P. Bork, E. A. Lemke, and M. Beck. 2013. 'Cell type-specific nuclear pores: a case in point for context-dependent stoichiometry of molecular machines', *Mol Syst Biol*, 9: 648.
- Park, M. R., R. D. Jeong, and K. H. Kim. 2014. 'Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants', *Front Plant Sci*, 5: 60.
- Park, N., P. Katikaneni, T. Skern, and K. E. Gustin. 2008. 'Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells', *J Virol*, 82: 1647-55.
- Parry, G. 2014. 'Components of the Arabidopsis nuclear pore complex play multiple diverse roles in control of plant growth', *J Exp Bot*, 65: 6057-67.
- Rajoo, S., P. Vallotton, E. Onischenko, and K. Weis. 2018. 'Stoichiometry and compositional plasticity of the yeast nuclear pore complex revealed by quantitative fluorescence microscopy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E3969-E77.
- Roth, C., and M. Wiermer. 2012. 'Nucleoporins Nup160 and Seh1 are required for disease resistance in Arabidopsis', *Plant Signal Behav*, 7: 1212-4.
- Schmitz, A., A. Schwarz, M. Foss, L. Zhou, B. Rabe, J. Hoellenriegel, M. Stoeber, N. Pante, and M. Kann. 2010. 'Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket', *PLoS Pathog*, 6: e1000741.
- Sikorskaite, S., M. L. Rajamaki, D. Baniulis, V. Stanys, and J. P. Valkonen. 2013. 'Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families', *Plant Methods*, 9: 31.
- Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M. P. Rout. 2010. 'The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 490-501.

- Tamura, K., Y. Fukao, N. Hatsugai, F. Katagiri, and I. Hara-Nishimura. 2017. 'Nup82 functions redundantly with Nup136 in a salicylic acid-dependent defense response of *Arabidopsis thaliana*', *Nucleus*, 8: 301-11.
- Tamura, K., Y. Fukao, M. Iwamoto, T. Haraguchi, and I. Hara-Nishimura. 2010. 'Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell*, 22: 4084-97.
- Tamura, K., and I. Hara-Nishimura. 2011. 'Involvement of the nuclear pore complex in morphology of the plant nucleus', *Nucleus*, 2: 168-72.
- Tamura, K. and I. Hara-Nishimura. 2013. 'The molecular architecture of the plant nuclear pore complex', *J Exp Bot*, 64: 823-32.
- Tang, Y., A. Huang, and Y. Gu. 2020. 'Global profiling of plant nuclear membrane proteome in *Arabidopsis*', *Nat Plants*, 6: 838-47.
- Terry, L. J., and S. R. Went. 2009. 'Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport', *Eukaryot Cell*, 8: 1814-27.
- Trotman, L. C., N. Mosberger, M. Fornerod, R. P. Stidwill, and U. F. Greber. 2001. 'Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1', *Nat Cell Biol*, 3: 1092-100.
- Walde, S., and R. H. Kehlenbach. 2010. 'The Part and the Whole: functions of nucleoporins in nucleocytoplasmic transport', *Trends Cell Biol*, 20: 461-9.
- Wiermer, M., Y. T. Cheng, J. Imkampe, M. Li, D. Wang, V. Lipka, and X. Li. 2012. 'Putative members of the *Arabidopsis* Nup107-160 nuclear pore sub-complex contribute to pathogen defense', *Plant J*, 70: 796-808.
- Wolf, C., and M. R. Mofrad. 2008. 'On the octagonal structure of the nuclear pore complex: insights from coarse-grained models', *Biophys J*, 95: 2073-85.
- Wu, G. Z., E. H. Meyer, A. S. Richter, M. Schuster, Q. Ling, M. A. Schottler, D. Walther, R. Zoschke, B. Grimm, R. P. Jarvis, and R. Bock. 2019. 'Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress', *Nat Plants*, 5: 525-38.
- Xu, F., and C. Copeland. 2012. '*Nuclear extraction from Arabidopsis thaliana*', *Bio-protocol*, 2.
- Yamaji, Y., K. Maejima, J. Ozeki, K. Komatsu, T. Shiraishi, Y. Okano, M. Himeno, K. Sugawara, Y. Neriya, N. Minato, C. Miura, M. Hashimoto, and S. Namba. 2012. 'Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level', *Plant Cell*, 24: 778-93.

- Zhang, Y., and X. Li. 2005. 'A putative nucleoporin 96 Is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by suppressor of npr1-1, constitutive 1', *Plant Cell*, 17: 1306-16.
- Zhou, L., and N. Pante. 2010. 'The nucleoporin Nup153 maintains nuclear envelope architecture and is required for cell migration in tumor cells', *FEBS Lett*, 584: 3013-20.
- Zhu, Y., B. Wang, K. Tang, C. C. Hsu, S. Xie, H. Du, Y. Yang, W. A. Tao, and J. K. Zhu. 2017. 'An Arabidopsis Nucleoporin NUP85 modulates plant responses to ABA and salt stress', *PLoS Genet*, 13: e1007124.

Figure descriptions

Fig. 1. An optimized nuclear extraction protocol provides samples enriched in nuclear proteins while limiting damage to nuclear envelopes. (a) Confocal microscopy images of a nucleus in a nuclear fraction. Visualization of nucleus shape by DAPI staining and observation of NE integrity by presence of RAE1-GFP. DIC indicates differential interference contrast. (b) Quality control of the optimized nuclear extraction protocol by immunoblotting using HSP70c and histone H3 as cytosolic and nuclear markers respectively. For each fraction, 10 μ g of total proteins were loaded on gel. CE indicates crude extract, CF = cytosolic fraction and NF = nuclear fraction.

Fig. 2. The nuclear proteomes of *A. thaliana* leaves vary according to treatments. (a) Quality control by immunoblotting of nuclear fractions obtained from each biological replicate following treatments. HSP70c and histone H3 serve as cytosolic and nuclear markers respectively. For each fraction, 4 μ g of total proteins were loaded on gel. NF indicates nuclear fraction and CE = crude extract. (b) Principal component analysis graph of nuclear fraction proteins detected by mass spectrometry. Nuclear fractions obtained from each biological replicate following treatments are represented by their sample name on the graph. CTRL indicates samples obtained from control leaves, INA = samples obtained from INA treated leaves and PIAMV = sample obtained from PIAMV infected leaves.

Fig. 3. Abundance of *A. thaliana* nucleoporins. Bar graph displaying abundance of all nucleoporins detected in nuclear proteome of control leaves. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) values obtained by mass spectrometry is used to estimate protein abundances. Graph show median emPAI values and median absolute deviation from five biological replicates. Nucleoporins are separated and color coded according to their position in plant NPC based on current knowledge.

Fig. 4. Nup1/Nup136 is less abundant in nuclear proteomes of PIAMV infected leaves. (a) Volcano plot displaying nucleoporins quantitative change in nuclear proteome of PIAMV infected leaves relative to control leaves. Nucleoporins with a significant

quantitative change are represented by black dots, those without are represented by grey dots. (b) Box plot presenting proteins intensity value obtained by mass spectrometry of Nup1 for all biological replicates of each group. Cross-marks represent average protein intensity. PIAMV indicates values obtained from PIAMV infected leaves and CTRL = values obtained from control leaves.

Fig. 5. Aladin, Nup214 and Seh1 are less abundant in nuclear proteomes of INA treated leaves. (a) Volcano plot displaying nucleoporins quantitative change in nuclear proteome of INA treated leaves relative to control leaves. Nucleoporins with a significant quantitative change are represented by black dots, those without are represented by grey dots. (b) Box plot presenting proteins intensity value obtained by mass spectrometry of Aladin, Nup214 and Seh1 for all biological replicates of each group. Cross-marks represent average protein intensity. INA indicates values obtained from INA treated leaves and CTRL = values obtained from control leaves.

Fig. 6. Nucleoporins with a significant quantitative change are located at NPC's extremities. Schematic representation of plant NPC. Nucleoporins position is based on current knowledge of plant NPC structure. Quantitative changes in treated relative to control samples are represented by a color gradient. Nucleoporins with a significant quantitative change in nuclear proteome following treatments are in bold. Nucleoporins not detected by mass spectrometry in this study are crossed out.

Fig. S1. Treatments assessments. Quality control of *A. thaliana* leaf samples following treatments. Leaf samples were collected one day post treatments. (a) Quality control by immunoblotting, antibodies against coat proteins of PIAMV serve as a marker for PIAMV presence. PIAMV solution used to inoculate leaves serves as a positive control (+ctrl). (b) Quality control by qRT-PCR, pathogenesis-related protein 1 (PR1) and pathogenesis-related protein 2 (PR2) serve as markers for plant immune response. PDF2 is used to normalize transcript levels. Bar graph presents data obtained from three biological replicates. CTRL indicates samples obtained from control leaves, INA = samples obtained from INA treated leaves and PIAMV = sample obtained from PIAMV infected leaves.

Fig. S2. PIAMV is able to replicate and propagate in *A. thaliana* plants after inoculation. (a) Detection of PIAMV coat proteins (CP-PIAMV) in PIAMV-GFP and mock inoculated leaves by immunoblotting. Dpi indicates day(s) post infection. (b) Area of leaves infected by PIAMV visible under UV light. Here, only three leaves were rub-inoculated with PIAMV-GFP.

Fig. S3. Nuclear fractions of INA treated leaves contain more HSP70c. Analysis of HSP70c detection in the immunoblot of nuclear fractions obtained from each biological replicate following treatments (see Fig. 2.a). Bar graph represents immunoblot band density ratio between HSP70c detected in each nuclear fraction relative to HSP70c detected in the crude extract. The same crude extract sample were loaded as control for all immunoblot presented in Fig 2.a. NF indicates nuclear fraction, CE = crude extract, CTRL = samples obtained from control leaves, INA = samples obtained from INA treated leaves and PIAMV = sample obtained from PIAMV infected leaves. ** indicates p-value ≤ 0.01 .

Fig. S4. Nucleoporins transcript levels following treatments with INA or salicylic acid. Heatmap created with Genevestigator using available data. Data collected from different studies are used to show a wide range of transcript levels variation following treatments.

Figure

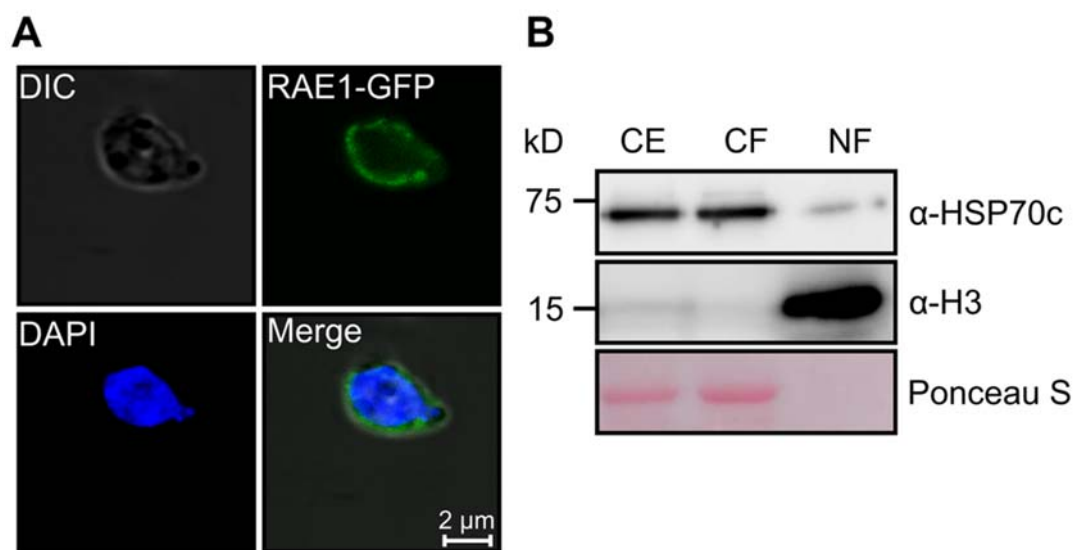


Fig. 1.

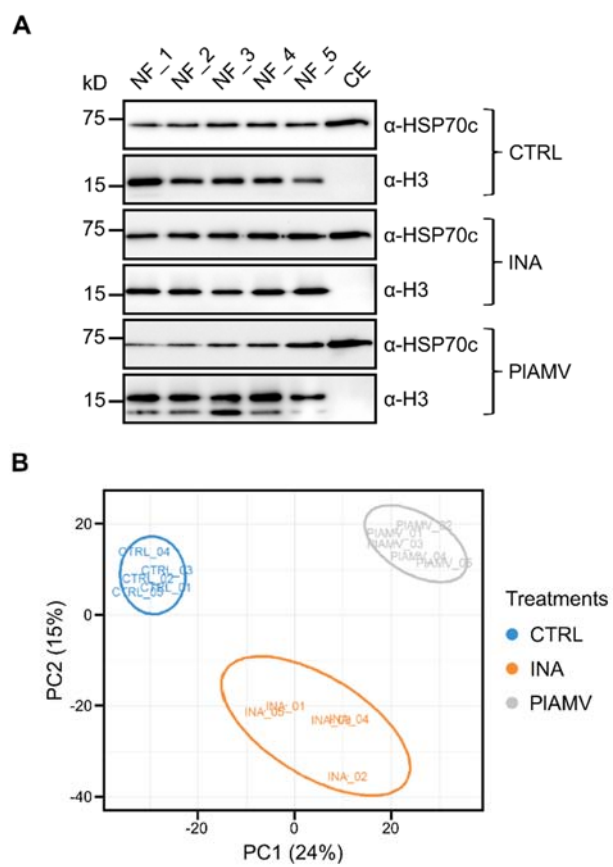


Fig. 2.

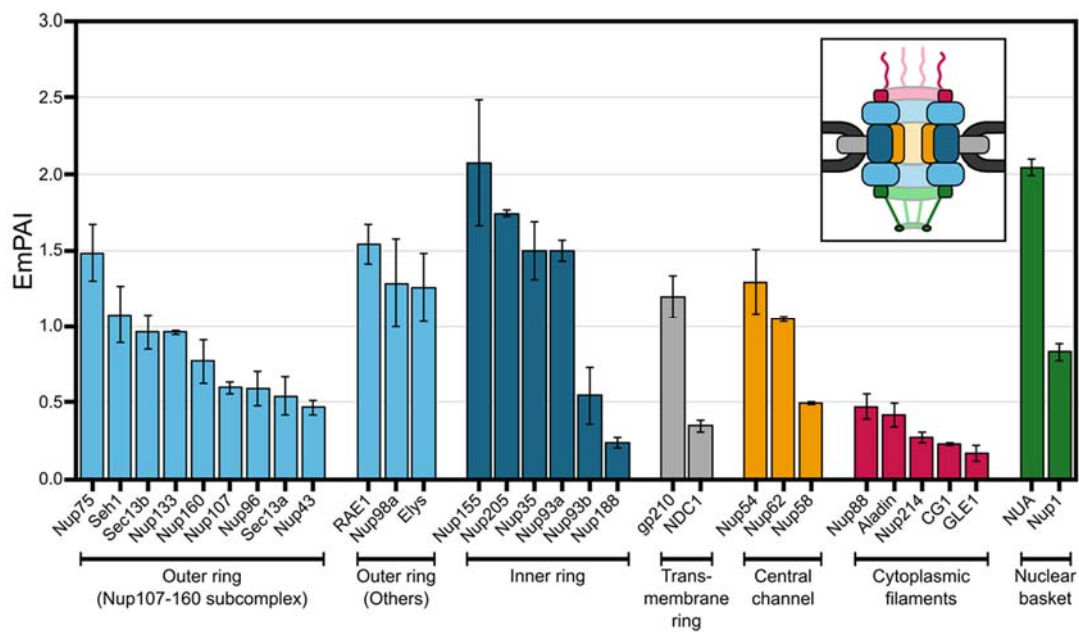


Fig. 3.

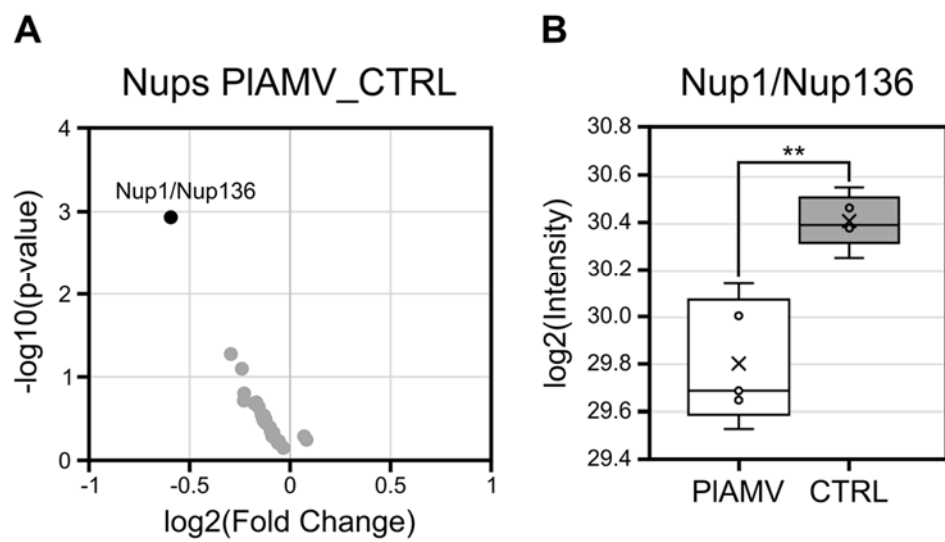


Fig. 4.

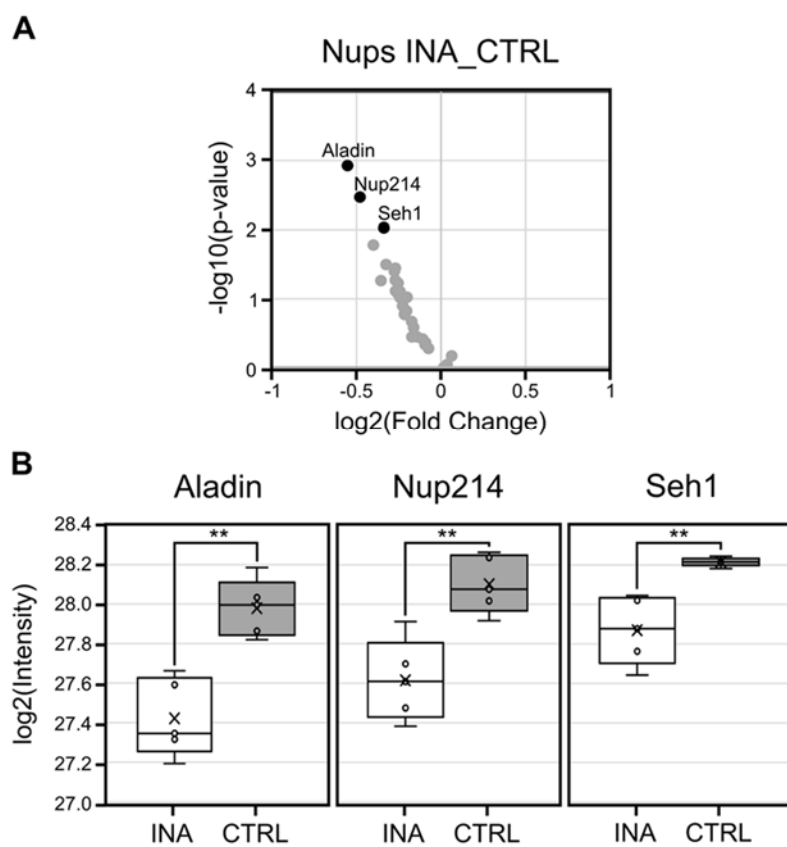


Fig. 5.

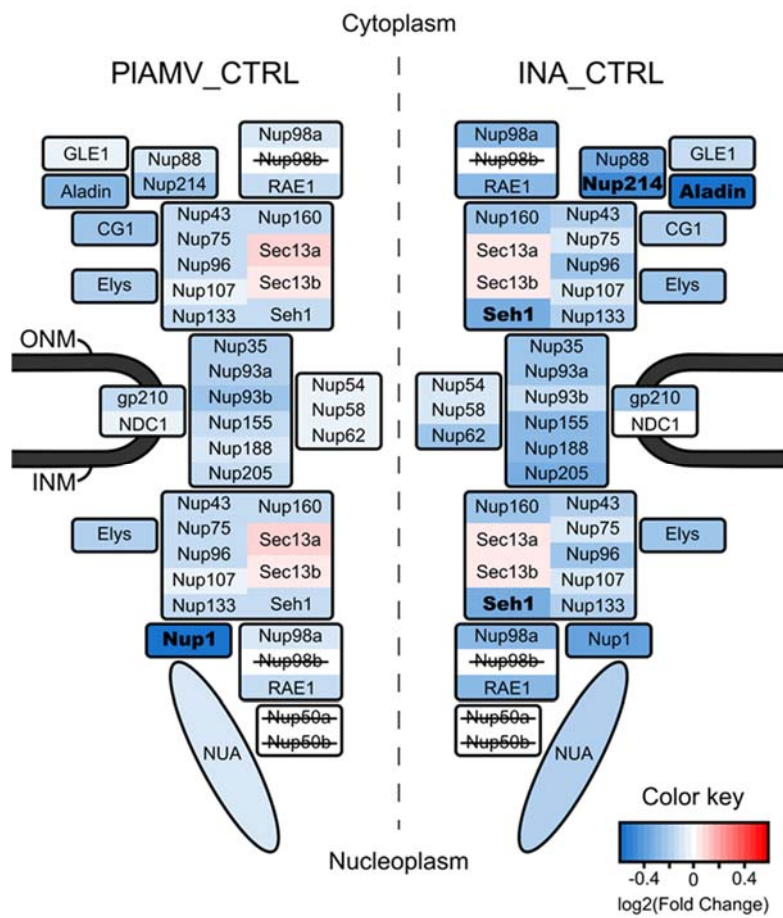


Fig. 6.

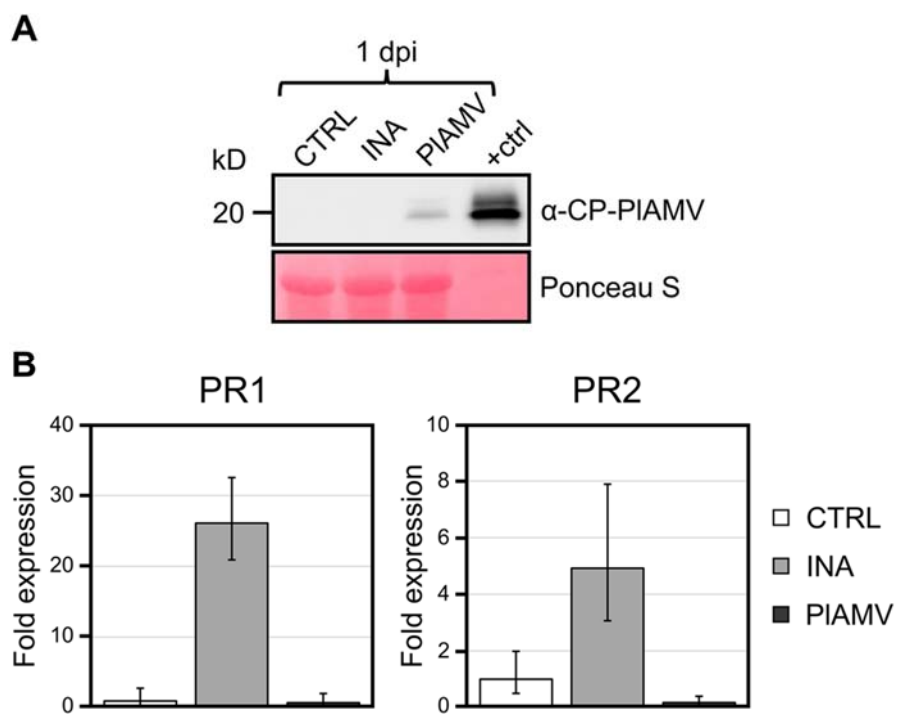


Fig. S1.

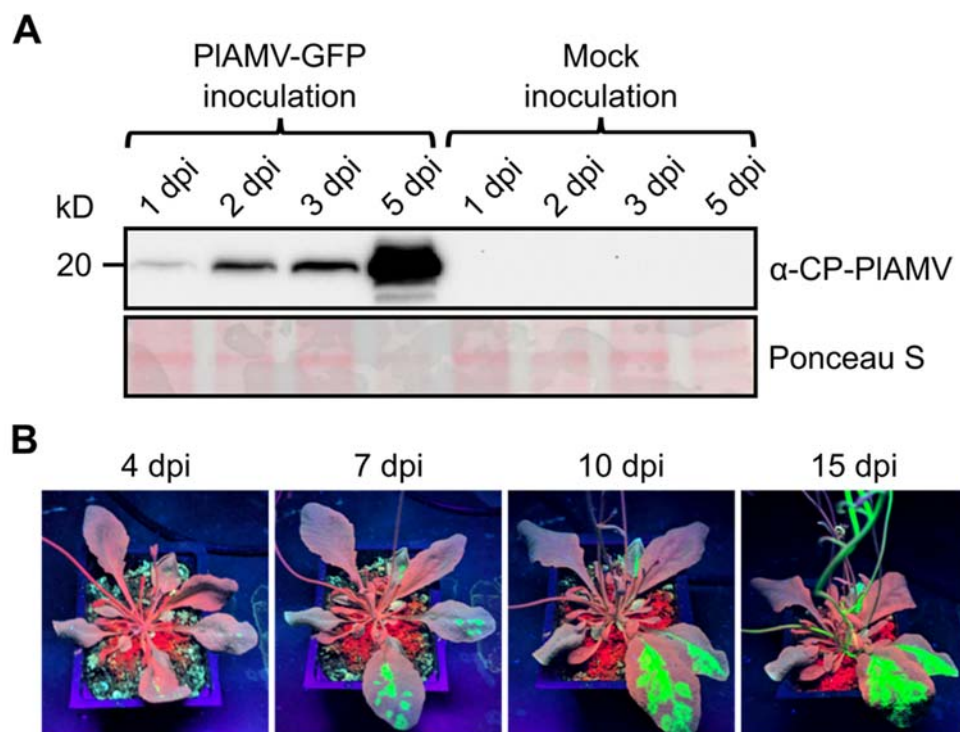


Fig. S2.

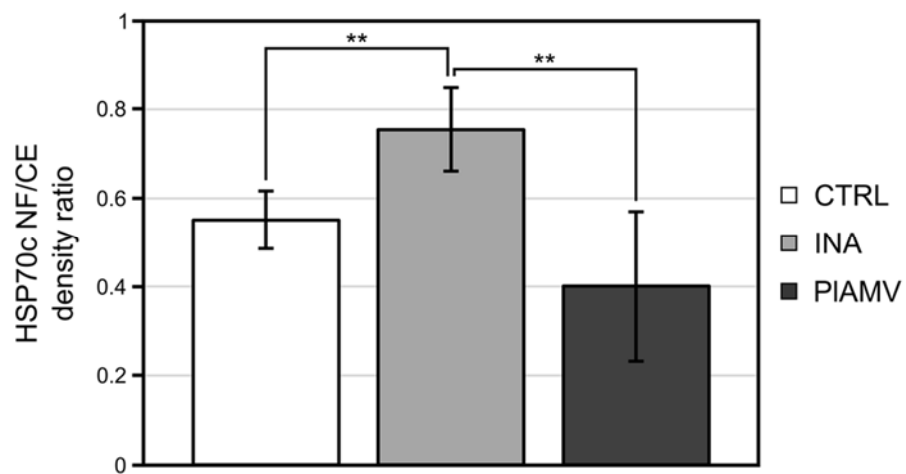


Fig. S3.

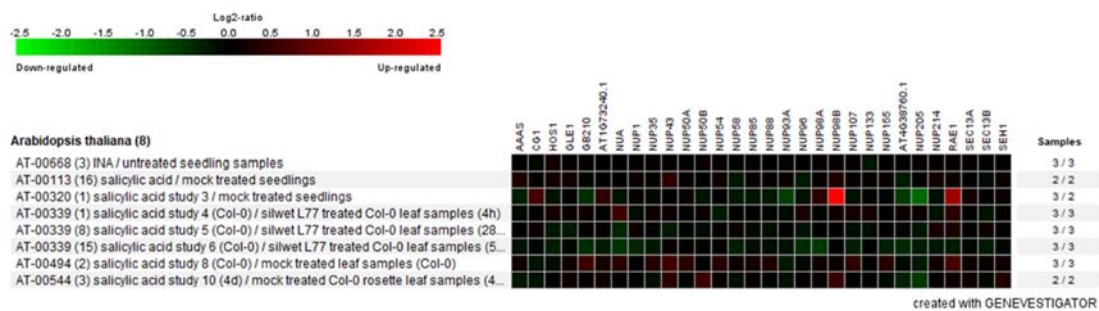


Fig. S4.

Table 1. Nucleoporins investigated by MS analysis in this study.

AGI code	Name	MW (kD)	Razor unique peptides	Mean coverage
<i>Outer ring (Nup107-160 subcomplex)</i>				
At4g30840	Nup43	39	7	16.26%
At4g32910	Nup75/Nup85	81	25	25.60%
At1g80680	Nup96/MOS3/SAR3	119	26	15.92%
At3g14120	Nup107	125	27	18.95%
At2g05120	Nup133	145	47	27.58%
At1g33410	Nup160/SAR1	168	39	17.91%
At3g01340	Sec13a	33	5	18.47%
At2g30050	Sec13b	33	12	30.62%
At1g64350	Seh1	36	12	28.37%
<i>Outer ring (Others)</i>				
At2g39810	Elys/HOS1	105	32	29.18%
At1g10390	Nup98a	106	22	19.43%
At1g59660	Nup98b	103	-	-
At1g80670	RAE1	38	14	36.09%
<i>Inner ring</i>				
At3g16310	Nup35	35	9	32.43%
At2g41620	Nup93a	97	34	32.44%
At3g57350	Nup93b	96	15	14.85%
At1g14850	Nup155	160	62	36.78%
At4g38760	Nup188/DUF3414	219	34	8.07%
At5g51200	Nup205	210	64	29.75%
<i>Transmembrane ring</i>				
At5g40480	gp210	211	58	25.81%
At1g73240	NDC1	57	11	9.64%
<i>Central channel</i>				
At1g24310	Nup54	42	14	27.82%
At4g37130	Nup58	57	9	14.22%
At2g45000	Nup62	73	17	17.66%
<i>Cytoplasmic filaments</i>				
At3g56900	Aladin	48	10	11.79%
At1g75340	CG1	41	4	8.11%
At1g13120	GLE1	70	7	7.13%
At5g05680	Nup88/MOS7	90	16	13.12%
At1g55540	Nup214	193	22	7.60%
<i>Nuclear basket</i>				
At1g79280	NUA/Tpr	237	102	33.81%
At3g10650	Nup1/Nup136	136	35	18.96%
At1g52380	Nup50a	47	-	-
At3g15970	Nup50b	49	-	-

CHAPITRE III

DISCUSSION

3.1 Retour sur les résultats obtenus

Les mécanismes régissant les interactions entre les plantes et leurs pathogènes sont complexes. La recherche scientifique a permis d'élucider une partie de ces mécanismes. Cependant, plusieurs processus impliqués dans ces interactions restent encore à découvrir. Le rôle exact des pores nucléaires, et des nucléoporines les composant, en fait partie. Il a déjà été démontré que les pores nucléaires jouent un rôle essentiel lors des interactions hôtes-phytopathogènes via leur fonction de médiateur des échanges nucléocytoplasmiques (Deslandes et Rivas 2011). Il a aussi été établi que des nucléoporines végétales spécifiques sont requises pour une réponse de défense efficace et combattre certains phytopathogènes (Ohtsu et al. 2014; Roth et Wiermer 2012; Wiermer et al. 2012). Ainsi, il serait sensé que les pores nucléaires végétaux subissent une altération suite à l'activation de la réponse de défense. Cependant, cela n'avait jamais été investigué auparavant. Il serait aussi logique que certains phytopathogènes impactent des nucléoporines spécifiques afin de nuire à la réponse immunitaire de l'hôte, bouleverser le transport nucléocytoplasmique ou atteindre l'intérieur du noyau. Pourtant, ce sujet n'avait jamais été étudié chez les végétaux.

Cela a mené à la conception du projet de recherche présenté dans ce mémoire. Le but du projet était d'investiguer l'impact d'une infection par le phytovirus modèle PLAMV et de l'activation de la réponse de défense sur les pores nucléaires de l'organisme modèle végétal *A. thaliana*. Il a été démontré que divers virus humains modifient l'abondance de nucléoporines spécifiques lors du processus d'infection (Le Sage et Mouland 2013; Cohen, Etingov, et Pante 2012). Ainsi, nous avons posé comme hypothèse que l'infection par PLAMV et l'activation de la réponse immunitaire végétale modifient l'abondance de

nucléoporines spécifiques et que ces changements sont détectables par spectrométrie de masse quantitative. Nous avons choisi cette technique d'analyse puisqu'elle permet de détecter de manière non ciblée les protéines contenues dans plusieurs échantillons puis de comparer la variation d'abondance de ceux-ci entre différentes conditions.

Les résultats obtenus au cours ma maîtrise ont permis de démontrer que ces hypothèses sont véridiques. En effet, l'infection par le phytovirus PIAMV diminue de manière significative l'abondance de la nucléoporine végétale Nup1/Nup136 dans le protéome nucléaire d'*A. thaliana*. La quantité de cette nucléoporine est abaissée de 34 % 24 h suivant l'inoculation par PIAMV. Ces résultats ont permis de démontrer, pour la première fois, qu'un phytovirus modèle possède la capacité d'impacter une nucléoporine végétale spécifique lors de son processus d'infection. Nous avons aussi établi que l'activation de la réponse de défense diminue significativement la quantité de trois nucléoporines différentes dans le protéome nucléaire. Les nucléoporines en question sont Aladin, Nup214 et Seh1. Une diminution d'abondance respective de 32 %, 28 % et 21 % a été détectée 24 h après l'induction de la réponse immunitaire par l'application d'une solution d'INA. Nos résultats permettent de démontrer, pour la première fois, que l'activation de la réponse de défense affecte les pores nucléaires végétaux et modifient l'abondance de nucléoporines spécifiques dans le noyau.

Pour obtenir ces résultats et arriver à ces conclusions, il a été nécessaire d'optimiser un protocole d'extraction de noyaux permettant de détecter la majorité des nucléoporines végétales d'intérêt par spectrométrie de masse. L'entièreté du projet de recherche reposait sur l'optimisation de ce protocole. Une lignée transgénique d'*A. thaliana* exprimant la nucléoporine RAE1-GFP a été utilisée pour marquer l'enveloppe nucléaire (Tamura et al. 2010). La présence de GFP permettait de suivre l'intégrité de l'enveloppe nucléaire au fur et à mesure des différentes étapes d'extraction.

Au cours de l'étude, différents protocoles d'isolation de noyaux et d'enveloppes nucléaires ont été testés (Sikorskaite et al. 2013; Xu et Copeland 2012; Folta et Kaufman 2006; Matunis 2006). Les extraits finaux ont été observés au microscope confocal pour

visualiser l'intégrité des noyaux et analysés par Western Blot afin de déterminer l'enrichissement en protéines nucléaires. Le protocole de Xu et Copeland (2012) a été sélectionné dû à sa simplicité et son bon rendement d'enrichissement en protéines nucléaires. Cependant, l'enveloppe nucléaire des noyaux obtenus était grandement endommagée. Cela était le cas pour tous les protocoles testés. En effet, aucune trace de GFP n'était observable par microscopie confocale autour des noyaux obtenus. Ainsi, le protocole original de Xu et Copeland (2012) a dû être modifié afin de diminuer au maximum les dommages engendrés à l'enveloppe nucléaire. La quantité de matériel de départ, la méthode pour broyer les feuilles, le nombre total de lavages et le volume de solutions utilisées pour chacun de ces lavages sont toutes des étapes qui ont été optimisées par rapport au protocole original.

Suite à ces modifications, nous avons été capables d'obtenir des échantillons enrichis en protéines nucléaires tout en conservant l'enveloppe des noyaux intacte. L'optimisation du protocole a porté ses fruits puisque 30 nucléoporines différentes sur un total de 33 chez *A. thaliana* (Tamura et Hara-Nishimura 2013) sont détectables par spectrométrie de masse dans nos échantillons. Néanmoins, il est important de noter que ces échantillons présentaient encore une certaine contamination cytoplasmique. Il aurait été possible de diminuer cette contamination en augmentant le nombre total de lavages effectués avec la solution contenant du Triton X-100. Ce détergent est essentiel pour enlever la contamination par des protéines chloroplastiques et cytoplasmiques. Au contraire des organismes animaux, les végétaux possèdent des chloroplastes. Ces chloroplastes sédimentent à la même vitesse que les noyaux des plantes (Sikorskaite et al. 2013). L'utilisation d'un détergent comme le Triton X-100 permet de détruire les interactions maintenant les membranes biologiques intactes (Ahyayauch et al. 2010) et de retirer les chloroplastes des extraits de noyaux. Cependant, l'enveloppe nucléaire est aussi une membrane biologique. Elle peut être endommagée par la présence de ce détergent. Pour notre étude, nous avons décidé de réaliser un nombre minimal de lavages avec la solution de Triton X-100 afin de conserver l'intégrité de l'enveloppe nucléaire même si cela signifiait d'autoriser une certaine contamination cytoplasmique.

Les pores nucléaires d'*A. thaliana* sont composés de 33 nucléoporines différentes (Tamura et Hara-Nishimura 2013). Nous en avons détecté 30 par spectrométrie de masse à l'aide de notre protocole optimisé. Ces 30 nucléoporines différentes ont été repérées dans tous nos échantillons d'extrait de noyaux démontrant la fiabilité et la reproductibilité de notre protocole. Les trois nucléoporines non détectées dans cette étude sont Nup98b, Nup50a et Nup50b. Nup98b fait partie du sous-complexe de l'anneau externe tandis que Nup50a et Nup50b font partie du sous-complexe formant le panier nucléaire. Selon leur localisation dans les pores nucléaires, toutes ces nucléoporines sont présentes du côté interne du noyau. Cela signifie qu'il est peu probable que nous les ayons perdus pendant le processus d'extraction des noyaux. D'autant plus que nous avons détecté toutes les nucléoporines formant les filaments cytoplasmiques du pore nucléaire. Il serait plus probable que ces trois nucléoporines non-détectées soient présentes en quantité inférieure au seuil de détection du spectromètre de masse. Cette hypothèse fait particulièrement du sens pour la nucléoporine Nup98b. Celle-ci est connue pour être faiblement exprimée lorsque son homologue Nup98a est fortement exprimé et *vice versa* (Gallemi et al. 2016). La détection de Nup98a dans nos échantillons pourrait expliquer l'absence de détection de Nup98b. Une autre explication possible est que ces trois nucléoporines ne soient tout simplement pas présentes dans les noyaux des feuilles d'*A. thaliana*. Leur séquence d'acides aminés n'est pas un obstacle à leur détection par spectrométrie de masse. En fait, elles ont toutes déjà été détectées dans d'autres études de protéomique (Furtauer et al. 2019; Wu et al. 2019; Mergner et al. 2020), mais jamais dans une étude se concentrant sur le protéome nucléaire des feuilles. Ainsi, leur accumulation cellulaire pourrait être tissu-dépendant ou organe-dépendante.

Au cours du projet, deux articles portant sur la détection des protéines de l'enveloppe nucléaire végétale par spectrométrie de masse ont été publiés (Tang, Huang, et Gu 2020; Goto et al. 2019). Ces articles portaient exclusivement sur la conception d'un protocole permettant l'étude de ce type de protéines. Un total de 13 nucléoporines différentes d'*A. thaliana* ont été détectées dans l'article publié en 2019 (Goto et al. 2019). Un total de 27 a été décelé dans celui de 2020 (Tang, Huang, et Gu 2020). Cela est moindre que les 30 détectables à l'aide de notre protocole optimisé d'extraction de noyaux.

Il est intéressant de noter que Nup98b, Nup50a et Nup50b n'ont pas non plus été identifiées par spectrométrie de masse dans ces deux études.

Une fois le protocole d'extraction de noyaux optimisé, nous étions en mesure de passer au deuxième objectif du projet de recherche. Celui-ci consiste à déterminer de façon quantitative les différences au niveau des nucléoporines entre des plants contrôles, infectés par le phytovirus PIAMV ou en réponse de défense via l'induction par l'INA. Les feuilles ont été récoltées 24 h après l'application des traitements puis les noyaux ont été extraits. Nous avons envoyé un total de 15 échantillons enrichis en protéines nucléaires à analyser par spectrométrie de masse, soit cinq réplicats par conditions (contrôle, PIAMV et INA). Le protéome nucléaire de chacun de ces échantillons a été acquis. Une analyse par composants principaux a permis de comparer ces protéomes nucléaires entre eux. L'analyse a démontré que les échantillons de la même condition expérimentale possèdent des profils protéomiques similaires et qu'il y a peu de variation entre les cinq réplicats. L'analyse a aussi établi que les trois conditions expérimentales peuvent être distinguées en fonction de leurs profils protéomiques nucléaires. Cela est logique puisque les protéines contenues dans les noyaux d'*A. thaliana* changent drastiquement suite à un stress (Fakih et al. 2016; Bae et al. 2003). Nos résultats montrent que le protéome nucléaire des feuilles diffère selon les conditions avec une faible variabilité entre les réplicats biologiques d'un même traitement. Cela était important à établir si nous voulions faire une comparaison quantitative entre les nucléoporines de feuilles contrôles et celles de feuilles inoculées par PIAMV ou traitées avec une solution d'INA.

Une seule nucléoporine, parmi les 30 détectées, voit sa quantité dans le noyau des feuilles diminuée significativement suite à l'infection par PIAMV. Cette nucléoporine est Nup1/Nup136. Son abondance est abaissée de 34 % une journée après l'inoculation par le phytovirus. *A. thaliana* est naturellement susceptible à PIAMV, c'est-à-dire que la présence de ce virus n'active pas la réponse de défense de la plante (Yamaji et al. 2012; Hashimoto et al. 2016). Ainsi, la diminution d'abondance de Nup1/Nup136 n'est pas provoquée par le système immunitaire de l'hôte.

Nup1/Nup136 est impliquée dans la réponse de défense végétale dépendante du signal par l'acide salicylique (Tamura et al. 2017). Ainsi, il est possible que PIAMV cible cette nucléoporine dû à son rôle dans l'activation de la réponse immunitaire. De plus, Nup1/Nup136 est une nucléoporine à domaine répétitif FG (Tamura et Hara-Nishimura 2013). Cela signifie qu'elle joue un rôle direct dans la régulation du transport nucléocytoplasmique. En outre, l'abondance de Nup1/Nup136 régule la forme du noyau. Sa surexpression induit l'élongation de ces derniers tandis qu'une réduction de son abondance cause la formation de noyaux plus petits que la normale (Tamura et al. 2017). Ainsi, il est aussi possible que PIAMV affecte Nup1/Nup136 dû à sa participation dans la régulation du transport nucléoplasmique ou à son rôle dans le maintien de la morphologie de l'enveloppe nucléaire.

La nucléoporine végétale Nup1/Nup136 est considérée comme un homologue fonctionnel de la nucléoporine animale Nup153. De la même manière que son homologue végétale, une diminution de l'abondance de Nup153 est corrélée à une structure anormale de l'enveloppe nucléaire (Zhou et Pante 2010). Divers virus humains ciblent Nup153 afin d'altérer le transport nucléocytoplasmique de l'hôte (Le Sage et Mouland 2013). Différents rhinovirus (Ghildyal et al. 2009; Gustin et Sarnow 2002) et le virus de la poliomyélite humaine (Gustin et Sarnow 2001; Park et al. 2008) utilisent des protéases spécifiques pour dégrader Nup153, induisant une diminution de sa quantité et affectant la régulation du transport des protéines à l'intérieur du noyau de l'hôte. Ces virus sont des virus à ARN simple brin, tout comme PIAMV. Ils ne pénètrent pas à l'intérieur du noyau au cours de leur cycle de réplication (Leveque et Semler 2015; Blaas et Fuchs 2016; Park, Jeong, et Kim 2014). Pourtant, ils impactent les pores nucléaires de l'hôte infecté. L'hypothèse est que ces virus humains ciblent Nup153 afin d'induire l'accumulation cytoplasmique de protéines nucléaires utiles pour la réplication virale ou afin d'échapper à la réponse de défense de l'hôte en bloquant l'import de signaux à l'intérieur du noyau (Gustin et Sarnow 2001; Park et al. 2008; Gustin et Sarnow 2002). Un processus similaire pourrait se passer dans les plants infectés par PIAMV suite à la diminution de Nup1/Nup136 dans le noyau des feuilles. Il serait intéressant d'étudier si l'import nucléaire de l'hôte est obstrué dans les plants inoculés par PIAMV.

Nous avons aussi recherché si des protéines virales de PIAMV s'accumulaient dans le noyau des feuilles lors de l'infection. Cela était seulement le cas pour la protéine de capsid de PIAMV (CP). Ce résultat était prévisible puisque les CP d'autres virus végétaux présentent une localisation nucléaire. Cela est le cas pour le *virus de la mosaïque du chou-fleur* (Leclerc, Chapdelaine, et Hohn 1999) et le *virus de la striure du maïs* (Liu et al. 1999). Il est intéressant de noter que l'homologue fonctionnel humain de Nup1/Nup136, Nup153, possède la capacité de se lier fortement au CP de certains virus humains (Schmitz et al. 2010; Matreyek et al. 2013; Matreyek et Engelman 2011). Il serait intéressant de rechercher si une interaction directe a lieu entre la nucléoporine végétale Nup1/Nup136 et les CP de PIAMV.

Dans un autre ordre d'idées, l'abondance des nucléoporines d'*A. thaliana* de plants en état de défense ont été comparés à ceux de plants contrôles. L'activation de la réponse immunitaire via l'application d'une solution d'INA induit une diminution significative des nucléoporines Aladin, Nup214 et Seh1 dans le protéome nucléaire des feuilles. Ces nucléoporines sont respectivement 32 %, 28 % et 21 % moins présentes dans les noyaux suivant l'activation de la réponse de défense. Parmi ces trois nucléoporines différentes, seulement Seh1 possède un lien connu dans les interactions hôtes-phytopathogènes. En effet, Seh1 a déjà été identifiée comme étant essentielle pour la défense des plantes face à différents pathogènes (Wiermer et al. 2012) et nécessaire pour la résistance aux maladies (Roth et Wiermer 2012). Il est tout de même intrigant de constater que son abondance nucléaire diminue. En ce qui concerne Nup214, cette nucléoporine est requise dans le processus d'embryogenèse et pour la viabilité des graines chez *A. thaliana* (Braud, Zheng, et Xiao 2012). Cependant, son rôle dans la réponse immunitaire n'a jamais été investigué auparavant. Quant à Aladin, cette nucléoporine est peu étudiée. Elle est seulement connue pour avoir un rôle structural chez les pores nucléaires végétaux. Des recherches plus poussées sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes induisant la diminution d'abondance d'Aladin, Nup214 et Seh1. Davantage d'études sont aussi requises pour déterminer si Aladin et Nup214 sont directement impliquées dans la réponse immunitaire d'*A. thaliana*.

Nup1/Nup136, Aladin, Nup214 et Seh1 ont vu leur abondance nucléaire diminuée suite aux stress appliqués au cours du projet de recherche. Il est intéressant de constater que ces quatre nucléoporines différentes sont toutes situées aux extrémités des pores nucléaires. Aladin et Nup214 sont des protéines localisées dans les filaments cytoplasmiques. Nup1/Nup136 fait partie du sous-complexe du panier nucléaire et Seh1 de celui de l'anneau externe. Aucun changement significatif d'abondance n'a été décelé pour les nucléoporines au centre du pore nucléaire. Cela inclut le sous-complexe du canal central, de l'anneau interne et de l'anneau transmembranaire. Il est logique que les nucléoporines au centre du pore soient plus fortement ancrées dans le complexe protéique donc, moins susceptibles à un débalancement. Cependant, aucune étude chez *A. thaliana* ne vient appuyer cette hypothèse. Peu de recherches portent sur la mobilité des nucléoporines végétales. À ce jour, seulement Nup1/Nup136 est connue pour avoir une haute mobilité comparativement aux autres protéines du pore nucléaire (Tamura et al. 2010). Néanmoins, nos résultats suggèrent que les nucléoporines végétales localisées aux extrémités du pore sont plus susceptibles de subir une variation d'abondance.

3.2 Conclusion

Le projet de maîtrise effectué ouvre la porte à un tout nouvel axe de recherche dans le laboratoire sur l'immunité végétale du Dr. Hugo Germain. Cet axe portera sur le rôle des pores nucléaires et du transport nucléocytoplasmique lors des interactions hôtes-phytopathogènes. Les travaux présentés dans ce mémoire correspondent à la première étude d'envergure dans cette nouvelle branche du laboratoire.

Le protocole optimisé d'extraction de noyaux a été essentiel pour le succès du projet. Il est idéal pour l'étude des protéines nucléaires et des nucléoporines chez l'organisme végétal modèle *A. thaliana*. Le protocole mis au point pourra servir ultérieurement dans le cadre d'autres projets de recherche. Il permettra aussi à d'autres laboratoires de plus facilement étudier les composants de l'enveloppe nucléaire végétale et de ces pores nucléaires par spectrométrie de masse.

L'étude effectuée a permis d'identifier Nup1/Nup136 comme étant une nucléoporine d'intérêt en ce qui a trait à l'infection de l'hôte végétal par le phytovirus modèle PIAMV. Les résultats obtenus ont aussi permis l'identification de deux nouvelles nucléoporines d'intérêt (Aladin et Nup214) en relation avec la réponse de défense végétale. Néanmoins, des études plus poussées sont requises afin de déterminer si Aladin et Nup214 sont directement impliquées dans la réponse immunitaire végétale. De plus, davantage de recherche est nécessaire afin de révéler les mécanismes conduisant à la diminution d'abondance de ces nucléoporines spécifiques dans le protéome nucléaire.

Des plants transgéniques d'*A. thaliana* portant une mutation au niveau des nucléoporines d'intérêt sont disponibles à des fins de recherche. Ces mutations conduisent à une perte complète ou partielle des nucléoporines touchées. Les plants sont considérés comme complètement ou partiellement « knockouts » pour les gènes mutés. Il serait intéressant d'investiguer si des plants d'*A. thaliana* « knockout » pour Nup1/Nup136 sont plus ou moins susceptibles à l'infection par le phytovirus modèle PIAMV. La propagation de PIAMV-GFP dans les plants « knockouts » pour Nup1/Nup136 pourrait être comparée à ceux de plants contrôles via la détection de protéines virales par Western-Blot ou par un suivi visuel sous lampe UV de la progression du virus (Hashimoto et al. 2016). Il serait aussi intéressant d'investiguer si une perte de Nup214 ou Aladin conduit à une réponse de défense moins efficace. Il serait possible d'induire l'activation de la réponse immunitaire dans des plants « knockouts » pour Nup214 ou Aladin via l'application d'une solution d'INA, puis mesurer l'intensité de la réponse de défense comparativement à des plants d'*A. thaliana* WT Col-0 sans mutation (Jin et al. 2018; Cheng et al. 2009). La différence au niveau de la transcription de gènes de défense, comme PR1 et PR2, pourrait être évaluée par qRT-PCR.

La protéine CP de PIAMV est la seule protéine virale détectée dans le protéome nucléaire des feuilles suite à l'inoculation du phytovirus dans *A. thaliana*. Les CP de certains virus humains possèdent la capacité de se lier fortement à Nup153, l'homologue fonctionnel animal de Nup1/Nup136 (Schmitz et al. 2010; Matreyek et al. 2013; Matreyek et Engelman 2011). Ainsi, il serait intéressant d'investiguer si une interaction directe

survient entre les CP de PIAMV et la nucléoporine végétale Nup1/Nup136. Pour ce faire, il serait possible d'inoculer des feuilles d'*A. thaliana*, puis isoler les CP de PIAMV par immunoprécipitation. L'extrait obtenu pourrait être analysé par spectrométrie de masse. Ainsi, il serait possible de déterminer si les CP de PIAMV interagissent directement avec Nup1/Nup136 ou avec toute autre protéine d'*A. thaliana* impliquée dans le transport nucléocytoplasmique. Cela pourrait renseigner sur les mécanismes conduisant à l'accumulation des CP de PIAMV dans le noyau des feuilles.

Bien que le projet se soit concentré sur le changement d'abondance des différentes nucléoporines, l'analyse de spectrométrie de masse des échantillons a permis d'obtenir les variations quantitativement significatives de toutes les protéines contenues dans les noyaux. Il serait intéressant d'investiguer plus en profondeur l'ensemble des changements d'abondance du protéome nucléaire. L'analyse de ces données par bio-informatique pourrait permettre d'identifier de nouvelles protéines d'intérêts en relation aux interactions hôtes-phytopathogènes. En outre, l'hypothèse que PIAMV affecte Nup1/Nup136 pour obstruer l'import nucléaire de l'hôte a été préalablement soulevée. L'obstruction du transport nucléocytoplasmique pourrait induire l'accumulation cytoplasmique de protéines nucléaires utiles pour la réplication virale ou bloquer l'import de signaux de défense à l'intérieur du noyau de l'hôte. Il serait intéressant d'étudier l'ensemble des changements d'abondance du protéome nucléaire suite à l'infection par PIAMV afin d'identifier s'il y a une diminution de la quantité de protéines nucléaires bénéfiques pour la réplication virale ou de protéines impliquées dans les signaux de défense.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahyayauch, H., M. Bennouna, A. Alonso, and F. M. Goni. 2010. 'Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena', *Langmuir*, 26: 7307-13.
- Aktar, M. W., D. Sengupta, and A. Chowdhury. 2009. 'Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards', *Interdiscip Toxicol*, 2: 1-12.
- Alexandratos, N., and J. Bruinsma. 2012. "World agriculture toward 2030/2050: The 2012 revision." In, edited by FOA Agricultural Development Economics Division.
- Ali, S., B. A. Ganai, A. N. Kamili, A. A. Bhat, Z. A. Mir, J. A. Bhat, A. Tyagi, S. T. Islam, M. Mushtaq, P. Yadav, S. Rawat, and A. Grover. 2018. 'Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance', *Microbiol Res*, 212-213: 29-37.
- An, C., and Z. Mou. 2011. 'Salicylic acid and its function in plant immunity', *J Integr Plant Biol*, 53: 412-28.
- Anderson, J. P., C. A. Gleason, R. C. Foley, P. H. Thrall, J. B. Burdon, and K. B. Singh. 2010. 'Plants versus pathogens: an evolutionary arms race', *Funct Plant Biol*, 37: 499-512.
- Ayash, M., M. Abukhalaf, D. Thieme, C. Proksch, M. Heilmann, M. Schattat, and W. Hoehenwarter. 2021. 'LC-MS Based Draft Map of the Arabidopsis thaliana Nuclear Proteome and Protein Import in Pattern Triggered Immunity', *bioRxiv*.
- Azad, M. A., L. Amin, and N. M. Sidik. 2014. 'Gene technology for papaya ringspot virus disease management', *ScientificWorldJournal*, 2014: 768038.
- Bae, M. S., E. J. Cho, E. Y. Choi, and O. K. Park. 2003. 'Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress', *Plant J*, 36: 652-63.
- Beck, M., and E. Hurt. 2017. 'The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 73-89.
- Bektas, Y., and T. Eulgem. 2014. 'Synthetic plant defense elicitors', *Front Plant Sci*, 5: 804.

- Bhargava, A., X. Lahaye, and N. Manel. 2018. 'Let me in: Control of HIV nuclear entry at the nuclear envelope', *Cytokine Growth Factor Rev*, 40: 59-67.
- Bigeard, J., J. Colcombet, and H. Hirt. 2015. 'Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI)', *Mol Plant*, 8: 521-39.
- Blaas, D., and R. Fuchs. 2016. 'Mechanism of human rhinovirus infections', *Mol Cell Pediatr*, 3: 21.
- Borrelli, V. M. G., V. Brambilla, P. Rogowsky, A. Marocco, and A. Lanubile. 2018. 'The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology', *Front Plant Sci*, 9: 1245.
- Boruc, J., X. Zhou, and I. Meier. 2012. 'Dynamics of the plant nuclear envelope and nuclear pore', *Plant Physiol*, 158: 78-86.
- Braud, C., W. Zheng, and W. Xiao. 2012. 'LONO1 encoding a nucleoporin is required for embryogenesis and seed viability in Arabidopsis', *Plant Physiol*, 160: 823-36.
- Brosseau, C., M. El Oirdi, A. Adurogbangba, X. Ma, and P. Moffett. 2016. 'Antiviral Defense Involves AGO4 in an Arabidopsis-Potexvirus Interaction', *Mol Plant Microbe Interact*, 29: 878-88.
- Canonne, J., and S. Rivas. 2012. 'Bacterial effectors target the plant cell nucleus to subvert host transcription', *Plant Signal Behav*, 7: 217-21.
- Capelson, M., Y. Liang, R. Schulte, W. Mair, U. Wagner, and M. W. Hetzer. 2010. 'Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes', *Cell*, 140: 372-83.
- Cheng, Y. T., H. Germain, M. Wiermer, D. Bi, F. Xu, A. V. Garcia, L. Wirthmueller, C. Despres, J. E. Parker, Y. Zhang, and X. Li. 2009. 'Nuclear pore complex component MOS7/Nup88 is required for innate immunity and nuclear accumulation of defense regulators in Arabidopsis', *Plant Cell*, 21: 2503-16.
- Choi, S. M., H. R. Song, S. K. Han, M. Han, C. Y. Kim, J. Park, Y. H. Lee, J. S. Jeon, Y. S. Noh, and B. Noh. 2012. 'HDA19 is required for the repression of salicylic acid biosynthesis and salicylic acid-mediated defense responses in Arabidopsis', *Plant J*, 71: 135-46.
- Cohen, S., I. Etingov, and N. Pante. 2012. 'Effect of viral infection on the nuclear envelope and nuclear pore complex', *Int Rev Cell Mol Biol*, 299: 117-59.

- Copeland, A. M., W. W. Newcomb, and J. C. Brown. 2009. 'Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment', *J Virol*, 83: 1660-8.
- Damalas, C. A., and I. G. Eleftherohorinos. 2011. 'Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators', *Int J Environ Res Public Health*, 8: 1402-19.
- Dawson, W. O., S. M. Garnsey, S. Tatineni, S. Y. Folimonova, S. J. Harper, and S. Gowda. 2013. 'Citrus tristeza virus-host interactions', *Front Microbiol*, 4: 88.
- Deslandes, L., and S. Rivas. 2011. 'The plant cell nucleus: a true arena for the fight between plants and pathogens', *Plant Signal Behav*, 6: 42-8.
- Di Ventura, B., and B. Kuhlman. 2016. 'Go in! Go out! Inducible control of nuclear localization', *Curr Opin Chem Biol*, 34: 62-71.
- Dodds, P. N., and J. P. Rathjen. 2010. 'Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions', *Nat Rev Genet*, 11: 539-48.
- Fakih, Z., M. B. Ahmed, C. Letanneur, and H. Germain. 2016. 'An unbiased nuclear proteomics approach reveals novel nuclear protein components that participates in MAMP-triggered immunity', *Plant Signal Behav*, 11: e1183087.
- Folta, K. M., and L. S. Kaufman. 2006. 'Isolation of Arabidopsis nuclei and measurement of gene transcription rates using nuclear run-on assays', *Nat Protoc*, 1: 3094-100.
- Furtauer, L., L. Kustner, W. Weckwerth, A. G. Heyer, and T. Nagele. 2019. 'Resolving subcellular plant metabolism', *Plant J*, 100: 438-55.
- Galleme, M., A. Galstyan, S. Paulisic, C. Then, A. Ferrandez-Ayela, L. Lorenzo-Orts, I. Roig-Villanova, X. Wang, J. L. Micol, M. R. Ponce, P. F. Devlin, and J. F. Martinez-Garcia. 2016. 'DRACULA2 is a dynamic nucleoporin with a role in regulating the shade avoidance syndrome in Arabidopsis', *Development*, 143: 1623-31.
- Garrow, J. 2002. 'Feast and famine: a history of food and nutrition in Ireland 1500-1920', *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95: 160-61.
- Genencher, B., L. Wirthmueller, C. Roth, M. Klenke, L. Ma, A. Sharon, and M. Wiermer. 2016. 'Nucleoporin-Regulated MAP Kinase Signaling in Immunity to a Necrotrophic Fungal Pathogen', *Plant Physiol*, 172: 1293-305.

- Ghildyal, R., B. Jordan, D. Li, H. Dagher, P. G. Bardin, J. E. Gern, and D. A. Jans. 2009. 'Rhinovirus 3C protease can localize in the nucleus and alter active and passive nucleocytoplasmic transport', *J Virol*, 83: 7349-52.
- Goto, C., S. Hashizume, Y. Fukao, I. Hara-Nishimura, and K. Tamura. 2019. 'Comprehensive nuclear proteome of Arabidopsis obtained by sequential extraction', *Nucleus*, 10: 81-92.
- Gustin, K. E., and P. Sarnow. 2001. 'Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition', *EMBO J*, 20: 240-9.
- . 2002. 'Inhibition of nuclear import and alteration of nuclear pore complex composition by rhinovirus', *J Virol*, 76: 8787-96.
- Hammond, J. 2018. "Plantago asiatica mosaic virus." In. Wallingford, UK: Invasive Species Compendium, CABI.
- Hashimoto, M., Y. Neriya, T. Keima, N. Iwabuchi, H. Koinuma, Y. Hagiwara-Komoda, K. Ishikawa, M. Himeno, K. Maejima, Y. Yamaji, and S. Namba. 2016. 'EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in Arabidopsis thaliana', *Plant J*, 88: 120-31.
- Hawkins, N. J., C. Bass, A. Dixon, and P. Neve. 2018. 'The evolutionary origins of pesticide resistance', *Biol Rev Camb Philos Soc*.
- He, S., and K. M. Creasey Krainer. 2020. 'Pandemics of People and Plants: Which Is the Greater Threat to Food Security?', *Mol Plant*, 13: 933-34.
- Ibarra, A., and M. W. Hetzer. 2015. 'Nuclear pore proteins and the control of genome functions', *Genes Dev*, 29: 337-49.
- International Plant Protection Convention Secretariat. 2021. "Scientific review of the impact of climate change on plant pests: A global challenge to prevent and mitigate plant-pest risks in agriculture, forestry and ecosystems." In. Rome, Italy: FAO on behalf of the International Plant Protection Convention Secretariat.
- Jin, H., S. M. Choi, M. J. Kang, S. H. Yun, D. J. Kwon, Y. S. Noh, and B. Noh. 2018. 'Salicylic acid-induced transcriptional reprogramming by the HAC-NPR1-TGA histone acetyltransferase complex in Arabidopsis', *Nucleic Acids Res*, 46: 11712-25.
- Kadota, S., J. Ou, Y. Shi, J. T. Lee, J. Sun, and E. Yildirim. 2020. 'Nucleoporin 153 links nuclear pore complex to chromatin architecture by mediating CTCF and cohesin binding', *Nat Commun*, 11: 2606.

- Kahms, M., J. Huve, R. Wesselmann, J. C. Farr, V. Baumgartel, and R. Peters. 2011. 'Lighting up the nuclear pore complex', *Eur J Cell Biol*, 90: 751-8.
- Kane, M., S. V. Rebenburg, M. A. Takata, T. M. Zang, M. Yamashita, M. Kvaratskhelia, and P. D. Bieniasz. 2018. 'Nuclear pore heterogeneity influences HIV-1 infection and the antiviral activity of MX2', *Elife*, 7.
- Khan, M., D. Seto, R. Subramaniam, and D. Desveaux. 2018. 'Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets', *Plant J*, 93: 651-63.
- King, J. C., and J. L. Slavin. 2013. 'White potatoes, human health, and dietary guidance', *Adv Nutr*, 4: 393S-401S.
- Komatsu, K., Y. Yamaji, J. Ozeki, M. Hashimoto, S. Kagiwada, S. Takahashi, and S. Namba. 2008. 'Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species', *Arch Virol*, 153: 193-8.
- Konig, R., S. Stertz, Y. Zhou, A. Inoue, H. H. Hoffmann, S. Bhattacharyya, J. G. Alamares, D. M. Tscherne, M. B. Ortigoza, Y. Liang, Q. Gao, S. E. Andrews, S. Bandyopadhyay, P. De Jesus, B. P. Tu, L. Pache, C. Shih, A. Orth, G. Bonamy, L. Miraglia, T. Ideker, A. Garcia-Sastre, J. A. Young, P. Palese, M. L. Shaw, and S. K. Chanda. 2010. 'Human host factors required for influenza virus replication', *Nature*, 463: 813-7.
- Kramer, U. 2015. 'Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana', *Elife*, 4.
- Kuhn, T. M., and M. Capelson. 2019. 'Nuclear Pore Proteins in Regulation of Chromatin State', *Cells*, 8.
- Le Sage, V., and A. J. Mouland. 2013. 'Viral subversion of the nuclear pore complex', *Viruses*, 5: 2019-42.
- Leclerc, D., Y. Chapdelaine, and T. Hohn. 1999. 'Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein', *J Virol*, 73: 553-60.
- Leveque, N., and B. L. Semler. 2015. 'A 21st century perspective of poliovirus replication', *PLoS Pathog*, 11: e1004825.
- Liu, H., M. I. Boulton, C. L. Thomas, D. A. Prior, K. J. Oparka, and J. W. Davies. 1999. 'Maize streak virus coat protein is karyophilic and facilitates nuclear transport of viral DNA', *Mol Plant Microbe Interact*, 12: 894-900.

- Lu, J., T. Wu, B. Zhang, S. Liu, W. Song, J. Qiao, and H. Ruan. 2021. 'Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus', *Cell Commun Signal*, 19: 60.
- Makhnevych, T., C. P. Lusk, A. M. Anderson, J. D. Aitchison, and R. W. Wozniak. 2003. 'Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex', *Cell*, 115: 813-23.
- Matreyek, K. A., and A. Engelman. 2011. 'The requirement for nucleoporin NUP153 during human immunodeficiency virus type 1 infection is determined by the viral capsid', *J Virol*, 85: 7818-27.
- Matreyek, K. A., S. S. Yucel, X. Li, and A. Engelman. 2013. 'Nucleoporin NUP153 phenylalanine-glycine motifs engage a common binding pocket within the HIV-1 capsid protein to mediate lentiviral infectivity', *PLoS Pathog*, 9: e1003693.
- Matunis, M. J. 2006. 'Isolation and fractionation of rat liver nuclear envelopes and nuclear pore complexes', *Methods*, 39: 277-83.
- Meier, I., and J. Brkljacic. 2010. 'The Arabidopsis nuclear pore and nuclear envelope', *Arabidopsis Book*, 8.
- Mergner, J., M. Frejno, M. List, M. Papacek, X. Chen, A. Chaudhary, P. Samaras, S. Richter, H. Shikata, M. Messerer, D. Lang, S. Altmann, P. Cyprys, D. P. Zolg, T. Mathieson, M. Bantscheff, R. R. Hazarika, T. Schmidt, C. Dawid, A. Dunkel, T. Hofmann, S. Sprunck, P. Falter-Braun, F. Johannes, K. F. X. Mayer, G. Jurgens, M. Wilhelm, J. Baumbach, E. Grill, K. Schneitz, C. Schwechheimer, and B. Kuster. 2020. 'Mass-spectrometry-based draft of the Arabidopsis proteome', *Nature*, 579: 409-14.
- Miller, W. A., S. Liu, and R. Beckett. 2002. 'Barley yellow dwarf virus: Luteoviridae or Tombusviridae?', *Mol Plant Pathol*, 3: 177-83.
- Minato, N., K. Komatsu, Y. Okano, K. Maejima, J. Ozeki, H. Senshu, S. Takahashi, Y. Yamaji, and S. Namba. 2014. 'Efficient foreign gene expression in planta using a plantago asiatica mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1', *Arch Virol*, 159: 885-96.
- Monette, A., N. Pante, and A. J. Mouland. 2011. 'HIV-1 remodels the nuclear pore complex', *J Cell Biol*, 193: 619-31.
- Moussavi-Baygi, R., Y. Jamali, R. Karimi, and M. R. Mofrad. 2011. 'Brownian dynamics simulation of nucleocytoplasmic transport: a coarse-grained model for the functional state of the nuclear pore complex', *PLoS Comput Biol*, 7: e1002049.

- Nazarov, P. A., D. N. Baleev, M. I. Ivanova, L. M. Sokolova, and M. V. Karakozova. 2020. 'Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection', *Acta Naturae*, 12: 46-59.
- Nicaise, V. 2014. 'Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges', *Front Plant Sci*, 5: 660.
- Nicolopoulou-Stamati, P., S. Maipas, C. Kotampasi, P. Stamatis, and L. Hens. 2016. 'Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture', *Front Public Health*, 4: 148.
- Ning, Y., W. Liu, and G. L. Wang. 2017. 'Balancing Immunity and Yield in Crop Plants', *Trends Plant Sci*, 22: 1069-79.
- Oerke, E. 2006. 'Crop losses to pests', *The Journal of Agricultural Science*, 144: 31-43.
- Ohtsu, M., Y. Shibata, M. Ojika, K. Tamura, I. Hara-Nishimura, H. Mori, K. Kawakita, and D. Takemoto. 2014. 'Nucleoporin 75 is involved in the ethylene-mediated production of phytoalexin for the resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans*', *Mol Plant Microbe Interact*, 27: 1318-30.
- Ozeki, J., M. Hashimoto, K. Komatsu, K. Maejima, M. Himeno, H. Senshu, T. Kawanishi, S. Kagiwada, Y. Yamaji, and S. Namba. 2009. 'The N-terminal region of the *Plantago asiatica* mosaic virus coat protein is required for cell-to-cell movement but is dispensable for virion assembly', *Mol Plant Microbe Interact*, 22: 677-85.
- Ozeki, J., S. Takahashi, K. Komatsu, S. Kagiwada, K. Yamashita, T. Mori, H. Hirata, Y. Yamaji, M. Ugaki, and S. Namba. 2006. 'A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica* mosaic virus contributes to systemic necrosis', *Arch Virol*, 151: 2067-75.
- Park, M. R., R. D. Jeong, and K. H. Kim. 2014. 'Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants', *Front Plant Sci*, 5: 60.
- Park, N., P. Katikaneni, T. Skern, and K. E. Gustin. 2008. 'Differential targeting of nuclear pore complex proteins in poliovirus-infected cells', *J Virol*, 82: 1647-55.
- Rasala, B. A., A. V. Orjalo, Z. Shen, S. Briggs, and D. J. Forbes. 2006. 'ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 17801-6.
- Roth, C., and M. Wiermer. 2012. 'Nucleoporins Nup160 and Seh1 are required for disease resistance in *Arabidopsis*', *Plant Signal Behav*, 7: 1212-4.

- Rubio, L., L. Galipienso, and I. Ferriol. 2020. 'Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution', *Front Plant Sci*, 11: 1092.
- Salina, D., P. Enarson, J. B. Rattner, and B. Burke. 2003. 'Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly', *J Cell Biol*, 162: 991-1001.
- Schmitz, A., A. Schwarz, M. Foss, L. Zhou, B. Rabe, J. Hoellenriegel, M. Stoeber, N. Pante, and M. Kann. 2010. 'Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket', *PLoS Pathog*, 6: e1000741.
- Schornack, S., M. van Damme, T. O. Bozkurt, L. M. Cano, M. Smoker, M. Thines, E. Gaulin, S. Kamoun, and E. Huitema. 2010. 'Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 17421-6.
- Sikorskaite, S., M. L. Rajamaki, D. Baniulis, V. Stanys, and J. P. Valkonen. 2013. 'Protocol: Optimised methodology for isolation of nuclei from leaves of species in the Solanaceae and Rosaceae families', *Plant Methods*, 9: 31.
- Simon-Mateo, C., and J. A. Garcia. 2011. 'Antiviral strategies in plants based on RNA silencing', *Biochim Biophys Acta*, 1809: 722-31.
- Solovyev, A. G., V. K. Novikov, A. Merits, E. I. Savenkov, D. A. Zelenina, L. G. Tyulkina, and SYu Morozov. 1994. 'Genome characterization and taxonomy of *Plantago asiatica* mosaic potexvirus', *J Gen Virol*, 75 (Pt 2): 259-67.
- Strambio-De-Castillia, C., M. Niepel, and M. P. Rout. 2010. 'The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 490-501.
- Surico, Giuseppe. 2013. 'The concepts of plant pathogenicity, virulence/avirulence and effector proteins by a teacher of plant pathology', *Phytopathologia Mediterranea*, 52: 399-417.
- Tamura, K., Y. Fukao, N. Hatsugai, F. Katagiri, and I. Hara-Nishimura. 2017. 'Nup82 functions redundantly with Nup136 in a salicylic acid-dependent defense response of *Arabidopsis thaliana*', *Nucleus*, 8: 301-11.
- Tamura, K., Y. Fukao, M. Iwamoto, T. Haraguchi, and I. Hara-Nishimura. 2010. 'Identification and characterization of nuclear pore complex components in *Arabidopsis thaliana*', *Plant Cell*, 22: 4084-97.

- Tamura, K., and I. Hara-Nishimura. 2013. 'The molecular architecture of the plant nuclear pore complex', *J Exp Bot*, 64: 823-32.
- Tang, Y., A. Huang, and Y. Gu. 2020. 'Global profiling of plant nuclear membrane proteome in Arabidopsis', *Nat Plants*, 6: 838-47.
- Terry, L. J., and S. R. Went. 2009. 'Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport', *Eukaryot Cell*, 8: 1814-27.
- Toyoda, K., N. C. Collins, A. Takahashi, and K. Shirasu. 2002. 'Resistance and susceptibility of plants to fungal pathogens', *Transgenic Res*, 11: 567-82.
- Trotman, L. C., N. Mosberger, M. Fornerod, R. P. Stidwill, and U. F. Greber. 2001. 'Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1', *Nat Cell Biol*, 3: 1092-100.
- United Nations. 2019. "World Population Prospects 2019: Highlights." In, edited by Department of Economic and Social Affairs: Population Division. New Yorks.
- Van Bavel, J. 2013. 'The world population explosion: causes, backgrounds and projections for the future', *Facts Views Vis Obgyn*, 5: 281-91.
- Van Norman, J. M., and P. N. Benfey. 2009. 'Arabidopsis thaliana as a model organism in systems biology', *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1: 372-79.
- Walde, S., and R. H. Kehlenbach. 2010. 'The Part and the Whole: functions of nucleoporins in nucleocytoplasmic transport', *Trends Cell Biol*, 20: 461-9.
- Wale, Stuart, Bud Platt, and Nigel D. Cattlin. 2008. *Diseases, Pests and Disorders of Potatoes: A Colour handbook* (Manson Publishing Ltd: London, UK).
- Wang, W., and Z. Y. Wang. 2014. 'At the intersection of plant growth and immunity', *Cell Host Microbe*, 15: 400-2.
- Wente, S. R., and M. P. Rout. 2010. 'The nuclear pore complex and nuclear transport', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2.
- Wiermer, M., Y. T. Cheng, J. Imkampe, M. Li, D. Wang, V. Lipka, and X. Li. 2012. 'Putative members of the Arabidopsis Nup107-160 nuclear pore sub-complex contribute to pathogen defense', *Plant J*, 70: 796-808.
- Wixon, J. 2001. 'Featured organism: Arabidopsis thaliana', *Comp Funct Genomics*, 2: 91-8.

- Woodward, C. L., S. Prakobwanakit, S. Mosessian, and S. A. Chow. 2009. 'Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1', *J Virol*, 83: 6522-33.
- Wu, G. Z., E. H. Meyer, A. S. Richter, M. Schuster, Q. Ling, M. A. Schottler, D. Walther, R. Zoschke, B. Grimm, R. P. Jarvis, and R. Bock. 2019. 'Control of retrograde signalling by protein import and cytosolic folding stress', *Nat Plants*, 5: 525-38.
- Xu, F., and C. Copeland. 2012. '*Nuclear extraction from Arabidopsis thaliana*', *Bio-protocol*, 2.
- Yamaji, Y., K. Maejima, J. Ozeki, K. Komatsu, T. Shiraishi, Y. Okano, M. Himeno, K. Sugawara, Y. Neriya, N. Minato, C. Miura, M. Hashimoto, and S. Namba. 2012. 'Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level', *Plant Cell*, 24: 778-93.
- Yuan, M., B. P. M. Ngou, P. Ding, and X. F. Xin. 2021. 'PTI-ETI crosstalk: an integrative view of plant immunity', *Curr Opin Plant Biol*, 62: 102030.
- Zhang, Y., and X. Li. 2005. 'A putative nucleoporin 96 Is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by suppressor of npr1-1, constitutive 1', *Plant Cell*, 17: 1306-16.
- Zhou, L., and N. Pante. 2010. 'The nucleoporin Nup153 maintains nuclear envelope architecture and is required for cell migration in tumor cells', *FEBS Lett*, 584: 3013-20.
- Zhu, Y., B. Wang, K. Tang, C. C. Hsu, S. Xie, H. Du, Y. Yang, W. A. Tao, and J. K. Zhu. 2017. 'An Arabidopsis Nucleoporin NUP85 modulates plant responses to ABA and salt stress', *PLoS Genet*, 13: e1007124.