



HAL
open science

Etude du rôle de la protéine CDC48 dans l'immunité des plantes

Hervé Begue

► **To cite this version:**

Hervé Begue. Etude du rôle de la protéine CDC48 dans l'immunité des plantes. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK037 . tel-01943746

HAL Id: tel-01943746

<https://theses.hal.science/tel-01943746v1>

Submitted on 4 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée à l'UMR 1347 Agroécologie CNRS, INRA, AgroSup, UB, UBFC Dijon

Ecole doctorale n°554

Environnements Santé

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Hervé BEGUE

Etude du rôle de la protéine CDC48 dans l'immunité des plantes

Composition du Jury :

D. DELMAS, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

C. MAZARS, Directeur de Recherche CNRS, Toulouse

F. BOUTEAU, Maître de Conférences, Université Paris Diderot, Paris

E. BAUDOIN, Maître de Conférences, Université Pierre et Marie Curie, Paris

C. ROSNOBLET, Maître de Conférences, Université de Bourgogne, Dijon

D. WENDEHENNE, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon,

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-encadrante

Directeur de Thèse



« *Florebo quocumque ferar* »

« *Nanos gigantum humeris insidentes* »

_Google scholar.... Ou presque

_Bernard de Chartres

«[...] *Les jaloux ne se gèrent pas.*

Les P'tits, tu les ignores ;

Les pires, tu les combats ! »

_Disiz la Peste

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du Jury, Mr Mazars, Mr Bouteau, Mr Baudouin et Mr Delmas d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à vous d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

Je remercie également très sincèrement mes encadrants David et Claire. Je vous remercie d'avoir eu confiance en moi pour ce projet. Vous avez été à mon écoute et vous m'avez accompagné tout au long de cette thèse. David, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Au-delà du point de vue scientifique, certaines discussions que nous avons eues dans ton bureau ou durant les trajets pour Besançon ne sont pas tombées dans l'oreille d'un sourd. Je m'efforcerai d'appliquer tes conseils tout au long de ma carrière, qu'elle soit scientifique ou non. Claire, je te remercie pour ton investissement dans ce projet. Ton enthousiasme est sans égal! Ta philosophie de prendre aussi positivement les petites victoires est vraiment marrante. Tes « c'est chouette non ??? » vont grandement me manquer !

Un grand merci aux collègues de l'équipe NO : Agnès, pour ta douceur, ta disponibilité et tes petits cœurs sur mes fioles de cellules. Carine, pour ton sourire et tes anecdotes vraiment marrantes. Cécile, pour ton aide en début de thèse. Valérie et Angélique, pour les séances de sport à déplacer les centri. Sylvain et Hoai-Nam pour votre disponibilité et vos conseils avisés. Olivier, pour les discussions scientifiques et tes blagues presque pas drôles. Siham pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Stéphane ! Si tu n'existais pas il aurait fallu t'inventer ! Ton « sourire » et ta « bonne humeur » sont inimitables (j'entends d'ici le : « salaud »). Et enfin, à Sébastien, pour ta culture, tes jeux de mots et tes chansons dans le labo !! Alors ça, ça va me manquer !!

Je remercie Dimacell, tout particulièrement Christine et Pascale pour votre aide. Travailler avec vous est un réel plaisir.

Je remercie aussi tous les anciens du labo. Vincent, le petit poucet qui voulait à chaque fois me soulever... bizarre, oui, je sais ! Damien, ta manie de vouloir mesurer les ROS dans tout ce qui bouge vont me marquer à vie, merci de m'avoir accueilli lors de ma première visite du labo. Daphnée, je pense qu'aujourd'hui les stats tu t'en fous un peu, mais je tenais à te remercier pour certaines discussions qui ont su me remonter le moral. Lenny, pour ton accent chantant et ta vision imagée de la thèse. Yuko (!!!!!) et ton balcon postprandial !!!!! Lucie Meyer, la meilleure qui n'est pas de cette équipe mais qui connaît bien la machine à café ! Merci pour ces pauses Nespresso.

Un petit paragraphe pour toi Elise ! J'émets une nuance à ce que j'ai dit plus haut... TU es la personne la plus énergique et enthousiaste que je connaisse !!! Je le répète, c'est quand même bête qu'on ait commencé à discuter ensemble qu'à la fin de ta thèse. Merci pour ces longues séances de sport tard à la Human Fit ! Le Battle Rope n'est plus pareil depuis ton départ ! Tu es quelqu'un de formidable !

Petite pensée à tous ces stagiaires que je n'ai pas eu mais que j'ai quand même Babysitté !!!

Halima, Miriam, Antoine, Florian, Aline, Zoeyyyyyyy, Sylvie (Elle, c'est spécial, c'est elle qui me Babysitte), Raphael ! Vous êtes les meilleurs SDM (Stagiaires du Mercredi) que je connaisse. En parlant de Stagiaire vraiment SDM : Pauline ! Merci pour avoir déblatéré des heures sur Zamioudis, ça m'a bien servi !! Que R soit avec toi !!! Je te passe le flambeau ! Et enfin, la vraie Meilleure, avant qu'elle n'aille du côté obscur, Lucie. J'ai énormément Babysitté avec toi, mais ce n'était pas si désagréable que ça. Toi et tes amygdales vont me manquer !

Je remercie aussi toutes ces personnes que j'ai croisées ces 3 ans, et qui disent simplement bonjour et avec qui je discute. Vous avez rendu mes journées agréables et permis de d'oublier de la thèse l'espace de quelques instants. Je pense tout particulièrement à toi Valérie M, avec nos énormes bonjours !! A toi aussi Isilda, tu vends du rêve avec Madère ! Michel, Thibaut et presque toute l'équipe de la Cantine ! Merci pour votre bonne humeur !! Michel, merci pour tes petits plats !!

Je tenais aussi à remercier, car je trouve qu'on ne le fait pas assez souvent, ceux qui vous mettent des bâtons dans les roues. Ce qui ne tue pas, vous rend plus fort à ce qu'il paraît... Donc merci à vous !

Passons aux copains maintenant. Nelson, Tu vas loin, trop loin..... Florian, dommage que tu ne sois arrivé que maintenant ! On aurait refait le monde toi et moi sur le balcon !! Entre vous deux, il y en a un que je préfère, mais je ne dirais pas qui, vous n'avez qu'à trouver ! Et Bien sûr, pas les mamans !

Jérémie ! Je peux enfin écrire un petit truc pour toi. Pour le M2, je n'ai pas eu la place, tu sais, en M2 SCM on bosse vraiment comparé aux B2i (Ca vaut aussi pour toi ça Nelson). Je peux enfin te remercier de nos discussions. Que ça soit philosophique, scientifique ou Zouzéfic ! Tu m'as recadré dans certaines situations et je t'en remercie ! Tu es quand même le seul mec qui peut placer « mainstream » et « Tocard » dans la même phrase !!! C'est fortiche !

Arnaud !!!!! Mon cher Arnaud. Merci de m'avoir transmis la passion Python !! Tu es un sacré professeur. Tu as été à mon écoute à des moments critiques et tes conseils sont d'or pour moi. Merci d'avoir été là.

Passons au plus important, la famille. La mienne est plutôt courte mais elle est inversement proportionnelle à l'importance...

Sébastien, tu es mon petit frère mais à bien des égards tu es plus grand que moi. Je te le redis, tu es un exemple à mes yeux....

Valérie, je suis le petit frère, mais je suis plus grand que toi !!!!! Par la taille! Merci d'avoir été là dès mon plus jeune âge. On se voit moins depuis que je suis en métropole, mais Tom, Zoé et Toi, sont mes leitmotifs. C'est à vous que je pense quand j'ai un coup de mou. La photo de Tom sur mon bureau aide aussi.

Maman, tu es celle qui m'a transmise cette rage d'avancer malgré l'adversité. Je t'aime

Et moucha !! Pour ceux qui ne connaissent pas moucha, ben c'est mon chat ! Elle est méchante, elle n'est pas belle, des fois elle ne sent pas bon, elle mord ! Mais elle réchauffe quand il fait froid !!!

Et enfin, je tiens à remercier avant toute chose celle qui m'a offert Moucha. Merci de partager ma vie ici à Dijon depuis 7 ans. Merci de m'écouter de radoter et me plaindre des pubs à la télé. Merci de me laisser me moquer de Cara. Merci de me faire m'évader de la thèse tous les soirs en rentrant à la maison.

Mon Esther, je t'aime

Table des matières

Introduction	1
1. Interaction plantes-microorganismes pathogènes	1
1.1. Reconnaissance de l'agent pathogène	2
1.2. Transduction du signal	5
1.3. Les réponses de défense	10
2. Le modèle cryptogéine/tabac	14
2.1. Reconnaissance de la cryptogéine.....	15
2.2. Signalisation précoce induite par la cryptogéine	16
2.3. Les déterminants moléculaires de la mise en place de la HR	19
3. Structure et fonction de la protéine apparentées aux chaperonnes CDC48 chez les plantes	
21	
3.1. Homéostasie des protéines et immunité des plantes	21
3.2. Article scientifique n°1: Structure et fonctions de la protéine apparentée aux chaperonnes p97/CDC48 chez les plantes	22
4. Objectifs de la thèse	23
Matériel et Méthodes	24
1. Cultures cellulaires	24
2. Cryptogéine	24
3. Analyse de l'abondance protéique	25
3.1. Extraction des protéines solubles.....	25
3.2. Séparation des protéines par SDS-PAGE	25
3.3. Séparation des protéines en condition non dénaturantes: Native-PAGE.....	26
3.4. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.....	26
3.5. Immuno-détection des protéines	27
4. Analyse de l'accumulation de transcrits.....	28

4.1.	Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADN complémentaires (ADNc)	28
4.2.	Analyse de l'accumulation de transcrits par PCR quantitative en temps réel	28
5.	Clonage des gènes et constructions	29
6.	Confirmation d'interaction entre CDC48 et ses partenaires	31
6.1.	Approche biochimique	31
6.2.	Approche cellulaire	32
7.	Mesure d'événements de signalisation cellulaire	36
7.1.	Quantification des formes actives de l'oxygène (FAO): peroxyde d'hydrogène extracellulaire (H ₂ O ₂).....	36
7.2.	Quantification des formes actives de l'azote	37
7.3.	Mesure de la mort cellulaire.....	38
7.4.	Mesure d'activités enzymatiques	38
7.5.	Mesure de molécules à pouvoir anti-oxydants.....	43
7.6.	Détermination de la peroxydation des lipides: dosage de Malondialdéhyde (MDA)	45
8.	Analyse bio-informatique de l'interactome de CDC48.....	46
8.1.	Etablissement de la liste d'interactants de CDC48	46
8.1.1.	Liste d'interactants de CDC48 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
8.1.2.	Validation de la méthode par comparaison de listes	47
8.1.3.	Listes d'interactants de CDC48 chez l'homme et la levure	48
8.2.	Représentation graphique de l'interactome de CDC48 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
8.2.1.	Récupération des données d'interactions des partenaires de CDC48 chez <i>A. thaliana</i>	49
8.2.2.	Analyse des communautés d'interactions	49
8.2.3.	Représentation graphique	50
8.3.	Analyse bio-informatique des partenaires de CDC48.....	50

Chapitre 1	52
Caractérisation fonctionnelle de la protéine CDC48 dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine chez le tabac.	52
1. Contexte scientifique et principaux résultats	52
1.1. Contexte et objectifs de l'étude.....	52
1.2. Résultats principaux.....	53
1.3. Ma contribution.....	54
2. Article scientifique n° 2:	54
Chapitre 2	55
Régulation de l'ascorbate peroxydase cytosolique par la protéine CDC48 dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine	55
1. Contexte de l'article et principaux résultats	55
1.1. Contexte et objectifs de l'étude.....	55
1.2. Résultats principaux.....	57
2. Article scientifique n°3.....	58
3. Résultats complémentaires	59
3.1. Confirmation de l'interaction <i>in planta</i> par la méthode du BiFC	59
3.2. Analyse du profil électrophorétique de cAPX	60
3.3. Etude de la dimérisation de cAPX et activité ascorbate peroxydase <i>in gel</i>	61
3.4. Etude préliminaire de la peroxydation des lipides	63
4. Discussion	64
4.1. Discussion relatives aux résultats complémentaires.....	64
Chapitre 3	68
Décryptage du rôle de CDC48 par l'analyse bio-informatique de son interactome	68
1. Contexte de l'article et principaux résultats	68
1.1. Contexte et objectifs de l'étude.....	68
1.2. Résultats principaux	69

2. Article scientifique n°3.....	70
3. Discussion	71
Conclusion & Discussion	76
Références bibliographie	84

Liste des abréviations

AAA+ : *ATPase associated with various activities*

ABA : Acide abscissique

ACC : *1-aminocyclopropane-1-carboxylase*

AO : *Ascorbate oxidase*

AOC : *Allene oxide cyclase*

ARF : *ADP rybosylation factor*

Avr : *Produit des gènes d'avirulence*

AzA : Acide azalaïque

BAK1 : *BR11-associated receptor kinase 1*

BBH : *Best bidirectional hits*

BiFC: *Bimolecular fluorescence complementation*

BLAST : *Basic local alignment search tool*

BR : Brassinostéroïde

BRI : *Brassinosteroid insensitive 1*

BY-2 : *Bright yellow-2*

cAPX : *Cytosolic ascorbate peroxidase*

CDC48 : *Cell division cycle 48*

CDPK : *Calcium-dependant protein kinase*

CERK1 : *Chitin-elicitor receptor kinase 1*

CFP : *Cyan fluorescent protein*

CK : *Cytokinine*

CMV : *Cucumber mosaic virus*

DAF-2DA : *Diacétate de 4-5 - diaminofluoresceine*

DAMP : *Damage-associated molecular pattern*

DEA/NO : *Diméthylamine NONOate*

DHA : *Déhydroascorbate*

DHAR : *DHA réductase*

din : *Defense induced*

DTNB : *1-chloro-2,4-dinitrobenzene*

DTNB : *Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)*

EBP1 : *ErbB3-binding protein 1*

EF-Tu : *Elongation factor-thermo unstable*

EGF-like : *Epidermal growth factor-like*

ELR : *Elicitin-like receptor*

ERAD : *Endoplasmic reticulum-associated protein*

ET : *Ethylène*

ETI : *Effector-triggered immunity*

ETS : *Effector-triggered sensitivity*

FAO : *Forme active de l'oxygène*

FDR : *False discovery rate*

flg22 : *Partie N-terminale de la flagelline*

FLIM : *Fluorescence life time imaging*

FLS2 : *Flagelling sensing 2*

FRET : *Fluorescence/Förster resonance energy transfer*

FRO2 : *Ferric reduction oxidase 2*

G3P : *Glycéraldéhyde-3-phosphate*

GA : *Gibberellines*

GFP : *Green fluorecent protein*

GML : *Graph modelling language*

GO : *Gene ontology*

GR : *Glutathion réductase*

GSH : *Glutathion*

GSNO : *S-nitrosoglutathion*

GSSG : *Glutathion disulfide*

GST : Glutathion S-transférase
HDAC2 : Histone désacétylase de type 2
HR : Réponse hypersensible
IdPr : Iodure de propidium
IP : Immuno-précipitation
IRT1 : *Iron-regulated transporter 1*
ISR : *Induced systemic resistance*
JA : Acide jasmonique
LOX : Lipoxygénase
LPS : *Lipopolysaccharide*
LysM : Motif de lysine
MAD : *Mitochondrion-associated degradation*
MAPK : *Mitogen-associated protein kinase*
MDA : Malondialdéhyde
MeSA : Méthyl jasmonate
MetS : *Methionine synthase*
MS : Spectrométrie de masse
MT : *Methionine transferase*
NAS : *Nicotianamine synthase*
NBS : *Nucleotide-binding site*
NBT : Bleu de nitrotétrazolium
NEM : *N-ethylmaleimide*
NO : *Nitric oxide*
NPR1 : *Non-expressor of pathogenesis-related gene 1*
OG : *Oligogalacturonate*
P2K1 : *P2 receptor kinase 1*
PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*
PCV : *Packed cell volumes*
PR : *Pathogenesis-related*
PRR : *Pattern recognition receptor*
PTI : *PAMP-triggered immunity*
PUB26 : *Plant U-box protein 26*
PUFA : *Polyunsaturated fatty acid*
PVX : *Patato virus X*
R : *Produit des gènes de résistance*
RBOHD : *Respiratory burst oxidative homolog protein D*
RES : *Reactive electrophile species*
RLK : *Receptor-like kinase*
RLP : *Receptor-like protein*
RNS : *Reactive nitrogen species*
SA : *Acide salicylique*
SABP3 : *SA-binding protein 3*
SAH : *S-adenosylhomocysteine*
SAHH : *S-adenosylhomocysteine hydrolase*
SAM : *S-adenosyl-methionine*
sAPX : *Stromal ascorbate peroxidase*
SAR : *Systemic -acquired response*
SCC : *Split C-terminus CFP*
SERK3 : *Somatic embryogenesis receptor-like kinase 3*
SNC : *Split N-terminus CFP*
SNO : *S-nitrosothiol*
SOD : *Super oxide dismutase*
TAP : *Tandem affinity purification*
tAPX : *Thylakoïd-bound ascorbate peroxidase*
TBA : *Acide 2-thiobarbiturique*
TCA : *Acide trichloroacétique*
TGA1 : *TGACG motif binding factor*
TMV : *Tobacco mosaic virus*
TNB : *Acide 5-thio-2-nitrobenzoïque*

Trx-NTR : *Thioredoxine-NADPH-thioredoxine reductase*

Ub : Ubiquitine

UPS : *Ubiquitin/proteasome system*

URF : Unité relative de fluorescence

UV : Ultra violet

VCP : *Valosin-containing protein*

VPD : *2-vinylpyridine*

WAK1 : *Wall-associated kinase*

YFP : *Yellow fluorescent protein*

INTRODUCTION

1. Interaction plantes-microorganismes pathogènes

Dans leur environnement, les plantes sont confrontées à des agressions par des insectes, des nématodes, des virus et des microorganismes pathogènes incluant des bactéries, des champignons et des oomycètes. Suivant les études, on estime qu'à l'échelle mondiale les pertes avant et après récolte dues à ces maladies avoisinent 30%. Comprendre les mécanismes sous-jacents au pouvoir infectieux de ces agresseurs ainsi que la résistance des plantes à ceux-ci agresseurs constituent donc un enjeu majeur en agriculture.

Des travaux conduits depuis plus d'une trentaine d'années ont permis d'établir les bases génétiques et moléculaires de la résistance des plantes aux microorganismes pathogènes et de proposer le concept d'immunité des plantes. En effet, bien que ne possédant effectivement pas de cellules spécialisées dans la reconnaissance et l'élimination des agresseurs, les plantes sont capables de s'opposer efficacement aux infections. Plus précisément, les plantes possèdent des défenses constitutives et des défenses inductibles. Les défenses constitutives représentent le premier obstacle à l'infection. Celles-ci se composent de barrières physiques comme la cuticule et la paroi cellulaire. De plus les plantes peuvent sécréter constitutivement des molécules chimiques à activité antimicrobienne telles que les phytoanticipines qui agissent contre divers agresseurs dont des bactéries, des champignons, des nématodes et des insectes (VanEtten et al., 1994). Ces défenses constitutives sont très efficaces. Toutefois, des agents pathogènes peuvent contourner ces défenses en pénétrant dans les tissus de la plante par des pores naturels (stomates, blessures) et/ou en hydrolysant les barrières physiques et/ou en neutralisant les molécules à activité antimicrobienne. En retour, les cellules végétales ont développé un système de surveillance leur permettant de détecter l'intrusion des agents infectieux. Cette reconnaissance est une étape essentielle de la réponse immunitaire.

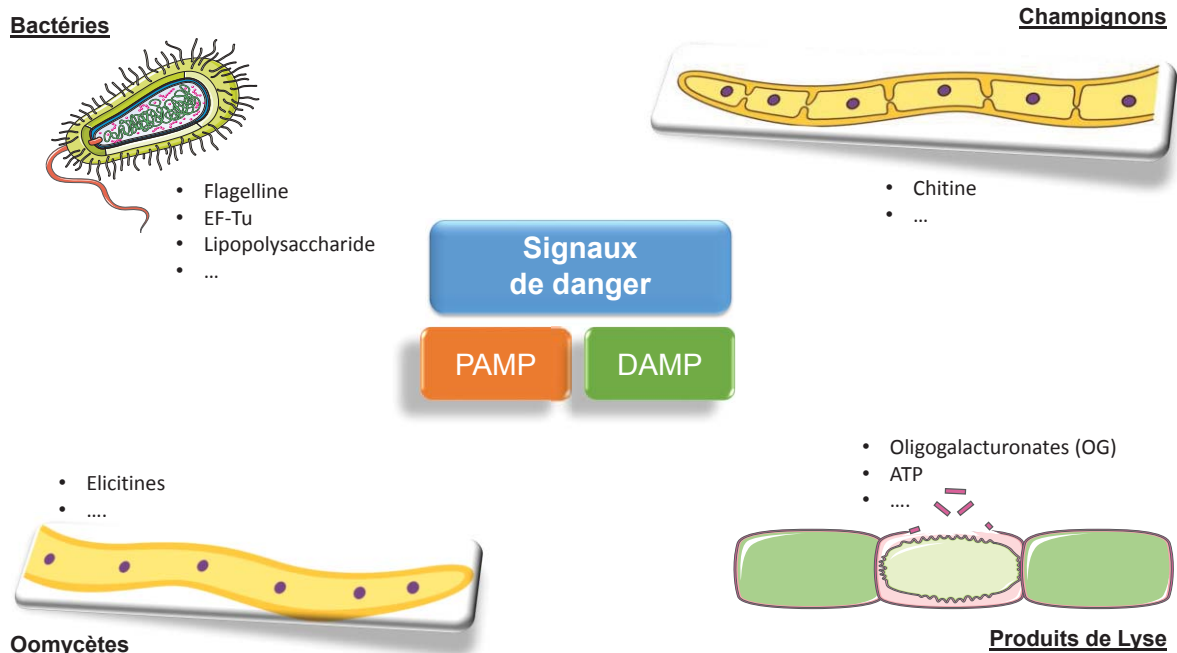


Figure Int.1 Différents signaux de danger reconnus par la plante. La plante est capable de reconnaître des PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) provenant de bactéries, de champignons ou d’oomycètes mais également des DAMP (*damage-associated molecular pattern*) issus de la plante lors de la dégradation des cellules végétales par un agent pathogène. La flagelline, le facteur d’élongation EF-Tu, ou encore certaines élicitines produites par des oomycètes sont des PAMP de nature peptidiques. Les lipopolysaccharides (LPS) sont des PAMP d’origine lipidique, alors que la chitine est un PAMP saccharidique. Tout comme les PAMP, les DAMP sont de compositions variées. Ainsi, les oligogalacturonates sont des DAMP d’origine saccharidique alors que l’ATP est une molécule nucléotidique.

1.1. Reconnaissance de l'agent pathogène

1.1.1. Les signaux de danger

Les plantes ont acquis la capacité de percevoir la présence de l'agent pathogène *via* la reconnaissance de molécules issues de ces derniers appelés PAMP (*pathogen-associated molecular patterns*). De plus, elles reconnaissent des molécules endogènes produites suite à l'action d'enzymes hydrolytiques des agresseurs et appelées DAMP (*damage-associated molecular patterns*). Les PAMP et les DAMP sont communément appelés éliciteurs de réactions de défense ou stimulateurs des défenses naturelles (SDN) car ils peuvent stimuler la réponse immunitaire chez les plantes (Hahn, 1996). Les éliciteurs sont de nature chimique variée et incluent en particulier des (glyco)protéines, des peptides, des oligosaccharides et des lipides (**Fig. Int.1**) (Boller and Felix, 2009; Nurnberger et al., 2004). Le terme éliciteur est toutefois très général car il désigne toute molécule/traitement abiotiques (tels que les UV) susceptibles de déclencher une réponse de défense de la plante. Les réponses de défense déclenchées plus spécifiquement par la reconnaissance des PAMP et des DAMP sont appelées PTI (PAMP-triggered immunity ; **Fig. Int.2A**).

Les PAMP sont des molécules d'origine microbienne, peu ou pas conservés chez les eucaryotes et qui exercent des fonctions essentielles dans la vie du microorganisme (Nurnberger et al., 2004; Thomma et al., 2011). Parmi les PAMP, les molécules les plus étudiées sont la chitine, un polymère de N-acétylglucosamine qui compose la paroi fongique (Felix et al., 1993), la flagelline du flagelle, l'organe locomoteur des bactéries (Boller and Felix, 2009; Felix et al., 1999) ou encore la protéine EF-Tu (*elongation factor-thermo unstable*), une des protéines les plus abondantes et les plus conservées chez les bactéries et ayant un rôle essentiel dans la traduction des protéines (Kunze et al., 2004). D'autres PAMP étudiés sont les élicitines (Derevnina et al., 2016), des protéines globulaires d'environ 10 kDa sécrétées par une trentaine d'espèces d'oomycètes de la famille des *Phytophthora* et quelques espèces de la famille des

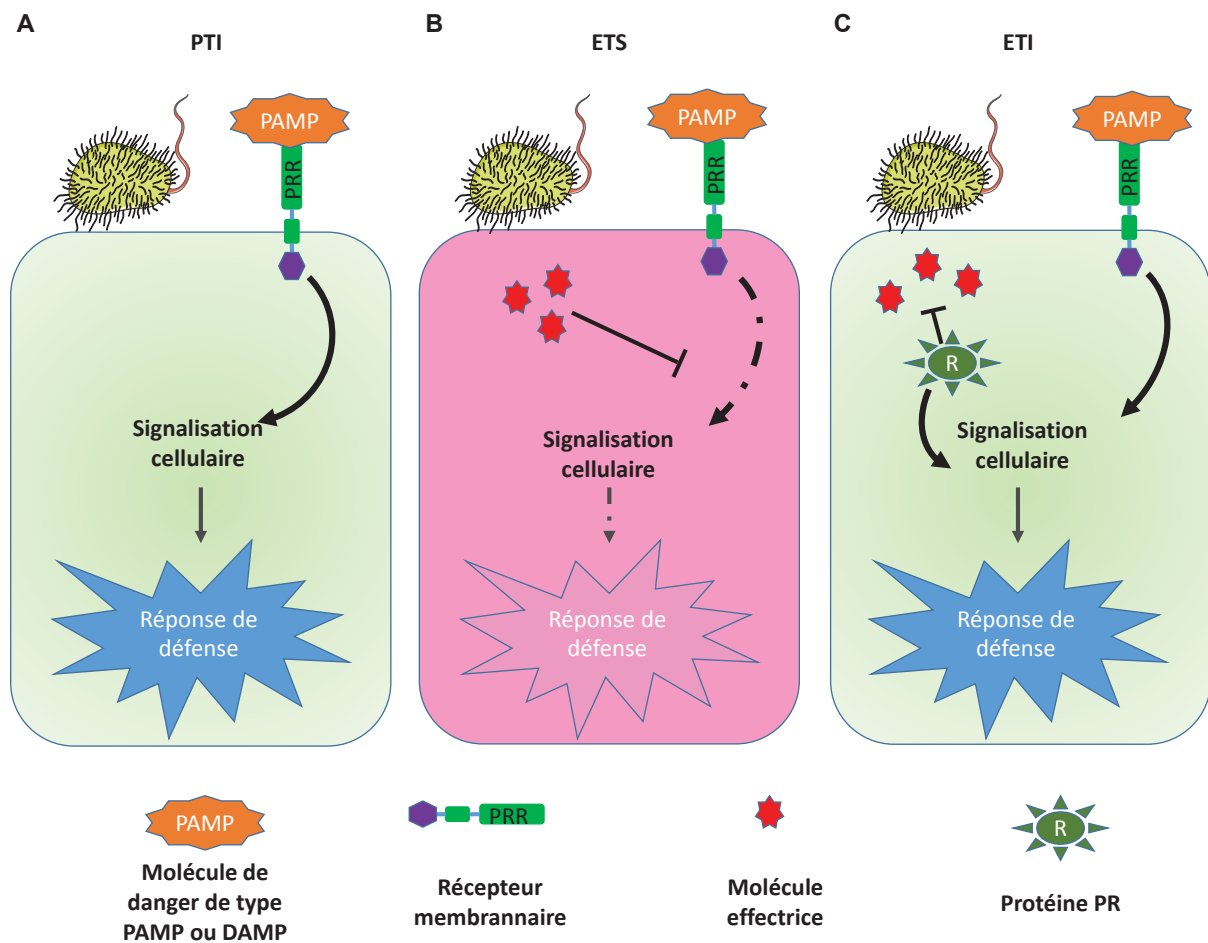


Figure Int.2 Réponse immunitaire des plantes **A**, une attaque par un agent pathogène est détectée par la plante *via* la reconnaissance de PAMP ou DAMP au niveau de la membrane plasmique par des PRR. Une cascade de signalisation intracellulaire est ensuite mise en place et débouche sur la réponse immunitaire appelée PTI (*PAMP-triggered immunity*). **B**, l'agent pathogène peut contourner/neutraliser la PTI en injectant dans le cytosol des cellules végétales des molécules effectrices, notamment par le biais de système de sécrétion de type III. Dans la plupart des cas, ces effecteurs inhibent la mise en place de la cascade de signalisation activée par les PAMP ou DAMP et, en conséquence, bloquent/réduisent l'efficacité de la PTI. La plante devient sensible à l'agent pathogène; ce processus est appelé ETS (*effector-triggered sensitivity*). **C**, la plante peut à son tour bloquer l'ETS en produisant des protéines R qui vont reconnaître directement ou indirectement les effecteurs, réinstaurer une cascade de transduction du signal et déclencher ainsi l'ETI (*effector-triggered immunity*). Contrairement à la PTI, l'ETI est spécifique d'un couple plante/pathogène donné.

Pythium (Panabières et al., 1997). Ces oomycètes étant dans l'incapacité de synthétiser leurs propres stérols (Stong et al., 2013), les élicitines sécrétées ont pour fonction de récupérer les stérols de la membrane des cellules végétales. Citons également les lipopolysaccharides (LPS), composants majeurs de la membrane externe des bactéries gram-négatives. Ces composés sont formés d'une partie polysaccharidique appelée antigène-O, qui est très variable entre les espèces, ainsi que du lipide-A, qui est quant à lui hyper conservé. Le lipide-A a été montré comme capable de déclencher la réponse immunitaire chez *A. thaliana* (Zeidler et al., 2004). Comme précisé ci-dessus, les DAMP sont des molécules provenant de la plante hôte, libérées suite aux dommages causés par la dégradation de la paroi végétale par les microorganismes lors de l'infection. Les DAMP les mieux caractérisés sont les oligogalacturonates (OG), des oligomères de résidus d'acide galacturonique reliés entre eux par des liaisons α -(1→4) et issus de la dégradation de la pectine, un élément structurale de la paroi (Nothnagel et al., 1983; Reymond et al., 1995). L'ATP est également considérée comme un DAMP. Il est effectivement reconnu comme signal de danger par les cellules végétales suite à sa libération dans le milieu extracellulaire lors de dommages cellulaires induits par une attaque pathogène (Tanaka et al., 2014).

La dernière catégorie de molécule signalant un danger regroupe les molécules effectrices ou effecteurs (ou facteur de virulence). Certains agents pathogènes produisent en effet des effecteurs codés par des gènes de virulence capables de contourner la PTI. Chez la plante ce processus déclenche l'ETS (*Effector-triggered sensitivity*; **Fig. Int.2B**). Selon le concept « gène pour gène » (Flor, 1971), en retour la plante produit des protéines de résistance, codées par des gènes de résistances (*R*), reconnaissant l'effecteur. Cette reconnaissance déclenche une réponse immunitaire spécifique du couple plante/microorganisme concerné et appelée ETI (*effector-triggered immunity* ; **Fig. Int.2C**).

1.1.2. Perception des signaux de dangers impliqués dans la PTI

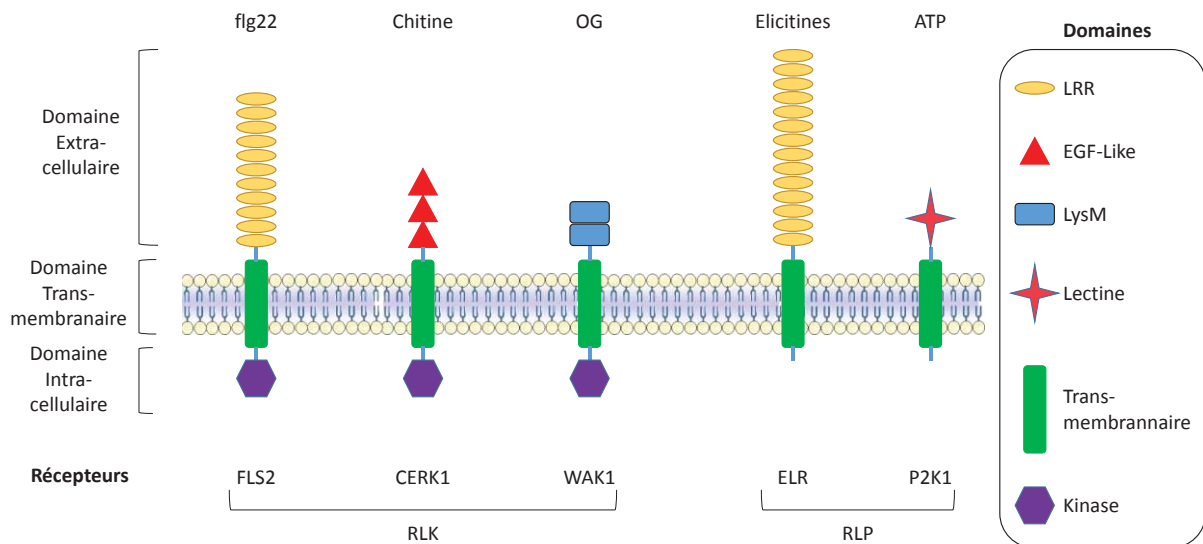


Figure Int.3 Représentation schématique de quelques PRR (*pattern recognition receptors*) et des ligands correspondants. Les PRR possèdent un domaine extracellulaire d'interaction avec le ligand et un domaine transmembranaire. Les PRR sont subdivisés en deux groupes: les RLK (*receptor-like kinases*), qui possèdent domaine intracellulaire à activité kinase et les RLP (*receptor-like proteins*), qui n'en possèdent pas.

Les LRR (*leucin-rich repeat*) reconnaissent les motifs peptidiques, les domaines EGF-like les motifs de lysine (LysM) et les lectines reconnaissent les motifs saccharidiques. Parmi les RLK citons FLS2 (*flagellin sensing 2*) qui possède 28 LRR et reconnaît le peptide flg22 (22 résidus d'acides aminés de la partie N-terminale de la flagelline) ; CERK1 (*chitin-elicitor receptor kinase 1*) qui possède 3 domaines EGF-like et reconnaît la chitine ; WAK1 (*wall-associated kinase*) qui possède 2 domaines LysM et reconnaît les oligogalacturonides (OG). Deux RLP sont présentées : ELR (*elicitin receptor*), qui possède 36 LRR et reconnaît les élicitines ; P2K1 (*P2 receptor kinase 1*) qui possède un motif de lectine et reconnaît l'ATP extracellulaire. Adapté de Wu et Zhou (2013).

La reconnaissance des PAMP et des DAMP se fait *via* des récepteurs appelés PRR (*pattern recognition receptor*), situés au niveau de la membrane plasmique des cellules. Il existe deux types de PRR: les RLK (*receptor-like kinase*) et les RLP (*receptor-like proteins*) (**Fig. Int.3**). Les RLK et RLP possèdent tous les deux un domaine extracellulaire impliqué dans la liaison au ligand, mais différent dans leur domaine intracellulaire. En effet, contrairement au RLP, le domaine intracellulaire des RLK présente une activité protéine kinase (Macho and Zipfel, 2014).

Concernant plus précisément les domaines extracellulaires, ils peuvent présenter des motifs répétés riches en leucine (LRR), des motifs de lysine (LysM) ou des domaines EGF (*epidermal growth factor*)-like. Alors que les PRR à domaine extracellulaire de type LRR reconnaissent les ligands peptidiques (Kobe and Kajava, 2001), les deux autres types de PRR (LysM et EGF-like) reconnaissent uniquement des ligands d'origine glucidiques. À ce jour, moins de 20 couples ligand-PRR ont été identifiés (Wu and Zhou, 2013).

Malgré ces différences structurales entre PRR, l'activation de la réponse immunitaire induite par la reconnaissance du ligand nécessite généralement une interaction membranaire avec des co-récepteurs, eux-mêmes n'étant pas spécifiques d'un PRR. Par exemple, le co-récepteur BAK1 (*brassinosteroid insensitive 1(BRI1)-associated receptor kinase 1*), aussi appelé SERK3 (*somatic embryogenesis receptor-like kinase 3*), est nécessaire à la transduction du signal suite à la reconnaissance de la flagelline par le récepteur FLS2 (*flagelling sensing 2*; Lu et al., 2010), mais est également requis pour la transduction du signal déclenchée par des élicitines sur le récepteur de type ELR (*elicitin like receptor*; Du et al., 2015).

1.1.3. Perception des signaux impliqués dans l'ETI

Les molécules effectrices participent à la virulence d'un agent pathogène en agissant sur des protéines cibles de l'hôte, notamment en interférant avec des protéines clés de la PTI (Cui et al., 2015; Jones and Dangl, 2006). Par exemple chez *Solanum tuberosum*, l'effecteur Pi02860

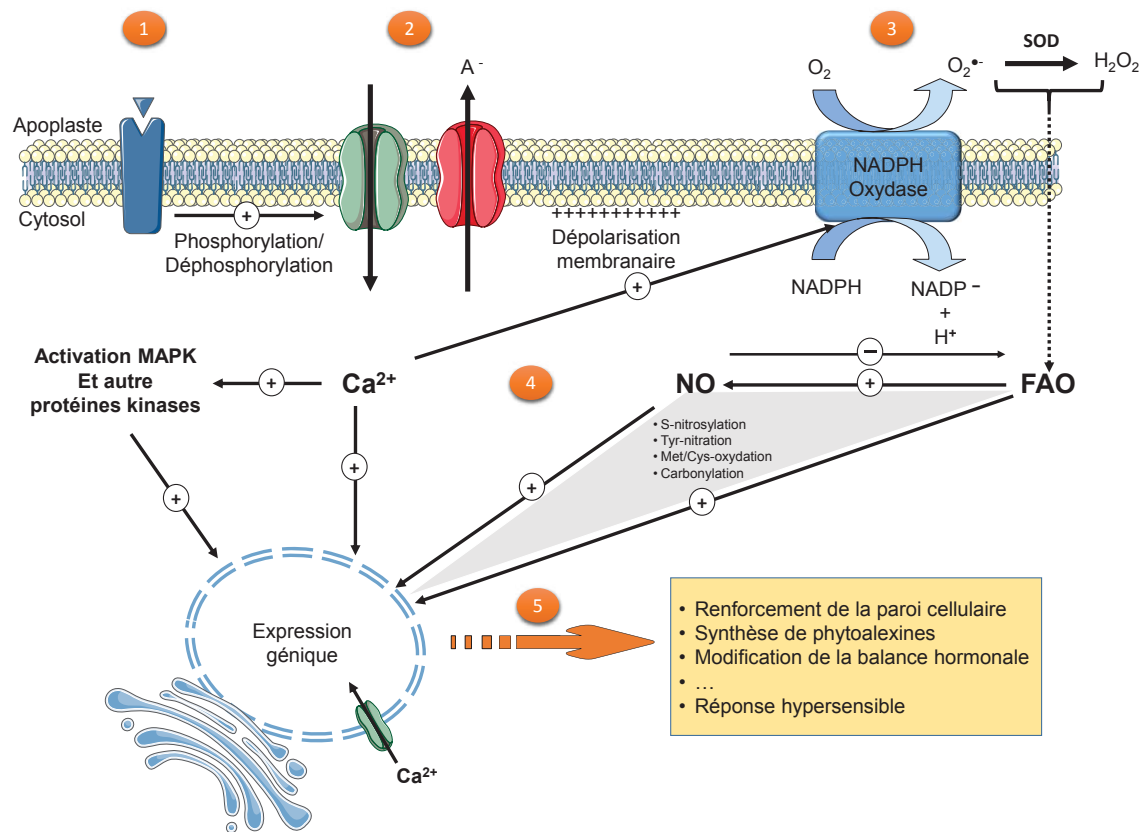


Figure Int.4 Représentation simplifiée de la cascade de signalisation aboutissant à la mise en place de la réponse immunitaire. Suite à la reconnaissance d'un signal de danger (1), des événements de phosphorylation et de déphosphorylation autorisent un influx calcique et des efflux d'anions (A^-) à l'origine d'une dépolarisation de la membrane plasmique (2). Une augmentation de la concentration de calcium libre est observée dans le cytosol mais également dans d'autres compartiments cellulaire, notamment le noyau. Le calcium cytosolique, associé à des événements de phosphorylation, contribue à l'activation d'une NADPH-oxydase membranaire qui catalyse la production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) à partir de dioxygène (3). Le $O_2^{\bullet-}$ est dismuté spontanément ou enzymatiquement *via* une superoxyde dismutase (SOD) en H_2O_2 . Ce dernier traverse la membrane cellulaire et est nécessaire à la production de monoxyde d'azote (NO). En retour ce dernier contrôle de taux de H_2O_2 d'un part en inhibant la NADPH oxydase par S-nitrosylation, d'autre part en interagissant avec le $O_2^{\bullet-}$ au niveau de l'apoplaste afin de former du peroxyde nitrite (non montré). La cascade de signalisation cellulaire se poursuit par l'action de protéines kinases comme les MAPK, le calcium, le NO et les FAO (4). L'ensemble de ces événements aboutissent à une reprogrammation génique menant aux réponses de défenses de la plante (5). Ces réponses peuvent correspondre au renforcement des parois, à la synthèse de composés à activités antimicrobiennes incluant des protéines PR et des phytoalexines, à une modification de la balance hormonale et dans certains cas, à la réponse hypersensible, une mort cellulaire programmée, localisée au site d'infection. Dans cette cascade de signalisation, le NO et les FAO agissent sur des protéines cibles par le biais de modification post-traductionnelles.

permet à l'oomycète *Phytophthora infestans* de contourner la réponse immunitaire induite par l'éliciteur INF1. Cet effecteur interagit avec la protéine StNRL1, une protéine adaptatrice d'une E3 Ubiquitine ligase, ce qui déclenche la dégradation protéasomale de la protéine StSWAP70, un régulateur positif de la PTI induite par INF1 (He et al., 2018).

Comme indiqué précédemment, les plantes possèdent des protéines de résistance R jouant un rôle essentiel dans l'ETI. Ces protéines, principalement intracellulaires, sont impliquées dans la reconnaissance directe ou indirecte des effecteurs (van Ooijen et al., 2007 ; **Fig. Int.2C**). La plupart des protéines R présente des domaines LRR et NBS (*nucleotide-binding site*), ce dernier conférant la capacité de fixer et l'hydrolyser l'ATP. Cette hydrolyse est à l'origine de changement de conformation permettant l'activation d'événements de signalisation cellulaire nécessaires à la mise en place des réponses de défense (Takken and Tameling, 2009).

1.2. Transduction du signal

La reconnaissance de l'agent pathogène conduit à la mise en place d'événements de signalisation intracellulaire nécessaires à l'activation d'une réponse adaptative de la plante (Jones and Dangl, 2006) (**Fig. Int.4**). Suivant les modèles d'étude, ces événements peuvent être rapides et s'observer dans les minutes suivant la reconnaissance des PAMP, DAMP ou des effecteurs. Suite à cette reconnaissance, des flux d'ions sont induits au niveau de la membrane plasmique, notamment des influx de Ca^{2+} et des efflux de NO_3^- et de K^+ . Les efflux d'anions ont été associés à une dépolarisation membranaire de la membrane plasmique dont l'amplitude et la durée dépendent de l'éliciteur (Garcia-Brugger et al., 2006). Les flux ioniques agissent en amont et/ou s'accompagnent d'autres événements de signalisation tels que l'activation de

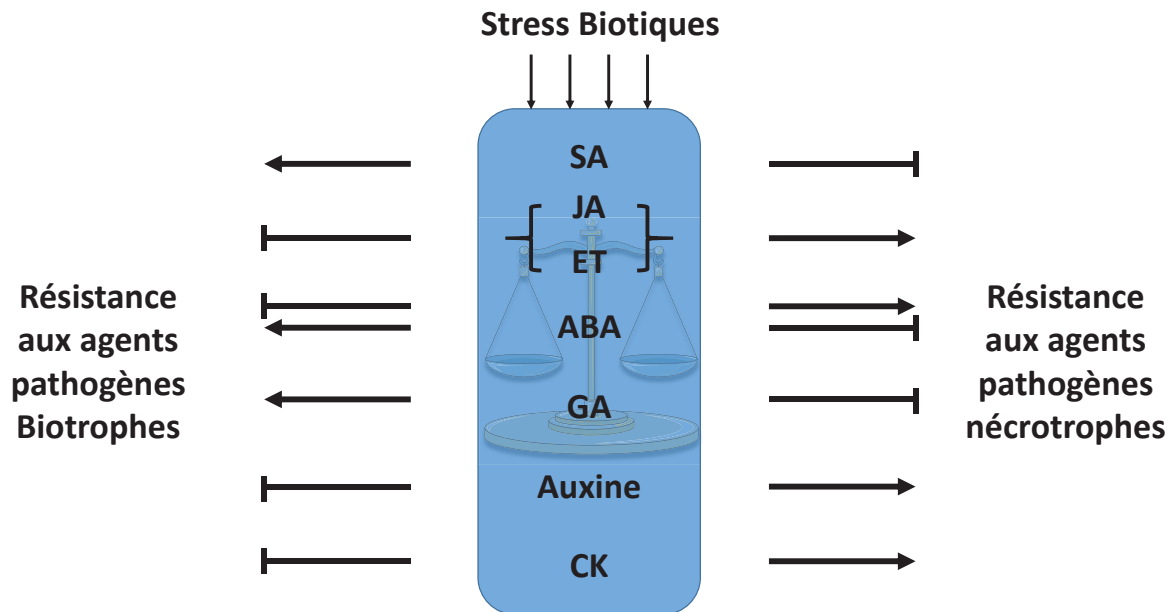
Tableau Int 1 Ensemble des modifications post-traductionnelles oxydatives identifiées lors d'interactions plante-microorganisme FAO: forme active de l'oxygène ; NO: *nitric oxide* ; ONOO⁻: peroxynitrite ; DNP: 2,4-dinitrophenylhydrazone ; DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine.

Modification	Origine	Résidus	Caractéristiques/Remarques
Carbonylation	FAO	Lys	• Oxydation majoritaire pouvant être prévenue par S-nitrosylation (Lounifi et al., 2012)
		Arg Pro Thr	• Irréversible et associée à la dégradation des protéines (Nyström, 2005)
S-nitrosylation	NO	Cys	• Modification réversible, impact variable selon la cible (Astier et al., 2012; Lindermayr et al., 2010; Yun et al., 2011, Wang et al., 2009)
Oxydation	FAO	Met	• Méthionine sulphoxyde, proposée comme protégeant la protéine d'autres stress oxydatif ou perturbant la phosphorylations des résidus voisins (Levine et al., 2001 ; Hardin et al., 2009)
Oxydation	FAO	Cys	• Réversible enzymatiquement par l'action de méthionine sulphoxyde réductases (Vieira Dos Santos et al., 2003)
		Cys	• L'oxydation de la méthionine sulphoxyde en méthionine sulfone est irréversible.
Tyrosine nitration	ONOO ⁻	Tyr	• Existence de différents degrés d'oxydation (Wasczczak et al., 2015)
		Tyr	• Sulfénylation (Cys-SOH), intermédiaire instable nécessaire à la formation de ponts disulfures inter ou intramoléculaire, à la S-glutathionylation (Lindermayr et al., 2010) ou au degré d'oxydation suivant. Le processus est réversible.
Tyrosine nitration	ONOO ⁻	Tyr	• Sulfinylation (Cys-SO ₂ H), modification réversible par voie enzymatique impliquant des sulfiredoxines
		Tyr	• Sulfonylation (Cys-SO ₃ H), modification irréversible
Tyrosine nitration	ONOO ⁻	Tyr	• Produit d'interaction entre NO et l'anion superoxyde. Informations limitées quant à la tyrosine nitration chez les plantes (Jain et Bhatla, 2018) mais aurait un rôle protecteur via la neutralisation de l'anion superoxyde.

protéines kinase comme les modules MAPK (*mitogen-associated protein kinase*), des CDPK (*Ca²⁺-dependant protein kinase*) et des caséines kinases catalysant la phosphorylation réversible de protéines cibles (Cristina et al., 2010).

Une production des formes actives de l'oxygène (FAO) et de l'azote (RNS ; *reactive nitrogen species*), dont le monoxyde d'azote (NO), est également rapidement observée. Parmi les FAO, la synthèse de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est principalement catalysée par une NADPH oxydase de la membrane plasmique dont l'activité est Ca^{2+} et phosphorylation dépendante (Kadota et al., 2015; Kwak et al., 2003). Les $O_2^{\bullet -}$ libérés dans l'apoplaste sont très rapidement réduits en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par des superoxyde dismutases (SOD) (Alscher et al., 2002). La synthèse de NO, la principale RNS, est catalysée à partir du nitrite par la nitrate réductase ou par réduction non enzymatique du nitrite (Jeandroz et al., 2016). Le H_2O_2 et le $O_2^{\bullet -}$ contribuent à l'arrêt du développement de l'agent pathogène *via* leur cytotoxicité, leur capacité à renforcer la paroi cellulaire en favorisant les réactions de pontages de composés pariétaux (voir § 1.3) et leurs propriétés signalétiques (Kärkönen and Kuchitsu, 2015; Lamb and Dixon, 1997). En effet, les FAO tout comme les RNS contribuent aux cascades de signalisation conduisant à la régulation de l'activité de protéines et à l'expression des réponses de défense (Kulik et al., 2015; Spoel et al., 2010). Concernant les protéines, les FAO, en particulier le H_2O_2 , peuvent interagir directement avec des résidus méthionine, cystéine, histidine, tryptophane ou thréonine suivant leur concentration (Stadtman and Levine, 2003). Il s'agit de mécanismes de modifications post-traductionnels affectant la fonction mais aussi le turnover des protéines (**Tab. Int.1**) (Astier et al., 2011; Levine et al., 2001; Waszczak et al., 2015). Par exemple, à concentration modérée de H_2O_2 , l'oxydation réversible des résidus méthionine sert à protéger les autres résidus des dommages oxydatifs (Levine et al., 2001). A plus forte concentration, l'oxydation est irréversible et peut conduire à la précipitation de la protéine sous forme de complexes et/ou à sa dégradation. Dans le cas des résidus cystéines, par l'intermédiaire de ponts disulfures, ils

sont essentiels à l'échafaudage et à stabilisation de la structure tertiaire et quaternaire des protéines. De plus, ils sont fréquemment retrouvés au niveau des sites catalytiques des enzymes et dans la coordination de métaux. Ils constituent une cible importante des FAO et des RNS, les modifications post-traductionnelles inhérentes ayant des conséquences diverses selon la position du résidu modifié et le type de modification (Waszczak et al., 2015). L'une des modifications les mieux caractérisées est la S-nitrosylation qui correspond à l'attachement covalent et réversible d'une molécule de NO sur l'atome de soufre du thiolate d'un résidu cystéine, formant ainsi un nitrosothiol (\sim S-NO ; (Lamotte et al., 2015)). D'après les données actuelles, cette modification a pour effet d'altérer les fonctions de la protéine cible, en inhibant ou en activant l'activité enzymatique, en engendrant des modifications de structure ou encore en modifiant la localisation subcellulaire (Astier et al., 2012a). En particulier, des protéines nitrosylées ont été identifiées dans les processus de mise en place de l'immunité chez les plantes, incluant des protéines du pathogène (Astier et al., 2012b; Lindermayr et al., 2010; Ling et al., 2017; Tada et al., 2008; Wang et al., 2009; Yun et al., 2011). Par exemple, durant la réponse immunitaire, l'interaction entre la protéine NPR1 (*non-expressor of pathogenesis-related gene1*) et le facteur de transcription TGA1 (*TGACG motif binding factor*) promeut la transcription des gènes codant les protéines PR (*pathogenesis related*) (Després et al., 2003). La S-nitrosylation de certains résidus cystéines de TGA1 a été décrite comme nécessaire à leur protection contre des phénomènes d'oxydation, améliorant ainsi la capacité de TGA1 à se fixer sur l'ADN (Lindermayr et al., 2010). Par ailleurs, durant la réponse hypersensible chez *A. thaliana*, la S-nitrosylation de l'AOC (*allene oxide cyclase*), une enzyme impliquée dans la voie de synthèse de l'acide jasmonique, représente potentiellement un mécanisme de régulation du taux de cette hormone (Romero-Puertas et al., 2008). Enfin, la S-nitrosylation de AtSABP3 (*SA-binding protein 3*), une protéine clé dans la voie de signalisation de l'acide salicylique a été proposée comme pouvant moduler les réponses de défense (Wang et al., 2009).



D'après Bari et Jones, 2009

Figure Int.5 Représentation de la balance hormonale lors de la mise en place des réponses de défense déclenchées par l'attaque d'un agent pathogène biotrophe ou nécrotrophe. Les flèches indiquent l'activation ou la contribution positive d'une hormone à la mise en place d'une réponse de défense. Les lignes finies par un trait droit indiquent la répression ou la contribution négative d'une hormone à la mise en place d'une réponse de défense. L'acide salicylique (SA), les gibberellines (GA) et les brassinostéroïdes (BR) favorisent les réactions de défense face aux agents pathogène biotrophes alors que l'éthylène (ET), l'acide jasmonique (JA), l'auxine et les cytokinines (CK) sont associées à la défense induite par des agents pathogènes nécrotrophes. Le rôle de l'acide abscissique (ABA) est fonction du pathosystème. D'après Bari et Jones, 2009.

Le taux de protéines oxydées est dépendant de la concentration en molécules oxydantes et sur la capacité de la cellule à se prémunir de cette oxydation. Cette protection peut être effective par action enzymatique, mais aussi grâce à des molécules ayant un puissant pouvoir antioxydant comme celles retrouvées dans le cycle de l'ascorbate/glutathion (Asada, 1999 ; **Introduction du chapitre 2**), ou encore par le biais de l'activité protéolytique du protéasome et/ou d'autres protéases qui vont dégrader les protéines oxydées (van der Hoorn and Jones, 2004).

Outre ces événements signalétiques, l'infection de la plante par un agent pathogène engendre des variations de taux de plusieurs phytohormones (Bari and Jones, 2009). En effet, en plus de leur implication dans divers processus physiologiques, l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), et l'éthylène (ET) jouent un rôle majeur dans les mécanismes de signalisation menant à la résistance aux microorganismes pathogènes (Broekaert et al., 2006; Loake and Grant, 2007; Lorenzo and Solano, 2005; Pieterse et al., 2012). D'une manière générale, il est admis que les voies de défenses dépendantes du SA et du ET/JA sont antagonistes puisque le JA et l'ET régulent la mise en place de la réponse immunitaire suite à l'attaque d'un agent pathogène nécrotrophe, alors que le SA régule la réponse immunitaire induite par un agent pathogène biotrophe (Glazebrook, 2005). D'autres phytohormones initialement décrites dans le développement participent à la réponse aux stressés biotiques et également abiotiques (**Fig. Int.5** ; Pieterse et al., 2009). Ainsi, un apport exogène d'auxine, une phytohormone principalement décrite dans la croissance, atténue les réponses de défense des plantes face à des microorganismes pathogènes du type *Pseudomonas* (Chen et al., 2007; Navarro et al., 2006). De plus, la résistance de plants d'*A. thaliana* mutés ou perturbés dans le transport de l'auxine compromet la résistance au champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina* (Llorente et al., 2008), suggérant une contribution de cette hormone dans la réponse immunitaire lors d'une attaque par un agent pathogène nécrotrophe. Par ailleurs, les gibberellines (GA) sont une classe

de phytohormones impliquées dans la croissance des plantes en promouvant notamment la dégradation par le protéasome des protéines DELLA qui sont des régulateurs négatifs de la croissance (Griffiths et al., 2006). Les protéines DELLA ont également été identifiées comme modulant les réponses de défense dépendantes du SA et du JA (Navarro et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, le quadruple mutant *della* est plus sensible au champignon nécrotrophe *Alternaria brassicicola* et *Botrytis cinerea* mais est plus résistant à *Pseudomonas syringae* DC3000 et *Hyaloperonospora arabidopsidis*, des pathogènes biotrophes (Navarro et al., 2008). Comme les GA stimulent la dégradation des protéines DELLA, il a été proposé que ces phytohormones soient impliquées dans la résistance des plantes aux agents pathogènes biotrophes et dans la sensibilité aux agents pathogènes nécrotrophes (Bari and Jones, 2009). Une autre classe de phytohormones a été décrite comme impliquée dans les réponses de défenses, les cytokinines (CK). Celles-ci sont impliquées dans de nombreux stress abiotiques (Muller and Sheen, 2007) mais ont un rôle peu compris dans les défenses. Cependant, durant le développement de la hernie des crucifères causé par l'agent pathogène biotrophe *Plasmodiophora brassicae* chez *Arabidopsis*, une analyse transcriptomique a mis en évidence une forte diminution de l'accumulation des transcrits codant une cytokinine oxydase, l'enzyme responsable de la dégradation de la phytohormone (Siemens et al., 2006). Dans cette même étude, l'utilisation de lignées transgéniques surexprimant la même enzyme a montré une résistance accrue à l'agent pathogène. Enfin, l'acide abscissique (ABA), impliquée dans la régulation de la croissance, le développement de la graine, la maturation embryonnaire et l'adaptation aux stress environnementaux, a également un rôle important dans les réponses de défenses qui varie en fonction du patho-système (Bari and Jones, 2009; Wasilewska et al., 2008).

Ainsi, pour un pathosystème donné, la réponse au stress sera caractérisée par une balance hormonale (**Fig. Int.5**).

1.3. Les réponses de défense

La transduction du signal, qui fait suite à la reconnaissance de l'agent pathogène (PTI et ETI), mène à une réponse de défense de la plante. Cette réponse nécessite une reprogrammation de l'expression de gènes communément et bien souvent pas défaut appelés gènes de défense. Les réponses de défense incluent principalement le renforcement de la paroi et la synthèse de composés antimicrobiens, l'intervention des protéines PR (*pathogenesis-related*), la mise en place de la réponse hypersensible et d'une résistance systémique acquise.

1.3.1. Renforcement de la paroi et synthèse de composés antimicrobiens

Le renforcement de la paroi au site d'infection constitue une réponse de défense autorisant une résistance physique plus forte de la paroi à la pression mécanique, limitant ainsi la progression de l'agent pathogène. Ce renforcement passe par le dépôt de lignine et de callose (polymère de β -1,3-glucane) (Hückelhoven, 2007; Trouvelot et al., 2008). En particulier il a été montré que la production de H_2O_2 était nécessaire à la lignification. L' H_2O_2 est également impliqué dans la formation de réticulation oxydative entre les protéines riches en proline, les rendant plus résistantes aux enzymes protéolytiques synthétisées par les agent pathogènes (Bradley et al., 1992).

En plus du renforcement pariétal, les réponses de défense peuvent cibler directement et inhiber des enzymes hydrolytiques sécrétées par le microorganisme pathogène qui ont pour but de dégrader la paroi végétale (De Lorenzo and Ferrari, 2002).

1.3.2. Les protéines PR (*pathogenesis-related*)

Les protéines PR sont produites en réponse à de nombreux pathogènes chez un grand nombre d'espèces végétales comme la tomate, le tabac, le persil, l'orge ou encore *A. thaliana*.

L'expression des gènes correspondants est sous le contrôle des phytohormones SA, JA et/ou ET (van Loon et al., 2006) mais aussi indirectement par le NO *via* certaines modifications post-traductionnelles de facteurs de transcriptions comme TGA1 (Lindermayr et al., 2010). Les protéines PR possèdent des rôles biologiques divers et sont classées en 17 familles selon leurs propriétés biochimiques. La plupart possèdent des propriétés antimicrobiennes et agissent au travers d'activités hydrolytiques, se traduisant par la dégradation de la paroi du pathogène ou par une toxicité vis-à-vis du pathogène. C'est le cas des β 1-3 glucanases (PR-2), des chitinases (PR-3, -4, -8 et -11), des endoprotéases (PR-7), ou encore des défensines (PR-12), des thionines (PR-13) et de certaines protéines de transfert de lipides (PR-14). Certaines protéines PR ciblent préférentiellement les oomycètes, comme PR-1, dont la fonction reste inconnue, ou les thaumatin-like protéines (PR-5); d'autres ciblent les virus, comme certaines ribonuclease-like protéines (PR-10). La famille 6 regroupe les inhibiteurs de protéases et ciblerait les nématodes et les insectes herbivores (van Loon et al., 2006). Enfin, certaines possèdent des activités SOD, comme les familles 15 et 16, permettant la génération de H₂O₂, qui suivant le contexte physiologique peut s'avérer toxique ou jouer un rôle dans la signalisation. Les peroxydases (PR-9) seraient quant à elles impliquées dans le renforcement de la paroi végétale (van Loon et al., 2006).

1.3.3. La réponse hypersensible (HR ; *hypersensitive response*)

La HR est une mort cellulaire programmée qui est observée plus particulièrement dans le contexte de l'ETI, bien que des PAMPs telles que certaines élicitines peuvent également la déclencher. Elle est caractérisée par une mort cellulaire localisée au site d'infection, les zones de lésions apparaissant quelques heures après l'interaction (Heath, 2000).

Parmi les événements de signalisation mobilisés lors de la réponse immunitaire (**Paragraphe 1.2**) certains ont été associés à la HR. En effet, les cascades de phosphorylation induite par les

MAPK (Aguilar et al., 2017; Zhang and Klessig, 2001), ou encore les phytohormones par le biais de la régulation croisée entre SA, JA/ET et FAO (Miller et al., 2017; Overmyer et al., 2003) ont été identifiées comme nécessaires à la mise en place de la HR. De plus, le NO, en synergie avec H₂O₂, participerait à la mise en place de la HR lors de la réponse immunitaire (Kulik et al., 2015; Mur et al., 2008).

D'un point de vue cellulaire, la HR se caractérise par une condensation du cytoplasme et de la chromatine. Les mitochondries libèrent également certaines protéines, comme le cytochrome c, et des protéases sont activées (Balakireva and Zamyatnin, 2018; Lam, 2004; Mur et al., 2008). Parmi ces protéases, la sous-unité catalytique $\beta 1$ du protéasome 26S, présentant une activité caspase-like, est nécessaire à la fusion de la membrane vacuolaire à la membrane plasmique. Le déchargement du contenu vacuolaire dans l'apoplaste contribue alors la mort cellulaire induite lors d'une infection par *Pseudomonas syringae* DC3000 (Hatsugai et al., 2009). Une autre protéase, la protéine VPE (*Vacuolar processing enzyme*), participe à la mise en place de la HR. VPE est en effet nécessaire à la maturation de protéines vacuolaires et à la désintégration de la membrane vacuolaire nécessaire au relargage des enzymes hydrolytiques lors de la HR durant une infection virale chez le tabac ou lors d'une agression par un oomycète chez *A. thaliana* (Hatsugai et al., 2004; Misas-Villamil et al., 2013).

Il est communément admis que la HR a pour but de limiter la croissance de l'agent pathogène et donc sa propagation en limitant l'accès aux nutriments disponibles (Greenberg and Yao, 2004). Cette stratégie de la « terre brûlée » est efficace pour lutter contre des agents pathogènes biotrophes ou hémibiotrophes, car ils ont besoin de cellules hôtes vivantes pour se développer (Glazebrook, 2005). En revanche, cette stratégie peut se révéler délétère pour la plante si elle fait face à un microorganisme nécrotrophe, qui se nourrit de tissus morts (Govrin and Levine, 2000).

1.3.4. La résistance systémique acquise (SAR)

L'efficacité des défenses de la plante est fonction, en plus de la reconnaissance de l'agent pathogène, de la rapidité et de l'intensité des réponses cellulaires conduisant à la résistance (Conrath et al., 2002). Après une infection par un agent pathogène, une seconde forme de résistance peut s'établir dans l'ensemble de la plante: la SAR. La SAR n'est pas spécifique à l'agent infectieux initial mais, au contraire, confère une protection des tissus non infectés de la plante contre un large spectre de microorganismes pathogènes (Singh et al., 2017). Cette protection peut durer jusqu'à plusieurs semaines (Durrant and Dong, 2004).

Ce phénomène nécessite le transport d'un ou plusieurs signaux de la zone infectée aux régions distales saines (Gao et al., 2014; Wendehenne et al., 2014). Le SA et sa forme méthylée (MeSA), l'acide azélaïque (AZA), l'acide pipécolique, et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), le NO et les FAO ont été identifiés comme nécessaires à l'induction de la SAR (Chanda et al., 2011; Gaffney et al., 1993; Hartmann et al., 2018; Jung et al., 2009; Wang et al., 2014).

La signalisation de la SAR en aval du SA, est contrôlée par la protéine NPR1 qui agit comme un co-activateur de la transcription des gènes PR. Dans les cellules non-activées, NPR1 est séquestrée dans le cytoplasme sous forme d'oligomère *via* la présence de ponts disulfures intermoléculaires. Le SA induit des modifications du statut redox et favorise la monomérisation de NPR1 nécessaire à sa translocation dans le noyau. L'interaction entre la protéine NPR1 et certains membres des familles de facteurs de transcription TGA, WRKY et TCP contribue à la mise en place de la SAR (Ding et al., 2018; Li et al., 2018; Sun et al., 2018).

1.3.5. La résistance systémique induite (ISR)

Un second type de résistance systémique appelé ISR, peut être mis en place par la plante suite à la colonisation de ses racines par des microorganismes bénéfiques. Même si ces microorganismes semblent avoir supprimé les réponses de défense racinaires de la plante hôte,

ils produisent des molécules élicitrices à l'origine de l'ISR. Parmi ces molécules élicitrices peuvent être citées les LPS, les pyoverdines, qui sont des chélateurs de fer le séquestrant dans le sol, ou encore des composés organiques volatils (Pieterse et al., 2014). Contrairement à la SAR, l'ISR est SA-indépendante et les hormones contrôlant l'ISR sont le JA et l'ET. Malgré l'indépendance au SA, la protéine NPR1 joue un rôle dans la mise en place de l'ISR, la forme cytosolique de NPR1 ayant cette fois-ci été montrée comme nécessaire à l'établissement de l'ISR (Spoel et al., 2003; Stein et al., 2008). Néanmoins, les mécanismes moléculaires exacts expliquant le rôle de NPR1 dans l'ISR n'ont pas encore été établis.

De manière intéressante, l'ISR est liée à l'homéostasie du fer. En effet, 20 % des transcrits qui s'accumulent durant l'ISR sont communs à ceux s'accumulant durant une carence en fer (Zamioudis et al., 2015). Parmi ces transcrits, celui codant pour le facteur de transcription MYB72 est reconnu comme un élément central dans la mise en place de l'ISR (Zamioudis et al., 2014) et les transcrits codant FRO2 (*Ferric reduction oxidase 2*) et IRT1 (*Iron-regulated transporter 1*), codant respectivement pour une Fe^{3+} réductase et un transporteur d'ion ferreux (Fe^{2+}), sont reconnus comme des marqueurs d'une carence en fer (Walker and Connolly, 2008).

2. Le modèle cryptogéine/tabac

La compréhension des processus sous-jacents à la réponse immunitaire a largement bénéficié de modèles expérimentaux simplifiés dans lesquels les effets de PAMP, DAMP ou d'effecteurs purifiés sur des suspensions cellulaires végétales ou des plantes ont été étudiés *via* des approches diverses (cellulaires, biochimiques, moléculaires pour l'essentiel). Bien que ces modèles ne rendent pas compte de la complexité d'une interaction plantes/microorganismes *in vivo*, ils ont conduit à l'identification d'événements et de composants essentiels des voies de signalisation cellulaire inhérentes à l'immunité végétale ainsi que d'acteurs de la HR. Dans ce contexte, le modèle cryptogéine-tabac décrit en détail ci-dessous est utilisé depuis bientôt une

trentaine d'année. La cryptogéine est une élicitrine produite par l'oomycète *Phytophthora cryptogea* (Ricci et al., 1989). Elle se caractérise par 6 hélices α constituant une face hydrophile, ainsi que 2 feuillets β et une boucle Ω définissant une cavité hydrophobe (Ponchet et al., 1999). Elle est aisée à purifier et déclenche des réponses de défense dans des suspensions cellulaires et des plants de tabac (Bourque et al., 1998; Rusterucci et al., 1996).

2.1. Reconnaissance de la cryptogéine

Chez le tabac, de nombreuses informations suggèrent que la reconnaissance de la cryptogéine implique un récepteur qui n'a pas encore été identifié. En effet, des études antérieures ont mis en évidence l'existence de sites de fixation spécifiques de haute affinité ($K_d = 2$ nM) pour la cryptogéine au niveau de la membrane plasmique (Wendehenne et al., 1995). L'interaction de la cryptogéine avec ces sites est pH dépendante et implique des interactions faibles. Grâce à des réactions de pontage, il a ensuite été démontré que la cryptogéine interagit avec un complexe protéique de la membrane plasmique composé de deux protéines glycosylées de 162 et 50 kDa (Bourque et al., 1999). Ces éléments concordent avec les données publiées sur le récepteur ELR (**Paragraphe 1.1.2**) de la pomme de terre sauvage *Solanum microdontum* (Du et al., 2015). En effet, la transformation de plantes de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) avec le gène ELR permet d'induire la HR en réponse à 14 élicitines dont la cryptogéine. De plus, par une approche d'immunoprécipitation, il a été mis en évidence que ELR (128 kDa) interagit avec le co-récepteur BAK1/SERK3 (50 kDa).

Les élicitines sont des protéines sécrétées par différentes espèces de *Phytophthora* présentant une cavité hydrophobe capables de fixer les acides gras et les stérols (**Paragraphe 1.1.1**). La cryptogéine présente elle aussi cette cavité qui lui permet de transférer, *in vitro*, les stérols d'une membrane artificielle à une autre (Mikes et al., 1997). Le complexe formé par la cryptogéine et le stérol (Osman et al., 2001) ou le lipide (Hirasawa et al., 2004) a été montré comme nécessaire

à la fixation aux sites de haute affinité et aux réponses cellulaires en aval. De plus, la reconnaissance de la cryptogéine par ses sites de fixation nécessite également la distribution de charges positives en surface de la protéine (Plešková et al., 2011). Cette distribution serait essentielle au positionnement correct de la cryptogéine au niveau de la membrane plasmique lors du chargement des stérols.

2.2. Signalisation précoce induite par la cryptogéine

Suite à la perception de la cryptogéine par la cellule de tabac, l'activation de protéines kinase et/ou l'inhibition de protéines phosphatases sont à l'origine d'un influx de Ca^{2+} (Lecourieux-Ouaked et al., 2000). Cet influx engendre une variation de la concentration calcique dans différents compartiments cellulaires dont le cytosol (Lecourieux et al., 2002), le noyau (Lecourieux et al., 2005), le chloroplaste et la mitochondrie (Manzoor et al., 2012). L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire est accompagnée d'efflux de Cl^- et de NO_3^- (Pugin et al., 1997; Gauthier et al., 2007).

Ces efflux sont nécessaires à l'activation de RBOHD (*respiratory burst oxidase homolog protein D*), une NADPH oxydase membranaire constituant un site majeur de production des FAO (**Fig. Int.4**; Simon-Plas et al., 2002; Wendehenne et al., 2002). La régénération du NADPH, le cofacteur essentiel au fonctionnement de la RBOHD, est dépendante de la voie des pentoses phosphates (Pugin et al., 1997). De par son rôle dans la production des FAO et dans la mise en place des cascades de signalisation de défenses, la NADPH-oxydase est finement régulée par divers procédés. Alors que chez *Arabidopsis thaliana*, RBOHD est régulée par diverses modifications post-traductionnelles (Kadota et al., 2005; Yun et al., 2011), chez le tabac des mécanismes de régulation par le biais d'interactions protéiques ont été proposés. En effet, un membre la famille des 14-3-3s a été identifié comme partenaire protéique potentiel de la région C-terminale de RBOHD (Elmayan et al., 2007). Les 14-3-3s sont des protéines qui interagissent

préférentiellement avec des protéines phosphorylées. Cette interaction peut avoir plusieurs effets sur la protéine, comme une inhibition, une activation, une translocation, la promotion ou la protection de la dégradation (van Hemert et al., 2001; Lozano-Durán and Robatzek, 2015). Ici, des lignées cellulaires n'exprimant pas cette 14-3-3 ne présentent pas de production de FAO durant l'élicitation, suggérant une régulation positive de RBOHD (Elmayan et al., 2007). À l'inverse, le protéasome régulerait négativement RBOHD (Lequeu et al., 2005). En effet, durant l'élicitation, une accumulation des transcrits et des sous-unités $\alpha 1$ din, $\alpha 3$ din, et $\beta 1$ din (*defense induced*) du complexe catalytique du protéasome a été observée, indiquant un potentiel rôle de ce dernier dans la réponse immunitaire (Dahan et al., 2001; Etienne et al., 2000; Suty et al., 2003). De plus, des cellules de tabacs surexprimant la sous-unité $\beta 1$ din produisent moins de FAO suite à l'élicitation alors que celles inhibées dans la production de $\beta 1$ din ou prétraitées par le MG132, un inhibiteur du protéasome, accumulent d'avantage de FAO durant la mise en place de la réponse immunitaire induite par la cryptogéine (Lequeu et al., 2005).

La production des FAO n'a pas lieu exclusivement dans l'apoplaste des cellules de tabac. En effet, à des temps précoces dans la mise en place de la réponse immunitaire induite par la cryptogéine, une étude sur cellules de tabac *Bright Yellow-2* (BY-2) a révélé l'induction d'une production intracellulaire de H_2O_2 initiée au niveau du noyau et se propageant vers la périphérie de la cellule (Ashtamker et al., 2007). Néanmoins, il n'a pas été établi d'interdépendance entre la production intracellulaire de H_2O_2 et celle de FAO par RBOHD.

Durant la réponse immunitaire induite par la cryptogéine, la production de FAO et de NO est sous le contrôle de désacétylases de type 2 (HDAC2 a/b) suivant un mécanisme non défini (Kulik et al., 2015). De plus, par une approche génétique et pharmacologique, Kulik et ses collaborateurs ont mis en évidence une co-régulation entre les FAO et le NO. En effet, les FAO apparaissent comme une étape nécessaire à la production de NO, alors que ce dernier module

le taux d'H₂O₂ probablement *via* la formation de peroxynitrite (ONOO⁻) résultant de l'interaction entre NO et O₂^{•-} (Kulik et al., 2015).

Quant au NO, dans la mise en place de la réponse immunitaire, il contribue à l'augmentation transitoire de la concentration en Ca²⁺ libre cytosolique (Lamotte et al., 2004, 2006) et agit sur des protéines cibles par S-nitrosylation (**Tab. Int.1**). Une étude protéomique sur suspensions de cellules de tabac a conduit à l'identification de 11 protéines S-nitroylées dans les 3 premières heures de traitement par la cryptogéine (Astier et al., 2012b). Celles-ci incluent des protéines liées au métabolisme énergétique dont la sous-unité α de l'ATP synthase, une calmoduline, une CDPK putative et une protéine de la famille des AAA+ ATPase (*ATPase associated with various activities*), CDC48 (*cell division cycle 48*). Une étude structurale *in silico* a démontré que le résidu Cys S-nitrosylé de la calmoduline est localisé dans le premier motif *EF-hand* de fixation du Ca²⁺ et que ce dernier est localisé dans un environnement favorisant la S-nitrosylation (Jeandroz et al., 2013). Une caractérisation fine de l'incidence de la S-nitrosylation de la calmoduline est en cours au laboratoire.

Enfin, la cryptogéine déclenche l'activation dans le cytoplasme de deux MAPK: SIPK et WIPK (Lebrun-Garcia et al., 1998), l'activation de SIPK ayant aussi été détectée au niveau du noyau (Dahan et al., 2009)

L'ensemble de ces événements précoces participe à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place des défenses dont la mort cellulaire associée à la HR.

2.3. Les déterminants moléculaires de la mise en place de la HR

Du fait du rôle des FAO dans l'établissement de la HR, la NADPH oxydase RBOHD apparaît essentielle à son établissement (Simon-Plas et al., 2002 ; **Paragraphes 1.3.3 et 2.2**). Comme précisé précédemment (**Paragraphe 1.3**) le NO, en synergie avec H₂O₂, participerait à l'établissement de la HR (Kulik et al., 2015). Durant l'élicitation par la cryptogéine, les FAO et

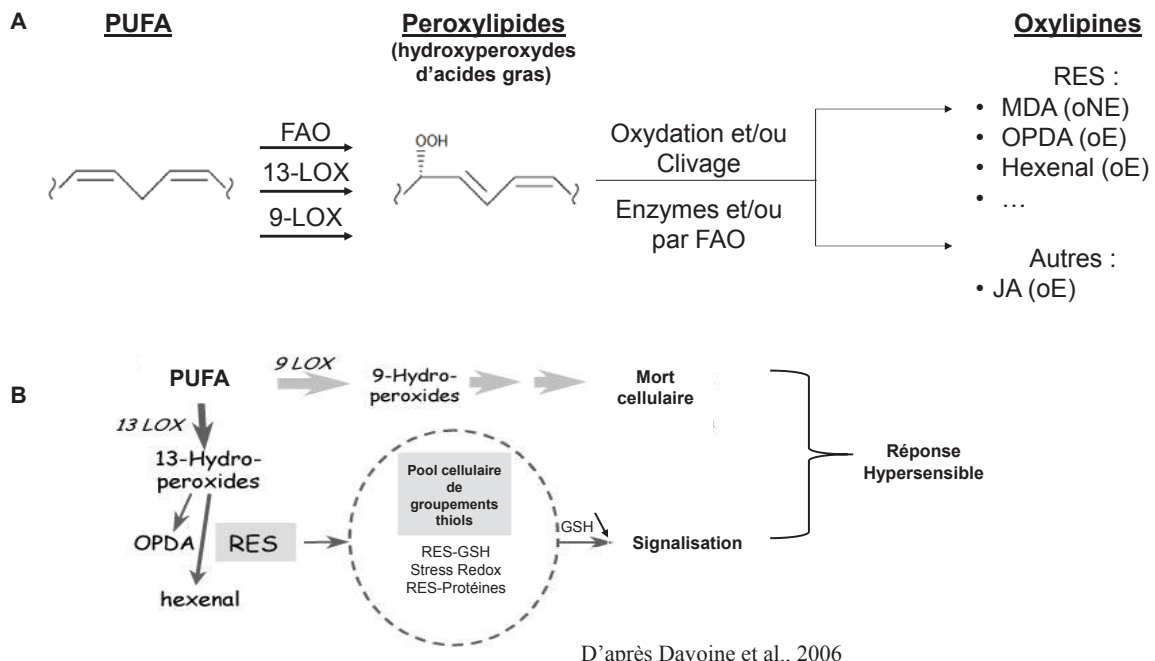


Figure Int.6 Peroxydation des lipides durant la réponse immunitaire induite par la cryptogéine. **A**, devenir des acides gras polyinsaturés (PUFA; *poly unsaturated fatty acid*). Après peroxydation non-enzymatique par des FAO ou enzymatique par les lipoxygénases 9-LOX et 13-LOX, des peroxylipides sont générés. Ils sont alors oxydés ou clivés enzymatiquement ou sous l'action de FAO pour donner des RES (*reactive electrophile species*): le malondialdéhyde (MDA), l'acide 12-oxo-phyto-dienoïque (OPDA), le précurseur du JA ou l'hexenal, ou des composés sans caractère électrophile: le JA. oNE : origine non enzymatique; oE : origine enzymatique. **B**, rôle hypothétique des RES dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine. La production massive de 9-hydroxyperoxydes d'acides gras par la 9-LOX serait à l'origine de la mort cellulaire sans passer par la formation de RES. Les 13-hydroxyperoxyde d'acides gras formés par la 13-LOX provoquent une accumulation de RES qui réagissent avec les thiols cellulaires dont le glutathion. La diminution du pool de glutathion intracellulaire résultante influence le statut redox de la cellule ce qui interviendrait dans la transduction du signal induisant la HR. D'après Davoine et al., 2006.

le NO régulent conjointement l'induction de 5 gènes, dont un codant pour l'ubiquitine ligase PUB26 (*plant U-box protein 26*) (Kulik et al., 2015). Les ubiquitines ligases permettent le transfert covalent d'une ubiquitine (polypeptide de 76 acides aminés), la répétition de ce processus conduisant à la poly-ubiquitination de la protéine cible. Cette modification a généralement pour effet de promouvoir la dégradation de la protéine par le protéasome 26S (Citovsky et al., 2009; Vierstra, 2003). Sur la base de la littérature scientifique, Kulik *et al.* (2015) ont proposé que PUB26 et son activité d'ubiquitination pourrait participer à la HR mais n'ont pas apporté d'arguments expérimentaux étayant cette hypothèse.

Le rôle du NO et des FAO n'est pas exclusivement synergique, chaque entité pouvant avoir un effet indépendant de l'autre. Ainsi, durant la réponse immunitaire induite par la cryptogéine, les FAO seraient en partie responsables de la génération d'oxylipines (Montillet et al., 2005), des produits de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés (Farmer et al., 2003) (**Fig. Int.6A**). Une autre voie enzymatique de peroxydation des lipides est aussi activée durant la mise en place de la réponse immunitaire, elle est catalysée par des lipoxygénases (LOX) et nécessite l'action combinée d'une lipase qui vient libérer les acides gras des différentes membranes (Cacas et al., 2005). Ces LOX peuvent être classées dans deux catégories, les 9-LOX et les 13-LOX qui introduisent respectivement un oxygène moléculaire en position 9 ou 13 sur l'acide gras polyinsaturé pour former des 9 ou des 13 hydroxyperoxydes d'acide gras. Ces deux classes sont activées durant la réponse immunitaire induite par la cryptogéine chez le tabac (Davoine et al., 2006; Rustérucchi et al., 1999). Indépendamment de leur origine, enzymatique ou non-enzymatique, deux classes d'oxylipines, basées sur leur réactivité chimique, se distinguent. La première est constituée des oxylipines électrophiles (RES: *reactive electrophile species*), qui réagissent spontanément avec les composés cellulaires nucléophiles. La seconde classe est constituée d'oxylipines non-réactives comme le JA. Les RES provenant de 13-hydroxyperoxyde d'acides gras réagissent avec le pool cellulaire de groupement thiols, incluant

les protéines et le glutathion. La conjugaison spontanée des RES au glutathion est en partie responsable de la diminution du pool de glutathion intracellulaire. Cette diminution a un impact sur le statut redox de la cellule et un rôle putatif dans la transduction du signal induisant la HR (Davoine et al., 2006). De plus, la production massive de 9-hydroxyperoxydes d'acides gras a été décrite comme étant potentiellement à l'origine de la mort cellulaire (Cacas et al., 2005; Rustérucci et al., 1999) (**Fig. Int.6B**).

En addition de ces mécanismes, suite au traitement à la cryptogéine, deux isoformes de l'histone désacétylase (HDAC) de type 2, NtHDAC2a et NtHDAC2b, ont été mises en évidence comme des déterminants de la mise en place de la HR. Ces HDAC ont été identifiées comme phosphorylées lors de l'élicitation aboutissant à une rapide et drastique chute dans l'abondance du transcrit et de la protéine (Bourque et al., 2011a). Par diverses approches, dont l'utilisation d'une lignée cellulaire n'exprimant plus *NtHDAC2a/b*, il a été démontré que ces protéines sont des régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite par la cryptogéine (Bourque et al., 2011a). Enfin, récemment, la protéine CDC48 a été identifiée comme un régulateur de la mise en place de la mort cellulaire induite par la cryptogéine (**Chapitre 1** ; Rosnoblet et al., 2017). En effet, lors de la réponse immunitaire, une accumulation à la fois du transcrit et de la protéine ont été observées. De plus, durant le traitement à la cryptogéine, la lignée cellulaire surexprimant la protéine CDC48 présente une mort cellulaire précoce et exacerbée.

3. Structure et fonction de la protéine apparentées aux chaperonnes CDC48 chez les plantes

3.1. Homéostasie des protéines et immunité des plantes

L'homéostasie protéique est régie par l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines (Harper and Bennett, 2016). En particulier, un défaut de fonctionnement des systèmes

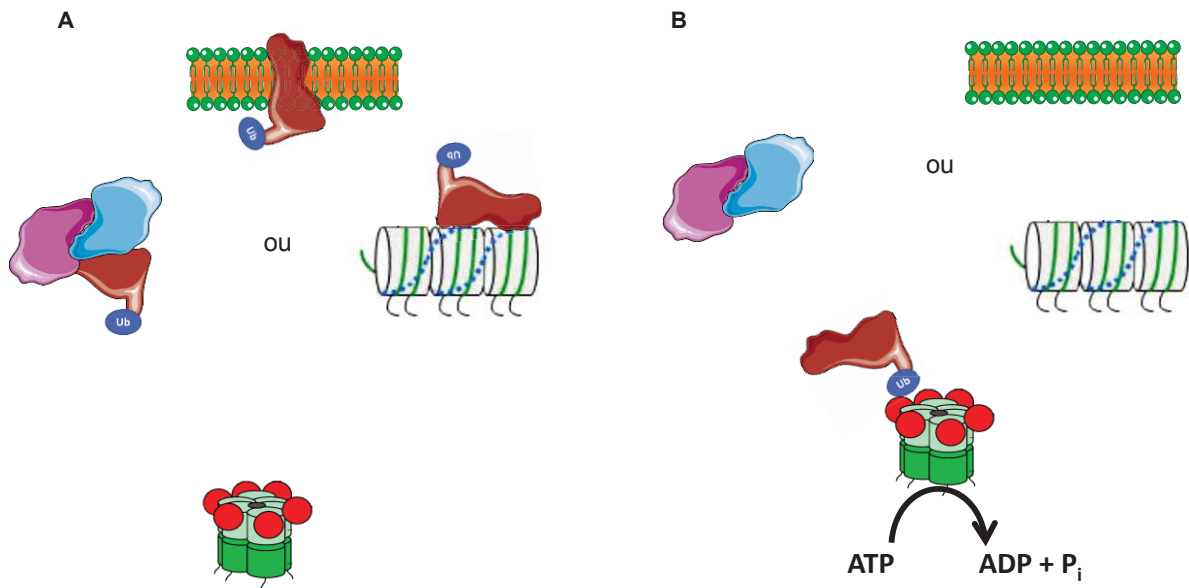


Figure Int.7 Description de la fonction ségrégase de CDC48. La fonction ségrégase de CDC48 lui permet d'extraire une protéine ubiquitinée d'une structure subcellulaire. **A**, CDC48 reconnaît la protéine cible enchâssée dans un complexe protéique, dans une membrane ou dans la chromatine par le biais de son ubiquitination. **B**, Après reconnaissance de la protéine cible, l'hydrolyse d'ATP par CDC48 génère des forces de traction permettant d'extraire la protéine cible de la structure subcellulaire. Ub: Ubiquitine

de dégradation des protéines conduit à un stress dit protéo-toxique délétère pour la cellule et très étudié dans le contexte de pathologies humaines neurodégénératives. A titre d'exemple, les données de la littérature indiquent que pour une protéine de 500 résidus d'acides aminés, les défauts d'incorporation de résidus d'acides aminés lors de la traduction affectent 1 protéine sur 20 chez *E. coli*. Chez l'homme, toujours sur la base de protéines de 500 résidus, Harper et Bennett ont estimé que 600 000 protéines sont dégradées toutes les minutes. Bien qu'il s'agisse d'une estimation, ce chiffre témoigne de l'importance des systèmes de dégradation des protéines afin de maintenir l'homéostasie protéique.

La mise en place de la réponse immunitaire des plantes requiert la synthèse *de novo* de protéines, un contrôle fin de leur turnover, comme cela a par exemple pu être démontré pour des récepteurs de l'immunité (Cheng et al., 2011), et une dégradation des protéines dont la fonction est altérée par les micro-organismes pathogènes ou les FAO/RNS produits abondamment par la cellule hôte. Diverses approches transcriptomiques ont démontré que des transcrits codant des protéines du système d'ubiquitination et de dégradation des protéines (notamment des sous-unités du protéasome) s'accumulent lors des réponses de défense. La régulation de l'homéostasie des protéines (Pauwels and Goossens, 2011; Spoel et al., 2009) apparaît donc comme essentielle au déroulement de la mise en place de la réponse immunitaire des plantes.

De précédents travaux de l'équipe ont démontré que la protéine CDC48 est S-nitrosylée en réponse à la cryptogéine. Chez la levure et les animaux, cette protéine agit comme une ségrégase et joue notamment un rôle essentiel dans la dégradation des protéines, en particulier dans l'UPS (*Ubiquitin/proteasome system*) mais aussi l'ERAD (*Endoplasmic reticulum-associated protein degradation*) et le MAD (*Mitochondrion-associated degradation*), deux processus permettant la dégradation de protéines incorrectement repliées (**Fig. Int.7** ; Baek et al., 2013; Stach and Freemont, 2017). Chez les plantes, le rôle de CDC48 dans l'immunité et, plus généralement,

dans la physiologie de la plante, a été peu abordé. L'article présenté ci-dessous et publié dans *Biochim Biophys Acta, General Subjects* (Bègue et al., 2017) propose un état des lieux de nos connaissances actuelles.

3.2. Article scientifique n°1: Structure et fonctions de la protéine apparentée aux chaperonnes p97/CDC48 chez les plantes

Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants

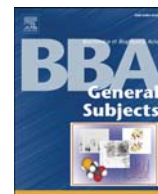
Article de revue paru en 2017 dans *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*

Bègue et al., 2017 BBA



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbagen

Review

Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants



Hervé Bègue, Sylvain Jeandroz, Cécile Blanchard, David Wendehenne, Claire Rosnoblet*

Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 July 2016

Received in revised form 29 September 2016

Accepted 1 October 2016

Available online 04 October 2016

Keywords:

p97/CDC48/VCP

Plants

Protein turnover

Immunity

ABSTRACT

Background: The chaperone-like p97 is a member of the AAA + ATPase enzyme family that contributes to numerous cellular activities. P97 has been broadly studied in mammals (VCP/p97) and yeasts (CDC48: Cell Division Cycle 48/p97) and numerous investigations highlighted that this protein is post-translationally regulated, is structured in homohexamer and interacts with partners and cofactors that direct it to distinct cellular signaling pathway including protein quality control and degradation, cell cycle regulation, genome stability, vesicular trafficking, autophagy and immunity.

Scope of review: p97 is also conserved in plants (CDC48) but its functions are less understood. In the present review we intended to present the state of the art of the structure, regulation and functions of CDC48 in plants.

Major conclusions: Evidence accumulated underline that CDC48 plays a crucial role in development, cell cycle regulation and protein turnover in plants. Furthermore, its involvement in plant immunity has recently emerged and first interacting partners have been identified, shedding light on its putative cellular activities.

General significance: Identification of emerging functions of CDC48 in plants opens new roads of research in immunity and provides new insights into the mechanisms of protein quality control.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

P97 is a molecular chaperone evolutionally conserved in plants, yeasts and animals. This protein is a highly abundant ATPase of the AAA + family, defined as ‘ATPases Associated with diverse cellular Activities’ [1,2]. The mammalian homologue of plant and yeast CDC48 (Cell Division Cycle 48), called VCP (valosin-containing protein) in mammals, is one of the most abundant proteins in eukaryotic cells, accounting for 1% of cytosolic proteins [3,4]. In yeast, CDC48 was first discovered in a genetic analysis aimed at identifying proteins required for cell-cycle progression [5]. Now, p97/CDC48/VCP is known to be involved in a large number of independent cellular processes and appears essential for cell growth and viability [6]. Indeed, in addition to cell cycle regulation, p97/CDC48/VCP is involved in ubiquitin-mediated pathways

and other biological events such as protein quality control and degradation, membrane fusion, DNA replication and damage repair, gene expression, apoptosis, autophagy and immunity [4,7–14].

The function of p97/CDC48/VCP has been particularly studied in ubiquitin-proteasome system (UPS), in endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and more recently in mitochondrial-associated and chromatin associated protein degradation (MAD and CAD) [14–17]. In these pathways, p97/CDC48/VCP segregates ubiquitinated proteins from their environment, such as protein complexes, membranes or chromatin and translocates unfolded substrates into the proteolytic chamber of the proteasome [6]. Some investigations also pointed out a role for mammalian VCP in immunity. For instance, this protein is an essential cofactor of the cytosolic antibody receptor TRIM21 (Tripartite motif-containing 21) in ADIN (antibody-dependent intracellular neutralization). Through this process, VCP mediates the proteasomal degradation of virus particles and, consequently, allows the neutralization of infection [13,18]. VCP was also shown to be required for the cross-presentation of antigens from viral proteins through the major histocompatibility complex class I (MHC-I) pathway [19,20]. However, pathogens can also take advantage of CDC48. For instance in mouse retrovirus, retro-translocation of the Rem viral protein from the ER is mediated by VCP. This moving seems necessary for the expression, the nuclear export and then the packaging of the viral RNA into virus particles [21]. ERAD mechanisms can also be used by Herpes virus to diminish the immune response, since viral proteins US2 and US11 promote the ER degradation of MHC-I with the help of

Abbreviations: ADIN, antibody-dependent intracellular neutralization; ARF, ADP ribosylation factor; AAA + ATPase, ATPase associated with diverse cellular activities; CDC48, cell division cycle 48; CAD, chromatin associated degradation; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, endoplasmic reticulum-associated degradation; GVS, gradient velocity sedimentation; HR, hypersensitive response; MAD, mitochondria associated degradation; MHC-1, major histocompatibility complex class 1; MP, movement proteins; NLR, nucleotide binding domain and leucine rich repeat proteins; NZF, Npl4 zinc finger domain; NO, nitric oxide; NVL2, nuclear VCP-like 2; ORMV, oilseed rape mosaic virus; PUX, plant UB domain-containing protein; RAD, ribosome associated degradation; TRIM21, tripartite motif-containing 21; UBA, ubiquitin associated domain; UBX, ubiquitin regulatory X; UPS, ubiquitin-proteasome system; VCP, valosin-containing protein.

* Corresponding author.

E-mail address: claire.rosnoblet@dijon.inra.fr (C. Rosnoblet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.001>

0304-4165/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

VCP [22,23]. Furthermore, in some cases VCP assists pathogen proteins to avoid ERAD, as reported for the Cholera toxin subunit CTA1 extracted by VCP from the ER membrane [24,25].

In the different cellular pathways requiring p97/CDC48/VCP, it interacts with a large network of specific adaptor proteins, also called cofactors, to process ubiquitinated substrates [26–28]. Although CDC48 may bind ubiquitinated substrates directly [29], most of its cofactors contains ubiquitin binding domains such as the ubiquitin associated domain (UBA), the UT3 domain or the NPL4 zinc finger domain (NZF) that bridge p97/CDC48/VCP to ubiquitinated substrates [30,31]. These cofactors are structurally diverse and, for most of them, their physiological functions are unknown [2,32]. However, it is thought that each cofactor directs CDC48 to a particular cellular pathway. For instance interaction between p97 and the cofactor p47 is required for membrane fusion while the p97-UFD1-NPL4 complex is involved in UPS degradation such as ERAD pathway [33,34]. Moreover, Zhang et al. [35] highlighted the critical role of the cofactors p37 and p47 in controlling the ATPase activity of VCP and its consequence on degenerative diseases caused by p97/VCP mutations.

Structurally, the active form of p97/CDC48/VCP is a barrel-shaped homohexameric complex that uses energy of ATP hydrolysis to remodel client proteins with the help of its associated cofactors [36]. Each monomer consists of two ATPase domains, D1 and D2, arranged as two stacked rings with a central channel in the homohexamer, and an N-terminal regulatory domain that lies at the periphery of the D1 ring (Fig. 1A and B) [2, 26,37,38]. Both D domains contain a Walker A and Walker B motifs involved in ATP binding and hydrolysis, respectively (Fig. 1A) [4,39]. Interaction between the D1 domain and ADP promotes the hexamerization of p97/CDC48/VCP required for ATPase activity [40]. ATP hydrolysis catalyzed by the D2 domain triggers a major conformational change that

generates energy allowing p97/CDC48/VCP to physically disassemble proteins from their partners or cellular structures and to remodel ubiquitinated proteins for recycling or degradation [41–45]. The N and C-terminal sequences of p97/CDC48/VCP are structurally flexible and mainly involved in selecting and/or processing substrates, but they could also modulate p97/CDC48/VCP activity through the binding of protein partners and cofactors [46–48]. The C-terminal tail especially includes an HbYX (Hb: hydrophobic, tyrosine, X: variable residue) motif that mediates interactions with additional adaptors and which is important for proteasome 20S binding [49]. Recently, two crucial studies investigated the structure of human p97/VCP under several nucleotide bound status using crystallization or cryo-electron microscopy [50,51]. Interestingly, these complementary approaches provides molecular details about intradomain communication inside each monomer and interdomain communication from one monomer to another. These signaling transmissions between domains control the ATPase activity of p97 through sequential conformational changes. In addition, the C-terminal tail mediates the D1 and D2 interdomain allosteric communication [50].

The N and C-terminal tails of p97/CDC48/VCP, structurally accessible at the hexamer periphery (Fig. 1B), are also targets for post-translational modifications. VCP is indeed prone to oxidative modification, phosphorylation, acetylation and SUMOylation, these post-translational modifications modulating the ATPase activity, the partner binding and the subcellular localization of the protein [52–55]. For instance, p97/VCP can be phosphorylated by the JAK-2 kinase and dephosphorylated by PTPH1 phosphatase, regulating early secretory pathways and cell proliferation [56,57]. Moreover in stress situation, oxidation of p97/VCP inhibits its ATPase activity while SUMOylation affects its subcellular distribution and hexamerization [52,58].

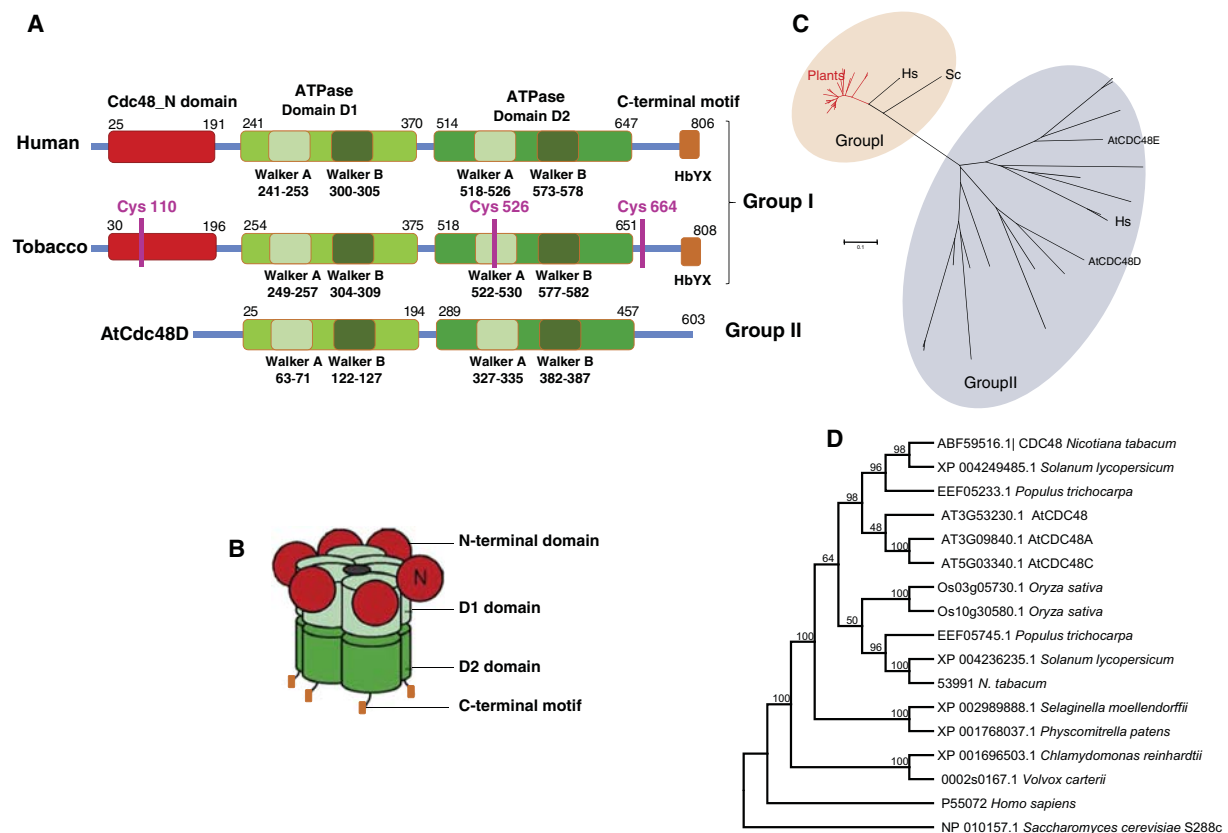


Fig. 1. Structure and evolutionary relationships among green plants CDC48 proteins. Following homology-based identification in publicly available databases, full-length protein sequences from representative plant lineages were aligned with clustal W and phylogenetic relationships were carried out using MEGA 6, using maximum likelihood method. A. Schematic alignment of conserved domains. Domains positions in human, tobacco CDC48 (ABF59516.1) and D isoform of *Arabidopsis thaliana* sequences were analyzed using NCBI identification of conserved domains program. S-nitrosylated residues in the tobacco isoform NtCDC48 are specified. B. Schematic representation of the CDC48 hexamer. C. Phylogenetic tree gathering groups I and II. D. Detail of group I phylogenetic tree.

In contrast to their human and yeast counterparts, so far the function of the plant CDC48 orthologues has been poorly investigated. In this review, we provide a comprehensive overview of the structure and of the emerging roles of p97/CDC48 in plants with an emphasis on its involvement in cell cycle regulation, protein turnover and immunity. From this analysis, we anticipate that p97/CDC48 is a protein of particular interest in plants.

2. CDC48 structure in plants

2.1. Evolutionary relationships

P97/CDC48/VCP is a highly conserved, ubiquitous protein in eukaryotes and archaea, with a limited number of eubacterial homologs that share less sequence identity [59,60]. To investigate the evolutionary relationships of CDC48 among plant species, protein sequences of plants, yeast and human homologs were used to perform a phylogenetic analysis (Fig. 1C and D).

The complete genome of representative green plants lineages from publicly available databases was searched using the full length amino acid sequence of five *Arabidopsis thaliana* CDC48s as queries (AtCDC48A, B, C, D and E) [61]. CDC48 homologs were identified in representative clades of green plants (green algae, mosses, lycophytes and angiosperms) and our analysis defines two major groups (Fig. 1C). Proteins from groups I and II showed major differences in their structure, especially in their N and C terminal tails (Fig. 1A). More precisely AtCDC48A, B and C belong to the group I and display the classical features found in animal VCP and yeast CDC48 [30] such as the consensus HbYX C terminal motif and typical CDC48 N-terminal domains (conserved protein domains CDC48_N). In this group CDC48s display high average similarity (approximately 90% including mammalian homologs), suggesting that this protein might keep similar functions and ways of regulation. In contrast AtCDC48 D and E belong to the group II which also includes sequences from yeast and human (for instance Nuclear VCP-like 2: NVL2). They own two AAA ATPase domains, but show more structural diversity and no conserved domains in their extremities. Human NVL2 is involved in 60S ribosomal subunit biogenesis and is exclusively localized in the nucleolus [62,63], raising the question of the exact function of AtCDC48 D and E.

Focusing on group I, different isoforms were identified in the genomes of angiosperms, suggesting that the CDC48 gene family evolved through successive rounds of duplications (Fig. 1D). Interestingly a major ancient duplication event led to, at least, two different isoforms in tobacco, tomato and poplar. In contrast, the three *A. thaliana* CDC48 isoforms A, B and C derived from a more recent duplication, NtCDC48A being the more abundant ([http://pax-db.org/species/3702/Arabidopsis thaliana](http://pax-db.org/species/3702/Arabidopsis_thaliana)) and being predominant in publications.

2.2. Protein structure and post-translational modifications

Based on the important degree of conservation of p97 primary sequence, it is tempting to speculate that human VCP and plant CDC48s display similar three dimensional structure. However, none of the forty-three 3D structures of p97/CDC48/VCP currently available in the RCSB Protein Data Bank refers to a plant isoform. Instead, the three dimensional structure of plant CDC48s was indirectly investigated using biochemical and biophysical methods.

The hexameric nature of the *A. thaliana* AtCDC48A isoform was first resolved by gel filtration and glycerol gradient velocity sedimentation (GVS) [64]. Using these two methods followed by Western blot analysis against AtCDC48A with an isoform specific antibody, authors observed a higher signal in molecular weights around 700 kDa, suggesting a predominantly association of AtCDC48A monomers into homo-hexameric and high-ordered protein complexes. In this plant species, it has been shown later that the plant UBX (ubiquitin regulatory X) domain-containing protein 1 (PUX1) promotes the disassembly of hexameric

AtCDC48A *in vitro* [65]. Using glycerol GVS centrifugation fractionation of membrane-free cytosolic proteins, PUX1 exclusively co-fractionates with non-hexameric AtCDC48A while the majority of cytosolic AtCDC48A protein is associated with higher oligomers. Moreover, in this work PUX1 has been shown to physically interact with AtCDC48A and to inhibit its ATPase activity. A further study deciphering the biochemical mechanism of PUX1 action on AtCDC48A allowed the identification of domains required for interaction in both PUX1 and AtCDC48A [47]. Thus, the central UBX domain, together with additional C-terminal flanking residues, are necessary for the binding of the N-terminal tail of AtCDC48A, the D1 and D2 ATPase domains being required for PUX1-mediated hexamer disassembly. Completing these studies, employing non-denaturing electrophoresis and fluorescence correlation spectroscopy, it has been shown that a transiently expressed fluorophore fused-AtCDC48A oligomerizes in living cells [66]. The hexameric complexes were predominant, with only 5% to 10% of monomers detected. Authors of this work also identified AtCDC48A as part of much larger complexes *in vivo*. Finally, using gel filtration analysis in native conditions it has been recently reported that in tobacco cells NtCDC48 is structured in a tightly bound hexamer [67]. In contrast, NtCDC48 was never detected in its monomeric structure, even in a cell line overexpressing recombinant NtCDC48. Interestingly, NtCDC48 appeared to take part to a less stable complex in a tobacco transgenic cell line producing much lower reactive oxygen and nitrogen species. Although requiring further investigations, this finding suggests that the mechanism inherent to the formation of the hexamer could involve redox processes. Taken together, these data highlight that the plant CDC48 isoforms are predominately found as hexamers and could belong to higher molecular weight complexes.

In terms of regulation, a recent investigation provided evidence that nitric oxide (NO) could impact the structure of CDC48. Indeed, Astier et al. [68] pointed out that the tobacco NtCDC48 isoform is regulated through S-nitrosylation, a post-translational modification in which NO establishes a reversible covalent bond with the sulfhydryl group of a cysteine (Cys) residue [69]. More precisely, in tobacco cells expressing an immune response NtCDC48 was found to undergo S-nitrosylation on residue Cys-526. Importantly, Cys-526 is located in the Walker A motif of the D2 domain involved in the binding of ATP (Fig. 1A). Accordingly, exposure of the recombinant NtCDC48 to NO or mutation of this Cys residues suppressed the ATPase activity of the protein and promoted subtle conformational changes *in vitro*. Based on these data, the authors suggested that the S-nitrosylation of the Cys-526 residue could trigger a steric hindrance interfering with ATP binding on the D2 domain, thus explaining the inhibitory effect of NO. Interestingly, studies conducted in human and drosophila p97/VCPs highlighted that the corresponding Cys residue (Cys-522) is also a key regulator of protein activity and a strategic target of pharmacological compound [52,70]. Moreover, this residue appears to be conserved among multicellular but not unicellular organisms and, accordingly, it has been proposed to confer an advantage to multicellular organisms through an upper level of post-translational regulation, most likely by oxidative/nitrosative modifications [52].

In vitro, two additional Cys-residues (Cys-110 and –664, Fig. 1A) were also S-nitrosylated following the treatment of the recombinant tobacco NtCDC48 protein with a NO donor [68]. The incidence of these post-translational modifications have not been investigated. It should be specified that *A. thaliana* AtCDC48s have also been found in proteomic studies aiming at identifying S-nitrosylated proteins [71–73]. For instance in AtCDC48A, the Cys-109 residue corresponding to tobacco Cys-110 has been shown to be constitutively S-nitrosylated in cultured cell suspension [72]. Furthermore, an AtCDC48 isoform was also identified as a candidate for S-nitrosylation in the nuclear fraction of *A. thaliana* cells [74]. Its exact identity has not been specified. The presence of a CDC48 isoform in the nucleus suggests that pools of CDC48 could occur in sub-cellular compartments and/or that its S-nitrosylation could induce

its relocation. Therefore, S-nitrosylation might constitute an important mean of regulation of CDC48 in plants.

Besides S-nitrosylation, plant CDC48 could also be regulated by phosphorylation. It was formerly reported that AtSERK1, a transmembrane like-kinase leucine-rich receptor, interacts with the N as well as the C terminus of AtCDC48A [75,46]. Latter, the same team visualized the oligomerization of AtCDC48A with AtSERK1 in ER-membrane-based regions in close proximity to the plasma membrane (PM) in living cells. Using *in vitro* trans-phosphorylation followed by mass spectrometry analysis, they highlighted the phosphorylation of Ser-41 by AtSERK1 [66]. A phosphoproteomic analysis of *A. thaliana* nuclear proteins has further underlined the phosphorylation of the residue Ser-720 in AtCDC48B [76]. In most cases, however, the functional consequence of this post-translational modification of CDC48 is poorly understood.

3. CDC48 partners and functions

First evidences indicate that in plants CDC48 could participate in functions shared with its animal and yeast counterparts, such as cell expansion and differentiation, cytokinesis, ERAD, membrane fusion, intracellular traffic and immunity [64,67,77–81]. In most cases, highlighted biological pathways rely on the identification on CDC48 partners. The following examples give an overview of CDC48 functions in plants.

3.1. Development and cell cycle regulation

Numerous studies in animals and yeast reported the requirement of p97/CDC48/VCP in the regulation of cell cycle and mitotic events [12]. Additionally, the central role of VCP/p97 has been well investigated in DNA replication and repair, as for instance in case of DNA double-strand breaks or UV-induced pyrimidine dimers [12,82–85]. Through these functions p97/CDC48/VCP is therefore essential for genome stability and cell viability [14,86–88]. In plants, the first connection between CDC48 and cell division was established about 20 years ago [77]. In this pioneer study, an *A. thaliana* AtCDC48 isoform was shown to functionally complement CDC48 yeast mutants, allowing mitotic spindle assembly, thus demonstrating that plant CDC48s also display a function in cell division. CDC48 transcripts were abundant in proliferating and rapidly growing plant cells, but weaker in most differentiated cell types, the protein being mostly localized in the nucleus. Latter, Rancour et al., [64] highlighted a role for AtCDC48A in membrane fusion pathways during mediation of cytokinesis in *A. thaliana*. In this process AtCDC48A acts together with SYP31, a protein involved in the ER to Golgi secretory pathway and recruited to the division plane during cytokinesis. Looking for other partners, the same team further identified PUX1 as a regulator of AtCDC48A and highlighted a dynamic regulation of AtCDC48A by PUX1 (see above in Section 2.2) in plant growth and development-related process [65]. Further supporting such a role, *A. thaliana* AtCDC48A T-DNA insertion mutants were characterized by a decrease in cell expansion, an arrest during seedling development and pleiotropic defects in pollen and embryo development [81]. In the same study, disruption of the Walker A motif of AtCDC48A resulted in cytokinesis abnormalities, aberrant cell divisions and excessive root hair emergence. At the subcellular level, AtCDC48A localized in nucleus and cytoplasm and was translocated to the division mid-zone during cytokinesis. Altogether, this thorough study demonstrated a critical role of AtCDC48A in plant cytokinesis, cell expansion and differentiation. In *Nicotiana glutinosa*, knockdown of NgCDC48 also resulted in aberrant development and early arrest of growth of both vegetative and reproductive organs [89].

More recently, Mérai et al. [90] provided new insights into the molecular mechanism by which AtCDC48A contributes to cell division. These authors demonstrated that the centromere disassembly is an active proteolytic mechanism directed by AtCDC48A together with its heterodimer UFD1-NPL4 cofactor. More precisely, the complex allows cell division through centromeric heterochromatin decondensation.

In all these examples, it was hypothesized that CDC48 regulates cell cycle and plant development through the turnover of key proteins via UPS degradation.

3.2. CDC48/p97 and the ubiquitin-proteasome system degradation

The involvement of p97/CDC48/VCP in UPS degradation pathways can be subdivided according to the cell structures of interest: endoplasmic reticulum (ERAD), chromatin (CAD), outer mitochondrial membrane (MAD) and ribosome (RAD) [14–17,34,91]. In these pathways, p97/CDC48/VCP, together with the heterodimer UFD1-NPL4, recognizes and segregates misfolded ubiquitinated proteins from each cellular structure and retro-translocates them back to the cytoplasm or the nucleus for subsequent proteasomal degradation [92,93]. Growing number of studies indicates that some of these mechanisms are conserved in plants.

The first evidence that CDC48 could function in an ERAD-related plant quality control mechanism was provided by Müller et al. [80]. Using *A. thaliana* as a model plant, these authors observed an accumulation of polyubiquitinated plant membrane mutated proteins in protoplasts that expressed a dominant negative of AtCDC48A. Consequently, a role for AtCDC48A in the degradation of aberrant proteins was demonstrated. An involvement for AtCDC48A in the folding of the plant receptor AtSERK1 through an ERAD-like quality control mechanism has been also highlighted. Indeed, AtCDC48A was found to promote the correct folding of AtSERK1 in the ER by removing misfolded polyubiquitinated proteins, these latter being degraded by the proteasome [94]. Still with regard to ERAD, AtCDC48A has been shown to take part in retro-translocation of orphan toxin subunits in *Nicotiana tabacum* leaves and protoplasts [72].

Some actors of the UPS degradation pathway have been also identified as plant CDC48 direct or indirect candidate partners. Notably, a complex associating proteins related to the ubiquitin signalisation pathway and three isoforms of AtCDC48 (A, B and C) was characterized in *A. thaliana* [95]. In the same plant species, Gallois et al. [78] pointed out the involvement of AtPUX7 as a bridge between AtCDC48A and ubiquitin via UBX and UBA domains. Completing these studies, in pollen vegetative cells the AtCDC48A isoform was found to physically interact *in vitro* with the heterodimeric cofactor UFD1-NPL4, while 26S and 20S proteasome subunits were also caught as AtCDC48A partners [90]. Also, a search for endogenous NtCDC48 partners in tobacco highlighted that numerous actors of the ubiquitin-proteasome degradation process interact with NtCDC48, as for example 26S proteasome regulatory subunits 3 and 6, ubiquitin, polyubiquitin-like protein and ubiquitin extension protein [67]. Two luminal-binding proteins (BiP 4 and 5) were also identified as NtCDC48 partners, these ER-resident chaperones contributing to ERAD in cooperation with CDC48 [67]. Similarly, Bip (GRP78) was identified as a VCP partner in human cells infected by *Helicobacter pylori* [96]. The identification of BiP proteins as CDC48 interacting proteins partners seems surprising as p97/CDC48/VCP is not an ER-resident protein. However, through its function in ERAD, p97/CDC48/VCP is closely associated with the ER membrane [55] and, therefore, could interact with ER-resident protein. This interaction could be indirect through additional transmembrane proteins also involved in ERAD.

3.3. Immunity

The involvement of p97/VCP as a host factor in immunity has been clearly reported in mammals [13,18]. Plants also express an immune response which underlying mechanisms have been widely investigated. In particular, key molecular components of animal immunity are also mobilized in plants, including reactive and nitrogen species. Furthermore, depending on the patho-system, this response involves phytohormones including, *inter alia*, salicylic acid (SA), jasmonic acid, ethylene and abscisic acid. Hallmarks of plant defense responses include the hypersensitive response (HR) corresponding to a programmed cell

death of cells infected by microbial pathogens. The HR is believed to restrict pathogens to their penetration site and to impair their development. Also, plants facing pathogens attack express a systemic resistance in the un-infected tissues [97–100]. Several investigations attributed a role for p97/CDC48 in plant immunity. First, CDC48 is known to form complexes with defense-related proteins. In particular, and as mentioned previously, the kinase SERK1 that interacts with AtCDC48A in *A. thaliana* mediates defense-related signal transduction in rice [75, 101]. Also, mutation in PUX2, a virulent powdery mildew-impacted transcriptional regulators in *A. thaliana*, resulted in reduced reproduction of the fungus. As AtCDC48A interacts with PUX1, another member of the PUX family, a role for CDC48 in fungal resistance is plausible [47, 65, 102]. More convincingly, in *A. thaliana* plantlets infected by the oilseed rape mosaic virus (ORMV), the AtCDC48B isoform was shown to mediate the targeting and retro-translocation of ORMV movement proteins (MP) from the ER to the cytosol for their subsequent degradation [103]. This process could reflect two mechanisms: a defense mechanism in which AtCDC48B contributes to the degradation of viral proteins but also a manipulation by the virus.

Indeed, retro-translocation of MP by AtCDC48B would be a viral strategy that increases virus replication efficiency and leads to optimization of infection [104]. A recent investigation also highlighted a regulatory role for AtCDC48A in the turnover of the immune-related intracellular receptors NLR (nucleotide binding domain and leucine rich repeat proteins). Tight regulation of NLR accumulation is necessary to promote plant defense and prevent autoimmunity, a constitutive activation of defense response detrimental to plant health. Proteasomal degradation of ubiquitinated NLR indeed leads to an optimal homeostasis allowing the efficiently recognition of the pathogen without triggering autoimmunity [61].

Interestingly, CDC48 has been reported to be specifically post-translationally modified in immunity. In particular, and as mentioned above, the protein was shown to be prone to S-nitrosylation. Indeed, an AtCDC48 isoform has been identified in a search for S-nitrosylated nuclear proteins in *A. thaliana* cell cultures infected with *Pseudomonas syringae* [74]. Furthermore, using tobacco cell suspensions, Astier et al. [68] observed a specific S-nitrosylation of NtCDC48 during the immune response triggered by cryptogeiin, a 10 kDa protein produced by the oomycete *Phytophthora cryptogea* which induces a HR and a systemic resistance in tobacco plants [105, 106]. As already discussed, *in vitro* this post-translational modification inhibits NtCDC48 ATPase activity. However, a recent investigation demonstrated that in tobacco cells elicited by cryptogeiin, only a few percent of the cellular NtCDC48 population appeared to undergo S-nitrosylation [67]. This latter observation raises the question of the incidence of this process in plant immunity. In plant cells undergoing defense responses, a significant increase of gene expression, transcripts accumulation and protein synthesis is observed [107]. This process is accompanied by the induced accumulation of transcripts encoding proteins of the UPS (see for instance [108]). In this regard, it is tempting to speculate that the overall process for protein quality control, including CDC48, is mobilized in plant cells facing an immune response. The importance of UPS in plant defense is exemplified by the finding that its components can be also manipulated by pathogens in order to suppress immunity [109–113]. Indeed, UPS can be also distorted by pathogen proteins catalysing the ubiquitination and then the degradation of host proteins required for plant resistance [114, 115]. Therefore, as S-nitrosylation impairs CDC48 enzymatic activity and, therefore, could lead to a dysfunction of the process of UPS degradation, an attractive hypothesis would be that CDC48 could act as a sensor of the nitrosative stress occurring in plant cells expressing an immune response. Once S-nitrosylated, the protein could initiate a signaling pathway promoting the up-regulation of UPS during infection [116].

New insights into CDC48 function in plant immunity were recently reported [67]. First, upon cryptogeiin treatment of tobacco cells, both NtCDC8 protein and transcripts were shown to accumulate.

Importantly, the protein accumulated under its active hexameric stable structure. Second, its overexpression led to an accelerated and more pronounced cryptogeiin-induced cell death. Collectively, these data highlighted that CDC48 is mobilized in plant cells undergoing an immune response and displays a function in the HR. Through which mechanisms NtCDC48 could contribute to cell death? In human and in yeast, numerous studies reported that p97/CDC48/VCP stimulates the activation of anti-apoptotic pathways [70, 96, 117]. However, other studies also proposed p97/CDC48/VCP as a pro-apoptosis effector, as in human ER stress-induced cell death or in drosophila model for eye degeneration [118–120]. In plants, several investigations provided evidence that the induction of the HR involves the inactivation of cell death repressors [121]. For instance, histone deacetylase of type II (HD2) were shown to negatively regulate cryptogeiin-induced cell death, impairment of their expression favoring an accelerated and amplified cell death [122, 123]. Thus, one interesting hypothesis would be that the overexpression of CDC48 could amplify/accelerate the degradation process of cell death repressors and, consequently, could cause early and exacerbated cell death. A role for CDC48 in the turnover of proteins related to HR is supported by the finding that the chaperone interacts *in vivo* with the ADP Ribosylation factor (ARF) ARF1 [67]. In addition to its role in vesicular traffic, ARF1 is directly involved in plant resistance in *Nicotiana benthamiana* and in rice [124, 125]. Notably, both studies pointed out that the overexpression of ARF triggers spontaneous lesions in leaves. However the incidence of the interaction of ARF1 with CDC48 is currently unknown.

4. Conclusion and prospects

While less investigated than its yeast and mammalian orthologues, first views of the structure and functions of CDC48 in plants begin to emerge. In addition to its involvement in the regulation of cell cycle and in plant development, CDC48 displays an exciting role in immunity (Fig. 2). This function opens a very interesting area of research and raises the question of how CDC48 contribute to immune responses. Based on available data, CDC48 is mobilized in plant cells challenged by microbial pathogens and might play a key role in the control quality of host proteins. In this regard, does CDC48 fulfil a general role of protein recycling or a specific control function within the immunity process? The second possibility seems plausible as immune-related proteins such as receptors were shown to be targeted by CDC48 in *A. thaliana* [61]. Reinforcing such a role, CDC48 has been shown to drive the degradation of pathogenic proteins [103]. Therefore, as reported in animal cells, it would not be surprising that CDC48 could be targeted by microbial effectors during the processes of infection, thus altering plant defense capacities. Validation of these hypotheses will first require the identification of CDC48 targets during pathogen infection and further molecular and genetic analysis of the incidence of these interactions. Also the understanding of CDC48 involvement in plant immunity implies an in depth investigation of its regulation, notably through post-translational modifications. Indeed, apart from nitrosylation and phosphorylation, other post-translational modifications of plant CDC48 have not been discovered yet. Such studies will also require the necessity of analysing the subcellular localization of CDC48 and the dynamic of its putative translocation/retro-translocation during plant physiological process. Moreover, growing studies highlighted crucial function of p97/VCP in genome stability [14] while involvement of plant CDC48 in chromatin regulation requires deeper investigations.

Finally, plant species contain several genes encoding distinct isoforms of CDC48 and our phylogenetic analysis indicated that AtCDC48s are distributed into two groups. Members of the group I showed more structural diversity with no conserved domains in their extremities. It will be interesting to investigate whether the group II AtCDC48s play functions unrelated to those fulfilled by group I CDC48s.

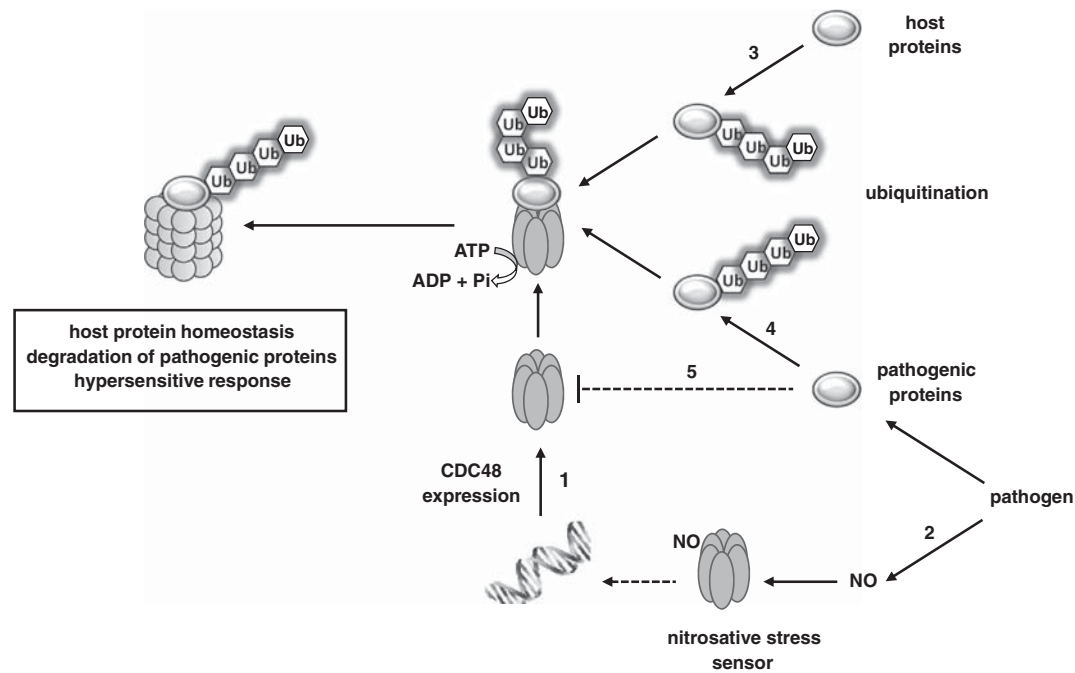


Fig. 2. Putative functions of CDC48 in plant immunity. (1) The recognition of microbial pathogens triggers the induction of the expression of host genes encoding CDC48. (2) The mechanisms underlying the transcriptional activation of the CDC48 genes are unknown but could be related to the S-nitrosylation of the corresponding proteins. Indeed, NO produced by host cells in response to pathogen attacks induces the inhibition of CDC48 ATPase activity through S-nitrosylation. This process might constitute a signal promoting the over-expression of CDC48 genes. (3) Once active in its hexameric structure, CDC48 interacts with and delivers ubiquitinated host proteins to the proteasome, thus ensuring protein homeostasis. In cells undergoing an immune response, the overexpression of CDC48 accelerates and amplifies the hypersensitive response (HR, cell death). Although the underlying mechanisms remain enigmatic, it is plausible that CDC48 contributes to the degradation of host proteins acting as negative regulators of the HR. (4) In addition, CDC48 might contribute to the host defense by favoring the degradation of pathogenic proteins (such as effectors). (5) In turn, by targeting CDC48, microbial effectors could suppress the UPS machinery and therefore alters plant defense.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

Funding: this work was supported by a fellowship from La Région de Bourgogne [PARI AGREE project].

References

- R. Erdmann, F.F. Wiebel, A. Flessau, J. Rytka, A. Beyer, K.U. Fröhlich, W.H. Kunau, PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases, *Cell* 64 (1991) 499–510.
- A. Stolz, W. Hilt, A. Buchberger, D.H. Wolf, Cdc48: a power machine in protein degradation, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 515–523.
- K.J. Koller, M.J. Brownstein, Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin, *Nature* 325 (1987) 542–545.
- D.H. Wolf, A. Stolz, The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 117–124.
- D. Moir, S.E. Stewart, B.C. Osmond, D. Botstein, Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies, *Genetics* 100 (1982) 547–563.
- H. Meyer, M. Bug, S. Bremer, Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 117–123.
- G.H. Baek, H. Cheng, V. Choe, X. Bao, J. Shao, S. Luo, H. Rao, Cdc48: a swiss army knife of cell biology, *J. Amino Acids* 2013 (2013) 183421.
- H.N. Ramanathan, Y. Ye, Revoking the cellular license to replicate: yet another AAA assignment, *Mol. Cell* 44 (2011) 3–4.
- N.P. Dantuma, T. Hoppe, Growing sphere of influence: Cdc48/p97 orchestrates ubiquitin-dependent extraction from chromatin, *Trends Cell Biol.* 22 (2012) 483–491.
- C.C. Yu, J.C. Yang, Y.C. Chang, J.G. Chuang, C.W. Lin, M.S. Wu, L.P. Chow, VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells, *PLoS One* 8 (2013), e55724.
- M. Bug, H. Meyer, Expanding into new markets-VCP/p97 in endocytosis and autophagy, *J. Struct. Biol.* 179 (2012) 78–82.
- K. Ramadan, S. Halder, K. Wiseman, B. Vaz, Strategic role of the ubiquitin-dependent segregase p97 (VCP or Cdc48) in DNA replication, *Chromosoma* 1-16 (2016).
- R.E. Watkinson, J.C. Tam, M.J. Vaysburd, L.C. James, Simultaneous neutralization and innate immune detection of a replicating virus by TRIM21, *J. Virol.* 87 (2013) 7309–7313.
- B. Vaz, S. Halder, K. Ramadan, Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability, *Front. Genet.* 4 (2013) 60.
- C. Hirsch, R. Gauss, S.C. Horn, O. Neuber, T. Sommer, The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum, *Nature* 458 (2009) 453–460.
- J.M. Heo, N. Livnat-Levanon, E.B. Taylor, K.T. Jones, N. Dephoure, J. Ring, J. Xie, J.L. Brodsky, F. Madeo, S.P. Gygi, K. Ashrafi, M.H. Glickman, J. Rutter, A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation, *Mol. Cell* 40 (2010) 465–480.
- E.B. Taylor, J. Rutter, Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system, *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011) 1509–1513.
- F. Hauler, D.L. Mallery, W.A. McEwan, S.R. Bidgood, L.C. James, AAA ATPase p97/VCP is essential for TRIM21-mediated virus neutralization, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 19733–19738.
- A.L. Ackerman, A. Giodini, P. Cresswell, A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells, *Immunity* 25 (2006) 607–617.
- V. Dasari, S. Rehan, S. Tey, M.J. Smyth, C. Smith, R. Khanna, Autophagy and proteasome interconnect to coordinate cross-presentation through MHC class I pathway in B cells, *Immunol. Cell Biol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2016.59> in press.
- H. Byun, N. Halani, J.A. Mertz, A.F. Ali, M.M. Lozano, J.P. Dudley, Retroviral Rem protein requires processing by signal peptidase and retrotranslocation for nuclear function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 12287–12292.
- E.J. Wiertz, D. Tortorella, M. Bogoy, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport, H.L. Ploegh, Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction, *Nature* 384 (1996) 432–438.
- H. Byun, Y. Gou, A. Zook, M.M. Lozano, J.P. Dudley, ERAD and how viruses exploit it, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 330.
- R.J. Abujarour, S. Dalal, P.I. Hanson, R.K. Draper, p97 is in a complex with cholera toxin and influences the transport of cholera toxin and related toxins to the cytoplasm, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 15865–15871.
- M. Kothe, Y. Ye, J.S. Wagner, H.E. De Luca, E. Kern, T.A. Rapoport, W.I. Lencer, Role of p97 AAA-ATPase in the retrotranslocation of the cholera toxin A1 chain, a non-ubiquitinated substrate, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28127–28132.
- I. Dreveny, H. Kondo, K. Uchiyama, A. Shaw, X. Zhang, P.S. Freemont, Structural basis of the interaction between the AAA ATPase p97/VCP and its adaptor protein p47, *EMBO J.* 23 (2004) 1030–1039.

- [27] H.O. Yeung, P. Kloppsteck, H. Niwa, R.L. Isaacson, S. Matthews, X. Zhang, P.S. Freemont, Insights into adaptor binding to the AAA protein p97, *Biochem. Soc. Trans.* 36 (2008) 62–67.
- [28] L. Madsen, M. Seeger, C.A. Semple, R. Hartmann-Petersen, New ATPase regulators—p97 goes to the PUB, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 2380–2388.
- [29] M. Rape, T. Hoppe, I. Gorr, M. Kalocay, H. Richly, S. Jentsch, Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone, *Cell* 107 (2001) 667–677.
- [30] A. Buchberger, H. Schindelin, P. Hänzelmann, Control of p97 function by cofactor binding, *FEBS Lett.* 589 (2015) 2578–2589.
- [31] G. Alexandru, J. Graumann, G.T. Smith, N.J. Kolawa, R. Fang, R.J. Deshaies, UBXD7 binds multiple ubiquitin ligases and implicates p97 in HIF1 α turnover, *Cell* 134 (2008) 804–816.
- [32] A. Buchberger, B. Bukau, T. Sommer, Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms, *Mol. Cell* 40 (2010) 238–252.
- [33] H. Kondo, C. Rabouille, R. Newman, T.P. Levine, D. Pappin, P. Freemont, G. Warren, p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion, *Nature* 388 (1997) 75–78.
- [34] H. Meyer, C.C. Wehl, The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 3877–3883.
- [35] X. Zhang, L. Gui, X. Zhang, S.L. Bulfer, V. Sanghez, D.E. Wong, Y. Lee, L. Lehmann, J.S. Lee, P.Y. Shih, H.J. Lin, M. Iacovino, C.C. Wehl, M.R. Arkin, Y. Wang, T.F. Chou, Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E1705–E1714.
- [36] J.P. Erzberger, J.M. Berger, Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35 (2006) 93–114.
- [37] B. DeLaBarre, A.T. Brunger, Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains, *Nat. Struct. Biol.* 10 (2003) 856–863.
- [38] T. Huyton, V.E. Pye, L.C. Briggs, T.C. Flynn, F. Beuron, H. Kondo, J. Ma, X. Zhang, P.S. Freemont, The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å, *J. Struct. Biol.* 144 (2003) 337–348.
- [39] T. Ogura, A.J. Wilkinson, AAA+ superfamily ATPases: common structure—diverse function, *Genes Cells* 6 (2001) 575–597.
- [40] Q. Wang, C. Song, C.C. Li, Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300 (2003) 253–260.
- [41] V.E. Pye, I. Dreveny, L.C. Briggs, C. Sands, F. Beuron, X. Zhang, P.S. Freemont, Going through the motions: the ATPase cycle of p97, *J. Struct. Biol.* 156 (2006) 12–28.
- [42] F. Beuron, I. Dreveny, X. Yuan, V.E. Pye, C. McKeown, L.C. Briggs, M.J. Cliff, Y. Kaneko, R. Wallis, R.L. Isaacson, J.E. Ladbury, S.J. Matthews, H. Kondo, X. Zhang, P.S. Freemont, Conformational changes in the AAA ATPase p97-p47 adaptor complex, *EMBO J.* 25 (2006) 1967–1976.
- [43] S. Jentsch, S. Rumpf, Cdc48 (p97): a “molecular gearbox” in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007) 6–11.
- [44] Y. Ye, Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase, *J. Struct. Biol.* 156 (2006) 29–40.
- [45] C. Song, Q. Wang, C. Song, T.J. Rogers, Valosin-containing protein (VCP/p97) is capable of unfolding polyubiquitinated proteins through its ATPase domains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463 (2015) 453–457.
- [46] J. Aker, J.W. Borst, R. Karlova, S. de Vries, The *Arabidopsis thaliana* AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane, *J. Struct. Biol.* 156 (2006) 62–71.
- [47] S. Park, D.M. Rancour, S.Y. Bednarek, Protein domain-domain interactions and requirements for the negative regulation of Arabidopsis CDC48/p97 by the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein, PUX1, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5217–5224.
- [48] Q. Wang, C. Song, C.C. Li, Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions, *J. Struct. Biol.* 146 (2004) 44–57.
- [49] D. Barthelme, R.T. Sauer, Identification of the Cdc48-20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine, *Science* 337 (2012) 843–846.
- [50] P. Hanzelmann, H. Scindelin, Structural basis of ATP hydrolysis and intersubunit signaling in the AAA+ ATPase p97, *Structure* 24 (2016) 127–139.
- [51] S. Banerjee, A. Bartesaghi, A. Merk, P. Rao, S.L. Bulfer, Y. Yan, N. Green, B. Mroczkowski, R.J. Neitz, P. Wipf, V. Falconieri, R.J. Deshaies, J.L. Milne, D. Huryn, M. Arkin, S. Subramaniam, 2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition, *Science* 351 (2016) 871–875.
- [52] M. Noguchi, T. Takata, Y. Kimura, A. Manno, K. Murakami, M. Koike, H. Ohizumi, S. Hori, A. Kakizuka, ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionarily conserved cysteine 522 residue in Walker A motif, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41332–41341.
- [53] C. Mori-Konya, N. Kato, R. Maeda, K. Yasuda, N. Higashimae, M. Noguchi, M. Koike, Y. Kimura, H. Ohizumi, S. Hori, A. Kakizuka, p97/valosin-containing protein (VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation, *Genes Cells* 14 (2009) 483–497.
- [54] C.A. Ewens, P. Kloppsteck, A. Förster, X. Zhang, P.S. Freemont, Structural and functional implications of phosphorylation and acetylation in the regulation of the AAA+ protein p97, *Biochem. Cell Biol.* 88 (2010) 41–48.
- [55] F. Madeo, J. Schauler, H. Zischka, D. Mecke, K.-U. Fröhlich, Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p, *Mol. Biol. Cell* 9 (1998) 131–141.
- [56] S.H. Zhang, J. Liu, R. Kobayashi, N.K. Tonks, Identification of the cell cycle regulator VCP (p97/CDC48) as a substrate of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17806–17812.
- [57] C. Lavoie, E. Chevet, L. Roy, N.K. Tonks, A. Fazel, B.I. Posner, J. Paiement, J.J. Bergeron, Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 13637–13642.
- [58] T. Wang, W. Xu, M. Qin, Y. Yang, P. Bao, F. Shen, Z. Zhang, J. Xu, Pathogenic mutations in the valosin-containing protein/p97(VCP) N-domain inhibit the SUMOylation of VCP and lead to impaired stress response, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 14373–14384.
- [59] D. Barthelme, R.T. Sauer, Bipartite determinants mediate an evolutionarily conserved interaction between Cdc48 and the 20S peptidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 3327–3332.
- [60] D. Barthelme, R.T. Sauer, Origin and functional evolution of the Cdc48/p97/VCP AAA+ protein unfolding and remodeling machine, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 1861–1869.
- [61] C. Copeland, V. Woloshen, Y. Huang, X. Li, AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor, *Plant J.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/tjp.13251> In press.
- [62] M. Nagahama, Y. Hara, A. Seki, T. Yamazoe, Y. Kawate, T. Shinohara, K. Hatsuizawa, K. Tani, M. Tagaya, NVL2 is a nucleolar AAA-ATPase that interacts with ribosomal protein L5 through its nucleolar localization sequence, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 5712–5723.
- [63] N. Hiraishi, Y. Ishida, M. Nagahama, AAA-ATPase NVL2 acts on MTR4-exosome complex to dissociate the nucleolar protein WDR74, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467 (2015) 534–540.
- [64] D.M. Rancour, C.E. Dickey, S. Park, S.Y. Bednarek, Characterization of AtCDC48. Evidence for multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants, *Plant Physiol.* 130 (2002) 1241–1253.
- [65] D.M. Rancour, S. Park, S.D. Knight, S.Y. Bednarek, Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of Arabidopsis CDC48, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 54264–54274.
- [66] J. Aker, R. Hesselink, R. Engel, R. Karlova, J.W. Borst, A.J. Visser, S.C. de Vries, In vivo hexamerization and characterization of the Arabidopsis AAA ATPase CDC48A complex using forster resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy and fluorescence correlation spectroscopy, *Plant Physiol.* 145 (2007) 339–350.
- [67] C. Rosnoblet, H. Bègue, C. Blanchard, C. Pichereaux, A. Besson-Bard, S. Aimé, D. Wendehenne, Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogem-induced immune response in tobacco, *Plant Cell Environ.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12686> In press.
- [68] J. Astier, A. Besson-Bard, O. Lamotte, J. Bertoldo, S. Bourque, H. Terenzi, D. Wendehenne, Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogem signaling in tobacco cells, *Biochem. J.* 447 (2012) 249–260.
- [69] O. Lamotte, J.B. Bertoldo, A. Besson-Bard, C. Rosnoblet, S. Aimé, S. Hichami, H. Terenzi, D. Wendehenne, Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants, *Front. Chem.* 2 (2015) 114.
- [70] P. Magnaghi, R. D'Alessio, B. Valsasina, N. Avanzi, S. Rizzi, D. Asa, F. Gasparri, L. Cozzi, U. Cucchi, C. Orrenius, P. Polucci, D. Ballinari, C. Perrera, A. Leone, G. Cervi, E. Casale, Y. Xiao, C. Wong, D.J. Anderson, A. Galvani, D. Donati, T. O'Brien, P.K. Jackson, A. Isacchi, Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death, *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 548–556.
- [71] C. Lindermayr, G. Saalbach, J. Durner, Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 137 (2005) 921–930.
- [72] A. Fares, M. Rossignol, J.B. Peltier, Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416 (2011) 331–336.
- [73] J. Hu, X. Huang, L. Chen, X. Sun, C. Lu, L. Zhang, Y. Wang, J. Zuo, Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously S-nitrosylated proteins in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 167 (2015) 1731–1746.
- [74] M. Chaki, A. Shekariesfahlan, A. Ageeva, A. Mengel, C. von Toerne, J. Durner, C. Lindermayr, Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated *Arabidopsis thaliana* cell cultures, *Plant Sci.* 238 (2015) 115–126.
- [75] I.M. Rienties, J. Vink, J.W. Borst, E. Russinova, S.C. de Vries, The Arabidopsis SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14lambda and the PP2C phosphatase KAPP, *Planta* 221 (2005) 394–405.
- [76] A.M. Jones, D. MacLean, D.J. Studholme, A. Serna-Sanz, E. Andreasson, J.P. Rathjen, S.C. Peck, Phosphoproteomic analysis of nuclei-enriched fractions from *Arabidopsis thaliana*, *J. Proteome* 72 (2009) 439–451.
- [77] H.S. Feiler, T. Desprez, V. Santoni, J. Kronenberger, M. Caboche, J. Traas, The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells, *EMBO J.* 14 (1995) 5626–5637.
- [78] J.L. Gallois, J. Drouaud, A. Lécureuil, A. Guyon-Debast, S. Bonhomme, P. Guerche, Functional characterization of the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein AtPUX7 in *Arabidopsis thaliana*, *Gene* 526 (2013) 299–308.
- [79] R.S. Marshall, N.A. Jolliffe, A. Ceriotti, C.J. Snowden, J.M. Lord, L. Frigerio, L.M. Roberts, The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 15869–15877.
- [80] J. Müller, P. Piffanelli, A. Devoto, M. Miklis, C. Elliott, B. Ortmann, P. Schulze-Lefert, R. Panstruga, Conserved ERAD-like quality control of a plant polytopic membrane protein, *Plant Cell* 17 (2005) 149–163.
- [81] S. Park, D.M. Rancour, S.Y. Bednarek, In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation, *Plant Physiol.* 148 (2008) 246–258.
- [82] K. ACS, M.S. Luijsterburg, L. Ackermann, F.A. Salomons, T. Hoppe, N.P. Dantuma, The AAA-ATPase VCP/p97 promotes 53BP1 recruitment by removing L3MBTL1 from DNA double-strand breaks, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12 (2011) 1345–1350.
- [83] M. Meerang, R. Ritz, S. Paliwal, Z. Garajova, M. Bosshard, N. Mailand, P. Janscak, U. Hübscher, H. Meyer, K. Ramadan, The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 1376–1382.
- [84] M.-R. Puumalainen, D. Lessel, P. Rütthemann, N. Kaczmarek, K. Bachmann, K. Ramadan, H. Naegeli, Chromatin retention of DNA damage sensors DDB2 and XPC through loss of p97 segregase causes genotoxicity, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3695.

- [85] A. Franz, L. Ackermann, T. Hoppe, Ring of change: CDC48/p97 drives protein dynamics at chromatin, *Front. Genet.* 7 (2016) 73.
- [86] F. Madeo, E. Fröhlich, K.U. Fröhlich, A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis, *J. Cell Biol.* 139 (1997) 729–734.
- [87] J.M. Müller, K. Deinhardt, I. Rosewell, G. Warren, D.T. Shima, Targeted deletion of p97 (VCP/CDC48) in mouse results in early embryonic lethality, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354 (2007) 459–465.
- [88] S. Imamura, T. Yabu, M. Yamashita, Protective role of cell division cycle 48 (CDC48) protein against neurodegeneration via ubiquitin-proteasome system dysfunction during zebrafish development, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23047–23056.
- [89] H. Bae, S.M. Choi, S.W. Yang, H.S. Pai, W.T. Kim, Suppression of the ER-localized AAA ATPase NgCDC48 inhibits tobacco growth and development, *Mol. Cell* 28 (2009) 57–65.
- [90] Z. Mérai, N. Chumak, M. García-Aguilar, T.F. Hsieh, T. Nishimura, V.K. Schoft, J. Bindics, L. Slusarz, S. Arnoux, S. Opravil, K. Mechtler, D. Zilberman, R.L. Fischer, H. Tamaru, The AAA-ATPase molecular chaperone Cdc48/p97 disassembles sumoylated centromeres, decondenses heterochromatin, and activates ribosomal RNA genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 16166–16171.
- [91] R. Verma, R.S. Oania, N.J. Kolawa, R.J. Deshaies, Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome, *eLife* 2 (2013), e00308.
- [92] E. Bosis, D. Salomon, O. Ohayon, G. Sivan, S. Bar-Nun, E. Rabinovich, Ssz1 restores endoplasmic reticulum-associated protein degradation in cells expressing defective cdc48-ufd1-npl4 complex by upregulating cdc48, *Genetics* 184 (2010) 695–706.
- [93] A. Stein, A. Ruggiano, P. Carvalho, T.A. Rapoport, Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components, *Cell* 158 (2014) 1375–1388.
- [94] J. Aker, S.C. de Vries, Plasma membrane receptor complexes, *Plant Physiol.* 147 (2008) 1560–1564.
- [95] S.A. Saracco, M. Hansson, M. Scalf, J.M. Walker, L.M. Smith, R.D. Vierstra, Tandem affinity purification and mass spectrometric analysis of ubiquitylated proteins in *Arabidopsis*, *Plant J.* 59 (2009) 344–358.
- [96] C.C. Yu, J.C. Yang, Y.C. Chang, J.G. Chuang, C.W. Lin, M.S. Wu, L.P. Chow, VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells, *PLoS One* 8 (2013), e55724.
- [97] N.S. Coll, P. Epple, J.L. Dangl, Programmed cell death in the plant immune system, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 1247–1256.
- [98] A. Kachroo, G.P. Robin, Systemic signaling during plant defense, *Curr. Opin. Plant Biol.* 16 (2013) 527–533.
- [99] X. Meng, S. Zhang, MAPK cascades in plant disease resistance signaling, *Annu. Rev. Phytopathol.* 51 (2013) 245–266.
- [100] D. Wendehenne, Q.M. Gao, A. Kachroo, P. Kachroo, Free radical-mediated systemic immunity in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 20 (2014) 127–134.
- [101] H. Hu, L. Xiong, Y. Yang, Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection, *Planta* 222 (2005) 107–117.
- [102] D. Chandran, Y.C. Tai, G. Hather, J. Dewdney, C. Denoux, D.G. Burgess, F.M. Ausubel, T.P. Speed, M.C. Wildermuth, Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted processes and regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 149 (2009) 1435–1451.
- [103] A. Niehl, K. Amari, D. Gereige, K. Brandner, Y. Mély, M. Heinlein, Control of tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48, *Plant Physiol.* 160 (2012) 2093–2108.
- [104] A. Niehl, K. Amari, M. Heinlein, CDC48 function during TMV infection: regulation of virus movement and replication by degradation? *Plant Signal. Behav.* 8 (2013), e22865.
- [105] A. Garcia-Brugger, O. Lamotte, E. Vandelle, S. Bourque, D. Lecourieux, B. Poinssot, D. Wendehenne, A. Pugin, Early signaling events induced by elicitors of plant defenses, *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19 (2006) 711–724.
- [106] D. Wendehenne, O. Lamotte, J.M. Frachisse, H. Barbier-Brygoo, A. Pugin, Nitrate efflux is an essential component of the cryptogin signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco, *Plant Cell* 14 (2002) 1937–1951.
- [107] F.A. Hoeberichts, C. Davoine, M. Vandorpe, S. Morsa, B. Ksas, C. Stassen, C. Triantaphyllidès, F. Van Breusegem, Cryptogin-induced transcriptional reprogramming in tobacco is light dependent, *Plant Physiol.* 163 (2013) 263–275.
- [108] A. Kulik, E. Noiro, V. Grandperret, S. Bourque, J. Fromentin, P. Salloignon, ... D. Wendehenne, Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogin signaling, *Plant Cell Environ.* 38 (2015) 331–348.
- [109] M. Trujillo, K. Shirasu, Ubiquitination in plant immunity, *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (2010) 402–408.
- [110] A.-S. Dielen, S. Badaoui, T. Candresse, S. German-Retana, The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game, *Mol. Plant Pathol.* 11 (2010) 293–308.
- [111] D. Marino, N. Peeters, S. Rivas, Ubiquitination during plant immune signaling, *Plant Physiol.* 160 (2012) 15–27.
- [112] T. Spallek, S. Robatzek, V. Göhre, How microbes utilize host ubiquitination, *Cell. Microbiol.* 11 (2009) 1425–1434.
- [113] C. Alcáide-Loridan, I. Jupin, Ubiquitin and plant viruses, let's play together! *Plant Physiol.* 160 (2012) 72–82.
- [114] R. Ranjusevic, R.B. Abramovitch, G.B. Martin, C.E. Stebbins, A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase, *Science* 311 (2006) 222–226.
- [115] M.J. Banfield, Perturbation of host ubiquitin systems by plant pathogen/pest effector proteins, *Cell. Microbiol.* 17 (2015) 18–25.
- [116] C. Rosnoblet, S. Bourque, V. Nicolas-Francès, O. Lamotte, A. Besson-Bard, S. Jeandroz, D. Wendehenne, Emerging Functions of Nitric Oxide in Plant Immunity, in: L. Lamattina, C. García-Mata (Eds.), *Gasotransmitters in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling*, Springer, 2016.
- [117] R.J. Braun, H. Zischka, Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1783 (2008) 1418–1435.
- [118] H. Higashiyama, F. Hirose, M. Yamaguchi, Y.H. Inoue, N. Fujikake, A. Matsukage, A. Kakizuka, Identification of ter94, drosophila VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration, *Cell Death Differ.* 9 (2002) 264–273.
- [119] R.V. Rao, H.M. Ellerby, D.E. Bredesen, Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 372–380.
- [120] R.V. Rao, K.S. Poksay, S. Castro-Obregon, B. Schilling, R.H. Row, G. del Rio, B.W. Gibson, D.E. Bredesen, Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 177–187.
- [121] S. Lorrain, F. Vaillieu, C. Balagué, D. Roby, Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci.* 8 (2003) 263–271.
- [122] S. Bourque, A. Dutartre, V. Hammoudi, S. Blanc, J. Dahan, J. Jeandroz, C. Pichereaux, M. Rossignol, D. Wendehenne, Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants, *New Phytol.* 192 (2011) 127–139.
- [123] V. Grandperret, V. Nicolas-Francès, D. Wendehenne, S. Bourque, Type-II histone deacetylases: elusive plant nuclear signal transducers, *Plant Cell Environ.* 37 (2015) 1259–1269.
- [124] W.Y. Lee, J.K. Hong, C.Y. Kim, H.J. Chun, H.C. Park, J.C. Kim, D.-J. Yun, W.S. Chung, S.-H. Lee, S.Y. Lee, M.J. Cho, C.O. Lim, Over-expressed rice ADP-ribosylation factor 1 (RARF1) induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tobacco plants, *Physiol. Plant.* 119 (2003) 573–581.
- [125] B. Coemans, Y. Takahashi, T. Berberich, A. Ito, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, S. Tsuda, S. Kamoun, L. Sági, R. Swennen, R. Terauchi, High-throughput in planta expression screening identifies an ADP-ribosylation factor (ARF1) involved in non-host resistance and R gene-mediated resistance, *Mol. Plant Pathol.* 9 (2008) 25–36.

4. Objectifs de la thèse

L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'implication de CDC48 dans l'immunité des plantes en utilisant le modèle cryptogéine/tabac. Pour ce faire, deux stratégies ont été menées. La première a consisté à analyser la dynamique d'expression de CDC48 ainsi que des événements intracellulaires sous-jacents à la mise en place de la réponse immunitaire entre une lignée cellulaire de tabac sauvage et une lignée surexprimant la protéine recombinante CDC48-TAP. La seconde stratégie a été d'établir une liste des protéines interagissant avec CDC48 puis d'étudier plus précisément l'un de ses partenaires, la protéine cAPX. Enfin, une analyse bio-informatique de la liste de partenaires de CDC48 a été conduite afin d'établir le réseau d'interaction protéine-protéine de CDC48 chez *Arabidopsis thaliana*.

Matériels et méthodes

1. Cultures cellulaires

Les suspensions cellulaires de *Nicotiana tabacum cv xanthi* ont été préalablement générées à partir de cals provenant de tissus foliaires. Les suspensions cellulaires de tabac sur-exprimant la protéine CDC48 couplée en C terminal à une étiquette de purification d'affinité en tandem (CDC48-TAP) ont été générées à partir de cals de tissus foliaires agro-infiltrés par *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformés par le transgène *NtCDC48-TAP* (Rosnoble et al., 2017).

Les cultures sont maintenues sous agitation (130 rpm) et lumière ($65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) continues, en salle climatisée (25 °C). Elles sont repiquées en fin de phase exponentielle de croissance, tous les 7 jours, à raison de 7 PCV (*Packed cell volumes*) pour les cellules sauvages et 30 PCV pour les cellules CDC48-TAP dans 100 mL de milieu de culture frais. A saturation, les cellules sont diluées au demi par addition de milieu de culture frais et utilisées pour les mesures biologiques dans les 24 heures suivant la dilution.

2. Cryptogéine

La cryptogéine est produite au laboratoire par le Dr. S. Bourque selon le protocole établi par Bonnet *et al.* (1996). Elle est extraite et purifiée à partir de filtrat de culture de *Phytophthora cryptogea*. Après dosage par mesure d'absorbance à 280 nm, la cryptogéine est préparée sous forme de solution mère à une concentration de 100 μM dans de l'eau ultra pure. Pour les expériences, les cellules sont traitées à la cryptogéine à une concentration finale de 100 nM.

3. Analyse de l'abondance protéique

3.1. Extraction des protéines solubles

Un échantillonnage de 4 mL de suspension cellulaire est effectué à différent temps après traitement ou non à la cryptogéine. Les cellules sont récoltées par filtration sur des filtres de verre GF/A (Whatman) et congelées immédiatement dans de l'azote liquide. Après broyage manuel des cellules congelées, 400 μ L de tampon d'extraction (50 mM Hepes pH 7,5, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, cocktail d'inhibiteurs de protéases *EDTA free* (PIC, Roche)) sont ajoutés. Selon les expériences, le tampon d'extraction est supplémenté par 1 mM Na_2VO_3 et 50 mM de β -glycerophosphate ou 10 mM de N-éthylmaleimide (NEM). Les extraits sont incubés sur glace pendant 15 minutes puis centrifugés deux fois à 14 000 g pendant 20 minutes à 4°C. La concentration protéique du surnageant est déterminée par la méthode de Bradford (1976).

3.2. Séparation des protéines par SDS-PAGE

Une quantité de 20 μ g de protéines est dénaturée 10 minutes à 70 °C dans du bleu de charge (12 mM Tris-HCl, 10 % (v/v) glycérol, 0,02 % (m/v) SDS, 90 mM DTT, 0,025 % (m/v) bleu de bromophénol). La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8 à 15 % (m/v) suivant les expériences (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (m/v) SDS, 8 à 15 % (m/v) polyacrylamide, 0,1 % (m/v) APS (persulfate d'ammonium) et 0,1 % (v/v) TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine)) en condition dénaturante (SDS-PAGE) en petit système (8 cm x 6 cm x 1 mm, Bio-Rad), dans un tampon de migration (25 mM Tris pH 8,8; 192 mM glycine, 0,1 % (m/v) SDS). Des standards de masse molaire pré-colorés (Nippon Genetics) sont déposés en parallèle des échantillons afin de suivre la migration et d'évaluer la masse molaire apparente des protéines d'intérêt.

Afin d'étudier la potentielle phosphorylation de la protéine cAPX, la stratégie de migration retardée a été utilisée. L'utilisation d'un gel SDS-PAGE supplémenté de la molécule Phos-tag™ AAL-107 (Wako) a pour effet de ralentir la migration des protéines phosphorylées, séparant ainsi de façon distincte la forme non phosphorylée de la forme ayant subi la modification post-traductionnelle. Ainsi, un gel de polyacrylamide de 12 % (m/v) contenant en plus 50 µM de Phos-tag™ AAL-107 (Wako) et 100 µM de MnCl₂ est utilisé pour séparer les extraits protéiques. Après migration, le gel est placé dans une solution d'EDTA 1 mM pendant 10 minutes sous agitation pour chélater les ions manganèse.

3.3. Séparation des protéines en condition non dénaturantes: Native-PAGE

Une quantité de 20 µg de protéines extraite dans du tampon optimisé pour conserver les interactions protéiques, appelé tampon IP (50 mM Hepes pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM DDT, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 10 % (m/v) saccharose, 0,3 % (v/v) IGEPAL CA-630, 100 µM Na₃VO₄, 10 mM β-glycerophosphate et cocktail d'inhibiteurs de protéases *EDTA free* (PIC, Roche)) est mélangée à du bleu de charge non-dénaturant (31,25 mM Tris-HCl pH 6,8; 12,5 % (v/v) glycérol, 0,5 % (m/v) bleu de bromophénol) et déposée sur un gel à 6 % (m/v) de polyacrylamide (375 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 % (m/v) polyacrylamide, 0,1 % (m/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED). La migration est réalisée dans un tampon à 25 mM de Tris pH 8,8, 192 mM de glycine, 0,1 % (m/v) de SDS, à 4 °C.

3.4. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Les protéines séparées par SDS-PAGE ou en conditions natives sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de pore 0,2 µm (Hybon™-ECL™ nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences) par transfert liquide (Bio-Rad) dans du tampon de transfert (25 mM Tris pH 8,8, 192 mM glycine, 20 % (v/v) éthanol et 0,035 % (m/v) SDS). Le transfert est

Tableau MM.1 Liste des différents anticorps utilisés au cours de cette étude

Anticorps	Protéine cible	Dilution	Type	Fournisseur
Primaire	α -CDC48	1/1000	Polyclonal Lapin	Abcam (ab111740)
Primaire	α -ARF	1/1000	Polyclonal Lapin	Agrisera (AS08 325)
Primaire	α -MAPK phos	1/5000	Polyclonal Lapin	Cell Signaling (9101S)
Primaire	α -MAPK total	1/5000	Polyclonal Lapin	Cell Signaling (9103)
Primaire	α -cAPX	1/10000	Polyclonal Lapin	Agrisera (AS08 368)
Primaire	α -GFP	1/5000	Polyclonal Lapin	GeneTex (GTX20290)
Primaire	α -His Tag	1/1000	Monoclonal Souris	Cell Signaling (2366S)
Primaire	α -Ubiquitine	1/1000	Monoclonal Souris	Abcam (ab7254)
Primaire	α -Ubiquitine	1/1000	Polyclonal Lapin	Abcam (ab7780)
Secondaire	α -Souris	1/3000		BioRad (170-6516)
Secondaire	α -Lapin	1/20000		Agrisera (AS09 602)

effectué à voltage constant 100 V pendant 1 heure. Afin de contrôler la qualité du transfert et l'homogénéité des dépôts protéiques, la membrane est colorée par une solution de rouge Ponceau (0,1 % (m/v) Ponceau S, 5 % (v/v) acide acétique). Après décoloration dans l'eau, la membrane est saturée par incubation sous agitation douce dans un tampon TBS (*Tris Buffered Saline*)-Tween (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) (TBST) contenant 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA) (TBST BSA) soit 1 h à température ambiante, soit à 4 °C sur la nuit.

3.5. Immuno-détection des protéines

Après saturation, la membrane de nitrocellulose est incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt, utilisé à la concentration précisée dans le **Tableau MM.1** et dilué dans du TBST BSA. Après 2 lavages de 10 minutes dans du TBST, la membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (*Horseshoe Peroxidase*) adéquat à la concentration requise (**Tab. MM.1**). Notons que pour les immuno-détections faisant suite aux immuno-précipitations (IP) l'anticorps secondaire est remplacé par une protéine A couplée à la HRP (1/2000, Abcam ab7456) dans du TBST BSA. En effet, la protéine A ne reconnaissant que très peu des anticorps dénaturés sur gel SDS-PAGE, seul l'anticorps primaire utilisé dans le Western blot est reconnu par la protéine A, mais pas l'anticorps utilisé dans l'IP ayant migré sur gel. Cette stratégie limite ainsi considérablement les signaux parasites des chaînes lourdes et légères de l'anticorps utilisé en IP. Après 3 nouveaux lavages de 10 minutes dans le TBST 0,1 %, la présence de la protéine d'intérêt est révélée sur films autoradiographiques par l'utilisation du kit Lumiglo® (Cell Signaling).

4. Analyse de l'accumulation de transcrits

4.1. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADN complémentaires (ADNc)

Les ARN sont extraits en utilisant le TRIzol® (Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. Du TRIzol est ajouté aux échantillons congelés et broyés à raison de 500 µL pour 100 mg de matériel biologique. Cinquante µL de 1-bromo-3-chloropropane est ensuite additionné aux échantillons. La phase aqueuse est récupérée après 15 min de centrifugation à 11 200 g à 4 °C puis les ARN sont précipités avec 250 µL d'isopropanol. Après une seconde centrifugation de 10 min à 11 200 g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot d'ARN lavé avec 500 µL d'éthanol 75 % (v/v). Les échantillons sont de nouveau centrifugés (5 min, 11 200 g, 4 °C) puis le surnageant est éliminé et le culot séché. Les ARN sont ensuite élués dans de l'eau exempte de nucléases. Après 10 min d'incubation à 65 °C, les échantillons sont placés 1 h à - 20°C. Une dernière centrifugation est réalisée (10 min, 11 200 g, 4 °C) et le surnageant, contenant les ARN, est transvasé dans un tube stérile. Les ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie UV à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Fischer). L'intégrité de 500 ng d'ARN est finalement vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (m/v).

Les ADNc sont synthétisés à partir de 500 ng d'ARN totaux à l'aide de la *reverse* transcriptase M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, DyNAmo cDNA synthesis kit, ThermoFischer). Le volume réactionnel final de 10 µL comprend 5 µL de 2 x *RT Buffer*, 0.5 µL d'*Oligo(dT)₁₅ primer* (50 ng), 1µL de M-MuLV RNase H⁺ transcriptase et 500 ng d'ARN totaux. La synthèse d'ADNc est effectuée par incubation 10 minutes à 25°C, puis 60 minutes à 37°C et enfin 5 minutes à 85°C.

4.2. Analyse de l'accumulation de transcrits par PCR quantitative en temps réel

Les PCR quantitatives (qPCR) sont effectuées à l'aide du kit GoTaq qPCR Master Mix et de l'appareil ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Les réactions sont réalisées

Tableau MM.2 Liste des amorces utilisées pour les analyses de RT-qPCR

	Gène	Amorce sens 5' → 3'	Amorce antisens 5' → 3'
Gènes de référence	l25	CCCCTCACCACAGAGTCTGC	AAGGGTGTGTTGTCCTCAATCTT
	ef-1	TGAGATGCACCACGAAGCTC	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG
Gènes étudiés	cdc48	GCACCCACAACCTTTCAAATC	GCTTTCACCTTTCTCCAGCC
	capx	GCCTTCTTTGCGGACTATGC	ACAATTCCACCAAAAAGCTTCCC
	gst-phi	GGCGATCAAAGTCCATGGTAGCCC	CCAATCCCTTAACCCAAGCTGGCC
	gst-tau	TTCAGTGGGCTCTAAAGATAAGGGCG	GGCTGCAGTTAATGTAICTCATCTC
	gsh1	GACCTTG TAGCTTATCTTGCTTCTG	TAATGTTGTCACCCTCCATTACTTT
	gsh2	ACAATATCTATGGGGAAGATGTGAA	CAAGTTCAGATATGGTTTGCTCTTT
	lox1	TTGGAGTTCAGGAGCATTCC	GAAGATGCGATCTGACTTAT
	vpe	TGGAGGCAGCGGAAAGGT	CATCCCAAGCACTCCAGGAC

dans un volume final de 15 μ L en plaques 96 puits. L'amplification PCR est accomplie selon le programme suivant: une première étape de dénaturation (95 °C, 2 min), 40 cycles composés d'une étape de dénaturation (95 °C, 15 s), d'une étape d'hybridation (60 °C, 30 s) et d'une étape d'élongation (72 °C, 30 s). Les gènes *NtL25* et *NtEF-1* sont utilisés comme gènes de référence pour normaliser les valeurs (Schmidt and Delaney, 2010). Les amorces spécifiques des différents gènes utilisées sont listées dans le **Tableau MM.2**. Les niveaux d'expression sont calculés en suivant la formule suivante: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, où:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Condition}} - \Delta Ct_{\text{calibrateur}}$$

avec

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

5. Clonage des gènes et constructions

Au sein du laboratoire, le système de clonage Gateway® (Thermo Fischer Scientific) est utilisé afin de simplifier le transfert d'une séquence codante d'un vecteur d'entrée, ou donneur, à n'importe quel autre vecteur d'expression. Lors de mon arrivée au laboratoire, différentes constructions étaient déjà disponibles. Celles-ci incluent la séquence codante CDC48 sans codon Stop clonée dans le vecteur d'entrée pDONR 221 (Thermo Fischer Scientific) qui permet de cloner CDC48 avec une étiquette fusionnée en position C-terminale, mais aussi CDC48 avec son codon stop cloné dans le vecteur d'entrée pENTR/TOPO (Thermo Fischer Scientific) permettant cette fois-ci d'ajouter une étiquette en position N-terminale. De plus, le laboratoire avait également cloné CDC48 dans le plasmide pH7WGF2 (Nter-GFP tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgique) permettant l'expression de CDC48 avec une étiquette GFP en position C terminale (CDC48-GFP) *in planta*, ainsi que dans le plasmide pHGWA (Nter-His tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium) afin de produire la protéine recombinante CDC48 fusionnée à une étiquette poly-histidine en position N terminal (His-CDC48).

Concernant cAPX, à partir d'ADNc de cellules de tabac non traitées à la cryptogéine, l'ADNc correspondant a été amplifié par réaction de recombinaison BP avec et sans son codon Stop dans le vecteur d'entrée pDONR 221 grâce aux amorces suivantes:

APX-STOP sens	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGTAAGTGCTATCCCACTG-3'
APX- noSTOP sens	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGACTGCCATGGGTAAGTGCTATCCCACTG-3'
APX- noSTOP antisens	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGCTTCAGCAAATCCCAATTC-3'
APX-STOP antisens	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGCTTCAGCAAATCCCAATTC-3'

L'ADNc codant la protéine APX a pu ensuite être cloné par réaction de recombinaison LR dans les vecteurs nécessaires aux différentes expérimentations.

Pour l'expérience de BiFC: cAPX et CDC48 ont été clonés dans les vecteurs de destination p35S-SCYNE(R)^{GW} et p35S-^{GW}SCYNE (Gehl et al., 2009) qui permettent de fusionner le fragment N-terminal de la CFP respectivement en position N-terminale et C-terminale de la protéine partenaire étudiée et les vecteurs de destination p35S-SCYCE(R)^{GW} et p35S-^{GW}SCYCE qui fusionnent le fragment C-terminal de la CFP respectivement en position N-terminale et C-terminale-de la protéine partenaire étudiée.

Pour l'expérience de FRET-FLIM: cAPX a été clonée dans le vecteur pH7YWG2 (Cter-YFP, Yellow Fluorescent Protein tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium) afin de fusionner en partie C-terminale la protéine YFP. CDC48 a été cloné dans le vecteur pH7WGC2 (Nter-CFP, Cyan Fluorescent Protein tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium) afin de fusionner en partie N-terminale la protéine CFP.

Pour l'expérience de mesure d'activité APX *in vitro*: la séquence codant pour la protéine cAPX a été clonée dans le vecteur d'expression pHGWA (Nter-His tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium) permettant la synthèse de la protéine recombinante His-cAPX.

6. Confirmation d'interaction entre CDC48 et ses partenaires

6.1. Approche biochimique

6.1.1. Extraction des protéines

Afin de confirmer les interactions entre CDC48 et ses partenaires, le matériel biologique (feuilles ou cellules) est broyé finement dans de l'azote liquide et les protéines totales sont extraites dans le tampon IP (50 mM Hepes pH 7,4; 100 mM NaCl, 1 mM DDT, 4 mM EDTA, 4 mM EGTA, 10 % (m/v) saccharose, 0,3 % (v/v) IGEPAL CA-630, 100 μ M Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate et cocktail d'inhibiteurs de protéases *EDTA free* (PIC, Roche)). Après homogénéisation, les échantillons sont placés 15 minutes sur glace puis centrifugés deux fois à 20 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Enfin, un dosage de Bradford est réalisé sur le surnageant afin de déterminer la concentration protéique.

6.1.2. Pull-down

Préalablement au laboratoire, CDC48 et certains de ses partenaires, dont la protéine ARF, ont été produits de manière recombinantes fusionnées à une étiquette Histidine, puis purifiées et enfin fixées sur des billes Ni-NTA (GE Healthcare). Ces billes couplées aux différentes protéines recombinantes sont conservées à 4°C à hauteur de 5 % (v/v) dans du tampon de stockage (50 mM Tris HCl pH 7,4; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA et cocktail d'inhibiteurs de protéases *EDTA free* (PIC, Roche)).

Les expériences de pulldown sont réalisées sur des extraits protéiques issus de feuille de tabac exprimant de façon transitoire la protéine GFP-CDC48 5 jours après agro-infiltration (voir section 6.2.1) ou sur des extraits issus de suspensions cellulaires de tabac sauvage. Après extraction protéique dans le tampon IP et dosage, 500 μ g de protéines sont incubés 45 minutes à 4 °C sous agitation, avec 20 μ L de billes Ni-NTA non couplées à une protéine recombinante.

Cette étape permet de dépléter l'échantillon en protéines interagissant de façon aspécifique avec les billes. Après centrifugation à 500 g pendant 5 minutes, le surnageant est récupéré puis incubé durant la nuit à 4 °C sous agitation, avec 20 µL de billes 5 % (v/v) His-ARF, His-CDC48 ou de billes non couplées. Après 5 lavages au tampon IP (1 mL) à 500 g pendant 5 minutes, les protéines cellulaires retenues par les protéines recombinantes fixées sur billes sont éluées dans 30 µL le bleu de charge 2 x pendant 3 minutes à 100 °C, puis déposées sur gel SDS-PAGE. La présence des différentes protéines d'intérêt est révélée par immuno-détection.

6.1.3. Co-Immunoprécipitation

Les expériences de co-immunoprecipitation sont réalisées sur des extraits protéiques issus de suspensions cellulaires de tabac sauvage ou surexprimant la protéine CDC48-TAP. Après extraction protéique dans le tampon IP et dosage, 1 mg de protéines est incubé 3 heures à 4 °C sous agitation avec 25 µL de billes magnétiques *Protein A Mag Sepharose* (GE Healthcare) et 1,5 µg d'anticorps dirigé contre la protéine cible. Après plusieurs lavages avec le tampon IP, 5 minutes à 500 g, les protéines co-immunoprécipitées sont éluées dans 30 µL de bleu de charge 2 x pendant 10 minutes à 70 °C. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel SDS-PAGE. La présence des différentes protéines est révélée par immuno-détection.

6.2. Approche cellulaire

6.2.1. Agro infiltration des partenaires

6.2.1.1. Transformation de la souche *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

La visualisation de l'interaction entre CDC48 et cAPX par microscopie nécessite de d'exprimer les différents partenaires dans une feuille d'un plant de tabac. La méthode utilisée est l'agro-infiltration. La souche *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 est transformée par choc thermique avec les différentes constructions. Pour ce faire, 2 µg de plasmide sont mis en contact de 250

μL de bactéries et l'ensemble est laissé sur glace pendant au moins 5 minutes. Les bactéries sont ensuite placées 5 minutes dans l'azote liquide, rapidement transférées dans un bain marie à 37 °C pendant 5 minutes et enfin placées sur glace. Après avoir ajouté 1 mL de milieu LB (Luria-Bertani) sous hotte, les bactéries sont agitées 3 heures à 28 °C.

6.2.1.2. Culture des *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformés

Les bactéries sont ensuite centrifugées à 4 000 g pendant 5 minutes et le culot repris dans 50 μL de LB est étalé sur boîte de pétri avec les antibiotiques appropriés, à savoir la gentamycine (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), qui permet de maintien du plasmide Ti désarmé, la rifampicine (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), dont la résistance est portée par la souche d'*Agrobacterium*, la spectinomycine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) qui sélectionne les plasmides nécessaires au FRET-FLIM, ou la kanamycine (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pour la sélection des plasmides nécessaires au BiFC. Les boîtes sont placées à l'étuve pendant 48 heures à 28 °C, puis une unité formant colonies est placée 24 heures à 28 °C sous agitation dans 3 mL de LB supplémentés des antibiotiques adéquats. De nouveaux, 100 μL de la pré-culture sont placés 24 heures à 28 °C sous agitation dans 10 mL de LB supplémentés en antibiotiques et d'acétosyringone à 20 μM . Ce composé phénolique induit l'expression de gènes de virulence chez la bactérie, augmentant ainsi l'efficacité de l'infiltration. Enfin, après centrifugation à 3 500 g pendant 15 minutes, le culot est suspendu dans du tampon 10 mM Mes, 10 mM MgCl_2 , 100 μM acétosyringone jusqu'à obtenir une densité optique à 600 nm égale 1. Les bactéries sont alors incubées 4 heures à température ambiante et l'infiltration des *Agrobacterium* sur la face inférieure des feuilles de tabac est réalisée à l'aide d'une seringue. Deux jours après agro-infiltration l'expression des différentes constructions est vérifiée par microscopie à épifluorescence (Leica, Nanterre, France). Les expériences de FRET-FLIM ou de BiFC sont effectuées 4 jours après agro-infiltration.

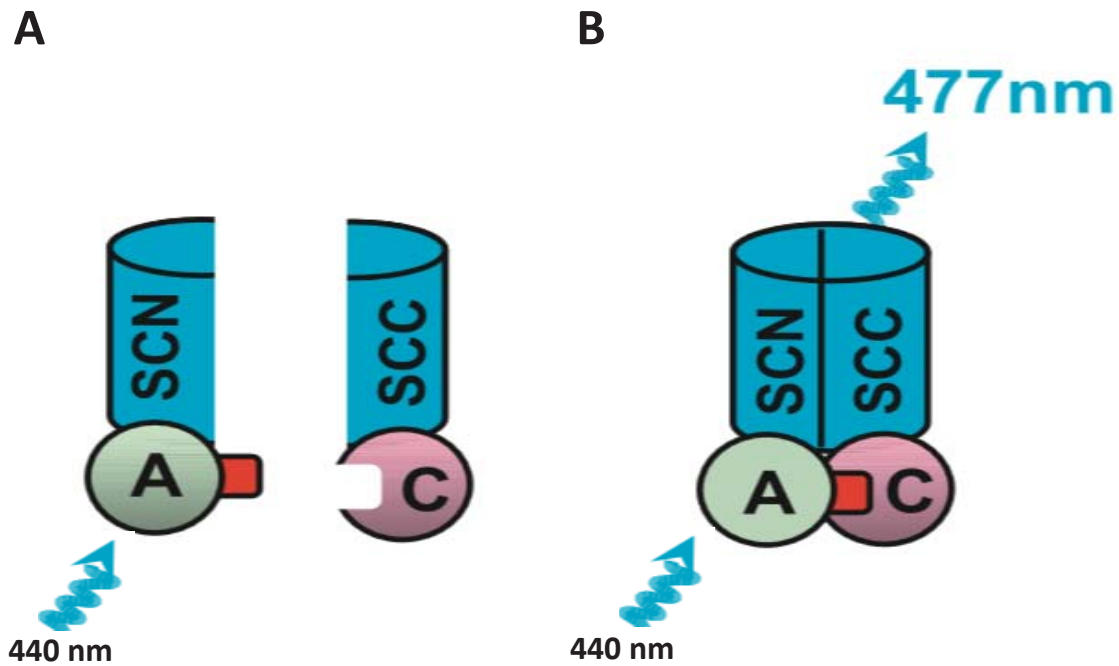


Figure MM1 Principe de la *Bimolecular Fluorescent Complementation* (BiFC). Deux protéines (A et C) sont fusionnées à la moitié N-terminale du fluorophore CFP (SCN) ou la moitié C-terminale du fluorophore CFP (SCC). A) Sans interactions entre les protéines A et C, le fluorophore ne peut se reconstituer, aucune fluorescence n'est mesurée. B) Grâce à l'interaction entre A et C, les moitiés de fluorophore sont assez proches pour qu'il se reconstitue, un signal de fluorescence est détectable après excitation à 440 nm. D'après Gehl *et al.*, 2009.

Tableau MM.3 Liste des constructions disponibles et différentes combinaisons utilisées en microscopie à épifluorescence

Construction		Combinaisons
APX-SCC	CDC48-SCC	APX-SCC + CDC48-SCN ou SCN-CDC48
APX-SCN	CDC48-SCN	SCC-APX + CDC48-SCN ou SCN-CDC48
SCC-APX	SCC-CDC48	APX-SCN + CDC48-SCC ou SCC-CDC48
SCN-APX	SCN-CDC48	SCN-APX + CDC48-SCC ou SCC-CDC48

6.2.2. BiFC: *Bimolecular fluorescence complementation*

Le BiFC est une technique visant à étudier l'interaction entre deux protéines et consistant à fusionner la moitié N-terminale d'un fluorophore à un premier partenaire et la moitié C-terminale d'un fluorophore au second (**Fig. MM.1**). Si les deux protéines n'interagissent pas, après excitation du fluorophore, aucune fluorescence n'est mesurée. Si les deux protéines interagissent entre elles, les deux moitiés de fluorophore sont assez proches pour se reconstituer et un signal de fluorescence est détectable après excitation à la longueur d'onde appropriée (Gehl et al., 2009; Xing et al., 2016).

Les résultats de BiFC sont obtenus après reconstitution de la protéine CFP ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 477 \text{ nm}$) à partir de sa moitié N-terminale (SCN ; *Split CFP N-terminus*) et C-terminale (SCC ; *Split CFP C-terminus*). Les constructions disponibles et les combinaisons testées sont listées dans le **Tableau MM.3**. L'acquisition des images est faite en microscope confocale TCS SP8 (Leica) en utilisant un objectif au grossissement x 20. Après excitation par un laser argon à 488 nm, les photons de fluorescence émis par la CFP ayant une longueur d'onde comprise entre 460 et 518 nm sont récupérés par un photomultiplicateur de type hybride (HyD), alors que les photons de fluorescence émis après auto-fluorescence des chloroplastes (650-700 nm) sont récupérés par un photomultiplicateur classique.

6.2.3. FRET-FLIM: Fluorescence/Förster resonance energy transfer by fluorescence life time imaging

Le FRET-FLIM est une technique consistant à faire exprimer simultanément par une cellule un partenaire fusionné à un fluorophore dit *donneur*, et le second partenaire à un fluorophore dit *accepteur*. Le couple de fluorophores est choisi parmi ceux qui ont des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur qui se chevauchent. Si les partenaires se rapprochent d'une distance de moins de 10 nm, après excitation le donneur transfère par résonance une

partie de son énergie, non radiative, à l'accepteur (FRET). Ce transfert a pour conséquence de faire diminuer le temps de vie (τ) de fluorescence du donneur. Ainsi, lors de l'interaction entre les deux partenaires une diminution du temps de vie de fluorescence du donneur après excitation peut être mesurée (FLIM). Pour étudier les interactions entre CDC48 et cAPX, nous avons réalisé des clonages dans des plasmides permettant d'ajouter une étiquette CFP en N-terminal de CDC48 et YFP en C-terminal de cAPX (Xing et al., 2016).

Les mesures de temps de vie de fluorescence ont été effectuées sur 15 disques foliaires issus de 4 plants de tabac agro-infiltrés de façon indépendante. Les plants expriment soit la protéine CFP-CDC48 seule (donneur), soit la protéine cAPX-YFP seule (accepteur), soit les deux protéines en même temps.

Du fait de l'épaisseur des disques foliaires, l'utilisation d'un microscope bi-photonique (A1-MP *scanning microscope*, Nikon, Japon) s'est avérée nécessaire et l'excitation de la CFP a ainsi été effectuée dans l'infrarouge ($\lambda_{\text{Ex-Biphoton}}$: 820 nm). L'émission de fluorescence de la CFP est collectée en utilisant un filtre passe-bande 474-514 nm (Semrock) et le traitement des temps de vie est réalisé par le logiciel Symphotime. L'analyse du temps de vie est effectuée sur une région d'intérêt dite globale, correspondant à un champ dans sa globalité (objectif Apo IR x 60, immersion à eau, Nikon), ou sur des régions plus ciblées comme les noyaux, le cytoplasme ou les chloroplastes. La valeur de temps de vie de fluorescence est déterminée en suivant un modèle bi-exponentiel, générant deux constantes. Seule la constante la plus longue est prise en compte car elle est la plus sensible au FRET. La seconde correspond au bruit de fond dû à l'auto-fluorescence des cellules végétales. Enfin, l'efficacité de transfert d'énergie, appelée pourcentage de FRET, est donnée par l'équation suivante:

$$E = (1 - \tau_{\text{donneur}} / \tau_{\text{donneur + accepteur}}) \times 100$$

avec

E: pourcentage de FRET

τ_{donneur} : temps de vie de fluorescence du donneur seul

$\tau_{\text{donneur + accepteur}}$: temps de vie de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur

7. Mesure d'événements de signalisation cellulaire

7.1. Quantification des formes actives de l'oxygène (FAO): peroxyde d'hydrogène extracellulaire (H₂O₂)

La quantification des FAO extracellulaires est réalisée sur suspensions cellulaires de tabac. Pour les mesures, un milieu a été préalablement élaboré pour forcer les flux d'ions de part et d'autre de la membrane plasmique tout en respectant l'osmolarité (Blein et al., 1991). De plus, la concentration en ion calcium est optimisée afin de faciliter la dismutation de l'anion superoxyde. Ainsi, le milieu de culture est retiré par filtration, puis les cellules sont rincées trois fois, puis reprises dans du milieu M10 (10 mM Mes pH 5,3; 240 mM mannitol, 500 µM CaCl₂, 500 µM K₂SO₄) afin d'atteindre une densité cellulaire de 0,1 g.mL⁻¹. Pour l'expérience, 10 mL des différentes lignées cellulaires sont placés dans des erlenmeyers et équilibrés pendant 1 heure à 25 °C sous agitation. Après équilibration, les cellules sont traitées par la cryptogéine (100 nM concentration finale). Après 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 et 90 minutes, pour chaque lignée, 250 µL de cellules sont prélevées et additionnés de 50 µL de luminol à 0,3 mM et 350 µL de H50 (50 mM Hepes pH 8,5, 240 mM mannitol, 500 µM CaCl₂, 500 µM K₂SO₄). La luminescence est mesurée à l'aide d'un luminomètre (Lumat, LB9507, Berthold) et exprimée en unité relative de luminescence (URL). L'utilisation d'une gamme étalon, réalisée à partir de 250 µL de cellules non traitées et de concentrations croissantes d'H₂O₂ (solution mère à 0,882 M) permet d'exprimer la production de FAO extracellulaire en nanomoles d'H₂O₂ par grammes de cellules.

7.2. Quantification des formes actives de l'azote

La quantification de NO intracellulaire est réalisée sur suspension cellulaire de tabac. Cette quantification se base sur l'utilisation de la sonde fluorescente diacétate de 4-5-Diaminofluoresceine (DAF-2DA), perméable aux membranes. Après internalisation et

hydrolyse par des estérases intracellulaires, le DAF-2 libéré réagit avec le trioxyde de diazote (N_2O_3) dérivé de l'oxydation de NO pour former un dérivé triazole fluorescent, le DAF-2T ($\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515 \text{ nm}$) (Kojima et al., 1998). La spécificité de ce fluorophore pour le dosage de NO a été sujette à polémique (Mur et al., 2011) mais l'équipe a démontré sa fiabilité *via* la comparaison de son utilisation avec d'autres fluorophores et d'autres méthodes dont l'électrochimie (Besson-Bard et al., 2008; Rasul et al., 2012).

Ainsi, les suspensions cellulaires sont transférées dans une plaque 24 puits à raison de 1 mL par puit. La plaque agitée 1 heure à l'obscurité, puis les cellules sont incubées avec du DAF-2DA à la concentration finale de 20 μM pendant 10 minutes. La production de NO est mesurée à l'aide d'un fluorimètre lecteur de plaques (Mithras, Berthold) avec un filtre d'excitation à 485 nm et un filtre d'émission à 535 nm. La fluorescence est exprimée en unités relatives (URF).

7.3. Mesure de la mort cellulaire

Durant la mort cellulaire induite par la cryptogéine, les cellules perdent leur intégrité membranaire permettant à l'iodure de propidium (IdPr, $\lambda_{\text{ex}} = 356 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$) de s'intercaler entre les bases nucléotidiques des acides nucléiques. Les cellules mortes présentent donc un noyau fluorescent après excitation à 356 nm. L'IdPr a la particularité de s'accumuler au niveau de la membrane plasmique des cellules vivantes, qui peuvent donc être facilement délimitées et dénombrées.

Pour déterminer le taux de mort cellulaire, 3 x 200 μL de cellules sont prélevées et diluées au demi dans du milieu de culture puis 10 μL d'IdPr est ajouté pour obtenir une concentration finale de 10 μM . Pour chaque prélèvement, 30 μL de cellules sont déposées entre lame et lamelle et le comptage d'au moins 300 cellules est réalisé. Le pourcentage de mort cellulaire est calculé comme suit:

$$(\text{Nombre de cellules mortes} / \text{Nombre total de cellules}) \times 100$$

7.4. Mesure d'activités enzymatiques

7.4.1. Activité ascorbate peroxydase (EC 1.11.1.11)

7.4.1.1. Activité de la protéine recombinante His-cAPX

La protéine recombinante His-cAPX produite en bactérie et purifiée sur colonne d'affinité est stockée dans un tampon à 20 mM de phosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7,2, 1 mM EDTA, 175 mM KCl à 4 °C. L'activité ascorbate peroxydase est mesurée en suivant l'oxydation H_2O_2 -dépendante de l'ascorbate et donc la décroissance en absorbance à 290 nm sur 1 minute (Kitajima et al., 2006). L'expérience est réalisée en cuve UVette® (Eppendorf) et la lecture se fait grâce au spectrophotomètre Uvikon 860 (Kontron). En pratique, l'activité est mesurée après ajout de H_2O_2 (concentration finale de 0,25 mM) à 120 μg de protéine recombinante dans le tampon d'activité 50 mM phosphate de sodium pH 7,2, 0,01 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BSA et 0,5 mM d'ascorbate pour volume final de 1 mL.

Afin d'analyser l'impact du NO sur cAPX, son activité enzymatique est mesurée après une pré-incubation 20 minutes dans l'obscurité avec 1 mM de diméthylamine NONOate (DEA/NO) ou 500 μM de S-nitrosoglutathion (GSNO). De plus, l'activité a également été mesurée en présence de GSSG ou de GSH à 500 μM ou encore de NEM à 5 mM.

L'activité enzymatique est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire de l'ascorbate à 290 nm et déterminée à $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. L'activité est exprimée en nanomoles d'ascorbate oxydé par minute et par milligrammes de protéines.

7.4.1.2. Activité de la protéine endogène cAPX

L'activité ascorbate peroxydase totale et endogène est mesurée à partir de cellules de tabac broyées en fine poudre dans de l'azote liquide. Les protéines sont extraites dans du tampon phosphate de potassium à 100 mM, pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 1 % (m/v) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) et 0,1 mM d'acide ascorbique fraîchement préparé (Noctor et al., 2016). Après

homogénéisation et repos pendant 15 minutes sur glace, les échantillons sont centrifugés à deux reprises à 14 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Afin de mesurer uniquement l'activité endogène cytosolique d'APX, les échantillons sont extraits avec le même tampon d'extraction sans acide ascorbique, puis prétraités par 5 µM d'H₂O₂ pendant 6 minutes juste avant lecture. Cette étape permet d'inhiber irréversiblement les activités chloroplastiques d'APX (Yoshimura et al., 1998). Dans chaque échantillon, la quantité de protéines est dosée par la méthode de Bradford. L'activité ascorbate peroxydase est mesurée par spectrométrie comme indiquée paragraphe 7.4.1.1. En pratique, 20 µL d'échantillon sont mélangés à 1 mL de tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0 et 25 µL d'acide ascorbique 20 mM (soit 0,478 mM final). La lecture commence dès l'ajout de 50 µL de 5 mM d'H₂O₂ (soit 0,228 mM final). L'activité spécifique est calculée en prenant le coefficient d'extinction molaire de l'ascorbate à 2.8 mM⁻¹.cm⁻¹ et exprimée en nanomoles d'ascorbate oxydée par minutes par milligramme de protéines.

7.4.1.3. Activité *in gel* (Mittler and Zilinskas, 1993)

L'activité APX *in gel* est mesurée à partir de cellules de tabac broyées en fine poudre dans de l'azote. Les protéines sont extraites dans un tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,0; 1 mM EDTA et 5 mM d'acide ascorbique fraîchement préparé. Après homogénéisation et centrifugation à 20 000 g pendant 30 minutes, le surnageant est récupéré pour réaliser l'activité *in gel*. La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford.

Les protéines totales sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition non-dénaturante et non-réductrice. Pour ce faire, 10 µg de protéines sont mélangés dans du bleu de charge non-dénaturant (31,25 mM Tris-HCl pH 6,8; 12,5 % (v/v) glycérol, 0,5 % (m/v) Bleu de bromophenol) et déposés sur un gel de 10 % polyacrylamide (0,375 mM Tris-HCl pH 8,8; 10 % (v/v) polyacrylamide, 0,1 % (m/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED). Au préalable, le gel a été exposé à un champ électrique de 90 V pendant 30 minutes, à 4 °C, dans le tampon de migration

(25 mM Tris, 192 mM glycine, 2 mM acide ascorbique) afin de faire pénétrer le substrat à l'intérieur du gel.

Après migration, le gel PAGE en conditions natives est équilibré à température ambiante dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 contenant 2 mM d'acide ascorbique pendant 30 minutes. Le tampon d'équilibration est changé toutes les 10 minutes. Le gel est ensuite incubé 20 minutes à température ambiante avec du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 enrichi de 4 mM d'acide ascorbique et de 2 mM de H₂O₂ à l'abri de la lumière. A la fin du temps d'incubation le gel est rincé 1 minute dans du tampon à 50 mM de phosphate de sodium pH 7 avant d'être immergé dans une solution tampon à 50 mM de phosphate de sodium pH 7,8 comportant 28 mM de TEMED et 2,45 mM de Bleu de Nitro-tétrazolium (NBT; *nitroblue tetrazolium*). La mise en contact entre avec le TEMED et le NBT n'excède pas 5 minutes puis la réaction est stoppée par rinçage à l'eau distillée. Le gel peut alors ensuite être conservé dans 10 % (v/v) d'acide acétique pendant plusieurs mois.

Le TEMED joue le rôle de catalyseur dans la réduction du NBT par l'ascorbate et le produit de cette réduction est un composé de couleur violette insoluble dans le milieu. Durant l'incubation avec l'H₂O₂, cAPX oxyde l'ascorbate à proximité. Ainsi au sein de cette région du gel, le NBT ne peut plus être réduit. L'activité APX est de ce fait révélée indirectement par une bande achromatique sur un fond mauve.

7.4.2. Activité glutathion réductase (EC 1.6.4.2)

L'activité glutathion réductase (GR) est mesurée à partir de cellules de tabac broyées en fine poudre dans de l'azote. Les protéines sont extraites dans 1 mL de tampon MES/KOH 50 mM pH 6 comportant 40 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂ et 1 mM d'acide ascorbique fraîchement préparé. Après homogénéisation et centrifugation à 14 000 g pendant 10 minutes à 4°C, le

surnageant est rapidement utilisé pour la mesure d'activité. La concentration protéique des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford.

L'activité GR est déterminée en suivant l'oxydation du NADPH (Queval and Noctor, 2007), donc la diminution d'absorbance à 340 nm en plaque 96 puits UV (Greiner UV-Star® 96 well plates) en utilisant le lecteur de plaque Infinite M200 Pr (Tecan). Chaque lecture est réalisée en triplicata.

Pour ce faire, 10 µL d'échantillon est mélangé à 185 µL de tampon Hepes 50 mM pH 8,0 complété avec 0,5 mM d'EDTA et 0,25 mM de NADPH. La réaction commence dès l'ajout de 5 µL de GSSG à 20 mM pour obtenir une concentration finale de substrat à 0,5 mM. La vitesse initiale de la réaction est déterminée par la lecture d'absorbance sur 1 minute. L'activité spécifique de la GR est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire de la NADPH à 6,22 mM⁻¹cm⁻¹ et est exprimée en micromole de NADPH oxydée par minutes et par milligramme de protéines.

7.4.3. Activité glutathion S-transférase (EC 2.5.1.18)

L'activité glutathion S-transférase totale est mesurée à partir de cellules de tabac broyées en fine poudre dans de l'azote. Les protéines sont extraites dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,2 comportant 2 mM de DTT, 0,01 % (v/v) de Triton 100-X et 1 mM d'EDTA. Après centrifugation à 25 000 g pendant 30 minutes à 4 °C, le surnageant est utilisé de suite pour la mesure d'activité. La concentration protéique des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford. Avant mesure d'activité, les échantillons sont dilués 10 fois dans du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,2.

L'activité GST totale est déterminée par l'utilisation de 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma Aldrich) (Davoine et al., 2006). En effet, une grande majorité des isozymes des GST sont capables de conjuguer le glutathion au CDNB, augmentant ainsi son absorbance à 340 nm.

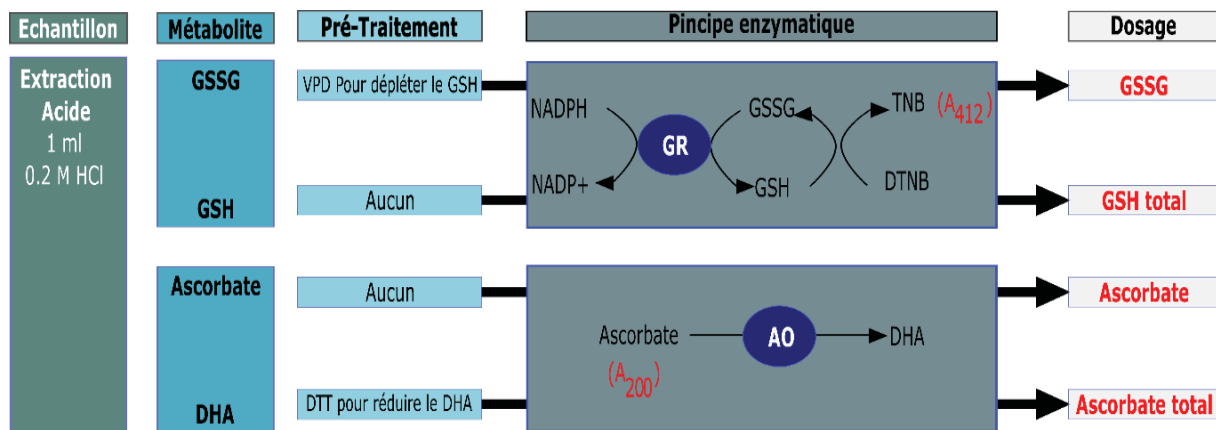


Figure MM.2 Principe des dosages de l'ascorbate, du DHA, du GSH et du GSSG. L'extraction des différents métabolites se fait à partir du même échantillon en condition acide. En fonction du métabolite, le prétraitement nécessaire est précisé. Chaque principe enzymatique ainsi que le métabolite dosé par absorbance sont spécifiés. VPD : 2-vinylpyridine ; GR : glutathion réductase ; DTNB : l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoïque) ; TNB : l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque ; AO : ascorbate oxydase. Schéma adapté de Noctor *et al.*, 2016.

La lecture d'absorbance se fait en plaque 96 puits UV (Greiner UV-Star® 96 well plates) en utilisant le lecteur de plaque Infinite M200 Pr (Tecan). Chaque lecture est réalisée en duplicata. En pratique, 10 µL d'échantillon dilué sont mélangés à 190 µL de tampon phosphate de potassium 50 mM complété par 2 mM de glutathion et 1 mM de CDNB. Le CDNB étant très peu soluble dans l'eau, une solution mère de 100 mM est préparée dans 1 mL d'éthanol. La mesure est réalisée toutes les minutes pendant 10 minutes et la partie linéaire de la cinétique est utilisée pour calculer la pente d'absorbance. L'activité spécifique est calculée à partir du coefficient d'extinction molaire du CDNB conjugué calculé à $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et en prenant en compte le coefficient de dilution. L'activité spécifique GST est ainsi exprimée en micromoles de CDNB conjugué par minutes et par microgramme de protéines.

7.5. Mesure de molécules à pouvoir anti-oxydants

La détermination de la concentration en glutathion et en ascorbate a été réalisée sur les mêmes échantillons (**Fig. MM.2**; d'après Noctor et al., 2016). Les métabolites sont extraits de 4 mL de cellules broyées en poudre dans de l'azote liquide en présence de 40 mM d'acide chlorhydrique. Après centrifugation à 16 000 g à 4 °C pendant 10 minutes, 500 µL de surnageant est repris dans 100 µL de tampon phosphate de sodium à 0,2 M pH 5,6. Le pH est ensuite ajusté entre pH 4 et 5 par ajouts successifs de 25 µL de 0,2 M de NaOH. Un dosage de Bradford est réalisé afin de déterminer la concentration protéique de chaque échantillon.

7.5.1. Ascorbate et ascorbate total

Le dosage enzymatique de l'ascorbate se fait en suivant l'oxydation de l'ascorbate endogène par une ascorbate oxydase (AO, Sigma Aldrich) exogène. La concentration d'ascorbate est déterminée en suivant la diminution de l'absorbance à 265 nm due à l'oxydation de l'ascorbate dont le produit d'oxydation n'absorbe pas à cette longueur d'onde. La lecture d'absorbance est

réalisée en plaque 96 puits UV (Greiner UV-Star® 96 well plates) et en utilisant le lecteur de plaque Infinite M200 Pr (Tecan). Chaque lecture est réalisée en triplicata.

Pour le dosage d'ascorbate, l'expérience est réalisée sur 40 µL d'échantillon dans un volume final de 200 µL complété au tampon phosphate 0,1 M pH 5,6. La réaction commence dès l'ajout de 0,2 unité AO et une première lecture est réalisée à ce moment. Un second point de lecture est réalisé 5 minutes plus tard quand la totalité de l'ascorbate est oxydée.

L'ascorbate total, correspondant à l'ascorbate réduit et à sa forme oxydée (déhydroascorbate ; DHA), est mesuré en réduisant le DHA en ascorbate par incubation de 30 minutes à température ambiante de 100 µL d'échantillon avec 140 µL de tampon phosphate de sodium 0,12 M pH 7,2 enrichi avec 25 mM de DTT. De nouveau, 40 µL de ce mélange est dosé dans un volume final de 200 µL de réaction comportant 0,2 unité AO comme précédemment décrit.

Afin de convertir le delta d'absorbance à 260 nm en quantité d'ascorbate, une droite étalon allant de 0 à 10 µmoles d'ascorbate a été réalisée dans un volume de réaction final de 200 µL comportant 0,2 unité AO dans un tampon phosphate 0,1 M pH 5,6. Ainsi la concentration en ascorbate est calculée en micromoles d'ascorbate par milligramme de protéines. Pour l'ascorbate total, un facteur de dilution de 2,5 est pris en compte dans les calculs.

7.5.2. Glutathion, glutathion total et glutathion oxydé (glutathion disulfide GSSG)

Le dosage du glutathion est basé sur la méthode de recyclage de la glutathion réductase (GR). En présence de NADPH, la GR catalyse la réduction du glutathion disulfide (GSSG) en glutathion (GSH) qui réagit avec l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoïque) (DTNB, réactif d'Ellman) formant ainsi de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB). La quantité de TNB peut être mesurée par absorbance à 412 nm. La lecture d'absorbance est réalisée en plaque 96 puits (Greiner bio-one 96 well plates) en utilisant le lecteur de plaque Infinite M200 Pr (Tecan). Chaque lecture est réalisée en triplicata.

L'enzyme est préparée juste avant les dosages dans une solution à 0,2 M de phosphate de sodium pH 7,5 et 10 mM d'EDTA afin d'obtenir une solution mère de GR à 20 U.mL⁻¹.

Le glutathion total (GSH + GSSG) est mesuré en incubant 10 µL d'échantillon dans 0,1 M de tampon sodium phosphate pH 7,5 comportant 0,6 mM de DTNB (Sigma Aldrich) et 0,015 unité de GR. Après addition de 0,5 mM de NADPH, l'absorbance à 412 nm est mesurée toutes les minutes pendant 6 minutes. La quantité de glutathion total est déterminée en réalisant une droite étalon allant de 0 à 1,2 nmoles de glutathion. La quantité de glutathion total est ainsi exprimée en nanomoles de glutathion par milligramme de protéine.

Le dosage de glutathion oxydé (GSSG) nécessite un prétraitement de l'échantillon avec du 2-vinylpyridine (VPD, Sigma Aldrich). En effet, le VPD précipite le glutathion réduit, déplaçant ainsi l'échantillon de GSH. Pour cela, 200 µL d'échantillon sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante avec 2 µL de VPD à 2 % (v/v). Après deux centrifugations de 16 000 g pendant 20 minutes, 20 µL du surnageant est utilisé pour doser le GSSG par la méthode décrite au-dessus. La quantité de GSSG dans l'échantillon est déterminée en réalisant une droite étalon entre 0 et 100 pmoles de GSSG. Notons que les solutions mères ayant servi à la réalisation de la gamme étalon ont été elles aussi prétraitées par du VPD. La quantité de glutathion oxydé est ainsi exprimée en nanomoles de GSSG par milligramme de protéines.

La quantité de glutathion libre est déterminée par la formule suivante:

$$\text{GSH} = \text{GSH}_{\text{total}} - 2 \times \text{GSSH}$$

7.6. Détermination de la peroxydation des lipides: dosage de Malondialdehyde (MDA)

La quantité de MDA est dosée à partir de cellules de tabac broyées en fine poudre dans l'azote suivant le protocole modifié de Islam et al., 2009. Le MDA a été extrait dans 1 mL d'acide trichloroacétique (TCA) 5 % (v/v). Après homogénéisation, les échantillons sont centrifugés à

12 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. La concentration protéique est déterminée par la méthode de Bradford sur 10 µL d'échantillons.

Le dosage est basé sur la condensation du MDA à l'acide 2-thiobarbiturique (TBA, Sigma Aldrich) à haute température. Le produit condensé absorbe à 532 nm et peut être dosé par spectrophotométrie. Expérimentalement, 1 mL de surnageant est mélangé à 1 mL de TCA à 20 % (v/v) et de TBA à 0,5 % (m/v), puis incubé à 95 °C pendant 25 minutes. Les tubes sont ensuite placés sur la glace pour stopper la réaction. De nouveau, les tubes sont centrifugés à 7 500 g pendant 5 minutes et la mesure d'absorbance est réalisée sur 1 mL de surnageant grâce au spectrophotomètre Uvikon 860 (Kontron). Ainsi, la quantité de MDA est calculée en mesurant l'absorbance à 532 nm, à laquelle est retranchée la valeur d'absorbance à 600 nm qui prend en compte les absorbances aspécifiques et en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 155 mM⁻¹.cm⁻¹. La quantité de MDA est exprimée en micromoles de MDA par milligramme de protéines.

8. Analyse bio-informatique de l'interactome de CDC48

L'ensemble de cette analyse a été réalisée grâce aux langages de programmation Python (v 3.7.0) et R (V 3.5.0) (Bassi, 2007; R Core Team, 2016) .

8.1. Etablissement de la liste d'interactants de CDC48

8.1.1. Liste d'interactants de CDC48 chez *Arabidopsis thaliana*

La liste des interactants de CDC48 chez *A. thaliana* a été établie à partir des protéines issues des peptides identifiés en MS dans la banque de données *Viridiplantae* par Carole Pichereaux (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale – CNRS, Université de Toulouse) (Rosnoblet et al., 2017 ; **Chapitre 1**). Le processus permettant l'obtention de la liste d'interactants chez *A. thaliana* est schématisé **Figure 1 de la publication du chapitre 3**.

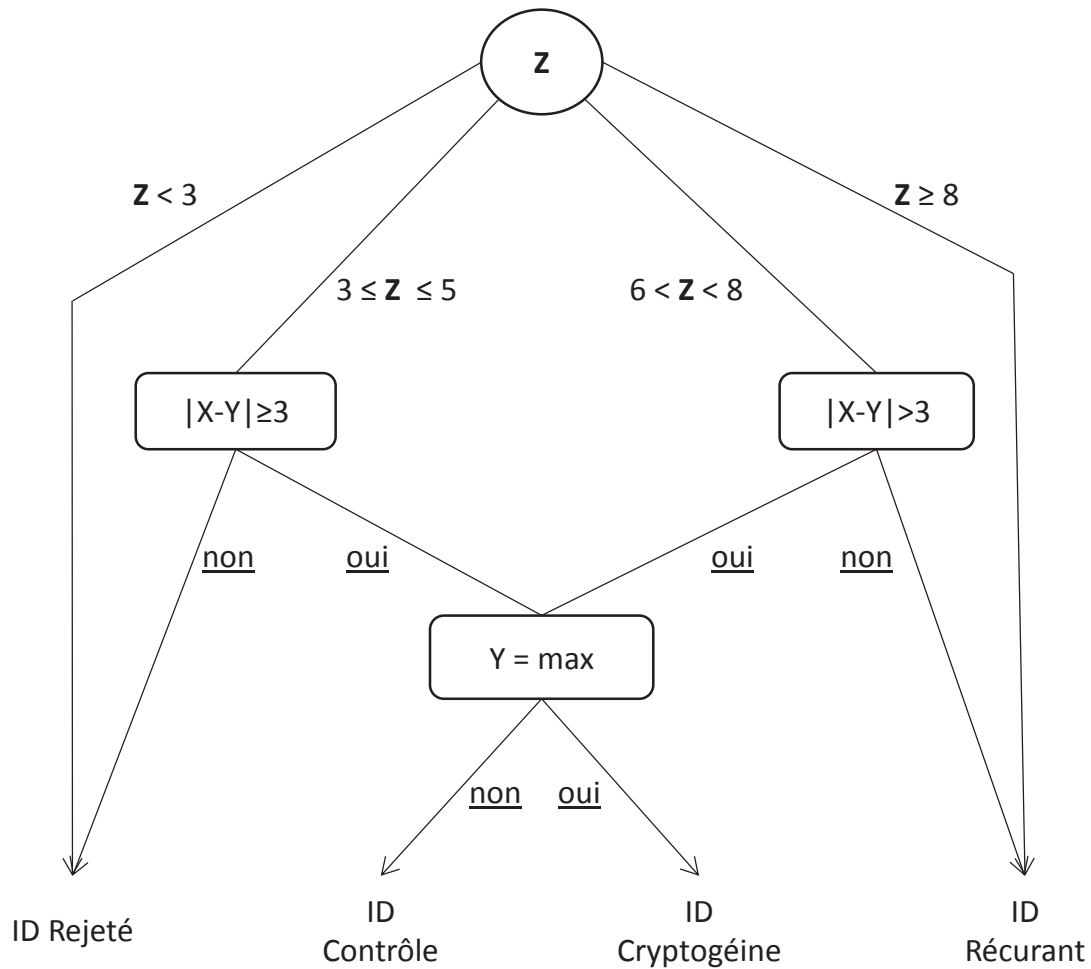


Figure MM.3 Arbre de décision permettant le tri des identifiants en fonction de leur occurrence dans les différentes expériences d'IP-MS. Pour un identifiant (ID) donné, X représente le nombre d'expériences contrôles dans lesquelles l'ID est retrouvé, avec $0 \leq X \leq 5$. Y représente le nombre d'expériences cryptogéine dans lesquelles ID est retrouvé, avec $0 \leq Y \leq 5$. Z représente combien de fois l'ID est retrouvé toutes expériences confondues, avec $Z = X + Y$ et $0 \leq Z \leq 10$. L'arbre de décision prend en compte tous les cas de figures possibles et se base principalement sur le fait que sur 5 expériences, un identifiant est validé si on le retrouve au moins 3 fois. L'arbre de décision permet donc de rejeter un identifiant sur la base de son occurrence, ou de déterminer si cet identifiant est retrouvé soit uniquement en condition contrôle, soit uniquement en condition cryptogéine, soit est retrouvé dans les deux conditions et est donc considéré comme récurrent.

Grâce aux identifiants UniProtKB des 4705 protéines identifiées en MS issues des 10 expériences de co-IP de CDC48 en condition contrôle et lors du traitement des cellules de tabac par la cryptogéine, l'ensemble des séquences protéiques a été récupéré de manière automatique sous format FASTA grâce à la fonction *UniProt.Search* de la librairie *Bioservices* de python (Cokelaer et al., 2013). En parallèle, l'ensemble du protéome d'*A. thaliana* et son annotation (version : 2018-01-05) ont été téléchargés à partir du site TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* ; www.arabidopsis.org).

La première étape consiste à attribuer aux 4705 protéines un identifiant TAIR ID, ou locus ATxGxxxxx. Pour ce faire, le protéome complet d'*A. thaliana* sert de base de données et chacune des 4705 séquences FASTA sert de requête à un BLAST (*Basic local alignment search tool*) réalisé grâce à la fonction *NcbiblastpCommandline* de la librairie *BioPython* de Python (Cock et al., 2009). Ainsi, à chaque protéine est attribué un seul locus sous la base d'un score maximal et d'une *e.value* inférieure à $10e^{-10}$. Seules les protéines d'*A. thaliana* présentant plus de 70 % d'identité avec une des séquences requêtes ont été conservées. La liste définitive des partenaires de CDC48 chez *A. thaliana* a été obtenue suite à un tri réalisé sur la base de la présence/absence des protéines lors des différentes expériences de co-IP. Ce dernier tri suit un arbre de décision présenté **Figure MM.3**, et permet d'attribuer aux protéines sélectionnées les attributs suivants :

- Récurrent : l'interaction est décelée à la fois dans la condition contrôle et la condition cryptogéine
- Cryptogéine : l'interaction est décelée uniquement dans la condition cryptogéine
- Contrôle : l'interaction est décelée uniquement dans la condition contrôle.

8.1.2. Validation de la méthode par comparaison de listes

La validation de la liste d'interactants d'*A. thaliana* nécessite sa comparaison à celle établie chez le tabac par Rosnoblet *et al.* (2017) et ceci par le biais d'une analyse du type BBH (*Best bidirectional hits*) ou « meilleur alignement réciproque » avec quelques modifications. Ce type d'analyse a pour but de déceler entre deux organismes des gènes orthologues (Moreno-Hagelsieb and Latimer, 2008). Deux gènes orthologues sont définis comme étant des gènes qui ont divergé après un événement de spéciation (Fitch, 2000). D'un point de vue évolutif, cette relation implique que les produits de ces gènes doivent avoir conservé leurs fonctions originelles. Autrement dit, les orthologues sont les « mêmes gènes » ou « mêmes protéines » dans des espèces et organismes différents. Ainsi, plus nous détectons d'orthologues de protéines identifiées par Rosnoblet *et al.*, (2017) dans la liste d'*A. thaliana*, plus nous validons la méthode mise en place. De plus, les protéines d'*A. thaliana* qui n'ont pas d'orthologues peuvent potentiellement être considérées comme de nouveaux partenaires identifiés.

L'analyse a été réalisée en trois étapes. Dans un premier temps, les séquences FASTA des 129 protéines d'*A. thaliana* identifiées ont servi de base de données et chaque séquence FASTA des interactants de tabac a servi de requête à un BLAST contre la base de données nouvellement créée grâce à la fonction *NcbiblastpCommandline*. Ainsi, pour chaque interactant de tabac, 129 alignements ont été possibles et ont été classés selon un score, un pourcentage d'identité et une *e.value*. Dans un deuxième temps, les séquences FASTA des 97 partenaires de tabac ont servi de base de données et chaque séquence FASTA des interactants d'*A. thaliana* a servi de requête à un BLAST contre la base de données nouvellement créée grâce à la même fonction que précédemment. Cette fois-ci, pour chaque interactant d'*A. thaliana*, 97 alignements ont été possibles et ont été classés selon un score, un pourcentage d'identité et une *e.value*. Enfin, dans un troisième temps, les résultats des différents BLAST ont été comparés, et si un interactant

d'*A. thaliana* et de tabac ont mutuellement présenté un alignement maximal avec une *e.value* inférieure à $10e^{-10}$, nous avons considéré que les deux protéines sont orthologues.

8.1.3. Listes d'interactants de CDC48 chez l'homme et la levure

Les listes des interactants de CDC48 chez l'homme et la levure ont été récupérées à partir de la base de données Biogrid (<https://thebiogrid.org> ; version : 3.4.156, Chatr-aryamontri et al., 2017) qui répertorie l'ensemble des interactions protéiques mis en évidence expérimentalement. Pour ce faire, les interactomes complets humain et levure (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été téléchargés et restreints aux interactions impliquant VCP chez les humains et ScCDC48 chez la levure. N'ont été conservées que les interactions physiques entre VCP ou ScCDC48 et leurs partenaires mises en évidence par des approches d'affinité suivies d'analyses de MS afin de se rapprocher le plus possible des conditions expérimentales notre étude.

8.2. Représentation graphique de l'interactome de CDC48 chez *Arabidopsis thaliana*

8.2.1. Récupération des données d'interactions des partenaires de CDC48 chez *A. thaliana*

Les données d'interactions des partenaires de CDC48 chez *A. thaliana* ont été récupérées grâce à la base de données Biogrid (Chatr-aryamontri et al., 2017). Pour ce faire, l'interactome complet d'*A. thaliana* a été téléchargé et uniquement les interactions mettant en jeu des protéines appartenant à la liste d'interactants de CDC48 chez *A. thaliana* ont été conservées. Ici, seules les interactions mises en évidence par des méthodes physiques ont été prises en compte. Aux interactions issues de la base de données Biogrid ont été ajoutées les interactions mises en évidence dans notre étude.

Afin de faciliter l'exportation et la lecture du réseau d'interaction protéique par des logiciels de représentation graphique, l'interactome complet de CDC48 chez *A. thaliana* a été converti au

format GML (*Graph modelling language*) en utilisant la librairie *networkx* de Python (Hagberg et al., 2008).

8.2.2. Analyse des communautés d'interactions

L'analyse des communautés a été rendue possible grâce au package *Igraph* de R (Csardi and Nepusz, 2006) qui propose 7 algorithmes différents permettant leur détection (Blondel et al., 2008; Clauset et al., 2004; Newman, 2006; Newman and Girvan, 2004; Raghavan et al., 2007; Reichardt and Bornholdt, 2006). Chacun de ces algorithmes aboutit à un coefficient de modularité qui atteste de la qualité du partitionnement. Plus le coefficient est élevé, plus il reflète des connexions denses entre les membres d'une même communauté et des connexions plus faibles entre les membres d'une communauté et le reste du réseau. Le choix final de l'algorithme a été basé sur le coefficient de modularité le plus haut possible et la capacité à détecter des complexes protéiques comme le protéasome 26S.

8.2.3. Représentation graphique

La représentation graphique de l'interactome de CDC48 chez *A. thaliana* a été rendue possible grâce au logiciel libre Gephi (version : 0.9.2). Après ouverture du fichier d'interaction au format GML, le graphique est considéré comme non dirigé. Pour la représentation graphique des nœuds, la taille est proportionnelle au degré de celui-ci, et la couleur est fonction de la communauté à laquelle le nœud appartient. Concernant la spatialisation, la *Force Atlas 2* a été utilisée en forçant la dissuasion de formation des *hubs*, en empêchant le recouvrement des nœuds et en spécifiant l'échelle afin d'obtenir un graphique lisible.

8.3. Analyse bio-informatique des partenaires de CDC48

Afin de caractériser les composants des différents interactomes de CDC48, nous avons utilisé la banque de donnée PANTHER (*Protein analysis through evolutionary relationship* ; www.pantherdb.org ; Mi et al., 2013) qui propose différents outils conçus pour faciliter la classification de protéines issues d'analyses de haut-débit. Parmi ces outils, la classification fonctionnelle des partenaires de CDC48 permet de décrire l'interactome par les classes protéiques qui le compose, ou encore de le décrire en suivant le schéma de classification proposé par le consortium de *Gene ontology* (GO ; Ashburner et al., 2000). Pour ce système de classification, nous avons choisi d'utiliser les *GO Term* décrivant les fonctions moléculaires (MF) ainsi que les processus biologiques (BP). De plus, la sur- ou sous-représentation d'un *GO Term* donné peut être déterminée statistiquement. Pour ce faire, les éléments de la liste d'interactants de CDC48 ont été classifiés, et la proportion de chaque *GO Term* de la liste de partenaires a été comparée à la proportion de ce même *GO Term* dans la liste de référence qui est composée de l'interactome complet d'une espèce donnée. Les *p.value* obtenues suite au test exact de Fisher ont été corrigées par la méthode FDR (*False discovery rate*).

Chapitre 1

Caractérisation fonctionnelle de la protéine CDC48 dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine chez le tabac.

1. Contexte scientifique et principaux résultats

1.1. Contexte et objectifs de l'étude

Une précédente étude réalisée dans l'équipe a permis d'identifier 11 protéines S-nitrosylées lors de la réponse immunitaire de cellules de tabac exposées à la cryptogéine (Astier et al., 2012b). Parmi celles-ci figure CDC48 dont un seul gène a été caractérisé chez le tabac. Les données de spectrométrie de masse ont indiqué que la S-nitrosylation porte sur le résidu cystéine 526 localisé dans le motif Walker A de fixation de l'ATP du domaine D2. Ce même résidu a précédemment été démontré comme cible de H₂O₂ dans la protéine CDC48 de drosophile (Noguchi et al., 2005). *In vitro*, deux autres résidus S-nitrosylables ont été identifiés (les résidus cystéine 110 et 664). Des études sur la protéine recombinante NtCDC48 ont démontré que le NO inhibe son activité ATPase et induit un changement structural de la protéine. Il a été proposé que la S-nitrosylation du résidu Cystéine 526 induise un encombrement stérique empêchant ou altérant la fixation ou l'hydrolyse de l'ATP dans le motif Walker A du domaine D2.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre a été d'entreprendre l'étude fonctionnelle de CDC48 dans la réponse immunitaire déclenchée par la cryptogéine dans des cellules de tabac. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article scientifique publié dans *Plant Cell and Environment* où je suis second auteur (Rosnoble et al., 2017). Le résumé de ce travail, ainsi que ma contribution, sont présentés ci-dessous.

1.2. Résultats principaux

Nous avons observé que la cryptogéine induit une accumulation de la protéine CDC48 et de son transcrit dans les cellules de tabac. En revanche, la forme S-nitrosylée est minoritaire, posant la question de l'incidence cellulaire de cette modification post-traductionnelle. Grâce à des expériences de filtration sur gel en conditions natives, nous avons mis en évidence que CDC48 est associée en complexe protéique d'une taille d'environ 660 kDa correspondant vraisemblablement à sa structuration fonctionnelle en hexamère. Cette fonctionnalité a été étudiée *via* deux approches :

D'une part, une identification des protéines interagissant avec CDC48 a été entreprise. Pour ce faire, des expériences d'immunoprécipitation de CDC48 endogène suivies d'analyse de spectrométrie de masse (IP-MS) ont été réalisées à partir de cellules témoin et traitées à la cryptogéine. Seule une analyse qualitative a été réalisée (à défaut d'une analyse quantitative). Cette expérience a conduit à l'identification de 97 partenaires récurrents de NtCDC48. Aucun partenaire n'a été spécifiquement identifié dans les conditions contrôles ou lors du traitement par la cryptogéine. Ces partenaires incluent majoritairement des protéines du métabolisme (environ 50 %) dont l'interaction avec CDC48 témoigne vraisemblablement de leur turnover. En accord avec cette hypothèse, plusieurs partenaires associés au contrôle qualité des protéines ont été identifiés, démontrant que son rôle dans la régulation de l'homéostasie protéique est conservé chez les plantes. D'autres fonctions semblent conservées comparativement aux animaux et aux levures. En particulier, nous avons confirmé l'interaction entre NtCDC48 et la petite GTPase *ADP ribosylation factor* (ARF) impliquée dans le trafic intracellulaire.

D'autre part nous avons généré et initié la caractérisation d'une lignée cellulaire de tabac surexprimant CDC48 (lignée CDC48-TAP avec ajout d'une étiquette de purification par affinité en tandem en position C-terminal de la protéine). La mesure des événements intracellulaires précoces induits par la cryptogéine, tels que la production de NO, de H₂O₂ ou l'activation de

MAPK, n'a pas révélé de différence entre les cellules sauvages et CDC48-TAP. Néanmoins, une mort cellulaire précoce et exacerbée a été observée en réponse à l'éliciteur dans les cellules CDC48-TAP, laissant supposer un rôle de CDC48 dans la régulation de la réponse hypersensible.

1.3. Ma contribution

Mon implication a été de confirmer par Western blot l'accumulation de CDC48 au cours de la mise en place de la réponse immunitaire. J'ai également participé à l'analyse de l'accumulation du transcrit codant CDC48 et vérifié la dégradation précoce des ARNm au cours de la réponse immunitaire. J'ai aussi réalisé les mesures de FAO et de NO dans les différentes lignées cellulaires utilisées et proposé et réalisé la quantification de la mort cellulaire en utilisant la technique basée sur l'iodure de propidium. Enfin, j'ai réalisé une partie des expériences confirmant l'interaction *in vitro* entre CDC48 et le partenaire ARF.

2. Article scientifique n° 2:

Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogin-induced immune response in tobacco.

Article de résultats originaux paru en 2017 dans *Plant, Cell & Environment*

Special Issue

Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced immune response in tobacco

Claire Rosnoblet¹, Hervé Bègue¹, Cécile Blanchard¹, Carole Pichereaux^{2,3}, Angélique Besson-Bard¹, Sébastien Aimé⁴ & David Wendehenne¹

¹Pôle Mécanisme et Gestion des Interactions Plantes-Microorganismes – ERL CNRS 6300 Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR 1347 Agroécologie 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cédex, France, ²Fédération de Recherche 3450, Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité, CNRS, 31326 Castanet-Tolosan, France, ³Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale – CNRS, Université de Toulouse, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France and ⁴INRA, UMR 1347 Agroécologie, Pôle Mécanisme et Gestion des Interactions Plantes-Microorganismes – ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cédex, France

ABSTRACT

Cdc48, a molecular chaperone conserved in different kingdoms, is a member of the AAA+ family contributing to numerous processes in mammals including proteins quality control and degradation, vesicular trafficking, autophagy and immunity. The functions of Cdc48 plant orthologues are less understood. We previously reported that Cdc48 is regulated by S-nitrosylation in tobacco cells undergoing an immune response triggered by cryptogein, an elicitor produced by the oomycete *Phytophthora cryptogea*. Here, we investigated the function of NtCdc48 in cryptogein signalling and induced hypersensitive-like cell death. NtCdc48 was found to accumulate in elicited cells at both the protein and transcript levels. Interestingly, only a small proportion of the overall NtCdc48 population appeared to be S-nitrosylated. Using gel filtration in native conditions, we confirmed that NtCdc48 was present in its hexameric active form. An immunoprecipitation-based strategy following mass spectrometry analysis led to the identification of about a hundred NtCdc48 partners and underlined its contribution in cellular processes including targeting of ubiquitylated proteins for proteasome-dependent degradation, subcellular trafficking and redox regulation. Finally, the analysis of cryptogein-induced events in NtCdc48-overexpressing cells highlighted a correlation between NtCdc48 expression and hypersensitive cell death. Altogether, this study identified NtCdc48 as a component of cryptogein signalling and plant immunity.

Key-words: Cdc48 partners; cell death; cryptogein; defence responses; NtCdc48.

INTRODUCTION

The molecular chaperone Cdc48 is an evolutionarily conserved ATPase of the AAA+ family (ATPases associated with diverse cellular activities; Erdmann *et al.* 1991; Erzberger & Berger 2006). The mammalian homolog of plant and yeast Cdc48, also called p97 or valosin-containing protein (VCP), has been well

characterized and represents one of the most abundant proteins in eukaryotic cells, accounting for 1% of cytosolic proteins (Moir *et al.* 1982; Koller & Brownstein 1987). In both yeast and animals, Cdc48/VCP has been assigned to a large number of independent cellular processes, being essential for cell growth and viability (Meyer 2005; Meyer *et al.* 2012). In particular, Cdc48/VCP contributes to many ubiquitin-mediated pathways, and its involvement in the endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation (ERAD), in the ubiquitin–proteasome machinery (Hirsch *et al.* 2009) and, more recently, in the mitochondrion-associated protein degradation has been reported (Heo *et al.* 2010; Taylor & Rutter 2011). Whatever the pathway in which it is involved, Cdc48/VCP functions in interaction with numerous specific adaptor proteins to process ubiquitylated substrates (Yeung *et al.* 2008; Madsen *et al.* 2009). These cofactors are diverse, and for most of them, their functions are unknown (Buchberger *et al.* 2010) although it is thought that each of them directs Cdc48/VCP to a particular cellular pathway.

In plants, little is known about Cdc48, but available evidences indicate that it displays similar functions to its animal and yeast counterparts, such as ERAD, cell expansion and differentiation, cytokinesis and membrane fusion (Müller *et al.* 2005; Marshall *et al.* 2008; Park *et al.* 2008; O'Quin *et al.* 2010; Gallois *et al.* 2013). In *Arabidopsis thaliana*, Cdc48 isoforms localize in different subcellular compartments including the nucleus, the cytoplasm (Gallois *et al.* 2013) and the phragmoplast mid-zone during cytokinesis (Rancour *et al.* 2002; Park *et al.* 2008) and are also visualized in association with the ER and the plasma membrane (Aker *et al.* 2006, 2007).

Structurally, the active form of Cdc48/VCP is a ring-shaped homohexameric complex that uses the energy of ATP hydrolysis to remodel client molecules with the help of associated cofactors (Erzberger & Berger 2006). The hexamer introduces an additional level of ubiquitin-mediated pathway regulation via segregation of ubiquitylated proteins from their environment, such as protein complexes, membranes or chromatin, and through translocation of unfolded substrates into the proteolytic chamber of the proteasome (Meyer *et al.* 2012). Each monomer consists of two ATPase domains, D1 and D2, both domains containing a Walker A and Walker B motif involved

Correspondence: C. Rosnoblet; e-mail: claire.rosnoblet@dijon.inra.fr

in ATP binding and hydrolysis, respectively (Ogura & Wilkinson 2001). Interaction between the D1 domain and ATP is required for the hexamerization of Cdc48 monomers (Wang *et al.* 2003). ATP hydrolysis by the D2 domain triggers a major conformational change that generates a pulling force, allowing Cdc48 to physically disassemble proteins from their partners or from other cellular structures and to remodel unfolded ubiquitylated proteins (Pye *et al.* 2006; Wolf & Stolz 2012). The N-terminal and C-terminal regions of Cdc48/VCP are structurally flexible around the hexamer and mostly involved in selecting and/or processing client molecules, but they could also regulate hydrolysis of ATP via either binding protein partners or post-translational modification (Park *et al.* 2007; Wolf & Stolz 2012). VCP is indeed prone to phosphorylation and acetylation, these post-translational modifications modulating partner binding and subcellular localization of the protein (Ewens *et al.* 2010). In plants, Rienties *et al.* (2005) and Aker *et al.* (2007) have highlighted the trans-phosphorylation of Cdc48 by the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 (SERK1).

The possibility that Cdc48/VCP could be regulated through redox-dependent processes has been also reported. In the *Drosophila* Cdc48, the Cys-522 residue was shown to be targeted by reactive oxygen species (ROS), and both ROS and nitric oxide (NO) donors impaired the protein ATPase activity (Noguchi *et al.* 2005). In the *A. thaliana* AtCdc48A isoform, Cys-109 appeared to be constitutively *S*-nitrosylated (Fares *et al.* 2011). Completing these data, we further demonstrated that both corresponding residues of the tobacco NtCdc48 orthologue (Cys-110 and Cys-526) undergo *S*-nitrosylation *in vitro* (Astier *et al.* 2012). As reported in *Drosophila*, NO triggered an inhibition of NtCdc48 but also promoted subtle conformational changes within the protein. Accordingly, Cys-526 of NtCdc48 localizes in the Walker A motif of the D2 domain involved in ATP binding, suggesting that its *S*-nitrosylation might trigger a mechanism of steric hindrance interfering with ATP binding. Importantly, we observed a specific *S*-nitrosylation *in vivo* of NtCdc48 on Cys-526 in tobacco cells undergoing an immune response triggered by cryptogeiin (Astier *et al.* 2012), an elicitor of defence responses produced by the oomycete *Phytophthora cryptogea*, inducing a hypersensitive response (HR) and a systemic acquired resistance in tobacco plants (Bonnet *et al.* 1996). The *S*-nitrosylation of NtCdc48 occurred within the first 2 h of elicitor treatment, concomitantly with NO production and other signalling events including the production of ROS (Kulik *et al.* 2015). More generally, in cryptogeiin signalling, NO is involved as a Ca²⁺-mobilizing second messenger and, in cooperation with ROS, as a mediator of the elicitor-induced hypersensitive cell death (Lamotte *et al.* 2004; Jeandroz *et al.* 2013; Kulik *et al.* 2015; Trapet *et al.* 2015). Several studies pointed out for a role of Cdc48 in plant immunity. In *A. thaliana*, Cdc48 was shown to interact with SERK1, whose rice orthologue positively regulates host defence response against fungal infection (Hu *et al.* 2005; Rienties *et al.* 2005). Furthermore, the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein 2 (PUX2), a UBX domain-containing protein acting as a negative regulator of the powdery mildew/*A. thaliana* interaction, was identified as

a putative physiological Cdc48 partner (Rancour *et al.* 2004; Chandran *et al.* 2009). More recently, Niehl *et al.* (2012) investigated the involvement of Cdc48 in *A. thaliana* during infection with oilseed rape mosaic virus. These authors demonstrated that the transcript encoding the AtCdc48B isoform was substantially increased upon infection and that AtCdc48B physically interacts with virus-encoded movement proteins, promoting their removal from ER and their degradation in an ERAD-like mechanism. These data strengthened a previous investigation underlying a function for Cdc48 in the elimination of aberrant variants of the mildew resistance o (MLO) protein through a ERAD-related quality control process in *A. thaliana* protoplasts (Müller *et al.* 2005).

Altogether, these studies strongly suggest that Cdc48 is regulated at the post-translational level through an NO-dependent process and might contribute to the plant defence machinery. However, its role in plant immunity remains poorly investigated and understood. In the present study, we further decipher the involvement of NtCdc48 in plant immunity using cryptogeiin and tobacco cell suspensions as a biological model. NtCdc48 was shown to accumulate at both the transcript and protein levels in cryptogeiin-elicited cells where it occurred in its active hexameric structure. This process was independent of NO, and only a small proportion of NtCdc48 appeared to be *S*-nitrosylated. An immunoprecipitation (IP)-based strategy led to the identification of numerous NtCdc48 partners and shed light on its contribution in key cellular processes including the targeting of ubiquitylated client proteins for proteasome-dependent degradation and subcellular trafficking. Finally, a role for NtCdc48 in cryptogeiin-induced cell death was highlighted.

MATERIALS AND METHODS

Treatments and chemicals

Nicotiana tabacum cv. Xanthi wild-type (WT), CL5 and Cdc48-TAP cell suspensions were maintained in the growth exponential phase as described previously (Besson-Bard *et al.* 2008) and subcultured 1 d prior to use. Cryptogeiin was purified according to Bonnet *et al.* (1996) and was stored at -20°C in water as a 10 μM stock solution. Tobacco cells were treated with a final concentration of 100 nM. As control, an equal volume of water was added in cell suspensions.

Western blotting and biotin switch assay

Tobacco cells were broken in lysis buffer [50 mM Hepes, pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol (DTT), 100 mM NaCl and protease cocktail inhibitors without EDTA (PIC, Roche, Basel, Switzerland)] and then quantified using the Bradford (1976) method. The lysis buffer was enriched with phosphatase inhibitors (100 μM Na₃VO₄ and 5 mM beta-glycerophosphate) in Western blot experiments directed against phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MAPK). Proteins (20 μg) were resolved by 10 or 12% (w/v) sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis

(SDS-PAGE) and visualized by Western blotting onto nitrocellulose membrane with an antibody raised against Cdc48 protein (1/1000, Abcam plc. Cambridge, UK), ADP ribosylation factor (ARF, 1/1000, Agrisera, Vännäs, Sweden) or phosphorylated p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1/5000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Immunoreactive proteins were revealed by electrochemiluminescence (ECL), and relative quantifications were made from six repetitions using the IMAGEJ software.

The biotin switch assay has been performed from protein extracts of cryptogin-treated cells as described previously (Wawer *et al.* 2010). After purification of the biotinylated versus non-biotinylated proteins using NeutrAvidin agarose, the resulting fractions were loaded on SDS-PAGE before Western blot against endogenous NtCdc48.

Molecular biology

The mRNA content of *NtCdc48* or *VPE* was assayed in control and cryptogin-treated tobacco cells. RNAs were extracted using TRIzol Reagent (Life Technologies, Rockville, MD, USA) according to the manufacturer's recommendations, and the quality of total RNA was checked in 1% (w/v) agarose gel. Five hundred nanogrammes of total RNA was reverse transcribed using oligo-dT primer and the 146, DyNamo™ kit (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). For the reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR), a SYBR Green PCR Master Mix kit (Life Technologies) was used, and PCR was performed using the ViiA™ 7 (Life Technologies) apparatus and the ViiA™ 7 v1.2 software. All samples were log-transformed and normalized to L25 control (Schmidt & Delaney 2010). Three independent experiments were performed, and the statistical analysis was performed by ANOVA test (***) $P < 0.05$. The following primers were used for RT-qPCR: NtCdc48-qF, 5'-GCACCCACAACCTCTTCAAATC-3'; NtCdc48-qR, 5'-GCTTTACTTTTCTCCAGC C-3'; L25-qF, 5'-CCCCTCACCA CAGAGTCTGC-3'; L25-qR, 5'-AAGGGTGTGTTGTCCTCAATCTT-3'; EF-1-qF, 5'-TGAGATGCACCACGAA GCTC-3'; EF-1-qR, 5'-CCAACATTGTCACCAGGAAG TG-3'; VPE-Fw, 5'-TGGAGGCAGCGAAAGGT-3'; and VPC-Rev, 5'-CATCCCAAGCACTCCAGGAC-3'.

NtCdc48 and NtARF coding sequences were cloned in order to obtain recombinant proteins in bacteria and/or in tobacco. After amplification of inserts from reverse-transcribed mRNA of tobacco, NtCdc48 and NtARF constructions were obtained using BP and LR Clonase kits from GATEWAY technology (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with the following plasmids: pDON221 and pYL436 (Cter-TAP fusion, Arabidopsis Biological Resource Center, The Ohio State University, USA), pH7WGF2 (Nter-GFP tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium) and pHGWA (Nter-His tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium) according to manufacturer instructions. The following primers were used for PCR and cloning: for C-terminal fusion of Cdc48 in pDONR221, CDC48-Fdonr (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGACTGCCATGACTAACAAAGCTGAATCCTCC-3') and CD

C48noSTOP-Rdonr (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGA AAGCTGGGTTACTATACAGGTCATCTTCATCTGCTCCACC-3'); for N-terminal fusion of Cdc48 in pENTR, CD C-FL4FN (5'-CACCATGACTAACAAAGCTGAATCCTC C-3') and CDC-FL2R (5'-CTAACTATACAGGTCATC TTCATCTGC-3'); and for N-terminal fusion of ARF in pDONR221, ARFpDONR-F (5'-GGGGACAAGTTTGT AAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGCTGTCTTTCCGG CAAAC-3') and ARFpDONRstop-R (5'-GGGGACCA CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTATGCCTTGTTT-GAAATATTGTTTCGAAAGCCA-3').

Gel filtration chromatography

Protein extracts were prepared from tobacco cells after cryptogin treatment. Cell lysis was performed in a gel filtration buffer [20 mM Hepes-KOH pH 7.6, 5% (v/v) glycerol, 100 mM KCl, 1 mM DDT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA and PIC] for 15 min at 4 °C. After centrifugation for 10 min at 20 800 g and 4 °C, 500 µg to 1 mg of fresh extracts were fractionated on a Superose 6 HR 10/300 GL column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) equilibrated in the gel filtration buffer. Size exclusion chromatography was carried out on a fast protein liquid chromatography system (FPLC) using an ÄKTA™ purifier (GE Healthcare). Elution profiles of blue dextran (V0), thyroglobulin (669 kDa), apoferritin (443 kDa), beta-amylase (200 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa, all from GE Healthcare) were used to obtain the calibration curve. All the gel filtration experiments were run at room temperature. One millilitre fractions were collected and precipitated in trichloroacetic acid, for 30 min at 4 °C. Dried pellets were suspended in loading buffer, and fractions were examined by Western blotting with antibody raised against Cdc48 (1/1000, Abcam Ltd).

Immunoprecipitation

Tobacco cells treated or not with cryptogin (pool of 5–90 min treated cells according to Astier *et al.* 2012) were lysed in the native IP buffer [50 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 4 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.3% (v/v) IGEPAL CA-630, 100 µM Na₃VO₄, 50 mM beta-glycerophosphate and PIC] for 15 min in ice, centrifuged first at 20 800 g for 20 min and then ultracentrifuged at 100 000 g for 20 min at 4 °C. After quantification, 1 mg of proteins was incubated with 50 µL of Affi-Gel® protein A gel agarose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) for 1 h at 4 °C in order to deplete the sample from proteins binding sepharose and/or protein A. The sample extract was then recovered by centrifugation at 8200 g and 4 °C and incubated with 1 µg of Cdc48 antibody. After 30 min at 4 °C, protein A gel agarose was added, and IP was performed overnight at 4 °C under gentle agitation. Beads were washed four times with the IP buffer, and bound proteins were reduced with additional DTT treatment and then alkylated using iodoacetamide. After elution of Cdc48 with its *in vivo* binding partners using loading buffer, bound proteins were resolved by electrophoresis on 12% (w/v) SDS-PAGE. Once proteins have reached the

running gel, stained and excised bands were removed and analysed by mass spectrometry (MS). Three independent experiments were performed. Furthermore, two additive independent experiments corresponding to protein samples extracted from tobacco cells elicited by cryptogein for 6 h were undertaken (Supporting Information Table S1g).

Digestion and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis

After Instant Blue (Invitrogen) staining of the gel, bands were excised and digested by the addition of 60 μL of a solution of modified trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 (10 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$, sequence grade, Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The mixture was incubated at 37 °C overnight.

The peptide mixtures were analysed by nano-liquid chromatography tandem MS (LC-MS/MS) using a nano-RS ultrahigh-performance liquid chromatography (UHPLC) system (Dionex, Amsterdam, the Netherlands) coupled to an LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Five microlitres of each sample was loaded on a C18 pre-column (300 μm inner diameter \times 5 mm; Dionex) at 20 $\mu\text{L}\text{min}^{-1}$ in 2% acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid. After 5 min of desalting, the pre-column was switched online with the analytical C18 column (75 μm inner diameter \times 15 cm; in-house packed) and equilibrated in 95% solvent A (5% acetonitrile and 0.2% formic acid) and 5% solvent B (80% acetonitrile and 0.2% formic acid). Peptides were eluted using a 5–50% gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.2% formic acid) during 105 min at a 300 nLmin^{-1} flow rate. The LTQ-Orbitrap was operated in data-dependent acquisition mode with the XCALIBUR software (Thermo Fisher Scientific). Survey scan MS spectra were acquired in the Orbitrap on the 300–2000 m/z range with the resolution set to a value of 60 000. The 20 most intense ions per survey scan were selected for collision-induced dissociation (CID) fragmentation, and the resulting fragments were analysed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was used within 60 s to prevent repetitive selection of the same peptide.

Database search and data analysis

The MASCOT DAEMON software (version 2.4, Matrix Science, London, UK) was used for database searches in batch mode with all the raw files acquired on each sample. To automatically extract peak lists from XCALIBUR raw files, the Extract_msn.exe macro provided with XCALIBUR (version 2.0 SR2, Thermo Fisher Scientific) was used through the MASCOT DAEMON interface. The following parameters were set for creation of the peak lists: parent ions in the mass range 400–4500, no grouping of MS/MS scans, and threshold at 1000. A peak list was created for each analysed fraction (i.e. gel slice), and individual Mascot searches were performed for each fraction. Data were searched against all entries in the SwissProt/Trembl 20140428/Viridiplantae (green plants) (55 790 250 sequences; 17 400 852 981 residues/1 991 712 sequences). Oxidation of methionine and carbamidomethylation of cysteine were set as variable

modifications for all Mascot searches. Specificity of trypsin digestion was set for cleavage after lysine or arginine except before proline, and one missed trypsin cleavage site was allowed. The mass tolerances in MS and MS/MS were set to 5 ppm and 0.8 Da, respectively, and the instrument setting was specified as 'ESI-Trap'. Mascot results were parsed with the in-house-developed software PROLINE (<http://proline.profiroteomics.fr/>). The target decoy database search allowed us to control and estimate the false-positive identification rate of our study, and the final catalogue of proteins presented an estimated false discovery rate (FDR) below 1%. The spectral count metric used for quantitation corresponds to the protein weighted spectrum count values in proline (last accessed on 27 May 2014). Finally, each protein set was blasted in Viridiplantae [uniprotkb_viridiplantae (protein)] in order to identify the corresponding *N. tabacum* protein if listed in the database (Supporting Information Tables S1a–f). NtCdc48 partners were considered as being significant when identified in five out of 10 IP samples (Supporting Information Table S1h).

Recombinant protein production, purification and pull-down

His-tagged NtARF and NtCdc48 proteins were produced in *E. coli* (Rosetta II) cells grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) medium. When the culture reached $A_{600} \sim 0.5$, protein production was induced with 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG), and the culture was extended for 3 h before purification of the His-tagged proteins using Ni^{2+} -affinity chromatography by FPLC on AKTA Prime® following the manufacturer's instructions (GE Healthcare). His-NtARF-containing or His-NtCdc48-containing fractions were selected following SDS-PAGE analysis, pooled and dialysed against 40 mM Tris-Cl pH 7.4 and 500 mM NaCl. Next, proteins were concentrated up to $\sim 0.25\text{ }\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ with an Amicon Ultra centrifugal filter (cut-off 10 kDa for His-NtARF or 30 kDa for His-NtCdc48, Millipore, Billerica, MA, USA) simultaneously with a buffer exchange against the storage buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA). His-tagged proteins were then incubated with 50 μL of Ni-NTA beads (GE Healthcare) overnight by gently shaking at 4 °C and stored at 4 °C after extensive washing with storage buffer plus PIC. His-NtARF-linked and His-NtCdc48-linked beads were stored at 5% (v/v) in storage buffer with PIC. Beads linked to recombinant proteins were used for pull-down with proteins extracted from infiltrated leaves or tobacco cells in IP buffer.

Agrobacterium tumefaciens strain (GV3101) was transformed with GFP-NtCdc48, grown at 28 °C with gentamycin (50 $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) and rifampicin (50 $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) for the strain plus spectinomycin (100 $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) for the plasmid. Infiltration of transformed bacteria in 10 mM Mes, 10 mM MgCl_2 and 100 μM acetosyringone was then performed in *Nicotiana benthamiana* leaves with a syringe. Overexpression of the GFP-coupled protein was monitored using an epifluorescence microscope (Leica, Nanterre, France), and total proteins from leaves overexpressing GFP-NtCdc48 or not as a negative

control were extracted and quantified 7 d after infiltration in IP buffer.

An amount of 500 μg of proteins extracted from tobacco leaves or cells and kept in IP buffer were incubated with 20 μL of 5% His-NtARF-beads or Nt-Cdc48-beads or free Ni-NTA beads as a negative control, overnight at 4 °C with gentle shaking. After extensive washing using IP buffer, linked proteins were eluted in the loading buffer for 3 min at 100 °C and resolved by SDS-PAGE. Finally, GFP-NtCdc48, His-NtCdc48 and His-NtARF were visualized by Western blot using anti-His (1/1000) and anti-GFP antibodies (1/5000, Cell Signaling), while endogenous NtARF was detected with anti-ARF antibodies (1/1000, Agrisera).

Generation of NtCdc48-TAP cell line

Agrobacterium tumefaciens strain (GV3101) was transformed with NtCdc48-TAP, grown at 28 °C with gentamycin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and rifampicin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for strain plus spectinomycin (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for plasmid. Next, transformed bacteria maintained in 10 mM Mes, 10 mM MgCl_2 and 100 μM acetosyringone were infiltrated in *N. tabacum* leaf pieces by soaking in sterile conditions. After *Agrobacterium*-mediated infection, leaf fragments were incubated for 48 h on plates containing MSH media pH 5.7 (2.6 g L^{-1} MO237 Murashige and Skoog, Duchefa Biochemie, Haarlem, the Netherlands; 40 mM sucrose; and 10 mM KNO_3) enriched with growth regulators (0.5 mg L^{-1} naphthaleneacetic acid and 0.1 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine) before their transfer to a selective MSH medium containing cefotaxime (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and gentamycin (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). After 5 months, cells regenerated from callus were transferred into flasks with fresh medium.

Cell death

At the indicated time, triplicate samples of 200 μL were taken from the batch of cell suspensions and half diluted. Then, propidium iodide (PI) was added at a 10 μM final concentration. PI is a dye that accumulates in dead cells and can be visualized by fluorescence (λ excitation: 536 nm; λ emission: 617 nm). Cells accumulating IP, considered as dead, were counted and expressed as a percentage of total cells. Nine hundred cells were counted for each treatment, and a statistical test ANOVA was realized with *** $P < 0.05$.

Reactive oxygen species and nitric oxide measurements

The detection of NO using 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA) was performed according to Kulik *et al.* (2015). After being filtrated to remove the culture media, cells were gently washed and re-suspended in the MS10 buffer (10 mM Mes, pH 5.3, 240 mM Mannitol, 500 μM CaCl_2 and 500 μM K_2SO_4) before incubation for 1 h with 20 μM DAF-2DA. After three washes with MS10 buffer aimed at removing the excess of the probe, cells were transferred into 24-well plates (1 mL per well, Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) and maintained for 30 min under shaking before treatment with

cryptogein. NO production was measured with a spectrofluorometer (Mithras, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using 485 nm excitation and 535 nm emission filters. Fluorescence was expressed as relative fluorescence units.

Reactive oxygen species production was determined by chemiluminescence as previously described (Kulik *et al.* 2015) and expressed in nanomoles of H_2O_2 per gramme of cell fresh weight.

RESULTS

Cryptogein promotes an increased accumulation of NtCdc48

Our previous study showed that NtCdc48 undergoes *S*-nitrosylation in cryptogein-treated tobacco cell suspensions, highlighting its putative involvement in plant immunity (Astier *et al.* 2012). To further support this assumption, first, we checked whether cryptogein treatment could affect the amount of endogenous NtCdc48 in tobacco cells. For this purpose, proteins extracted from WT tobacco cells exposed to cryptogein were subjected to Western blot analysis using antibodies raised against endogenous NtCdc48. A similar experiment was performed in CL5 cell suspensions. These cells are impaired in type II histone deacetylase expression and display premature cell death and low production of ROS and nitrogen reactive species (Bourque *et al.* 2011; Kulik *et al.* 2015). As shown in Fig. 1a, in WT cells, two immunoreactive bands were detected: a 90 kDa band corresponding to the monomeric form of NtCdc48 and a second band with higher molecular weight. According to native gels (Supporting Information Fig. S1), the high molecular weight signal corresponds to a tightly bound NtCdc48 complex that resists denaturing treatments with detergents, chaotropic and reducing reagents, salts and temperature ranges (data not shown). These observations suggest the existence of tight interactions between NtCdc48 subunits that we were not able to dissociate. It should be specified that the occurrence of this immunoreactive band was impossible to predict in all our Western blot analysis against NtCdc48. Importantly, the level of NtCdc48 increased slightly within the first 6 h of cryptogein treatment and more strongly thereafter. Interestingly, compared with WT cells, in CL5 cells, the rate of NtCdc48 accumulation did not evolve within 12 h cryptogein but then drastically decreased (Fig. 1B). In these cells, the presence of the tightly bound NtCdc48 complex was less observed.

In order to check the proportion of NtCdc48 undergoing *S*-nitrosylation in WT cells facing cryptogein elicitation, we applied the biotin switch assay as previously reported (Wawer *et al.* 2010; Astier *et al.* 2012). Then, the biotinylated proteins (i.e. initially *S*-nitrosylated) were purified from the non-biotinylated ones (i.e. non-*S*-nitrosylated) by affinity. The presence of NtCdc48 in each fraction was analysed by Western blot (Fig. 1c). As a positive control, the *S*-nitrosylation of a recombinant NtCdc48 exposed to the NO donor nitrosoglutathione (GSNO) was provided. In response to cryptogein, a slight increase in the level of NtCdc48 *S*-nitrosylation was observed until 90 min. However, only a small proportion of NtCdc48 appeared to undergo *S*-

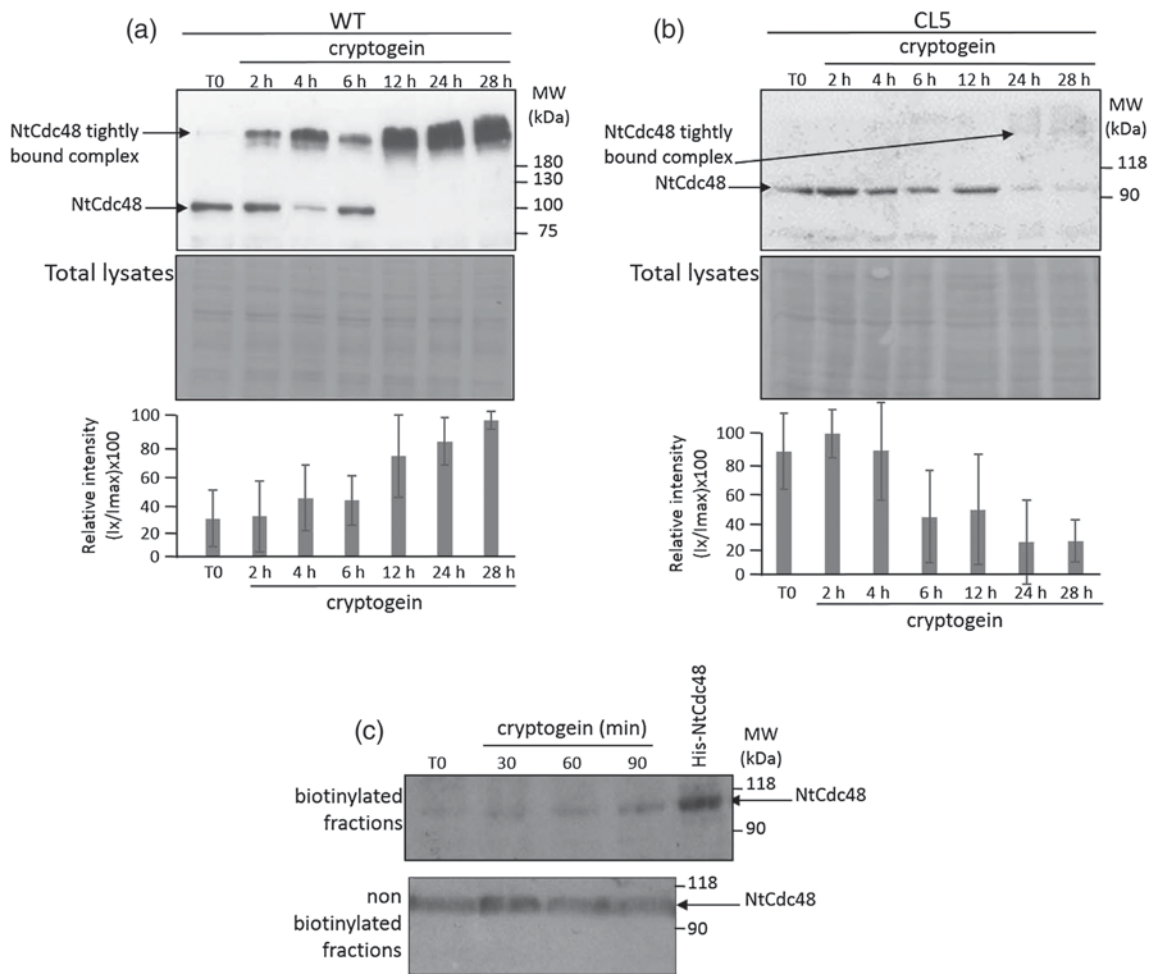


Figure 1. Analysis of NtCdc48 accumulation and *S*-nitrosylation in cryptogein-treated tobacco cells. (a and b) Time course of NtCdc48 accumulation. Wild-type (WT, a) and CL5 cells (b) were treated with 100 nM cryptogein. For each sample, 20 μ g of extracted proteins was separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and NtCdc48 accumulation was analysed by Western blotting. Protein loading was checked using Ponceau staining and is shown on the bottom panel. Results shown are one from six representative experiments. Relative levels of NtCdc48 signal intensities shown on lower panels were measured using IMAGEJ software; averages and standard deviations have been made from six repetitions. (c) Analysis of NtCdc48 *in vivo* *S*-nitrosylation. Wild-type cells were treated with 100 nM cryptogein. For each sample, 100 μ g of extracted proteins was subjected to the biotin switch assay, and the biotinylated proteins were purified by affinity using NeutraVidin agarose resin. Then, the biotinylated (i.e. *S*-nitrosylated) and non-biotinylated (i.e. non-*S*-nitrosylated) proteins were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-Cdc48 antibodies.

nitrosylation as most of the protein was clearly detected in the non-*S*-nitrosylated fraction.

Because the amount of NtCdc48 was affected by cryptogein treatment, next, we investigated whether this process was related to the expression of the corresponding gene or protein stability. We therefore measured the level of *NtCdc48* mRNA by quantitative real-time PCR in WT and CL5 cells exposed to cryptogein. In WT cells, the elicitor triggered a significant increase of *NtCdc48* transcript level after 4 h of treatment (Fig. 2b). This result suggests that the increase of NtCdc48 protein during the immune response is mainly due to an increase in the expression of the corresponding gene or an increase of its mRNA stability. In CL5 cells, we observed that cryptogein induced an early degradation of RNAs from 100 min of treatment (Fig. 2c). This degradation is linked to the premature death occurring in those cells (Bourque *et al.* 2011; Kulik *et al.*

2015; as discussed later). The accumulation of *NtCdc48* transcript in CL5 cells was therefore investigated before RNA degradation (Fig. 2d). We found that its level remained constant within the first 90 min of elicitation, supporting the observation that the level of the protein did not change in CL5 cells within the first hours of cryptogein treatment.

Altogether, these results highlighted that NtCdc48 is mobilized in cryptogein-induced immune response in WT cells. Furthermore, they showed that the dynamic of NtCdc48 accumulation is modified in CL5 cells showing premature cell death.

NtCdc48 is structured in hexamer in tobacco cells

Cdc48 is active in cellular functions as a homohexameric complex. Indeed, Cdc48 hexamerization, promoted by the

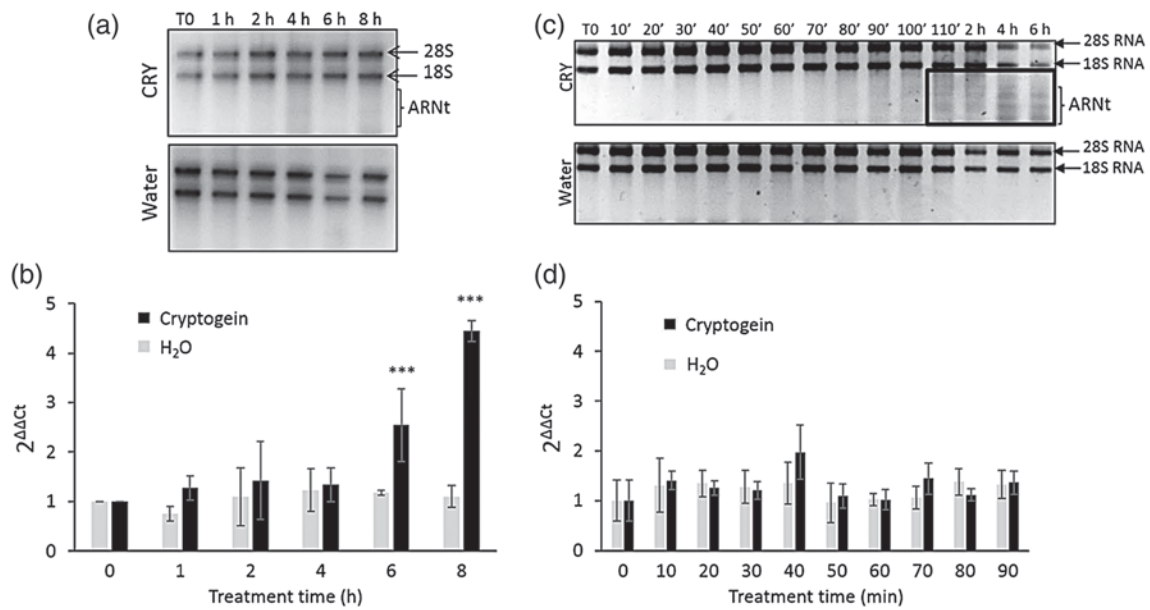


Figure 2. Accumulation of *NtCdc48* transcript in wild-type (WT) and CL5 cells. *NtCdc48* expression was measured in WT (b) and CL5 cells (d) elicited with 100 nM cryptogeiin. Accumulation of *NtCdc48* transcripts was measured by reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) using *L25* mRNA as a calibration gene. Three independent experiments were performed, and a statistical analysis was carried out by an ANOVA test (** $P < 0.05$). RNA quality was checked on agarose gel [(a) for WT cells (c) for CL5 cells].

interaction between ATP and the D1 domain, is required for chaperone activity, and a growing number of essential cofactors have been identified (Pye *et al.* 2006; Buchberger *et al.* 2010; Dantuma & Hoppe 2012; Wolf & Stolz 2012). In order to further characterize the involvement of NtCdc48 in cryptogeiin-induced defence responses in tobacco cells, we analysed whether it takes part in a complex and studied the size of this complex during the time course of the elicitor treatment. Thus, proteins extracted from cryptogeiin-treated WT and CL5 cells were subjected to gel filtration in native conditions. After separation by SDS-PAGE, the collected fractions were analysed by Western blot against Cdc48. In WT cells, without cryptogeiin treatment, NtCdc48 was detected in fractions 5, 6 and 7 that, according to calibration, correspond to molecular weights around 669 kDa (Fig. 3a, upper panel). Based on this molecular weight calibration, we assumed that NtCdc48 is present in its hexameric form. Accordingly, we did not observe its occurrence in fractions corresponding to its monomeric structure. Importantly, in fractions 5, 6 and 7, in addition to the 90 kDa signal, an immunoreactive signal with higher molecular weight was also detected in SDS-PAGE. As discussed in Fig. 1, this signal corresponds to a tightly bound NtCdc48 complex resisting to denaturing treatments. In CL5 cells, NtCdc48 was similarly detected in fractions 5–7, corresponding to the hexamer, but also in fraction 8, corresponding to smaller molecular weights. Therefore, the NtCdc48 complex might be less stable in this cell line (Fig. 3a, lower panel). As previously mentioned (Fig. 1), in CL5 cells, the tightly bound hexamer resistant to denaturing treatments was less detected compared with WT cells.

During the time course of cryptogeiin treatment, in WT cells, NtCdc48 was mainly found in fractions 5–7 corresponding to its hexameric structure and therefore active form (Fig. 3b). In elicited-CL5 cells, from 30 min to 6 h, the repartition of

NtCdc48 in the fractions was more spread, with the immunoreactive signals being detected in fractions 4–8 (Fig. 3c). As in WT cells, the protein might be structured as a hexamer. However, the stronger signal observed in fraction 4 indicates that the complex could have additional stable partners in CL5 cells. At later time points, the signal corresponding to NtCdc48 was hard to visualize in accordance with Fig. 1.

In sum, these data showed that NtCdc48 is found as a hexameric and potentially active complex in both WT and CL5 cells and also indicated that cryptogeiin might not promote its dissociation into the monomeric inactive form.

Identification of NtCdc48 partners

In animals, the involvement of Cdc48 in a particular cellular pathway is determined by the identity of its partners. In order to identify these pathways in plant immunity, we looked for NtCdc48 partners. For this purpose, proteins extracted in native conditions from cryptogeiin-treated or non-treated WT tobacco cells were co-immunoprecipitated with antibodies against endogenous NtCdc48. Next, the immunoprecipitated samples corresponding to NtCdc48 binding complexes in living cells were subjected to MS analysis. To deplete the protein extracts from non-specific partners of NtCdc48, a pre-incubation with an excess of beads coupled to protein A free from specific NtCdc48 antibody was performed. It should be noticed that the cryptogeiin sample corresponded to a pool of equal amount of proteins extracted from cells elicited for 5–90 min as the *S*-nitrosylation of NtCdc48 was observed within this time window (Fig. 1c; Astier *et al.* 2012). Three independent experiments were performed.

The search of matching proteins in *N. tabacum* sequences of Viridiplantae led to the identification of about 97 Cdc48

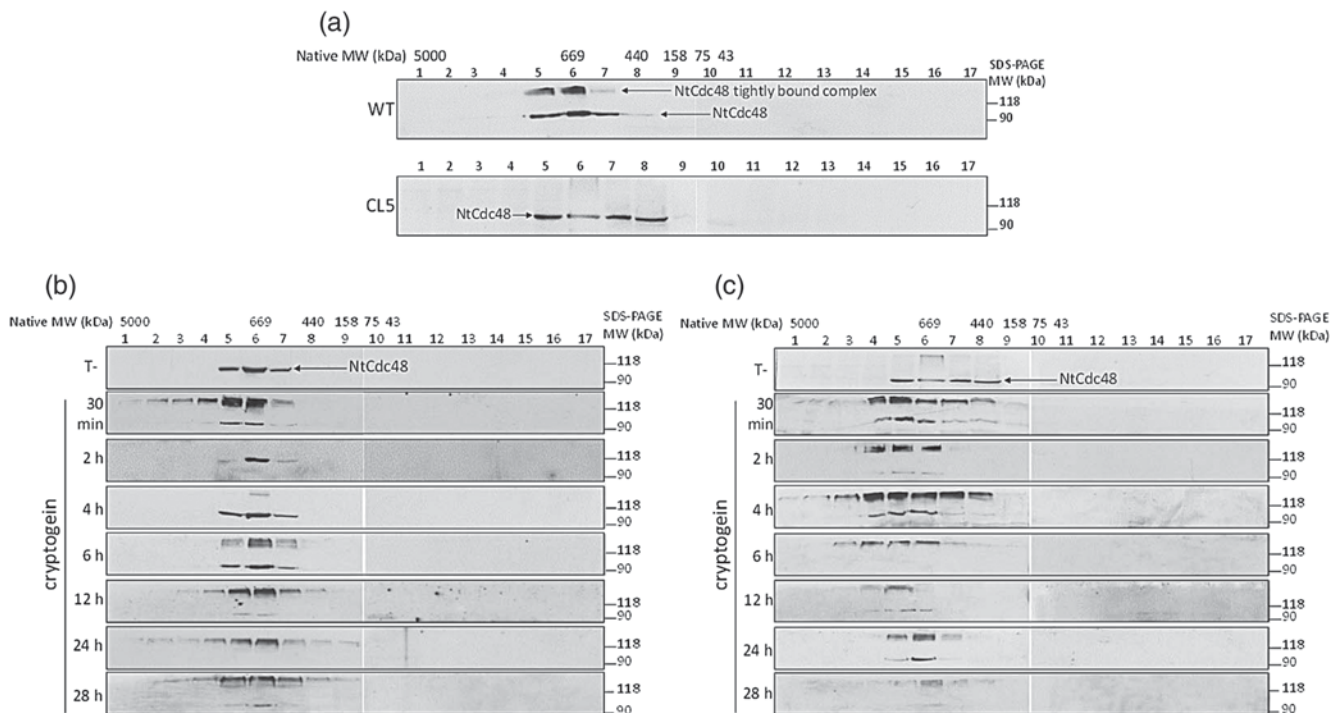


Figure 3. Gel filtration analysis of NtCdc48 structure in wild-type (WT) and CL5 cells. Proteins ($500 \mu\text{g}$ – 1 mg) extracted from cryptogeiin-treated WT and CL5 cells were separated according to their molecular weight using gel filtration chromatography. After trichloroacetic acid precipitation of each fraction, NtCdc48 was detected by Western blot analysis. (a) WT and CL5 cells without cryptogeiin treatment. (b) WT cells treated with cryptogeiin 100 nM for 28 h. (c) CL5 cells treated with cryptogeiin 100 nM for 28 h. Results shown are from one of two representative experiments.

recurrent partners (Table 1, Fig. 4 and Supporting Information Table S1). Importantly, no recurring difference in the partner's identity has been observed between cryptogeiin-treated and non-treated (control) samples. The fact that the identity of the proteins interacting with Cdc48 was identical in cryptogeiin-treated and non-treated cells suggests that Cdc48 did not recruit specific partners during the early time course of the immune response. Regarding the identity of the partners, the majority was related to primary metabolism and cellular energetic, underlying the chaperone activity of NtCdc48. Three other functional classes of partners were particularly indicative of NtCdc48 functions, namely proteins associated to protein quality control and ubiquitin–proteasome system degradation, to gene expression and to intracellular trafficking. Indeed, animal and yeast Cdc48 orthologues play a central role in these cellular processes, suggesting a conserved function of NtCdc48. Accordingly, several proteins found in our analysis were also identified as Cdc48 partners in animals and yeast such as ARF, polyubiquitin, proteasomal subunit proteins or 14.3.3 members (Zhang *et al.* 1997, 1999; Dai *et al.* 1998; Lavoie *et al.* 2000; Verma *et al.* 2000; Besche *et al.* 2009; Yu *et al.* 2013; Ackema *et al.* 2014). It is interesting to notice that about one-quarter of identified peptides were oxidized (data not shown), highlighting again the chaperone function of Cdc48. Another interesting functional class of NtCdc48 partners concerns proteins related to redox control including catalases, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. Identified partners localize in different subcellular compartments, including the cytosol,

the nucleus, the ER and the chloroplast (Table 1). As has been shown for its orthologues, this result suggests that NtCdc48 segregates proteins from complexes and/or membranes of different subcellular compartments (Meyer & Wehl 2014).

In order to complete this analysis and using a similar approach, the search of NtCdc48 partners was also investigated from protein samples extracted from cells elicited or not with cryptogeiin for 6 h. Indeed, as shown in Fig. 1, the accumulation of the protein was particularly enhanced from this time point. Two independent experiments were performed, and the identified NtCdc48 partners belonged to the same functional classes as those described earlier. Furthermore, here too, we did not identify partners specific to cryptogeiin treatment (Supporting Information Table S1g).

NtCdc48 interacts with NtARF

One interesting partner of NtCdc48 and showing a nice covering in MS is ARF (Supporting Information Fig. S2a). This small GTPase is indeed involved in subcellular trafficking (Beck *et al.* 2011; Stalder & Antonny 2013) and has been reported to play a role in plant immunity (Lee *et al.* 2003; Nomura *et al.* 2006, 2011; Coemans *et al.* 2008; Nielsen *et al.* 2012; Agbeci *et al.* 2013; Nielsen & Thordal-Christensen 2013). As ARF interacts with Cdc48 orthologues in yeasts (Ackema *et al.* 2014), in human (Yu *et al.* 2013) and with another member of the AAA+ ATPase family in tobacco (Lee & Sano 2007), we decided to confirm the interaction between tobacco NtARF and NtCdc48

Table 1. List of NtCdc48 partners classified by cellular function

Cellular function	Mass analysis
Bait	Putative spindle disassembly-related protein CDC48
Primary metabolism and energetic	Acetyl-coenzyme A carboxylase, adenosine kinase isoform 1S, 1T and 2S, adenosylhomocysteinase, ADH-like UDP-glucose dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase (NAD ⁺), argininosuccinate synthase, ascorbate peroxidase, asparagine synthetase, ATP synthase subunits alpha and alpha chloroplastic, cysteine synthase, cytosolic acetoacetyl-coenzyme A thiolase, enolase, fructokinase, fructose-bisphosphate aldolase, glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase chloroplastic, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cytosolic, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases A and B chloroplastic, isocitrate dehydrogenases: NAD ⁺ (precursor) and NADP, malate dehydrogenase, methionine synthase (<i>Nicotiana attenuate</i>), Mg-dependent ATPase 1, <i>N</i> -acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, NAD-dependent isocitrate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase, phosphoglycerate kinase chloroplastic and cytosolic, plastidic phosphoglucomutase, probable glutathione <i>S</i> -transferase, pyruvate kinase, ribulose bisphosphate carboxylase large chain, ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 and 2 chloroplastic, <i>S</i> -adenosylmethionine synthases 1 and 2, sucrose synthase, UDP-glucose 6-dehydrogenase, UDP-glucose pyrophosphorylase, uridine 5'-monophosphate synthase
Secondary metabolism	Geranylgeranyl diphosphate reductase chloroplastic, methylenetetrahydrofolate reductase, putative pyridoxine biosynthesis protein isoform A, spermidine synthase
Intracellular traffic	ADP ribosylation factor, clathrin heavy chains 1 and 2, dicarboxylate/tricarboxylate carrier, Hin19, small GTPase Rab2
Degradation and quality control	26S proteasome ATPase regulatory subunit 6, probable 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3, polyubiquitin, pentameric polyubiquitin, ubiquitin extension protein, luminal binding proteins 4 and 5, heat shock protein 70, 70-2, 70-3 and 90, molecular chaperone Hsp90, nascent polypeptide-associated complex alpha chain
Redox control	Catalase, catalase isozyme 1, cytosolic ascorbate peroxidase, pleiotropic drug resistance protein 1, superoxide dismutase
Gene expression	AGO4-2 (<i>Nicotiana benthamiana</i>), elongation factors: 1 gamma-like protein, 1-alpha and 2, eukaryotic initiation factors: 4A-10, 11 and 14, glycine-rich RNA-binding protein, RNA-binding glycine-rich protein, nuclear RNA-binding protein, nucleosome assembly protein 1-like protein 2, poly(A)-binding protein, tobacco nucleolin
Cellular structure	Actin, actin 2, 93 and 103, alpha-tubulin, beta-tubulin (<i>Nicotiana attenuate</i>)
14.3.3 proteins	14-3-3 proteins a-1, c-1, c-2 and h-1, 14-3-3-like protein C

Equal amounts of proteins (1 mg) extracted from wild-type (WT) tobacco cells elicited or not with cryptogin were immunoprecipitated with an antibody raised against NtCdc48. Next, NtCdc48 and its partners were charged on sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before gel cutting. Finally, the corresponding proteins were analysed by mass spectrometry for identification. Proteins found at least in 5 out of 10 co-immunoprecipitation (IP) experiments (six essays with a short cryptogin treatment time and four additional essays with a long cryptogin treatment time) are listed and divided in several cellular functions.

using a pull-down strategy. Therefore, His-tagged NtARF recombinant protein was firstly produced in *E. coli*, purified (Supporting Information Fig. S2b, left panel) and then fixed by affinity on Ni-NTA beads, these beads being incubated with proteins extracted from leaves transiently expressing GFP-NtCdc48 (Supporting Information Fig. S2c).

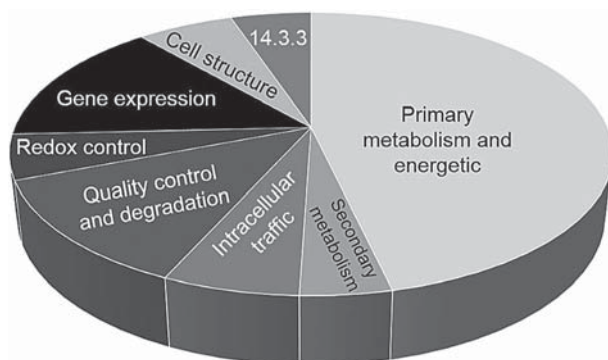


Figure 4. Functional representativeness of NtCdc48 partners. Diagram shows the quantitative distributions of NtCdc48 partners according to their functions.

As expected, the presence of His-NtARF was only detected in NtARF-linked beads using a Western blot against the His tag (Fig. 5a). A Western blot directed against the GFP tag allowed us to visualize a weak signal corresponding to GFP-NtCdc48 only in total lysate from infiltrated leaves and especially in pull-down with His-NtARF beads (Fig. 5b). Accordingly, this signal was not observed in non-infiltrated leaves or after incubation with free beads. Another pull-down was then performed using His-NtCdc48-linked beads incubated with protein extract from tobacco WT cells. His-NtCdc48 was only detected in NtCdc48-linked beads after Western blot against the His tag (Fig. 5c, upper panel), while a weak signal corresponding to endogenous NtARF was actually detected in pull-down with His-NtCdc48 beads using Western blot against NtARF (Fig. 5c, lower panel). Despite the weakness of the signals, these data support the possibility that NtARF and NtCdc48 might physically interact.

The level of NtARF accumulation was then studied in tobacco WT and CL5 cells treated by cryptogin for 2–28 h using Western blot against endogenous NtARF (Fig. 6). In WT cells, the amount of NtARF was constant throughout the time course of elicitation (Fig. 6a). In contrast, in CL5 cells exposed to cryptogin, the level of NtARF decreased within the first hours of cryptogin treatment (Fig. 6b). Similarly to NtCdc48

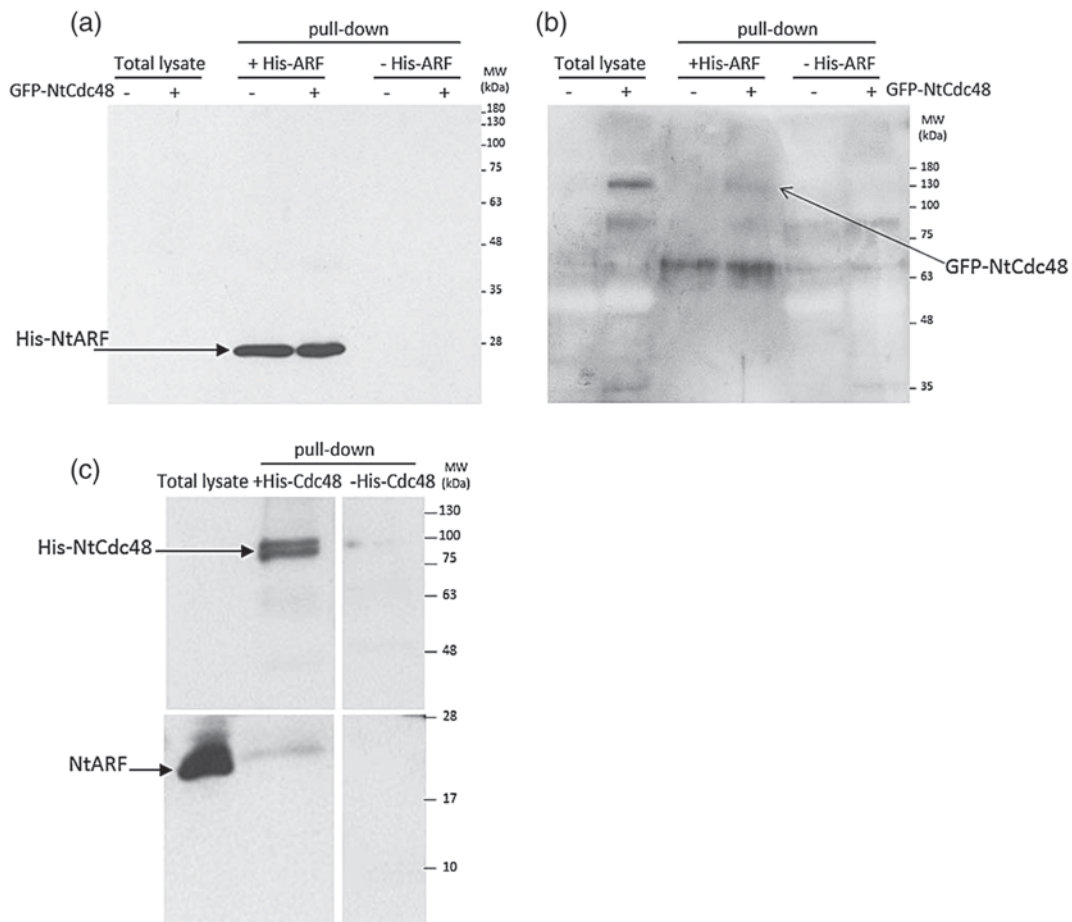


Figure 5. Interaction between NtARF and NtCdc48. (a and b) Pull-down of GFP-NtCdc48 with His-NtARF beads. His-NtARF recombinant proteins were fixed on Ni-NTA affinity slurry and incubated with total proteins extracted from leaves expressing GFP-NtCdc48. Negative controls have been performed with Ni-NTA beads without His-NtARF and with leaves non-expressing GFP-NtCdc48. (a) Western blot raised against His tag. (b) Western blot raised against GFP tag. (c) Pull-down of endogenous NtARF with His-NtCdc48 beads. His-NtCdc48 recombinant proteins were fixed on Ni-NTA affinity slurry and then incubated with total proteins extracted from wild-type (WT) tobacco cells. Negative controls have been performed with Ni-NTA beads free from His-NtCdc48. Western blot against His tag is shown on the upper panel, while Western blot raised against endogenous NtARF is visualized on the bottom panel.

(Fig. 1b), the protein was no longer detectable after 12 h of elicitation (Fig. 6b).

Taken together, these data confirm the possibility that NtARF might act as a partner for NtCdc48 and also indicate that, in contrast to WT cells, both proteins display a similar profile of accumulation in CL5 cells elicited by cryptogein.

Analysis of cryptogein-induced events in cells overexpressing NtCdc48

Impairment of Cdc48 expression was shown to be lethal in various organisms (Madeo *et al.* 1997; Wu *et al.* 1999; Müller *et al.* 2007; Imamura *et al.* 2012). In plants, Bae *et al.* (2009) reported that the suppression of Cdc48 expression in tobacco deeply impacts growth and development. In *A. thaliana*, Cdc48 T-DNA mutants arrested during seedling development (Park *et al.* 2008). Similarly, our attempts to generate tobacco cell lines invalidated in NtCdc48 expression failed as our construction

was lethal (data not shown). To overcome this limitation, we generated a tobacco suspension cell line overexpressing recombinant NtCdc48 with a tandem affinity purification tag at the C-terminal part of the protein. This line, named NtCdc48-TAP, was used to investigate the involvement of NtCdc48 in immunity.

Using Western blot raised against endogenous NtCdc48, we confirmed that, compared with WT cells, the NtCdc48-TAP line constitutively expressed a second immunoreactive band with a molecular mass of about 130 kDa corresponding to the NtCdc48-TAP recombinant fusion protein (Fig. 7a). Moreover, the ability of NtCdc48-TAP to assemble in hexamer was checked using gel filtration in native conditions (Fig. 7b). This result revealed the ability of the tagged protein to bind ATP in tobacco cells, interaction between ATP and D1 being required for hexamerization (Wang *et al.* 2003). In response to cryptogein treatment, the accumulation of NtCdc48-TAP increased within 2 h but then decreased

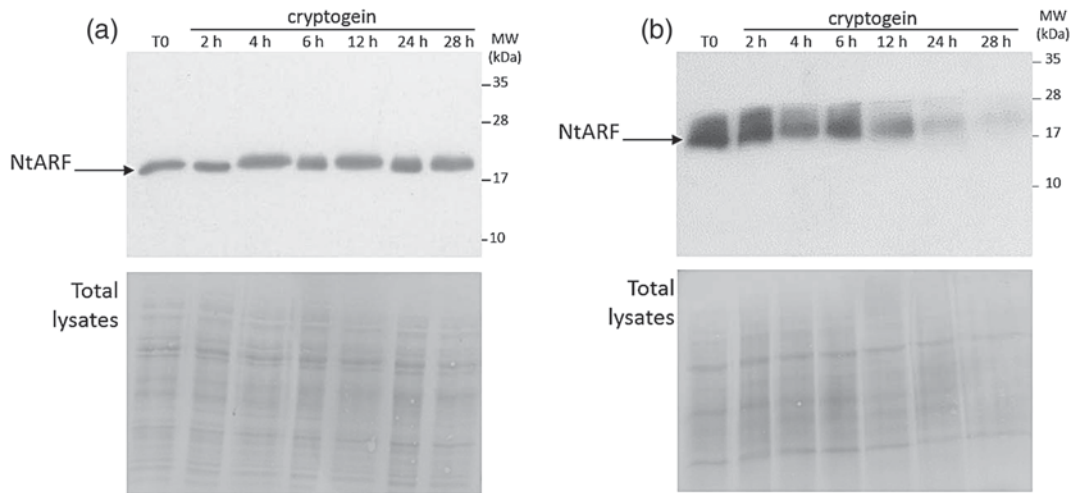


Figure 6. NtARF protein abundance in tobacco cells. Twenty microgrammes of proteins extracted from cryptogeiin (100 nM)-treated wild-type (a) and CL5 (b) cells was resolved using sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12%). NtARF was detected by Western blot (upper panels). Protein loading was checked by Ponceau staining (bottom panels). Results shown are from one of three representative experiments.

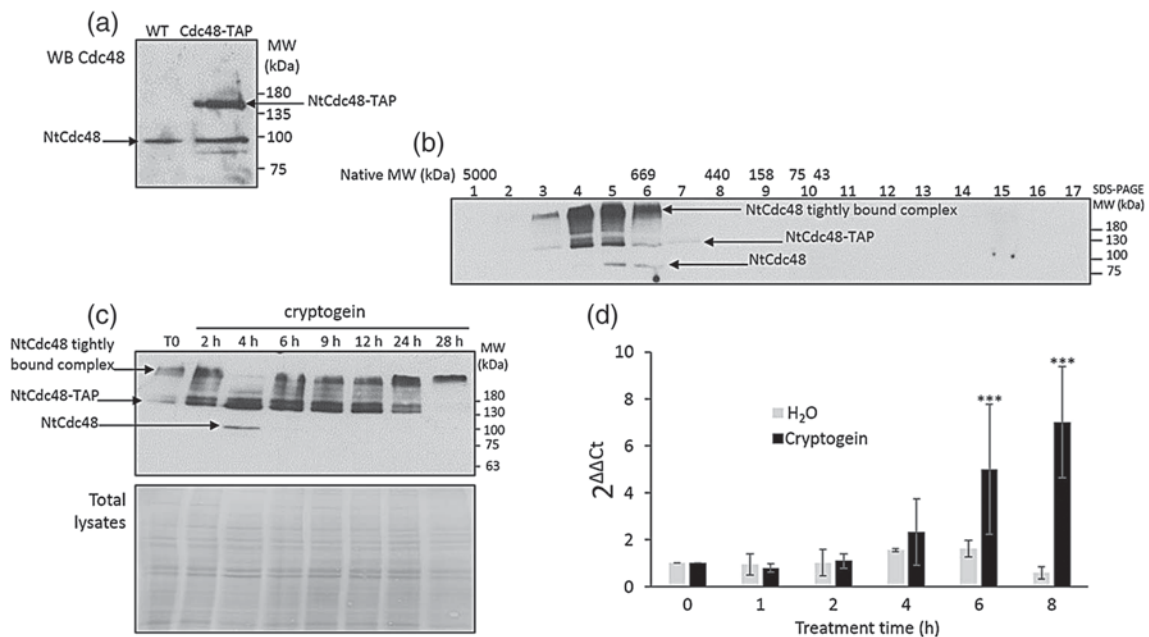


Figure 7. NtCdc48 protein abundance in NtCdc48-overexpressing tobacco cells. (a) Detection of NtCdc48-TAP in cells from transgenic callus using Western blot against endogenous NtCdc48. (b) Gel filtration analysis of NtCdc48 structure in NtCdc48-TAP cells. The experimental procedure was identical as the one described in the legend of Fig. 3. (c) Time course of endogenous NtCdc48 and NtCdc48-TAP accumulation in NtCdc48-TAP cells. The experimental procedure was identical to the one described in the legend of Fig. 1. Upper panel: Western blot against Cdc48; bottom panel: Ponceau staining. (d) Accumulation of *NtCdc48* transcripts in NtCdc48-TAP-overexpressing cells. The experimental procedure was identical to the one described in the legend of Fig. 2. Three independent experiments were performed, and a statistical analysis was carried out by an ANOVA test (***) $P < 0.05$.

after 12 h (Fig. 7c). Concerning the NtCdc48 tightly bound complex, as reported in Fig. 1a, its occurrence was more pronounced in the latter time of the experiment. Finally, as described in WT cells (Fig. 2b), the elicitor triggered a significant increase in *NtCdc48* mRNA level in the NtCdc48-TAP line (Fig. 7d).

We next analysed cryptogeiin-induced early events in the NtCdc48-TAP cell line including ROS and NO production as well as MAPK activation. Cryptogeiin triggered a fast and transient production of H₂O₂, which was similar in WT and NtCdc48-TAP cells (Fig. 8a). The production of NO was monitored using the NO-sensitive fluorophore

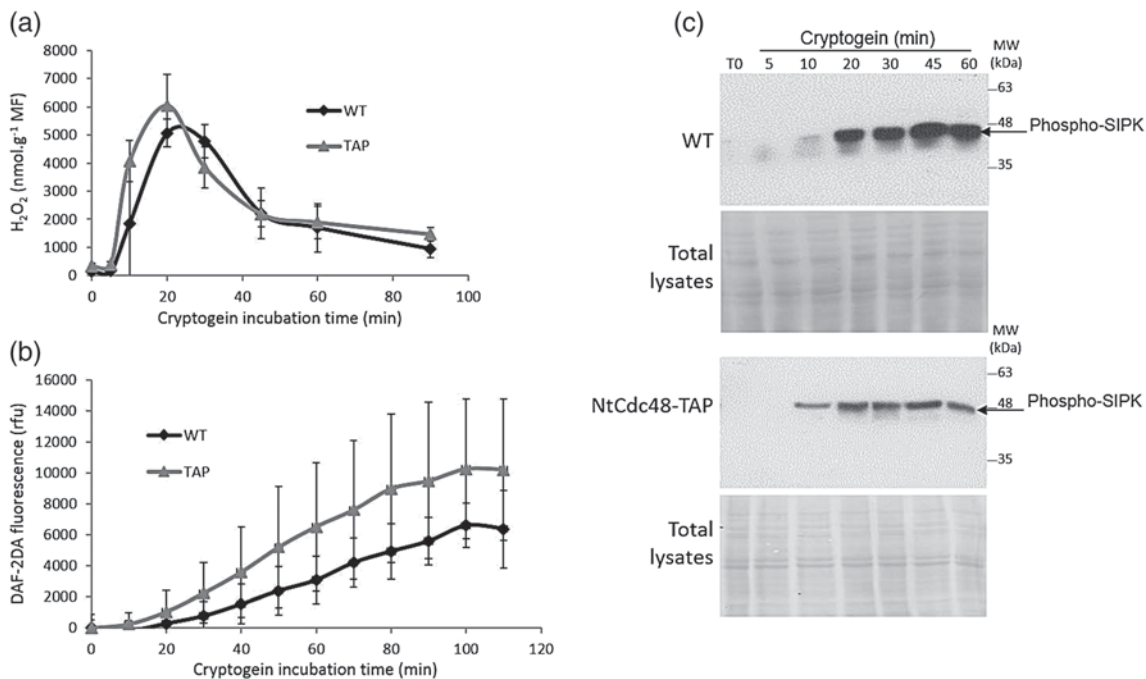


Figure 8. Analysis of cryptogei-induced reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production and mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation in NtCdc48-TAP cells. (a) Time course of H₂O₂ production in cryptogei-treated cells. Wild-type (WT) and NtCdc48-TAP cells were treated with 100 nM cryptogei. The concentration of H₂O₂ was measured by luminescence. For each time point, luminescence values obtained in cryptogei-treated cells were deduced from those measured in control cells non-treated with cryptogei. (b) NO production in cryptogei-treated cells. WT and NtCdc48-TAP tobacco cell suspensions were treated with 100 nM cryptogei. NO production was measured by fluorescence using the intracellular NO-sensitive fluorophore DAF-2DA. For each time point, fluorescence values obtained in cryptogei-treated cells were deduced from those measured in control cells non-treated with cryptogei. For panels a and b, each value represents the mean \pm standard error of nine measurements (three replicates per experiment performed three times). (c) Measurement of MAPK kinase phosphorylation in cryptogei-treated cells. Twenty microgrammes of proteins extracted from cryptogei (100 nM)-treated WT and NtCdc48-TAP cells was separated by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Phospho-MAPK was revealed using Western blotting. Protein loading was checked by Ponceau staining (bottom panels). Results shown are from one of three representative experiments.

DAF-2DA as previously reported (Lamotte *et al.* 2004; Besson-Bard *et al.* 2008; Kulik *et al.* 2015). Both lines displayed a similar NO synthesis manifested by an increase in DAF-2 triazole fluorescence (Fig. 8b). Regarding MAPK activation, previous studies showed that cryptogei induces the activation of the MAPK salicylic acid-induced protein kinase (SIPK) (Klessig *et al.* 2000; Dahan *et al.* 2009). The ability of cryptogei to trigger the activation of this MAPK in the NtCdc48-TAP cell line was investigated using Western blot raised against active phosphorylated MAPKs. As shown in Fig. 8c, in WT cells, the elicitor induced a rapid activation of a 48 kDa MAPK corresponding to SIPK as previously reported (Klessig *et al.* 2000; Dahan *et al.* 2009). Then, SIPK remained active during the 1 h treatment. Similar data were obtained in the NtCdc48-TAP tobacco cell line.

To complete this investigation, we analysed the impact of NtCdc48-TAP overexpression in cryptogei-induced cell death. The rate of cryptogei-induced cell death was studied in WT, NtCdc48-TAP and CL5 cell lines using PI fluorescence. According to previous results (Bourque *et al.* 2011; Kulik *et al.* 2015), CL5 cells exhibited a significantly higher rate of cell death in response to cryptogei, reaching 60% of death after 8 h, whereas only 20% of cell death occurred in WT at the same time (Fig. 9a). Interestingly, compared

with WT cells, from 4 h of elicitor treatment, the NtCdc48-TAP line showed a higher rate of cell death, reaching about 35% after 8 h. Cell death was accompanied by a global RNA degradation (Fig. 9b). To reinforce these data, we also analysed the accumulation of the transcript encoding the vacuolar processing enzymes (VPEs). VPEs were previously identified as caspase-1-like cysteine proteases promoting the disruption of vacuole integrity during HR (Hara-Nishimura *et al.* 2005; Lam 2005; Yamada *et al.* 2005). As previously reported by Gauthier *et al.* (2007), an increase in *NtVPEs* transcript accumulation was observed in WT tobacco cells elicited by cryptogei treatment (Fig. 9c). Interestingly, this accumulation occurred significantly earlier in the overexpressing cell line (Fig. 9d). These data highlight a correlation between NtCdc48 expression and cell death, suggesting a role of NtCdc48 in this process.

DISCUSSION

We previously identified NtCdc48 as a target of NO in tobacco cells undergoing an immune response induced by cryptogei (Astier *et al.* 2012). In the present study, we further investigated the function of this chaperone. Our results showed that cryptogei triggers an increased accumulation of both NtCdc48

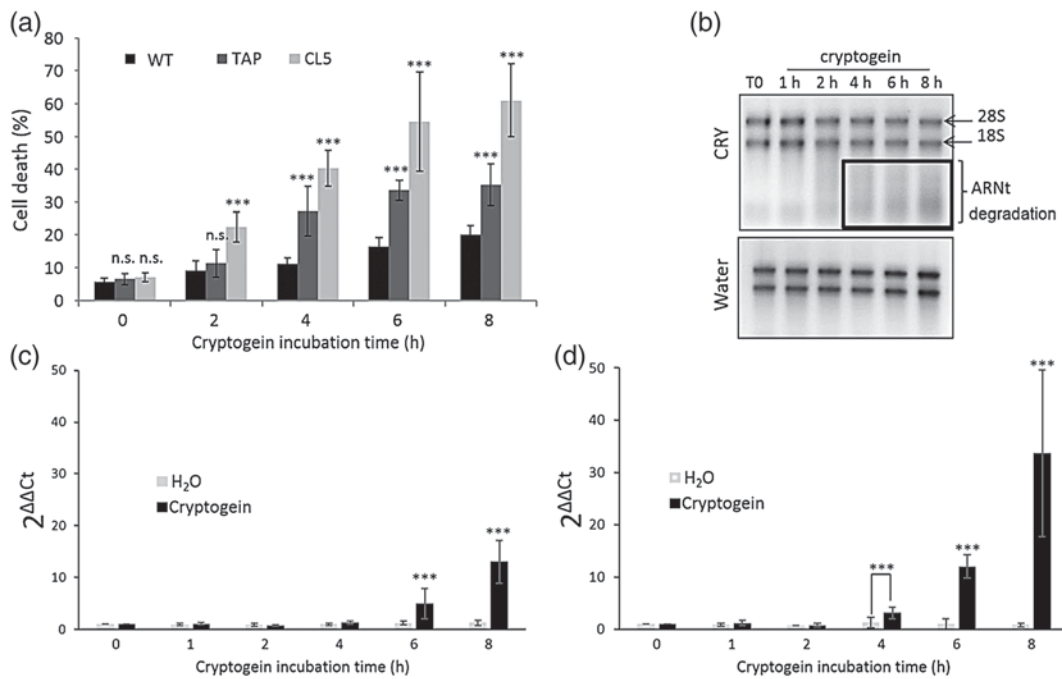


Figure 9. Analysis of cryptogeiin-induced cell death. (a) Rate of cell death in wild-type (WT), CL5 and NtCdc48-TAP cells. Cell suspensions were treated with 100 nM cryptogeiin. The percentage of dead cells was estimated at indicated time by propidium iodide (PI) fluorescence emission at 617 nm. Each value represents the mean of three independent experiments (\pm standard deviation). Statistical analysis was performed by ANOVA test ($***P < 0.05$). (b) RNA quality of cryptogeiin-treated NtCdc48-TAP-overexpressing cells checked on agarose gel. (c and d) Accumulation of *NiVPEs* transcripts in cryptogeiin (100 nM)-treated WT (c) and NtCdc48-TAP-overexpressing (d) cells measured by reverse-transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) using *L25* mRNA as a calibration gene. Three independent experiments were performed, and a statistical analysis was carried out by an ANOVA test ($***P < 0.05$).

transcript and protein and that its overexpression leads to an amplified cell death. Cdc48 hexameric structure was not impaired during the time course of elicitation, suggesting that it remained active. Accordingly, numerous partners of NtCdc48 were identified, thus providing a first global view of the cellular signalling pathways in which it is involved.

Our previous analysis showed that the *S*-nitrosylation of NtCdc48 on Cys-526 promotes subtle conformational changes of the protein and inhibits its ATPase activity *in vitro*. Paradoxically, our present findings provided support that NtCdc48 is potentially active in tobacco cells elicited by cryptogeiin. Firstly, we found that NtCdc48 is structured in a tightly bound hexamer corresponding to its active structure. Secondly, the protein is not impaired in the binding of partners/client proteins, suggesting that its chaperone function was kept during the immune response. Finally, cryptogeiin induced an enhanced accumulation of NtCdc48 after 6 h of treatment, reinforcing the assumption that the protein is mobilized in tobacco cells undergoing an immune response.

These statements raise the question of the incidence of Cdc48 *S*-nitrosylation in cryptogeiin signalling. NtCdc48 is most probably *S*-nitrosylated in its hexameric form as the monomer has never been observed in the gel filtration analysis. Consequently, while this process could inhibit Cdc48 activity as shown by *in vitro* assays on the recombinant protein (Astier *et al.* 2012), it probably does not impact the

oligomerization state of the protein. This argument is strengthened by a recent investigation in human colon cancer cells (Magnaghi *et al.* 2013). The authors reported that the pharmacological inhibitor MMS-859 covalently modifies Cys-522 (corresponding to Cys-526 in NtCdc48) on Cdc48 and introduces a steric hindrance preventing ATP binding on the D2 domain, unchanging the hexameric state of the complex. Another important point to take into account in the understanding of the impact of NO on Cdc48 is the proportion of NtCdc48 regulated by *S*-nitrosylation. As shown on Fig. 1c, only a low percent of NtCdc48 undergoes *S*-nitrosylation *in vivo*. This observation is not surprising as many studies reported that, *in vivo*, the *S*-nitrosylated form of a protein of interest represents a low proportion of the total protein population as shown for instance for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Wawer *et al.* 2010). In this scenario, NO produced in response to cryptogeiin might have a negligible effect on the overall cellular activity of the enzyme. Interestingly, Noguchi *et al.* (2005) also suggested that in *Drosophila*, Cdc48 acts as a sensor of the oxidative stress once oxidized on Cys-522 (corresponding to Cys-526 in NtCdc48), thus mediating protective function. Whether *S*-nitrosylated NtCdc48 could display such a function in cryptogeiin-induced response is an interesting hypothesis requiring future investigations.

We previously reported that NtCdc48 *S*-nitrosylation did not affect the oligomerization of the protein into its

hexameric structure (Astier *et al.* 2012). More generally, the mechanisms underlying the formation of the tightly bound NtCdc48 complex resisting denaturing treatments are not known. We observed that this complex occurs preferentially in WT cells and more rarely in CL5 cells. Moreover, the gel filtration analysis suggests that NtCdc48 takes part in a less stable complex in the CL5 cell line. We recently showed that the latter produces much lower ROS, NO and peroxynitrite in response to cryptogein as compared with WT cells (Kulik *et al.* 2015). This finding suggests that the mechanism responsible for the formation of the tightly bound complex could be redox dependent, ROS being able to trigger covalent bounds between proteins. This hypothesis will require further investigation.

We identified 97 recurrent NtCdc48-interacting proteins listed in the tobacco bank. None of these partners were found exclusively in control cells or in cryptogein-treated cells, whatever the time point of elicitation. However, we cannot exclude the hypothesis that quantitative rather than qualitative modifications of NtCdc48 partners occur during elicitation. To resolve this issue, a quantitative MS analysis will be required. The absence of specific NtCdc48 partners between control and elicited samples indicates that the functions of NtCdc48 are probably unmodified by cryptogein treatment. Furthermore, it minimizes the hypothesis that the S-nitrosylation of NtCdc48 modifies its binding properties with partners. On the other hand, the observation that NtCdc48 over-accumulated in cryptogein-elicited cells strongly suggests that it displays an enhanced activity during the immune response. Based on the identity of its targets, a main function of Cdc48 seems to be related to protein homeostasis as widely reported in animals and yeast (Baek *et al.* 2013). Indeed, numerous studies showed that Cdc48 constitutes a binding platform for the ubiquitylation machinery and delivers ubiquitin-modified client proteins to the proteasome for degradation. Accordingly, in our analysis, numerous actors of the ubiquitin–proteasome degradation process were caught, for example 26S proteasome subunits 3 and 6 and polyubiquitin and ubiquitin extension protein, as has been shown in other kingdoms (Grinyer *et al.* 2007; Besche *et al.* 2009). Importantly, this process is also mobilized in ERAD and mitochondria degradation pathway in which Cdc48 recognizes and segregates misfolded ubiquitylated proteins from ER or mitochondria and retrotranslocates them to the cytoplasm for subsequent proteasomal degradation (Hirsch *et al.* 2009; Taylor & Rutter 2011). In these pathways, Cdc48 acts with the help of cofactors including Npl4, Ufd1 or Vms1 in the mitochondria (Bosis *et al.* 2010; Heo *et al.* 2010; Stein *et al.* 2014). In plants, this mechanism is conserved (Müller *et al.* 2005), and some of these cofactors have punctually been identified as Cdc48 partners. In *A. thaliana* for instance, AtPUX7 is suggested to act as a bridge between one of the three NtCdc48 orthologues and ubiquitin via its UBX domain (Gallois *et al.* 2013). More recently, it has been shown that the AtCdc48A isoform physically associates with the heterodimeric cofactor Ufd1–Npl4, while 26S and 20S proteasome subunits were also caught as AtCdc48A partners (Mérail *et al.* 2014). In

our study, we were unable to find orthologues of Npl4 and Ufd1 as NtCdc48 partners but identified two luminal binding proteins (BiP 4 and 5). These ER-resident chaperones were shown to contribute to ERAD by recognizing and targeting abnormally folded proteins for degradation in cooperation with Cdc48 (Elkabetz *et al.* 2004; Rutledge *et al.* 2009).

More generally, this discussion underlines that Cdc48-dependent protein quality control machineries are probably induced in cryptogein-elicited tobacco cells. Accordingly, we and others previously showed that transcripts encoding ubiquitin ligases and proteasome subunits accumulate in response to cryptogein (Dahan *et al.* 2001; Kulik *et al.* 2015). It is reasonable to propose that the overall process is related to vigorous protein synthesis as highlighted by the identification of numerous transcripts accumulating in cryptogein-treated tobacco cells and plants (Hoeberichts *et al.* 2013; Kulik *et al.* 2015). Indeed, such enhancement in protein synthesis might be also accompanied by an increase of the level of misfolded proteins that cells need to degrade. This does not exclude a specific immune function of Cdc48 in plants as previously reported (Introduction section; Müller *et al.* 2005; Niehl *et al.* 2012). Finally, further linking NtCdc48 with protein homeostasis, we found that it also interacts with actors of gene expression. Because our protein extraction protocol eliminated most of the nuclear proteins, the majority of NtCdc48 partners of this category correspond to translation elongation and initiation factors, RNA and poly-A binding proteins. Our data fit other studies reporting that Cdc48/VCP and translation initiation/elongation factors belong to the same complexes in human cells and fungi (Grinyer *et al.* 2007; Yu *et al.* 2013).

Proteins related to primary metabolism are the most represented category of NtCdc48-interacting proteins. The MS analysis indicated that part of them is oxidized (data not shown), suggesting that these proteins might represent clients intended to be degraded through the ubiquitin–proteasome machinery. Proteins related to intracellular traffic also emerge as NtCdc48 partners as also found in other organisms (Pleasure *et al.* 1993; Meyer 2005; Ritz *et al.* 2011; Ramanathan & Ye 2012). Our attention was especially drawn to the small GTPase ADP ribosylation factor ARF, a key regulator of coated vesicle formation allowing membrane distortion (Beck *et al.* 2011). ARF1 and Cdc48 have previously been shown to interact, whether directly or not, and represent key regulators in the removing of misfolded proteins from mitochondria and subsequent degradation by the proteasome (Xu *et al.* 2011; Ackema *et al.* 2014). Moreover, ARF isoform, together with ARF-activating and ARF-binding proteins, was identified in the interactome of Cdc48 overexpressed in *Helicobacter pylori*-infected gastric cells (Yu *et al.* 2013). Using a pull-down strategy, we were able to confirm that NtCdc48 weakly interacts with NtARF. The weakness of signals suggests that NtCdc48 and NtARF might not interact directly but through intermediate partners. Indeed, ARF does not own a ubiquitin binding domain as is the case for most Cdc48 direct partners (Yeung *et al.* 2008). The identification of NtARF as a component of an

NtCdc48-containing protein complex is particularly relevant in the context of plant immunity in which the importance of membrane trafficking and secretion has been highlighted in numerous studies (Kwon *et al.* 2008; Leborgne-Castel *et al.* 2010; Beck *et al.* 2012; Agbeci *et al.* 2013; Hyodo *et al.* 2013; Nielsen & Thordal-Christensen 2013). In particular, modulation of host traffic proteins by effectors appears as an important strategy to increase pathogen survival and multiplication (Bozkurt *et al.* 2011; Gu & Innes 2012). This is precisely the case of the *Pseudomonas syringae* virulence factor HopM1 that specifically targets and mediates destruction of ARF-GEF via the host proteasome, suppressing vesicle traffic-associated defence in *A. thaliana* (DebRoy *et al.* 2004; Nomura *et al.* 2006). Accordingly, host cells were shown to counter bacterial virulence by blocking the ability of pathogen to degrade ARF-GEF protein (Nomura *et al.* 2011). Furthermore, a direct role for ARF in plant resistance has been described in *N. benthamiana* and in rice (Lee *et al.* 2003; Coemans *et al.* 2008). Notably, both studies pointed out that the overexpression of ARF triggers spontaneous lesions in leaves. It should be noticed that in contrast to these studies, we did not find an increased accumulation of NtARF in response to cryptogein, suggesting a distinct regulation. The function of NtARF in cryptogein signalling as well as the understanding of the impact of its interaction with NtCdc48 remains to be elucidated.

In animal as well as in yeast, Cdc48 was assigned to have anti-apoptotic functions in many studies (Braun & Zischka 2008; Magnaghi *et al.* 2013). More precisely, in these organisms, Cdc48 inhibition resulted in the activation of pro-apoptotic pathways and cell death, this process being linked to the accumulation of poly-ubiquitinated misfolded proteins. On the other hand, several investigations also proposed a pro-apoptotic role of functional Cdc48 (Higashiyama *et al.* 2002; Rao *et al.* 2004a,2004b). In this second scenario, Cdc48 has been suspected to be part of a complex involved in caspases 6 and 9 during apoptotic cell death (Rao *et al.* 2004b). Furthermore, in a *Drosophila* cellular model for eye degeneration, the Cdc48 orthologue ter94 was shown to trigger cell death pathway proceeding via a distinct pathway from the known cell death pathway, suggesting that ter94 is a cell death effector by itself (Higashiyama *et al.* 2002). Our study brings to light a putative function of NtCdc48 in the elicitor-triggered cell death. Supporting this function, its overexpression in tobacco cells led to an increased rate of cell death together with a faster overall RNA degradation and *NtVPEs* transcript accumulation during the course of elicitation. We examined whether the increased cell death of the NtCdc48-TAP overexpressor line was related to a modification in the production of NO and ROS, which act as mediators of cryptogein-induced cell death (Lamotte *et al.* 2004; Kulik *et al.* 2015). Our data clearly minimized this hypothesis. Altogether, these data raise the question of the mechanisms underlying NtCdc48 involvement in cell death and opens interesting future investigations.

In conclusion, our study designs NtCdc48 as a new actor of plant immunity and as putative regulator of cell death.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by La Région de Bourgogne (PARI AGRALE N° 38926 and AGREE n° 2014-9201AAO047S04455). C.R. was supported by a fellowship from La Région de Bourgogne (PARI AGREE project) and from the Université de Bourgogne (BQR project). We thank Agnès Klinguer for cell culture and maintenance.

REFERENCES

- Ackema K.B., Hench J., Böckler S., Wang S.C., Sauder U., Mergentaler H., ... Spang A. (2014) The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function. *EMBO Journal* **33**, 2659–2675.
- Agbeci M., Grangeon R., Nelson R.S., Zheng H. & Libalberté J.F. (2013) Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus. *PLoS Pathogen* **9**, e1003683.
- Aker J., Borst J.W., Karlova R. & de Vries S. (2006) The *Arabidopsis thaliana* AAA protein CDC48A interacts *in vivo* with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *Journal of Structural Biology* **156**, 62–71.
- Aker J., Hesselink R., Engel R., Karlova R., Borst J.W., Visser A.J. & de Vries S. C. (2007) *In vivo* hexamerization and characterization of the *Arabidopsis* AAA ATPase CDC48A complex using Förster resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Plant Physiology* **145**, 339–350.
- Astier J., Besson-Bard A., Lamotte O., Bertoldo J., Bourque S., Terenzi H. & Wendehenne D. (2012) Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogein signaling in tobacco cells. *Biochemical Journal* **447**, 249–260.
- Bae H., Choi S.M., Yang S.W., Pai H.S. & Kim W.T. (2009) Suppression of the ER-localized AAA ATPase NgCDC48 inhibits tobacco growth and development. *Molecular Cell* **28**, 57–65.
- Baek G.H., Cheng H., Choe V., Bao X., Shao J., Luo S. & Rao H. (2013) Cdc48: a swiss army knife of cell biology. *Journal of Amino Acids* **2013**, 183421.
- Beck R., Prinz S., Diestelkötter-Bachert P., Röhling S., Adolf F., Hoehner K., ... Wieland F. (2011) Coatomer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *Journal of Cell Biology* **194**, 765–777.
- Beck M., Heard W., Mbengue M. & Robatzek S. (2012) The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 367–374.
- Besche H.C., Haas W., Gygi S.P. & Goldberg A.L. (2009) Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. *Biochemistry* **48**, 2538–2549.
- Besson-Bard A., Griveau S., Bedioui F. & Wendehenne D. (2008) Real-time electrochemical detection of extracellular nitric oxide in tobacco cells exposed to cryptogein, an elicitor of defence responses. *Journal of Experimental Botany* **59**, 3407–3414.
- Bonnet P., Bourdon E., Ponchet M., Blein J.-P. & Ricci P. (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181–192.
- Bosis E., Salomon D., Ohayon O., Sivan G., Bar-Nun S. & Rabinovich E. (2010) Ssz1 restores endoplasmic reticulum-associated protein degradation in cells expressing defective cdc48-ufd1-npl4 complex by upregulating cdc48. *Genetics* **184**, 695–706.
- Bourque S., Dutartre A., Hammoudi V., Blanc S., Dahan J., Jeandroz J., ... Wendehenne D. (2011) Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytologist* **192**, 127–139.
- Bozkurt T.O., Schornack S., Win J., Shindo T., Ilyas M., Oliva R., ... Kamoun S. (2011) Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 20832–20837.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Braun R.J. & Zischka H. (2008) Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death: from yeast apoptosis to human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**, 1418–1435.

- Buchberger A., Bukau B. & Sommer T. (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Molecular Cell* **40**, 238–252.
- Chandran D., Tai Y.C., Hather G., Dewdney J., Denoux C., Burgess D.G., ... Wildermuth M.C. (2009) Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted processes and regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**, 1435–1451.
- Coemans B., Takahashi Y., Berberich T., Ito A., Kanzaki H., Matsumura H., ... Terauchi R. (2008) High-throughput *in planta* expression screening identifies an ADP-ribosylation factor (ARF1) involved in non-host resistance and R gene-mediated resistance. *Molecular Plant Pathology* **9**, 25–36.
- Dahan J., Etienne P., Petitot A.S., Houot V., Blein J.P. & Suty L. (2001) Cryptogein affects expression of alpha3, alpha6 and beta1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1947–1948.
- Dahan J., Pichereaux C., Rossignol M., Blanc S., Wendehenne D., Pugin A. & Bourque S. (2009) Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochemistry Journal* **418**, 191–200.
- Dai R.M., Chen E., Longo D.L., Gorbea C.M. & Li C.C. (1998) Involvement of valosin-containing protein, an ATPase co-purified with I κ B α and 26S proteasome, in ubiquitin-proteasome-mediated degradation of I κ B α . *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3562–3573.
- Dantuma N.P. & Hoppe T. (2012) Growing sphere of influence: Cdc48/p97 orchestrates ubiquitin-dependent extraction from chromatin. *Trends in Cell Biology* **22**, 483–491.
- DebRoy S., Thilmony R., Kwack Y.B., Nomura K. & He S.Y. (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9927–9932.
- Elkabetz Y., Shapira I., Rabinovich E. & Bar-Nun S. (2004) Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3980–3989.
- Erdmann R., Wiebel F.F., Flessau A., Rytka J., Beyer A., Fröhlich K.U. & Kunau W.H. (1991) PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* **64**, 499–510.
- Erzberger J.P. & Berger J.M. (2006) Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **35**, 93–114.
- Ewens C.A., Kloppsteck P., Förster A., Zhang X. & Freemont P.S. (2010) Structural and functional implications of phosphorylation and acetylation in the regulation of the AAA+ protein p97. *Biochemistry and Cell Biology* **88**, 41–48.
- Fares A., Rossignol M. & Peltier J.B. (2011) Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **416**, 331–336.
- Gallois J.L., Drouaud J., Lécureuil A., Guyon-Debast A., Bonhomme S. & Guerche P. (2013) Functional characterization of the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein AtPUX7 in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **526**, 299–308.
- Gauthier A., Lamotte O., Reboutier D., Bouteau F., Pugin A. & Wendehenne D. (2007) Cryptogein-induced anion effluxes: electrophysiological properties and analysis of the mechanisms through which they contribute to the elicitor-triggered cell death. *Plant Signaling & Behavior* **2**, 86–95.
- Grinyer J., Kautto L., Traini M., Willows R.D., Te'o J., Bergquist P. & Nevalainen H. (2007) Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. *Current Genetics* **51**, 79–88.
- Gu Y. & Innes R.W. (2012) The KEEP ON GOING protein of *Arabidopsis* regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infection. *The Plant Cell* **24**, 4717–4730.
- Hara-Nishimura I., Hatsugai N., Nakaune S., Kuroyanagi M. & Nishimura M. (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 404–408.
- Heo J.M., Livnat-Levanon N., Taylor E.B., Jones K.T., Dephore N., Ring J., ... Rutter J. (2010) A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Molecular Cell* **40**, 465–480.
- Higashiyama H., Hirose F., Yamaguchi M., Inoue Y.H., Fujikake N., Matsukage A. & Kakizuka A. (2002) Identification of ter94, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death and Differentiation* **9**, 264–273.
- Hirsch C., Gauss R., Horn S.C., Neuber O. & Sommer T. (2009) The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**, 453–460.
- Hoebrechts F.A., Davoine C., Vandorpe M., Morsa S., Ksas B., Stassen C., ... Van Breusegem F. (2013) Cryptogein-induced transcriptional reprogramming in tobacco is light dependent. *Plant Physiology* **163**, 263–275.
- Hu H., Xiong L. & Yang Y. (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**, 107–117.
- Hyodo K., Mine A., Taniguchi T., Kaido M., Mise K., Taniguchi H. & Okuno T. (2013) ADP ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus. *Journal of Virology* **87**, 163–176.
- Imamura S., Yabu T. & Yamashita M. (2012) Protective role of cell division cycle 48 (CDC48) protein against neurodegeneration via ubiquitin-proteasome system dysfunction during zebrafish development. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 23047–23056.
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., ... Wendehenne D. (2013) There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca²⁺ signaling. *Plant Physiology* **163**, 459–470.
- Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., ... Silva H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8849–8855.
- Koller K.J. & Brownstein M.J. (1987) Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin. *Nature* **325**, 542–545.
- Kulik A., Noirot E., Grandperret V., Bourque S., Fromentin J., Salloignon P., ... Wendehenne D. (2015) Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogein signaling. *Plant, Cell & Environment*, **38**, 331–348.
- Kwon C., Neu C., Pajonk S., Yun H.S., Lipka U., Humphry M., ... Schulze-Lefert P. (2008) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature* **451**, 835–840.
- Lam E. (2005) Vacuolar proteases livening up programmed cell death. *Trends in Cell Biology* **15**, 124–127.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., ... Wendehenne D. (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiology* **135**, 516–529.
- Lavoie C., Chevet E., Roy L., Tonks N.K., Fazel A., Posner B.I., ... Bergeron J.J. (2000) Tyrosine phosphorylation of p97 regulates transitional endoplasmic reticulum assembly *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13637–13642.
- Leborgne-Castel N., Adam T. & Bouhidel K. (2010) Endocytosis in plant-microbe interactions. *Protoplasma* **247**, 177–193.
- Lee M.H. & Sano H. (2007) Attenuation of the hypersensitive response by an ATPase associated with various cellular activities (AAA) protein through suppression of a small GTPase, ADP ribosylation factor, in tobacco plants. *The Plant Journal* **51**, 127–139.
- Lee W.Y., Hong J.K., Kim C.Y., Chun H.J., Park H.C., Kim J.C., ... Lim C.O. (2003) Over-expressed rice ADP-ribosylation factor 1 (RARF1) induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* **119**, 573–581.
- Madeo F., Fröhlich E. & Fröhlich K.U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *Journal of Cell Biology* **139**, 729–734.
- Madsen L., Seeger M., Semple C.A. & Hartmann-Petersen R. (2009) New ATPase regulators – p97 goes to the PUB. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **41**, 2380–2388.
- Magnaghi P., D'Alessio R., Valsasina B., Avanzi N., Rizzi S., Asa D., ... Isacchi A. (2013) Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nature Chemical Biology* **9**, 548–556.
- Marshall R.S., Jolliffe N.A., Ceriotti A., Snowden C.J., Lord J.M., Frigerio L. & Roberts L.M. (2008) The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 15869–15877.
- Mérai Z., Chumak N., García-Aguilar M., Hsieh T.F., Nishimura T., Schoft V. K., ... Tamaru H. (2014) The AAA-ATPase molecular chaperone Cdc48/p97 disassembles sumoylated centromeres, decondenses heterochromatin, and activates ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 16166–16171.
- Meyer H.H. (2005) Golgi reassembly after mitosis: the AAA family meets the ubiquitin family. *Biochimica et Biophysica Acta* **1744**, 481–492.
- Meyer H. & Wehl C.C. (2014) The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *Journal of Cell Science* **127**, 3877–3883.
- Meyer H., Bug M. & Bremer S. (2012) Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nature Cell Biology* **14**, 117–123.

- Moir D., Stewart S.E., Osmond B.C. & Botstein D. (1982) Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**, 547–563.
- Müller J., Piffanelli P., Devoto A., Miklis M., Elliott C., Ortmann B., ... Panstruga R. (2005) Conserved ERAD-like quality control of a plant polytopic membrane protein. *The Plant Cell* **17**, 149–163.
- Müller J.M., Deinhardt K., Rosewell I., Warren G. & Shima D.T. (2007) Targeted deletion of p97 (VCP/CDC48) in mouse results in early embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **354**, 459–465.
- Niehl A., Amari K., Gereige D., Brandner K., Mély Y. & Heinlein M. (2012) Control of tobacco mosaic virus movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48. *Plant Physiology* **160**, 2093–2108.
- Nielsen M.E. & Thordal-Christensen H. (2013) Transcytosis shuts the door for an unwanted guest. *Trends in Plant Science* **18**, 611–616.
- Nielsen M.E., Feechan A., Böhlenius H., Ueda T. & Thordal-Christensen H. (2012) *Arabidopsis* ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 11443–11448.
- Noguchi M., Takata T., Kimura Y., Manno A., Murakami K., Koike M., ... Kakizuka A. (2005) ATPase activity of p97/valosin-containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 41332–41334.
- Nomura K., DebRoy S., Lee Y.H., Pumphlin N., Jones J. & He S.Y. (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**, 220–223.
- Nomura K., Mecy C., Lee Y.N., Imboden L.A., Chang J.H. & He S.Y. (2011) Effector-triggered immunity blocks pathogen degradation of an immunity-associated vesicle traffic regulator in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10774–10779.
- Ogura T. & Wilkinson A.J. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure – diverse function. *Genes to Cells* **6**, 575–597.
- O'Quin J.B., Bourassa L., Zhang D., Shockey J.M., Gidda S.K., Fosnot S., ... Dyer J.M. (2010) Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 21781–21796.
- Park S., Rancour D.M. & Bednarek S.Y. (2007) Protein domain–domain interactions and requirements for the negative regulation of *Arabidopsis* CDC48/p97 by the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein, PUX1. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 5217–5224.
- Park S., Rancour D.M. & Bednarek S.Y. (2008) In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiology* **148**, 246–258.
- Pleasure I.T., Black M.M. & Keen J.H. (1993) Valosin-containing protein, VCP, is a ubiquitous clathrin-binding protein. *Nature* **365**, 459–462.
- Pye V.E., Drevényi I., Briggs L.C., Sands C., Beuron F., Zhang X. & Freemont P.S. (2006) Going through the motions: the ATPase cycle of p97. *Journal of Structural Biology* **156**, 12–28.
- Ramanathan H.N. & Ye Y. (2012) The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Research* **22**, 346–359.
- Rancour D.M., Dickey C.E., Park S. & Bednarek S.Y. (2002) Characterization of AtCDC48. Evidence for multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants. *Plant Physiology* **130**, 1241–1253.
- Rancour D.M., Park S., Knight S.D. & Bednarek S.Y. (2004) Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1, regulates the oligomeric structure and activity of *Arabidopsis* CDC48. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 54264–54274.
- Rao R.V., Ellerby H.M. & Bredesen D.E. (2004a) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death and Differentiation* **11**, 372–380.
- Rao R.V., Poksay K.S., Castro-Obregon S., Schilling B., Row R.H., del Rio G., ... Bredesen D.E. (2004b) Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 177–187.
- Rienties I.M., Vink J., Borst J.W., Russinova E. & de Vries S.C. (2005) The *Arabidopsis* SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14lambda and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta* **221**, 394–405.
- Ritz D., Vuk M., Kirchner P., Bug M., Schütz S., Hayer A., ... Meyer H. (2011) Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations. *Nature Cell Biology* **13**, 1116–1123.
- Rutledge A.C., Qiu W., Zhang R., Kohen-Avramoglu R., Nemat-Gorgani N. & Adeli K. (2009) Mechanisms targeting apolipoprotein B100 to proteasomal degradation: evidence that degradation is initiated by BiP binding at the N terminus and the formation of a p97 complex at the C terminus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **29**, 579–585.
- Schmidt G.W. & Delaney S.K. (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* **283**, 233–241.
- Stalder D. & Antonny B. (2013) Arf GTPase regulation through cascade mechanisms and positive feedback loops. *FEBS Letters* **587**, 2028–2035.
- Stein A., Ruggiano A., Carvalho P. & Rapoport T.A. (2014) Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components. *Cell* **158**, 1375–1388.
- Taylor E.B. & Rutter J. (2011) Mitochondrial quality control by the ubiquitin–proteasome system. *Biochemical Society Transactions* **39**, 1509–1513.
- Trapet P., Kulik A., Lamotte O., Jeandroz S., Bourque S., Nicolas-Francès V., ... Wendehenne D. (2015) NO signaling in plant immunity: a tale of messengers. *Phytochemistry* **112**, 72–79.
- Verma R., Chen S., Feldman R., Schieltz D., Yates J., Dohmen J. & Deshaies R.J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 3425–3439.
- Wang Q., Song C. & Li C.C. (2003) Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* **300**, 253–260.
- Wawer I., Bucholtz M., Astier J., Anielska-Mazur A., Dahan J., Kulik A., ... Wendehenne D. (2010) Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochemical Journal* **429**, 73–83.
- Wolf D.H. & Stolz A. (2012) The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823**, 117–124.
- Wu D., Chen P.J., Chen S., Hu Y., Nuñez G. & Ellis R.E. (1999) C. elegans MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development* **126**, 2021–2031.
- Xu S., Peng G., Wang Y., Fang S. & Karbowski M. (2011) The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 291–300.
- Yamada K., Shimada T., Nishimura M. & Hara-Nishimura I. (2005) AVPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiologia Plantarum* **123**, 369–375.
- Yeung H.O., Klopsteck P., Niwa H., Isaacson R.L., Matthews S., Zhang X. & Freemont P.S. (2008) Insights into adaptor binding to the AAA protein p97. *Biochemical Society Transactions* **36**, 62–67.
- Yu C.C., Yang J.C., Chang Y.C., Chuang J.G., Lin C.W., Wu M.S. & Chow L.P. (2013) VCP phosphorylation-dependent interaction partners prevent apoptosis in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *PLoS One* **8**, e55724.
- Zhang S.H., Kobayashi R., Graves P.R., Piwnicka-Worms H. & Tonks N.K. (1997) Serine phosphorylation-dependent association of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1 with 14-3-3beta protein. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 27281–27287.
- Zhang S.H., Liu J., Kobayashi R. & Tonks N.K. (1999) Identification of the cell cycle regulator VCP (p97/CDC48) as a substrate of the band 4.1-related protein-tyrosine phosphatase PTPH1. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17806–17812.

Received 2 September 2015; received in revised form 20 November 2015; accepted for publication 27 November 2015

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. NtCdc48 abundance on native gel. Ten microgrammes of proteins extracted from wild-type cells was resolved using native gel (6%, without any detergent or reducing agent). NativeMark™ Unstained Protein Standard (Life Technologies) was used as a molecular weight marker. After transfer on nitrocellulose membrane in native conditions, NtCdc48 was revealed using Western blot. Results shown are one from three representative experiments.

Figure S2. Production of recombinant NtARF and NtCdc48. (a) NtARF sequence from UniProtKB with matching peptides (in bold) found in co-IP. (b) Purification of His-NtARF (left panel) and His-NtCdc48 (right panel) recombinant proteins produced in *Escherichia coli* cells. Purifications have been performed using Ni²⁺-affinity chromatography by fast protein liquid chromatography (FPLC). Eluted fractions of interest have been selected based on sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie blue staining. (c) GFP-NtCdc48 expression in leaves using epifluorescence microscopy.

Table S1a. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in the first sample of control cells. Control cells were harvested and proteins were extracted in native conditions. Proteins were first submitted to pre-clearing with excess of protein A beads free from antibody and then incubated with NtCdc48 antibody before addition of protein A beads. After incubation overnight at 4 °C under gentle agitation and extensive wash, NtCdc48 and its partners were eluted with loading buffer, reduced and alkylated, charged on sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) before gel cutting and sample sending for mass spectrometry analysis. Each protein set was blasted in Viridiplantae [uniprotkb_viridiplantae (protein)] in order to identify the corresponding *Nicotiana tabacum* protein if listed in the database (last column).

Table S1b. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in the first sample of cryptogeiin-treated cells. Cryptogeiin-

treated cells during 5–90 min were harvested, and then proteins were extracted in native conditions. Then the same protocol as described Table S1a was used.

Table S1c. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in the second sample of control cells. For legend, see Table S1a.

Table S1d. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in the second sample of cryptogeiin-treated cells. For legend, see Table S1b.

Table S1e. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in the third sample of control cells. For legend, see Table S1a.

Table S1f. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in the third sample of cryptogeiin-treated cells. For legend, see Table S1b.

Table S1g. Mass spectrometry analysis of NtCdc48 binding proteins in two additive independent experiments. Protein samples were extracted in native conditions from tobacco control and cryptogeiin-treated cells during 6 h. Each set of proteins was treated as specified Table S1a. Each protein set was blasted in Viridiplantae [uniprotkb_viridiplantae (protein)] in order to identify the corresponding *Nicotiana tabacum* proteins that are listed here.

Table S1h. Significant partners of NtCdc48. NtCdc48 partners from all assays (Tables S1a–g) were compared and considered as being significant when identified in five out of 10 immunoprecipitation (IP) samples.

Chapitre 2

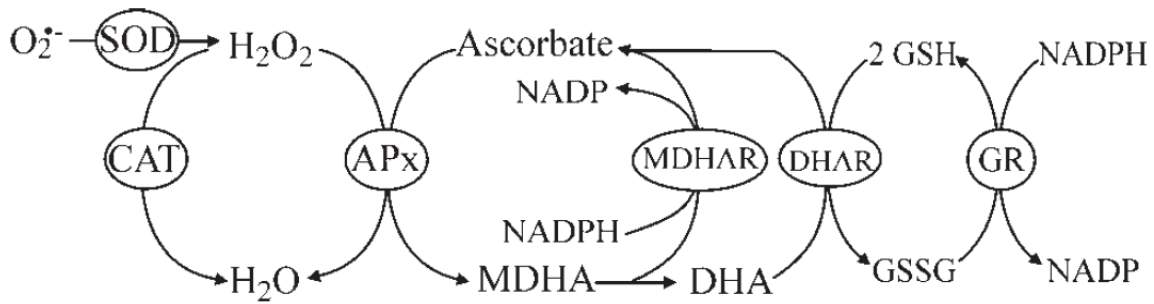
Régulation de l'ascorbate peroxydase cytosolique par la protéine CDC48 dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine

1. Contexte de l'article et principaux résultats

1.1. Contexte et objectifs de l'étude

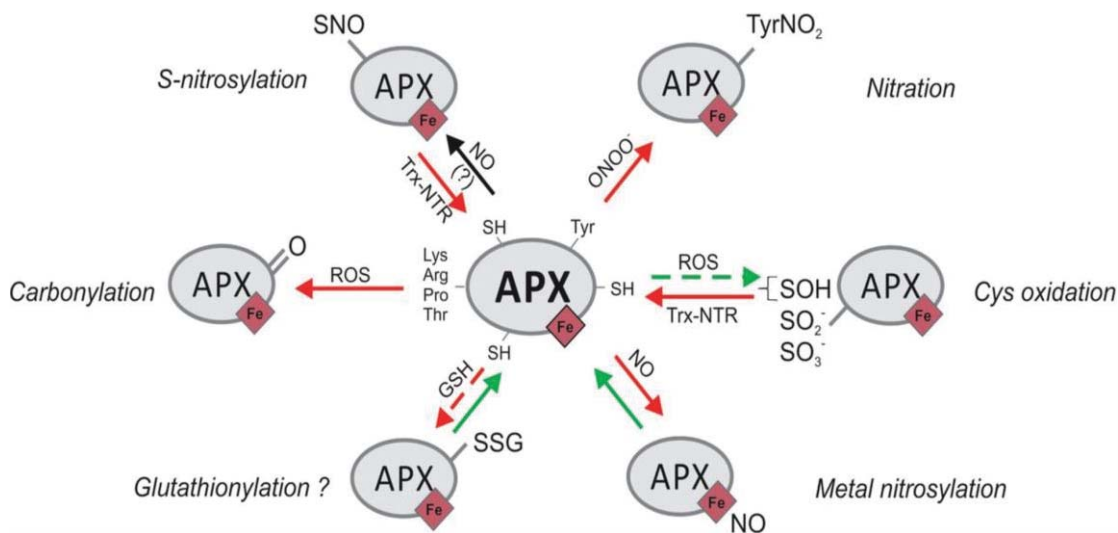
Nous avons établi que CDC48 est mobilisée dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine, identifié plusieurs de ses partenaires protéiques et mis en évidence son rôle potentiel dans la régulation de la mort cellulaire (**Chapitre 1** ; Rosnoblet et al., 2017). Afin de mieux cerner le rôle de CDC48, une étude fine de l'incidence cellulaire de son interaction avec certains de ses partenaires a été entreprise. Parmi ces derniers (Rosnoblet et al., 2017), trois sont des acteurs clé du statut redox cellulaire, à savoir la superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), la catalase (EC 1.11.1.6) et l'ascorbate peroxydase cytosolique (cAPX ; EC 1.11.1.11). La catalase et cAPX présentent des activités anti-oxydantes et sont associées à la détoxification des FAO (Gill and Tuteja, 2010) ; la SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H₂O₂. Ces protéines sont donc impliquées dans le contrôle du taux de FAO et sont classiquement activées lors de la réponse immunitaire et plus généralement dans les processus cellulaires impliquant des productions d'entités oxydantes (**Fig. Int.4**). Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes focalisés sur l'étude de l'interaction entre CDC48 et cAPX dans la réponse immunitaire déclenchée par la cryptogéine.

Chez le tabac, 3 isoformes d'APX existent, une forme cytosolique (cAPX), et deux formes chloroplastiques (sAPX : *stroma*-APX et tAPX : *thylakoid-bound* APX) (Madhusudhan et al., 2003; Orvar and Ellis, 1995). Comme souligné précédemment, cAPX est une des enzymes clé de la détoxification intracellulaire d'H₂O₂ (Mittler et al., 2004) et est impliquée dans la régulation de nombreux stress abiotiques et biotiques et, plus généralement, dans l'homéostasie des FAO



(Teixeira et al., 2005)

Figure 2.1 Voie de détoxication des espèces réactives de l'oxygène chez les plantes impliquant APX. Abréviations: APX Ascorbate peroxidase; CAT Catalase; DHA Dehydroascorbate; DHAR DHA Reductase; MDHA Monodehydroascorbate; MDHAR MDHA Reductase; GR Glutathion reductase; GSH Glutathion réduit. Extrait de Teixeira et al., 2005.



(Correa-Aragunde et al., 2015)

Figure 2.2 Modifications post-traductionnelles de l'ascorbate peroxydase cytosolique (cAPX) induites par les FAO et les RNS. Certains résidus d'acides aminés d'APX peuvent être la cible de carbonylation, de S-nitrosylation, d'oxydation, de tyrosine nitration, de métal-nitrosylation et éventuellement de glutathionylation. Certaines oxydations et S-nitrosylation de résidus cystéines peuvent être réduites par des thioredoxine-NADPH-thioredoxine reductase (Trx-NTR). Les flèches vertes indiquent que ces modifications activent APX, alors que les rouges indiquent que ces modifications inhibent l'activité APX. La flèche noire indique des données contradictoires sur la conséquence de la S-nitrosylation. Les flèches en pointillés indiquent que ces données n'ont pas été vérifiées expérimentalement. Adapté de Correa-Aragunde et al., 2015.

(Anjum et al., 2016). Cette enzyme, dont l'homodimérisation a été décrite comme nécessaire à son activité (Hong et al., 2018; Mittler and Zilinskas, 1991), fonctionne avec deux molécules au fort pouvoir antioxydant, l'ascorbate et le glutathion (**Fig. 2.1**) (Foyer and Noctor, 2011). En effet, la réduction de l' H_2O_2 par cAPX nécessite l'ascorbate comme donneur d'électron, les produits de cette réaction étant H_2O et le dihydroascorbate (DHA) (Asada, 1999). Le DHA est régénéré en ascorbate par le GSH soit chimiquement, soit enzymatiquement *via* l'action des DHA réductases (DHAR) qui constituent une classe de glutathion S-transférases (GST) (Dixon et al., 2002). Malgré cette proximité fonctionnelle, le lien entre ces trois molécules ne peut pas simplement se réduire à un système compensatoire dans lequel la variation des teneurs en ascorbate et GSH est gouvernée uniquement par l'activité d'APX, puisque leurs quantités sont également dépendantes d'autres événements cellulaires (Fotopoulos et al., 2010; Gong et al., 2018; Smirnoff and Wheeler, 2000).

L'activité de l'ascorbate peroxydase est finement régulée par des modifications post-traductionnelles (**Fig. 2.2**). cAPX peut ainsi subir une carbonylation lors d'une production excessive de FAO (Bai et al., 2011). Des résidus cysteinyl peuvent également être oxydés et, suivant le taux d'oxydation, ce processus peut être réversible grâce à l'action d'une thioredoxine-NADPH-thioredoxine reductase (Trx-NTR) (Gelhaye et al., 2005; Marchand et al., 2004; Yamazaki et al., 2004). Le NO et ses dérivés peuvent promouvoir la S-nitrosylation du résidu cysteinyl 32 se situant à proximité immédiate du site actif (résidu 33 à 44) (Bai et al., 2011; Begara-Morales et al., 2014; Correa-Aragunde et al., 2015; Fares et al., 2011; de Pinto et al., 2013), la métal-nytrosylation du fer hémique (Clark et al., 2000) et la nitration des résidus tyrosine 5 et 235 (Begara-Morales et al., 2014). Suivant les études, la S-nitrosylation a des effets opposés. Par exemple, chez le pois durant un stress salin, la S-nitrosylation de cAPX stimule son activité (Begara-Morales et al., 2014), alors que chez le tabac BY-2 (*Bright Yellow 2*), lors de la mise en place de la mort cellulaire induite par un stress thermique, la S-

nitrosylation de cAPX inhibe son activité enzymatique et serait un signal nécessaire à son ubiquitination puis à sa dégradation par le protéasome (de Pinto et al., 2013).

L'étude de de Pinto et al. (2013) a apporté des premiers éléments démontrant que cAPX est ciblée par la voie UPS, sa dégradation pouvant impacter le taux intracellulaire d'H₂O₂. Au regard de son implication dans le processus de contrôle qualité de protéines en interaction avec l'UPS, nous avons émis l'hypothèse que CDC48 pouvait être un acteur important du turnover de cAPX lors de la réponse immunitaire. Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un article scientifique soumis à *Journal of Experimental Botany* où je suis premier auteur. Le résumé de ce travail, ainsi que les résultats complémentaires, sont présentés ci-dessous.

1.2. Résultats principaux

Nous avons confirmé l'interaction entre cAPX et CDC48 *in vitro* et *in vivo* par diverses approches biochimiques et biophysiques. Comme montré précédemment (Rosnoblet et al., 2017), cAPX interagit avec CDC48 de manière récurrente dans les cellules de tabac, indépendamment de la mise en place de la réponse immunitaire. De plus, cette interaction s'établit dans le cytoplasme. La dynamique d'accumulation de cAPX induite par la cryptogéine est fortement impactée dans la lignée cellulaire surexprimant CDC48 (CDC48-TAP), à la fois quantitativement et qualitativement. En particulier, cAPX arbore une modification post-traductionnelle, probablement occasionnée par des entités oxydantes, et prépondérante dans la lignée CDC48-TAP. De manière surprenante, la surexpression de CDC48 impacte fortement l'activité de cAPX en réponse à la cryptogéine, cette dernière étant supprimée chez le surexprimeur comparativement à la lignée sauvage. Complétant ces données, l'étude du statut redox de ces lignées cellulaires a révélé une diminution de glutathion plus importante dans les cellules CDC48-TAP en réponse à la cryptogéine, accompagnée d'un stress oxydatif précoce.

Globalement, l'ensemble de ces résultats met en évidence l'existence d'une régulation de cAPX et, par extension, du statut redox par CDC48 en réponse à la cryptogéine.

2. Article scientifique n°3

Regulation of cytosolic ascorbate peroxidase by the protein CDC48 in the immune response triggered by cryptogein

Article de résultats originaux soumis à *Journal of Experimental Botany* en juin 2018. L'article est actuellement en révision pour ce même journal.

1 Regulation of cytosolic ascorbate peroxidase by the protein CDC48 in the
2 immune response triggered by cryptogein
3
4
5

6 **Hervé Bègue¹, Cécile Blanchard¹, Pascale Winckler², Angélique Besson-Bard¹, David
7 Wendehenne^{1*} and Claire Rosnoblet^{1*}**
8
9
10

11 ¹Agroécologie, AgroSup Dijon, ERL CNRS 6300, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, 21000
12 Dijon, France, ²Plateforme Dimacell/Imagerie spectroscopique UMR Procédés Alimentaires et
13 Microbiologiques Equipe Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques, AgroSup Dijon Nord,
14 21000 Dijon, France
15

16 e-mails: Hervé Bègue, herve.begue@u-bourgogne.fr; Cécile Blanchard, cecile.blanchard@u-
17 bourgogne.fr; Pascale Winckler, pascale.winckler@u-bourgogne.fr; Angélique Besson-Bard,
18 angelique.besson-bard@inra.fr; David Wendehenne, david.wendehenne@inra.fr, Claire Rosnoblet,
19 claire.rosnoblet@inra.fr
20

21 *To whom correspondence should be addressed: C. Rosnoblet, Tel. +33 3 80 69 34 24 or D.
22 Wendehenne, Tel. +33 3 80 69 37 22
23

24 Date of submission: 15 June 2018

25 Number of figures: 9 in the main file (Fig.2 in color online-only) and 4 in supplementary data
26 (Fig.S2 in color online-only)

27 Word count: 6499
28
29
30
31
32
33
34

35 Regulation of cytosolic ascorbate peroxidase by the protein CDC48 in the immune
36 response triggered by cryptogein
37

38 **Running title:** Regulation of cAPX by CDC48 in tobacco immune response

39 **Highlight:** The exploration of the regulation of cytosolic ascorbate peroxidase by the protein
40 CDC48, a significant actor of immunity, revealed new insights about redox control in plant
41 immunity.

42

43 **Abstract:** The chaperone-like protein CDC48 (Cell Division Cycle 48) has recently emerged as an
44 important actor of plant immunity. A previous search for its protein partners led to the identification
45 of numerous candidates, including cytosolic ascorbate peroxidase (cAPX), a major regulator of the
46 redox status of plant cells. Here, we examined further the regulation of cAPX by CDC48 in the
47 immune response triggered by cryptogein in tobacco cells, a 10 kDa protein produced by the
48 oomycete *Phytophthora cryptogea*. The interaction between both proteins was confirmed using
49 different approaches and has been found to occur in the cytoplasm. The dynamic of cAPX
50 accumulation, both quantitative and qualitative, was strongly impacted in cells overexpressing
51 NtCDC48, a post-translationally modified cAPX being mainly found. Furthermore, the cryptogein-
52 induced activity of cAPX was suppressed in the overexpressor line. Accordingly, a faster and
53 stronger reduction of the level of both reduced and oxidized glutathione, as well as of their
54 respective ratio, were observed in these cells. Collectively, these data highlight a role for CDC48 in
55 the regulation of cAPX.

56

57 **Keywords:** Ascorbate peroxidase, CDC48, plant immunity, plant biochemistry, protein-protein
58 interaction, redox regulation

59

60 **Abbreviations:** ASA, ascorbate; CDC48, cell division cycle 48; CDNB, 1-chloro-2,4-
61 dinitrobenzene; CFP, cyan fluorescent protein; cAPX, cytosolic ascorbate peroxidase; FLIM,
62 fluorescence lifetime imaging; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; GS, glutathione
63 synthase; GSSG, oxidized glutathione; GST, glutathione S-transferase; IP, immunoprecipitation;
64 MS, mass spectrometry; NEM, N-ethylmaleimide; NO, nitric oxide; PCD, programmed cell death;
65 PIC, protease inhibitors cocktail; PTM, post-translational modification; ROS, reactive oxygen
66 species; SNC1, suppressor of non-expressor of pathogenesis-related gene 1 constitutive 1; TAP,
67 tandem affinity purification; UPS, ubiquitin proteasome system degradation; VCP, valosin
68 containing protein; YFP, yellow fluorescent protein.

69

70 **Introduction**

71 In animals, p97 or valosin-containing protein (VCP, also called CDC48 in yeast), is a well
72 described chaperone-like protein. VCP/CDC48 is active under homo-hexameric form and is
73 involved in numerous cellular activities such as endoplasmic reticulum associated degradation or
74 ubiquitin proteasome system (UPS) degradation (Baek *et al.*, 2013). Numerous investigations
75 reported that VCP/CDC48 recognizes and interacts directly, or through protein adaptors, with poly-
76 ubiquitinated proteins intended to degradation by the proteasome. The energy generated through the
77 ATPase activity of VCP/CDC48 enables the segregation of target proteins from complexes or
78 cellular structures and remodels them. Next, target proteins are presented to the proteasome (Wang
79 *et al.*, 2004). CDC48 is also conserved in plants but its functions remain poorly understood
80 compared to yeast or mammals (Bègue *et al.*, 2017). Nevertheless, recent investigations provided
81 evidences that this protein contributes to plant immunity. In particular, AtCDC48A, one of the five
82 isoforms of CDC48 found in *Arabidopsis thaliana*, has been shown to be involved in the turnover
83 of SNC1, an intracellular immune receptor involved in the resistance against the oomycete
84 *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2 (Copeland *et al.*, 2016). AtCDC48A drives the
85 proteasomal degradation of poly-ubiquitinated SNC1. A second CDC48 *A. thaliana* isoform,
86 AtCDC48B, was also found to be linked to plant immunity (Niehl *et al.*, 2012). A strong
87 accumulation of the corresponding transcripts was observed in response to the *Oilseed rape mosaic*
88 *virus*. Furthermore, AtCDC48B interacts with the virus-encoded movement protein, promoting its
89 degradation. Finally, NtCDC48 has been shown to be specifically S-nitrosylated in tobacco cells
90 undergoing an immune response induced by cryptogein, a protein secreted by the oomycete
91 *Phytophthora cryptogea* which triggers a hypersensitive response, a programmed cell death (PCD)
92 confining pathogens to restricted necrotic lesions, and a systemic acquired resistance that
93 temporarily protects plants against a broad spectrum of further infections (Astier *et al.*, 2012;
94 Wendehenne *et al.*, 2014; Kulik *et al.*, 2015). Astier *et al.* (2012) highlighted that this nitric oxide
95 (NO)-dependent post-translational modification (PTM) leads to a decrease of the ATPase activity *in*
96 *vitro* together with a discrete structural modification. Recently, further details about the
97 involvement of NtCDC48 in plant immunity have been reported (Rosnoblet *et al.*, 2017). The
98 authors demonstrated that NtCDC48 accumulates in cryptogein-treated cells, both at the protein and
99 transcript levels, the protein being found in its hexameric active form. Supporting a role for
100 NtCDC48 in hypersensitive response, the cryptogein-induced cell death was accelerated and more
101 pronounced in a cell line overexpressing NtCDC48.

102 In order to decipher the role of NtCDC48 in immune response in tobacco, using an
103 immunoprecipitation (IP)-based strategy, Rosnoblet *et al.* (2017) identified about one hundred

104 NtCdc48 putative protein partners which functions are related to primary and secondary
105 metabolisms, intracellular traffic, gene expression and, as expected, to protein quality control and
106 degradation. Interestingly, this analysis also pointed out that NtCDC48 interacts with three main
107 proteins involved in the redox control, namely catalase, superoxide dismutase and cytosolic
108 ascorbate peroxidase (cAPX). In regard to the crucial functions of reactive oxygen species (ROS) in
109 plant immunity and, more generally, in plant signaling (Mittler *et al.*, 2004; Noctor *et al.*, 2017;
110 Zhou *et al.*, 2017), this data was particularly relevant. Indeed, plants have evolved efficient
111 antioxidant systems to regulate the steady state level of ROS. Among them, the ascorbate-
112 glutathione cycle is one of the major H₂O₂ scavenging system (Asada, 1999). The first reaction is
113 catalyzed by APX and consists on the reduction of H₂O₂ into water with ascorbate (ASA) as
114 specific electron donor. The last enzyme involved in this cycle is glutathione reductase (GR) that
115 catalyzes the reduction of oxidized glutathione (GSSG) into reduced glutathione (GSH) and is
116 necessary for the regeneration of ASA.

117 In plants, several isoforms of APX have been identified, including cytosolic (cAPX),
118 microbody and chloroplastic ones (thylakoid-bound and stromal). Those isoforms differ not only by
119 their subcellular localization, but also in their molecular weight, three dimensional structure and
120 enzymatic features (Anjum *et al.*, 2016). Involvement of APXs in the plant response to biotic
121 stresses is well documented (Mittler *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2017; Fujiwara *et al.*, 2016). The
122 corresponding data showed that the modulation of the transcription, translation and/or activity of
123 APX is a mechanism strongly correlated to the responses to microbial pathogens. Moreover, APX is
124 subject to several PTMs. For instance in *Antiaris toxicaria*, an excess of H₂O₂ during seed
125 desiccation led to the carbonylation of APX residues and to an irreversible inhibition of its activity
126 (Bai *et al.*, 2011). APX is also prone to phosphorylation. For example, in wheat, the protein
127 encoded by the resistance gene *WHEAT KINASE START1* has been shown to phosphorylate
128 thylakoid-bound APX, thus leading to an inhibition of its enzymatic activity. The authors proposed
129 that this process negatively impacts the ability of cells to detoxify ROS and might contribute to cell
130 death (Gou *et al.*, 2015). Furthermore, NO-mediated PTMs have been reported to influence APX
131 activity. In tobacco, addition of NO donors was followed by an inhibition of APX activity through
132 the reversible binding of NO to the heme prosthetic group (Clark *et al.*, 2000). In *A. thaliana*, cAPX
133 has been found to be modified by tyrosine nitration (Lozano-Juste *et al.*, 2011). This PTM was
134 shown to trigger the inhibition of the *in vitro* activity of pea cAPX (Begara-Morales *et al.*, 2014).
135 The incidence of S-nitrosylation is more controversy. Again in *A. toxicaria*, S-nitrosylation of
136 cAPX has been shown to prevent its carbonylation (Bai *et al.*, 2011). The authors speculated that
137 this mechanism could enhance its activity. Similarly, in salt-stressed pea plants, cAPX activity was
138 found to be enhanced through S-nitrosylation (Begara-Morales *et al.*, 2014). In tobacco cells, a

139 decrease of both the amount and activity of cAPX was observed during the PCD triggered by heat
140 stress. This process was partly linked to a reduced expression of the corresponding gene during the
141 late phase of PCD (Vacca *et al.*, 2004). Furthermore, cAPX was found to undergo S-nitrosylation
142 during heat stress. Unlike the previous cited studies, *in vitro* and *in vivo* assays demonstrated that
143 this modification triggers a rapid decrease in cAPX activity and facilitates cAPX degradation
144 through UPS (de Pinto *et al.*, 2013).

145 In the present study, we investigated the incidence of NtCDC48 on cAPX regulation during the
146 immune response triggered by cryptogein in tobacco. We confirmed the interaction between
147 NtCDC48 and cAPX, and showed that it occurs in the cytoplasm. Then we provided evidences that
148 cAPX accumulation and activities and, more generally, the glutathione status were strongly affected
149 in cells over-expressing NtCDC48. Collectively, our data highlighted that CDC48 in an important
150 regulator of cAPX.

151

152 **Materials and Methods**

153 *Cells treatments*

154 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi wild-type (WT) and CDC48-TAP cell suspensions (Rosnoblet *et al.*
155 *et al.*, 2017) were maintained in the growth exponential phase and subcultured 1 day prior to use as
156 described previously (Besson-Bard *et al.*, 2008). Cryptogein was purified according to Bonnet *et al.*
157 (2008) then stored at -20°C as a 100 µM stock solution. Tobacco cells were treated with 100 nM of
158 cryptogein or with an equal volume of water as control.

159

160 *Electrophoresis and Western blot*

161 Tobacco cells were broken in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM EDTA, 2 mM
162 dithiothreitol (DTT), 100 mM NaCl and protease inhibitor cocktail (PIC) without EDTA (Roche),
163 supplemented or not with 10 mM N-Ethylmaleimide (NEM)) and quantified using the Bradford
164 method (1976). Proteins (20 µg) were resolved by 15 % (w/v) SDS-PAGE and visualized by
165 Western blot with an antibody against CDC48 protein (Abcam, ab111740), cAPX (Agrisera, AS06
166 180) or His-tag (Cell Signaling Technology, 2366). Immunoblots were revealed using LumiGLO®
167 reagents (Cell Signaling Technology). After transfers, membranes were stained with Ponceau red in
168 order to check the loading of total proteins. For gel retardation assay, 12 % SDS-PAGE have been
169 supplemented with Phos-tag™ AAL-107 50 µM (Wako Chemical) and MnCl₂ 100 µM. After
170 migration, gel have been rinsed in EDTA 1 mM for Mn²⁺ chelation.

171

172 *Molecular biology*

173 The mRNA content of interest proteins were assayed in control and cryptogein-treated tobacco
 174 cells. RNAs were extracted using TRIzol Reagent (Life Technologies) according to manufacturer's
 175 instructions. Five hundred nanogrammes of total RNA was reverse-transcribed using oligo-dT
 176 primer and DyNamo™ kit (Thermo Fisher Scientific). The reverse-transcriptase quantitative PCR
 177 (RT-qPCR) was performed with a SYBR Green PCR Master Mix kit (Life Technologies) and
 178 ViiA™ 7 apparatus and the ViiA™ 7 v1.2 software (Life Technologies). All samples were log-
 179 transformed and normalized to L25 control (Schmidt and Delaney, 2010). The following primers
 180 were used for RT-qPCR: L25-qF: 5'-CCCCTCACCACAGAGTCTGC-3' and L25-qR: 5'-
 181 AAGGGTGTGTTGTCCTCAATCTT-3'; Nt-APXqPCR-F: 5'-GCCTTCTTTGCGGACTATGC-3'
 182 and Nt-APXqPCR-R: 5'-ACAATTCCACAAAAGCTTCCC-3'; Nt-GST-tauqPCR-F: 5'-
 183 TTCAGTGGGCTCTAAAGATAAGGGCG-3' and Nt-GST-tauqPCR-R: 5'-
 184 GGCTGCAGTTAATGTACTCATCTC-3'; Nt-GST-phiqPCR-F: 5'-
 185 GGCGATCAAAGTCCATGGTAGCCC-3' and Nt-GST-phiqPCR-R: 5'-
 186 CCAATCCCTTAACCAAGCTGGCC-3'; Nt-GSH1-qPCR-F: 5'-
 187 GACCTTGTAGCTTATCTTGCTTCTG-3' and Nt-GSH1-qPCR-R: 5'-
 188 TAATGTTGTCACCCTCCATTACTTT-3'; Nt-GSH2-qPCR-F: 5'-
 189 ACAATATCTATGGGGAAGATGTGAA-3' and Nt-GSH2-qPCR-R: 5'-
 190 CAAGTTCAGATATGGTTTGCTCTTT-3'; Nt-GS1qPCR-F: 5'-
 191 GACCTTGTAGCTTATCTTGCTTCTG-3' and Nt-GS1qPCR-R: 5'-
 192 TAATGTTGTCACCCTCCATTACTTT-3'; Nt-GS2qPCR-F: 5'-
 193 ACAATATCTATGGGGAAGATGTGAA-3' and Nt-GS2qPCR-R: 5'-
 194 CAAGTTCAGATATGGTTTGCTCTTT-3'. Cytosolic APX coding sequence was cloned in order
 195 to obtain fluorescent protein in tobacco. After amplification of inserts from reverse transcribed
 196 mRNA of tobacco, cAPX constructions were obtained using BP and LR Clonase kits from
 197 GATEWAY technology (Invitrogen) with the following plasmids: pDON221 and pH7YWG2 (Cter
 198 Yellow Fluorescent Protein-tag fusion, Plant System Biology, Ghent, Belgium; Karimi *et al.*, 2005)
 199 according to manufacturer instructions. The following primers were used for cloning of cAPX in
 200 pDONR221: cAPXNoStop-F: 5'-
 201 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGACTGCCATGGGTAAGTGCTATCCCCT
 202 G-3') and cAPXNoStop-R: 5'-
 203 GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGCTTCAGCAAATCCCAATTC-3'. For CFP-
 204 CDC48, LR reaction was performed with pH7WGC2 plasmid (Nter Cyan Fluorescent Protein-tag
 205 fusion; Karimi *et al.*, 2005) from previously cloned CDC48 in pENTR (Rosnoblet *et al.*, 2017).
 206
 207

Co-immunoprecipitation

208 Tobacco cells treated with cryptogein were lysed in the IP buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 100
209 mM NaCl, 1 mM DTT, 4 mM EDTA, 10 % (w/v) sucrose, 0.3 % (v/v) IGEPAL CA-630, 100 μ M
210 Na_3VO_4 , 10 mM beta-glycerophosphate, PIC) for 15 min at 4°C, and centrifuged at 14,000 g, 20
211 min at 4°C. One mg of proteins was incubated with 25 μ L of Protein A Mag Sepharose (GE
212 Healthcare) and with 1.5 μ g of antibody against CDC48 or phosphorylated MAP kinases as
213 negative control (Cell Signaling Technology, 9101S). Such a negative control could not have been
214 realized from CDC48-TAP cells because of the Igg-binding domain present into the TAP tag. After
215 the washing phase, co-immunoprecipitated proteins were eluted in the loading buffer 10 min at
216 70°C and resolved by 12 % (w/v) SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and
217 immunoblotted with indicated antibodies. Following IPs, protein A coupled with horseradish
218 peroxidase (Abcam) was used instead of secondary antibody.

219

220 *Pull-down*

221 Beads linked to recombinant His-CDC48 proteins were obtained as previously described
222 (Rosnoblet *et al.*, 2017) then used for pull-downs with proteins extracted from tobacco cells treated
223 0 h, 2 h and 12 h with cryptogein. An amount of 500 μ g of proteins extracted with IP buffer were
224 incubated with 40 μ L of free Ni-NTA beads (GE Healthcare) for 3 hours at 4 °C in order to deplete
225 the sample from proteins binding beads. The sample extract was then recovered by centrifugation at
226 800 g at 4 °C and incubated with 20 μ L of 5 % His-CDC48-beads or free Ni-NTA beads as a
227 negative control, overnight at 4°C with gentle shaking. After overnight incubation, total lysates
228 have been kept as “posts” in order to check the absence of protein degradation during incubation
229 time. After extensive wash with IP buffer, linked proteins were eluted in the loading buffer and
230 resolved by SDS-PAGE. Finally, His-NtCdc48 and cAPX were immunoblotted using indicated
231 antibodies.

232

233 *FRET by Fluorescence Life Time Imaging (FLIM)*

234 *Agrobacterium tumefaciens* strain (GV3101) was transformed with CFP-CDC48 (donor) or
235 cAPX-YFP (acceptor) or both constructions together then grown at 28°C with gentamycin (50
236 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and rifampicin (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) for the strain plus spectinomycin (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) for the
237 plasmids. Infiltrations of transformed bacteria in 10 mM MES, 10 mM MgCl_2 and 100 μ M
238 acetosyringone was then performed in *Nicotiana tabacum* leaves with a syringe. Four independent
239 plants were infiltrated with newly transformed bacteria and 15 leaf disks were analyzed per plant.
240 Expression of CFP and or YFP-coupled proteins was checked with an epifluorescence microscope
241 (Leica) four days after infiltration.

242 FLIM images were collected using a time-correlated single-photon counting (TCSPC) module
243 (Picoquant) on a Nikon A1-MP scanning microscope. Imaging was carried out with $\times 60$ Apo IR
244 objective (NA: 1.27, Water Immersion, Nikon). 820 nm excitation was provided by an IR laser
245 (Chameleon, Coherent) that delivers femtosecond pulses at a repetition rate of 80 MHz.
246 Fluorescence emission of CFP was collected by a Single-Photon Avalanche Diode detector, using a
247 band-pass emission filter FF01-494/20 (Semrock). TCSPC lifetime recording was performed over
248 200 temporal channels (final resolution 0.64 ps). We performed a global lifetime analysis on ROI of
249 the FLIM images using Symphotime software. The fluorescence lifetimes were calculated by fitting
250 the tail of CFP fluorescence decay to a biexponential model, with two lifetime constants. For this
251 analysis, we report only the longer lifetime as it was the most sensitive to FRET. The efficiency of
252 energy transfer (FRET %) was given by the following equation: $E = 1 - FDA/FD$, with relative
253 fluorescence intensities of the donor in the absence (FD) or presence (FDA) of the acceptor.

254

255 *Gel Filtration Chromatography*

256 Protein extracts were prepared from tobacco cells after cryptogein treatment. Cells lysis was
257 performed in a gel filtration buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 5 % (v/v) glycerol, 100 mM KCl,
258 1 mM DDT, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA and PIC) supplemented with NEM 10 mM. After
259 centrifugation 10 min at 20,800 g at 4°C, 500 μg of fresh extracts were fractionated on a Superdex
260 200HR 10/30 column (GE Healthcare). Size exclusion chromatography was carried out on HPLC
261 using ÄKTATM purifier (GE Healthcare). Elution profiles of blue dextran (V0), ferritin (440 kDa),
262 aldolase (158 kDa), conalbumine (75 kDa), ovalbumine (43 kDa) and cytochrome c (14 kDa, all
263 from GE Healthcare) were used for calibration curve. One mL fractions were collected and
264 precipitated in trichloroacetic acid, 30 min at 4°C. Dried pellets were suspended in loading buffer
265 and examined by Western blot with antibody against cAPX.

266

267 *Endogenous cAPX activity*

268 Tobacco cells treated with cryptogein were homogenized in extraction buffer (100 mM
269 potassium phosphate pH 7.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM ascorbate and 1 % (m/v)
270 polyvinylpyrrolidone) for 15 min on ice then centrifuged twice at 16,000 g during 15 min at 4
271 °C. The supernatant was used for analysis of APX activity (EC 1.11.1.11) as described by Vacca *et*
272 *al.* (2004) with the following adjustments. Decrease of absorbance at 290 nm was measured in 1 mL
273 of activity mix (50 mM potassium phosphate, pH 7.0; 0.01 mg/mL BSA; 0.5 mM ascorbate and 20
274 μL of supernatant). The measurement of the activity started after addition of H_2O_2 at the final
275 concentration of 0.25 mM. After Bradford assay, the activity was expressed in nanomoles of
276 ascorbate oxidized per minute per milligram of protein and as percentage of the activity control.

277

278 *Ascorbate and Glutathione assays*

279 WT and CDC48-TAP cells were homogenized into 1 mL of 0.2 M HCl. After centrifugation at
280 16,000 g at 4 °C for 10 min, pH of supernatant was adjusted to 4-5 before being used for assays of
281 both ascorbate and glutathione. Contents of ascorbate, total ascorbate, glutathione and total
282 glutathione were determined according to Noctor *et al.* (2016). These methods lead to quantification
283 of total ascorbate (dehydroascorbate +ASA), ASA, total glutathione (GSH+GSSG) and GSSG that
284 allows to deduce GSH content (total glutathione - 2xGSSG). Finally, ascorbate and glutathione
285 amounts were expressed in micromoles or nanomoles of ascorbate or glutathione, respectively, per
286 microgram of protein. Percentage of GSH pool was calculated according to GSH/total glutathione x
287 100 and ratio correspond to GSH/GSSG (Queval and Noctor, 2007).

288

289 *GR activity*

290 Glutathione reductase (GR) activity was quantified on microplate according to Murshed *et al.*
291 (2008). Succinctly, tobacco cells treated with cryptogein were lysed in 50 mM MES-KOH buffer
292 (pH 6), 40 mM KCl, 2 mM CaCl₂ and 1 mM L-ascorbic acid. The homogenate was centrifuged at
293 16,000 g during 10 min at 4 °C and the supernatant was analyzed immediately after. GR activity
294 was measured spectrophotometrically as NADPH oxidation at 340 nm in 50 mM HEPES reaction
295 buffer (pH 8), 0.5 mM EDTA, 0.25 mM NADPH and 0.5 mM GSSG. After Bradford assay, the
296 activity was defined as micromole of NADPH oxidized per minute per milligram of protein.

297

298 *GST activity*

299 Glutathione S-transferase (GST) activity was quantified through the ability of glutathione to
300 conjugate 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma Aldrich). Following cryptogein treatment,
301 tobacco cells were lysed in extraction buffer containing 50 mM potassium-phosphate pH 7.2, 2 mM
302 DTT, 0.01 % (v/v) triton x-100 and 1 mM EDTA and supernatant was freshly used after
303 centrifugation 30 min at 25,000 g at 4°C. GST activities were measured in a total volume of 200 µL
304 containing extraction buffer, 2 mM GSH and 10 µL of cell lysate. The reaction was started by the
305 addition of 1 mM CDNB then carried out at 30°C for 30 min. Enzyme activity was determined
306 spectrophotometrically following the increase of absorbance at 340 nm. Bradford assay allowed to
307 calculate activities in µmoles of conjugated CDNB/min/µg of protein.

308

309 **Results**

310 *cAPX interacts with NtCDC48*

311 In our previous study, thanks to IP-MS analysis, we identified cAPX as a putative partner of
312 NtCDC48 in basal condition and during the immune response triggered by cryptogein (Fig.S1;
313 Rosnoblet *et al.*, 2017). In order to confirm the interaction, several complementary approaches were
314 performed. First, a pulldown strategy was carried out. Therefore, a His-tagged NtCDC48
315 recombinant protein was produced in *E. coli*, purified and then fixed by affinity on Ni-NTA beads.
316 Next, these latter were incubated with proteins extracted from wild-type (WT) cells elicited by
317 cryptogein.

318 We checked that His-NtCDC48 was only detected in NtCDC48-linked beads using a Western blot
319 against the His tag (Fig.1A, upper panel). Using antibody against His tag, the recombinant His-
320 NtCDC48 was detected under monomeric (around 95 kDa) and tightly bound hexameric forms
321 (above 250 kDa) as previously reported (Rosnoblet *et al.*, 2017). Then, immunoblot raised against
322 cAPX showed that the endogenous cAPX was detected exclusively in total lysates, in pull-down
323 with His-NtCDC48 beads, and in posts, whatever the cryptogein elicitation time (Fig.1A, lower
324 panel). Therefore, cAPX is able to interact *in vitro* with the recombinant protein His-NtCDC48, this
325 interaction being not impacted by cryptogein treatment.

326 To demonstrate that the endogenous NtCDC48 protein also interacts with cAPX, a co-IP
327 experiment in WT cells elicited by cryptogein was performed (Fig.1B). In total lysates (upper
328 panel), an increased accumulation of NtCDC48 under tightly bound hexameric structure was
329 observed during elicitation. This data confirmed our recent study showing that cryptogein triggered
330 an accumulation of NtCDC48 (Rosnoblet *et al.*, 2017). Moreover, following Western blot raised
331 against endogenous cAPX in total lysates, we noticed the detection of double signal with molecular
332 masses estimated around 31 and 33 kDa, a 28 kDa size being expected in theory. Following IP of
333 CDC48 then immunoblot against cAPX, the two immune-reactive signals previously mentioned
334 were detected whatever elicitation time (Fig.1B, lower panel).

335 As controls, we verified that cAPX was co-immunoprecipitated through CDC48 antibodies but
336 not after incubation with free beads or through neutral antibodies raised against phosphorylated
337 MAP kinases used as a negative control. So far, these latter were not shown to interact with cAPX
338 nor CDC48. As expected, cAPX did not stick to free beads and was not co-immunoprecipitated
339 through phospho-MAPK antibodies (Fig.1D).

340 To study whether the overexpression of CDC48 affects its interaction with cAPX, we performed a
341 similar experiment in the NtCDC48-TAP line overexpressing NtCDC48 previously characterized in
342 our lab (Rosnoblet *et al.*, 2017). In these cells, cAPX was also found among the proteins co-
343 immunoprecipitated through NtCDC48 (Fig.1C, lower panel). However, compared to WT cells, the
344 33 kDa signal was largely predominant both in the total lysate (Fig.1C, upper panel) and following
345 co-IP. Moreover, a decreased amount of cAPX was observed between 2 and 12 h of cryptogein

346 incubation, probably linked to the premature cell death of NtCDC48-TAP cell line (Rosnoblet *et al.*,
347 2017, see latter). It should be specified that we were not able to perform a negative control using
348 neutral antibody (such as phospho-MAPK) with extracts from overexpressing NtCDC48-TAP cells
349 because of the Igg-binding domain in the tag. However, we checked that cAPX extracted from
350 overexpressing cells did not stick to free beads (Fig.1C, lower panel).

351 To strengthen our data, the interaction between cAPX and CDC48 was studied *in planta* using
352 FRET with Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) experiments. Thanks to agro-infiltration, we
353 expressed transiently CFP-CDC48 and cAPX-YFP recombinant proteins in *N. tabacum* cv. Xanthi
354 leaves. Excitation was performed using two-photon microscopy in order to penetrate deeper into
355 tissues. Accordingly to their expected subcellular localisation, cAPX-YFP was only detectable in
356 the cytoplasm while CFP-CDC48 was observed in the cytoplasm and in the nucleus (Fig.S2).
357 Therefore, both proteins co-localized in the cytoplasm. Then, we looked for their molecular
358 interaction using FLIM. In the leaf epidermal cells expressing only the CFP-CDC48 protein, the
359 fluorescence was detected in the cytoplasm and in the nucleus with a higher lifetime (Fig.2A, left
360 panel). A mean lifetime of 2.97 ns was measured for CFP without partner (Fig.2B). In those cells,
361 the fluorescence lifetimes measured into nucleus and cytoplasm were similar to the global
362 measurement. In leaves co-expressing CFP-CDC48 and cAPX-YFP, a significant reduction of CFP
363 lifetime to 2.41 ns was measured (Fig.2B). This lifetime reduction was due to the fluorescence
364 resonance energy transfer to cAPX-YFP and was observed in the cytoplasm and not in the nucleus
365 (Fig.2A, right panel). These data strongly suggest that NtCDC48 and cAPX interact exclusively in
366 the cytoplasm of tobacco cells. Moreover, as FRET is possible providing that the distance between
367 donor and acceptor is no more than 10 nm, NtCDC48 certainly interacts with cAPX in a direct
368 manner. We also planned to perform the FLIM experiment in tissues pre-infiltrated with cryptogein.
369 However, these assays did not work properly because of the tissular alterations associated to
370 cryptogein injection (Xing *et al.*, 2016).

371

372 *Analysis of cAPX dynamic of expression*

373 In order to understand the functional relationship between CDC48 and cAPX, we analysed the
374 accumulation of cAPX transcript and protein during the immune response triggered by cryptogein
375 in WT tobacco cells as well as in the CDC48-TAP cell line. In both cell lines, cryptogein induced a
376 significant increase of cAPX transcript level from 4 hours, which further raised with longer times of
377 treatment (Fig.3A and B). At the protein level, as already shown in Fig.1B, two bands around 31
378 and 33 kDa immuno-reacting with the antibody raised against cAPX were detected (Fig.3C). In WT
379 cells without cryptogein treatment, the 31 kDa signal was predominant and showed a slight
380 accumulation from 6 hours (Fig.3C, upper panel). In cryptogein-treated WT cells, two steps of

381 accumulation were observed. First, an increasing amount of the two immunoreactive bands was
382 noticed until 12 hours of treatment. Next, from 12 hours, the accumulation of the 31 kDa band
383 strongly decreased while the accumulation of the 33 kDa signal remained more constant (Fig.3C,
384 lower panel). Interestingly, a distinct profile of cAPX accumulation occurred in the NtCDC48
385 overexpressing line. Indeed, without cryptogein treatment, the 33 kD band was predominant while
386 the 31 kDa signal was poorly detected (Fig.3C, upper panel). A similar profile of protein
387 accumulation was observed during the 6 first hours of cryptogein treatment (Fig.3C, lower panel).
388 Then, as previously observed in Fig.1C, the accumulation of the 33 kDa band decreased. This
389 decline could be linked to the premature death occurring in CDC48-TAP cells (Rosnoblet *et al.*,
390 2017). Overall, these data indicate that the accumulation of cAPX is impacted by the over-
391 expression of NtCDC48. Moreover, relative distribution of both 31 and 33 kDa signals have been
392 calculated from five independent similar experiments in both cell lines treated or not with
393 cryptogein (Fig.3D). As shown in Fig.3C, without elicitation, relative quantification confirms the
394 predominance of the 31 kDa signal in WT cells and the 33 kDa one in overexpressing cells (Fig.3D,
395 upper panel). During cryptogein incubation, the normalisation highlights the increase amount of the
396 33 kDa band in WT cells after 6 h of treatment and the decrease of the 31 kDa one (Fig.3D, lower
397 panel).

398 Since cAPX has been shown to be phosphorylated (19), the mass increment of the upper signal
399 of 33 kDa could be linked to such PTM modification. To check this hypothesis, we performed
400 Phos-tag SDS-PAGE retardation assays (Fig.4). This method considerably slows down
401 electrophoretic migration of phosphorylated polypeptides. In Phos-tag gels, both cAPX signals
402 migration did not change in comparison to SDS-PAGE according to molecular weight markers
403 (Fig.4A, upper panel). Moreover, we carried out Western blot against phosphorylated MAP kinase
404 as positive control (Fig.4B). As expected, phosphorylation of MAP kinase occurred after 2 h of
405 cryptogein treatment and PhosTag gel revealed a clear electrophoretic retention. Taken together,
406 these experiments indicate that difference observed in electrophoretic mobility between two cAPX
407 signals is not due to phosphorylation.

408 In addition to phosphorylation, APX can be subject to PTM linked to reactive oxygen or nitric
409 species (Gou *et al.*, 2015; Clark *et al.*, 2000; Lozano-Juste *et al.*, 2011), these modifications more
410 affecting Met or Cys residues in particular. Moreover, mass spectrometry analysis previously
411 highlighted that number of peptides corresponding to cAPX was oxidized on Met residues
412 (Rosnoblet *et al.*, 2017). To check whether the 33 kDa band could correspond to such modification,
413 protein extracts from control and cryptogein-treated WT and transgenic cells were incubated with
414 N-ethylmaleimide (NEM), an alkylating reagent that reacts with Cys residues (Paulech *et al.*, 2013).
415 The corresponding Western blot against cAPX showed that the NEM treatment strongly impacts the

416 presence of the 33 kDa immuno-reactive polypeptide (Fig.5). In WT cells, compared to samples not
417 treated with NEM (Fig.3C), this band was poorly observed, even in the cryptogein-treated samples.
418 In the transgenic line, the 31 kDa signal, which was not observed in the protein extracts non-
419 exposed to NEM (Fig.3C), was clearly detected in both the cryptogein and control samples (Fig.5).
420 These data strengthen the hypothesis that the 33 kDa and 31 kDa bands correspond to a same
421 polypeptide undergoing a Cys-dependent PTM. Moreover, gel filtration analysis in native
422 conditions of NEM treated WT and NtCDC48-TAP samples clearly demonstrated that the distinct
423 electrophoretic mobility of both signals was not due to mass increment (Fig.6). Actually, in native
424 conditions the 31 kDa signal is detected in fractions corresponding to higher molecular mass
425 (fractions 7-9 in WT and CDC48-TAP cells) compared to the fractions enriched in the 33 kDa
426 polypeptide (fractions 9-12 in CDC48-TAP cells). Such phenomenon could be due to steric
427 hindrance linked to oxidative modification.

428 NEM is a thiol-reacting reagent. Since APX has been shown to be modified by S-nitrosylation
429 (de Pinto *et al.*, 2013) we studied the influence of cysteine S-nitrosylation on cAPX electrophoretic
430 migration (Fig.S3). While we succeeded to confirm the *in vitro* nitrosylation and the resulting
431 inhibition of the enzymatic activity of cAPX (Fig.S3A and B) as previously reported (de Pinto *et al.*,
432 2013), this modification did not explain the additional signal at 33 kDa (Fig.S3C). Interestingly,
433 NEM also induced a decrease of cAPX activity *in vitro* (Fig.S3B), suggesting that Cys alkylation
434 either triggers a steric hindrance impacting the activity, or affects residues involved in the catalytic
435 activity. So, the 33 kDa signal is certainly due to oxidative modification of redox-active Cys other
436 than nitrosylation.

437 To complete the expression analysis, the enzymatic activity of cAPX was measured in both cell
438 lines treated or not with cryptogein. For this purpose, cAPX activity was monitored by following
439 the oxidation of ASA in presence of H₂O₂. We have checked that, according to the extraction
440 method, only the cytosolic APX activity was measured without chloroplastic APX activities
441 interference (Fig.S4). Indeed, using our experimental procedure, there was no difference between
442 total and cytosolic ascorbate peroxidase activity, other APXs being inactivated because of the
443 absence of ASA in the extraction buffer and the pre-incubation with H₂O₂ (Amako *et al.*, 1994). In
444 WT cells, a significant increase in the activity of cAPX was measured 2 hours after cryptogein
445 treatment (Fig.7A). This increase was transient and after 4 hours and thereafter, the cAPX activity
446 returned and remained at the background level. In cells overexpressing NtCDC48, without
447 cryptogein treatment, the rate of cAPX enzymatic activity appeared 2 times lower as compared to
448 WT cells (Fig.7B). Interestingly, in this cell line cryptogein did not induce any increase of cAPX
449 activity (Fig.7C), thus contrasting with the situation observed in WT cells. In order to determine
450 whether the difference of cAPX activities observed in WT and CDC48-TAP was linked to substrate

451 availability, we determined the level of ascorbate in both cell lines exposed to cryptogein for 0, 2
452 and 12 hours. Whatever the cell line, a similar level of total or reduced ascorbate was measured, the
453 concentration being unchanged upon cryptogein elicitation treatment (Fig.7D and E). Therefore, the
454 non-induction of cAPX activity observed in CDC48-TAP cells exposed to the elicitor was not
455 linked to a reduced concentration of ascorbate.

456

457 *The cellular redox status is affected in NtCDC48 over-expressing cells*

458 As cAPX is a main regulator of the cellular redox status and, contrary to WT cells, did not
459 show an induced activity in cryptogein-treated CDC48-TAP cells (Fig.7C), a comparative analysis
460 of the redox status between both cellular lines was performed. We focused our work on glutathione.
461 For this purpose, we measured the content of total glutathione (GSH+GSSG) and of GSH in both
462 cell lines after cryptogein treatment (Fig.8A and B). In WT cells, the content of both total and
463 reduced glutathione was reduced by almost 50 % after 12 hours of elicitation with cryptogein
464 (Fig.8A and B, black bars). For each point, we calculated the percentages of GSH (Fig.8C) and the
465 GSH/GSSG ratios (Fig.8C, white numbers). Despite the decrease in total glutathione after 12 h of
466 cryptogein treatment, the percentage of GSH remained constant and represented about 90 % of the
467 total glutathione pool (Fig.8C, black bars). In addition, the GSH/GSSG ratios were not significantly
468 different and remained around 20 to 30 in WT cells during the time course. In CDC48-TAP cells, a
469 significant decrease in total glutathione and in GSH was also measured after 12 hours of elicitation
470 (Fig.8A and B, grey bars). Compared to WT cells, this reduction was more pronounced as early as 2
471 hours of treatment and, from this time point, the amount of total glutathione and GSH were
472 significantly lower. In this cell line, the percentage of GSH was constant during the 2 first hours of
473 elicitation but drastically failed to 42 % at 12 hours (Fig.8C, grey bars). This decrease was
474 accompanied by a critical and significant fall in the GSH/GSSG ratio from 16 to 3.

475 In order to complete the study, the activity of GR was measured in both cell lines exposed to
476 cryptogein (Fig.8D). As previously mentioned, GR catalyzes the reduction of GSSG into GSH and
477 is necessary for regeneration of ascorbate. In WT cells, the GR activity remained constant during
478 the time lapse chosen. However, in cells overexpressing CDC48, the GR activity decreased 2 hours
479 after elicitation and then came back to the steady state after 12 hours of treatment (Fig.8D, grey
480 bars).

481 We also checked whether the decrease of GSH in overexpressing cells could be linked to a
482 down-regulation of the expression of GSH synthase (GS1 and GS2). For this purpose, we measured
483 the level of *GS1* and *GS2* mRNA in the two cell lines during cryptogein treatment (Fig.9A).
484 However, the level of both transcripts did not change during elicitation on both cell lines.

485 Consequently, the earlier decrease in GSH in the overexpressing cells cannot be explained by the
486 amount of GS transcripts.

487 As GSH can also be a substrate of glutathione-S-transferases (GST), we studied the amount of
488 transcripts and the enzymatic activity of the plant dominant classes tau and phi GST in both cell
489 lines during elicitation (McGonigle *et al.*, 2000; Nutricati *et al.*, 2006). In tobacco cell lines,
490 transcript level of both GST tau and phi was significantly up-regulated in response to cryptogein
491 from 4 h of treatment (Fig.9B). The induction occurred similarly in WT and CDC48-TAP cells.
492 Finally, GST activity was similar in both cell lines, without modification during elicitation (Fig.9C).
493 Taken together, these results highlighted that premature and more pronounced loss of glutathione in
494 CDC48-TAP cells is not due to GST activity.

495

496

497 **Discussion**

498 The aim of this study was to investigate the involvement of NtCDC48 in the regulation of
499 cAPX. We demonstrated that both proteins interact, thus confirming our recent assumption that
500 cAPX could represent a target of the chaperone-like protein (Rosnoblet *et al.*, 2017). One other
501 information arises from the interaction study. Although NtCDC48 was found both in the cytoplasm
502 and in the nucleus as previously reported (Park *et al.*, 2008), the interaction between both proteins
503 occurred only in the cytosol, in accordance with the expected subcellular localization of cAPX.

504 The accumulation of the cAPX transcript was enhanced in both WT and CDC48-TAP tobacco
505 cells treated with cryptogein, highlighting an induced *cAPX* gene expression or a higher
506 stabilization of the corresponding transcripts. This data also showed that the over-expression of
507 NtCDC48 did not alter this process. A different situation occurred at the protein level. Indeed, in
508 WT cells, two immunoreactive bands with a molecular mass of about 31 and 33 kDa were
509 recurrently detected in the Western blot assays in denaturing and reducing conditions. In response
510 to cryptogein, the accumulation of both signals was enhanced, a higher stability of the 33 kDa band
511 being observed over time. In contrast, in cells overexpressing CDC48, the 33 kDa band was
512 predominant while the lower band was almost not detected. In addition, compared to WT cells,
513 upon cryptogein treatment, we did not see a clear induction of the protein accumulation in this cell
514 line. Thus, the overexpression of NtCDC48 deeply impacts cAPX at the protein level, both
515 quantitatively and qualitatively. Which interpretation could be drawn from these observations? APX
516 has been shown to be subjected to post-translational modifications as nitrosylation or
517 phosphorylation (Gou *et al.*, 2015; Correa-Aragunde *et al.*, 2015), this latter having been excluded
518 by gel retardation assays. Accordingly, cAPX was found amongst proteins undergoing constitutive
519 S-nitrosylation in tobacco cells (Astier *et al.*, 2012) but while we have confirmed the S-nitrosylation
520 of cAPX and its consequent enzymatic activity inhibition, this PTM did not explain the appearance
521 of two signals. Moreover, the 33 kDa band was surprisingly delayed in gel filtration under native
522 conditions, suggesting a steric hindrance of cAPX instead of a mass increment. Therefore we
523 assume that the presence of the 33 kDa band might reflect a post-translational protein modification
524 that slows down both electrophoretic mobility and elution by gel filtration. Such event could be due
525 to oxidative modification. Supporting this hypothesis, the intensity of the 33 kDa band was reduced
526 when the protein extracts were exposed to NEM promoting alkylation of Cys residues (Paulech *et*
527 *al.*, 2013). In these conditions, the 31 kDa band was also observed in the transgenic line. This data
528 also suggests that the 33 kDa band reflects a Cys-dependent PTM that could be up-regulated in the
529 NtCDC48 overexpressing line. To confirm that the 33 kDa band comes from such PTM, we tried to
530 oxidize recombinant cAPX *in vitro* by incubating the protein with H₂O₂ or attempting to perform a
531 Fenton reaction. However, our assays failed.

532 Completing this result, the over-expression of NtCDC48 also altered cAPX activity as both the
533 background and the induced cAPX activity triggered by cryptogein were reduced or impaired,
534 respectively, as compared to WT cells. We verified that the reduced activity observed in the
535 transgenic line was not related to a lower ascorbate concentration. Although we did not correlate the
536 impairment of cAPX activity to the higher rate of cell death triggered by cryptogein in CDC48-TAP
537 cells, our results are in line with those of Mittler *et al.* (1999) who reported an increased cell death
538 in a transgenic tobacco line expressing antisense APX RNA infected by the *P. syringae* pv
539 *phaseolicola*. Our observation also raised the question of the ROS concentration. Indeed, in regard
540 to the role of cAPX in H₂O₂ detoxification, a higher rate of this oxidant and, more generally, an
541 alteration of the redox control, might be expected in the CDC48-TAP cells exposed to cryptogein.
542 Regarding H₂O₂, we previously reported that its production induced in the apoplast within 20
543 minutes by cryptogein through the activation of the NADPH oxidase NtRBOHD was similarly
544 observed in the WT and NtCDC48 overexpressing line (Rosnoblet *et al.*, 2017). As cryptogein also
545 triggered an increase of ROS concentration in intracellular compartments (Allan and Fluhr, 1997),
546 we tried to quantify this production in cell suspensions using the ROS-sensitive fluorescence probe
547 fluorescein H₂DCF-DA. However the results were poorly reproducible (data not shown).
548 Nevertheless, the measurement of the total glutathione content (GSH+GSSG) and of the
549 GSH/GSSG ratio gave interesting information. First, in WT cells, the content of both the reduced
550 and oxidized form of glutathione was reduced from 12 hours of cryptogein treatment. In spite of
551 this decrease, the percentage of GSH and the GSH/GSSG ratio remained constant, the ratio values
552 being similar to those reported in *A. thaliana* plantlets grown in air enriched or not with a high CO₂
553 concentration (Mhamdi *et al.*, 2010). According to Noctor *et al.* (2012) even though the
554 GSH/GSSG ratio remains unchanged, a decrease in glutathione concentration alone is sufficient to
555 lead to a less reducing environment for the plant cell. Thus, these data point out that cryptogein
556 triggers a modification in the redox status and also confirm Davoine *et al.* (2006) investigation
557 showing a significant reduction of the GSH concentration in tobacco leaves infiltrated with the
558 elicitor. Second, in cells that overexpress CDC48, the basal state of glutathione was equivalent to
559 those of WT cells. However, the decrease in glutathione content was more pronounced and the
560 percentage of GSH and of the GSH/GSSG ratio strongly decreased after 12 hours of cryptogein
561 treatment. Because GSH/GSSG ratios under 3:1 are indicative of a sever decrease in the cell
562 capacity to respond to an oxidative stress (Potters *et al.*, 2010), these results highlight that the over-
563 expression of NtCDC48 deeply affects the redox metabolism in cells facing the cryptogein-induced
564 immune response. Furthermore, we have shown that the decreases in GSH amount were neither
565 linked to GS gene expression nor GST activities, which could suggest an alteration at the level of
566 GS activity or in GSH degradation in CDC48-TAP cells. We cannot also exclude that the absence

567 of the induction of cAPX activity in CDC48-TAP cells more or less directly explains the decrease
568 in GSH level.

569 In conclusion, these data highlight a role for NtCDC48 in the regulation of cAPX at several
570 levels and, more generally, provided evidence that the rate of NtCDC48 expression impacts the
571 overall glutathione status. As both catalase and ascorbate peroxidase have also been identified as
572 putative partner of NtCDC48 (Rosnoblet *et al.*, 2017), this latter might represent a key regulator of
573 the cellular redox status. Further studies are required to investigate such possibility.

574

575 **Acknowledgements:** We thank DImaCell microscopy facilities in Dijon, Graham Noctor for sound
576 advices about redox state measurements, Agnès Klinguer for cell culture and maintenance, Maria
577 Concetta de Pinto for cAPX antibody, David Macherel and Laurence Dubrez-Daloz for advices.
578 Funding was provided by La Région de Bourgogne (PARI AGREE project) and the French
579 Ministry of Higher Education, Research and Innovation (HB PhD scholarship).

References

- Allan AC, Fluhr R.** 1997. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell* **9**, 1559–1572.
- Amako K, Chen G-X, Asada K.** 1994. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. *Plant and Cell Physiology* **35**, 497-504.
- Anjum NA, Sharma P, Gill SS *et al.*** 2016. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research International* **23**, 19002-19029.
- Asada K.** 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 601-639.
- Astier J, Besson-Bard A, Lamotte O, Bertoldo J, Bourque S, Terenzi H, Wendehenne D.** 2012. Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogean signalling in tobacco cells. *Biochemistry Journal* **447**, 249–260.
- Bai X, Yang L, Tian M, Chen J, Shi J, Yang Y, Hu X.** 2011. Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. *PLoS One* **6**, e20714.
- Baek GH, Cheng H, Choe V, Bao X, Shao J, Luo S, and Rao H.** 2013. Cdc48: a swiss army knife of cell biology. *Journal of Amino Acids* **2013**, 1–12.
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bègue H, Jeandroz S, Blanchard C, Wendehenne D, Rosnoblet C.** 2017. Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1861**, 3053–3060.
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D.** 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 21–39.
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein J-P, Ricci P.** 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 181–192.
- Chen L-J, Zou W-S, Wu G, Lin H-H, Xi D-H.** 2017. Tobacco alpha-expansin EXPA4 plays a role in *Nicotiana benthamiana* defence against Tobacco mosaic virus. *Planta* **247**, 355-368.
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF.** 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 1380–1384.

- Copeland C, Woloshen V, Huang Y, Li X.** 2016. AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor. *The Plant Journal* **88**, 294–305.
- Correa-Aragunde N, Foresi N, Lamattina L.** 2015. Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *Journal of Experimental Botany* **66**, 2913–2921.
- Davoine C, Falletti O, Douki T, Iacazio G, Ennar N, Montillet J-L, Triantaphylides C.** 2006. Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *Plant Physiology* **140**, 1484–1493.
- De Pinto MC, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas MDC, Gadaleta C, Delledonne M, De Gara L.** 2013. S-nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology* **163**, 1766–1775.
- Gou J-Y, Li K, Wu K et al.** 2015. Wheat stripe rust resistance protein WKS1 reduces the ability of the thylakoid-associated ascorbate peroxidase to detoxify reactive oxygen species. *The Plant Cell* **27**, 1755–1770.
- Fujiwara A, Togawa S, Hikawa T, Matsuura H, Masuta C, Inukai T.** 2016. Ascorbic acid accumulates as a defense response to Turnip mosaic virus in resistant *Brassica rapa* cultivars. *Journal of Experimental Botany* **67**, 4391–4402.
- Jaramillo J, Padilla MN, Carreras A, Corpas FJ, Barroso JB.** 2014. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S -nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527–538.
- Karimi M, De Meyer B, Hilson P.** 2005. Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**, 103–105.
- Kulik A, Noirot E, Grandperret V, Bourque S, Fromentin J, Salloignon P, Truntzer C, Dobrowolska G, Simon-Plas F, Wendehenne, D.** 2015. Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogin signalling: NO and ROS crosstalk in cryptogin signalling. *Plant, Cell & Environment* **38**, 331–348.
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R, Leon J.** 2011. *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**, 3501–3517.
- McGonigle B, Keeler SJ, Lau S-MC, Koeppe MK, O'Keefe DP.** 2000. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology* **124**, 1105-1120.
- Mhamdi A, Hager J, Chaouch S et al.** 2010. Arabidopsis glutathione reductase1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology* **153**, 1144–1160.

- Mittler R, Feng X, Cohen M.** 1998 Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *The Plant Cell* **10**, 461–473.
- Mittler R., Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inze D, Ellis BE.** 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **96**, 14165–14170.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**, 490–498.
- Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H.** 2008. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate-glutathione cycle. *Analytical Biochemistry* **383**, 320–322.
- Niehl A, Amari K, Gereige D, Brandner K, Mely Y, Heinlein M.** 2012. Control of tobacco mosaic virus movement protein fate by cell-division-cycle protein 48. *Plant Physiology* **160**, 2093–2108.
- Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH.** 2012. Glutathione in plants: an integrated overview: glutathione status and functions. *The Plant Cell* **35**, 454–484.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH.** 2016. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation: methods in oxidative stress research. *Plant, Cell & Environment* **39**, 1140–1160.
- Noctor G, Reichheld J-P, Foyer CH.** 2017. ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.013.
- Nutricati E, Miceli A, Blando F, De Bellis L.** 2006. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* glutathione S-transferases. *Plant Cell Reports* **25**, 997-1005.
- Park S, Rancour DM, Bednarek SY.** 2008. *In planta* analysis of the cell cycle-dependent localization of AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation. *Plant Physiology* **148**, 246–258.
- Paulech J, Solis N, Cordwell SJ.** 2013. Characterization of reaction conditions providing rapid and specific cysteine alkylation for peptide-based mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* **1834**, 372–379
- Potters G, Horemans N, Jansen MAK.** 2010. The cellular redox state in plant stress biology - A charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**, 292–300.
- Rosnoblet C, Bègue H, Blanchard C, Pichereaux C, Besson-Bard A, Aimé S, Wendehenne D.** 2017. Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced

immune response in tobacco: role of Cdc48 in plant immunity. *Plant, Cell & Environment* **40**, 491–508.

Schmidt GW, Delaney SK. 2010. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics* **283**, 233–241.

Queval G, Noctor G. 2007. A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Analytical Biochemistry* **363**, 58–69.

Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L. 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* **134**, 1100–1112.

Wang Q, Song C, Li C-CH. 2004. Molecular perspectives on p97–VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *Journal of Structural Biology* **146**, 44–57.

Wendehenne D, Gao Q, Kachroo A, Kachroo P. 2014. Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 127–134.

Xing S, Wallmeroth N, Berendzen KW, Grefen C. 2016. Techniques for the analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Plant Physiology* **171**, 727–758.

Zhou S, Hong Q, Li Y, Li Q, Wang M. 2017. Autophagy contributes to regulate the ROS levels and PCD progress in TMV-infected tomatoes. *Plant Science* **269**, 12–19.

Figure legends

Figure 1. Interaction between cAPX and NtCDC48. (A) Pull-down of cAPX with His-NtCDC48 beads. His-NtCDC48 recombinant proteins have been fixed on Ni-NTA affinity slurry and incubated with proteins extracted from WT cells treated with 100 nM cryptogein. Negative control has been performed with Ni-NTA beads without His-NtCDC48. Western blots allowed to detect His-Tag and cAPX. After incubation of protein extracts with beads, total lysates have been loaded in gels as “posts” in order to check the absence of protein degradation. (B & C) Immunoprecipitation (IP) of NtCDC48 proteins followed by Western blot raised against cAPX. Proteins were extracted from WT (B) and NtCDC48-TAP (C) cells treated with 100 nM of cryptogein during indicated times. The presence of NtCDC48 and cAPX in total lysates and in IP have been detected by Western blot against endogenous proteins. Ponceau staining show equal protein loading of total lysates. As negative controls for NtCDC48-TAP cells (C), proteins have been incubated with magnetic beads without antibody. (D) Negative controls for WT cells: protein extract has been incubated with free beads or subjected to IP through antibody raised against phosphorylated MAPK followed by Western blot targeting cAPX. The results are representative of three replicates. MW: molecular weight.

Figure 2 Interaction between cAPX and NtCDC48 detected by FRET-FLIM. (A) Representative FLIM images of tobacco leaves expressing CFP-NtCDC48 alone (donor, left panel) or CFP-CDC48 and the acceptor cAPX-YFP (right panel). Vertical bar on the left indicates a continuous color scale of the CFP lifetime, ranging from 1 to 3 ns. N = nucleus. Asterisks indicate fluorescence lifetime signal of the chloroplast autofluorescence. (B) FLIM analysis of CFP-CDC48 alone and together with cAPX-YFP in tobacco leaves. N: number of measurement realized; Average τ : CFP mean lifetime in nanoseconds; SEM : standard error; FRET : percentage of FRET efficacy. Statistical analysis was carried-out by t-Test.

Figure 3. cAPX transcripts and protein accumulations in WT and NtCDC48-TAP cells. mRNA *cAPX* amount was measured in WT (A) and NtCDC48-TAP (B) cells elicited with 100 nM of cryptogein. Accumulation of *cAPX* was analyzed by reverse transcriptase quantification PCR (RT-qPCR) using *L25* mRNA as calibrator gene. Five independent experiments were performed and a statistical analysis was carried out by an ANOVA test followed by Tukey’s range test. Error bars represent mean \pm standard error (S.E), and stars indicate significant differences between treated and control conditions ($p < 0.001$). (C) Time course of cAPX protein accumulation. WT and NtCDC48-TAP cells were treated with 100 nM of cryptogein or an equivalent volume of water as control. Twenty μ g of extracted proteins were separated by SDS-PAGE, and endogenous cAPX was

analyzed by Western blot (upper panel). Protein loading was checked using Ponceau staining, shown in bottom panel. Results are representative from 5 experiments. **(D)** Relative distribution of the average of two immuno-reactive signals (top one at 33 kDa and bottom one at 31 kDa) was calculated according to Image J software from 5 independent experiments and depicted in the lower panel.

Figure 4. Analysis of cAPX phosphorylation by gel retardation. **(A)** Western blot against cAPX protein in SDS-PAGE and in Phos-tag™ AAL-107 (Wako) supplemented gel in WT cells during cryptogeiin elicitation. The presence of cAPX was detected by anti-APX antibody. **(B)** Positive control have been performed with immunoblots raised against phosphorylated MAP kinases in WT cells. On lower panels (total lysate) Ponceau staining allowed to follow the progress of whole proteins migration and to check the equal loading of proteins in gels.

Figure 5. Effect of N-ethylmaleimide (NEM) on cAPX protein electrophoretic migration. Time course of cAPX protein accumulation. WT and NtCDC48-TAP cells were treated with 100 nM of cryptogeiin or an equivalent volume of water as control. Twenty µg of proteins extracted with buffer supplemented by 10 mM N-Ethylmaleimide (NEM) were separated by SDS-PAGE, and endogenous cAPX was analyzed by Western blot. Protein loading was checked using Ponceau staining, shown in bottom panels. Results are representative from 5 experiments.

Figure 6. Gel filtration analysis of the two immunoreactive cAPX signals in WT and NtCDC48-TAP cells. Protein (500 µg) extracted with buffer supplemented with NEM 10 mM from cryptogeiin-treated (100 nM) wild-type (WT) and NtCDC48-TAP cells were separated according to their molecular weight using gel filtration chromatography. After TCA precipitation of each fraction, cAPX was detected by Western blot analysis.

Figure 7. Ascorbate peroxidase activity and quantification of ASA in WT and NtCDC48-TAP cells. APX activity within WT **(A)** and NtCDC48-TAP cells **(C)** treated with 100 nM cryptogeiin (solid line) or an equivalent volume of water (dashed line). Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test. Asterisk indicates significant difference between treated and control conditions ($p < 0.05$). **(B)** Measurements of basal APX activity in WT and NtCDC48-TAP cells. Statistical analysis was carried out by T-test. Asterisks represent significant difference between WT and NtCDC48-TAP APX activity ($p < 0.001$). Error bars represent mean \pm S.E of four biological repetitions ($n = 4$) and all APX activity is expressed as nanomoles of ascorbate oxidized per minutes per milligram of proteins. **(D, E)** Quantification of the total ascorbate **(D: reduced**

ascorbate and its oxidized form dehydroascorbate) and reduced ascorbate (**E**) within WT and NtCDC48-TAP cells treated with 100 nM of cryptogein. Error bars represent mean \pm S.E of four biological repetitions (n = 4). Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test (n.s.: not significant).

Figure 8. Redox status in WT and NtCDC48-TAP cells. All experiments was performed on WT and NtCDC48-TAP cells treated with 100 nM of cryptogein during indicated time. Error bars represent mean \pm S.E of four biological repetitions (n = 4). Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test. Different letters indicates statistical differences ($p < 0.05$). (**A**), total glutathione content (GSH + GSSG) was expressed as μmol of GSH per milligram of protein. (**B**), reduced glutathione (GSH, deduced from GSSG and total glutathione amounts) was expressed as μmol of GSH per milligram of protein. (**C**), percentage reduction of the glutathione pool (GSH/total glutathione \times 100). Values of the GSH/GSSG ratio are indicated in white on the plot. For statistical analysis, lower-case and capital letters correspond to percentage reduction of glutathione and GSH/GSSG ratio statistical groups, respectively. (**D**), glutathione reductase activity have been measured in treated cells and expressed as micromoles of NADPH oxidized per minutes per milligram of proteins.

Figure 9. GS and GST transcripts accumulation and GST enzymatic activity in WT and NtCDC48-TAP cells. (**A and B**), mRNA *cAPX* amount was measured in WT and NtCDC48-TAP cells elicited with 100 nM of cryptogein. Accumulation of *GS1* and *GS2* (**A**) *GST tau* and *phi* (**B**) was analyzed by reverse transcriptase quantification PCR (RT-qPCR) using *L25* mRNA as calibrator gene. Five independent experiments were performed and a statistical analysis was carried out by an ANOVA test followed by Tukey's range test. Error bars represent mean \pm standard error (S.E), and stars indicate significant differences between treated and control conditions ($p < 0.001$). (**C**), Enzymatic activities of GSTs tau and Phi from tobacco WT and overexpressing NtCDC48-TAP cells during cryptogein treatment. The substrate CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) was used for the measurement of the GST activity by absorbance at 340 nm. Error bars represent mean \pm S.E of four biological repetitions (n = 4). Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test. Different letters indicates statistical differences ($p < 0.05$).

Figure 1

Figure 1

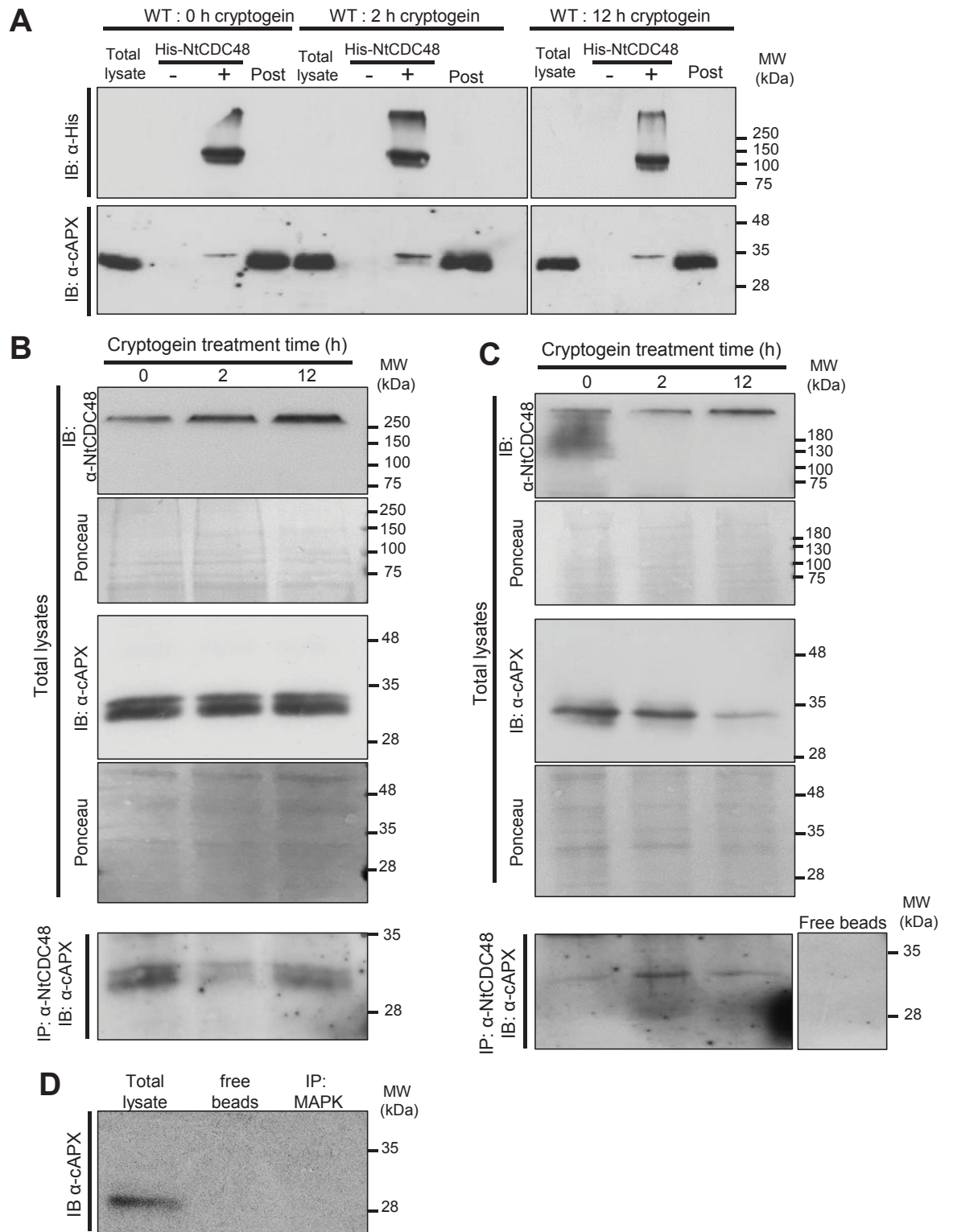
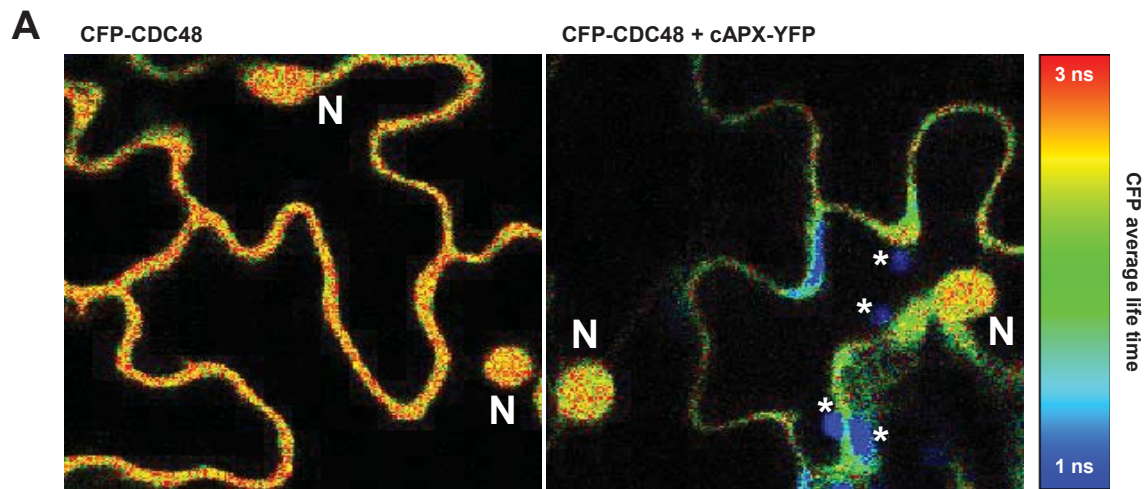


Figure 2

Figure 2



B

Donnor	Acceptor	N	Average τ (ns)	SEM	FRET (%)	p-value
CFP-CDC48	-	23	2.97	0.04	-	-
CFP-CDC48	cAPX-YFP	25	2.41	0.04	19.0	$1.21e^{-13}$

Figure 3

Figure 3

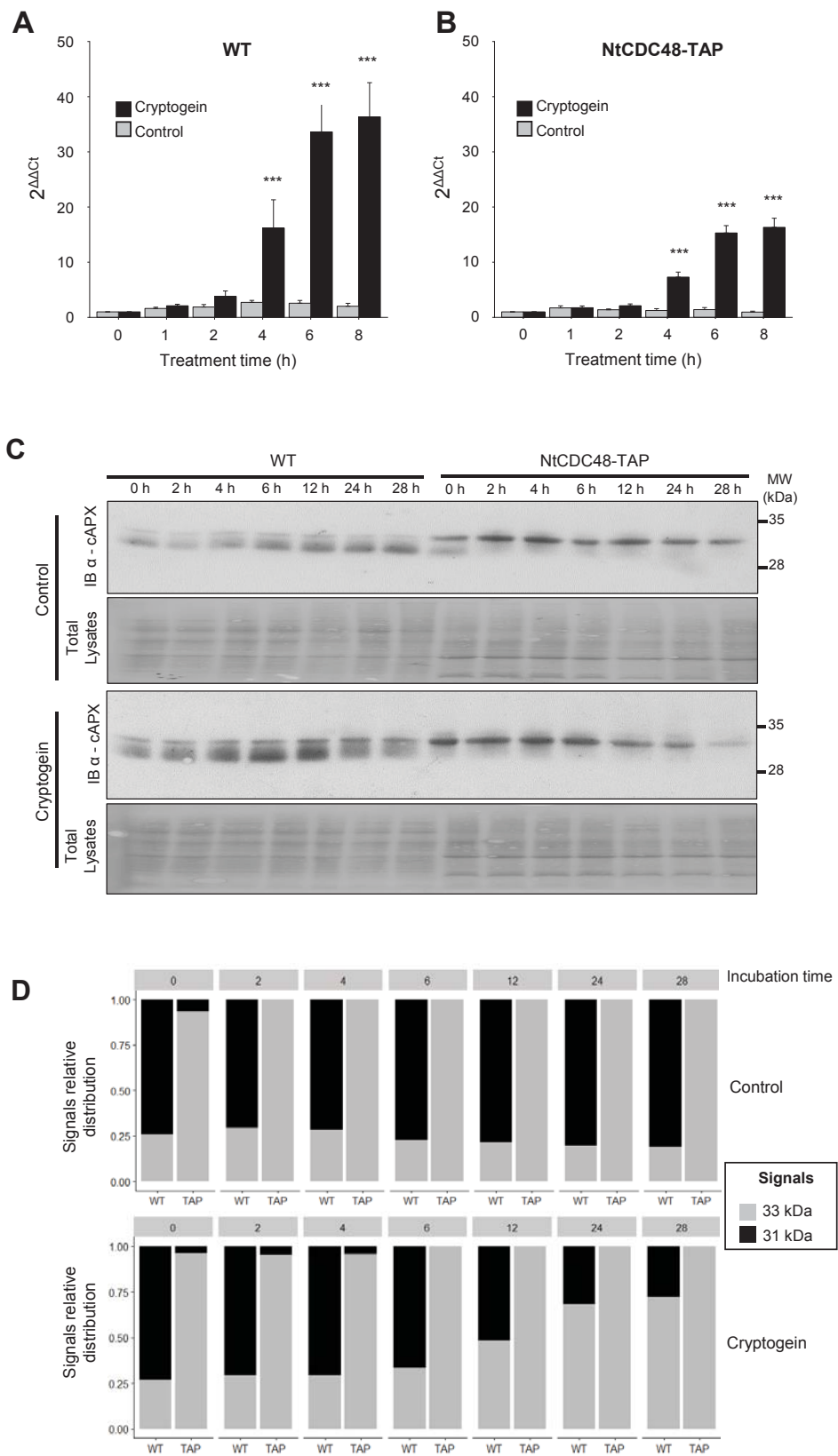


Figure 4

Figure 4

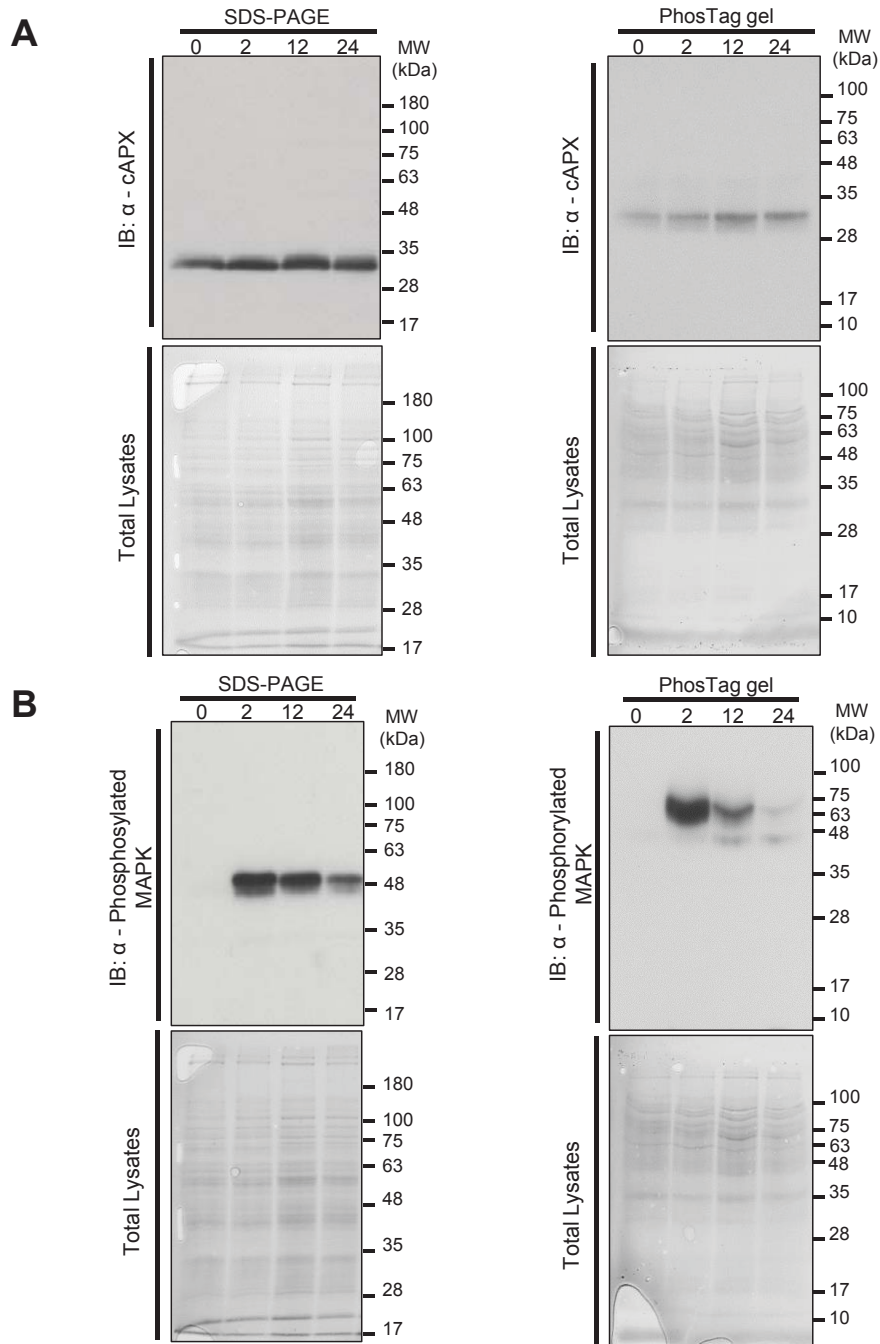


Figure 5

Figure 5

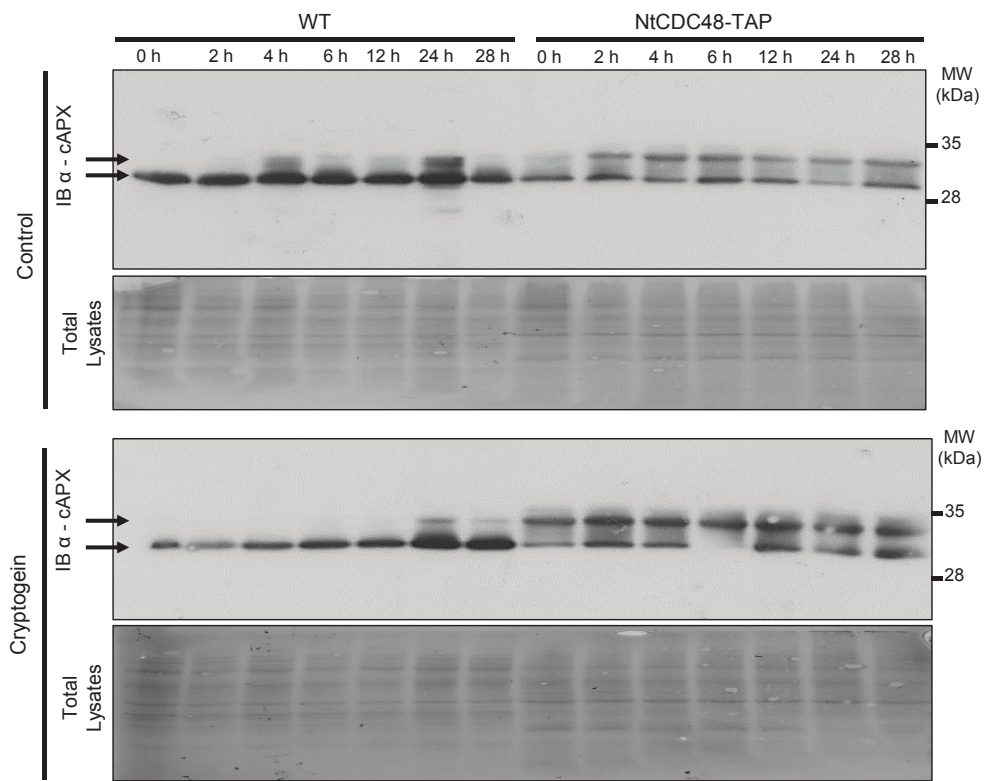


Figure 6

Figure 6

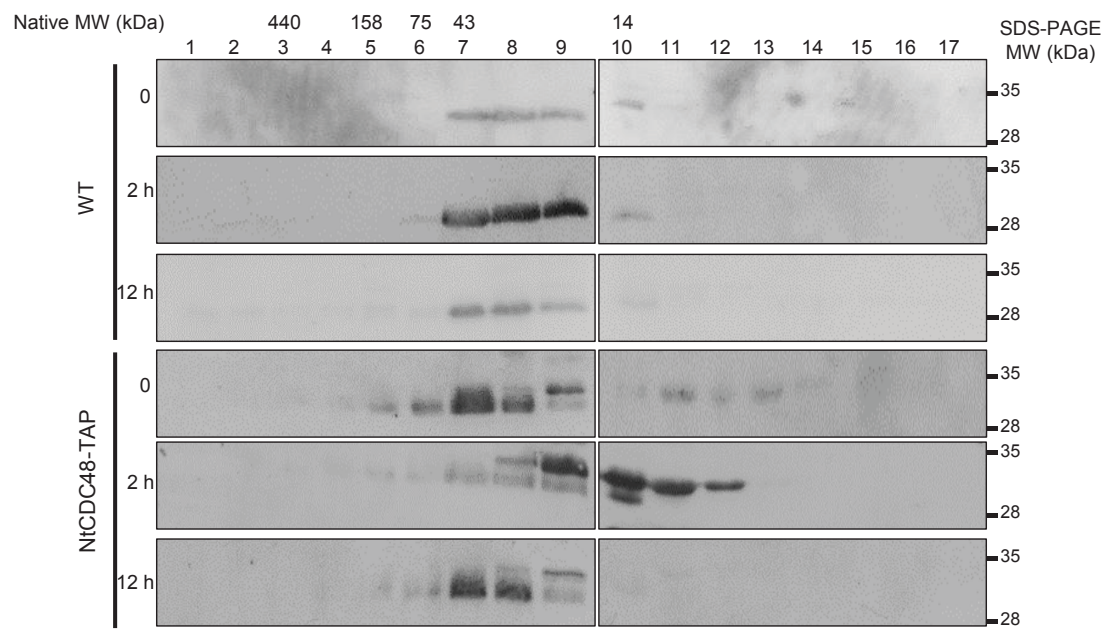


Figure 7

Figure 7

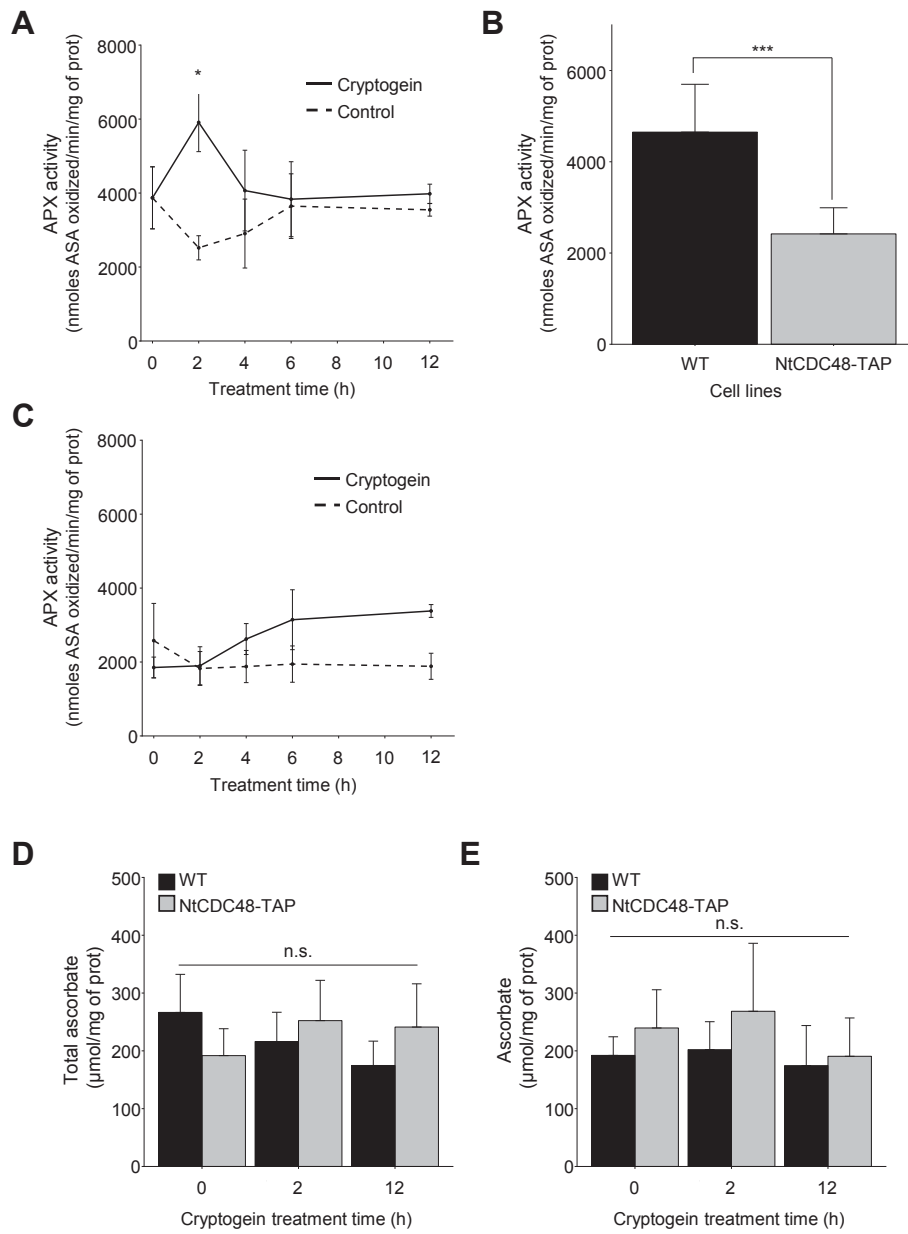


Figure 8

Figure 8

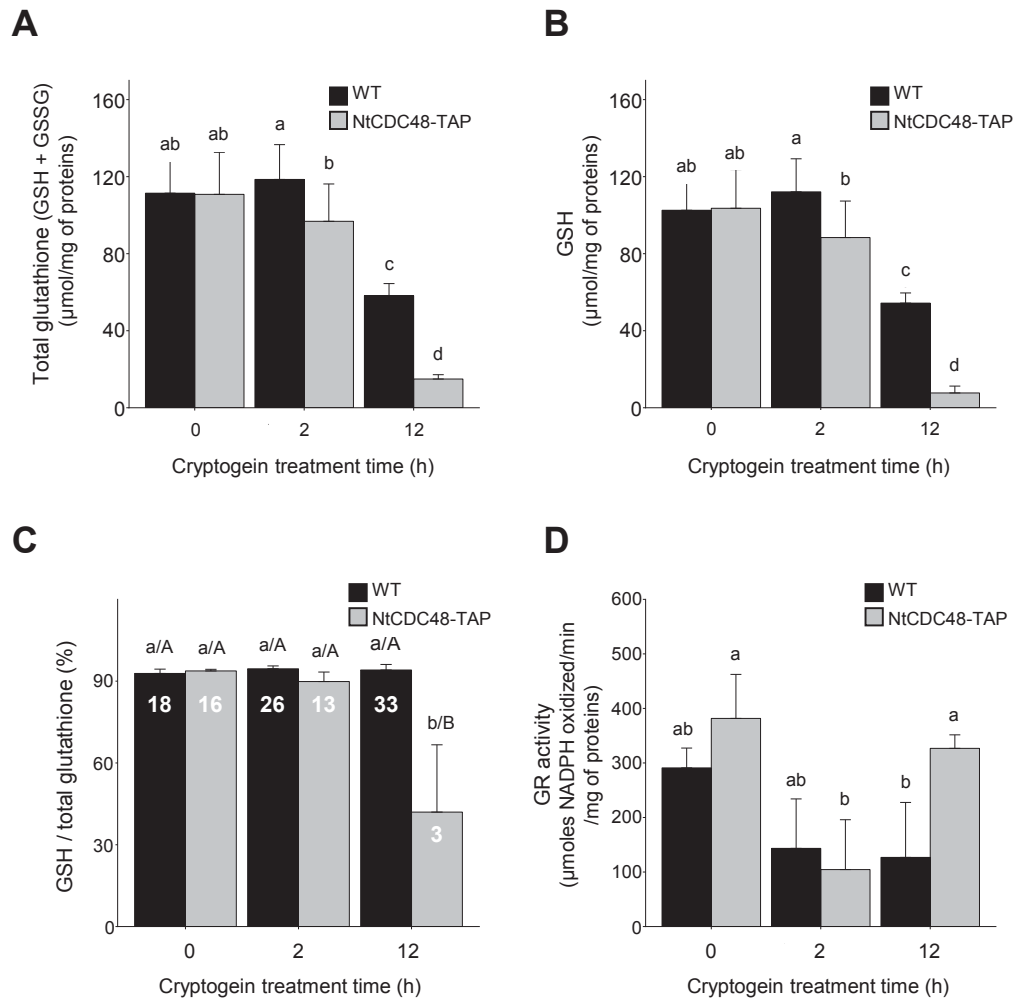
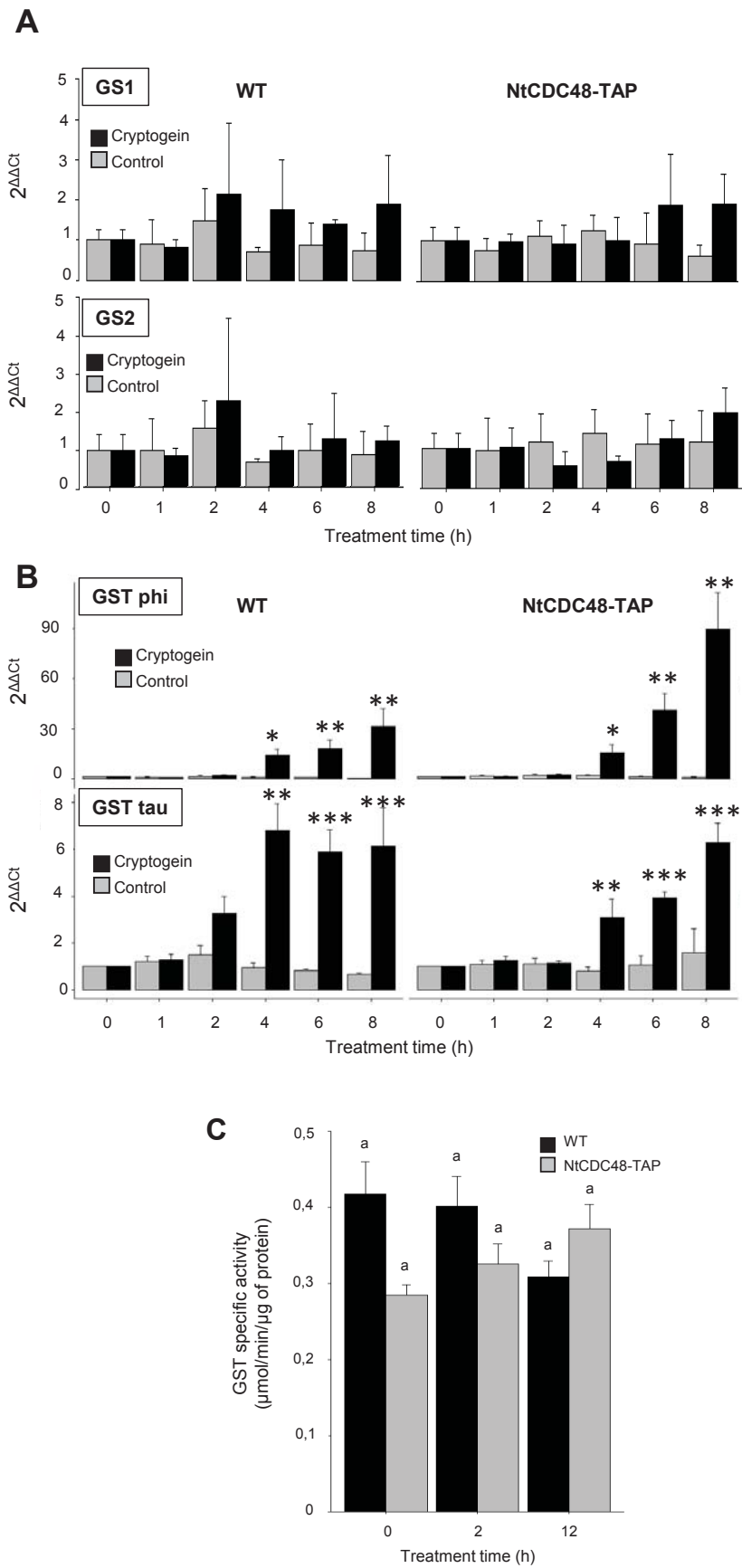


Figure 9

Figure 9



Supplemental data

Supplemental Material and Methods

Recombinant cAPX production and purification

His-tagged cAPX protein was produced in *E. coli* (Rosetta II) cells grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium. When the culture reached A600~0.45, protein production has been induced with 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) during 3 h before purification using His-trap HP® column by FPLC chromatography on AKTA Purifier® following the manufacturer's instructions (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). His-cAPX containing fractions were selected following SDS-PAGE analysis, pooled and dialyzed against 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (NaPi), pH 7.0, 200 mM KCl, 1 mM EDTA,. Next, protein was concentrated up to ~4 μg/μL with a Amicon Ultra centrifugal filter (cutoff 10 kDa, Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

cAPX biotin switch and activity assay

Ten μg of recombinant cAPX were treated with GSSG (500 μM) or with GSNO (500 μM) overnight and then were subjected to biotin switch according to Astier *et al.* (6) with some adaptation. All the steps were performed in half-light. Briefly, after addition of freshly prepared MMTS [methyl methanethiosulfonate, 2 M in DMF (dimethylformamide)] and SDS (25 %, w/v) to final concentrations of 20 mM and 2.5 % respectively, samples were incubated for 20 min at 50°C. Proteins were then precipitated with 10 vol. of acetone at -80°C for 30 min, before centrifugation at 14000 g for 15 min. After washing (3 vol. of 80 % acetone), the pellets were suspended in 85 μl of HEN buffer containing 1 % SDS and mixed with 1 mM biotin-HPDP {N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, dissolved in ¼ DMF and ¾ DMSO} and 20 mM ascorbate. Proteins were then precipitated by addition of 10 vol. of acetone at -80°C for 30 min, followed by a centrifugation at 14000 g for 15 min at 4°C. The pellets were resuspended in 40 μl of HEN. Biotinylation of cAPX was then analysed by immunoblotting with peroxidase-coupled anti-biotin antibodies (1:10 000 dilution, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) or with antibody raised against cAPX.

As previously described for endogenous one, activity of recombinant cAPX have been measured at 290 nm in 1 mL of activity mix (50 mM potassium phosphate, pH 7.0; 0,5 mM ascorbate and 0.01 mg/mL BSA) with 120 μg of recombinant cAPX. Chemical products are used at the following concentrations: 500 μM GSNO, 1 mM diethylamine NONOate (DEA/NO), 500 μM GSH or GSSG, 250 μM 2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) and 5 mM NEM. The activity was expressed in nanomoles of ascorbate oxidized per minute per milligram of protein.

Legends to supplemental figures

Supplemental Figure S1. cAPX sequence from UniProtKB with matching peptides (in bold) identified by mass spectrometry analysis following co-IP of NtNtCDC48 (9).

Supplemental figure S2. Confocal microscopy shows the subcellular co-localization between cAPX and NtNtCDC48 in tobacco leaves double-agro-infiltrated with cAPX-YFP (yellow) and CFP-NtNtCDC48 (blue). Excitation has been performed with two photon excitation wavelength of 820 nm and emission collection with [563-588] nm filter for YFP and a [400-492] nm filter for CFP. Asterisks indicate chloroplasts autofluorescence. White arrow targets localization of proteins. N = nucleus.

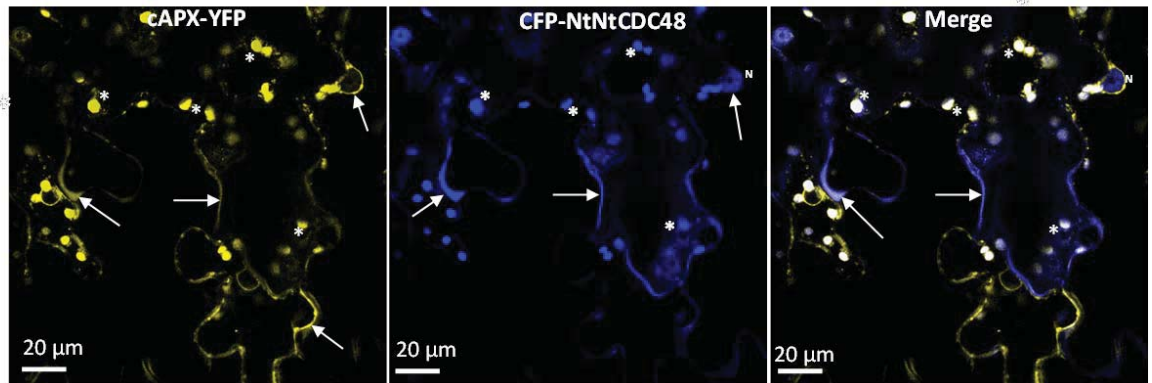
Supplemental figure S3. Analysis of recombinant APX nitrosylation. (A) Nitrosylation of recombinant His-cAPX *in vitro* by the NO donor GSNO. Recombinant proteins (10 µg) was treated with GSNO (500 µM) or GSSG (500 µM) overnight and then subjected to biotin switch. Detection of biotinylated proteins was achieved by immunoblotting with cAPX or with anti-biotin antibodies. (B) Recombinant His tagged cAPX activity *in vitro*. His-APX (120 µg) was treated with 500 µM of GSH, GSSG or GSNO, or with 1 mM of DEA/NO, or with 5 mM NEM. Statistical analysis was carried out by Kruskal-Wallis test. Different letters indicates statistical differences ($p < 0.05$). (C) Electrophoretic mobility of His-APX. His-APX was separated by SDS-PAGE after treatment with GSNO (500 µM) and negative controls have been performed through addition of the NO scavenger cPTIO (250 µM) or with NEM (5 mM). Recombinant cAPX was visualized on Coomassie blue staining (0,5 µg of protein, upper panel) and analyzed by Western blotting (0,1 µg of protein, lower panel).

Supplemental Figure S4. Comparison of total and cytosolic APX activities within WT cells treated with cryptogein 100 nM during 2 hours. Inactivation of chloroplastic APXs by the absence of ASA in the extraction buffer and pre-incubation with H₂O₂ enables to determine only cytosolic APX activity (Amako et al., 1994). Error bars represent mean ± S.E of four biological repetitions (n = 4). Statistical analysis was carried out by T-test (n.s.: not significant).

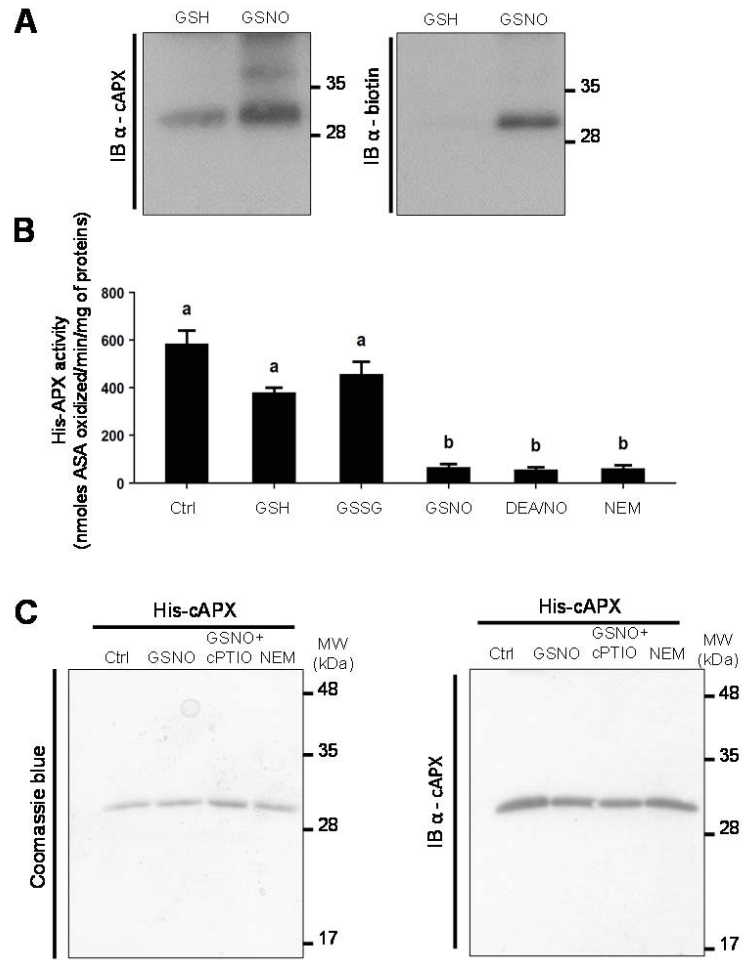
Supplemental Figure S1

>tr|Q42941|Q42941_TOBAC Ascorbate peroxidase OS=Nicotiana tabacum GN=APX PE=2 SV=1
MGKCYPTVSEEYLKAVDKCK**RKLRGLIAEKNCAPLMLRL**LAWHSAGTYDVCSK**TGGPFGT**
MRLKAEQGHGANNGIDIAIRLLLEPIKEQFPILSYGDFYQLAGVVAVEVTGGPDVPFHPG**RED**
KTEPPVEGRLPDATKGSDHLRDVFK**QMGLSDKDIALSGGHTLGRCHKERSGFEGPWT**
TNPLIFDNSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRPLVEKYAADEDAFFADYAE**AHLK**
LSELGFAEA

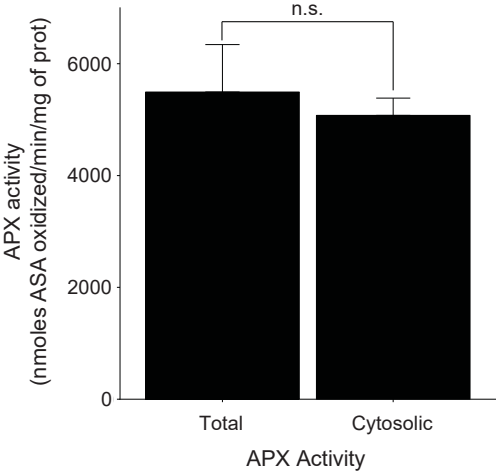
Supplemental Figure S2



Supplemental Figure S3



Supplemental Figure S4



3. Résultats complémentaires

3.1. Confirmation de l'interaction *in planta* par la méthode du BiFC

Nous avons souhaité confirmer l'interaction entre CDC48 et cAPX *in planta* en utilisant une approche de BiFC (*Bimolecular fluorescence complementation*) (Gehl et al., 2009). Cette technique consiste à faire exprimer simultanément par la plante un premier partenaire fusionné à la partie N-terminale d'un fluorophore et le second partenaire fusionné à la partie C-terminale du même fluorophore. Si une interaction se produit entre les deux partenaires, il y a reconstitution du fluorophore et un signal de fluorescence est mesuré après excitation (**Fig. MM.1**). Dans le cas présent, nous avons utilisé comme fluorophore la protéine CFP et nommé sa région N-terminale SCN (*Split CFP N-terminus*) et sa région C-terminale SCC (*Split CFP C-terminus*) (Gehl et al., 2009). Ainsi, 8 constructions ont été réalisées en positionnant les régions C- ou N-terminales du fluorophore à chaque extrémité de CDC48 et de cAPX, puis les 8 combinaisons correspondantes (**Tab. MM.3**) ont été produites dans des plants de tabacs par agro-infiltration afin de confirmer l'interaction entre CDC48 et cAPX. En plus de ces 8 combinaisons, une neuvième a été utilisée comme contrôle positif: SCN-CDC48 + SCC-CDC48. En effet, du fait de l'homohexamérisation de CDC48, la probabilité de former un fluorophore fonctionnel permettant de vérifier l'expression correcte des constructions plasmidiques était importante et nous a semblé être un bon témoin positif d'expression.

Expérimentalement, 4 jours après agroinfiltration de feuilles de tabac âgées de 3 mois, des disques foliaires ont été analysés par microscopie à épifluorescence afin de sélectionner les combinaisons fonctionnelles. Ainsi, la production de cAPX-SCN conjointement à SCC-CDC48 a révélé la fluorescence la plus intense et cette combinaison a donc été choisie pour les analyses de BiFC en microscopie confocale. Ces analyses ont permis de confirmer l'interaction entre cAPX-SCN et SCC-CDC48, l'émission de fluorescence étant révélatrice de la reconstitution du fluorophore (**Fig. 2.3A**). La fluorescence générée par cAPX-SCN et SCC-CDC48 a été détectée

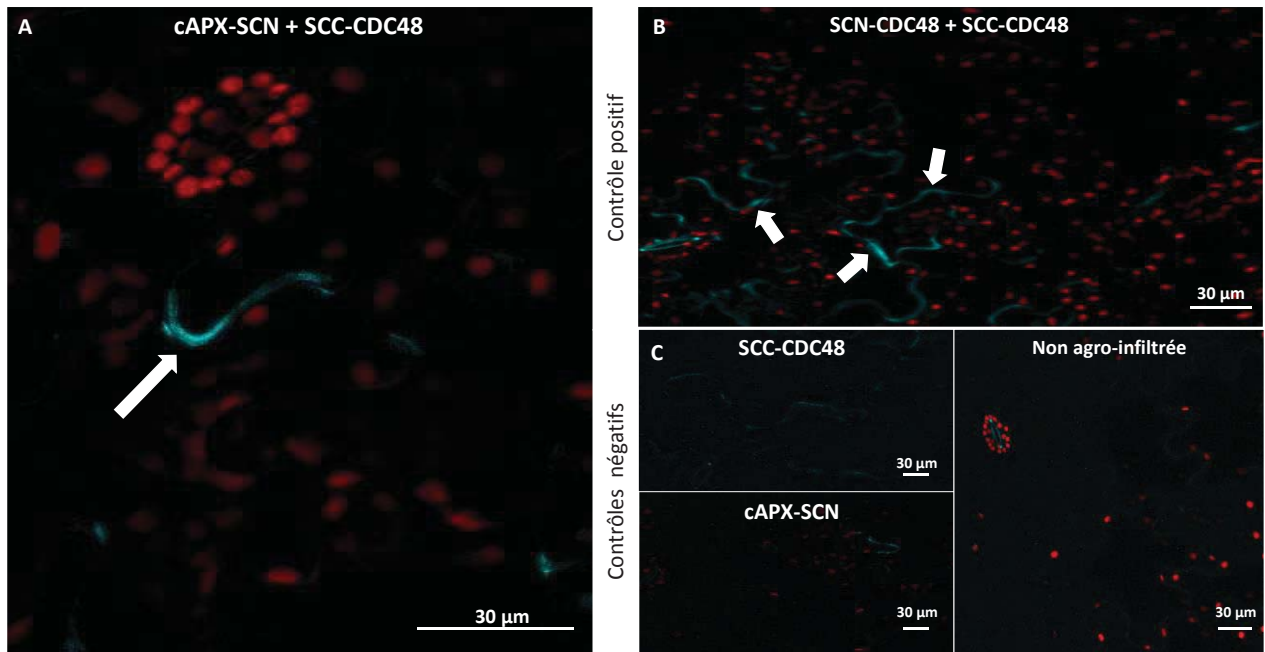


Figure 2.3 Etude de l'interaction entre cAPX-SCN et SCC-CDC48 par la méthode du BiFC. **A**, disques foliaires exprimant les constructions cAPX-SCN et SCC-CDC48, **B**, disques foliaires exprimant les constructions SCN-CDC48 et SCC-CDC48, **C**, disques foliaires exprimant les constructions SCC-CDC48 ou cAPX-SCN ou n'ayant pas été agro-infiltrés. Les agroinfiltrations ont été réalisées dans des feuilles de tabac âgées de 3 mois. Quatre jours après agroinfiltration, des disques foliaires ont été prélevés et l'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocale TCS SP8 (Leica). Après excitation de la CFP par un laser à argon à 488 nm, la fluorescence de la CFP (460-518 nm), indiquée par les flèches blanches, a été récupérée par un photomultiplicateur de type hybride (HyD). L'autofluorescence des chloroplastes (650-700 nm) a été récupéré par un photomultiplicateur classique. Les images sélectionnées ici sont représentatives de 3 expériences biologiques indépendantes.

dans le cytoplasme, en accord avec la localisation subcellulaire connue de cAPX. Comme attendue, la fluorescence mesurée dans les contrôles positifs exprimant SCC-CDC48 et SCN-CDC48 est plus forte et plus étendue (**Fig. 2.3B**), confirmant à la fois la production des protéines dans les feuilles de tabac et l'assemblage des monomères de CDC48 exogènes en complexe. Nous avons également souhaité vérifier qu'aucune émission de fluorescence n'était détectée dans des feuilles de tabac exprimant uniquement SCC-CDC48, cAPX-SCN ou non agro-infiltrées (**Fig. 2.3C**). Malheureusement, bien que beaucoup plus faible que celle observée en présence des deux partenaires, une émission de fluorescence a été détectée de manière récurrente dans ces témoins négatifs, mettant en doute les résultats des expériences de BiFC. De plus, il est admis que la technique du BiFC révèle souvent de faux positifs (Xing et al., 2016), en raison notamment de la complémentation irréversible du fluorophore. A ce titre, le clonage des deux partenaires sous la dépendance d'un promoteur fort de type 35S aurait pu favoriser des interactions aspécifiques et donc une liaison permanente des moitiés de fluorophores. En conséquence, nous avons décidé d'aborder l'étude de l'interaction entre CDC48 et cAPX *in planta* en utilisant la technique du FRET-FLIM, dont les résultats se sont révélés performants et fiables (**Chapitre 2, article 3**).

3.2. Analyse du profil électrophorétique de cAPX

Lors de cette étude, nous avons montré que cAPX présente un profil de migration particulier en SDS-PAGE. En effet, dans des expériences de Western blot ciblant la protéine endogène, deux signaux immuno-réactifs de 31 et 33 kDa ont été détectés. Grâce aux expériences de filtration sur gel, nous avons montré que ce profil est probablement dû à une conformation particulière de cAPX lors de la migration qui est abolie dans des extraits protéiques traités par le N-ethylmaleimide (NEM), un agent alkylant.

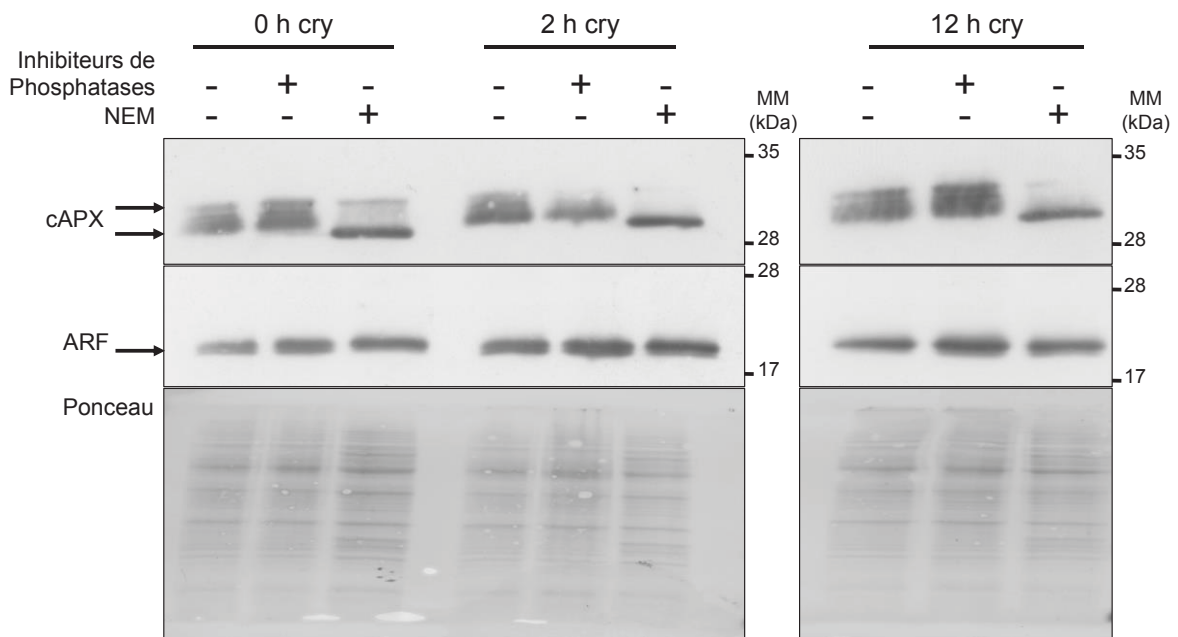


Figure 2.4 Analyse par Western blot du profil électrophorétique des protéines cAPX et ARF. Des cellules sauvages ont été traitées par 100 nM de cryptogéine pendant 12 heures. Pour chaque prélèvement, l'extraction protéique a été réalisée dans un tampon d'extraction éventuellement supplémenté avec des inhibiteurs de phosphatases (1 mM Na_3VO_4 , 50 mM β -glycérophosphate) ou du N-éthylmaleimide (10 mM). Vingt μg de protéines ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 15 % (m/v). Après transfert sur membrane de nitrocellulose, l'uniformité du dépôt a été vérifiée par une coloration au Rouge Ponceau. Les protéines ont été révélées par Western blot dirigés soit contre la protéine cAPX, soit contre la protéine ARF. Les flèches noires indiquent la présence des différents signaux immunoréactifs. Le résultat présenté ici est représentatif de 3 répétitions biologiques indépendantes.

Au début de cette étude, nous avons contrôlé que les variations du profil de migration électrophorétique étaient bien spécifiques à cAPX et non pas liées à un biais technique. Pour ce faire, nous avons comparé le profil de migration de cAPX à celui de la protéine ARF. Cette dernière présente une masse molaire proche de celle de cAPX, est elle-aussi cytosolique et interagit avec CDC48 (Rosnoblet et al., 2017).

Expérimentalement, des échantillons protéiques, issus de cellules sauvages traitées avec la cryptogéine durant 2 h, 12 h ou non traitées, ont été supplémentés ou non avec des inhibiteurs de phosphatase (Na_2VO_4 et β -glycérophosphate) ou du NEM, comme décrit dans la publication n°3. L'analyse par Western blot de ces échantillons, à l'aide des anticorps spécifiques respectifs, a révélé que la protéine ARF ne présentait pas de double signal ou d'altération de migration électrophorétique en présence de NEM ou d'inhibiteurs de phosphatases, alors que les deux bandes de 31 et 33 kDa sont bien détectées avec l'anticorps anti-APX, le signal de 31 kDa étant largement prépondérant en présence de NEM (**Fig. 2.4**). De ce fait, les variations de mobilité électrophorétiques observées sont bien spécifiques à la protéine cAPX et non pas liées à nos conditions expérimentales.

3.3. Etude de la dimérisation de cAPX et activité ascorbate peroxydase *in gel*

Il a été montré que l'homodimérisation de cAPX est nécessaire à son activité enzymatique (Hong et al., 2018; Mittler and Zilinskas, 1991). Notre étude révèle que dans la lignée CDC48-TAP, cAPX est détectée à une masse molaire plus importante en SDS-PAGE (33 kDa au lieu de 31 kDa) et n'est pas activée en réponse à la cryptogéine. Nos expériences de filtration sur gel en conditions natives n'ayant pas mis en évidence de dimérisation de cAPX dans aucune de nos lignées cellulaires, nous avons analysé la migration de cAPX en conditions natives sur gel d'acrylamide, dans des extraits protéiques provenant des deux lignées cellulaires traitées par la cryptogéine (**Fig. 2.5A**).

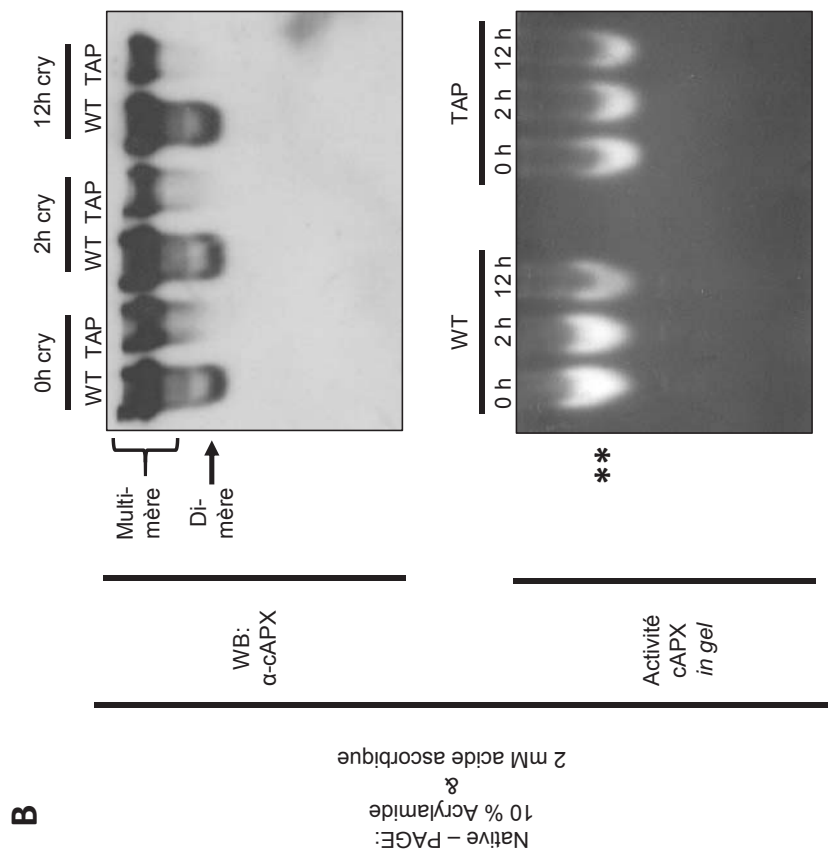
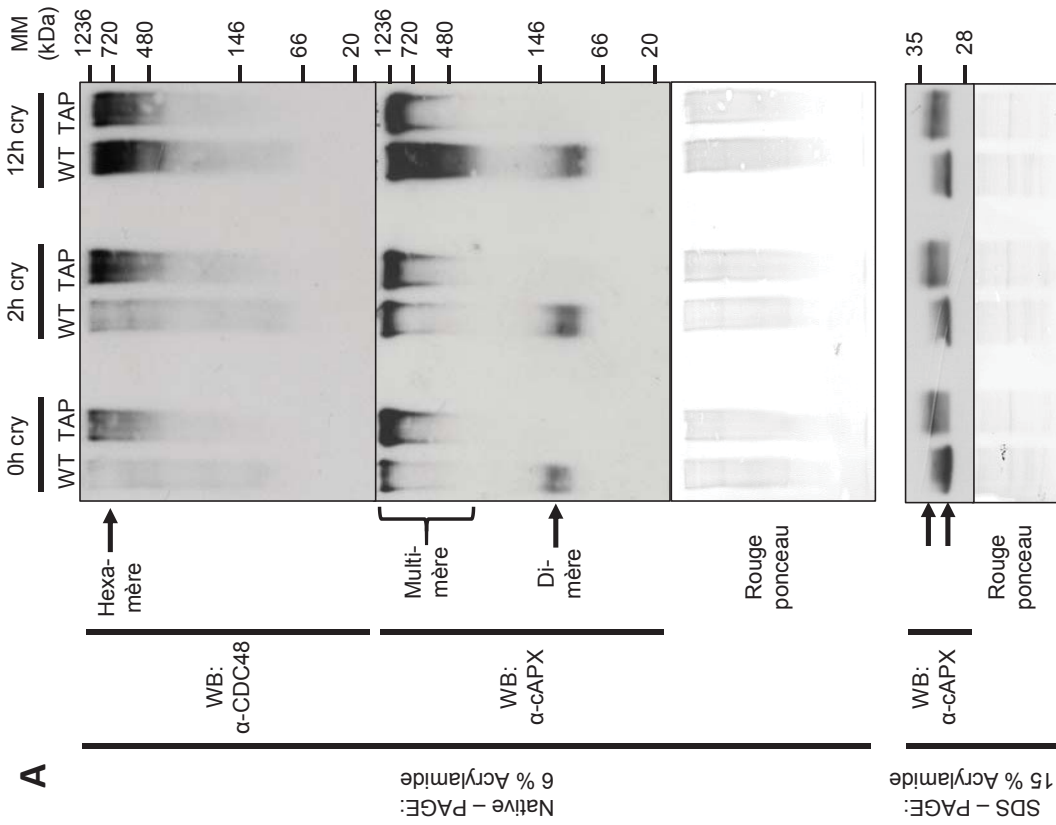


Figure 2.5 Etude de la dimérisation de cAPX et de l'activité ascorbate peroxydase *in gel*. Des cellules sauvages et CDC48-TAP ont été traitées par 100 nM de cryptogéine pendant 12 heures. **A)** Etude de la masse moléculaire apparente de cAPX et de CDC48 en condition non dénaturante (panneau du haut). Etude de la masse moléculaire de cAPX en condition dénaturante (panneau du bas). Vingt μ g de protéines ont été chargés sur un gel Native-PAGE 6 % (m/v) (panneau du haut) ou SDS-PAGE 15 % (m/v) (panneau du bas). Après transfert sur membrane de nitrocellulose, l'uniformité des dépôts a été vérifiée par une coloration au Rouge Ponceau. Les protéines ont été révélées par Western blot dirigé soit contre la protéine cAPX, soit contre la protéine CDC48. **B)** Etude de la masse moléculaire apparente de cAPX en condition non dénaturante lorsque les protéines ont été prélevées dans le tampon d'extraction utilisé pour l'activité APX *in gel* (panneau du haut). Mesure de l'activité APX *in gel* par la méthode du bleu nitro-tétrazolium (panneau du bas). Vingt μ g de protéines supplémenté de 2 mM d'acide ascorbique ont été déposés sur un gel Native-PAGE 10 % (m/v). Les protéines ont été révélées par Western blot dirigé contre la protéine cAPX (panneau du haut). Pour les différents Western blot, les flèches noires indiquent la présence des différents signaux immunoréactifs. Pour la mesure *in gel* de l'activité APX, les étoiles indiquent la présence d'un signal positif. Les résultats présentés ici sont représentatifs de 3 répétitions biologiques indépendantes.



Comme contrôle positif, nous avons réalisé un Western blot dirigé contre CDC48. La protéine est bien présente sous forme d'hexamère (**Fig. 2.5A**; panneau du haut) et est plus abondante dans la lignée surexpresser CDC48-TAP. Concernant cAPX, en condition native deux signaux immuno-réactifs correspondants à des masse molaire différentes sont observés (**Fig. 2.5A**; panneau du haut). Le premier signal a une masse molaire apparente entre 66 et 146 kDa et pourrait correspondre à un dimère de cAPX. De manière intéressante, ce signal n'est retrouvé que dans la lignée sauvage, là où est majoritairement détectée la forme de cAPX migrant à 31 kDa (**Fig. 2.5A**; panneau du bas) et l'induction de son activité par la cryptogéine. Le deuxième signal, visualisé cette fois-ci dans les deux lignées, est détecté à des masses moléculaires supérieures à 700 kDa et pourrait correspondre à un multimère de cAPX, tels que décrit chez le riz (Hong et al., 2018).

Afin d'étudier l'activité cAPX des dimères et multimères détectés sur gel natif, nous avons réalisé des mesures d'activité ascorbate peroxydase *in gel* en utilisant le protocole décrit par Mittler and Zilinskas (1993) (**Fig. 2.5B**). Ces expériences, réalisées sur gels natifs à 10 % (m/v) d'acrylamide du fait de contraintes expérimentales, ont révélé un profil de migration comparable à celui observé dans les expériences utilisant un gel à 6 % (m/v) d'acrylamide (**Fig. 2.5B**, panneau du haut). L'analyse de l'activité APX *in gel* a révélé que l'activité ascorbate peroxidase est effective au niveau du signal correspondant au dimère, le multimère semblant inactif (**Fig. 2.5B** ; panneau du bas). Cette activité a été détectée dans les deux lignées alors que le Western blot n'a pas permis de révéler la présence du dimère dans la lignée surexpresser. Notons que dans cette dernière l'activité cAPX s'est révélée moins intense comparativement à la lignée sauvage.

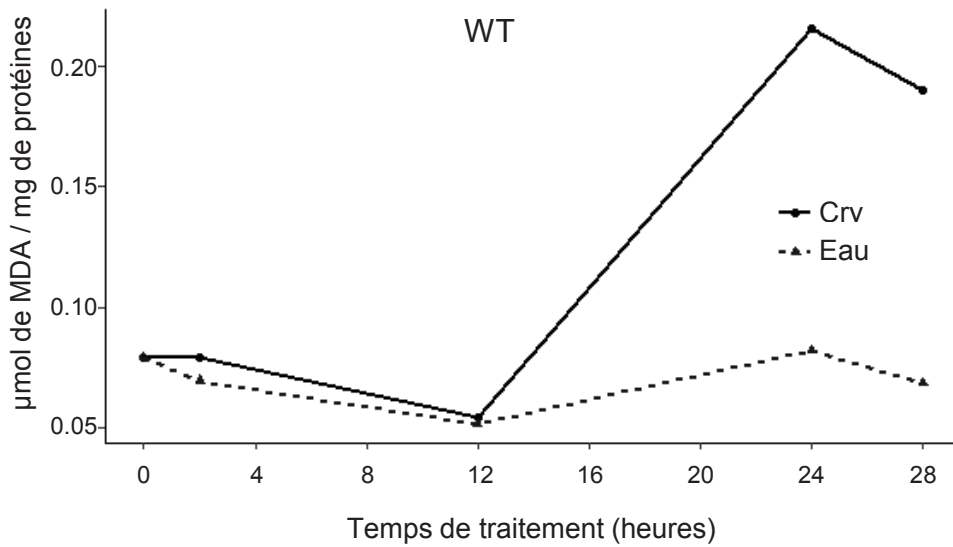
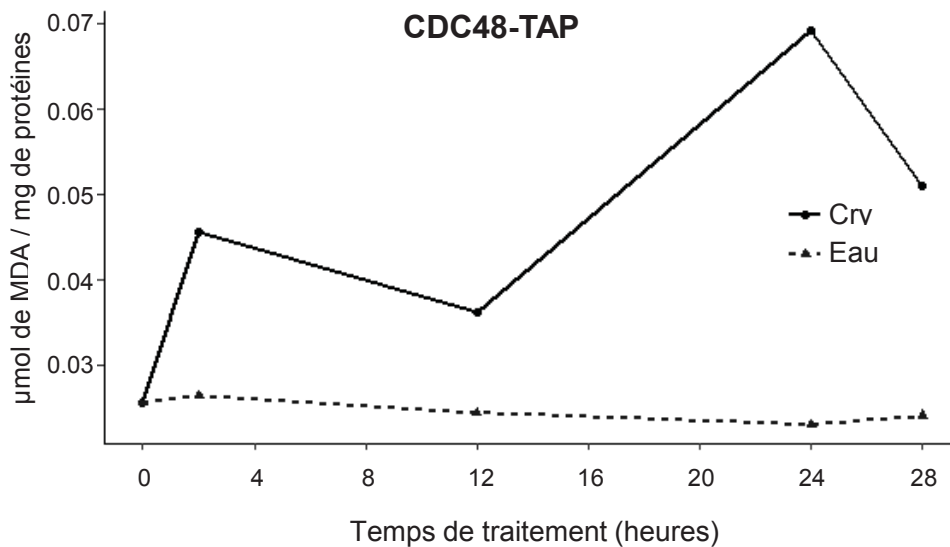
A**B**

Figure 2.6 Accumulation de malondialdéhyde (MDA) au cours de la mise en place de la réponse immunitaire. Des cellules sauvages et CDC48-TAP ont été traitées par 100 nM de cryptogéine pendant 28 heures. **A & B**) Dosage spectrophotométrique du MDA après condensation du MDA à l'acide thiobarbiturique à haute température. La quantité de MDA a été calculée en déduisant l'absorbance à 600 nm de l'absorbance à 532 nm et en prenant comme coefficient d'extinction molaire $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Islam et al., 2009). Après dosage protéique par la méthode de Bradford, la quantité de MDA dans les cellules sauvages (**A**) et les cellules CDC48-TAP (**B**) a été exprimée en μmole de MDA par mg de protéines. Ces résultats ont été obtenus en dosant le MDA sur une seule répétition biologique.

3.4. Etude préliminaire de la peroxydation des lipides

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'activité de cAPX augmente transitoirement dans les cellules sauvages durant la mise en place de la réponse immunitaire déclenchée par la cryptogéine, cette induction d'activité n'étant pas observée dans les cellules qui surexpriment CDC48. Cette différence d'activité entre les deux lignées n'impacte pas le taux de H₂O₂ détecté dans le milieu extracellulaire (Rosnoblet et al., 2017). Nous nous sommes donc interrogés sur l'incidence de la non-induction de cAPX sur le taux de H₂O₂ intracellulaire dans les cellules TAP. Comme précisé dans la discussion de l'article 3, nous n'avons toutefois pas pu quantifier le H₂O₂ intracellulaire par fluorescence à l'aide de la sonde H₂DCF-DA, les résultats étant peu reproductibles. Nous avons donc décidé de quantifier un autre marqueur du stress oxydatif, à savoir la peroxydation des lipides (Farmer and Mueller, 2013). Pour ceci, un dosage du malondialdéhyde (MDA) (**Fig. Int.6**; Heath and Packer, 1968; Yin et al., 2011), un des marqueurs de la peroxydation non-enzymatique induite par les FAO, a été entrepris dans des cellules sauvages et CDC48-TAP durant le traitement cryptogéine (**Fig. 2.6**).

Dans les cellules sauvages, nous avons ainsi observé que la quantité de MDA varie très peu au sein des cellules contrôles (**Fig. 2.6A**). Deux et 12 heures après le traitement par la cryptogéine, nous n'avons pas observé de différences entre la quantité de MDA mesurée dans les cellules traitées et les cellules contrôle. Cependant après 12 heures, la quantité de MDA mesurée dans les cellules élicitées est beaucoup plus importante que dans les cellules contrôles. Les résultats préliminaires observés ici concordent avec ceux obtenus dans des feuilles de plants de tabac traitées à la cryptogéine (Rustérucci et al., 1999). Dans les cellules surexprimant CDC48, si la teneur en MDA ne varie également pas dans les cellules contrôle (**Fig. 2.6B**), une accumulation plus importante de MDA a été observée dès 2 h de traitement à la cryptogéine. Néanmoins, une attention particulière doit être portée sur les concentrations de MDA pour les deux lignées,

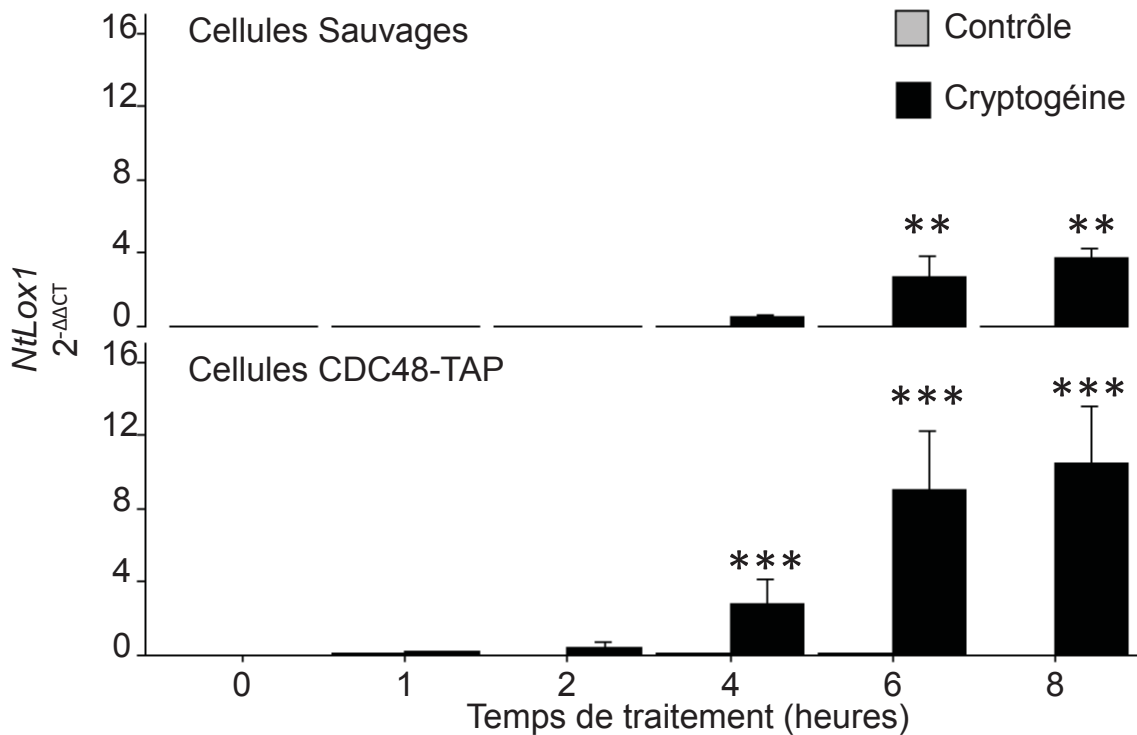


Figure 2.7 Etude de l'accumulation du transcrit *NiLOX1*. Expression relative du transcrit codant LOX1 pour la lignée sauvage (panneau du haut) et la lignée CDC48-TAP (panneau du bas). Les cellules ont été traitées par 100 nM de cryptogéine pendant 8 heures. Les quantités de transcrits ont été normalisées par-rapport au gène *L25* (Schmidt & Delaney, 2010) et l'expression relative a été déterminée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les résultats sont les moyennes de 4 répétitions biologiques indépendantes \pm l'écart type. Une analyse statistique a été réalisée par un test de Kruskal-Wallis suivi d'une correction de Holm. Les étoiles indiquent les valeurs statistiquement différentes du contrôle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

puisque la teneur en MDA est environ deux fois plus élevée dans les cellules sauvages que dans les cellules CDC48-TAP.

Pour compléter cette étude préliminaire et détecter d'éventuelles variations des voies de régulation de la peroxydation enzymatique, nous avons mesuré les taux d'accumulation de transcrits codant pour NtLOX1, une 9-LOX de tabac (Feussner and Wasternack, 2002). Des expériences de RT-qPCR ont mis en évidence une augmentation de l'abondance des ARNm *Ntlox1* significative à partir de 6 h de traitement par la cryptogéine dans les cellules sauvages (**Fig. 2.7** ; panneau du haut). De manière intéressante, cette induction est plus précoce et détectée dès 4 h de traitement, dans les cellules qui surexpriment CDC48 (**Fig. 2.7** ; panneau du bas).

4. Discussion

Dans cette étude nous avons confirmé l'interaction entre NtCDC48 et cAPX *in vitro* et *in vivo* puis entrepris une caractérisation de l'activité et de la régulation de cette dernière dans la réponse immunitaire induite par la cryptogéine. L'incidence fonctionnelle de NtCDC48 sur cAPX a été abordée *via* l'utilisation de cellules de tabac surexprimant NtCDC48. Les résultats obtenus montrent que la surexpression de NtCDC48 impacte cAPX en termes d'activité, probablement en termes de structure et, plus généralement, le statut redox cellulaire.

4.1. Discussion relative aux résultats complémentaires

Le profil électrophorétique de cAPX diffère entre les cellules sauvages, où deux signaux immuno-réactifs à 31 et 33 kDa sont révélés, et les cellules CDC48-TAP où le signal à 33 kDa est prépondérant. En parallèle, l'activité enzymatique de cAPX augmente transitoirement après deux heures de traitement par la cryptogéine dans les cellules sauvages, cette induction

d'activité n'ayant pas été observée dans la lignée surexpresser. Il est donc envisageable de corréler l'activité enzymatique de cAPX à la présence de la protéine de 31 kDa. Dans la mesure où il a été montré que cAPX est active sous forme d'homo-dimère (Hong et al., 2018; Mittler and Zilinskas, 1991) le polypeptide de 31 kDa serait apte à former le dimère actif. Les expériences sur gel natif ont ainsi révélé des signaux immuno-réactifs dont les masses molaires correspondraient d'une part à un complexe protéique de haut poids moléculaire et, d'autre part, à un dimère de cAPX. En Western blot, le dimère n'a été détecté que dans la lignée sauvage, ce qui conforte notre hypothèse d'absence de dimère actif dans les cellules CDC48-TAP. Le signal correspondant au complexe protéique a été quand-à-lui observé dans les deux lignées, même si il n'est pas possible de certifier qu'il s'agit bien du même complexe dans les deux lignées. Indirectement, nos résultats posent la question de l'activité cAPX de ce complexe. Il a récemment été montré *in vitro* que l'une des isoformes de cAPX de riz était capable de former des multimères dont l'activité enzymatique peroxydase est réduite au profit d'une activité chaperonne (Hong et al., 2018). En accord avec cette étude nos expériences d'activité *in gel* n'ont pas mis en évidence d'activité cAPX du multimère, mais uniquement du dimère. Il est à noter que l'activité ascorbate peroxydase *in gel* du dimère a été détectée dans la lignée sauvage et surexpresser alors même qu'aucun signal immuno-réactif correspondant au dimère n'a été détecté en Western blot. Cette contradiction pourrait s'expliquer par une différence de sensibilité des méthodes, l'activité *in gel* étant plus sensible. Ces résultats suggèrent également que l'homo-dimérisation de cAPX existe au sein de la lignée CDC48-TAP mais en plus faible proportion, corroborant ainsi les résultats de mesure d'activité cAPX sur extraits totaux (**Chapitre 2, article**). Ainsi, le polypeptide cAPX de 31 kDa, prépondérant dans les cellules sauvages formerait un homo-dimère actif, alors que le polypeptide cAPX de 33 kDa, prépondérant dans les cellules CDC48-TAP, ne s'associerait pas en homo-dimère mais

contribuerait à la formation de complexes de haut poids moléculaire inactif en termes d'activité cAPX.

Le statut redox des cellules peut également être évalué en étudiant la peroxydation des lipides. L'étude de la quantité de MDA dans les cellules de tabac a révélé une accumulation de MDA importante après 2 h de traitement à la cryptogéine dans les cellules CDC48-TAP, alors que les cellules sauvages n'accumulent du MDA qu'après 12 h de traitement, conformément aux données de la littérature (Rustérucchi et al., 1999). Ces résultats suggèrent qu'au sein de la lignée CDC48-TAP, les FAO induiraient précocement la peroxydation des lipides membranaires. Cette peroxydation non-enzymatique intervient dès deux heures de traitement par la cryptogéine, au moment même où l'activité de cAPX aurait dû être induite comme cela est observé dans la lignée sauvage. Ainsi, en régulant le taux de H₂O₂, cAPX limiterait également le risque de peroxydation lipidique non-enzymatique lors de la réponse immunitaire. Il est important de rappeler que ces résultats ne sont qu'indicatifs puisque les mesures n'ont été réalisées qu'une seule fois. De plus, la technique utilisée pour mesurer la peroxydation des lipides est controversée (Graham Noctor, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, communication personnelle). En effet, elle se base sur la condensation à haute température du MDA à l'acide thiobarbiturique (TBA). Malheureusement, la spécificité de cette technique est faible en raison de la réactivité du TBA avec des composés autres que le MDA (Noctor et al., 2016). De plus, l'abondance de MDA n'est que très partiellement représentative, puisque durant le traitement à la cryptogéine, la proportion de lipides peroxydés par les FAO est environ 5 fois inférieure à la proportion de lipides peroxydés par des 9-LOX (Montillet et al., 2005). Afin d'apporter des informations complémentaires, nous avons mis en évidence une accumulation d'ARNm *9-LOX* lors du traitement de cellules sauvages par la cryptogéine, en accord avec les données préalablement publiées par Rustérucchi et al. (1999). Cette accumulation est plus

précoce dans les cellules CDC48-TAP et est à mettre en parallèle avec la mort cellulaire prématurée observée au sein de cette lignée (Rosnoblet et al., 2017). Cependant, nous n'avons pas réalisé d'expériences permettant de vérifier si cette différence du taux de transcrits entre les cellules sauvages et surexprimant CDC48 est également corrélée à une différence d'accumulation de la protéine et d'activité 9-LOX.

Chapitre 3

Décryptage du rôle de CDC48 par l'analyse bio-informatique de son interactome

1. Contexte de l'article et principaux résultats

1.1. Contexte et objectifs de l'étude

L'étude de CDC48/VCP chez l'Homme et la levure a permis d'associer cette protéine à divers processus biologiques tels que la régulation du cycle cellulaire, la réparation des cassures double-brin d'ADN, la fusion des membranes, l'autophagie ou l'apoptose (Meyer et Wehl, 2014; Stach et Freemont, 2017). D'un point de vue moléculaire, la plupart de ces processus fait appel à la capacité de CDC48 à reconnaître et interagir avec des protéines cibles poly-ubiquitinées puis à délivrer celles-ci au protéasome pour leur dégradation (Meyer et al., 2012). L'identification des protéines cibles de CDC48 et, plus généralement, la caractérisation de son interactome, constitue donc une approche pertinente afin d'appréhender le rôle de CDC48 chez les plantes. Lorsque cette thèse a débutée, une telle approche n'avait pas encore été réalisée.

Récemment, nous avons mis en évidence chez le tabac que CDC48 est mobilisée durant la réponse immunitaire induite par la cryptogéine (**Chapitre 1** ; Rosnoblet et al., 2017). Dans cette même étude, grâce à des expériences d'IP de CDC48 couplées à une analyse MS, nous avons établi une liste de 97 partenaires potentiels de CDC48. Ces derniers ont été décrits comme récurrents, car interagissant avec CDC48 à l'état basal et en réponse à la cryptogéine. En d'autres termes nous n'avons pas identifié de protéines partenaires interagissant spécifiquement avec CDC48 durant la réponse immunitaire déclenchée par l'éliciteur.

La banque de données *Viridiplantae* qui a servi aux analyses de MS ne comprend pas l'intégralité des séquences protéiques de *Nicotiana tabacum*. De nombreux peptides séquencés par MS n'ont en effet pas mené à l'identification de protéines chez le tabac. De ce fait, la liste de partenaires identifiés était certainement incomplète. Sur la base d'outils bio-informatiques, les objectifs de cette étude ont donc été d'établir une nouvelle liste de partenaires de CDC48

chez la plante modèle *A. thaliana* à partir des données issues des expériences d'IP-MS réalisées chez le tabac. L'interactome de CDC48 a ainsi pu être établi et comparé à l'interactome de CDC48 chez d'autres organismes. Le réseau d'interaction obtenu a également permis de mettre en évidence de nouveaux processus biologiques impliquant potentiellement CDC48.

Les résultats de ces analyses ont fait l'objet d'un article dont je suis premier auteur et soumis en juillet 2018 dans le journal *Plant Science* dans le cadre d'une édition dédiée à l'immunité (éditeurs associés : Prs A. Kachroo and P. Kachroo, Université du Kentucky, Etats-Unis).

1.2. Résultats principaux

La stratégie adoptée a permis d'identifier 128 partenaires potentiels de CDC48 chez *A. thaliana*. Une majorité des protéines partenaires listées par Rosnoblet *et al.* (2017) ont été retrouvées dans la nouvelle liste, validant l'approche développée. De plus, deux protéines, AtEBP1 (AT3G51800) et l'Arginyl-tRNA ligase (AT4G26300), interagissant avec CDC48 uniquement durant la mise en place de la réponse immunitaire ont été identifiées.

La caractérisation de l'interactome de CDC48 d'*A. thaliana* et sa comparaison avec des interactomes humain et de levure ont mis en évidence que certains processus biologiques impliquant les partenaires de CDC48 sont spécifiques aux plantes. Il s'agit principalement de processus métaboliques tels que la voie des pentoses phosphates, les processus glycolytiques ou la synthèse de précurseurs métaboliques. Le réseau établi a également mis en lumière l'interaction avec l'ubiquitine, des sous-unités du protéasome et certaines protéines chaperonnes, confirmant ainsi le rôle centrale de CDC48 dans le contrôle qualité des protéines et notamment l'UPS. Enfin, l'étude de communautés du réseau d'interaction a permis d'établir un lien entre CDC48 et la voie de biosynthèse de la S-adenosylméthionine (SAM), un intermédiaire métabolique précurseur de divers processus dont la synthèse d'éthylène et de la nicotianamine, et un donneur de groupe méthyl associé à des processus de modifications post-traductionnels.

2. Article scientifique n°3

Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity

1 **Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality**
2 **control, in plant immunity**

3

4 Hervé Bègue, Arnaud Mounier, Claire Rosnoblet, David Wendehenne

5

6 Affiliation : Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-

7 21000 Dijon, France

8

9 Corresponding author: Hervé Bègue (herve.begue@u-bourgogne.fr) and D. Wendehenne
10 (david.wendehenne@u-bourgogne.fr)

11 **Abstract**

12

13 The evolutionally conserved chaperone-like protein CDC48 (cell division cycle 48) is a major
14 component of ubiquitin-dependent protein degradation pathways in animal and yeast and,
15 more generally, of the protein quality control machinery. In plants, CDC48 plays essential
16 regulatory functions in development and the possibly that it contributes to protein
17 degradation through the ubiquitin-proteasome system (UPS) and the endoplasmic reticulum-
18 associated protein degradation (ERAD) system has been reported. In this review we described
19 recent findings highlighting a role for CDC48 in plant immunity. First data indicated that CDC48
20 is mobilized in plant cells undergoing an immune response, regulates the turnover of immune
21 receptors and mediates the degradation of viral proteins. Furthermore its overexpression was
22 associated to an exacerbated hypersensitive-like cell death. We also designed and reported
23 here the first CDC48 interactome. The corresponding data confirms the closed interaction of
24 CDC48 with components of the UPS and shed light on its putative regulatory function of S-
25 adenosyl-methionine synthesis and metabolism. More generally, these investigations further
26 support the concept that plant cells facing pathogen attack finely regulate the protein quality
27 control machinery.

28

29 **Highlights**

30

31 - The chaperone-like protein CDC48 is a component of the ubiquitin-proteasome system

32 - CDC48 contributes to the turnover of immune receptors

33 - CDC48 is mobilized by cells facing an immune response

34 - Overproduction of CDC48 leads to exacerbated cell death during the immune response

35 - The *A. thaliana* CDC48 interactome highlights new functions of CDC48

36

37

38 **Keywords**

39

40 CDC48; Interactome; Plant immunity; S-adenosyl-methionine; Ubiquitin-proteasome system

41

42

43 **1 - Introduction**

44

45 The protein synthesis and degradation systems remain in balance in order to maintain cell
46 function. In animals and yeast, it is now well established that the proper flux of proteins is
47 highly regulated by numerous factors that finely control the precise abundance of each
48 protein as well as the stoichiometry of protein complexes. Dysregulation of this process has
49 been linked to the development of multiple pathologies such as Alzheimer's disease [1].
50 Accordingly, cells facing increased translational input, including tumorigenic cells, elevate the
51 protein quality control by enhancing their protein folding and degradation capacities, notably
52 through the synthesis of heat shock proteins (HSPs) and proteasome subunits. This adaptation
53 also reduces the risk of proteotoxic stress due to proteome imbalance [2, 3]. The protein
54 quality control is therefore the focus of intense research in human therapies and, for instance,
55 drugs targeting proteins of the protein balance, such as HSP90 or proteasome subunits, are
56 developed as strategies to kill tumor cells.

57 Plants undergoing an immune response show enhanced transcriptomic and translational
58 activities. In addition to the protein biogenesis machinery, transcriptomic and proteomic
59 studies highlighted that the protein degradation machinery is up-regulated in plant facing
60 pathogen attack. In particular, genes encoding key players of the ubiquitin-proteasome
61 system (UPS) such as E3-ubiquitin ligases and 26S proteasome subunits are over-expressed
62 during plant immune responses [4-7], suggesting that the increased protein biosynthesis is
63 accompanied by an enhanced proteolysis in order to maintain the protein balance. The UPS
64 also regulates the accumulation of key players of the immune responses, including
65 intracellular nucleotide-binding leucine-rich repeat (NB-LRR) immune receptors involved in
66 the direct or indirect perception of effectors [4, 8]. Interestingly, the turnover of immune
67 receptors and, therefore, proper defence responses, also involved chaperones as reported for
68 HSP90 [9]. Completing this picture, chaperones contribute to plant defense through their
69 interaction with effectors as shown for HSP70 [10]. In turn micro-organisms and viruses are
70 able to manipulate components of the UPS by redirecting this proteolysis machinery to
71 eliminate unwanted host cell proteins and/or to regulate their own protein homeostasis [11-
72 14].

73 The conserved AAA+ ATPase CDC48, also named valosin-containing protein (VCP) or p97 in
74 metazoans, is a major cytosolic and nuclear component of the protein quality control where

75 it acts in ubiquitin-mediated pathways [15-17]. CDC48 consists of a C-terminal (C-ter) and N-
76 terminal (N-ter) flexible domains. The N-ter domain contributes to the binding of
77 ubiquitinated client proteins and both the N- and C-ter domains interact with cofactors. The
78 core of the protein contains two adjacent ATPase domains (namely, D1 and D2), both of which
79 containing a Walker A and Walker B motifs involved in the binding and hydrolysis of ATP,
80 respectively [18, 19]. CDC48 is active as a stable homo-hexameric barrel structure with a small
81 central pore [20]. It is now commonly accepted that the binding of ATP to the D1 domain
82 promotes the hexamerization of the proteins whereas the ATPase activity of the D2 domain is
83 required for CDC48 biological function. Most of our knowledges regarding CDC48 activities
84 come from studies based on animal and yeast models. This protein is associated with main
85 cellular processes including the regulation of cell cycle, DNA replication and damage response,
86 gene expression, membrane fusion, autophagy and apoptosis [15, 21]. At the molecular level,
87 the main role of CDC48 resides in the extraction of poly-ubiquitinated client proteins from
88 membranes, proteins complexes and chromatin upon ATP hydrolysis by the D2 domain.
89 Therefore, CDC48 acts as a segregase. Then, client proteins are subsequently targeted to the
90 proteasome for degradation [16, 20, 22]. The extraction is based on the ATP-dependent
91 unfolding of the client proteins through their transit in the central pore. This process is
92 particularly energy consuming as the D2 domain hydrolyses ATP many times to pull the client
93 protein through the central pore. A deubiquitinase (DUB) assists CDC48 in order to reduce the
94 length of the ubiquitin chain, thus facilitating the translocation of the protein through the pore
95 [18, 23]. The role of CDC48 is best exemplified by its involvement in the endoplasmic reticulum
96 (ER)-associated protein degradation (ERAD) and mitochondrion-associated degradation
97 (MAD) pathways in which it interacts with and extracts poly-ubiquitinated misfolded proteins
98 from the ER and mitochondria before delivers them to the proteasome for proteolysis [15, 24,
99 25]. In addition, CDC48 acts in the ribosome-associated degradation (RAD) pathway to remove
100 the defective nascent polypeptide chains resulting from errors in translation before their
101 degradation [16, 26]. Finally, regarding immunity, a dual role for CDC48 during viral infection
102 has been reported in humans. In one hand, CDC48 emerges as an important host factor in
103 antiviral immunity, for instance by contributing to the intracellular neutralization of adenovirus
104 mediated by the cytosolic antibody receptor TRIM21 [27]. On the other hand, CDC48 is
105 required for cytomegalovirus replication by favouring the expression of the virus gene IE2 [28]
106 as well as for the replication of the West Nile virus [29].

107 By comparison, not much is known about the function of CDC48 in plants. It was first reported
108 that in *Arabidopsis thaliana*, CDC48 contributes to cell division, cytokinesis and growth
109 processes and was preferentially expressed in expanding cells in contrast to morphologically
110 differentiated cells [30, 31]. Accordingly, T-DNA mutants impaired in the expression of the *A.*
111 *thaliana* AtCDC48A isoform showed embryo growth arrest at the early stage of development
112 and seedling lethality [32]. Similarly, mutation or invalidation of the expression CDC48 in rice
113 led to a premature senescence and death phenotype [33]. A role for plant CDC48 in UPS and
114 ERAD were also evidenced in several investigation. For instance, when over-expressed in
115 tobacco protoplasts in the absence of its partner B subunit, the catalytic A subunit of the castor
116 bean toxin ricin was shown to be retro-translocated from the ER lumen to the cytosol and
117 degraded through a CDC48-dependent process [34]. According to the author, this mechanism
118 allows the elimination of orphan proteins that fail to assemble correctly. Supplementing this
119 data, Yamamoto *et al.* [35] demonstrated that upon its expression in *A. thaliana* culture cells,
120 a vacuolar carboxypeptidase mutated in its active site was retained in the ER and next
121 degraded by the proteasome in a CDC48-dependent manner. This finding illustrates a role for
122 CDC48 in removing non-functional proteins. Other client proteins of CDC48 were identified
123 such as the soluble secretory protein CLAVATA3 [36], the small GTPase ARF1 involved in
124 subcellular trafficking [37], immune receptors [38] and proteins involved in various cellular
125 processes (see the following sub-chapters for further details).

126 In terms of regulation, AtCDC48A appeared to be primarily hexameric in living cells [39] and
127 regulated by AtPUX1, an ubiquitin-regulatory X (UBX) domain-containing protein which
128 inhibits AtCDC48A activity and promotes the disassembly of the active hexamer [40, 41].
129 Another UBX domain-containing protein, AtPUX7, was reported to interact with AtCDC48 in
130 the nucleus and could constitute a molecular adaptators between the AtCDC48 and
131 ubiquitinated substrate [42]. Finally, AtCDC48A was shown to interact at the plasma
132 membrane and to be phosphorylated by the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1
133 receptor (SERK1) [39, 43]. A redox-based regulation through nitric oxide-induced post-
134 translational protein modifications has also been demonstrated [44].

135 Here, we described and discussed recent findings highlighting a role for CDC48 in plant
136 immunity and generated a CDC48 protein-protein interaction network providing a detailed
137 overview of CDC48 involvement in defense and, more generally, of its functions in plant cells.

138

139 2.1 - CDC48 involvement in plant immunity

140

141 An increasing body of evidence suggests that CDC48 plays an important role in immunity as a
142 component of the UPS machinery. First, in *A. thaliana* plantlets infected by the oilseed rape
143 mosaic virus (ORMV), the AtCdc48A isoform was shown to mediate the retro-translocation of
144 ORMV movement proteins (MPs) from the ER toward the cytosol for their subsequent
145 degradation [45]. The purpose of this process is not clearly understood as, according to the
146 authors, it might contribute to either plant defense or to the regulation of ORMV replication
147 [46]. These opposite hypotheses highlight two scenarios previously proposed by Verchot [14].
148 In one hand, viral interactions with the UPS components such as CDC48 but also ubiquitin
149 ligases could serve to regulate virus infection in order to facilitate rapid turnover of viral
150 proteins and to promote replication and movement. In the other hand, the UPS machinery
151 could participate to antiviral immunity by degrading viral effectors. A role for AtCDC48A in the
152 turnover of the NB-LRR protein SNC1 *via* its degradation through the 26S proteasome was also
153 proposed in plantlets facing *Hyaloperonospora arabidopsis* Noco2 infection [38]. This
154 mechanism is central in the regulation of the NLR protein abundance as an increase in SNC1
155 level leads to autoimmunity. Further supporting a role for the UPS machinery in the regulation
156 of SNC1 levels, down-expression of the ubiquitin E3 ligase CPR1 (Constitutive expressor of
157 Pathogenesis Related genes 1) or of the E4 protein MUSE3 (Mutant, SNC1-Enhancing 3) that
158 further poly-ubiquitylates SNC1 led to enhanced NLR accumulation and autoimmunity [47,
159 48]. Completing these data, in response to the tomato yellow leaf curl virus an increase of the
160 amount of CDC48 protein was observed in the susceptible tomato cultivar *Jinpeng-1* as
161 compared to the resistant cultivar *Zheza-301* [49]. The authors did not investigate the role of
162 CDC48 in this patho-system.

163 Further arguments highlighting a function of CDC48 in plant immunity were recently reported
164 thanks to the cryptogein/tobacco model. Cryptogein is a 10 kDa elicitor produced by
165 *Phytophthora cryptogea*. This oomycete, or purified cryptogein, triggers a hypertensive
166 response (HR) as well as a systemic acquired resistance (SAR) in tobacco plants [50]. The
167 mechanisms underlying cryptogein-induced immune responses have been widely studied in
168 tobacco cell suspensions [51, 52]. In these latter, both NtCDC48 protein and transcripts were
169 shown to accumulate in response to cryptogein treatment [37]. The protein accumulated
170 under its hexameric stable structure, suggesting that its activity was increased during the

171 immune response. Accordingly, the cell death induced by cryptogein appeared to be
172 accelerated and more pronounced in a tobacco cell lines overexpressing NtCDC48. These cells
173 did not show an increased level of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), two
174 main components of the cryptogein-induced cell death pathway [52]. Therefore, NtCDC48
175 overexpression might contribute to cell death through a ROS/NO independent process.

176 Interestingly, CDC48 was also found to undergo a fast S-nitrosylation in tobacco cells facing
177 cryptogein exposure [44]. S-nitrosylation is a reversible NO-dependent post-translational
178 protein modification of cysteine residues (Cys) thiol leading to nitrothiol (SNO) [53]. Cys526
179 was identified as a target for S-nitrosylation *in vivo* whereas *in vitro* two other Cys residues
180 were shown to be S-nitrosylated in addition to Cys526. This latter is located in the Walker A
181 motif of the D2 domain involved in the binding of ATP. *In vitro*, its S-nitrosylation was shown
182 to suppress NtCDC48 ATPase activity and to trigger a slight conformational change of the
183 protein. According to the authors, the S-nitrosylation of Cys526 could interfere with ATP
184 binding to the protein through a mechanism of steric hindrance. Other proteomic studies
185 aiming at identifying S-nitrosylated protein in various plant species under distinct physiological
186 conditions also led to the identification of CDC48 (for review see [53]). In particular, the
187 protein was shown to be prone to S-nitrosylation in the nucleus of *A. thaliana* cells infected
188 with *Pseudomonas syringae* [54]. Therefore, S-nitrosylation emerges as an important post-
189 translational regulation of CDC48. This observation raises the question of the impact of this
190 process *in vivo*. In this regard, Rosnoblet *et al.* [37] demonstrated that in response to
191 cryptogein treatment only a few percent of the cellular NtCdc48 population undergoes S-
192 nitrosylation, reinforcing the difficulty in understanding the physiological incidence of this
193 post-translational modification. The hypothesis that CDC48 S-nitrosylation constitutes a
194 redox-based signal activating the UPS machinery has been proposed but not supported by
195 experimental evidences [55].

196 In animals and yeast, partners of CDC48 vary according to the cellular process in which it is
197 involved. In plants, CDC48 has been reported to form complexes with defense-related proteins
198 such as SERK1 in rice, providing insights into its mode of action in immunity [43, 56, 57]. Based
199 on these statements, a proteomic approach aiming at identifying NtCDC48 partners in
200 cryptogein-treated tobacco cells has been recently carried out through endogenous protein
201 immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis (IP-MS) [37]. The corresponding
202 peptides identified by MS were BLAST against the SwissProt/Trembl *Viridiplantea* database,

203 and only proteins with more than 90 % of identity with *Nicotiana tabacum* proteins were
204 considered as partners of CDC48. The majority of NtCDC48 partners identified was related to
205 primary metabolism and cellular energy. Some functional classes were particularly relevant of
206 its function well known in mammals and yeast, notably those related to protein quality control
207 and UPS, gene expression and subcellular trafficking. Accordingly, several proteins involved in
208 these pathways have already been identified as CDC48 partners in animals and yeast, such as
209 the ADP ribosylation factor ARF, polyubiquitin, proteasomal subunits proteins or 14.3.3
210 members. Specific features of the plant CDC48 proteome also emerged from this analysis and
211 are further discussed below. Interestingly, the MS analysis highlighted that many identified
212 peptides were oxidized, underlining again the chaperone-like function of Cdc48. Of
213 importance, although these experiments led to the identification of a hundred of partners,
214 none of them were found exclusively in cryptogeiin-treated cells.

215

216 **2.2 - CDC48 Interactome**

217

218 2.2.1 - Establishment of the CDC48 interactome

219 To further investigate the role of CDC48 in plant immunity, its protein interaction network was
220 constructed based on the NtCDC48 interactome previously characterized by Rosnoblet *et al.*
221 [37].

222 The protein-protein interaction databases are poorly enriched in tobacco proteins or in
223 proteins from other Solanaceae. In order to benefit from *A. thaliana* databases, we developed
224 the strategy sum up Figure 1. First, each tobacco putative protein (n = 4705) from the previous
225 MS analysis [37] were blasted against a database containing the whole *A. thaliana* proteome
226 (version: 2018-01-05). This step allowed a better identification of the proteins interacting with
227 CDC48 as only 125 proteins (3 percent of the total pool of peptides) remained unidentified
228 versus 1825 proteins in the initial analysis in tobacco. Next, because of the change of species,
229 we applied a first sorting in order to keep the tobacco proteins showing at least 70% of identity
230 with their *A. thaliana* counterparts. Then, the 682 selected proteins were subjected to a
231 second sorting based on the occurrence of the peptides between the different assays
232 performed by Rosnoblet *et al.* [37]. At the end, 128 putative *A. thaliana* CDC48 partners were
233 identified versus 97 in the previous analysis restricted to tobacco. Amongst these, 126 were
234 considered as recurrent partners of CDC48 as they co-immunoprecipitated in both cryptogeiin

235 and control conditions. Furthermore, two proteins were found only in the protein list
236 corresponding to cryptogein treatment and, consequently, emerged as CDC48-specific
237 partners in cells undergoing an immune response. One of these two proteins, AtEBP1 (or
238 AtG2) encoded by AT3G51800, is homologue of the human epidermal growth factor receptor
239 EBP1 and was shown to regulate organ size and cell proliferation [58, 59]. The second one is
240 an Arginine-tRNA ligase. Mutation of the corresponding gene, AT4G26300, was described as
241 embryo-lethal [60].

242 A two way reciprocal BLASTp search was conducted between the *A. thaliana* proteins found
243 in this study and the *N. tabaccum* CDC48-interacting proteins identified in Rosnoblet *et al.*
244 [37]. This reciprocal BLASTp comparison confirmed that a large percentage of *N. tabaccum*
245 partners found an *A. thaliana* orthologue (Table 1). Actually, 85 of a total of 97 *N. tabaccum*
246 proteins found mutual best hits with a stringent e-value of 10^{-10} or better. Interestingly, only
247 64 orthologues were identified, meaning that some tobacco partners reciprocal BLASTp led to
248 the same *A. thaliana* orthologue. Thus, amongst the 128 putative *A. thaliana* CDC48 partners
249 (Figure 1), half could be considered as newly identified partners of CDC48. Among those
250 proteins, many isoforms of previously identified partners were found. For instance, number
251 of isoforms of tubulin, S-adenosyl-methionine (SAM) synthase, UDP-glucose-6-
252 dehydrogenase, glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase, 14-3-3 proteins, actin, or
253 fructose-bisphosphate aldolase were identified. This observation suggests that CDC48 may
254 not be specific to one isoform but can interact with several isoforms of a same protein family.
255 Moreover, among the newly identified proteins, an enrichment of members of protein
256 complexes occurred. For instance, in the *N. tabaccum* CDC48 interactome, only two subunits
257 of the regulatory particle of the 26S proteasome were identified. Here, 5 subunits were found,
258 including the non-ATPase regulatory subunits RPN1A, RPN7 and RPN3A and the ATPase
259 regulatory subunits RPT4B and RPT3. The same tendency was observed for isocitrate
260 dehydrogenase and ATP synthase complexes. These results indicate that the plant CDC48 not
261 only interacts with single proteins but with protein complexes as previously reported in other
262 organisms [17, 61].

263

264 2.2.2 - Analysis CDC48 partners

265 Next, a deeper characterization of the CDC48 interactome was performed. Although protein
266 functions can be described in multiple ways, we focused on the classification schemes

267 provided by the Gene Ontology (GO) Consortium [62]. For this purpose, we used the Protein
268 Analysis Through Evolutionary Relationship (PANTHER) database [63]. PANTHER
269 (<http://www.pantherdb.org/>) was designed to classify proteins in order to facilitate high-
270 throughput investigations. Thus, our total protein set was analyzed according to the protein
271 class, molecular function, biological process or pathways. Based on this parameters, the
272 protein partners have been classified into 13 different protein classes (Figure 2A), confirming
273 that CDC48 interacts with a wide range of different proteins and is potentially involved in
274 various cellular activities. Main classes include hydrolases and oxidoreductases. Accordingly,
275 the largest part of the molecular function GO term assignment (Figure 2B) and of the biological
276 process GO term (Figure 2C) were catalytic activity and metabolism. Proteins related to the
277 nucleic acid regulations, to cytoskeleton, membrane traffic and protein folding also emerged
278 from this analysis.

279 We further exploited our data using statistical overrepresentation test of the PANTHER
280 database. This tool is based on the simple binomial test and compares a protein list to a
281 reference list and determine whether a particular class of proteins is overrepresented or
282 underrepresented [63]. Therefore, we opposed the list of the protein partners of CDC48 to
283 the whole proteome of *A. thaliana*. The analysis of the GO Term indicated that CDC48 partners
284 involved in 4 biological pathways are overrepresented (Figure 2D). These pathways include
285 the ubiquitin proteasome pathway. This data was expected as CDC48 is a major component
286 of the UPS [61] and confirmed the validity of our approach. Proteins involved in energy supply,
287 notably glycolysis and synthesis of ATP were also found enriched, further supporting the
288 observation that CDC48 particularly interacts with proteins related to metabolism.
289 Interestingly, proteins involved in the biosynthesis of SAM were strongly overrepresented.
290 SAM is a molecule located at the crossroads of amino-acids and ethylene biosynthesis and is
291 involved in iron homeostasis through the production of nicotianamine [64, 65]. By acting as a
292 methyl group donor, SAM also acts as cofactor in number of metabolic reactions and
293 contributes to the regulation of protein activities through post-translational modifications.

294

295 2.2.3 - Comparison with human and yeast CDC48 interactomes

296 We decided to highlight the specificity of the plant CDC48 interactome as compared to other
297 organisms. For this purpose, we compared the plant CDC48 interactome with those of human
298 (VCP) and yeast (ScCDC48) CDC48. In order to properly compare these interactomes, we

299 extracted from the Biogrid database (<https://thebiogrid.org/>; version: 3.4.156) partners of
300 VCP and ScCDC48 that were identified by affinity capture followed by MS analysis. We found
301 446 and 104 VCP and ScCDC48 partners, respectively. Then we performed the same GO Term
302 analysis as described above.

303 According to the protein classification, VCP partners belong to 22 protein classes versus 11 for
304 the ScCDC48 partners (Figure S1) and 13 for the plant partners (Figure 2A). The higher number
305 of protein classes in the human interactome might be linked to the higher number of VCP
306 partners identified so far. Nine classes of CDC48 interactants were similarly found in all
307 organisms (Figure 3A). Proteins annotated nucleic acid binding and hydrolases were
308 predominant, notably in yeast (Figure 3B). CDC48 also commonly interacts with chaperones,
309 ligases, transferases and with proteins related to membrane traffic. Oxidoreductases and
310 transporters were found both in human and plants but not in yeast. Similarly, cytoskeletal
311 proteins were less represented in the yeast CDC48 interactomes. Isomerase was the unique
312 protein class found exclusively in the plant CDC48 interactome but transcription factors were
313 less represented (Figure 3B). More generally, although CDC48 activities have been linked to
314 defense responses, this survey clearly indicates that CDC48 does not specifically interact, or
315 poorly, with defense/immunity proteins (Figure S1).

316 According to the molecular function and biological process analyses, again CDC48 partners
317 were mainly involved in catalytic activities and metabolism (Figure 2B and C), whatever the
318 organism (Figure S2). In contrast, signal transducers activity appeared to be restricted to the
319 human VCP partners whereas anti-oxidants activities were more abundant in the plant CDC48
320 partners list. Accordingly, we previously identified cytosolic ascorbate peroxidase, catalase
321 and superoxyde dismutase, three main redox-related proteins, namely, as CDC48 partners in
322 tobacco cells [37].

323 Thanks to the PANTHER overrepresentation tool, we finally highlighted that SAM biosynthetic
324 process, glycolytic process and pentose-phosphate shunt were GO terms specifically
325 overrepresented in the plant CDC48 interactome as compared to the human and yeast
326 interactome (Figure 3C). Some biological processes were also found as being enriched in both
327 the human and plant interactomes as the regulation of mitochondrial membrane
328 permeability, the response to the hydrogen peroxide and protein folding (Figure 3D). At the
329 opposite some well-described biological process involving CDC48 as autophagy, ubiquitin-

330 dependent ERAD pathway or chromatin remodeling were found enriched only for the Human
331 and Yeast interactome (Figure 3E).

332

333 2.2.4 - Analysis of the CDC48 protein-protein interaction (PPI) network

334 Thanks to the new list of CDC48 partners, we constructed the protein-protein interaction
335 network representing only CDC48, its partners and their respective interactions. For this
336 purpose, the Biogrid database in which experimental interactions are reported was used [66].

337 Only physical interactions were taken into account and no distinctions were did concerning
338 AtCDC48 isoforms. The resulting network was composed of 129 proteins, symbolized by
339 nodes, and 236 interactions symbolized by links (Figure 4A). Based on this network, specific
340 groups of CDC48 partners were designed. More precisely, protein communities, highlighting
341 groups of interconnected proteins were defined. Communities are network modules which
342 are densely connected within themselves but sparsely connected with the rest of the network.
343 They generally correspond to meaningful biological units such as protein complexes and
344 functional modules [67]. For communities detection, several algorithms could be used but we
345 choose the Louvain one [68] which gives one of the best coefficient of modularity and was one
346 of the best to discriminate proteins complexes.

347 Thus, 7 communities were generated (Figure 4B). Among them, 2 major communities with a
348 large numbers of proteins were obtained. The first one is composed by CDC48 and proteins
349 that, for the majority, interact only with it. The both protein partners interacting with CDC48
350 only during elicitation, EBP1 and Arginine-tRNA ligase, were identified as belonging to this
351 community. The second larger community is composed essentially by proteins that interact
352 both with CDC48 and the ubiquitin UBQ3 (encoded by *AT5G03240*). All the other communities
353 interacted with largest communities. As previously mentioned, with this method we were able
354 to discriminate proteins described as membership of protein complexes. Notably, 5 proteins
355 composing the 26S proteasome were grouped together (major node RPN1A encoded by
356 *AT2G20580*) as well as the isocitrate dehydrogenase subunits (major node IDH1 encoded by
357 *AT4G35260*). Two others communities, with intermediate sizes, were composed by proteins
358 interacting with central proteins belonging to the 14-3-3s family (major nodes GRF2 and GRF8
359 encoded respectively by *AT1G78300* and *AT5G65430*). In addition to interacting with
360 communities composed by CDC48 and UBQ3, those two communities were found to interact

361 together. The last community was composed by three chaperones proteins (major node CR88
362 encoded by *AT2G04030*)

363 As the algorithm chosen to define communities was able to detect protein complexes, we
364 investigated whether communities could be described as functional modules. Thus, the
365 presence of biological pathways within communities was analyzed. We used the Kyoto
366 Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; <https://www.genome.jp/kegg/>) database to
367 recover information about pathways in which CDC48 and its partners were involved. These
368 information were attributed to 95 proteins over 129. Such analysis makes sense if the number
369 of proteins into a community is large enough, that why we performed it only for communities
370 represented by CDC48, GRF2, GRF8 and both 14-3-3 members (GRF2 and GRF8).

371 For the communities of proteins interacting only with CDC48 or both CDC48 and UBQ3, a large
372 number of pathways were found without any over-representation of one or several pathways.
373 For communities represented by 14-3-3 members, especially for GRF8, an important part of
374 the pathways pool was composed by proteins involved in cysteine and methionine
375 biosynthesis (KEGG ID: *ath00270*; [https://www.genome.jp/kegg-
376 bin/show_pathway?ath00270](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ath00270)). Herein, the four proteins involved into this pathway
377 correspond to the four isoforms of SAM synthase (*AT3G17390*, *AT4G01850*, *AT2G36880* and
378 *AT1G02500*) that catalyse the formation of SAM from methionine and ATP. The last protein
379 involved in this pathway and belonging to this community is the cytosolic malate
380 dehydrogenase 1 (MDH1; *AT1G04410*) which is at the interface of this amino acid biosynthesis
381 and pyruvate metabolism. Concerning the cysteine and methionine biosynthesis pathway, the
382 cysteine synthase 1 (OSA1; *AT4G14880*) was also found into the community represented by
383 GRF2. OSA1 catalyses the synthesis of cysteine from O-acetyl-L-serine and hydrogen sulphide.
384 Two other proteins involved in the cysteine and methionine biosynthesis were found into the
385 community represented by UBQ3. Interestingly, these enzymes are closely link to SAM
386 biosynthesis (Figure 4C). The first enzyme is homocysteine methyltransferase (MS1;
387 *AT5G17920*) that catalyzes the transfer of a methyl group to homocysteine resulting in
388 methionine, one of the precursor of SAM. The second enzyme, adenosyl-homocysteinase
389 (SAHH1, *AT4G13940*) hydrolyses S-adenosyl homocysteine into L-homocysteine. S-adenosyl
390 homocysteine is the molecule formed after the transfer of the methyl group from SAM to an
391 acceptor.

392

393 3 - Discussion

394

395 With the identification of CDC48 protein partners and the establishment of its protein
396 network, we are now gaining insight into its function in plant immunity. The data highlighted
397 here provide evidence that CDC48 interacts with components of the immune response as
398 exemplified with SNC1 and SERK1. These process contribute to the proper turnover of SNC1
399 and CDC48 post-translational regulation, respectively. Other proteins such as AtEBP1 and
400 arginine-tRNA ligase might constitute targets of CDC48 during defense responses, although
401 we lack experimental evidences supporting this hypothesis. As reported in animals, CDC48
402 also interacts with and promotes the degradation of viral proteins as shown for the ORMV
403 MPs. The question of whether this process constitutes a viral strategy or a defense mechanism
404 remains unanswered.

405 The analysis of CDC48 involvement in cryptogein-induced immune response and the deduced
406 CDC48 protein network are informative on several fronts:

407 - First, the CDC48 interactome advances our understanding of its cellular functions.
408 Undoubtedly, the identification of ubiquitin, of subunits of the 26S proteasome as well as
409 chaperones as partners confirm its central role in the protein quality control and notably in
410 UPS. Unexpectedly, the protein-protein network also reveals a close connection of CDC48 with
411 SAM biosynthesis and metabolism. As previously mentioned, SAM is an abundant plant co-
412 factor considered as an activated form of methionine. It is a main precursor of the ethylene,
413 nicotianamine and polyamine biosynthetic pathways which are mobilized in numerous
414 physiological process including plant defences. The role of CDC48 in the regulation of SAM-
415 dependent metabolic processes is currently unknown but deserves particular attention. More
416 generally, a majority of CDC48 partners are related to primary metabolism, an enrichment of
417 proteins associated to the glycolysis and ATP synthesis being observed. It is likely that this data
418 reflects a high turnover of the corresponding proteins in order to meet the cellular energy
419 requirements.

420 - Second, with the exception of AtEBP1 and arginine-tRNA ligase, the CDC48 partners did not
421 differ among the cryptogein-treated and control cells. This conclusion must be nuanced as the
422 identification of the CDC48 partners developed by Rosnoblet *et al.* [37] was qualitative but
423 not quantitative. Nevertheless, as cryptogein was shown to trigger an increased accumulation
424 of NtCDC48 in its hexameric active structure, it is plausible to assume that the segregase

425 activity of NtCDC48 and, more generally, the UPS machinery are over-induced in cells
426 undergoing an immune response. Accordingly, in addition to AtCDC48, transcripts encoding
427 E3-ligases, 26S proteasome subunits as well as HSPs were shown to accumulate in cryptogei-
428 elicited cells [52, 69, 70]. As the transcriptional activity of these latter is up-regulated, the
429 over-accumulation of CDC48 and of components of UPS and of the folding machinery probably
430 reflects a process allowing cells to face the increased protein biogenesis and inherent risks of
431 imbalance in the proteome caused, for instance, by errors in translation, accumulation of
432 misfolded proteins or orphan protein subunits. Furthermore, UPS might contribute to the
433 degradation of oxidized proteins caused by ROS.

434 - Third, transgenic cells over-expressing NtCDC48 showed a faster and amplified cryptogei-
435 induced cell death. The underlying mechanisms have not been investigated so far. One
436 possibility would be that CDC48 interacts with and promotes the degradation of negative
437 regulators of cell death such as histone deacetylases of type II [51]. However, such regulators
438 were not identified in the list of CDC48 partners. The fact that nuclear proteins were excluded
439 from samples during protein extraction could partly explain this statement. Another possibility
440 deserving attention is that in cells over-expressing NtCDC48, the induced accumulation of the
441 endogenous CDC48 triggered by cryptogeiin could lead to an exacerbated concentration of
442 active CDC48 and, consequently, to higher segregase activities. In this scenario, a proteome
443 imbalance in favour of protein degradation might occur, thus favouring cell death.

444 A future challenge is to understand the impact of the interaction between CDC48 and partners
445 of interest. Indeed, in addition to trap proteins and deliver them to the proteasome to assume
446 proper protein turnover, such interactions might also be part of other cellular processes that
447 remain to be characterized. Another promising aspect is to extend the analysis of the CDC48
448 protein network to other patho-systems, including plant-virus interactions. Such approach
449 could also lead to the identification of microbial proteins degraded trough or manipulating
450 CDC48 during infections. Finally, a further challenge is to complete the qualitative
451 identification of CDC48 partners with quantitative analysis.

452

453

454

455

456

457 4 - References

458

459 [1] J. Cheng, B.J. North, T. Zhang, X. Dai, K. Tao, J. Guo, W. Wei, The emerging roles of protein
460 homeostasis-governing pathways in Alzheimer's disease, *Aging cell*, (2018) e12801.

461 [2] J.W. Harper, E.J. Bennett, Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance,
462 *Nature*, 537 (2016) 328-338.

463 [3] I. Amm, T. Sommer, D.H. Wolf, Protein quality control and elimination of protein waste: The role of
464 the ubiquitin–proteasome system, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843
465 (2014) 182-196.

466 [4] G. Furlan, J. Klinkenberg, M. Trujillo, Regulation of plant immune receptors by ubiquitination,
467 *Frontiers in plant science*, 3 (2012) 238.

468 [5] J. Furniss, S. Spoel, Cullin-RING ubiquitin ligases in salicylic acid-mediated plant immune signaling,
469 *Frontiers in plant science*, 6 (2015).

470 [6] D. Marino, N. Peeters, S. Rivas, Ubiquitination during plant immune signaling, *Plant physiology*, 160
471 (2012) 15-27.

472 [7] B. Sharma, D. Joshi, P.K. Yadav, A.K. Gupta, T.K. Bhatt, Role of Ubiquitin-Mediated Degradation
473 System in Plant Biology, *Frontiers in plant science*, 7 (2016).

474 [8] D.D. Guerra, J. Callis, Ubiquitin on the move: the ubiquitin modification system plays diverse roles
475 in the regulation of endoplasmic reticulum- and plasma membrane-localized proteins, *Plant*
476 *physiology*, 160 (2012) 56-64.

477 [9] S. Huang, J. Monaghan, X. Zhong, L. Lin, T. Sun, O.X. Dong, X. Li, HSP90s are required for NLR immune
478 receptor accumulation in Arabidopsis, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 79 (2014) 427-
479 439.

480 [10] N.H. Kim, B.K. Hwang, Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT
481 and triggers plant cell death and immunity, *Plant physiology*, 167 (2015) 307-322.

482 [11] C. Alcaide-Loridan, I. Jupin, Ubiquitin and plant viruses, let's play together!, *Plant physiology*, 160
483 (2012) 72-82.

484 [12] A.-S. Dielen, S. Badaoui, T. Candresse, S. German-Retana, The ubiquitin/26S proteasome system
485 in plant–pathogen interactions: a never-ending hide-and-peek game, *Molecular plant pathology*, 11
486 (2010) 293-308.

487 [13] R. Janjusevic, R.B. Abramovitch, G.B. Martin, C.E. Stebbins, A Bacterial Inhibitor of Host
488 Programmed Cell Death Defenses Is an E3 Ubiquitin Ligase, *Science*, 311 (2006) 222-226.

489 [14] J. Verchot, Plant Virus Infection and the Ubiquitin Proteasome Machinery: Arms Race along the
490 Endoplasmic Reticulum, *Viruses*, 8 (2016).

491 [15] L. Stach, P.S. Freemont, The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool, *The Biochemical journal*, 474
492 (2017) 2953-2976.

493 [16] D. Xia, W.K. Tang, Y. Ye, Structure and function of the AAA+ ATPASE p97/Cdc48p, *Gene*, (2016).

494 [17] G.H. Baek, H. Cheng, V. Choe, X. Bao, J. Shao, S. Luo, H. Rao, Cdc48: a swiss army knife of cell
495 biology, *Journal of amino acids*, 2013 (2013) 183421.

496 [18] J. van den Boom, H. Meyer, VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis
497 and Signaling, *Molecular cell*, 69 (2018) 182-194.

498 [19] D. Barthelme, R.T. Sauer, Origin and Functional Evolution of the Cdc48/p97/VCP AAA+ Protein
499 Unfolding and Remodeling Machine, *Journal of molecular biology*, 428 (2016) 1861-1869.

500 [20] B. DeLaBarre, A.T. Brunger, Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals
501 communication between nucleotide domains, *Nature structural biology*, 10 (2003) 856-863.

502 [21] H. Meyer, C.C. Wehl, The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease
503 pathogenesis, *Journal of cell science*, 127 (2014) 3877-3883.

504 [22] E.K. Schrader, K.G. Harstad, A. Matouschek, Targeting proteins for degradation, *Nature chemical*
505 *biology*, 5 (2009) 815-822.

506 [23] N. Bodnar, T. Rapoport, Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase, *F1000Research*, 6
507 (2017) 1318.

508 [24] B. Meusser, C. Hirsch, E. Jarosch, T. Sommer, ERAD: the long road to destruction, *Nature cell*
509 *biology*, 7 (2005) 766-772.

510 [25] H. Meyer, M. Bug, S. Bremer, Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin
511 system, *Nature cell biology*, 14 (2012) 117-123.

512 [26] Y. Ye, W.K. Tang, T. Zhang, D. Xia, A Mighty "Protein Extractor" of the Cell: Structure and Function
513 of the p97/CDC48 ATPase, *Frontiers in molecular biosciences*, 4 (2017).

514 [27] F. Hauler, D.L. Mallery, W.A. McEwan, S.R. Bidgood, L.C. James, AAA ATPase p97/VCP is essential
515 for TRIM21-mediated virus neutralization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
516 *United States of America*, 109 (2012) 19733-19738.

517 [28] Y.T. Lin, J. Prendergast, F. Grey, The host ubiquitin-dependent segregase VCP/p97 is required for
518 the onset of human cytomegalovirus replication, *PLoS pathogens*, 13 (2017) e1006329.

519 [29] W. Phongphaew, S. Kobayashi, M. Sasaki, M. Carr, W.W. Hall, Y. Orba, H. Sawa, Valosin-containing
520 protein (VCP/p97) plays a role in the replication of West Nile virus, *Virus research*, 228 (2016) 114-123.

521 [30] H.S. Feiler, T. Desprez, V. Santoni, J. Kronenberger, M. Caboche, J. Traas, The higher plant
522 *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and
523 expanding cells, *The EMBO journal*, 14 (1995) 5626-5637.

524 [31] D.M. Rancour, C.E. Dickey, S. Park, S.Y. Bednarek, Characterization of AtCDC48. Evidence for
525 multiple membrane fusion mechanisms at the plane of cell division in plants, *Plant physiology*, 130
526 (2002) 1241-1253.

527 [32] S. Park, D.M. Rancour, S.Y. Bednarek, In planta analysis of the cell cycle-dependent localization of
528 AtCDC48A and its critical roles in cell division, expansion, and differentiation, *Plant physiology*, 148
529 (2008) 246-258.

530 [33] Q.N. Huang, Y.F. Shi, X.B. Zhang, L.X. Song, B.H. Feng, H.M. Wang, X. Xu, X.H. Li, D. Guo, J.L. Wu,
531 Single base substitution in OsCDC48 is responsible for premature senescence and death phenotype in
532 rice, *J Integr Plant Biol*, 58 (2016) 12-28.

533 [34] R.S. Marshall, N.A. Jolliffe, A. Ceriotti, C.J. Snowden, J.M. Lord, L. Frigerio, L.M. Roberts, The role
534 of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells, *The Journal of*
535 *biological chemistry*, 283 (2008) 15869-15877.

536 [35] M. Yamamoto, M. Kawanabe, Y. Hayashi, T. Endo, S. Nishikawa, A vacuolar carboxypeptidase
537 mutant of *Arabidopsis thaliana* is degraded by the ERAD pathway independently of its N-glycan,
538 *Biochemical and biophysical research communications*, 393 (2010) 384-389.

539 [36] F. De Marchis, S. Colanero, E.M. Klein, D. Mainieri, V.M. Prota, M. Bellucci, G. Pagliuca, E. Zironi,
540 T. Gazzotti, A. Vitale, A. Pompa, Expression of CLAVATA3 fusions indicates rapid intracellular processing
541 and a role of ERAD, *Plant Science*, 271 (2018) 67-80.

542 [37] C. Rosnoblet, H. Begue, C. Blanchard, C. Pichereaux, A. Besson-Bard, S. Aime, D. Wendehenne,
543 Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogeiin-induced immune
544 response in tobacco, *Plant, cell & environment*, 40 (2017) 491-508.

545 [38] C. Copeland, V. Woloshen, Y. Huang, X. Li, AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune
546 receptor, *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 88 (2016) 294-305.

547 [39] J. Aker, R. Hesselink, R. Engel, R. Karlova, J.W. Borst, A.J. Visser, S.C. de Vries, In vivo
548 hexamerization and characterization of the *Arabidopsis* AAA ATPase CDC48A complex using forster
549 resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy and fluorescence correlation
550 spectroscopy, *Plant physiology*, 145 (2007) 339-350.

551 [40] J. Aker, S.C. de Vries, Plasma membrane receptor complexes, *Plant physiology*, 147 (2008) 1560-
552 1564.

553 [41] D.M. Rancour, S. Park, S.D. Knight, S.Y. Bednarek, Plant UBX domain-containing protein 1, PUX1,
554 regulates the oligomeric structure and activity of *arabidopsis* CDC48, *The Journal of biological*
555 *chemistry*, 279 (2004) 54264-54274.

556 [42] J.L. Gallois, J. Drouaud, A. Lecureuil, A. Guyon-Debast, S. Bonhomme, P. Guerche, Functional
557 characterization of the plant ubiquitin regulatory X (UBX) domain-containing protein AtPUX7 in
558 *Arabidopsis thaliana*, *Gene*, 526 (2013) 299-308.

559 [43] I.M. Rienties, J. Vink, J.W. Borst, E. Russinova, S.C. de Vries, The Arabidopsis SERK1 protein
560 interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14lambda and the PP2C phosphatase
561 KAPP, *Planta*, 221 (2005) 394-405.

562 [44] J. Astier, A. Besson-Bard, O. Lamotte, J. Bertoldo, S. Bourque, H. Terenzi, D. Wendehenne, Nitric
563 oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation
564 in cryptogeiin signalling in tobacco cells, *The Biochemical journal*, 447 (2012) 249-260.

565 [45] A. Niehl, K. Amari, D. Gereige, K. Brandner, Y. Mely, M. Heinlein, Control of Tobacco mosaic virus
566 movement protein fate by CELL-DIVISION-CYCLE protein48, *Plant physiology*, 160 (2012) 2093-2108.

567 [46] A. Niehl, K. Amari, M. Heinlein, CDC48 function during TMV infection: regulation of virus
568 movement and replication by degradation?, *Plant Signal Behav*, 8 (2013) e22865.

569 [47] Y.T. Cheng, Y. Li, S. Huang, Y. Huang, X. Dong, Y. Zhang, X. Li, Stability of plant immune-receptor
570 resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation,
571 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 14694-
572 14699.

573 [48] Y. Huang, S. Minaker, C. Roth, S. Huang, P. Hieter, V. Lipka, M. Wiermer, X. Li, An E4 ligase facilitates
574 polyubiquitination of plant immune receptor resistance proteins in Arabidopsis, *The Plant cell*, 26
575 (2014) 485-496.

576 [49] Y. Huang, H.Y. Ma, W. Huang, F. Wang, Z.S. Xu, A.S. Xiong, Comparative proteomic analysis
577 provides novel insight into the interaction between resistant vs susceptible tomato cultivars and TYLCV
578 infection, *BMC Plant Biol*, 16 (2016) 162.

579 [50] M. Ponchet, F. Panabieres, M.L. Milat, V. Mikes, J.L. Montillet, L. Suty, C. Triantaphylides, Y. Tirilly,
580 J.P. Blein, Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications?, *Cellular and molecular life
581 sciences : CMLS*, 56 (1999) 1020-1047.

582 [51] S. Bourque, A. Dutartre, V. Hammoudi, S. Blanc, J. Dahan, S. Jeandroz, C. Pichereaux, M. Rossignol,
583 D. Wendehenne, Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants,
584 *The New phytologist*, 192 (2011) 127-139.

585 [52] A. Kulik, E. Noiro, V. Grandperret, S. Bourque, J. Fromentin, P. Salloignon, C. Truntzer, G.
586 Dobrowolska, F. Simon-Plas, D. Wendehenne, Interplays between nitric oxide and reactive oxygen
587 species in cryptogeiin signalling, *Plant, cell & environment*, 38 (2015) 331-348.

588 [53] O. Lamotte, J.B. Bertoldo, A. Besson-Bard, C. Rosnoblet, S. Aime, S. Hichami, H. Terenzi, D.
589 Wendehenne, Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants, *Frontiers in
590 chemistry*, 2 (2015) 114.

591 [54] M. Chaki, A. Shekariesfahlan, A. Ageeva, A. Mengel, C. von Toerne, J. Durner, C. Lindermayr,
592 Identification of nuclear target proteins for S-nitrosylation in pathogen-treated Arabidopsis thaliana
593 cell cultures, *Plant Science*, 238 (2015) 115-126.

594 [55] C. Rosnoblet, S. Bourque, V. Nicolas-Francès, O. Lamotte, A. Besson-Bard, S. Jeandroz, D.
595 Wendehenne, NO Signalling in Plant Immunity, in: L. Lamattina, C. García-Mata (Eds.) *Gasotransmitters
596 in Plants: The Rise of a New Paradigm in Cell Signaling*, Springer International Publishing, Cham, 2016,
597 pp. 219-238.

598 [56] H. Hu, L. Xiong, Y. Yang, Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured
599 cell and host defense response against fungal infection, *Planta*, 222 (2005) 107-117.

600 [57] D. Chandran, Y.C. Tai, G. Hather, J. Dewdney, C. Denoux, D.G. Burgess, F.M. Ausubel, T.P. Speed,
601 M.C. Wildermuth, Temporal global expression data reveal known and novel salicylate-impacted
602 processes and regulators mediating powdery mildew growth and reproduction on Arabidopsis, *Plant
603 physiology*, 149 (2009) 1435-1451.

604 [58] B.M. Horvath, Z. Magyar, Y. Zhang, A.W. Hamburger, L. Bako, R.G. Visser, C.W. Bachem, L. Bogre,
605 EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants, *The EMBO journal*, 25 (2006)
606 4909-4920.

607 [59] T. Wang, Z. Sui, X. Liu, Y. Li, H. Li, J. Xing, F. Song, Y. Zhang, Q. Sun, Z. Ni, Ectopic expression of a
608 maize hybrid up-regulated gene, ErbB-3 binding Protein 1 (ZmEBP1), increases organ size by promoting
609 cell proliferation in Arabidopsis, *Plant science : an international journal of experimental plant biology*,
610 243 (2016) 23-34.

611 [60] M. Berg, R. Rogers, R. Muralla, D. Meinke, Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for
612 gametogenesis and embryo development in Arabidopsis, *The Plant journal : for cell and molecular*
613 *biology*, 44 (2005) 866-878.

614 [61] H. Bègue, S. Jeandroz, C. Blanchard, D. Wendehenne, C. Rosnoblet, Structure and functions of the
615 chaperone-like p97/CDC48 in plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861
616 (2017) 3053-3060.

617 [62] M. Ashburner, C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S.
618 Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E.
619 Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, G. Sherlock, Gene ontology: tool for the unification of biology.
620 The Gene Ontology Consortium, *Nature genetics*, 25 (2000) 25-29.

621 [63] H. Mi, A. Muruganujan, J.T. Casagrande, P.D. Thomas, Large-scale gene function analysis with the
622 PANTHER classification system, *Nature protocols*, 8 (2013) 1551-1566.

623 [64] M. Sauter, B. Moffatt, M.C. Saechao, R. Hell, M. Wirtz, Methionine salvage and S-
624 adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis, *The*
625 *Biochemical journal*, 451 (2013) 145-154.

626 [65] E. Koen, A. Besson-Bard, C. Duc, J. Astier, A. Gravot, P. Richaud, O. Lamotte, J. Boucherez, F.
627 Gaymard, D. Wendehenne, Arabidopsis thaliana nicotianamine synthase 4 is required for proper
628 response to iron deficiency and to cadmium exposure, *Plant science : an international journal of*
629 *experimental plant biology*, 209 (2013) 1-11.

630 [66] A. Chatr-Aryamontri, R. Oughtred, L. Boucher, J. Rust, C. Chang, N.K. Kolas, L. O'Donnell, S. Oster,
631 C. Theesfeld, A. Sellam, C. Stark, B.J. Breitkreutz, K. Dolinski, M. Tyers, The BioGRID interaction
632 database: 2017 update, *Nucleic acids research*, 45 (2017) D369-d379.

633 [67] N. Przulj, D.A. Wagle, I. Jurisica, Functional topology in a network of protein interactions,
634 *Bioinformatics*, 20 (2004) 340-348.

635 [68] D.B. Vincent, G. Jean-Loup, L. Renaud, L. Etienne, Fast unfolding of communities in large networks,
636 *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment*, 2008 (2008) P10008.

637 [69] J. Dahan, P. Etienne, A.S. Petitot, V. Houot, J.P. Blein, L. Suty, Cryptogein affects expression of
638 alpha3, alpha6 and beta1 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco, *Journal of experimental*
639 *botany*, 52 (2001) 1947-1948.

640 [70] O. Lamotte, K. Gould, D. Lecourieux, A. Sequeira-Legrand, A. Lebrun-Garcia, J. Durner, A. Pugin, D.
641 Wendehenne, Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor
642 cryptogein, *Plant physiology*, 135 (2004) 516-529.

643

644 **Figure legends**

645
646

647 Figure 1 - Schematic representation of the procedure used for generating the CDC48
648 interactome. See the text for details.

649

650 Figure 2 - Description of CDC48 interactome *via* Gene Ontology analysis

651 A,B and C) Pie charts representing the protein classes, molecular functions and biological
652 process of the plant CDC48 partners, respectively. The analysis was performed thanks to the
653 PANTHER database classification tool.

654 D) Selection of pathways overrepresented in the CDC48 interactome. This analysis was
655 performed thanks to the PANTHER database overrepresentation tool. The overrepresentation
656 is statistically inferred using the Fisher's Exact with False Discovery Rate (FDR) multiple test
657 correction. Results display p-values < 0.05 [63].

658

659 Figure 3 - Comparison of the plant CDC48 interactome to VCP and Yeast CDC48 interactomes
660 *via* Gene Ontology analysis

661 A) UpSet representation of protein class intersections between Plant, Human and Yeast CDC48
662 interactomes. Each column corresponds to a set of protein (numbers are specified above each
663 column); the bar plots indicate the number of protein class belonging to the set. Below a given
664 column, the black points indicate in which organisms those protein classes are found. If only
665 one point is represented, this indicates that the protein classes composing the given set are
666 specific to one organism. For instance, 8 protein classes are specific to the human CDC48
667 interactome and are not found in yeast and plants. In contrast, 9 protein classes are similarly
668 found in the CDC48 interactomes of human, yeast and plants. Protein class was extracted from
669 the PANTHER database classification tool.

670 B) Proportion (in %) of the 13 protein classes composing the plant CDC48 interactome (green)
671 and, when possible, the proportion of the same protein classes into the human (red) and yeast
672 (blue) CDC48 interactome. For a given protein class, star indicates the proportion that are
673 statistically different between organisms using pairwise proportion test (p-value < 0.05).
674 Protein class was extracted from the PANTHER database classification tool.

675 C) Selection of Biological processes (BP) GO terms that are found overrepresented in the plant
676 interactome.

677 D) Selection of common BP GO terms found to be overrepresented in human and plants CDC48
678 interactomes.

679 E) Selection of common BP GO terms found to be overrepresented in yeast and human CDC48
680 interactomes.

681 For figures C, D and E, BP GO Term analysis was performed thanks to the PANTHER database
682 overrepresentation tool. The overrepresentation of a given BP GO Term in a given organisms
683 is statistically inferred using the Fisher's Exact with FDR multiple test correction. Results
684 display p-values < 0.05.

685
686 Figure 4 - Protein-protein interaction (PPI) network interaction network of the plant CDC48
687 interactome

688 A) Representation of the PPI network of CDC48. Nodes represent protein and the size of nodes
689 is proportional to the number of connection with other nodes as known as degree. Links
690 between nodes represent physical interactions between proteins. These link were either
691 highlighted in Rosnoblet et al. study [37] or from the Biogrid database. Each color represents
692 nodes belonging to a same community. The graphic representation was performed thanks to
693 the Gephi software.

694 B) Simplified description of the different communities found into the plant CDC48 network.
695 Each community is identified by a number and characterized by the number of nodes that
696 compose the community and a major node (i.e. the node with the highest degree).

697 C) Schematic focus on the cysteine methionine biosynthesis pathway (KEGG; ath00270)
698 focusing on S-adenosyl methionine red point). Protein partners of CDC48 are framed and the
699 community in which the protein was found is specified. SAMS: S-adenosyl methionine
700 synthase; MS1 : 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1;
701 SAHH1 : Adenosylhomocysteinase 1.

702
703 Figure S1 - Comparison of the protein classes belonging to the human, plant and yeast CDC48
704 interactomes. Pie charts represent the proportion of each protein class of the CDC48
705 interactomes. For a given interactome, the number of classes is specified. The analysis was
706 performed thanks to the PANTHER database classification tool.

707

708 Figure S2 - Comparison of the molecular function and biological processes of the human, plant
709 and yeast CDC48 partners.

710 A) Pie chart representing the molecular functions of CDC48 partners and their respective
711 proportion.

712 (B) Pie chart representing the biological functions of CDC48 partners and their respective
713 proportion.

714 The analysis was performed thanks to the PANTHER database classification tool.

715

Figure 1

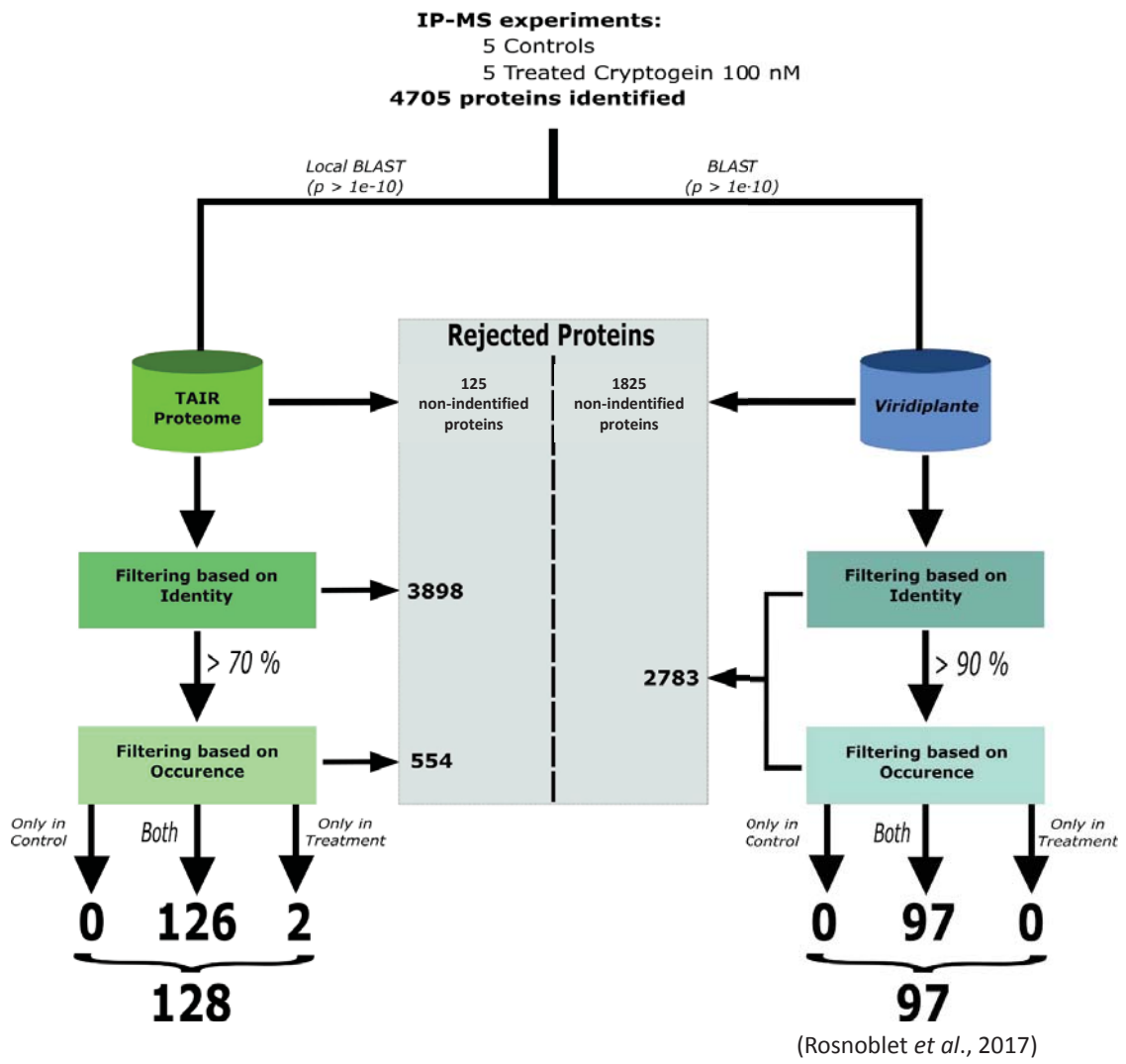


Figure 2

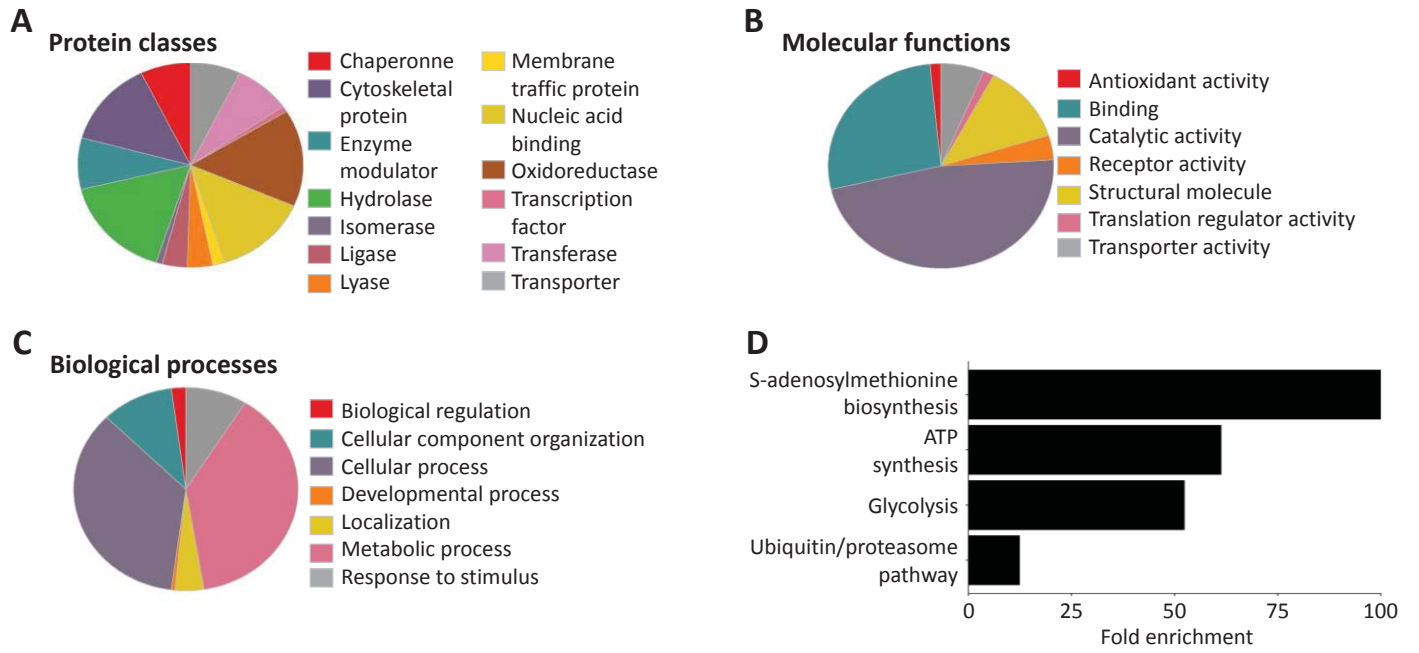


Figure 3

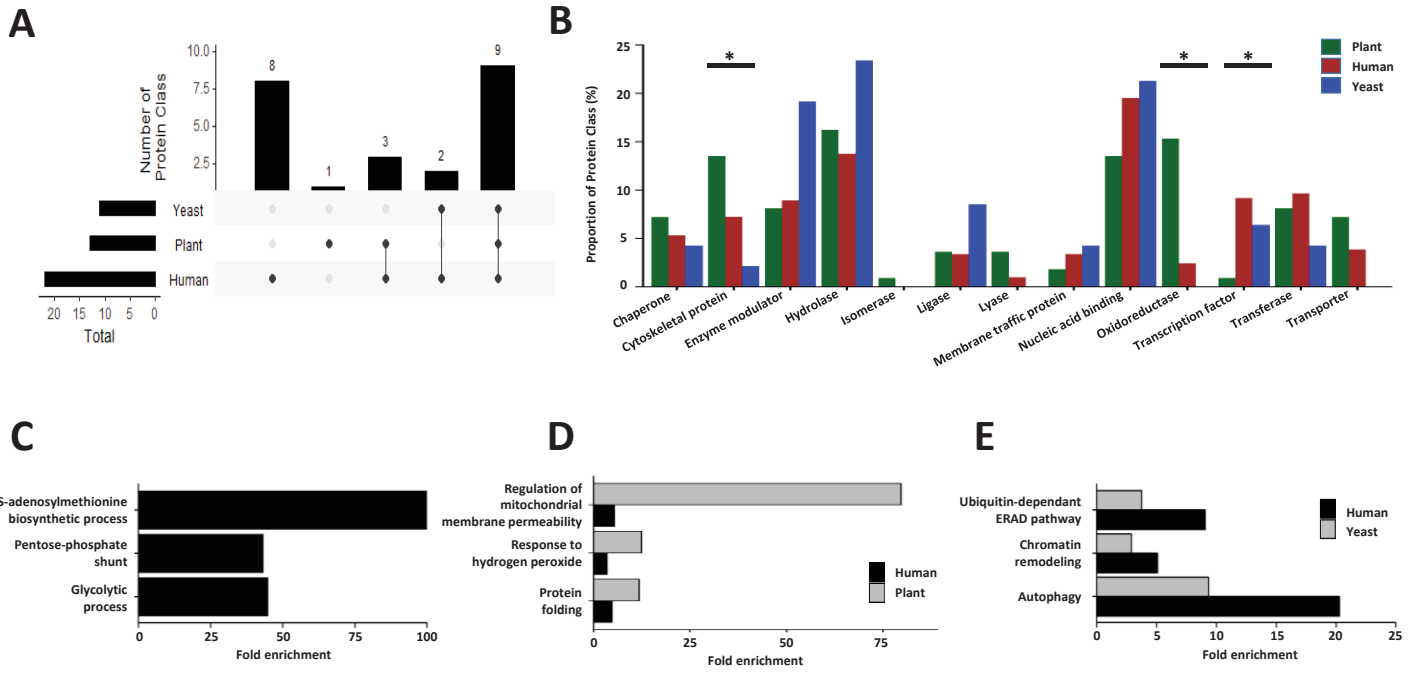
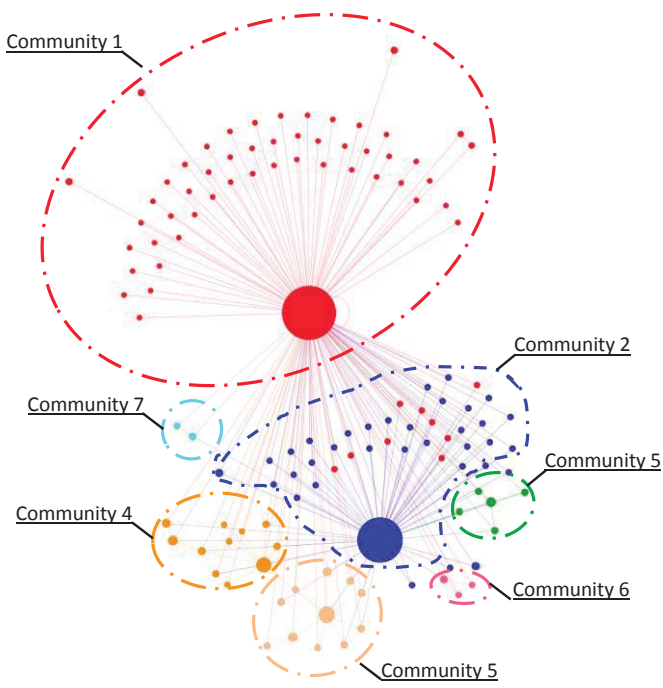


Figure 4

A



B

COMMUNITY	NUMBER OF NODES	MAJOR NODE
1	62	CDC48
2	35	UBQ3
3	11	GRF2
4	11	GRF8
5	5	RPN1A
6	3	CR88
7	2	IDH1

C

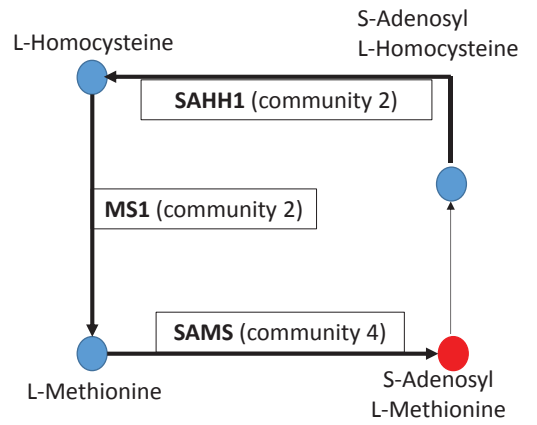


Figure S1

Protein classes

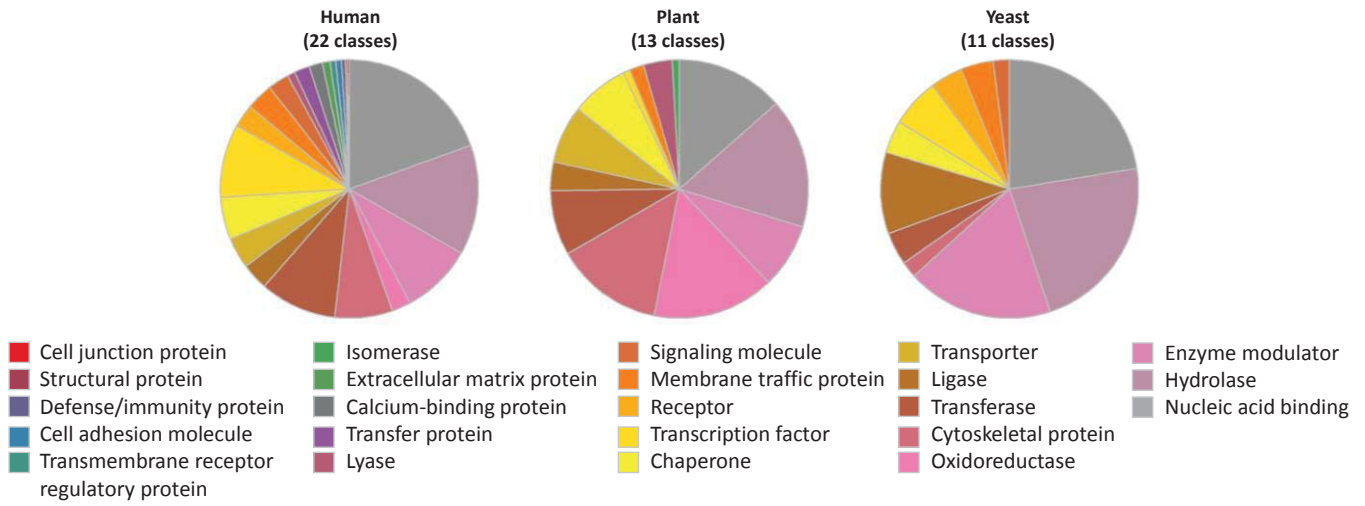
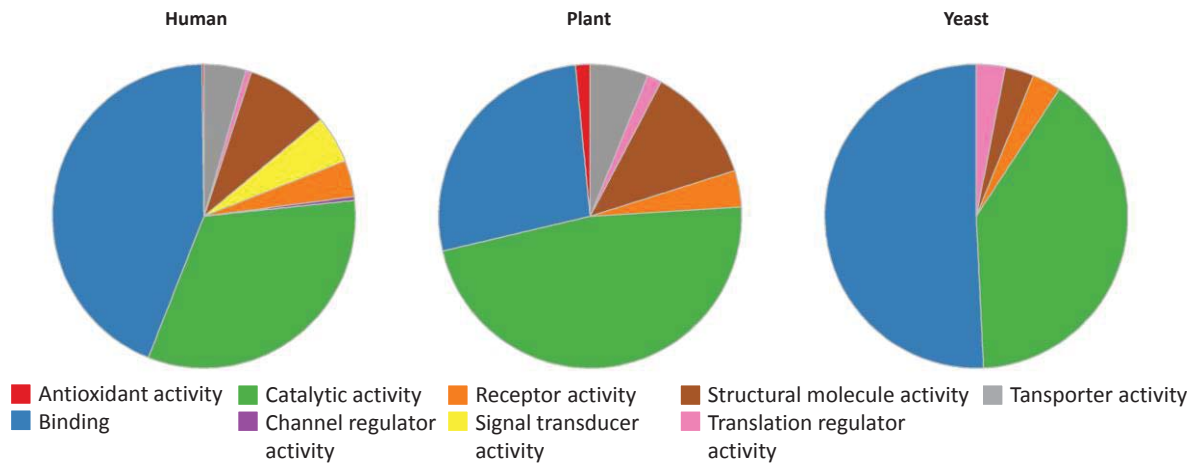


Figure S2

A Molecular functions



B Biological processes

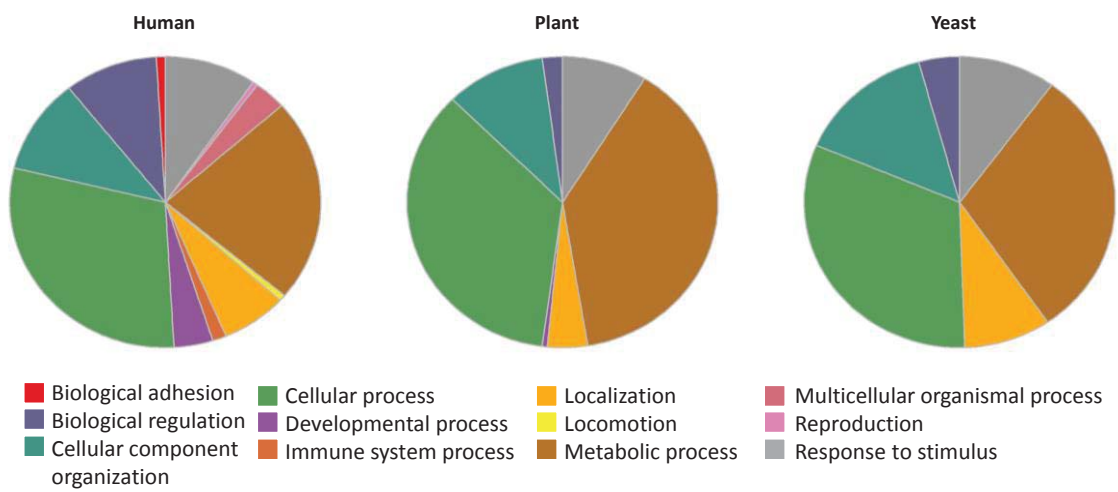


Table 1 - List of CDC48 partners in *A. thaliana*.

Partners of CDC48 are separated according to their functions. Stars (*) indicate protein possessing orthologs among the *N. tabaccum* partners. Crosses (‡) indicate partners that were only found during the cryptogein treatment.

TAIR ID	ENTRY NAME	Protein name
CDC48		
AT3g09840	CD48A_ARATH	Cell division control protein 48 homolog A *
Proteasome related		
AT1g20200	PSD3A_ARATH	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 A (RPN3-A) *
AT4g24820	PSMD6_ARATH	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7 (RPN7)
AT2g20580	PSD2A_ARATH	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1 A (RPN1-A)
AT5g58290	PRS6B_ARATH	26S proteasome regulatory subunit 3 (RPT3) *
AT1g45000	PS10B_ARATH	26S proteasome regulatory subunit 4 B (RPT4B) *
AT4g05050	UBQ11_ARATH	Polyubiquitin 11 *
AT5g03240	UBQ3_ARATH	Polyubiquitin 3 *
14-3-3 proteins		
AT1g78300	14332_ARATH	14-3-3-like protein GF14 omega *
AT2g42590	14339_ARATH	14-3-3-like protein GF14 mu *
AT5g65430	14338_ARATH	14-3-3-like protein GF14 kappa
Tubulins and Actins		
AT4g14960	TBA6_ARATH	Tubulin alpha-6 chain *
AT1g20010	TBB5_ARATH	Tubulin beta-5 chain *
AT1g50010	TBA2_ARATH	Tubulin alpha-2 chain
AT5g19780	TBA5_ARATH	Tubulin alpha-5 chain
AT5g62700	TBB3_ARATH	Tubulin beta-3 chain
AT5g12250	TBB6_ARATH	Tubulin beta-6 chain
AT2g29550	TBB7_ARATH	Tubulin beta-7 chain
AT5g23860	TBB8_ARATH	Tubulin beta-8 chain
AT3g12110	ACT11_ARATH	Actin-11 *
AT5g09810	ACT7_ARATH	Actin-7 *
AT3g53750	ACT3_ARATH	Actin-3
ATP synthesis/Transport		
ATCg00120	ATPA_ARATH	ATP synthase subunit alpha, chloroplasic (EC 3.6.3.14) *
AT5g08680	ATPBO_ARATH	ATP synthase subunit beta-3, mitochondrial (EC 3.6.3.14) *
AT2g07698	F4IMB5_ARATH	ATPase, F1 complex, alpha subunit protein *
ATMg01190	ATPAM_ARATH	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
ATCg00480	ATPB_ARATH	ATP synthase subunit beta, chloroplasic (EC 3.6.3.14)
AT2g33040	ATPG3_ARATH	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial
AT5g13490	ADT2_ARATH	ADP,ATP carrier protein 2, mitochondrial

AT4g28390 ADT3_ARATH ADP,ATP carrier protein 3, mitochondrial

Biosynthesis of cellular compounds:

Amino-acids

AT2g36880 METK3_ARATH S-adenosylmethionine synthase 3 (EC 2.5.1.6) *

AT1g02500 METK1_ARATH S-adenosylmethionine synthase 1 (EC 2.5.1.6)

AT4g01850 METK2_ARATH S-adenosylmethionine synthase 2 (EC 2.5.1.6)

AT3g17390 METK4_ARATH S-adenosylmethionine synthase 4 (EC 2.5.1.6)

AT5g17920 METE1_ARATH 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase 1 (EC 2.1.1.14) *

AT4g14880 CYSK1_ARATH Cysteine synthase 1 (EC 2.5.1.47) *

AT4g13940 SAHH1_ARATH Adenosylhomocysteinase 1 (EC 3.3.1.1) *

AT5g10240 ASNS3_ARATH Glutamine-dependent asparagine synthetase 3 (EC 6.3.5.4) *

AT4g24830 ASSY_ARATH Argininosuccinate synthase, chloroplastic (EC 6.3.4.5) *

AT2g19940 ARGC_ARATH Probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, chloroplastic (EC 1.2.1.38) *

AT3g58610 ILV5_ARATH Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic (EC 1.1.1.86)

AT4g13930 GLYC4_ARATH Serine hydroxymethyltransferase 4 (EC 2.1.2.1)

Proteins

AT5g60390 EF1A4_ARATH Elongation factor 1-alpha 4 *

AT1g56070/AT1g56075 EF2_ARATH Elongation factor 2 *

AT1g09640 EF1G1_ARATH Probable elongation factor 1-gamma 1 *

AT3g13920 IF4A1_ARATH Eukaryotic initiation factor 4A-1 (EC 3.6.4.13) *

AT4g02930 EFTM_ARATH Elongation factor Tu, mitochondrial

AT4g26300 SYRM_ARATH Arginine--tRNA ligase, chloroplastic/mitochondrial (EC 6.1.1.19) ‡

AT1g29880 SYGM1_ARATH Glycine--tRNA ligase, mitochondrial 1 (EC 6.1.1.14)

Pyrimidines

AT3g54470 UMPS_ARATH Uridine 5'-monophosphate synthase (EC 2.4.2.10) (EC 4.1.1.23) *

Lipids

AT5g49460 ACLB2_ARATH ATP-citrate synthase B-2 (EC 2.3.3.8)

AT5g35360 ACCC_ARATH Biotin carboxylase, chloroplastic (EC 6.3.4.14)

Chaperonne and related proteins

AT5g02500 MD37E_ARATH Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e *

AT5g42020 MD37F_ARATH Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37f *

AT3g12580 MD37C_ARATH Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c

AT3g20050 TCPA_ARATH T-complex protein 1 subunit alpha

AT3g11830 TCPH_ARATH T-complex protein 1 subunit eta

AT3g03960 TCPQ_ARATH T-complex protein 1 subunit theta

AT5g56000 HS904_ARATH Heat shock protein 90-4 *

AT5g56030 HS902_ARATH Heat shock protein 90-2

AT2g04030 HS905_ARATH Heat shock protein 90-5, chloroplastic

AT4g24190 ENPL_ARATH Endoplasmin homolog

AT5g09590 HSP7J_ARATH Heat shock 70 kDa protein 10, mitochondrial

AT1g79930 HSP7O_ARATH Heat shock 70 kDa protein 14

AT1g79920	HSP7P_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 15
AT1g16030	HSP7E_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 5
AT5g49910	HSP7G_ARATH	Heat shock 70 kDa protein 7, chloroplastic
AT3g23990	CH60A_ARATH	Chaperonin 60, mitochondria
AT3g13470	CPNB2_ARATH	Chaperonin 60 subunit beta 2, chloroplastic

Enzymes, especially glycolysis related

AT5g41670	6PGD2_ARATH	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 2, chloroplastic (EC 1.1.1.44)
AT3g02360	6PGD3_ARATH	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 3 (EC 1.1.1.44)
AT2g05710	ACO3M_ARATH	Aconitate hydratase 3, mitochondrial (EC 4.2.1.3)
AT5g43940	ADHX_ARATH	Alcohol dehydrogenase class-3 (EC 1.1.1.1)
AT1g77120	ADH1_ARATH	Alcohol dehydrogenase class-P (EC 1.1.1.1) *
AT3g48000	AL2B4_ARATH	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B4, mitochondrial (EC 1.2.1.3) *
AT1g23800	AL2B7_ARATH	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B7, mitochondrial (EC 1.2.1.3)
AT4g26270	PFKA3_ARATH	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 3 (EC 2.7.1.11)
AT2g36530	ENO2_ARATH	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator (EC 4.2.1.11) *
AT1g65930	ICDHC_ARATH	Cytosolic isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) *
AT1g74030	ENO1_ARATH	Enolase 1, chloroplastic (EC 4.2.1.11)
AT4g38970	ALFP2_ARATH	Fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic (EC 4.1.2.13) *
AT2g21330	ALFP1_ARATH	Fructose-bisphosphate aldolase 1, chloroplastic (EC 4.1.2.13)
AT2g01140	ALFP3_ARATH	Fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic (EC 4.1.2.13)
AT2g36460	ALFC6_ARATH	Fructose-bisphosphate aldolase 6, cytosolic (EC 4.1.2.13)
AT1g74470	CHLP_ARATH	Geranylgeranyl diphosphate reductase, chloroplastic (EC 1.3.1.83) *
AT5g40760	G6PD6_ARATH	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, isoform 2, cytoplasmic (EC 1.1.1.49) *
AT1g12900	G3PA2_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPA2, chloroplastic (EC 1.2.1.13) *
AT3g04120	G3PC1_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC1, cytosolic (EC 1.2.1.12) *
AT1g13440	G3PC2_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPC2, cytosolic (EC 1.2.1.12) *
AT1g16300	G3PP2_ARATH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GAPCP2, chloroplastic (EC 1.2.1.12)
AT4g35260	IDH1_ARATH	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 1, mitochondrial (EC 1.1.1.41) *
AT5g14590	ICDHP_ARATH	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic/mitochondrial (EC 1.1.1.42) *
AT5g03290	IDH5_ARATH	Isocitrate dehydrogenase [NAD] catalytic subunit 5, mitochondrial (EC 1.1.1.41)
AT1g04410	MDHC1_ARATH	Malate dehydrogenase 1, cytoplasmic (EC 1.1.1.37) *
AT3g59970	MTHR1_ARATH	Methylenetetrahydrofolate reductase 1 (EC 1.5.1.20)
AT2g44160	MTHR2_ARATH	Methylenetetrahydrofolate reductase 2 (EC 1.5.1.20) *
AT5g25880	MAOP3_ARATH	NADP-dependent malic enzyme 3 (EC 1.1.1.40)
AT1g56190	PGKH2_ARATH	Phosphoglycerate kinase 2, chloroplastic (EC 2.7.2.3) *
AT1g79550	PGKY3_ARATH	Phosphoglycerate kinase 3, cytosolic (EC 2.7.2.3) *
AT1g70730	PGMC2_ARATH	Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 2 (EC 5.4.2.2) *
AT1g76550	PFP2_ARATH	Pyrophosphate--fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha 2
AT3g52990	Q94KE3_ARATH	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) *
ATCg00490	RBL_ARATH	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC 4.1.1.39) *
AT5g15490	UGDH3_ARATH	UDP-glucose 6-dehydrogenase 3 (EC 1.1.1.22) *
AT3g29360	UGDH2_ARATH	UDP-glucose 6-dehydrogenase 2 (EC 1.1.1.22)

ROS processing system

AT1g07890	APX1_ARATH	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic (EC 1.11.1.11) *
-----------	------------	--

AT4g35090 CATA2_ARATH Catalase-2 (EC 1.11.1.6) *

RNA processing

AT2g27040 AGO4_ARATH Protein argonaute 4 *
AT5g65260 PABN2_ARATH Polyadenylate-binding protein 2 *
AT4g39260 RBG8_ARATH Glycine-rich RNA-binding protein 8 *
AT3g51800 EBP1_ARATH ERBB-3 BINDING PROTEIN 1†

Trafficking

AT3g11130 CLAH1_ARATH Clathrin heavy chain 1 *
AT1g52360 COB22_ARATH Coatomer subunit beta¹-2

Transport

AT4g17170 RAB1C_ARATH Ras-related protein RABB1c *
AT3g12390 NACA1_ARATH Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein 1 *
AT1g78900 VATA_ARATH V-type proton ATPase catalytic subunit A (EC 3.6.3.14)
AT5g14040 MPPCP3_ARATH Mitochondrial phosphate carrier protein 3, mitochondrial
AT2g31660 SAD2_ARATH Importin beta-like

Other

AT5g15650 RGP2_ARATH UDP-arabinopyranose mutase 2 (EC 5.4.99.30)
AT1g78570 RHM1_ARATH Trifunctional protein (EC 4.2.1.76) (EC 1.1.1.-) (EC 5.1.3.-)
AT5g03300 ADK2_ARATH Adenosine kinase 2 (EC 2.7.1.20) *
AT5g01410 PDX13_ARATH Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PDX1.3 (EC 4.3.3.6) *
AT1g04850 Q9MAT3_ARATH F13M7.16 protein (Ubiquitin-associated (UBA)/TS-N domain-containing protein)
AT2g39730 RCA_ARATH Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic *
AT1g65260 VIPP1_ARATH Membrane-associated protein VIPP1, chloroplastic
AT3g43190 SUS4_ARATH Sucrose synthase 4 (EC 2.4.1.13) *
AT3g03250 UGPA2_ARATH UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase 2 (EC 2.7.7.9) *
AT5g47720 THIC2_ARATH Probable acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic 2 (EC 2.3.1.9) *

3. Discussion

Les interactions protéines-protéines sont au cœur des processus physiologiques et leurs études chez les animaux ont notamment permis de caractériser des mécanismes de signalisation cellulaire remarquables tels que l'inflammasome dans le contexte de la réponse immunitaire (Han, 2008; Kumar and Jain, 2018). La caractérisation des interactions à l'échelle du protéome d'un organe, d'un type cellulaire, d'un tissu ou d'un organisme requiert l'utilisation de banques de données et le développement d'approches bio-informatiques qui s'avèrent aujourd'hui essentielles (Friesner et al., 2017).

Pour étudier un interactome *in silico*, un nombre suffisant d'interactions protéiques doit être reporté dans les bases de données, ce qui n'est pas le cas chez le tabac. De ce fait nous avons choisi de créer le réseau d'interaction chez la plante modèle *A. thaliana*. L'interactome de CDC48 ainsi établi se compose de 128 protéines. Cet ordre de grandeur est similaire à celui rapporté dans l'étude d'autres interactomes chez les plantes (Paul et al., 2009; Rosnoblet et al., 2017). La représentation sous forme de réseau met en exergue que CDC48 interagit avec l'ubiquitine, le protéasome et des protéines chaperonnes, confirmant son rôle central dans le contrôle qualité des protéines. De plus, la comparaison des interactomes de la plante, de l'Homme et de la levure a montré que l'interaction de CDC48 avec des protéines impliquées dans des processus antioxydants semble être spécifique aux plantes, renforçant ainsi l'intérêt d'étudier des partenaires comme cAPX (**Chapitre 2**). Néanmoins, l'étude d'interactomes présente des limites, en particulier la présence de faux positifs (Gingras et al., 2007). A ce titre, nous avons identifié des partenaires localisés dans le chloroplaste, les mitochondries ou la lumière du RE. CDC48 étant décrite comme localisée dans le noyau et le cytoplasme (Aker et al., 2006), il aurait pu paraître logique de les éliminer. Or, cette protéine est également fréquemment associée aux membranes où elle participe, *via* son rôle de ségrégase, à l'extraction

de protéines membranaires ou luminales pour les présenter ensuite au protéasome (Baek et al., 2013; Bègue et al., 2017). CDC48 interagit donc avec des protéines d'origines subcellulaires diverses, expliquant notre choix de maintenir des protéines autres que nucléaires et cytosoliques. Il s'avèrera néanmoins nécessaire, lors d'études ciblées entre CDC48 et un partenaire potentiel issu des analyses d'IP-MS, de confirmer cette interaction par différents techniques biochimiques et biophysiques (Rosnoblet *et al.*, 2017 ; Bègue *et al.*, en révision pour *J Exp Bot*). À l'inverse, il est envisageable que des protéines partenaires, n'aient pas été identifiées pour des raisons inhérentes au protocole d'extraction protéique utilisé, qui permet l'extraction de protéines essentiellement cytosoliques, mais n'est pas adapté aux protéines localisées aux niveaux de compartiments cellulaires comme le noyau ou les mitochondries (Valerie et al., 2006). Ainsi, les interactomes de CDC48 chez les plantes établis par Rosnoblet *et al.*, (2017) puis dans cette étude ne doivent pas être considérés comme figés.

Notre approche a permis de mettre en évidence deux protéines susceptibles d'interagir spécifiquement avec CDC48 durant l'élicitation à la cryptogéine: l'arginyl-tRNA ligase et EBP1. L'arginyl-tRNA ligase (AT4G26300) est une protéine faisant partie d'un complexe macromoléculaire qui catalyse l'attachement covalent d'une arginine à l'un de ses ARN de transfert durant la synthèse protéique. Cet aminoacyl-tRNA synthétase est décrite comme requise lors de la traduction de protéines cytoplasmiques et chloroplastiques. De manière intéressante, contrairement à la seconde arginyl-tRNA ligase (AT1G66530) qui est localisée au niveau cytosolique et mitochondrial, la délétion du locus AT4G26300 cause un arrêt du développement embryonnaire (Berg et al., 2005). En lien avec l'immunité, il a été montré chez *A. thaliana* que la quantité de transcrite codant pour l'arginyl-tRNA ligase diminue en réponse à une infection par *Agrobacterium tumefaciens* (Ditt et al., 2006). De plus, un lien avec l'homéostasie du fer est envisageable. En effet, toujours chez *A. thaliana* des analyses de MS

ont mis en évidence une réduction de la teneur en cette protéine durant une carence en fer (Lan et al., 2011). L'homéostasie du fer étant une composante de l'immunité (voir **Paragraphe 1.3.5 de l'Introduction générale**), l'hypothèse d'une implication de l'arginyl-tRNA ligase dans les réponses de défense semble plausible. Ces informations témoignent de l'intérêt d'étudier plus spécifiquement l'interaction entre CDC48 et l'arginyl-tRNA ligase.

La protéine EBP1 a également été identifiée comme interagissant avec CDC48 uniquement durant la mise en place de la réponse immunitaire. Chez l'Homme, EBP1 présente deux isoformes. L'isoforme cytoplasmique et nucléaire de 48 kDa (p48) régule la survie cellulaire en participant à la régulation négative de l'apoptose, alors que l'isoforme cytoplasmique de 42 kDa (p42) promeut la différenciation cellulaire (Liu et al., 2006). Au sein de cellules cancéreuses, contrairement à l'isoforme p48, le taux protéique de la protéine EBP1 p42 est très faible du fait d'une dégradation protéasomale accrue suite à sa phosphorylation et son ubiquitination (Liu et al., 2009). De par ces résultats, EBP1 p48 est décrite comme oncogénique, alors que p42 agirait comme un suppresseur de tumeur. Chez les plantes, cette protéine est essentiellement décrite comme impliquée dans le cycle cellulaire et dans la régulation de la taille des organes (Horváth et al., 2006; Zhang et al., 2005). Un lien entre EBP1 et la dégradation protéique a déjà été mis en évidence chez *A. thaliana*. En effet, l'analyse de l'interactome de la sous-unité régulatrice RPT2 du protéasome 19S a identifié EBP1, conjointement à CDC48, comme partenaires du protéasome 26S (Sako et al., 2014). Contrairement à l'arginyl-tRNA ligase, à ce jour, aucune implication de la protéine EBP1 dans l'immunité chez les plantes n'a été décrite. Néanmoins, son lien avec le système UPS avéré dans différents organismes fait de la protéine EBP1 un partenaire potentiel de CDC48 particulièrement intéressant à étudier.

L'établissement de la représentation graphique de l'interactome sous forme de réseau nous a conduit à utiliser des outils spécifiques, comme la détection de communautés

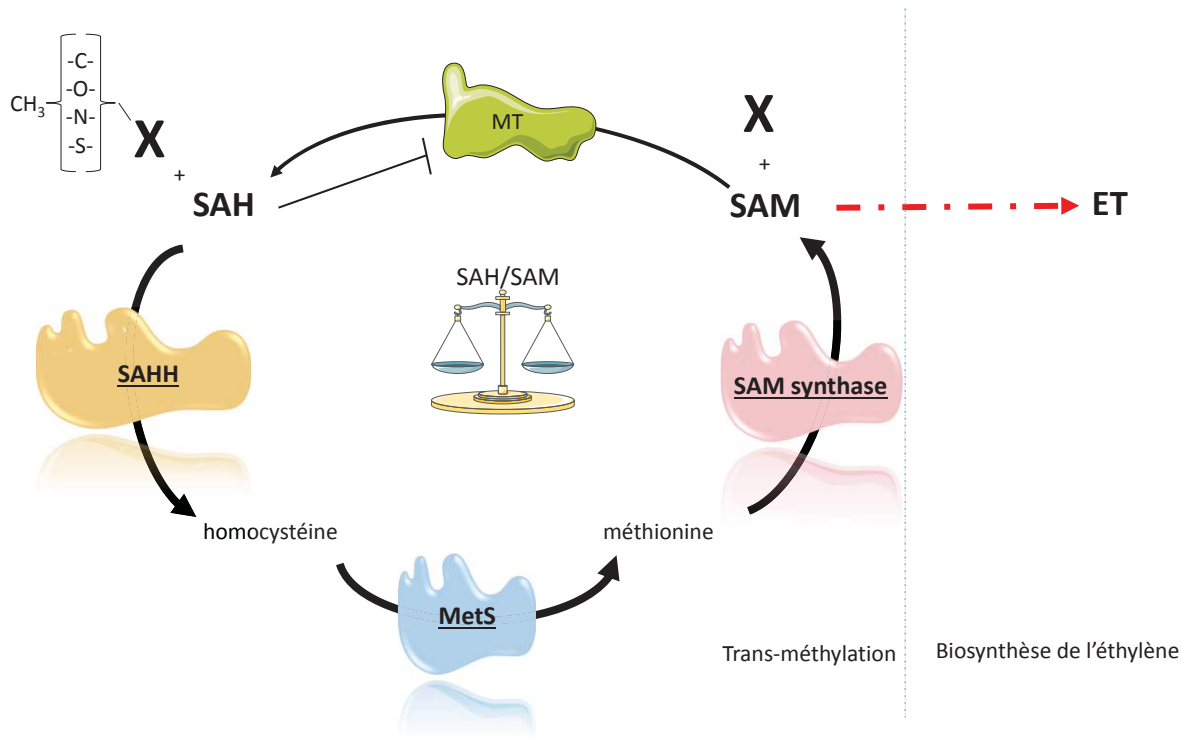


Figure 3.1 Représentation schématique du cycle de la S-adenosyl méthionine. La SAM sert de substrat à diverses MT dans le but de réaliser la méthylation de molécules variées (X). Les MT catalysent l'attachement du groupement méthyl sur des atomes nucléophiles de la molécule X et produisent du SAH, qui inhibe les MT. Le SAH est rapidement hydrolysé par une SAHH générant de l'homocystéine, qui servira de substrat pour former de la méthionine par la MetS. Enfin, la méthionine sert de substrat à la SAM synthase pour redonner du SAM pouvant ainsi être réutilisé pour les réactions de trans-méthylation ou alors servir de précurseur à la formation d'ET. Les enzymes soulignées ont été retrouvées comme protéines partenaires potentielles de CDC48 lors de l'analyse du réseau. SAM : S-adenosyl-méthionine ; MT : méthyl transférase ; SAH : S-adenosyl-homocystéine ; SAHH : SAH hydrolase ; MetS : méthionine synthase ; ET : éthylène.

(Przulj et al., 2004). Grâce à l'analyse de ces communautés, nous avons mis en évidence un lien entre CDC48 et les enzymes du métabolisme de la SAM: la SAM synthase, la S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH) et la méthionine synthase (MetS). Les réactions de trans-méthylation sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la biosynthèse de molécules, la régulation épigénétique, le métabolisme primaire et secondaire ou encore la tolérance aux stress (Kim and Zilberman, 2014; Kryukov et al., 2016). Elles impliquent des méthyltransférases (MT) qui utilisent la SAM comme donneur de méthyl (**Fig. 3.1**). La SAM est incorporée aux atomes nucléophiles (azote, oxygène, soufre, carbone) des molécules cibles (acides nucléiques, lipides, protéines ou hormones) par le biais des différentes méthyl transférases subdivisées en 4 familles: les N-MT, les O-MT, les S-MT et les C-MT (Moffatt and Weretilnyk, 2001). De par cette large utilisation, la SAM est le second cofacteur le plus utilisé par les enzymes après l'ATP (Palmieri et al., 2006). Les réactions de trans-méthylation aboutissent à la formation de S-adenosylhomocystéine (SAH), un inhibiteur des MT. Le SAH est rapidement pris en charge par la SAHH qui aboutit à la formation d'homocystéine et d'adenosine qui sera ensuite phosphorylé pour donner de l'AMP. L'homocystéine sert alors de substrat à la MetS pour la synthèse de méthionine qui pourra enfin être utilisée par la SAM synthase pour former à nouveau de la SAM (Rahikainen et al., 2018). Ainsi, le ratio SAH/SAM détermine la capacité de l'organisme à réaliser les réactions de trans-méthylation en fonction de l'affinité qu'ont les MT pour leur substrat (SAM) ou leur inhibiteur (SAH) (Cantoni, 1975; Moffatt and Weretilnyk, 2001).

Ces enzymes ont été associées à la réponse immunitaire. Par exemple, chez le tabac, l'inhibition de SAHH par l'utilisation d'ARN anti-sens aboutit à des plants résistants à divers virus dont celui de la mosaïque du tabac (TMV ; *Tobacco mosaic virus*), du concombre (CMV ; *Cucumber mosaic virus*) ou le virus X de la pomme de terre (PVX ; *Potato virus X*) (Choi et al., 2011; Masuta et al., 1995). En effet, pour ces virus la méthylation de la coiffe en 5' des ARNm viraux

est essentielle à leur réplication. La protéine SAHH apparaît donc primordiale pour son contrôle des réactions de trans-méthylation en modulant le ratio SAH/SAM. De plus, la trans-méthylation est aussi importante dans la régulation des défenses des plantes en modifiant des phytohormones majeures de la réponse immunitaire. En effet, la méthylation du SA par une salicylate carboxyl méthyltransferase (Liu et al., 2010) est nécessaire au transport du SA des zones infectées aux régions distales saines permettant la mise en place de la SAR (Gaffney et al., 1993; Gao et al., 2014). Le JA est aussi méthylé sous l'action d'une carboxyl méthyltransferase spécifique, dont la surexpression est liée à l'augmentation de la résistance d'*A. thaliana* et de *Vitis vinifera* à une infection par l'agent pathogène *Botrytis cinerea* (Jia et al., 2016; Seo et al., 2001). Enfin, la SAM est le précurseur de nombreuses molécules modulatrices de la réponse immunitaire (Sauter et al., 2013). Entre autre, elle est le précurseur du 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) dont l'oxydation par l'ACC oxydase forme l'éthylène. Ces deux molécules sont décrites comme régulant les réponses immunitaires et symbiotiques des plantes (Nascimento et al., 2018). La SAM, par l'action de la nicotianamine synthase (NAS), est aussi le précurseur de la nicotianamine, un chélateur de fer non protéique (Bauer et al., 2004; Koen et al., 2013). Chez *A. thaliana*, durant l'ISR et la résistance induite par l'acide β -aminobutyrique, une accumulation des transcrits codant pour l'isoforme 4 de la NAS (AtNAS4) a été observée (Koen et al., 2014; Zamioudis et al., 2014). L'étude du rôle de CDC48 dans la régulation des enzymes du métabolisme de la SAM est donc particulièrement intéressante dans le contexte de l'immunité.

Conclusion & Discussion

Les mécanismes sous-jacents à la réponse immunitaire des plantes sont très étudiés et ces 30 dernières années des acteurs clés de l'immunité ont été identifiés et caractérisés. Ceux-ci incluent le NO, un médiateur de l'immunité innée et acquise chez les animaux (Trapet et al., 2015; Wendehenne et al., 2014; Yu et al., 2014). Durant la réponse immunitaire, le NO agit en partie *via* la S-nitrosylation de protéines (Astier et al., 2011; Yu et al., 2014). Toutefois, peu de protéine S-nitrosylées ont été identifiées *in vivo* et caractérisées finement (Lamotte et al., 2015). Celles-ci incluent NPR1, SABP3, la peroxiredoxine 2, la NADPH oxydase et NtCDC48. Cette dernière, apparentée aux chaperonnes, est S-nitrosylée en réponse à la cryptogéine. *In vitro*, ce processus conduit à l'inhibition de son activité ATPase essentielle à son activité ségrégase (Astier et al., 2012). L'objectif de cette thèse a été d'étudier le rôle de la protéine CDC48 dans la réponse immunitaire chez les plantes.

Nous avons montré que CDC48 est potentiellement active durant l'élicitation et que le transcrit, tout comme la protéine, s'accumulent durant la réponse immunitaire induite chez le tabac par la cryptogéine (Rosnoblet et al., 2017). En revanche, le pourcentage de la population cellulaire de CDC48 S-nitrosylée s'est révélé faible, posant ainsi la question de l'incidence physiologique de cette modification post-traductionnelle sur la fonction de la protéine. Ces résultats corroborent ceux de plusieurs études *in vivo* montrant que pour une protéine donnée, le taux de S-nitrosylation cellulaire est faible (Wawer et al., 2010; Zhou et al., 2018). Une des hypothèses émise par l'équipe serait qu'une fois S-nitrosylée, la sous-population subissant cette modification pourrait agir comme senseur de NO (Rosnoblet et al., 2016). Cette hypothèse est basée sur le concept selon lequel l'apparition des résidus cystéinyls au cours de l'évolution est un avantage sélectif conférant notamment aux cellules un système efficace de détection et de réponse aux espèces réactives de l'azote et de l'oxygène (Derakhshan et al., 2007). La S-

nitrosylation agirait ainsi comme un signal d'alerte de stress nitrosatif/oxydatif, favorisant la synthèse *de novo* et CDC48 afin de promouvoir la voie UPS permettant l'élimination de protéines oxydées. A ce titre, il est intéressant de noter que des inhibiteurs de la voie UPS, incluant ceux de CDC48 (Chou et al., 2017, 2011; Gareau et al., 2018) promeuvent cette voie (Harper and Bennett, 2016). En accord avec cette hypothèse, des travaux de l'équipe ont également montré que la production de NO et de FAO induite par la cryptogéine est requise à l'accumulation de transcrits codant pour des E3 ubiquitine ligases, autres acteurs de la voie UPS (Kulik et al., 2015).

La mobilisation de CDC48 dans l'immunité chez les mammifères a clairement été décrite dans la littérature, alors que peu d'études ont été menées chez les plantes (Bègue et al., 2017). Les résultats concernant la mobilisation de CDC48 durant l'élicitation induite par la cryptogéine (Rosnoblet et al., 2017) complètent les données publiées par Copeland *et al.* (2016) et Niehl *et al.* (2012) démontrant respectivement l'implication de CDC48 dans la régulation du turnover du récepteur SNC1 et de protéines de mouvement virales. Afin de compléter l'étude de la dynamique d'accumulation de CDC48 dans la réponse immunitaire, il serait judicieux d'analyser sa localisation subcellulaire. En effet, comme discuté dans la conclusion du **Chapitre 3**, le protocole d'extraction protéique utilisé dans les expériences d'IP-MS n'est pas adapté à la purification de protéines de compartiments cellulaires spécifiques. Or, selon le processus biologique dans lequel CDC48 est impliqué, un recrutement local de la protéine s'effectue. Par exemple, lors de la réparation des cassures double brins de l'ADN, CDC48 s'accumule au niveau des chromosomes (Verma et al., 2011) alors que dans le processus de dégradation des protéines de la membrane externe mitochondriale induit par un stress, ainsi que dans la mise en place de la mitophagie, CDC48 s'accumule en périphérie des mitochondries (Guo et al., 2016; Nielson et al., 2017). Par conséquent, l'élucidation du rôle de CDC48 dans la mise en place de la réponse immunitaire nécessite une étude fine et dynamique de sa

localisation subcellulaire. Bien que l'observation par microscopie à épi-fluorescence de GFP-CDC48, produite de manière transitoire dans des feuilles de tabac, ne semble pas révéler de modification de la localisation de cette protéine en réponse à la cryptogéine, une analyse en microscopie confocale, supportée par des analyses statistiques, pourrait ainsi être menée. D'autre part, l'étude de l'accumulation de la protéine endogène dans les différents compartiments subcellulaires est également envisageable en effectuant des expériences de fractionnement cellulaire.

Pour élucider le rôle de CDC48 dans la réponse immunitaire, une double stratégie a été menée. La première a consisté à établir une lignée cellulaire surexprimant constitutivement la protéine CDC48-TAP afin d'étudier l'impact de cette dernière sur des réponses cellulaires induites par la cryptogéine dont la mort cellulaire. La seconde démarche a consisté à identifier des partenaires potentiels de CDC48 endogènes, suite ou non à une élicitation, à confirmer cette interaction puis à étudier la dynamique d'expression, la régulation et l'activité de ces partenaires dans les deux lignées cellulaires dans le contexte de l'immunité.

Nous avons observé que lors de la réponse immunitaire induite par la cryptogéine, les différences observées entre la lignée sauvage et celle surexprimant CDC48 concernent la mort cellulaire et la régulation du stress oxydatif (Rosnoblet et al., 2017; **Chapitre 2**). En revanche, la surexpression de CDC48 n'a pas présenté d'incidence sur des événements de signalisation cellulaire précoces comme la production de NO, de FAO ou encore l'activation des MAPK (Rosnoblet et al., 2017).

L'implication de CDC48 dans la mort cellulaire est sujet à controverse et reste ambiguë (Braun and Zischka, 2008). Dans certains modèles biologiques, l'accumulation de CDC48 est liée à la survie cellulaire et présente un rôle anti-apoptotique. En particulier, dans divers types de cellules cancéreuses, le taux d'expression de CDC48, de même que celui des composants de l'UPS, est élevé. Ce mécanisme autorise une dégradation active des protéines incorrectement

repliées/non fonctionnelles dont la synthèse est accrue du fait de la très forte activité traductionnelle de ces cellules (Harper and Bennett, 2016). En conséquence, les cellules cancéreuses maintiennent une balance synthèse protéique/dégradation protéique optimale et la surexpression de CDC48 et des composants de l'UPS est associée avec un faible pronostic de survie des patients (Chan et al., 2006; Tsujimoto et al., 2004; Yamamoto et al., 2004). L'inhibition de CDC48, du protéasome et de chaperonnes est donc développée en tant que nouvelle stratégie pour induire la mort cellulaire dans certains cancers (Anderson et al., 2015; Gareau et al., 2018; Harper and Bennett, 2016; Magnaghi et al., 2013). Dans d'autres modèles mais de façon plus anecdotique, l'activité de CDC48 est décrite comme pro-apoptotique, son accumulation favorisant la mort cellulaire. Par exemple, chez un mutant de drosophile surexprimant CDC48 au niveau des yeux composés, une auto-dégénérescence importante a été observée (Higashiyama et al., 2002; Kushimura et al., 2018). Globalement, il en a été déduit que dans un contexte cellulaire post-mitotique, comme dans les cellules différenciées ou spécialisées, l'accumulation de CDC48 aurait un effet pro-apoptotique, alors que dans des cellules moins spécialisées, ou ayant une fréquence élevée de division comme dans les cellules cancéreuses, CDC48 aurait un effet anti-apoptotique (Braun and Zischka, 2008). Dans notre étude, les cellules traitées par la cryptogéine sont en phase exponentielle de croissance mais le cycle cellulaire n'est pas synchronisé au sein de la population cellulaire. Ce paramètre est particulièrement important à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. En effet, il a été montré qu'en fonction du stade du cycle cellulaire certains événements induits par la cryptogéine diffèrent (Kadota et al., 2005; Ohno et al., 2011). En effet, si le cycle cellulaire n'influence pas la production de FAO, d'autres réponses de défense dont la mort cellulaire ne sont déclenchées que si la cellule a reconnu la cryptogéine durant les phases G1 et S du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire s'arrête alors au stade G1 et G2 avant la mise en place de la mort cellulaire. Ainsi, durant le traitement cryptogéine une sous-population de cellules voit leur cycle

cellulaire stoppé. Par analogie aux modèles animaux, cette condition cellulaire pourrait favoriser l'implication de CDC48 dans la mort cellulaire, ce mécanisme encore non élucidé étant exacerbé dans la lignée surexprimant la protéine. Une autre possibilité serait que la surexpression de CDC48 dans la lignée CDC48-TAP crée un déséquilibre de la balance synthèse/dégradation des protéines en faveur de la dégradation, favorisant la mort cellulaire. Bien qu'hypothétique et non compris, ce mécanisme serait inductible car les cellules contrôlant surexprimant CDC48 ne présentent pas de mortalité accrue comparées aux cellules sauvages. Plusieurs scénarios peuvent être envisagés. En particulier, il serait plausible que la surexpression de CDC48 accélère la dégradation de régulateurs négatifs de la mort cellulaire induite en réponse à la cryptogéine. A ce titre, il serait particulièrement intéressant d'analyser la cinétique de dégradation des histones déacétylase de type 2 (HDAC2) dans la lignée surexpresser. Notre équipe a en effet démontré que ces protéines régulent négativement la mort cellulaire (et la HR sur tissu foliaire) déclenchée par la cryptogéine. Cette régulation négative se manifeste par une inhibition de l'accumulation des transcrits *HDAC2* et une dégradation des protéines correspondantes (Bourque et al., 2011b; Grandperret et al., 2014). Chez la lignée surexprimant CDC48, une accélération de la dégradation de HDAC2 pourrait ainsi être observée.

Nous pouvons nous interroger sur la finalité de l'interaction entre les partenaires potentiels identifiés en IP-MS et CDC48. En effet, CDC48 interagit-elle avec ses partenaires pour accompagner leur dégradation ou bien ces interactions participent-elles à des processus cellulaires autres? À partir de l'identification de partenaires potentiels de CDC48 par IP-MS, deux types d'études ont été menées afin de mieux comprendre le rôle de CDC48 dans la réponse immunitaire et, plus généralement, dans la physiologie de la plante. La première a consisté en une étude ciblée d'un des partenaires de CDC48, la protéine cAPX (**Chapitre 2**), alors que la seconde est une étude plus globale de l'interactome de CDC48 (**Chapitre 3**). Idéalement, une

protéine partenaire spécifiquement impliquée dans la réponse immunitaire aurait été co-immunoprécipitée uniquement dans les échantillons traités à la cryptogéine ou, alternativement, sur- ou sous-représentée parmi ces partenaires. Toutefois, dans nos analyses de MS, aucun partenaire n'a été identifié exclusivement dans les échantillons traités ou témoins (Rosnoblet et al., 2017). De plus, nous n'avons pas réalisé de MS quantitative. Or, en transposant les résultats de MS chez *A. thaliana*, seuls deux partenaires potentiels absents des banques de tabac ont été identifiés comme interagissant spécifiquement avec CDC48 lors de la réponse immunitaire. La grande majorité des partenaires semble donc interagir avec CDC48 indépendamment de l'immunité, même si comme souligné ci-dessus une analyse quantitative permettrait éventuellement de mettre en évidence des différences dans l'abondance des partenaires co-immunoprécipités. Indépendamment d'une élicitation, notre hypothèse est que CDC48 prendrait en charge cAPX pour la mener à la dégradation par la voie UPS, participant ainsi au turnover de la protéine. En accord avec cette possibilité, chez *A. thaliana* cAPX a été montrée comme ubiquitinée ou interagissant avec une protéine ubiquitinée (Igawa et al., 2009). Par ailleurs, en réponse à un stress thermique, chez le tabac cAPX est ubiquitinée avant d'être dégradée par la voie UPS (de Pinto et al., 2013; Vacca et al., 2007). Les résultats de nos expériences montrent que même si cAPX interagit avec CDC48 indépendamment de l'immunité, les transcrits ainsi que la protéine (en particulier l'isoforme de 31 kDa) s'accumulent lors de la réponse immunitaire induite par la cryptogéine. De plus, une augmentation de son activité a été observée. Il est envisageable que l'augmentation de la synthèse protéique puisse être associée à une dégradation plus marquée de cAPX par la voie UPS. Ce mécanisme aurait pour but d'éliminer les protéines nouvellement synthétisées mal conformées ou inopérantes, mais pourrait également participer à la régulation de l'activité de la protéine *via* sa dégradation. La comparaison de la régulation de cAPX entre la lignée sauvage et surexprimeur lors de l'élucation par la cryptogéine s'est également révélée informative. D'une part aucune

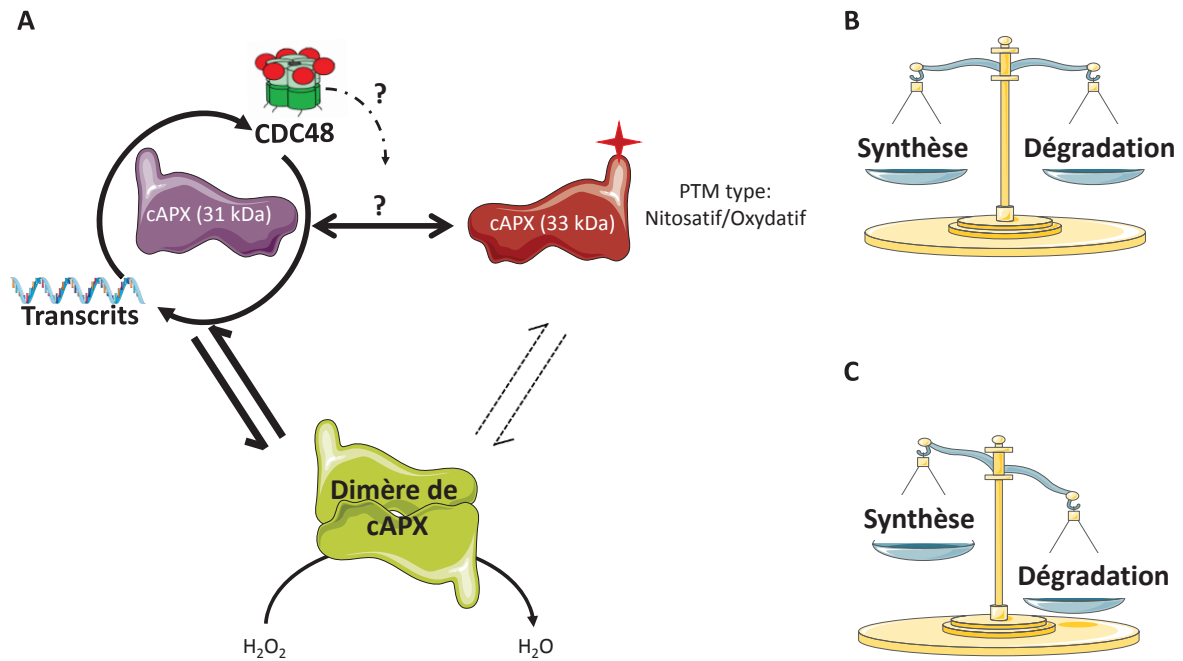


Figure C.1 Schéma hypothétique de la régulation de cAPX par CDC48. CDC48 via l'UPS participerait au *turnover* de la protéine cAPX (A). Chez le tabac, cAPX existe sous deux formes présentant des masses moléculaires apparentes en SDS-PAGE de 31 kDa majoritairement retrouvée au sein des cellules sauvages et de 33 kDa, majoritairement retrouvée au sein des cellules CDC48-TAP. La forme de 33 kDa est une forme de cAPX arborant vraisemblablement une PTM de type nitrosatif et/ou oxydatif. Le mécanisme régulant le taux et donc la sur/sous-représentation de chacune de ces deux formes de cAPX reste encore indéterminé, mais pourrait en partie impliquer CDC48. Contrairement aux cellules sauvages (B), au sein des cellules qui surexpriment CDC48 (C), du fait de la forte accumulation de CDC48 et d'une probable sur-activation de l'UPS, l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de cAPX semble être rompu au profit de la dégradation de la forme de 31 kDa. Dans cette même lignée cellulaire présentant majoritairement la forme de 33 kDa, l'activité cAPX est fortement réduite comparativement à la lignée sauvage (Chapitre 2). Ces informations suggèrent que la forme de 31 kDa est celle se dimérisant et porteuse de l'activité.

augmentation de l'activité de cAPX n'a été mesurée, d'autre part une accumulation plus marquée de la bande immunoréactive de 33 KDa (versus celle de 31 kDa) a été révélée. La surexpression de CDC48 impacte donc fortement cAPX, en terme d'activité comme de qualité, ces deux paramètres étant probablement associés. Une hypothèse plausible serait que la bande immunoréactive de 31 kDa s'accumulant plus fortement dans les cellules sauvages corresponde à l'isoforme active (**Fig. C.1**). Sa dégradation serait plus intense dans la lignée surexprimant CDC48, expliquant sa moindre accumulation et la non induction de l'activité cAPX dans cette lignée. L'étude de l'ubiquitination de cAPX interagissant avec CDC48 lors de traitement à la cryptogéine permettrait d'apporter des premiers éléments de réponse afin d'étayer ces hypothèses.

À la vue des résultats, il semblerait donc que dans le modèle cryptogéine/tabac, CDC48 ait un rôle indirect dans la réponse immunitaire, sa principale fonction étant de participer au contrôle qualité des protéines *via* la voie UPS. L'analyse du réseau d'interaction de CDC48 met en effet en évidence le lien fort entre CDC48 et l'UPS, comme c'est le cas pour ses orthologues animaux et de levure. En effet, même si aucune ubiquitine ligase n'a été retrouvée au sein du ce réseau, CDC48 interagit avec la communauté des complexes protéiques potentiellement ubiquitinées (Igawa et al., 2009), dont le nœud centrale est l'ubiquitine (UBQ3). CDC48 interagit également avec la communauté du protéasome, soulignant là encore le rôle central de CDC48 dans le contrôle qualité des protéines chez les plantes (**Chapitre 3**). Or, de nombreuses études montrent que le système UPS est important dans la mise en place de la réponse immunitaire (Adams and Spoel, 2018; Dielen et al., 2010; Marino et al., 2012). Ainsi, l'observation de réponses précoces et/ou exacerbées lors de la mise en place de l'immunité induite par la cryptogéine dans les cellules surexprimant CDC48 pourrait être due à une activité exacerbée de CDC48, accélérant la voie UPS et dérégulant ainsi l'homéostasie de protéines régulatrices de la mort cellulaire comme discuté précédemment ou du stress redox. De ce fait, le modèle cellulaire surexprimant

CDC48 constitue un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de processus biologiques impliquant l'UPS.

Références bibliographie

- Adams, E.H.G., and Spoel, S.H. (2018). The ubiquitin–proteasome system as a transcriptional regulator of plant immunity. *J. Exp. Bot.*
- Aguilar, E., del Toro, F.J., Canto, T., and Tenllado, F. (2017). Identification of MAPKs as signal transduction components required for the cell death response during compatible infection by the synergistic pair Potato virus X–Potato virus Y. *Virology* 509, 178–184.
- Aker, J., Borst, J.W., Karlova, R., and de Vries, S. (2006). The *Arabidopsis thaliana* AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *J. Struct. Biol.* 156, 62–71.
- Alscher, R.G., Erturk, N., and Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341.
- Anderson, D.J., Le Moigne, R., Djakovic, S., Kumar, B., Rice, J., Wong, S., Wang, J., Yao, B., Valle, E., Kiss von Soly, S., et al. (2015). Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell* 28, 653–665.
- Anjum, N.A., Sharma, P., Gill, S.S., Hasanuzzaman, M., Khan, E.A., Kachhap, K., Mohamed, A.A., Thangavel, P., Devi, G.D., Vasudhevan, P., et al. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 19002–19029.
- Asada, K. (1999). THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 601–639.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25–29.
- Ashtamker, C., Kiss, V., Sagi, M., Davydov, O., and Fluhr, R. (2007). Diverse Subcellular Locations of Cryptogein-Induced Reactive Oxygen Species Production in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *PLANT Physiol.* 143, 1817–1826.
- Astier, J., Rasul, S., Koen, E., Manzoor, H., Besson-Bard, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Durner, J., Lindermayr, C., and Wendehenne, D. (2011). S-nitrosylation: An emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Sci.* 181, 527–533.
- Astier, J., Kulik, A., Koen, E., Besson-Bard, A., Bourque, S., Jeandroz, S., Lamotte, O., and Wendehenne, D. (2012a). Protein S-nitrosylation: What’s going on in plants? *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1101–1110.
- Astier, J., Besson-Bard, A., Lamotte, O., Bertoldo, J., Bourque, S., Terenzi, H., and Wendehenne, D. (2012b). Nitric oxide inhibits the ATPase activity of the chaperone-like AAA+ ATPase CDC48, a target for S-nitrosylation in cryptogein signalling in tobacco cells. *Biochem. J.* 447, 249–260.

- Baek, G.H., Cheng, H., Choe, V., Bao, X., Shao, J., Luo, S., and Rao, H. (2013). Cdc48: A Swiss Army Knife of Cell Biology. *J. Amino Acids* 2013, 1–12.
- Bai, X., Yang, L., Tian, M., Chen, J., Shi, J., Yang, Y., and Hu, X. (2011). Nitric Oxide Enhances Desiccation Tolerance of Recalcitrant *Antiaris toxicaria* Seeds via Protein S-Nitrosylation and Carbonylation. *PLoS ONE* 6, e20714.
- Balakireva, A., and Zamyatnin, A. (2018). Indispensable Role of Proteases in Plant Innate Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 629.
- Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488.
- Bassi, S. (2007). A Primer on Python for Life Science Researchers. *PLoS Comput. Biol.* 3, e199.
- Bauer, P., Thiel, T., Klatter, M., Berezky, Z., Brumbarova, T., Hell, R., and Grosse, I. (2004). Analysis of Sequence, Map Position, and Gene Expression Reveals Conserved Essential Genes for Iron Uptake in Arabidopsis and Tomato. *PLANT Physiol.* 136, 4169–4183.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M.N., Carreras, A., Corpas, F.J., and Barroso, J.B. (2014). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 65, 527–538.
- Bègue, H., Jeandroz, S., Blanchard, C., Wendehenne, D., and Rosnoblet, C. (2017). Structure and functions of the chaperone-like p97/CDC48 in plants. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1861, 3053–3060.
- Berg, M., Rogers, R., Muralla, R., and Meinke, D. (2005). Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 44, 866–878.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2008). New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 21–39.
- Blein, J.-P., Milat, M.-L., and Ricci, P. (1991). Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *PLANT Physiol.* 95, 486–491.
- Blondel, V.D., Guillaume, J.-L., Lambiotte, R., and Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *J. Stat. Mech. Theory Exp.* 2008, P10008.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.-P., and Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 181–192.

- Bourque, S., Ponchet, M., Binet, M.-N., Ricci, P., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (1998). Comparison of Binding Properties and Early Biological Effects of Elicitins in Tobacco Cells. *Plant Physiol.* *118*, 1317–1326.
- Bourque, S., Binet, M.-N., Ponchet, M., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (1999). Characterization of the Cryptogein Binding Sites on Plant Plasma Membranes. *J. Biol. Chem.* *274*, 34699–34705.
- Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M., and Wendehenne, D. (2011a). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol.* *192*, 127–139.
- Bourque, S., Dutartre, A., Hammoudi, V., Blanc, S., Dahan, J., Jeandroz, S., Pichereaux, C., Rossignol, M., and Wendehenne, D. (2011b). Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants. *New Phytol.* *192*, 127–139.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* *70*, 21–30.
- Braun, R.J., and Zischka, H. (2008). Mechanisms of Cdc48/VCP-mediated cell death — from yeast apoptosis to human disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1783*, 1418–1435.
- Broekaert, W.F., Delauré, S.L., De Bolle, M.F.C., and Cammue, B.P.A. (2006). The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 393–416.
- Cacas, J.-L., Vaillau, F., Davoine, C., Ennar, N., Agnel, J.-P., Tronchet, M., Ponchet, M., Blein, J.-P., Roby, D., Triantaphylides, C., et al. (2005). The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant Cell Environ.* *28*, 1367–1378.
- Cantoni, G.L. (1975). Biological Methylation: Selected Aspects. *Annu. Rev. Biochem.* *44*, 435–451.
- Chan, C.-H., Ko, C.-C., Chang, J.-G., Chen, S.-F., Wu, M.-S., Lin, J.-T., and Chow, L.-P. (2006). Subcellular and Functional Proteomic Analysis of the Cellular Responses Induced by *Helicobacter pylori*. *Mol. Cell. Proteomics* *5*, 702–713.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M.K., Yu, K., Sekine, K., Gao, Q., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., et al. (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat. Genet.* *43*, 421–427.
- Chatr-aryamontri, A., Oughtred, R., Boucher, L., Rust, J., Chang, C., Kolas, N.K., O'Donnell, L., Oster, S., Theesfeld, C., Sellam, A., et al. (2017). The BioGRID interaction database: 2017 update. *Nucleic Acids Res.* *45*, D369–D379.
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J., and Kunkel, B.N. (2007). *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 20131–20136.

- Cheng, Y.T., Li, Y., Huang, S., Huang, Y., Dong, X., Zhang, Y., and Li, X. (2011). Stability of plant immune-receptor resistance proteins is controlled by SKP1-CULLIN1-F-box (SCF)-mediated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 14694–14699.
- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C.-M., and Hwang, I. (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* *16*, 388–394.
- Chou, C.-C., Bam, R., Yang, Z., Bui, J.L., Jiang, D., and Koong, A.C. (2017). Hypoxia-Induced Endoplasmic Reticulum Stress. In *Tumor Hypoxia*, (WORLD SCIENTIFIC), pp. 225–247.
- Chou, T.-F., Brown, S.J., Minond, D., Nordin, B.E., Li, K., Jones, A.C., Chase, P., Porubsky, P.R., Stoltz, B.M., Schoenen, F.J., et al. (2011). Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4834–4839.
- Citovsky, V., Zaltsman, A., Kozlovsky, S.V., Gafni, Y., and Krichevsky, A. (2009). Proteasomal degradation in plant–pathogen interactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 1048–1054.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A., and Klessig, D.F. (2000). Nitric Oxide Inhibition of Tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *13*, 1380–1384.
- Clauset, A., Newman, M.E.J., and Moore, C. (2004). Finding community structure in very large networks. *Phys. Rev. E* *70*.
- Cock, P.J.A., Antao, T., Chang, J.T., Chapman, B.A., Cox, C.J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., et al. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics* *25*, 1422–1423.
- Cokelaer, T., Pultz, D., Harder, L.M., Serra-Musach, J., and Saez-Rodriguez, J. (2013). BioServices: a common Python package to access biological Web Services programmatically. *Bioinformatics* *29*, 3241–3242.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., and Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant–pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* *7*, 210–216.
- Copeland, C., Woloshen, V., Huang, Y., and Li, X. (2016). AtCDC48A is involved in the turnover of an NLR immune receptor. *Plant J.* *88*, 294–305.
- Correa-Aragunde, N., Foresi, N., and Lamattina, L. (2015). Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study. *J. Exp. Bot.* *66*, 2913–2921.
- Cristina, M., Petersen, M., and Mundy, J. (2010). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *61*, 621–649.
- Csardi, G., and Nepusz, T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Systems*, 1695.
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J.E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* *66*, 487–511.

- Dahan, J., Etienne, P., Petitot, A., Houot, V., Blein, J., and Suty, L. (2001). Cryptogein affects expression of $\alpha 3$, $\alpha 6$ and $\beta 1$ 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *J. Exp. Bot.* *52*, 1947–1948.
- Dahan, J., Pichereaux, C., Rossignol, M., Blanc, S., Wendehenne, D., Pugin, A., and Bourque, S. (2009). Activation of a nuclear-localized SIPK in tobacco cells challenged by cryptogein, an elicitor of plant defence reactions. *Biochem. J.* *418*, 191–200.
- Davoine, C., Falletti, O., Douki, T., Iacazio, G., Ennar, N., Montillet, J.-L., and Triantaphylides, C. (2006). Adducts of Oxylin Electrophiles to Glutathione Reflect a 13 Specificity of the Downstream Lipoxygenase Pathway in the Tobacco Hypersensitive Response. *PLANT Physiol.* *140*, 1484–1493.
- De Lorenzo, G., and Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 295–299.
- Derakhshan, B., Hao, G., and Gross, S. (2007). Balancing reactivity against selectivity: The evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovasc. Res.* *75*, 210–219.
- Derevnina, L., Dagdas, Y.F., De la Concepcion, J.C., Bialas, A., Kellner, R., Petre, B., Domazakis, E., Du, J., Wu, C.-H., Lin, X., et al. (2016). Nine things to know about elicitors. *New Phytol.* *212*, 888–895.
- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R. (2003). The Arabidopsis NPR1 Disease Resistance Protein Is a Novel Cofactor That Confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the Basic Domain/Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *PLANT CELL ONLINE* *15*, 2181–2191.
- Dielen, A.-S., Badaoui, S., Candresse, T., and German-Retana, S. (2010). The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game. *Mol. Plant Pathol.* *11*, 293–308.
- Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., and Zhang, Y. (2018). Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. *Cell* *173*, 1454-1467.e15.
- Ditt, R.F., Kerr, K.F., de Figueiredo, P., Delrow, J., Comai, L., and Nester, E.W. (2006). The *Arabidopsis thaliana* Transcriptome in Response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 665–681.
- Dixon, D.P., Davis, B.G., and Edwards, R. (2002). Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants: IDENTIFICATION OF TWO CLASSES WITH PUTATIVE FUNCTIONS IN REDOX HOMEOSTASIS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*. *J. Biol. Chem.* *277*, 30859–30869.
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L.C.P., Zhou, J., Liebrand, T.W.H., Xie, C., Govers, F., Robatzek, S., et al. (2015). Elicitor recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nat. Plants* *1*, 15034.

- Durrant, W.E., and Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annu. Rev. Phytopathol.* *42*, 185–209.
- Elmayan, T., Fromentin, J., Riondet, C., Alcaraz, G., Blein, J.-P., and Simon-Plas, F. (2007). Regulation of reactive oxygen species production by a 14-3-3 protein in elicited tobacco cells. *Plant Cell Environ.* *30*, 722–732.
- Etienne, P., Petitot, A.-S., Houot, V., Blein, J.-P., and Suty, L. (2000). Induction of *tcI 7*, a gene encoding a β -subunit of proteasome, in tobacco plants treated with elicitors, salicylic acid or hydrogen peroxide¹. *FEBS Lett.* *466*, 213–218.
- Fares, A., Rossignol, M., and Peltier, J.-B. (2011). Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *416*, 331–336.
- Farmer, E.E., and Mueller, M.J. (2013). ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* *64*, 429–450.
- Farmer, E.E., Alméras, E., and Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6*, 372–378.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T. (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* *4*, 307–316.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin: Plants perceive a conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* *18*, 265–276.
- Feussner, I., and Wasternack, C. (2002). The Lipoxygenase Pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* *53*, 275–297.
- Fitch, W.M. (2000). Homology : a personal view on some of the problems. *Trends Genet.* *16*, 227–231.
- Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* *9*, 275–296.
- Fotopoulos, V., Ziogas, V., Tanou, G., and Molassiotis, A. (2010). Involvement of AsA/DHA and GSH/GSSG Ratios in Gene and Protein Expression and in the Activation of Defence Mechanisms Under Abiotic Stress Conditions. In *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*, N.A. Anjum, M.-T. Chan, and S. Umar, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 265–302.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *PLANT Physiol.* *155*, 2–18.
- Friesner, J., Assmann, S.M., Bastow, R., Bailey-Serres, J., Beynon, J., Brendel, V., Buell, C.R., Bucksch, A., Busch, W., Demura, T., et al. (2017). The Next Generation of Training for Arabidopsis Researchers: Bioinformatics and Quantitative Biology. *Plant Physiol.* *175*, 1499–1509.

- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* 261, 754–756.
- Gao, Q., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2014). Chemical inducers of systemic immunity in plants. *J. Exp. Bot.* 65, 1849–1855.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. (2006). Early Signaling Events Induced by Elicitors of Plant Defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 19, 711–724.
- Gareau, A., Rico, C., Boerboom, D., and Nadeau, M.-E. (2018). In vitro efficacy of a first-generation valosin-containing protein inhibitor (CB-5083) against canine lymphoma. *Vet. Comp. Oncol.* 16, 311–317.
- Gauthier, A., Lamotte, O., Rebutier, D., Bouteau, F., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2007). Cryptogein-Induced Anion Effluxes: Electrophysiological Properties and Analysis of the Mechanisms Through Which They Contribute to the Elicitor-Triggered Cell Death. *Plant Signal. Behav.* 2, 86–95.
- Gehl, C., Waadt, R., Kudla, J., Mendel, R.-R., and Hänsch, R. (2009). New GATEWAY vectors for High Throughput Analyses of Protein–Protein Interactions by Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol. Plant* 2, 1051–1058.
- Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., and Jacquot, J.P. (2005). The plant thioredoxin system. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 24–35.
- Gill, S.S., and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- Gingras, A.-C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R. (2007). Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 645–654.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227.
- Gong, B., Sun, S., Yan, Y., Jing, X., and Shi, Q. (2018). Glutathione Metabolism and Its Function in Higher Plants Adapting to Stress. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, D.K. Gupta, J.M. Palma, and F.J. Corpas, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 181–205.
- Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* 10, 751–757.
- Grandperret, V., Nicolas-Francès, V., Wendehenne, D., and Bourque, S. (2014). Type-II histone deacetylases: elusive plant nuclear signal transducers: HD2 as new nuclear signal transducers. *Plant Cell Environ.* 37, 1259–1269.
- Greenberg, J.T., and Yao, N. (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* 6, 201–211.

- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.-L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T. -p., et al. (2006). Genetic Characterization and Functional Analysis of the *GID1* Gibberellin Receptors in *Arabidopsis*. *PLANT CELL ONLINE* 18, 3399–3414.
- Guo, X., Sun, X., Hu, D., Wang, Y.-J., Fujioka, H., Vyas, R., Chakrapani, S., Joshi, A.U., Luo, Y., Mochly-Rosen, D., et al. (2016). VCP recruitment to mitochondria causes mitophagy impairment and neurodegeneration in models of Huntington's disease. *Nat. Commun.* 7, 12646.
- Hagberg, A.A., Schult, D.A., and Swart, P.J. (2008). Exploring Network Structure, Dynamics, and Function using NetworkX. In *Proceedings of the 7th Python in Science Conference*, G. Varoquaux, T. Vaught, and J. Millman, eds. (Pasadena, CA USA), pp. 11–15.
- Hahn, M.G. (1996). MICROBIAL ELICITORS AND THEIR RECEPTORS IN PLANTS. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 387–412.
- Han, J.-D.J. (2008). Understanding biological functions through molecular networks. *Cell Res.* 18, 224–237.
- Harper, J.W., and Bennett, E.J. (2016). Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature* 537, 328–338.
- Hartmann, M., Zeier, T., Bernsdorff, F., Reichel-Deland, V., Kim, D., Hohmann, M., Scholten, N., Schuck, S., Bräutigam, A., Hölzel, T., et al. (2018). Flavin Monooxygenase-Generated N-Hydroxypipicolinic Acid Is a Critical Element of Plant Systemic Immunity. *Cell* 173, 456-469.e16.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2004). A Plant Vacuolar Protease, VPE, Mediates Virus-Induced Hypersensitive Cell Death. *Science* 305, 855–858.
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.* 23, 2496–2506.
- He, Q., Naqvi, S., McLellan, H., Boevink, P.C., Champouret, N., Hein, I., and Birch, P.R.J. (2018). Plant pathogen effector utilizes host susceptibility factor *NRL1* to degrade the immune regulator *SWAP70*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E7834–E7843.
- Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. In *Programmed Cell Death in Higher Plants*, E. Lam, H. Fukuda, and J. Greenberg, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 77–90.
- Heath, R.L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
- van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., and van Heusden, G.P.H. (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays* 23, 936–946.
- Higashiyama, H., Hirose, F., Yamaguchi, M., Inoue, Y.H., Fujikake, N., Matsukage, A., and Kakizuka, A. (2002). Identification of *ter94*, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 9, 264–273.

- Hirasawa, K., Amano, T., and Shioi, Y. (2004). Lipid-binding form is a key conformation to induce a programmed cell death initiated in tobacco BY-2 cells by a proteinaceous elicitor of cryptogein. *Physiol. Plant.* *121*, 196–203.
- Hong, S.H., Tripathi, B.N., Chung, M.-S., Cho, C., Lee, S., Kim, J.-H., Bai, H.-W., Bae, H.-J., Cho, J.-Y., Chung, B.Y., et al. (2018). Functional switching of ascorbate peroxidase 2 of rice (OsAPX2) between peroxidase and molecular chaperone. *Sci. Rep.* *8*.
- van der Hoorn, R.A., and Jones, J.D. (2004). The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 400–407.
- Horváth, B.M., Magyar, Z., Zhang, Y., Hamburger, A.W., Bakó, L., Visser, R.G.F., Bachem, C.W.B., and Bögre, L. (2006). EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *EMBO J.* *25*, 4909–4920.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* *45*, 101–127.
- Igawa, T., Fujiwara, M., Takahashi, H., Sawasaki, T., Endo, Y., Seki, M., Shinozaki, K., Fukao, Y., and Yanagawa, Y. (2009). Isolation and identification of ubiquitin-related proteins from *Arabidopsis* seedlings. *J. Exp. Bot.* *60*, 3067–3073.
- Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N.A., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., and Murata, Y. (2009). Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* *166*, 1587–1597.
- Jeandroz, S., Lamotte, O., Astier, J., Rasul, S., Trapet, P., Besson-Bard, A., Bourque, S., Nicolas-Frances, V., Ma, W., Berkowitz, G.A., et al. (2013). There’s More to the Picture Than Meets the Eye: Nitric Oxide Cross Talk with Ca²⁺ Signaling. *PLANT Physiol.* *163*, 459–470.
- Jeandroz, S., Wipf, D., Stuehr, D.J., Lamattina, L., Melkonian, M., Tian, Z., Zhu, Y., Carpenter, E.J., Wong, G.K.-S., and Wendehenne, D. (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase–like proteins in the plant kingdom. *Sci. Signal.* *9*, re2–re2.
- Jespersen, H.M., Kjærsgård, I.V.H., øStergaard, L., and Welinder, K.G. (1997). From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem. J.* *326*, 305–310.
- Jia, H., Zhang, C., Pervaiz, T., Zhao, P., Liu, Z., Wang, B., Wang, C., Zhang, L., Fang, J., and Qian, J. (2016). Jasmonic acid involves in grape fruit ripening and resistant against *Botrytis cinerea*. *Funct. Integr. Genomics* *16*, 79–94.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323–329.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J.T. (2009). Priming in Systemic Plant Immunity. *Science* *324*, 89–91.
- Kadota, Y., Watanabe, T., Fujii, S., Maeda, Y., Ohno, R., Higashi, K., Sano, T., Muto, S., Hasezawa, S., and Kuchitsu, K. (2005). Cell cycle dependence of elicitor-induced signal transduction in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* *46*, 156–165.

- Kadota, Y., Shirasu, K., and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol.* *56*, 1472–1480.
- Kärkönen, A., and Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry* *112*, 22–32.
- Kim, M.Y., and Zilberman, D. (2014). DNA methylation as a system of plant genomic immunity. *Trends Plant Sci.* *19*, 320–326.
- Kitajima, S., Tomizawa, K., Shigeoka, S., and Yokota, A. (2006). An inserted loop region of stromal ascorbate peroxidase is involved in its hydrogen peroxide-mediated inactivation. *FEBS J.* *273*, 2704–2710.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 725–732.
- Koen, E., Trapet, P., Brulé, D., Kulik, A., Klinguer, A., Atauri-Miranda, L., Meunier-Prest, R., Boni, G., Glauser, G., Mauch-Mani, B., et al. (2014). β -Aminobutyric Acid (BABA)-Induced Resistance in *Arabidopsis thaliana* : Link with Iron Homeostasis. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *27*, 1226–1240.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., and Nagano, T. (1998). Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* *70*, 2446–2453.
- Kryukov, G.V., Wilson, F.H., Ruth, J.R., Paulk, J., Tsherniak, A., Marlow, S.E., Vazquez, F., Weir, B.A., Fitzgerald, M.E., Tanaka, M., et al. (2016). *MTAP* deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells. *Science* *351*, 1214–1218.
- Kulik, A., Noirot, E., Grandperret, V., Bourque, S., Fromentin, J., Salloignon, P., Truntzer, C., Dobrowolska, G., Simon-Plas, F., and Wendehenne, D. (2015). Interplays between nitric oxide and reactive oxygen species in cryptogeiin signalling: NO and ROS crosstalk in cryptogeiin signalling. *Plant Cell Environ.* *38*, 331–348.
- Kumar, S., and Jain, S. (2018). Immune signaling by supramolecular assemblies. *Immunology*.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *PLANT CELL ONLINE* *16*, 3496–3507.
- Kushimura, Y., Tokuda, T., Azuma, Y., Yamamoto, I., Mizuta, I., Mizuno, T., Nakagawa, M., Ueyama, M., Nagai, Y., Yoshida, H., et al. (2018). Overexpression of ter94, *Drosophila* VCP, improves motor neuron degeneration induced by knockdown of TBPH, *Drosophila* TDP-43. *Am. J. Neurodegener. Dis.* *7*, 11–31.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.-M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D.G., and Schroeder, J.I. (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO J.* *22*, 2623–2633.
- Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 305–315.

- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251–275.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Garcia-Brugger, A., Durner, J., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2004). Analysis of Nitric Oxide Signaling Functions in Tobacco Cells Challenged by the Elicitor Cryptogein. *PLANT Physiol.* 135, 516–529.
- Lamotte, O., Courtois, C., Dobrowolska, G., Besson, A., Pugin, A., and Wendehenne, D. (2006). Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 1369–1376.
- Lamotte, O., Bertoldo, J.B., Besson-Bard, A., Rosnoblet, C., Aimé, S., Hichami, S., Terenzi, H., and Wendehenne, D. (2015). Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. *Front. Chem.* 2.
- Lan, P., Li, W., Wen, T.-N., Shiao, J.-Y., Wu, Y.-C., Lin, W., and Schmidt, W. (2011). iTRAQ Protein Profile Analysis of Arabidopsis Roots Reveals New Aspects Critical for Iron Homeostasis. *PLANT Physiol.* 155, 821–834.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998). **Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells: Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells.** *Plant J.* 15, 773–781.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2002). Analysis and Effects of Cytosolic Free Calcium Increases in Response to Elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *PLANT CELL ONLINE* 14, 2627–2641.
- Lecourieux, D., Lamotte, O., Bourque, S., Wendehenne, D., Mazars, C., Ranjeva, R., and Pugin, A. (2005). Proteinaceous and oligosaccharidic elicitors induce different calcium signatures in the nucleus of tobacco cells. *Cell Calcium* 38, 527–538.
- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A., and Lebrun-Garcia, A. (2000). Phosphoproteins Involved in the Signal Transduction of Cryptogein, an Elicitor of Defense Reactions in Tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 13, 821–829.
- Lequeu, J., Simon-Plas, F., Fromentin, J., Etienne, P., Petitot, A.-S., Blein, J.-P., and Suty, L. (2005). Proteasome comprising a β 1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Lett.* 579, 4879–4886.
- Levine, R., Moskovitz, J., and Stadtman, E. (2001). Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life* 50, 301–307.
- Li, M., Chen, H., Chen, J., Chang, M., Palmer, I.A., Gassmann, W., Liu, F., and Fu, Z.Q. (2018). TCP Transcription Factors Interact With NPR1 and Contribute Redundantly to Systemic Acquired Resistance. *Front. Plant Sci.* 9.
- Lindermayr, C., Sell, S., Muller, B., Leister, D., and Durner, J. (2010). Redox Regulation of the NPR1-TGA1 System of *Arabidopsis thaliana* by Nitric Oxide. *Plant Cell* 22, 2894–2907.
- Ling, T., Bellin, D., Vandelle, E., Imanifard, Z., and Delledonne, M. (2017). Host-Mediated S-Nitrosylation Disarms the Bacterial Effector HopAII to Reestablish Immunity. *Plant Cell* 29, 2871–2881.

- Liu, P.-P., Yang, Y., Pichersky, E., and Klessig, D.F. (2010). Altering Expression of *Benzoic Acid/Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase 1* Compromises Systemic Acquired Resistance and PAMP-Triggered Immunity in *Arabidopsis*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *23*, 82–90.
- Liu, Z., Ahn, J.-Y., Liu, X., and Ye, K. (2006). Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10917–10922.
- Liu, Z., Oh, S.-M., Okada, M., Liu, X., Cheng, D., Peng, J., Brat, D.J., Sun, S., Zhou, W., Gu, W., et al. (2009). Human BRE1 Is an E3 Ubiquitin Ligase for Ebp1 Tumor Suppressor. *Mol. Biol. Cell* *20*, 757–768.
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J., and Molina, A. (2008). Repression of the Auxin Response Pathway Increases Arabidopsis Susceptibility to Necrotrophic Fungi. *Mol. Plant* *1*, 496–509.
- Loake, G., and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 466–472.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135–162.
- Lorenzo, O., and Solano, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*, 532–540.
- Lozano-Durán, R., and Robatzek, S. (2015). 14-3-3 Proteins in Plant-Pathogen Interactions. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *28*, 511–518.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 496–501.
- Macho, A.P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol. Cell* *54*, 263–272.
- Madhusudhan, R., Ishikawa, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., and Shibata, H. (2003). Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. *Physiol. Plant.* *117*, 550–557.
- Magnaghi, P., D'Alessio, R., Valsasina, B., Avanzi, N., Rizzi, S., Asa, D., Gasparri, F., Cozzi, L., Cucchi, U., Orrenius, C., et al. (2013). Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat. Chem. Biol.* *9*, 548–556.
- Manzoor, H., Chiltz, A., Madani, S., Vatsa, P., Schoefs, B., Pugin, A., and Garcia-Brugger, A. (2012). Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium* *51*, 434–444.
- Marchand, C., Le Maréchal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Decottignies, P. (2004). New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *PROTEOMICS* *4*, 2696–2706.
- Marino, D., Peeters, N., and Rivas, S. (2012). Ubiquitination during Plant Immune Signaling. *PLANT Physiol.* *160*, 15–27.

- Masuta, C., Tanaka, H., Uehara, K., Kuwata, S., Koiwai, A., and Noma, M. (1995). Broad resistance to plant viruses in transgenic plants conferred by antisense inhibition of a host gene essential in S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 6117–6121.
- Meyer, H., and Wehl, C.C. (2014). The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell Sci.* *127*, 3877–3883.
- Meyer, H., Bug, M., and Bremer, S. (2012). Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* *14*, 117–123.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., and Thomas, P.D. (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc.* *8*, 1551–1566.
- Mikes, V., Milat, M.-L., Ponchet, M., Ricci, P., and Blein, J.-P. (1997). The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* *416*, 190–192.
- Miller, R.N.G., Costa Alves, G.S., and Van Sluys, M.-A. (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Ann. Bot.* *119*, 681–687.
- Misas-Villamil, J.C., Toenges, G., Kolodziejek, I., Sadaghiani, A.M., Kaschani, F., Colby, T., Bogyo, M., and van der Hoorn, R.A.L. (2013). Activity profiling of vacuolar processing enzymes reveals a role for VPE during oomycete infection. *Plant J.* *73*, 689–700.
- Mittler, R., and Zilinskas, B.A. (1991). Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* *97*, 962–968.
- Mittler, R., and Zilinskas, B.A. (1993). Detection of Ascorbate Peroxidase Activity in Native Gels by Inhibition of the Ascorbate-Dependent Reduction of Nitroblue Tetrazolium. *Anal. Biochem.* *212*, 540–546.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* *9*, 490–498.
- Moffatt, B.A., and Weretilnyk, E.A. (2001). Sustaining S-adenosyl-l-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiol. Plant.* *113*, 435–442.
- Montillet, J.L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., van de Cotte, B., Agnel, J.P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F., and Triantaphylides, C. (2005). Fatty Acid Hydroperoxides and H₂O₂ in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves. *PLANT Physiol.* *138*, 1516–1526.
- Moreno-Hagelsieb, G., and Latimer, K. (2008). Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. *Bioinformatics* *24*, 319–324.
- Muller, B., and Sheen, J. (2007). Advances in Cytokinin Signaling. *Science* *318*, 68–69.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* *59*, 501–520.
- Mur, L.A.J., Mandon, J., Cristescu, S.M., Harren, F.J.M., and Prats, E. (2011). Methods of nitric oxide detection in plants: A commentary. *Plant Sci.* *181*, 509–519.

- Nascimento, F.X., Rossi, M.J., and Glick, B.R. (2018). Ethylene and 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) in Plant–Bacterial Interactions. *Front. Plant Sci.* 9.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., and Jones, J.D.G. (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* 312, 436–439.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., and Jones, J.D.G. (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Curr. Biol.* 18, 650–655.
- Newman, M.E.J. (2006). Finding community structure in networks using the eigenvectors of matrices. *Phys. Rev. E* 74.
- Newman, M.E.J., and Girvan, M. (2004). Finding and evaluating community structure in networks. *Phys. Rev. E* 69.
- Niehl, A., Amari, K., Gereige, D., Brandner, K., Mely, Y., and Heinlein, M. (2012). Control of Tobacco mosaic virus Movement Protein Fate by CELL-DIVISION-CYCLE Protein48. *PLANT Physiol.* 160, 2093–2108.
- Nielson, J.R., Fredrickson, E.K., Waller, T.C., Rendón, O.Z., Schubert, H.L., Lin, Z., Hill, C.P., and Rutter, J. (2017). Sterol Oxidation Mediates Stress-Responsive Vms1 Translocation to Mitochondria. *Mol. Cell* 68, 673–685.e6.
- Noctor, G., Mhamdi, A., and Foyer, C.H. (2016). Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation: Methods in oxidative stress research. *Plant Cell Environ.* 39, 1140–1160.
- Noguchi, M., Takata, T., Kimura, Y., Manno, A., Murakami, K., Koike, M., Ohizumi, H., Hori, S., and Kakizuka, A. (2005). ATPase Activity of p97/Valosin-containing Protein Is Regulated by Oxidative Modification of the Evolutionally Conserved Cysteine 522 Residue in Walker A Motif. *J. Biol. Chem.* 280, 41332–41341.
- Nothnagel, E.A., McNeil, M., Albersheim, P., and Dell, A. (1983). Host-Pathogen Interactions : XXII. A Galacturonic Acid Oligosaccharide from Plant Cell Walls Elicits Phytoalexins. *Plant Physiol.* 71, 916–926.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266.
- Ohno, R., Kadota, Y., Fujii, S., Sekine, M., Umeda, M., and Kuchitsu, K. (2011). Cryptogein-Induced Cell Cycle Arrest at G2 Phase is Associated with Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases, Suppression of Expression of Cell Cycle-Related Genes and Protein Degradation in Synchronized Tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiol.* 52, 922–932.
- van Ooijen, G., van den Burg, H.A., Cornelissen, B.J.C., and Takken, F.L.W. (2007). Structure and Function of Resistance Proteins in Solanaceous Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 43–72.
- Orvar, B.L., and Ellis, B.E. (1995). Isolation of a cDNA encoding cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco. *Plant Physiol.* 108, 839–840.

- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.-L., Panabières, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M., and Blein, J.-P. (2001). Mediation of Elicitin Activity on Tobacco Is Assumed by Elicitin-Sterol Complexes. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2825–2834.
- Overmyer, K., Brosché, M., and Kangasjärvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci.* *8*, 335–342.
- Palmieri, L., Arrigoni, R., Blanco, E., Carrari, F., Zanor, M.I., Studart-Guimaraes, C., Fernie, A.R., and Palmieri, F. (2006). Molecular Identification of an Arabidopsis S-Adenosylmethionine Transporter. Analysis of Organ Distribution, Bacterial Expression, Reconstitution into Liposomes, and Functional Characterization. *PLANT Physiol.* *142*, 855–865.
- Panabières, F., Ponchet, M., Allasia, V., Cardin, L., and Ricci, P. (1997). Characterization of border species among Pythiaceae: several Pythium isolates produce elicitins, typical proteins from *Phytophthora* spp. *Mycol. Res.* *101*, 1459–1468.
- Panchuk, I.I., Volkov, R.A., and Schöffl, F. (2002). Heat Stress- and Heat Shock Transcription Factor-Dependent Expression and Activity of Ascorbate Peroxidase in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* *129*, 838–853.
- Paul, A.-L., Liu, L., McClung, S., Laughner, B., Chen, S., and Ferl, R.J. (2009). Comparative Interactomics: Analysis of *Arabidopsis* 14-3-3 Complexes Reveals Highly Conserved 14-3-3 Interactions between Humans and Plants. *J. Proteome Res.* *8*, 1913–1924.
- Pauwels, L., and Goossens, A. (2011). The JAZ Proteins: A Crucial Interface in the Jasmonate Signaling Cascade. *Plant Cell* *23*, 3089–3100.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 308–316.
- Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal Modulation of Plant Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *28*, 489–521.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., and Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* *52*, 347–375.
- de Pinto, M.C., Paradiso, A., Leonetti, P., and De Gara, L. (2006). Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *Plant J.* *48*, 784–795.
- de Pinto, M.C., Locato, V., Sgobba, A., Romero-Puertas, M. d. C., Gadaleta, C., Delledonne, M., and De Gara, L. (2013). S-Nitrosylation of Ascorbate Peroxidase Is Part of Programmed Cell Death Signaling in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *PLANT Physiol.* *163*, 1766–1775.
- Plešková, V., Kašparovský, T., Obořil, M., Ptáčková, N., Chaloupková, R., Ladislav, D., Damborský, J., and Lochman, J. (2011). Elicitin–membrane interaction is driven by a positive charge on the protein surface: Role of Lys13 residue in lipids loading and resistance induction. *Plant Physiol. Biochem.* *49*, 321–328.

- Ponchet, M., Panabières, F., Milat, M.-L., Mikes, V., Montillet, J.-L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y., and Blein, J.-P. (1999). Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 56, 1020–1047.
- Przulj, N., Wigle, D.A., and Jurisica, I. (2004). Functional topology in a network of protein interactions. *Bioinformatics* 20, 340–348.
- Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. (1997). Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *PLANT CELL ONLINE* 9, 2077–2091.
- Queval, G., and Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during Arabidopsis rosette development. *Anal. Biochem.* 363, 58–69.
- R Core Team (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing).
- Raghavan, U.N., Albert, R., and Kumara, S. (2007). Near linear time algorithm to detect community structures in large-scale networks. *Phys. Rev. E* 76.
- Rahikainen, M., Alegre, S., Trotta, A., Pascual, J., and Kangasjärvi, S. (2018). Trans-methylation reactions in plants: focus on the activated methyl cycle. *Physiol. Plant.* 162, 162–176.
- Rasul, S., Dubreuil-Maurizi, C., Lamotte, O., Koen, E., Poinssot, B., Alcaraz, G., Wendehenne, D., and Jeandroz, S. (2012). Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana: NO production in response to OGs. *Plant Cell Environ.* 35, 1483–1499.
- Reichardt, J., and Bornholdt, S. (2006). Statistical mechanics of community detection. *Phys. Rev. E* 74.
- Reymond, P., Grunberger, S., Paul, K., Muller, M., and Farmer, E.E. (1995). Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4145–4149.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.-C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernollet, J.-C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi Phytophthora eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183, 555–563.
- Romero-Puertas, M.C., Campostrini, N., Mattè, A., Righetti, P.G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P., and Delledonne, M. (2008). Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis thaliana undergoing hypersensitive response. *PROTEOMICS* 8, 1459–1469.
- Rosnoblet, C., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Lamotte, O., Besson-Bard, A., Jeandroz, S., and Wendehenne, D. (2016). NO Signalling in Plant Immunity. In *Gasotransmitters in Plants*, L. Lamattina, and C. García-Mata, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 219–238.

- Rosnoblet, C., Bègue, H., Blanchard, C., Pichereaux, C., Besson-Bard, A., Aimé, S., and Wendehenne, D. (2017). Functional characterization of the chaperon-like protein Cdc48 in cryptogein-induced immune response in tobacco: Role of Cdc48 in plant immunity. *Plant Cell Environ.* *40*, 491–508.
- Rusterucci, C., Stallaert, V., Milat, M.L., Pugin, A., Ricci, P., and Blein, J.P. (1996). Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitins in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* *111*, 885–891.
- Rustérucci, C., Montillet, J.-L., Agnel, J.-P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.-J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.-P., et al. (1999). Involvement of Lipoxygenase-dependent Production of Fatty Acid Hydroperoxides in the Development of the Hypersensitive Cell Death induced by Cryptogein on Tobacco Leaves. *J. Biol. Chem.* *274*, 36446–36455.
- Sako, K., Yanagawa, Y., Kanai, T., Sato, T., Seki, M., Fujiwara, M., Fukao, Y., and Yamaguchi, J. (2014). Proteomic Analysis of the 26S Proteasome Reveals Its Direct Interaction with Transit Peptides of Plastid Protein Precursors for Their Degradation. *J. Proteome Res.* *13*, 3223–3230.
- Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M.C., Hell, R., and Wirtz, M. (2013). Methionine salvage and *S*-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem. J.* *451*, 145–154.
- Schmidt, G.W., and Delaney, S.K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics* *283*, 233–241.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 4788–4793.
- Siemens, J., Keller, I., Sarx, J., Kunz, S., Schuller, A., Nagel, W., Schmülling, T., Parniske, M., and Ludwig-Müller, J. (2006). Transcriptome Analysis of *Arabidopsis* Clubroots Indicate a Key Role for Cytokinins in Disease Development. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 480–494.
- Simon-Plas, F., Elmayan, T., and Blein, J.-P. (2002). The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J.* *31*, 137–147.
- Singh, A., Lim, G.-H., and Kachroo, P. (2017). Transport of chemical signals in systemic acquired resistance: Transport of signals in SAR. *J. Integr. Plant Biol.* *59*, 336–344.
- Smirnoff, N., and Wheeler, G.L. (2000). Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *35*, 291–314.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., et al. (2003). NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *PLANT CELL ONLINE* *15*, 760–770.
- Spoel, S.H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N.W., Genschik, P., and Dong, X. (2009). Proteasome-Mediated Turnover of the Transcription Coactivator NPR1 Plays Dual Roles in Regulating Plant Immunity. *Cell* *137*, 860–872.

- Spoel, S.H., Tada, Y., and Loake, G.J. (2010). Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. *New Phytol.* *186*, 333–339.
- Stach, L., and Freemont, P.S. (2017). The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochem. J.* *474*, 2953–2976.
- Stadtman, E.R., and Levine, R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* *25*, 207–218.
- Stein, E., Molitor, A., Kogel, K.-H., and Waller, F. (2008). Systemic Resistance in Arabidopsis Conferred by the Mycorrhizal Fungus *Piriformospora indica* Requires Jasmonic Acid Signaling and the Cytoplasmic Function of NPR1. *Plant Cell Physiol.* *49*, 1747–1751.
- Stong, R.A., Kolodny, E., Kelsey, R.G., González-Hernández, M.P., Vivanco, J.M., and Manter, D.K. (2013). Effect of Plant Sterols and Tannins on *Phytophthora ramorum* Growth and Sporulation. *J. Chem. Ecol.* *39*, 733–743.
- Sun, Y., Detchemendy, T.W., Pajerowska-Mukhtar, K.M., and Mukhtar, M.S. (2018). NPR1 in JazzSet with Pathogen Effectors. *Trends Plant Sci.* *23*, 469–472.
- Suty, L., Lequeu, J., Lançon, A., Etienne, P., Petitot, A.-S., and Blein, J.-P. (2003). Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of “plant defense proteasomes.” *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 637–650.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X. (2008). Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* *321*, 952–956.
- Takken, F.L.W., and Tameling, W.I.L. (2009). To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science* *324*, 744–746.
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., and Stacey, G. (2014). Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front. Plant Sci.* *5*.
- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., and Joosten, M.H.A.J. (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *Plant Cell* *23*, 4–15.
- Trapet, P., Kulik, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Bourque, S., Nicolas-Francès, V., Rosnoblet, C., Besson-Bard, A., and Wendehenne, D. (2015). NO signaling in plant immunity: A tale of messengers. *Phytochemistry* *112*, 72–79.
- Trouvelot, S., Varnier, A.-L., Allègre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.-M., Pugin, A., et al. (2008). A β -1,3 Glucan Sulfate Induces Resistance in Grapevine against *Plasmopara viticola* Through Priming of Defense Responses, Including HR-like Cell Death. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *21*, 232–243.
- Tsujimoto, Y., Tomita, Y., Hoshida, Y., Kono, T., Oka, T., Yamamoto, S., Nonomura, N., Okuyama, A., and Aozasa, K. (2004). Elevated Expression of Valosin-Containing Protein (p97) Is Associated with Poor Prognosis of Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 3007–3012.

- Vacca, R.A., Valenti, D., Bobba, A., de Pinto, M.C., Merafina, R.S., De Gara, L., Passarella, S., and Marra, E. (2007). Proteasome function is required for activation of programmed cell death in heat shocked tobacco Bright-Yellow 2 cells. *FEBS Lett.* *581*, 917–922.
- Valerie, M., Catherine, D., Michel, Z., and Hervé, T. (2006). *Plant Proteomics* (New Jersey: Humana Press).
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., and Farmer, E.E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *PLANT CELL ONLINE* *6*, 1191–1192.
- Verma, R., Oania, R., Fang, R., Smith, G.T., and Deshaies, R.J. (2011). Cdc48/p97 Mediates UV-Dependent Turnover of RNA Pol II. *Mol. Cell* *41*, 82–92.
- Vierstra, R. (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* *8*, 135–142.
- Walker, E.L., and Connolly, E.L. (2008). Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 530–535.
- Wang, Y.-Q., Feechan, A., Yun, B.-W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F.-Q., Xie, Z.-S., Pallas, J.A., et al. (2009). S-Nitrosylation of AtSABP3 Antagonizes the Expression of Plant Immunity. *J. Biol. Chem.* *284*, 2131–2137.
- Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., Frey, N.F. dit, and Leung, J. (2008). An Update on Abscisic Acid Signaling in Plants and More *Mol. Plant* *1*, 198–217.
- Waszczak, C., Akter, S., Jacques, S., Huang, J., Messens, J., and Van Breusegem, F. (2015). Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. *J. Exp. Bot.* *66*, 2923–2934.
- Wawer, I., Bucholc, M., Astier, J., Anielska-Mazur, A., Dahan, J., Kulik, A., Wyslouch-Cieszynska, A., Zaręba-Kozioł, M., Krzywinska, E., Dadlez, M., et al. (2010). Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochem. J.* *429*, 73–83.
- Wendehenne, D., Binet, M.-N., Blein, J.-P., Ricci, P., and Pugin, A. (1995). Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett.* *374*, 203–207.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.M., Barbier-Brygoo, H., and Pugin, A. (2002). Nitrate Efflux Is an Essential Component of the Cryptogein Signaling Pathway Leading to Defense Responses and Hypersensitive Cell Death in Tobacco. *PLANT CELL ONLINE* *14*, 1937–1951.
- Wendehenne, D., Gao, Q., Kachroo, A., and Kachroo, P. (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *20*, 127–134.
- Wu, Y., and Zhou, J.-M. (2013). Receptor-Like Kinases in Plant Innate Immunity: RLKs in Plant Innate Immunity. *J. Integr. Plant Biol.* *55*, 1271–1286.

- Xing, S., Wallmeroth, N., Berendzen, K.W., and Grefen, C. (2016). Techniques for the analysis of protein-protein interactions in vivo. *Plant Physiol.* pp.00470.2016.
- Yamamoto, S., Tomita, Y., Hoshida, Y., Iizuka, N., Kidogami, S., Miyata, H., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Yasuda, T., Yano, M., et al. (2004). Expression Level of Valosin-Containing Protein (p97) Is Associated with Prognosis of Esophageal Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5558–5565.
- Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y., and Hisabori, T. (2004). Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* *45*, 18–27.
- Yin, H., Xu, L., and Porter, N.A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.* *111*, 5944–5972.
- Yoshimura, K., Ishikawa, T., Nakamura, Y., Tamoi, M., Takeda, T., Tada, T., Nishimura, K., and Shigeoka, S. (1998). Comparative Study on Recombinant Chloroplastic and Cytosolic Ascorbate Peroxidase Isozymes of Spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* *353*, 55–63.
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S.H., and Loake, G.J. (2014). Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol.* *202*, 1142–1156.
- Yun, B.-W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N.B.B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J.W., Kang, J.-G., Kwon, E., Spoel, S.H., et al. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* *478*, 264–268.
- Zamioudis, C., Hanson, J., and Pieterse, C.M.J. (2014). β -Glucosidase BGLU42 is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* *204*, 368–379.
- Zamioudis, C., Korteland, J., Van Pelt, J.A., van Hamersveld, M., Dombrowski, N., Bai, Y., Hanson, J., Van Verk, M.C., Ling, H.-Q., Schulze-Lefert, P., et al. (2015). Rhizobacterial volatiles and photosynthesis-related signals coordinate MYB72 expression in *Arabidopsis* roots during onset of induced systemic resistance and iron-deficiency responses. *Plant J.* *84*, 309–322.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. (2004). From The Cover: Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 15811–15816.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.* *6*, 520–527.
- Zhang, W.-K., Shen, Y.-G., He, X.-J., Du, B.-X., Xie, Z.-M., Luo, G.-Z., Zhang, J.-S., and Chen, S.-Y. (2005). Characterization of a novel cell cycle-related gene from *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *56*, 807–816.
- Zhou, S.-N., Lu, J.-X., Wang, X.-Q., Shan, M.-R., Miao, Z., Pan, G.-P., Jian, X., Li, P., Ping, S., Pang, X.-Y., et al. (2018). S-Nitrosylation of Prostacyclin Synthase Instigates Nitrate Cross-Tolerance *In Vivo*. *Clin. Pharmacol. Ther.*

Abstract

The chaperone protein CDC48 (Cell division cycle 48) is a major regulator of the quality control of proteins and is involved in various cellular processes in animals and yeast. In contrast, the role of CDC48 in plants is poorly known. In the present work, we investigated the function of CDC48 in plant immunity thanks to the cryptogein/tobacco biological model, cryptogein being produced by the oomycete *phytophthora cryptogea*.

Three strategies were carried out. First, the dynamic of accumulation CDC48 together with intracellular events inherent to the immune response were analyzed in both wild-type and CDC48 overexpressing tobacco cells (CDC48-TAP line). Second, a list of CDC48 partners was established based on immunoprecipitation assays followed by mass spectroscopy analysis. Among those partners the cytosolic form of ascorbate peroxidase (cAPX), a central enzyme of the regulation of the redox status regulation, has been specifically studied. Finally, a computational analysis of the partner list of CDC48 and the subsequent generation of the protein-protein interaction (PPI) network of CDC48 in *Arabidopsis thaliana* were undertaken.

Our data indicated that the activation of the immune response is accompanied by an induction of the accumulation of both CDC48 transcript and protein. In addition, an early and exacerbated cell death was observed in the CDC48-TAP line, suggesting a role for CDC48 in the hypersensitive response. The interaction between CDC48 and cAPX was confirmed by different approaches. Interestingly, the activity of CDC48 and its dynamic of accumulation were strongly impacted in the CDC48 overexpressing line. Accordingly, a dysregulation of the redox status also occurred in this line. Finally, the computational analysis of the CDC48 PPI network highlighted new potential target proteins including proteins involved in the metabolism of S-adenosylmethionine, a substrate molecule of trans-methylation reactions and precursor of ethylene and nicotianamine.

To summarize, this work provides new information about CDC48 in plant biology. It indicates that CDC48 is mobilized by plant cells undergoing an immune response and impacts the redox status through the regulation of the cAPX turnover. New research avenues emerged from our study, notably a putative role of CDC48 in the regulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and in the establishment of hypersensitive response through process which remain to be investigated

Key words: CDC48, cAPX, Plant immunity, Biochemistry, Protein-protein interaction network

Résumé

La protéine chaperonne CDC48 (*Cell division cycle 48*) est un acteur important du contrôle qualité des protéines chez les eucaryotes et est associée à divers processus physio(patho)logiques chez les mammifères. En revanche, son rôle au sein du règne végétal a été peu appréhendé. Ce travail de thèse s'inscrit dans l'étude des fonctions de CDC48 chez les plantes et concerne plus particulièrement son implication dans la réponse immunitaire induite chez le tabac par cryptogéine produite par l'oomycète *phytophthora cryptogea*.

Trois stratégies ont été adoptées. Premièrement, la dynamique d'accumulation de la protéine CDC48 ainsi que les événements intracellulaires sous-jacents à la réponse immunitaire ont été étudiés à la fois dans des cellules de tabac sauvages et des cellules sur-exprimant la protéine CDC48 (lignée CDC48-TAP). Deuxièmement, une liste de protéines interagissant avec CDC48 a été établie suite à des expériences d'immuno-précipitation de CDC48 suivit d'analyses de spectrométrie de masse. Parmi celles-ci, la forme cytosolique de l'ascorbate peroxydase (cAPX), une enzyme impliquée dans la détoxification du H₂O₂ intracellulaire, a fait l'objet d'une étude ciblée. Enfin, ces travaux ont été complétés par une analyse bio-informatique de l'ensemble des partenaires de CDC48 identifiés chez le tabac et d'établissement du réseau d'interaction protéique de CDC48 chez *Arabidopsis thaliana*.

Les principaux résultats obtenus ont montré que l'activation de la réponse immunitaire s'accompagne de l'induction d'une accumulation des transcrits et la protéine CDC48. De plus, une mort cellulaire précoce a été observée chez les cellules CDC48-TAP, suggérant un rôle de cette dernière dans la régulation de la réponse hypersensible. L'interaction physique entre CDC48 et cAPX a été confirmée par différentes approches. De façon intéressante, il s'est avéré que l'activité et la dynamique d'accumulation de cAPX sont fortement impactées par la surexpression de CDC48. En accord avec ses résultats, le statut rédox s'est également révélé altéré dans la lignée surexpresser. Enfin, l'analyse bio-informatique du réseau d'interaction protéique de CDC48 a permis de dégager de nouvelles protéines cibles, en particulier celles impliquées dans le métabolisme de la S-adenosylméthionine, une molécule substrat des réactions de trans-méthylation et précurseur de l'éthylène et de la nicotianamine. De plus, cette analyse a confirmé son rôle dans du système de dégradation Ubiquitine/protéasome.

Pour conclure, ce travail de thèse apporte de nouvelles informations quant au rôle de CDC48 dans la biologie des plantes. Il indique que celle-ci est mobilisée dans les cellules végétales exprimant une réponse immunitaire et impacte le statut rédox *via* la régulation du turnover de cAPX. De nouvelles pistes de recherche ont été dégagées, en particulier un rôle probable de CDC48 dans la régulation de la synthèse de la S-adenosylméthionine et de la réponse hypersensible suivant des mécanismes restant à déterminer.

Mots clés: CDC48, cAPX, Immunité des plantes, Biochimie, Réseau d'interaction protéine-protéine