



HAL
open science

Dynamique intracellulaire des protéines membranaires chez les plantes

Enric Zelazny

► **To cite this version:**

Enric Zelazny. Dynamique intracellulaire des protéines membranaires chez les plantes. *Vegetal Biology*.
Université Paris-Saclay, 2020. tel-04776974

HAL Id: tel-04776974

<https://hal.inrae.fr/tel-04776974v1>

Submitted on 12 Nov 2024

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.

HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Université Paris-Saclay

Spécialité :
Biologie Végétale, Ecologie, Evolution

présentée par

Enric ZELAZNY

Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes
CNRS/SupAgro/INRA/UMR5004, Montpellier

Dynamique intracellulaire des protéines membranaires chez les plantes

Soutenance prévue le **01/07/2020**, devant le jury d'examen :

Doan Trung LUU - Chargé de recherche CNRS, BPMP Montpellier - Rapporteur

Sébastien MONGRAND – Directeur de recherche CNRS, LBM, Bordeaux - Rapporteur

Patrick MOREAU - Directeur de recherche CNRS, LBM, Bordeaux – Membre du jury

Sébastien THOMINE - Directeur de recherche CNRS, I2BC Gif-sur-Yvette – Rapporteur

Samantha VERNHETTES - Directrice de recherche INRA, IJPB Versailles – Membre du jury

Table des matières

I. Curriculum Vitae	1
II. Activité scientifique	6
II.1 Doctorat (2003-2008) : Régulation du trafic des aquaporines de maïs vers la membrane plasmique	6
II.1.1 Contexte	6
II.1.2 L'hétéromérisation entre les aquaporines ZmPIP1 et ZmPIP2 régule leur trafic vers la membrane plasmique dans les cellules de maïs	6
II.1.3 Un motif diacide N-terminal est essentiel à la sortie de ZmPIP2;5 du réticulum endoplasmique et à son trafic vers la membrane plasmique	8
II.2 Premier post-doctorat (2008-2011) : Mécanismes moléculaires régulant le trafic du transporteur de fer IRT1 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
II.2.1 Contexte	9
II.2.2 La dynamique intracellulaire d'IRT1 n'est pas régulée par la disponibilité en fer	10
II.2.3 L'ubiquitination d'IRT1 contrôle son endocytose	11
II.2.4 La localisation subcellulaire d'IRT1 est régulée par ses substrats secondaires	12
II.2.5 La protéine FYVE1 est impliquée dans le maintien de la polarité d'IRT1	13
II.3 Deuxième post-doctorat (2011-2013) : Rôle du complexe rétromère dans le développement d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	14
II.3.1 Contexte	14
II.3.2 Les protéines VPS26, VPS29 et VPS35 agissent ensemble dans les mêmes processus physiologiques	15
II.3.3 VPS35 joue un rôle majeur dans le recrutement du cœur du rétromère au niveau de la membrane des endosomes	15
II.3.4 Le rétromère interagit avec la GTPase RABG3f à la surface des endosomes	16
II.4 Chargé de Recherche CNRS (depuis 2013) : Contrôle de la dynamique intracellulaire d'IRT1 et impact sur le maintien de l'homéostasie des métaux chez <i>Arabidopsis</i>	17
II.4.1 Contexte	17
II.4.2 Objectifs	18
II.4.3 Caractérisation de l'ubiquitination et du trafic d'IRT1 en réponse aux métaux non ferreux	19
II.4.3.1 L'endocytose d'IRT1 en réponse à l'excès de métaux non ferreux est médiée par l'ubiquitination	19
II.4.3.2 L'E3 ubiquitine ligase IDF1 contrôle l'endocytose d'IRT1 médiée par les métaux via une polyubiquitination de type K63	20
II.4.3.3 IRT1 est phosphorylée par la kinase CIPK23 en réponse à l'excès de métaux non ferreux	21
II.4.3.4 Des histines présentes dans la grande boucle cytosolique d'IRT1 sont impliquées dans la perception directe des métaux non ferreux	23
II.4.4 Identification de nouveaux facteurs impliqués dans la dynamique ou l'activité d'IRT1	24
II.4.4.1 Recherche de protéines interagissant avec IRT1	24

<i>II.4.4.2 Contrôle dynamique du complexe d'acquisition du fer composé d'IRT1, FRO2 et AHA2</i>	25
<i>II.4.4.2.1 La protéine IRT1 interagit directement avec FRO2 et AHA2</i>	26
<i>II.4.4.2.2 Régulation différentielle de l'ubiquitination et de l'endocytose des membres du complexe d'acquisition du fer</i>	27
<i>II.4.4.3 Rôle de HIR2 dans le contrôle de la machinerie d'acquisition du fer, impact sur la nutrition en métaux</i>	29
<i>II.4.4.3.1 Importance de HIR2 dans le maintien de l'homéostasie des métaux chez Arabidopsis thaliana</i>	29
<i>II.4.4.3.2 Rôle de HIR2 et des nanodomains membranaires dans la dynamique intracellulaire d'IRT1</i>	30
<i>II.4.4.4 Etude du rôle des flotillines dans l'endocytose d'IRT1 (projet collaboratif)</i>	33
<i>II.4.4.5 Rôle de PDI5 dans la maturation de la protéine IRT1 et impact sur l'homéostasie du fer</i>	34
<i>II.4.4.5.1 Interaction entre IRT1 et PDI5, localisation de la protéine PDI5 dans la racine d'Arabidopsis</i>	34
<i>II.4.4.5.2 Etude du rôle de PDI5 dans l'homéostasie du fer</i>	35
<i>II.4.4.5.3 Rôle de PDI5 dans la formation des ponts disulfures chez IRT1</i>	35
III. Projet de recherche et direction de recherche	37
III.1 Projet de recherche : Protéines HIR et nanodomains membranaires chez Arabidopsis thaliana	37
III.1.1 Contexte	37
III.1.2 Objectifs	38
III.1.3 Projet scientifique	39
<i>III.1.3.1 Axe 1 : Caractérisation de la famille des protéines HIR : dynamique intracellulaire et nouvelles fonctions</i>	39
<i>III.1.3.1.1 Dynamique intracellulaire des protéines HIR</i>	39
<i>III.1.3.1.2 Identification de nouvelles protéines interagissant avec HIR2 en vue de mieux comprendre sa fonction</i>	40
<i>III.1.3.2 Axe 2 : Rôle des HIR dans la dynamique intracellulaire des aquaporines PIP et impact sur le transport de l'eau et de H₂O₂ chez Arabidopsis</i>	42
<i>III.1.3.2.1 Rôle des HIR dans le contrôle de la dynamique de PIP₂;1</i>	42
<i>III.1.3.2.2 Etude de l'impact physiologique de l'interaction HIR-PIP chez Arabidopsis</i>	43
<i>III.1.3.3 Axe 3 : Etude de la formation d'une plateforme putative de signalisation H₂O₂ localisée dans des nanodomains de la membrane plasmique</i>	44
III.2 Direction de la Recherche	45
IV. Bibliographie	47

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Samantha Vernhettes, Doan Luu, Sébastien Mongrand, Patrick Moreau et Sébastien Thomine d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Durant le début de ma carrière j'ai eu la chance de rencontrer des personnes de grandes valeurs scientifique et humaine qui m'ont aidé à construire le chercheur que je suis. Il s'agit de François Chaumont, Thierry Gaude, Grégory Vert, Sébastien Thomine et Christophe Maurel. Merci à vous.

Je souhaite remercier également les doctorants que j'ai supervisés, Amanda et Guillaume, qui ont réalisé un excellent travail.

Je terminerais en disant un grand merci à ma "petite famille", Wassila, Neyla et Elyas et également à mes parents et à Sarah.

I. Curriculum Vitae

Enric ZELAZNY

Date de naissance : 11 avril 1979

Statut : Chargé de Recherche (CRCN) CNRS

Adresse : Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, CNRS/SupAgro/INRA/UMR 5004, 2 Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 2, France

E-mail : enric.zelazny@supagro.fr

Titres Universitaires

- **1999 : Diplôme d'Etudes Universitaires Générales de Sciences de la Vie.**
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- **2000 : Licence de Biologie Cellulaire et de Physiologie.**
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- **2001 : Maîtrise de Biologie Cellulaire et de Physiologie.**
Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France.
- **2002 : Master 2 Expression Génique et Protéines Recombinantes.**
Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- **2008 : Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique : Régulation du trafic des aquaporines de maïs vers la membrane plasmique.**
Laboratoire de Biochimie Physiologique, Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, Belgique. Directeur de thèse : Pr. François Chaumont.

Parcours depuis la thèse

- **Janvier 2008 - mars 2011 : Post-doctorat : Mécanismes moléculaires régulant le trafic et l'activité du transporteur de fer IRT1 chez Arabidopsis.**
Equipe Transport et Signalisation Fer dirigée par le Dr. Catherine Curie, Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier, France. Superviseur : Dr. Grégory Vert.
- **Mai 2011 - juin 2013 : Post-doctorat : Rôle du complexe rétromère dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*.**
Equipe Signalisation Cellulaire et Endocytose dirigée par le Dr. Thierry Gaude, Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, ENS de Lyon, France. Superviseur : Dr. Thierry Gaude.
- **Octobre 2013 – août 2018 : Chargé de Recherche CNRS**
Equipe Signalisation Cellulaire et Ubiquitination chez les Plantes dirigée par le Dr. Grégory Vert, Département de Biologie Cellulaire, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France.
- **Septembre 2018 – décembre 2019 : Chargé de Recherche CNRS**
Equipe Approches Intégratives du Transport des Ions dirigée par le Dr. Sébastien Thomine, Département de Biologie Cellulaire, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France.
- **Depuis janvier 2020 : Chargé de Recherche CNRS**
Equipe eau, signalisation et architecture hydraulique (AQUA) dirigée par le Dr. Christophe Maurel, Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier, France.

Publications et chapitre de livre

• Articles dans des revues internationales avec comité de lecture

(Les noms des doctorants et stagiaires encadrés/co-encadrés sont soulignés)

1. Hachez C., **Zelazny E.**, Chaumont F. (2006) Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1142-1156.
2. Hachez C., Moshelion M., **Zelazny E.**, Cavez D., Chaumont F. (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Mol Biol.* 62, 305-323.
3. **Zelazny E.**, Borst J.W., Muylaert M., Batoko H., Hemminga M.A., Chaumont F. (2007). FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12359-12364.
4. **Zelazny E.**, Miecielica U., Borst J.W., Hemminga M.A., Chaumont F. (2009). An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant J.* 57, 346-355.
5. Vert G., Barberon M., **Zelazny E.**, Séguéla M., Briat J-F., Curie C. (2009). Arabidopsis IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells. *Planta* 229, 1171-1179.
6. Barberon M.*, **Zelazny E.***, Robert S., Conéjéro G., Curie C., Friml J., Vert G. (2011). Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, E450-E458. * These authors contributed equally to this work.
7. **Zelazny E.***, Barberon M.*, Curie C., Vert G. (2011). Ubiquitination of transporters at the forefront of plant nutrition. *Plant Signal Behav* 6, 1597-1599. * These authors contributed equally to this work.
8. **Zelazny E.**, Santambrogio M. and Gaude T. (2013). Retromer association with membranes: plants have their own rules! *Plant Signal Behav* 8:9, e25312.
9. **Zelazny E.***, Santambrogio M.*, Pourcher M., Chambrier P., Dedieu-Berne A., Fobis-Loisy I., Miège C., Jaillais Y. and Gaude T. (2013). VPS35 interacts with the Rab7 homolog RABG3f and is essential for membrane recruitment of the core retromer in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 288, 8815-8825. * These authors contributed equally to this work.
10. Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, **Zelazny E**, Vert G (2014) Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 8293-8298.
11. **Zelazny E**, Vert G (2014) Plant nutrition: root transporters on the move. *Plant Physiol* 166: 500-508.
12. Dubeaux G, **Zelazny E***, and Vert G* (2015) Getting to the root of plant iron uptake and cell-cell transport: Polarity matters! *Communicative & Integrative Biology* 8:3, e1038441. *Corresponding authors.
13. **Zelazny E***, Vert G* (2015) Regulation of iron uptake by IRT1: endocytosis pulls the trigger. *Mol Plant* 8, 977-979. *Corresponding authors.

14. Junkova P, Danek M, Kocourkova D, Brouzdova J, Kroumanova K, **Zelazny E**, Janda M, Hynek R, Martinec J, Valentova O (2018) Mapping of Plasma Membrane Proteins Interacting With *Arabidopsis thaliana* Flotillin 2. *Front Plant Sci* 9: 991.

15. Dubeaux G, Neveu J, **Zelazny E**, Vert G (2018) Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol Cell* 69: 953-964 e955.

• Chapitre de livre

1. **Zelazny E.***, Ivanov R.* and Gaude T. (2012). The Plant SNX Family and Its Role in Endocytosis. *Endocytosis in Plants*, J. Šamaj (ed.), 233-247. DOI: 10.1007/978-3-642-32463-5_12. * These authors contributed equally to this work.

Conférences

Communications orales

- **Zelazny E.**, Borst J.W., Hemminga M.A. and Chaumont F. (2005). Maize plasma membrane aquaporins interact to regulate their trafficking and activity. The International Conference on Aquaporins, Genval, Belgium.
- **Zelazny E.**, Curie C. and Vert G. (2009). Endocytosis of the root iron uptake machinery in plants: From pathways to mechanisms. The European Network for Plant Endomembrane Research (ENPER) Meeting, Montpellier, France.
- **Zelazny E.**, Thierry O. and Vert G. (2015). Role of a SPFH domain-containing protein and plasma membrane microdomains in the control of iron acquisition machinery in plants. The European Network for Plant Endomembrane Research (ENPER) Meeting, Leeds, UK.

Communications par affiches

- **Zelazny E.**, Fetter K., Van Wilder V., Hachez C., Moshelion M. and Chaumont F. (2004). Plasma membrane aquaporin interactions modulate their water channel activity. The International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France.
- **Zelazny E.**, Borst J.W., Hemminga M.A. and Chaumont F. (2006). Maize plasma membrane aquaporins interact to regulate their trafficking and activity. The Society for Experimental Biology Meeting, Canterbury, UK.
- **Zelazny E.**, Muylaert M., Borst J.W., Hemminga M.A. and Chaumont F. (2007). Aquaporin trafficking to the plasma membrane in maize cells. The International Workshop on Plant Membrane Biology. Valencia, Spain.
- **Zelazny E.**, Barberon M., Conenégéro G., Robert S., Curie C., Friml J. and Vert G. (2010). Mechanisms driving the *Arabidopsis* IRT1 root iron transporter turnover. RUBICON Workshop: Role of various type of ubiquitin chains in membrane trafficking. Paris, France.
- **Zelazny E.**, Barberon M., Conégéro G., Robert S., Curie C., Friml J. and Vert G. (2010). Mechanisms driving the *Arabidopsis* IRT1 root iron transporter turnover. The American Society of Plant Biologists (ASPB) Meeting. Montréal, Canada.
- **Zelazny E.**, Schnabel J., Santambrogio M., Pourcher M., Ivanov R., Fobis-Loisy I., Gaude T. (2011). Role of the retromer in development and self-incompatibility in the *Brassicaceae*. Meeting “Des molécules aux écosystèmes” organized by “Agence Nationale de la Recherche” (ANR). Montpellier, France.

Enseignement

- 2016-2019 : Participation au module Mécanismes de Signalisation chez les Plantes, Master 2 Sciences du Végétal, Université Paris Saclay, AgroParisTech. Quatre heures d'enseignement par an.

Encadrement

Thèses :

- Co-encadrement de la thèse de Guillaume Dubeaux (ED145, Université Paris Saclay) d'octobre 2013 à décembre 2016. Mécanismes moléculaires contrôlant l'ubiquitination et l'endocytose du transporteur de fer IRT1 d'*Arabidopsis thaliana*. Equipe Signalisation Cellulaire et Ubiquitination, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France. Taux d'encadrement : 50%. Directeur de thèse : Grégory Vert.
- Encadrement de la thèse d'Amanda Martin-Barranco (ED567, Université Paris Saclay, financement SPS) de novembre 2015 à juin 2019. Rôle de la protéine HIR2 et des microdomaines de la membrane plasmique dans le contrôle de la machinerie d'acquisition du fer chez les plantes. Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France. Taux d'encadrement : 100%. Directeur de thèse : Enric Zelazny.

Stages :

- Encadrement d'Urszula Miecielica, stagiaire de Master 1 en Microbiologie (Université de Wroclaw, Pologne), de février à juin 2004. Projet : Interactions entre aquaporines de la membrane plasmique de maïs. Laboratoire de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, Belgique. Taux d'encadrement : 50%.
- Encadrement de Mélanie Muylaert, étudiante ingénieure (Université Catholique de Louvain), lors de son stage de fin d'étude de septembre 2004 à septembre 2005. Projet : Etude fonctionnelle d'aquaporines de la membrane plasmique chez le maïs. Laboratoire de Biochimie Physiologique, Université Catholique de Louvain, Belgique. Taux d'encadrement : 50%.
- Encadrement de Laurianne Pancarte lors de son stage de Master 1 (Université Montpellier II), de mars à juillet 2009. Projet : Etude du trafic de FRO2, une réductase impliquée dans l'absorption du fer chez *Arabidopsis thaliana*. Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Montpellier, France. Taux d'encadrement : 50%.
- Encadrement d'Ophélie Thierry lors de son stage de Master 2 Biologie et Santé, spécialité Sciences du Végétal, Université Paris Sud, de janvier à juin 2015. Projet : Mécanismes contrôlant la dynamique du transporteur de fer IRT1 chez *Arabidopsis thaliana*. Equipe Signalisation Cellulaire et Ubiquitination, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France. Taux d'encadrement : 100%.
- Encadrement de Riadh Takouachet lors de son stage de Master 2 Science et Technologie, mention biologie moléculaire et cellulaire, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris, de janvier à juin 2018. Projet : Rôle de la protéine PDI5 dans le contrôle de l'activité du transporteur de fer IRT1 et impact sur l'homéostasie du fer chez la plante. Equipe Signalisation Cellulaire et Ubiquitination, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Gif-sur-Yvette, France. Taux d'encadrement : 100%.

Autre :

- Encadrement de Michal Danek (doctorant) lors de deux séjours au laboratoire (juin 2017 et octobre 2018) dans le cadre d'un projet collaboratif PHC Barrande (France-République

Tchèque). Rôle des microdomaines de la membrane plasmique et des flotillines dans le contrôle de la dynamique du transporteur de fer IRT1 d'Arabidopsis.

Financements

- Financement ANR JCJC du projet de recherche NUTRIR (253 k€). Protéines HIR des microdomaines membranaires : contrôle de la machinerie d'acquisition du fer et nouvelles fonctions chez Arabidopsis. Durée du projet : 36 mois dont 24 mois de Post-Doctorat. Début du projet scientifique : mars 2019. Coordinateur : Enric Zelazny.
- Financement PHC Barrande, ministère des affaires étrangères et du développement international (2.5k€ / an). Projet collaboratif France - République Tchèque, éditions 2017 et 2018 (n° 38143QD). Coordinateurs : Enric Zelazny et Jan Martinec.
- Financement du projet de thèse HIRON (145k€), appel à projet Recherche 2015, Laboratoire d'Excellence Sciences des Plantes de Saclay (SPS). Durée du financement : de novembre 2015 à février 2019. Coordinateur : Enric Zelazny.
- Financement « Attractivité » 2015 (8k€), Université Paris Sud. Coordinateur : Enric Zelazny.

Collaborations scientifiques

- Depuis juin 2016 : collaboration avec le Professeur Jan Martinec, Institut de Botanique Expérimentale (IEB), Académie Tchèque des Sciences, Prague, République Tchèque. Intitulé du projet : Rôle des microdomaines de la membrane plasmique et des flotillines chez les plantes.

Activités liées à la recherche

Jury de thèse :

- Membre du jury de thèse d'Adrien Chevalier (novembre 2014). Intitulé de la thèse : "Protein motifs required for maize aquaporin trafficking to the plasma membrane". Institut des Sciences de la Vie, Université Catholique de Louvain, Belgique.

Evaluation d'articles scientifiques :

- "Reviewer" occasionnel pour des journaux scientifiques tels que Molecular Plant et Plant Journal.

II. Activité scientifique

II.1 Doctorat (2003-2008) : Régulation du trafic des aquaporines de maïs vers la membrane plasmique

II.1.1 Contexte

Depuis le début de ma carrière, je m'intéresse aux mécanismes qui régulent le trafic intracellulaire des protéines chez les plantes. Lors de mon doctorat, réalisé dans l'équipe de François Chaumont de l'Université Catholique de Louvain en Belgique, j'ai utilisé le maïs comme plante modèle afin d'étudier le trafic de canaux à eau appelés aquaporines vers la membrane plasmique. En facilitant le mouvement de l'eau à travers les membranes cellulaires, les aquaporines jouent un rôle essentiel dans la croissance et le développement des plantes. Les structures tridimensionnelles de diverses aquaporines de plantes ou d'animaux montrent que ces protéines forment des tétramères, chaque monomère étant un canal à eau indépendant (Murata et al., 2000; Tornroth-Horsefield et al., 2006). Chez le maïs (*Zea mays*), on dénombre 34 aquaporines incluant 13 Plasma membrane Intrinsic Proteins (PIP) réparties en deux groupes, ZmPIP1 (ZmPIP1;1-ZmPIP1;6) et ZmPIP2 (ZmPIP2;1-ZmPIP2;7), qui présentent des activités de canal à eau différentes (Chaumont et al., 2001). En effet, lorsqu'elles sont exprimées en ovocytes de xénope, les ZmPIP1 sont inactives alors que les ZmPIP2 induisent une augmentation importante du coefficient de perméabilité osmotique à l'eau de la membrane (P_f) (Chaumont et al., 2000). Avant le début de ma thèse, il avait été démontré dans l'équipe que la co-expression des ZmPIP1 et ZmPIP2 en ovocytes de xénope induisait un effet synergique qui se traduisait par une augmentation du P_f en comparaison d'ovocytes exprimant uniquement les aquaporines ZmPIP2 (Fetter et al., 2004). En outre, une interaction entre les protéines ZmPIP1 et ZmPIP2 avait été démontrée, suggérant un mécanisme de régulation de ces aquaporines par hétéromérisation. Ces données ayant été obtenues dans un système hétérologue, les ovocytes de xénope, il apparaissait essentiel d'étudier en détail ce processus de régulation des ZmPIP dans les cellules de maïs, ce à quoi je me suis consacré durant ma thèse.

II.1.2 L'hétéromérisation entre les aquaporines ZmPIP1 et ZmPIP2 régule leur trafic vers la membrane plasmique dans les cellules de maïs

Afin de déterminer la localisation subcellulaire des protéines ZmPIP1 et ZmPIP2, différentes isoformes ZmPIP ont été fusionnées à des versions monomériques de la "Cyan Fluorescent Protein" (mCFP) ou de la "Yellow Fluorescent Protein" (mYFP) et exprimées de manière transitoire dans des protoplastes de mésophylle de maïs. Il est important de mentionner que les protéines de fusions mCFP/mYFP-ZmPIP sont fonctionnelles. Nous avons montré que lorsqu'elles sont exprimées seules dans des cellules de maïs, les ZmPIP1 sont retenues dans le réticulum endoplasmique (RE) au contraire des ZmPIP2 qui sont efficacement adressées à la membrane plasmique (Figure 1) (Zelazny et al., 2007). De façon intéressante, lorsqu'elles sont co-exprimées avec les ZmPIP2, les protéines ZmPIP1 sont relocalisées à la membrane plasmique (Figure 1). Cependant, lorsque deux isoformes du groupe ZmPIP1 sont co-exprimées, comme par exemple ZmPIP1;1 et ZmPIP1;2, les deux protéines sont retenues dans le RE, soulignant le fait que les ZmPIP2 sont spécifiquement requises pour l'acheminement des ZmPIP1 vers la membrane plasmique.

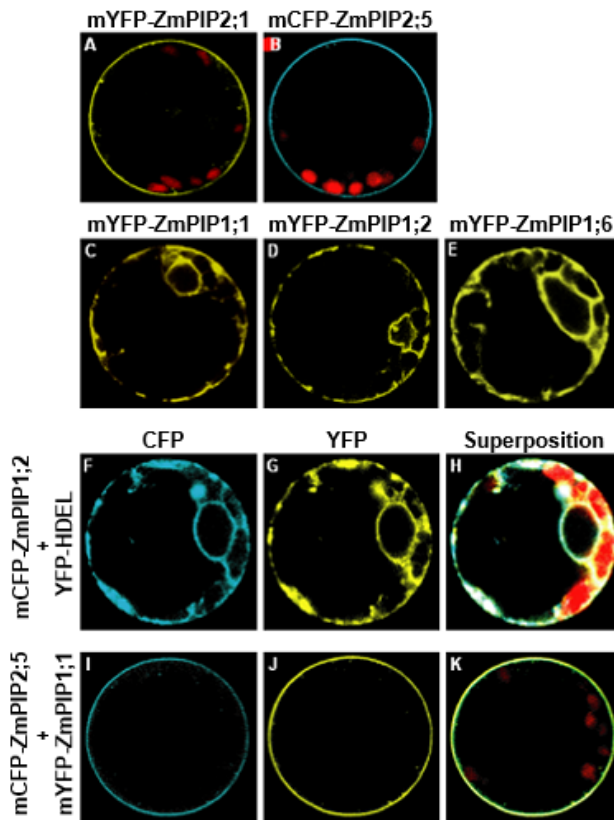


Figure 1 : Les protéines ZmPIP2 induisent la relocalisation des ZmPIP1 du RE vers la membrane plasmique dans les protoplastes de maïs. Analyse par microscopie confocale de protoplastes de mésophylle de maïs exprimant mYFP-ZmPIP2;1 (A), mCFP-ZmPIP2;5 (B), mYFP-ZmPIP1;1 (C), mYFP-ZmPIP1;2 (D), mYFP-ZmPIP1;6 (E). (F-H) Co-expression de mCFP-ZmPIP1;2 avec le marqueur de RE YFP-HDEL. (I-K) Co-expression de mCFP-ZmPIP2;5 et mYFP-ZmPIP1;1. Le canal CFP (à gauche), le canal YFP (au milieu) et la superposition des deux canaux (à droite) sont indiqués. Les structures rouges correspondent aux chloroplastes autofluorescents. Le diamètre des protoplastes est compris entre 25 et 35 μm .

La relocalisation des ZmPIP1 vers la membrane plasmique en présence des ZmPIP2 suggérerait l'existence d'interactions physiques entre les aquaporines de ces deux groupes. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des tests d'interactions basés sur la technique de "Förster Resonance Energy Transfert" (FRET). Le FRET est un processus au cours duquel l'énergie d'une molécule fluorescente excitée, le donneur, est transférée par un mécanisme non radiatif vers un chromophore accepteur, lorsque les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur se chevauchent et quand les deux molécules sont à proximité l'une de l'autre ($< 10 \text{ nm}$), donc a fortiori lorsqu'elles interagissent. Le FRET se manifeste notamment par une diminution du temps de vie de la fluorescence du donneur (τ), qui correspond au temps moyen pendant lequel la molécule reste dans un état excité, et qui peut être mesurée par la technique de "Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy" (FLIM) (Gadella et al., 1999). La technique de FRET-FLIM présente le grand avantage de révéler des interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes avec une grande résolution temporelle et spatiale (Rusznova et al., 2004; Bucherl et al., 2013). Durant ma thèse, j'ai réalisé des analyses de FRET-FLIM sur des protoplastes de maïs dans le laboratoire de J.W. Borst et M.A. Hemminga (Université de Wageningen, Pays-Bas) en utilisant comme donneur et accepteur des protéines de fusion mCFP et mYFP, respectivement. En présence de ROP6-YFP, une GTPase localisée dans la membrane plasmique et utilisée ici comme contrôle négatif d'interaction, le τ mesuré pour mCFP-ZmPIP2;1 est identique à celui observé pour mCFP-ZmPIP2;1 exprimée seule (Figure 2). Ceci montre que ZmPIP2;1 et ROP6 n'interagissent pas. En revanche, une forte diminution du τ a été mesurée pour différentes protéines mCFP-ZmPIP2 en présence de diverses isoformes ZmPIP1 (Figure 2), prouvant que les ZmPIP2 et ZmPIP1 interagissent physiquement au niveau de la membrane plasmique des protoplastes de maïs (Zelazny et al., 2007). D'autre part, les interactions entre protéines ZmPIP1 et ZmPIP2 endogènes ont été confirmées par des co-immunopurifications (co-IP) réalisées sur des extraits protéiques de racines ou de lignées cellulaires de maïs en utilisant des anticorps spécifiques. Ces approches de co-IP ont été réalisées par Mélanie Muylaert que j'ai

supervisée durant son stage d'ingénierie et qui a ensuite réalisé un doctorat sous la direction de François Chaumont. En conclusion, nos travaux ont montré que dans les cellules de maïs, l'hétéromérisation entre les ZmPIP2 et les ZmPIP1 était nécessaire au trafic de ces dernières vers la membrane plasmique et que ce mécanisme constituait un moyen pour la cellule végétale de moduler la perméabilité à l'eau de la membrane plasmique. Différentes combinaisons d'hétéromères ZmPIP1-ZmPIP2 dans des types cellulaires spécifiques ou en réponse à certains signaux environnementaux pourraient permettre d'augmenter considérablement la diversité de l'activité des aquaporines dans la membrane plasmique. Suite à la publication de nos travaux, l'hétéromérisation entre protéines PIP1 et PIP2 a été décrite chez un grand nombre d'espèces végétales (Laloux et al., 2018).

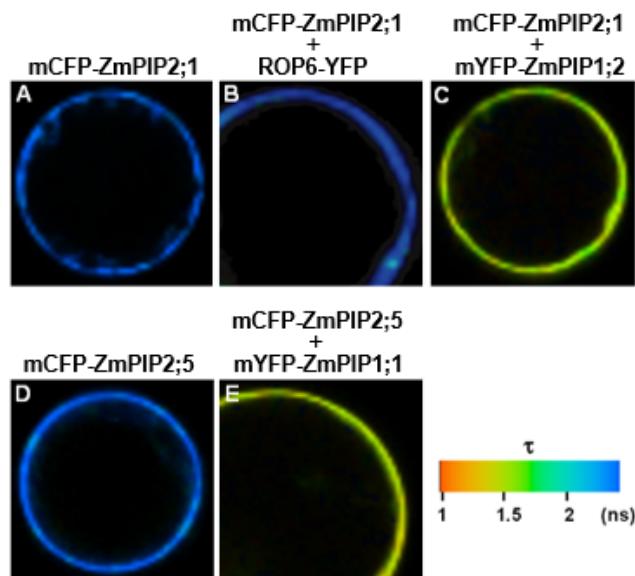


Figure 2 : Les protéines ZmPIP1 et ZmPIP2 interagissent physiquement dans les protoplastes de maïs. Des analyses de FRET-FLIM ont été réalisées sur des protoplastes de maïs exprimant différentes combinaisons de protéines de fusion ZmPIP fluorescentes. mCFP-ZmPIP2;1 seule (A) ou co-exprimée avec ROP6-YFP (B) (contrôle négatif) ou mYFP-ZmPIP1;2 (C). La YFP fusionnée à ROP6, une GTPase localisée à la membrane plasmique, a été utilisée comme contrôle négatif d'interaction avec les ZmPIP. mCFP-ZmPIP2;5 seule (D) ou co-exprimée avec mYFP-ZmPIP1;1 (E). Le temps de vie de la fluorescence du donneur τ est indiqué par un code couleur allant du rouge pour les valeurs de τ proches de 1 ns au bleu pour les valeurs de τ supérieures à 2 ns.

II.1.3 Un motif diacide N-terminal est essentiel à la sortie de ZmPIP2;5 du réticulum endoplasmique et à son trafic vers la membrane plasmique

La localisation subcellulaire des aquaporines de la membrane plasmique de maïs est régulée de manière différentielle selon l'isoforme concernée et implique probablement des signaux spécifiques présents dans la séquence primaire. Afin d'identifier ces signaux, les protéines ZmPIP2;5 et ZmPIP1;2 ont été utilisées comme modèles. Nous avons concentré nos recherches sur les régions N- et C- terminales cytosoliques qui jouent souvent un rôle important dans l'adressage des aquaporines (van Balkom et al., 2004; Rai et al., 2006) et qui sont les régions les plus divergentes entre les groupes de protéines ZmPIP1 et ZmPIP2. Urszula Miecielica, que j'ai encadrée durant son stage de Master 1 et qui a ensuite réalisé une thèse sous la direction de François Chaumont, a participé à la réalisation de ce projet. Des protéines ZmPIP tronquées et mutées, ainsi que des protéines chimériques créées en échangeant des domaines de ZmPIP2;5 et ZmPIP1;2, ont été fusionnées à la mYFP ou à la mCFP et exprimées dans des protoplastes de maïs. L'analyse par microscopie confocale a révélé que la suppression du domaine cytosolique N-terminal complet de ZmPIP2;5 entraînait une rétention intracellulaire de la protéine. En réalisant des délétions de plus en plus courtes de la partie N-terminale de ZmPIP2.5, nous avons montré qu'un motif diacide DIE (Asp4-Ile5-Glu6), absent des ZmPIP1, était nécessaire au trafic de ZmPIP2.5 vers la membrane plasmique (Zelazny et al., 2009). Les motifs diacide (D/E)_x(D/E), avec x correspondant à n'importe quel acide aminé, sont très bien conservés évolutivement (Nishimura and Balch, 1997; Hanton et al., 2005; Zuzarte et al., 2007) et sont

impliqués dans la sortie des protéines membranaires du RE via une reconnaissance par la sous-unité Sec24 du complexe coat protein complex II (COPII) (Sieben et al., 2008). Nous avons montré que le remplacement de l'aspartate et du glutamate du motif DIE par des alanines (AIA) induisait une rétention de ZmPIP2.5 dans le RE (Figure 3). Nous avons également démontré que la fonction de ce signal dans la sortie du RE était conservée chez d'autres isoformes ZmPIP2 (Zelazny et al., 2009). De façon intéressante, le remplacement de la région N-terminale cytosolique de ZmPIP1;2 par la région correspondante de ZmPIP2;5, contenant le motif DIE, n'induit pas d'adressage de la protéine à la membrane plasmique. La présence d'un signal diacide à l'extrémité N-terminale de cette protéine chimérique n'apparaît donc pas suffisante pour compenser des signaux de rétention présents dans ZmPIP1;2 qui n'ont toujours pas été identifiés. Il est intéressant de mentionner que la fonction des motifs diacide dans l'export depuis le RE d'aquaporines du groupe PIP2 est conservée chez *Arabidopsis thaliana* (Sorieul et al., 2011).

En conclusion, mes travaux ont montré que l'adressage à la surface cellulaire des aquaporines ZmPIP de maïs est régulé différemment selon les isoformes et implique des signaux spécifiques et/ou la formation d'hétéromères.

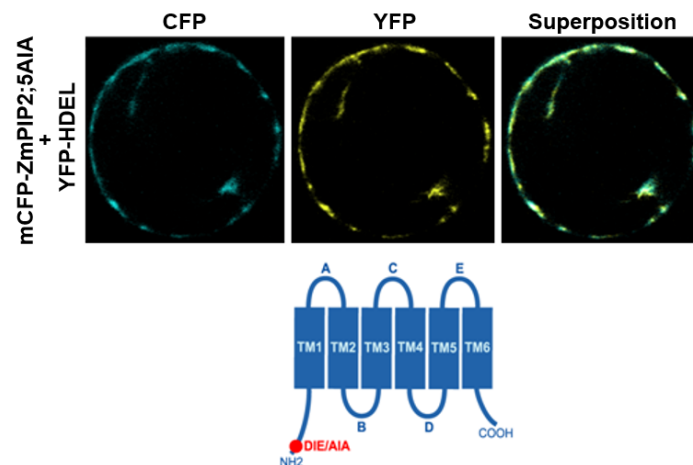


Figure 3 : Le motif diacide N-terminal DIE est nécessaire à l'export de ZmPIP2;5 depuis le RE. Analyse par microscopie confocale de protoplastes de maïs co-exprimant la protéine mYFP-ZmPIP2;5AIA, dans laquelle les deux résidus acides du motif DIE de ZmPIP2;5 ont été mutés en alanines, avec le marqueur de RE YFP-HDEL. Le canal CFP (à gauche), le canal YFP (au milieu) et la superposition des deux canaux (à droite) sont indiqués. Le diamètre des protoplastes est compris entre 25 et 35 μm . Un schéma de la protéine ZmPIP2;5AIA est présenté, par souci de clarté, la mYFP fusionnée en position N-terminal n'est pas représentée. TM1 à TM6 correspondent aux six domaines transmembranaires et les cinq boucles sont notées A à E.

II.2 Premier post-doctorat (2008-2011) : Mécanismes moléculaires régulant le trafic du transporteur de fer IRT1 chez *Arabidopsis thaliana*

II.2.1 Contexte

Après avoir étudié le trafic des aquaporines de maïs le long de la voie sécrétoire, j'ai décidé d'explorer d'autres aspects de la dynamique intracellulaire des protéines en me concentrant sur les mécanismes d'endocytose et le rôle de l'ubiquitination. J'ai alors rejoint l'équipe de Jean-François Briat (ensuite dirigée par Catherine Curie) du Laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes de Montpellier afin de travailler sous la direction de Gregory Vert sur un projet visant à étudier le trafic et le contrôle post-traductionnel du transporteur de fer racinaire IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) chez

Arabidopsis thaliana. Au cours de mon post-doctorat, j'ai collaboré avec Marie Barberon qui réalisait alors un doctorat sous la direction de Grégory Vert.

Le fer est un élément essentiel à la croissance et au développement de la plante en intervenant notamment dans les réactions de transfert d'électrons lors de la photosynthèse et de la respiration. Bien qu'essentiel, le fer est également toxique lorsqu'il est présent en trop grande quantité car il induit alors des stress oxydatifs. De ce fait, l'homéostasie du fer dans la plante doit être strictement régulée. Chez *Arabidopsis thaliana*, l'absorption du fer au niveau des cellules de l'épiderme de la racine nécessite trois étapes successives impliquant des protéines membranaires. Le fer est tout d'abord solubilisé via l'extrusion de protons par la protéine *Arabidopsis H⁺-ATPase 2 (AHA2)*, les ions Fe^{3+} ainsi solubilisés sont ensuite réduits en ions Fe^{2+} par la réductase *Ferric Reduction Oxydase 2 (FRO2)* et finalement transportés à l'intérieur de la cellule par le transporteur *IRT1* (Robinson et al., 1999; Vert et al., 2002; Santi and Schmidt, 2009). *IRT1* constitue un acteur majeur de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*, comme l'atteste la forte chlorose et la létalité du mutant perte de fonction *irt1-1* (Vert et al., 2002). Le gène *IRT1* est régulé de façon transcriptionnelle par le fer, une carence en fer induisant une forte accumulation du transcrit *IRT1* dans la racine (Vert et al., 2002). Il est important de mentionner qu'*IRT1* ne transporte pas uniquement du fer mais également d'autres métaux tels que le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le cobalt (Co) qui constituent les substrats secondaires d'*IRT1* (Rogers et al., 2000; Vert et al., 2002). Avant le début de mon post-doctorat, des travaux suggéraient que des concentrations élevées en fer induisaient une diminution de la stabilité de la protéine *IRT1*, bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation putative demeuraient obscurs. (Connolly et al., 2002).

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle au cours de laquelle une ubiquitine (Ub), un polypeptide de 76 acides aminés, est généralement attachée sur une lysine d'une protéine substrat (MacGurn et al., 2012). Les protéines cibles peuvent être modifiées par une seule ubiquitine sur une lysine (monoubiquitination) ou plusieurs lysines (multi-monoubiquitination). Alternativement, étant donné que l'ubiquitine comporte elle-même plusieurs lysines, les molécules d'ubiquitine peuvent être liées entre elles pour former des chaînes Ub (polyubiquitination) (Lauwers et al., 2010). Des études menées majoritairement chez les animaux et la levure ont montré que l'ubiquitination, sous la forme de monoUb ou de polyUb de type K63, survient à différentes étapes de l'endocytose pour contrôler l'internalisation des protéines depuis la membrane plasmique ainsi que leur tri au niveau des corps multivésiculaires (MVB) avant qu'elles ne soient adressées à la vacuole ou au lysosome pour être dégradées (Lauwers et al., 2010). La liaison de l'ubiquitine sur une protéine cible est un processus qui fait intervenir successivement une enzyme E1 activant l'Ub, une enzyme E2 conjuguant l'Ub et enfin une E3 ubiquitine ligase qui catalyse le transfert de l'Ub depuis l'enzyme E2 vers le substrat (Dupre et al., 2004). En 2008, bien que l'endocytose des protéines médiée par l'ubiquitination était déjà bien décrite chez les animaux et la levure, chez les plantes, seul le transporteur d'auxine *PIN2* avait été montré comme étant ubiquitiné (Abas et al., 2006) et le rôle de l'ubiquitination dans la dynamique intracellulaire des protéines membranaires demeurait inconnu.

II.2.2 La dynamique intracellulaire d'IRT1 n'est pas régulée par la disponibilité en fer

Afin d'étudier la localisation subcellulaire d'*IRT1*, nous avons réalisé des immunolocalisations sur des cellules de l'épiderme de la racine d'*Arabidopsis* carencées en fer, en utilisant un anticorps anti-*IRT1* spécifique. Cette technique, combinée à des approches de co-localisation avec des marqueurs de compartiments subcellulaires et des traitements

pharmacologiques interférant avec différentes étapes de l'endocytose, nous a permis de montrer que la protéine IRT1 était localisée au niveau des endosomes précoces et qu'elle effectuait un cycle entre ce compartiment et la membrane plasmique pour permettre l'absorption des métaux (Barberon et al., 2011). En outre, nous avons mis en évidence qu'IRT1 était adressée à la vacuole pour être dégradée. Afin de découvrir comment le trafic d'IRT1 était contrôlé, nous avons réexaminé l'effet putatif du fer sur la stabilité de la protéine IRT1 (Connolly et al., 2002). De façon surprenante, des immunoblots réalisés sur des extraits protéiques de lignées transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant de manière constitutive *IRT1* dans le mutant *irt1-1* ont mis en évidence que la protéine IRT1 s'accumulait indépendamment de la quantité en fer disponible. De plus, des immunolocalisations ont montré que la localisation d'IRT1 exprimée de façon constitutive dans les cellules de l'épiderme de la racine n'était pas affectée par la nutrition en fer. Nous avons également déterminé que la demi-vie d'IRT1 endogène était inchangée quel que soit le statut en fer (Barberon et al., 2011). Ces résultats ont clairement montré que, contrairement à ce qui avait été proposé préalablement, la stabilité de la protéine IRT1 n'était pas régulée par le fer. La déstabilisation fer-dépendante d'IRT1 proposée auparavant (Connolly et al., 2002) était basée sur l'analyse de lignées transgéniques exprimant constitutivement une version tronquée d'IRT1, ne comportant pas un peptide signal putatif à l'extrémité N-terminale, dans des plantes sauvages exprimant déjà IRT1 endogène. Une telle forme tronquée d'IRT1 est certainement mal repliée et instable dans la cellule. L'absence d'accumulation de la protéine IRT1 dans ces plantes transgéniques en condition de suffisance en fer, interprétée initialement comme une preuve de la régulation post-transcriptionnelle d'IRT1 par le fer, reflète donc plutôt le profil d'expression de la protéine IRT1 endogène.

II.2.3 L'ubiquitination d'IRT1 contrôle son endocytose

Nous avons ensuite cherché à savoir si, premièrement, IRT1 était ubiquitinée *in vivo* et si, deuxièmement, l'ubiquitination contrôlait la dynamique intracellulaire d'IRT1. Après avoir immunopurifié la protéine IRT1 avec l'anticorps anti-IRT1, des immunodétections réalisées sur les fractions immunopurifiées avec un anticorps anti-Ub (P4D1), qui reconnaît la monoUb et la polyUb, ont mis en évidence un signal de haut poids moléculaire typique des protéines membranaires ubiquitinées, alors qu'aucun signal n'a été observé pour le témoin négatif correspondant au mutant *irt1-1* (Figure 4A). Ce résultat montre qu'IRT1 est ubiquitinée dans la racine d'*Arabidopsis* (Barberon et al., 2011). Aucun signal d'ubiquitination n'ayant été obtenu pour IRT1 en utilisant un anticorps spécifique des chaînes polyUb (FK1) et plusieurs formes ubiquitinées d'IRT1 ayant été détectées avec l'anticorps P4D1, nous avons proposé qu'IRT1 était multi-monoubiquitinée. Les lysines K154 et K179, localisées dans la grande boucle cytosolique d'IRT1, ont été identifiées par mutagenèse dirigée comme étant des cibles de l'ubiquitination. En effet, chez la forme mutée IRT1_{K154RK179R}, une très forte diminution du niveau d'ubiquitination est observée. Contrairement à IRT1 non mutée qui est localisée dans les endosomes précoces, la protéine IRT1_{K154RK179R} s'accumule à la membrane plasmique, montrant ainsi l'importance de l'ubiquitination dans l'endocytose d'IRT1 (Figure 4B) (Barberon et al., 2011). Nos travaux ont montré pour la première fois chez les plantes le rôle de l'ubiquitination dans l'endocytose d'une protéine membranaire et ainsi établi IRT1 comme un nouveau modèle d'étude des mécanismes d'ubiquitination. De façon intéressante, les plantes exprimant la protéine IRT1_{K154RK179R} sont très affectées par l'absorption massive de métaux substrats secondaires d'IRT1 (Zn, Mn, Co), ce qui induit des stress oxydatifs. Ceci met en évidence l'importance de l'endocytose d'IRT1 médiée par l'ubiquitination dans le maintien de l'homéostasie des métaux chez *Arabidopsis thaliana*.

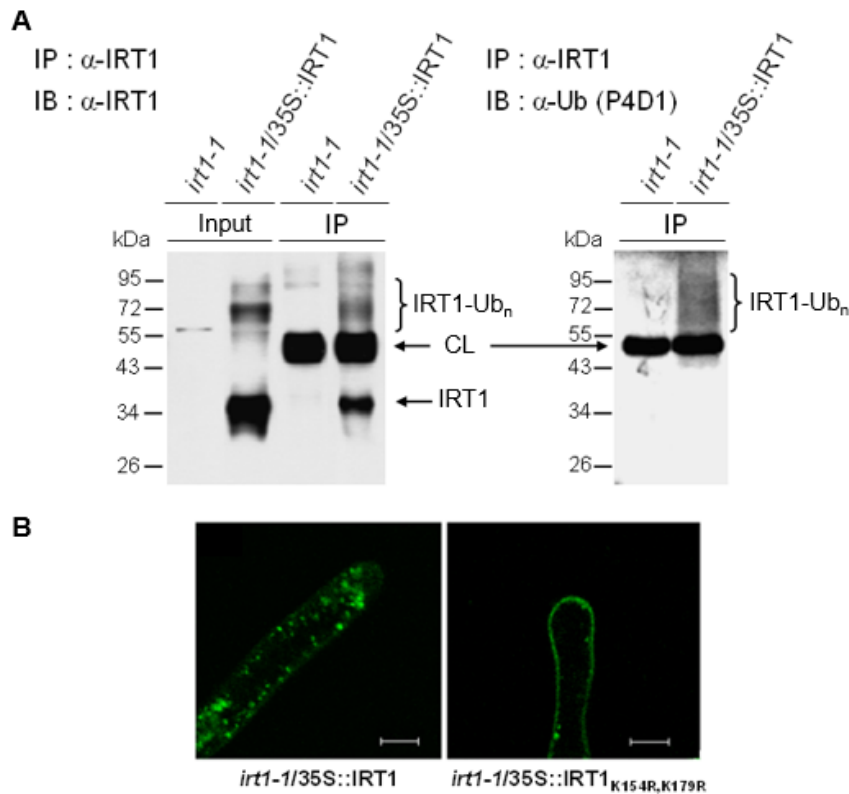


Figure 4 : L'ubiquitination d'IRT1 contrôle son endocytose. (A) IRT1 est ubiquitinée *in vivo*. Des immunopurifications (IP) ont été réalisées en utilisant un anticorps anti-IRT1 sur des extraits de protéines de racines (input) issus de plantes *irt1-1* (contrôle négatif) et *irt1-1/35S::IRT1*, suivies d'immunoblots (IB) anti-IRT1 (gauche) et anti-ubiquitine P4D1 (droite). La chaîne lourde des anticorps anti-IRT1 (CL) présente dans les fractions IP ainsi que les formes ubiquitinées d'IRT1 (IRT1-Ub_n), sont indiquées. (B) L'ubiquitination de deux lysines contrôle la localisation d'IRT1. Des immunolocalisations d'IRT1 et de la forme mutée IRT1_{K154R,K179R}, dans laquelle les lysines 154 et 179 ont été mutées en arginines, ont été réalisées dans les poils absorbants de racine de plantes *irt1-1/35S::IRT1* (gauche) et *irt1-1/35S::IRT1_{K154R,K179R}* (droite), respectivement. Barre d'échelle = 10 μ m.

II.2.4 La localisation subcellulaire d'IRT1 est régulée par ses substrats secondaires

Comme indiqué précédemment, la localisation et la stabilité d'IRT1 ne sont pas régulées par son substrat principal, le fer. A la fin de mon post-doctorat, nous nous sommes intéressés au rôle des substrats secondaires d'IRT1, que sont le Zn, le Mn et le Co (appelés par la suite métaux non ferreux), dans la dynamique intracellulaire d'IRT1. Ces travaux ont été ensuite poursuivis par Marie Barberon, finalisés après mon recrutement au CNRS dans l'équipe de Grégory Vert et finalement publiés en 2014 (Barberon et al., 2014). Nous avons montré en réalisant des immunolocalisations sur des cellules épidermiques de la racine que le trafic d'IRT1 était régulé par les métaux non ferreux. En effet, lorsque le Zn, le Mn et le Co sont absents du milieu de culture, la protéine IRT1 est relocalisée des endosomes précoces vers le domaine externe de la membrane plasmique, faisant face au sol (Figure 5). De façon intéressante, la protéine non ubiquitinable IRT1_{K154RK179R} est localisée à la membrane plasmique de façon polaire en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux (Figure 5), suggérant que l'ubiquitination joue un rôle dans l'endocytose d'IRT1 dépendante des métaux. Le contrôle de la localisation subcellulaire d'IRT1 par ses substrats secondaires constitue certainement un mécanisme de protection pour la plante qui permet de limiter l'absorption de métaux facilement disponibles et toxiques tels que le Zn, le Mn et le Co par rapport au fer dont la réduction préalable par FRO2 est limitante pour son absorption (Zelazny et al., 2011). Ces résultats ont été le point

de départ d'une étude plus approfondie du rôle des métaux non ferreux et de l'ubiquitination dans la dynamique intracellulaire d'IRT1 que j'ai conduite avec Grégory Vert après mon recrutement au CNRS (voir ci-dessous).

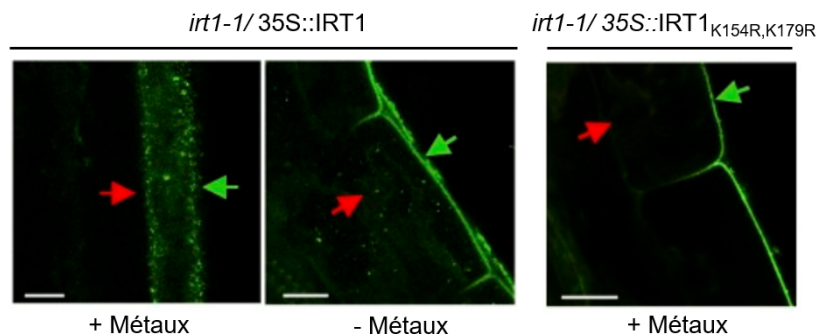


Figure 5 : La localisation subcellulaire d'IRT1 est régulée par les métaux non ferreux (Zn, Mn, Co). Immunolocalisation de la protéine IRT1 dans les racines des lignées transgéniques *irt1-1/35S::IRT1* et *irt1-1/35S::IRT1_{K154R,K179R}* cultivées sur un milieu MS/2 contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux Zn, Mn, Co (+ Métaux) ou sur un milieu MS/2 ne contenant pas de Zn, Mn et Co (-Métaux). Les flèches rouge et verte indiquent les domaines interne et externe de la membrane plasmique, respectivement. Barre d'échelle = 10 μ m.

II.2.5 La protéine FYVE1 est impliquée dans le maintien de la polarité d'IRT1

Un crible double hybride réalisé avec la grande boucle cytosolique d'IRT1 a permis d'isoler la protéine FYVE1. L'interaction entre cette dernière et IRT1 a ensuite été confirmée par co-IP (Barberon et al., 2014). Nous avons montré que FYVE1 se liait aux phosphatidylinositol-3-phosphates (PI3P) et était recrutée au niveau des endosomes tardifs/MVB dans les cellules d'*Arabidopsis*. De façon intéressante, FYVE1 contrôle la localisation et la polarité d'IRT1 dans les cellules de l'épiderme de la racine. En effet, la surexpression de FYVE1 induit l'accumulation d'IRT1 à la membrane plasmique de manière non polaire en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux, alors que dans ces conditions de culture IRT1 est normalement localisée dans les endosomes précoces (Figure 6). Cette localisation apolaire d'IRT1 dans les lignées surexprimant FYVE1 conduit à des défauts d'homéostasie des métaux, suggérant que la polarisation d'IRT1 est essentielle pour le transport radial des substrats métalliques vers le système vasculaire (Barberon et al., 2014). Quelques mois après la publication de nos travaux, (Gao et al., 2014) ont montré que la même protéine FYVE1, sous le nom de FYVE DOMAIN PROTEIN REQUIRED FOR ENDOSOMAL SORTING 1 (FREE1), pouvait interagir directement avec l'ubiquitine et faisait partie de la sous-unité I du complexe endosomal sorting complex for transport (ESCRT). Le complexe ESCRT est impliqué dans la capture des protéines cargo ubiquitinées et permet leur tri dans les vésicules intraluminales des MVB avant leur adressage vers la vacuole. Jusqu'à présent, le fait que la surexpression de FYVE1 induise une relocalisation d'IRT1 à la membrane plasmique plutôt qu'un adressage accru vers la vacuole demeure obscur et devra être précisé dans le futur.

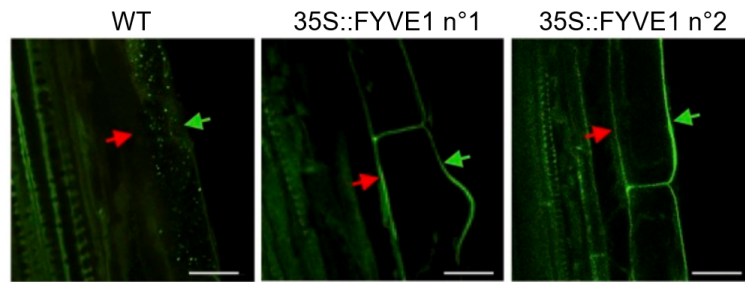


Figure 6 : La localisation d'IRT1 est perturbée lorsque la protéine FYVE1 est surexprimée. Immunolocalisation de la protéine IRT1 dans les racines de plantes sauvages (WT) et de deux lignées transgéniques 35S::FYVE1 cultivées sur un milieu MS/2 dépourvu de fer et contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux (Zn, Mn, Co). Les flèches rouge et verte indiquent les domaines interne et externe de la membrane plasmique, respectivement. Barre d'échelle = 10 µm.

II.3 Deuxième post-doctorat (2011-2013) : Rôle du complexe rétromère dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*

II.3.1 Contexte

Au cours d'un second post-doctorat effectué dans l'équipe de Thierry Gaude au Laboratoire de Reproduction et de Développement des Plantes de Lyon, j'ai poursuivi mon étude des mécanismes d'endocytose chez les plantes en m'intéressant au rôle du rétromère dans le développement d'*Arabidopsis thaliana*. Le rétromère est un complexe multiprotéique qui est impliqué dans le trafic intracellulaire de certaines protéines appelées cargos (Attar and Cullen, 2010). Chez les mammifères, le rétromère est composé de deux sous-complexes : le cœur du rétromère constitué des protéines Vacuolar Protein Sorting (VPS) 26, VPS29, VPS35 et un dimère de protéines Sorting Nexin (SNX). Ces différentes composantes peuvent être cytosoliques ou associées à la membrane des endosomes où le rétromère est alors fonctionnel. Chez les mammifères et la levure, les protéines SNX ont la capacité de se lier aux membranes des endosomes et de recruter par la suite le cœur du rétromère (Rojas et al., 2007). En outre, des travaux ont suggéré que la sous-unité VPS26 était importante pour le recrutement du cœur du rétromère aux membranes (Gokool et al., 2007). De plus, il a été démontré que deux GTPases, Rab5 et Rab7, agissaient séquentiellement pour contrôler le recrutement du complexe rétromère humain à la surface des endosomes (Rojas et al., 2008; Seaman et al., 2009). Chez *Arabidopsis thaliana*, toutes les composantes du rétromère sont conservées. Il existe deux isoformes VPS26 (VPS26a et VPS26b), une protéine VPS29, trois isoformes VPS35 (VPS35a, VPS35b et VPS35c) et trois protéines SNX (SNX1, SNX2a et SNX2b). L'analyse de mutants d'*Arabidopsis* a mis en évidence le rôle de VPS29 dans le maintien de l'homéostasie des endosomes, le trafic de protéines et le recyclage du transporteur d'auxine PIN1 (Shimada et al., 2006; Jaillais et al., 2007). Des phénotypes similaires ont été observés chez divers mutants *vps35*, suggérant que les isoformes VPS35 étaient impliquées dans les mêmes processus biologiques que VPS29 (Yamazaki et al., 2008). Lorsque j'ai commencé mon post-doctorat, aucun mutant perte de fonction *vps26* n'avait été décrit. De façon intéressante, le rétromère de plante présente des caractéristiques uniques car, contrairement aux mammifères, les protéines SNX ne sont pas nécessaires pour la liaison du cœur du rétromère aux membranes ainsi que pour sa fonction (Pourcher et al., 2010). L'un des objectifs de mon projet était d'étudier comment les composantes du cœur du rétromère étaient recrutées au niveau de la membrane des endosomes et s'associaient physiquement pour former un complexe fonctionnel.

II.3.2 Les protéines VPS26, VPS29 et VPS35 agissent ensemble dans les mêmes processus physiologiques

Lorsque que j'ai débuté mon post-doctorat, le rôle des différentes sous-unités VPS dans l'assemblage et la fonction du cœur du rétromère chez *Arabidopsis thaliana* demeurait méconnu. Dans un premier temps, nous avons analysé la fonction de la sous-unité VPS26, jusqu'alors non décrite, via la caractérisation de mutants perte de fonction. Alors que les simples mutants *vps26a* et *vps26b* se comportent comme des plantes sauvages, suggérant une redondance fonctionnelle de ces deux gènes, le double mutant *vps26a vps26b* présente de graves défauts de croissance et de développement (Figure 7) similaires à ceux décrits préalablement pour le mutant *vps29* (Jaillais et al., 2007). Ainsi, *vps26a vps26b* présente des cotylédons ayant une forme et un positionnement anormaux, des défauts de croissance de la racine primaire et d'initiation des racines latérales ainsi qu'un nanisme à l'âge adulte (Zelazny et al., 2013). Nous avons également démontré que chez le double mutant *vps26a vps26b* la maturation des protéines de réserve de la graine était altérée (Zelazny et al., 2013), de façon similaire à ce qui avait été observé pour le mutant *vps29* ou le double mutant *vps35a vps35c* (Shimada et al., 2006; Yamazaki et al., 2008). L'ensemble de ces résultats montre que la perte de fonction concomitante de *VPS26a* et *VPS26b* récapitule les phénotypes des mutants *vps29* et *vps35* décrits préalablement et, par conséquent, indique que VPS26, VPS29 et VPS35 fonctionnent ensemble en médiant les mêmes processus physiologiques.

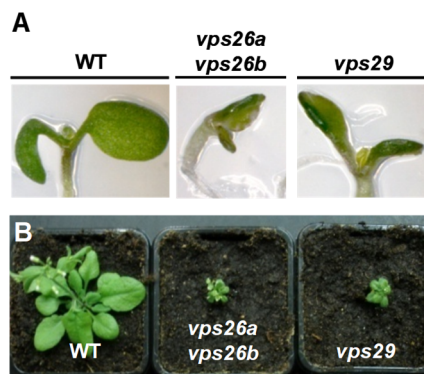


Figure 7 : Le double mutant *vps26a vps26b* et le mutant *vps29* d'*Arabidopsis thaliana* présentent des défauts de développement et de croissance similaires. (A) Phénotypes des cotylédons de mutants *vps29*, *vps26a vps26b* et de plantules sauvage (WT) âgés de 7 jours. (B) Phénotypes de plantes adultes *vps29*, *vps26a vps26b* et sauvage (WT).

II.3.3 VPS35 joue un rôle majeur dans le recrutement du cœur du rétromère au niveau de la membrane des endosomes

Afin d'étudier l'assemblage du cœur du rétromère chez les plantes, nous avons utilisé la technique de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC) et montré que l'interaction entre VPS26 et VPS35 ne se produisait, à la fois dans le cytosol et à la surface des endosomes, que lorsque la troisième sous-unité, VPS29, était présente. Ceci suggère que les trois sous-unités VPS sont requises simultanément pour assurer la stabilité et l'assemblage du cœur du rétromère dans les cellules végétales (Zelazny et al., 2013). Ces observations ont été confortées par des immunoblots montrant qu'en absence de VPS29 (mutant *vps29*) ou de VPS26 (double mutant *vps26a vps26b*), l'accumulation de l'isoforme VPS35a diminuait très fortement ou que VPS35a était complètement absente, respectivement. A l'opposé, la déplétion complète des trois protéines SNX n'affecte pas l'abondance de VPS35a, indiquant que chez *Arabidopsis*, les deux sous-complexes SNX et VPS se comportent comme des unités biosynthétiquement indépendantes. En vue d'étudier le rôle des différentes sous-unités VPS dans l'association du cœur du rétromère avec la membrane des endosomes, nous avons réalisé des analyses de fractionnement cellulaire et déterminé la distribution cytosolique ou membranaire (microsomes) des protéines VPS29 et VPS35a endogènes dans plusieurs mutants

vps. Chez le mutant perte de fonction *vps29*, la proportion de protéine VPS35a présente dans les microsomes est similaire à celle observée chez des plantes sauvages, bien que, comme attendu, la quantité totale de VPS35a soit fortement diminuée. Des analyses de microscopie ont en outre révélé que la protéine de fusion fonctionnelle VPS35a-GFP conservait sa capacité à être recrutée au niveau des endosomes dans *vps29*. Ainsi, VPS29 n'est pas requise pour l'association de VPS35a aux membranes des endosomes (Zelazny et al., 2013). Nous n'avons malheureusement pas pu déterminer un rôle éventuel de VPS26 dans le recrutement au niveau des membranes de VPS35a, étant donné que cette dernière n'est plus détectée dans le double mutant *vps26a vps26b*. De façon intéressante, bien que la protéine VPS29 s'accumule normalement en absence de VPS26, les fractionnements cellulaires ont révélé que VPS29 était totalement soluble dans le double mutant *vps26a vps26b*. Bien que nous ne puissions pas exclure un rôle de VPS26 dans le recrutement membranaire de VPS29, étant donné que la sous-unité VPS35 semble jouer un rôle primordial dans l'association du cœur du rétromère aux membranes, comme indiqué ci-après, il est probable que l'absence de protéine VPS35 dans le contexte du double mutant *vps26a vps26b* soit responsable du relargage de VPS29 dans le cytosol.

Chez la levure et les mammifères, l'inhibition de l'interaction entre VPS35 et VPS26 conduit au relargage de VPS35 dans le cytosol, indiquant que VPS26 est impliquée dans le recrutement membranaire de VPS35 (Gokool et al., 2007). Afin de tester si chez *Arabidopsis thaliana*, VPS26 joue un rôle similaire, nous avons comparé la localisation subcellulaire de VPS35a-GFP exprimée de façon transitoire chez le tabac avec celle de formes mutantes de VPS35a qui n'interagissent plus avec VPS26. Nos analyses ont montré que les formes mutées de VPS35a présentaient la même localisation que VPS35a sauvage en étant à la fois localisées dans le cytosol ou associées aux membranes des endosomes. Ces résultats ont été confirmés par des analyses de fractionnement cellulaire montrant que la distribution des protéines de fusion VPS35a demeurerait inchangée quand des mutations empêchant leur interaction avec VPS26 étaient introduites. Dans une approche similaire, nous avons montré que des formes mutées de VPS35a qui ne sont plus capables d'interagir avec VPS29 conservent leur capacité à s'associer aux endosomes. Ces données indiquent que la protéine VPS35a d'*Arabidopsis* peut se lier à la membrane des endosomes indépendamment des autres sous-unités du rétromère.

II.3.4 Le rétromère interagit avec la GTPase RABG3f à la surface des endosomes

Chez les mammifères, la GTPase Rab7, dans sa forme liée au GTP, interagit avec VPS35 et joue un rôle majeur dans le recrutement du cœur du rétromère au niveau de la membrane des endosomes (Seaman et al., 2009). Afin d'étudier si certains homologues de Rab7 d'*Arabidopsis thaliana*, qui sont au nombre de six (RABG3a – RABG3f), pouvaient jouer un rôle similaire, nous avons analysé l'interaction éventuelle entre VPS35 et RABG3f qui présente le plus fort taux d'identité avec Rab7 humaine. Un test double hybride a révélé une interaction physique directe entre VPS35 et RABG3f dans la levure. Cette interaction a été confirmée *in planta* en montrant que la protéine VPS35a endogène est co-immunopurifiée avec la protéine de fusion YFP-RABGf à partir d'extraits protéiques microsomaux issus de lignées transgéniques d'*Arabidopsis*. De façon intéressante, aucune interaction entre ces deux protéines n'est détectée lorsque la même approche est réalisée à partir de fractions protéiques cytosoliques. Ainsi, l'interaction entre VPS35a et RABG3f n'a lieu que dans la fraction membranaire dans laquelle RABG3f est sous sa forme active, liée au GTP. Ces résultats suggèrent que RABG3f participe au recrutement du cœur du rétromère à la membrane des endosomes via une interaction avec la sous-unité VPS35 (Zelazny et al., 2013).

En conclusion, nous avons proposé un modèle (Figure 8) dans lequel l'assemblage du cœur du rétromère a lieu dans le cytosol, VPS35 interagissant directement avec les sous-unités VPS26 et VPS29. Le complexe VPS est ensuite recruté à la surface des endosomes via une interaction entre VPS35 et la GTPase RABG3f activée, ceci indépendamment de l'activité des protéines SNX. Nos travaux ont également mis en avant que bien que certains aspects de l'assemblage et du fonctionnement du rétromère de plante soient conservés de façon évolutive, les plantes ont également développé des mécanismes spécifiques de régulation de ce complexe (Zelazny et al., 2013).

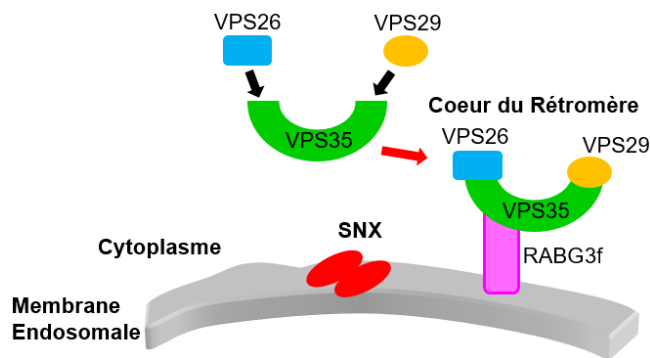


Figure 8 : Modèle d'assemblage du cœur du rétromère à la surface des endosomes chez les plantes.

II.4 Chargé de Recherche CNRS (depuis 2013) : Contrôle de la dynamique intracellulaire d'IRT1 et impact sur le maintien de l'homéostasie des métaux chez *Arabidopsis*

II.4.1 Contexte

En octobre 2013, j'ai été recruté en tant que Chargé de Recherche au CNRS dans l'équipe dirigée par Grégory Vert à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC) de Gif-sur-Yvette. J'ai alors poursuivi l'étude des mécanismes contrôlant la dynamique intracellulaire et l'activité du transporteur de fer IRT1 ainsi que leur impact sur le maintien de l'homéostasie des métaux chez *Arabidopsis thaliana*. Suite au départ de Grégory Vert pour Toulouse en août 2018, j'ai rejoint l'équipe dirigée par Sébastien Thomine à l'I2BC, afin de poursuivre mon projet de recherche sur IRT1. Le contrôle de la dynamique d'IRT1 dans la cellule fait intervenir des mécanismes multiples, dont l'ubiquitination ne représente probablement qu'un des aspects. Ainsi, les travaux que nous avons menés ces dernières années suggèrent que les nanodomains de la membrane plasmique joueraient un rôle important dans le trafic et/ou l'activité d'IRT1, comme détaillé ci-après. Ces observations ont constitué le point de départ me permettant de faire émerger une nouvelle thématique de recherche visant à mieux comprendre le rôle des nanodomains membranaires chez les plantes via l'étude d'une famille de protéines appelées Hypersensitive Induced Reaction proteins (HIR). Ce projet est détaillé dans la section III.

Tout d'abord, je voudrais introduire quelques notions concernant les nanodomains membranaires chez les plantes et les protéines HIR. La membrane plasmique est une structure hétérogène qui contient notamment des nanodomains qui sont spécifiquement enrichis en stérols, sphingolipides et qui contiennent un ensemble de protéines spécifiques. Chez les plantes, la taille de ces domaines est de l'ordre de 10 à 100 nm jusqu'au micromètre. Il a été démontré qu'une multitude de nanodomains membranaires très distincts coexistaient à la surface des cellules végétales (Jarsch et al., 2014). De façon intéressante, la composition protéique de ces domaines peut être modifiée par des stimuli biologiques (Keinath et al., 2010). Bien que la fonction des nanodomains de la membrane plasmique reste largement méconnue

chez les plantes, un rôle de plateforme de signalisation/régulation a été proposé (Simon-Plas et al., 2011; Demir et al., 2013; Wang et al., 2015). Il est intéressant de noter que la spécificité d'un mécanisme de signalisation pourrait être expliquée par la séparation spatiale de récepteurs dans différents nanodomains de la membrane plasmique, comme cela a été récemment suggéré pour le récepteur immunitaire Flagellin Sensing 2 (FLS2) et le récepteur de brassinostéroïde Brassinosteroid Insensitive 1 (BRI1) qui sont impliqués dans des processus biologiques différents bien qu'utilisant des composantes de signalisation communes en aval (Bucherl et al., 2017). D'un point de vue physiologique, les nanodomains membranaires de plantes ont été décrits jusqu'à présent comme jouant des rôles importants dans la réponse aux pathogènes, la symbiose et sont également sûrement importants pour la signalisation hormonale (Raffaele et al., 2009; Qi et al., 2011; Wang et al., 2015; Liang et al., 2018).

Les protéines à domaine "stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C" (SPFH) constituent un groupe de protéines résidentes des nanodomains membranaires. Chez les mammifères, ces protéines sont impliquées dans différents mécanismes tels que la régulation des canaux ioniques, les connexions entre membrane et cytosquelette ou le trafic de vésicules et de protéines (Browman et al., 2007). Certaines protéines à domaine SPFH sont conservées de façon évolutive telles les flotillines (Flot) qui sont situées dans des nanodomains spécifiques et qui définissent une voie d'endocytose indépendante de la clathrine chez les animaux et les plantes (Li et al., 2012; Danek et al., 2016). Chez *Arabidopsis*, cette voie d'endocytose dépendante des nanodomains membranaires implique la protéine Flot1 et intervient dans l'internalisation depuis la membrane plasmique de l'aquaporine PIP2;1 (Li et al., 2012). De façon intéressante, un stress salin stimule l'endocytose de PIP2;1 médiée par les nanodomains/microdomaines membranaires alors qu'en condition standard PIP2;1 est principalement endocytée de manière dépendante de la clathrine (Li et al., 2011). Les plantes possèdent un groupe spécifique de quatre protéines à domaine SPFH appelées HIR (HIR1 à HIR4). Jusqu'à présent, la fonction physiologique des HIR reste méconnue bien que l'on sache qu'elles sont importantes pour la défense des plantes contre les pathogènes (Zhou et al., 2010; Qi et al., 2011). En effet, l'isoforme HIR2 peut interagir avec le récepteur immunitaire RPS2 et différents mutants perte de fonction *hir* sont plus sensibles que le génotype sauvage à l'infection par *Pseudomonas syringae* (Qi et al., 2011). Cependant, la fonction de l'interaction HIR2-RPS2 ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent inconnus.

II.4.2 Objectifs

- Comme décrit précédemment dans ce document, le trafic intracellulaire du transporteur IRT1 n'est pas régulé par son substrat principal, le fer, mais par des substrats secondaires (Zn, Mn, Co) potentiellement beaucoup plus toxiques pour la cellule que le fer lorsqu'ils sont présents en excès. Le premier objectif de mon projet de recherche était de caractériser le rôle des métaux non ferreux dans l'endocytose d'IRT1 et également d'analyser comment la nutrition métallique influence l'ubiquitination d'IRT1 ainsi que son impact sur la physiologie de la plante. Nous avons également cherché à découvrir quels mécanismes moléculaires intervenaient en amont des étapes d'ubiquitination d'IRT1.

- Lorsque j'ai été recruté au CNRS, seules quelques protéines avaient été démontrées comme régulant le trafic ou la stabilité du transporteur IRT1, comme par exemple l'E3 ubiquitine ligase IRT1-Degradation Factor 1 (IDF1) impliquée dans l'ubiquitination d'IRT1 (Shin et al., 2013) ou encore la protéine FYVE1 étudiée par notre équipe (Barberon et al., 2014). Le deuxième objectif de mon projet était donc de découvrir de nouveaux acteurs impliqués dans la régulation du trafic ou de l'activité d'IRT1 et d'examiner leur impact sur l'homéostasie des métaux chez la plante. Pour cela j'ai recherché des protéines interagissant avec IRT1 via des

co-IP d'IRT1 couplées à des analyses de spectrométrie de masse, puis nous avons étudié l'importance de ces interactions.

II.4.3 Caractérisation de l'ubiquitination et du trafic d'IRT1 en réponse aux métaux non ferreux

L'étude du rôle des métaux non ferreux (Zn, Mn, Co) dans l'endocytose d'IRT1 a été l'objet d'une thèse réalisée par Guillaume Dubeaux d'octobre 2013 à décembre 2016 et dont j'ai été le co-encadrant. Ce travail a conduit à la publication d'un article dans lequel je suis co-auteur et intitulé "Metal sensing by the IRT1 transporter-receptor orchestrates its own degradation and plant metal nutrition" (Dubeaux et al., 2018).

II.4.3.1 L'endocytose d'IRT1 en réponse à l'excès de métaux non ferreux est médiée par l'ubiquitination

Suite à mon recrutement dans l'équipe de Grégory Vert, nous avons poursuivi la caractérisation du rôle des métaux non ferreux dans le trafic d'IRT1. Pour cela, nous disposions alors d'une fusion fonctionnelle d'IRT1, IRT1-mCitrine, dont l'expression sous le contrôle du promoteur *IRT1* permettait de compléter le défaut de développement et la chlorose du mutant perte de fonction *irt1-1*. En absence de fer, afin d'activer le promoteur *IRT1*, et en absence de métaux non ferreux, IRT1-mCitrine est uniquement localisée à la membrane plasmique dans les cellules de l'épiderme de la pointe racinaire de façon polaire (Figure 9), confirmant ainsi les données obtenues précédemment par immunolocalisation (Barberon et al., 2014). En absence de fer et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux, IRT1-mCitrine est présente dans des endosomes précoces, comme déterminé ultérieurement par des analyses de co-localisation, mais est également partiellement localisée à la membrane plasmique (Figure 9). Cette localisation à la membrane plasmique n'avait pas été observée précédemment dans les mêmes conditions de culture par immunolocalisation et pourrait s'expliquer par des milieux de cultures dont la composition en métaux varie légèrement ou par la zone de la racine observée (zone différenciée / pointe racinaire). De façon intéressante, en absence de fer et en présence d'un excès de métaux non ferreux (10 fois la concentration physiologique), la protéine IRT1-mCitrine est uniquement présente dans des endosomes (Figure 9), identifiés par la suite comme étant des MVB, révélant ainsi un nouvel aspect du rôle des métaux dans la dynamique d'IRT1. De plus, lorsque l'activité lytique de la vacuole est bloquée, des plantes exprimant IRT1-mCitrine cultivées en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux présentent une fluorescence vacuolaire faible alors qu'en présence d'un excès de métaux une très forte fluorescence dans la vacuole est observée, traduisant une dégradation accrue d'IRT1-mCitrine. Ces observations ont été confirmées par des approches d'immunoblots (Dubeaux et al., 2018).

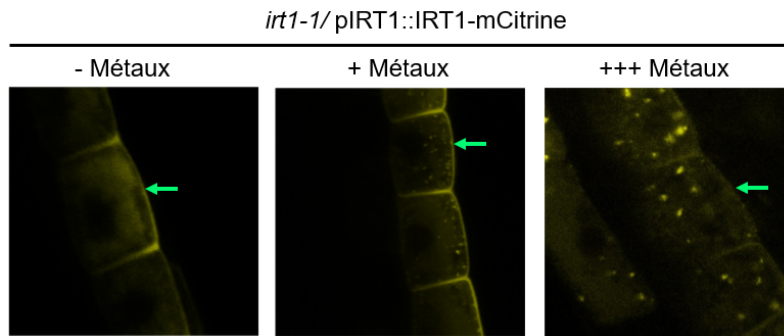


Figure 9 : IRT1 est endocytée en réponse à un excès de métaux non ferreux. Analyse confocale de la localisation de la protéine IRT1-mCitrine dans les cellules de l'épiderme de la pointe racinaire de la lignée transgénique *irt1-1/pIRT1::IRT1-mCitrine* cultivée sur un milieu MS/2 sans fer contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux (Zn, Mn, Co) (+ Métaux), un excès de métaux non ferreux (+++ Métaux) ou ne contenant pas de métaux non ferreux (- Métaux). La flèche verte indique le domaine externe de la membrane plasmique.

Afin de déterminer si l'endocytose d'IRT1 dépendante des métaux non ferreux impliquait des mécanismes d'ubiquitination, nous avons analysé le niveau d'ubiquitination d'IRT1 en fonction de la disponibilité en métaux. Pour cela, la protéine IRT1-mCitrine a été immunopurifiée à partir d'extraits protéiques de racines de plantes soumises ou non à un excès de métaux non ferreux, puis les formes ubiquitinées d'IRT1-mCitrine ont été détectées dans les fractions immunopurifiées avec l'anticorps anti-Ub générique P4D1 (Figure 10). Nous avons ainsi observé qu'un excès de métaux non ferreux induisait une augmentation de l'ubiquitination d'IRT1 (Dubeaux et al., 2018). En outre, nous avons montré que la forme mutée non ubiquitinable IRT1_{K154,179R} fusionnée à la mCitrine n'était pas internalisée depuis la membrane plasmique en réponse à un excès de métaux non ferreux, montrant ainsi que l'ubiquitination des résidus K154 et K179 est essentielle au contrôle de la dynamique d'IRT1 par les métaux.

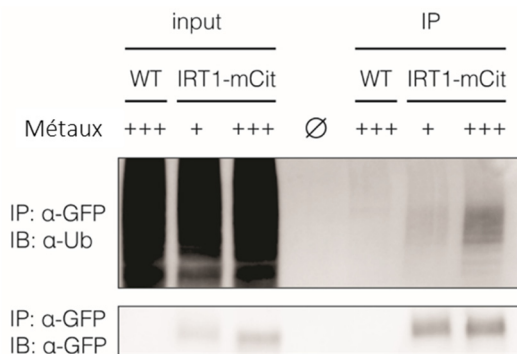


Figure 10 : Un excès de métaux non ferreux induit une augmentation de l'ubiquitination d'IRT1. Des immunopurifications (IP) ont été réalisées avec un anticorps anti-GFP à partir de protéines solubilisées de racines de plantes exprimant IRT1-mCitrine ou de plantes sauvages (WT, contrôle) ayant poussé sur un milieu MS/2 sans fer contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux (+) ou un excès de métaux non ferreux (+++). Les protéines ubiquitinées ont ensuite été détectées par immunoblot (IB) avec un anticorps anti-Ub P4D1. En parallèle IRT1-mCitrine a été détectée avec un anticorps anti-GFP.

II.4.3.2 L'E3 ubiquitine ligase IDF1 contrôle l'endocytose d'IRT1 médiée par les métaux via une polyubiquitination de type K63

Lorsque nous avons initié ce travail, l'E3 ubiquitine ligase IDF1 était connue pour ubiquitiner IRT1 (Shin et al., 2013), mais les signaux environnementaux déclenchant ce mécanisme n'avaient pas été identifiés. Nous avons décidé d'étudier l'implication éventuelle d'IDF1 dans le contrôle de l'endocytose d'IRT1 médiée par les métaux non ferreux. Dans un premier temps, des analyses phénotypiques ont montré qu'en absence de fer le mutant perte de fonction *idf1-1* était plus sensible à la toxicité induite par un excès de métaux non ferreux que des plantes sauvages et qu'il suraccumulait plus de Zn, Mn et Co. De plus, la protéine IRT1-mCitrine exprimée dans le mutant *idf1-1* n'est plus efficacement endocytée en réponse à l'excès

de métaux mais reste majoritairement localisée à la membrane plasmique (Figure 11). Des immunopurifications d'IRT1-mCitrine, couplées à une immunodétection des formes ubiquitinées d'IRT1 avec l'anticorps anti-Ub générique P4D1, ont révélé que la protéine IRT1-mCitrine exprimée dans le mutant *idf1-1* était moins ubiquitinée en réponse aux métaux non ferreux que lorsqu'elle était exprimée chez *irt1-1* (contrôle). Pour aller plus loin, nous avons utilisé un anticorps spécifique de la polyubiquitination de type K63 (clone Apu3) et montré qu'IRT1-mCitrine était modifiée par des chaînes polyUb K63 en réponse à l'excès de métaux et que cette modification était abolie chez le mutant *idf1-1*. Ces résultats indiquent que l'E3 ubiquitine ligase IDF1 est responsable de la polyubiquitination de type K63 d'IRT1 en réponse à un excès de métaux non ferreux (Dubeaux et al., 2018).

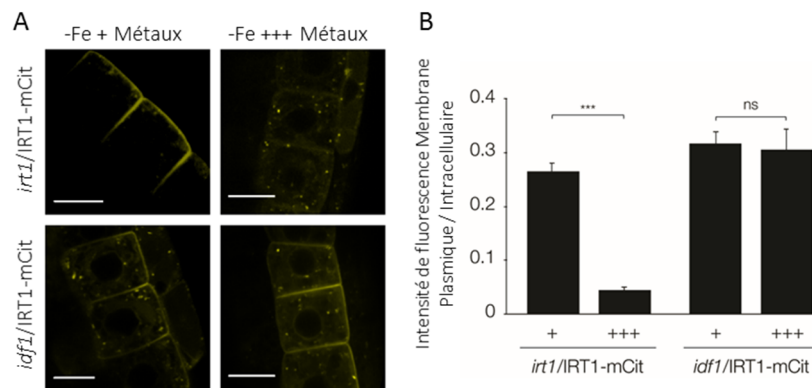


Figure 11 : La protéine IDF1 est impliquée dans l'endocytose d'IRT1 en réponse aux métaux non ferreux. (A) Analyse confocale de la localisation d'IRT1-mCitrine exprimée dans les mutants *idf1-1* et *irt1-1* (contrôle) cultivés sur un milieu MS/2 sans fer (-Fe) et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux (+) ou d'un excès de ces mêmes métaux (+++). Barre d'échelle = 10 μ m. (B) Ratio entre l'intensité du signal de fluorescence d'IRT1-mCitrine à la membrane plasmique et dans des compartiments intracellulaires mesuré à partir de "Z-stacks" réalisés sur des cellules épidermiques de la pointe racinaire de lignées transgénique ayant poussé comme en A. Les barres d'erreur représentent la déviation standard (n=15). Les astérisques indiquent des différences significatives entre les conditions -Fe +Métaux (+) et -Fe +++Métaux (+++) pour *irt1-1*/IRT1-mCit (Mann-Whitney, $P < 0.0001$). Aucune différence significative (ns) n'a été observée entre les deux conditions métalliques pour *idf1-1*/IRT1-mCit.

II.4.3.3 IRT1 est phosphorylée par la kinase CIPK23 en réponse à un excès de métaux non ferreux

La phosphorylation joue un rôle important dans l'endocytose et dans la régulation de l'activité d'un grand nombre de récepteurs et de transporteurs. De façon intéressante, la phosphorylation de certains récepteurs permet le recrutement d'E3 ubiquitine ligases spécifiques et constitue donc un prérequis pour l'ubiquitination (Kumar et al., 2004). Nous avons donc cherché à savoir si la protéine IRT1 était phosphorylée et si cette modification pouvait réguler l'ubiquitination et l'endocytose d'IRT1 en réponse aux métaux. Des IP de la protéine IRT1-mCitrine, combinées à des immunodétections avec un anticorps reconnaissant les thréonines phosphorylées, ont montré qu'IRT1-mCitrine était phosphorylée spécifiquement en réponse à un excès de métaux non ferreux. Ce résultat suggérait un rôle de la phosphorylation dans l'endocytose d'IRT1 médiée par les métaux, hypothèse renforcée par le fait qu'IRT1-mCitrine n'était plus endocytée en réponse à un excès de métaux non ferreux en présence de l'inhibiteur de kinase K252a (Dubeaux et al., 2018). L'analyse des profils de phosphorylation d'IRT1-mCitrine exprimée dans les mutants *irt1-1* (contrôle) ou *idf1-1* n'a pas révélé de différence, suggérant que la phosphorylation d'IRT1 se produisait en amont des événements d'ubiquitination.

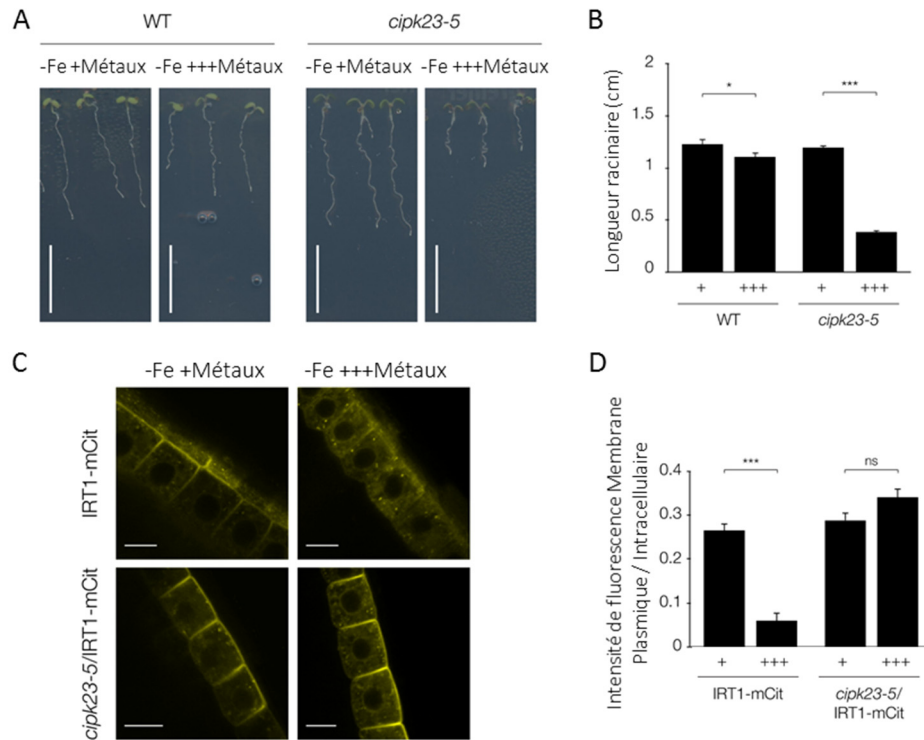


Figure 12 : CIPK23 est importante pour la tolérance à l'excès de métaux non ferreux et est impliquée dans l'endocytose d'IRT1. (A) Analyse phénotypique du mutant *cipk23-5* et de plantes sauvages (WT) ayant poussé 7 jours sur un milieu MS/2 dépourvu de fer (-Fe) et contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux (+) ou un excès de ces mêmes métaux (+++). Barre d'échelle = 5 mm. (B) Quantification de la longueur racinaire de plantes ayant poussé comme en A. Les barres d'erreur représentent la déviation standard (n=40), les astérisques indiquent des différences significatives (Mann-Whitney, P<0.0001). (C) Analyse confocale de la localisation d'IRT1-mCitrine exprimée dans le mutant *cipk23-5* (*cipk23-5*/IRT1-mCit) ou dans des plantes sauvages (IRT1-mCit) cultivés sur un milieu MS/2 sans fer (-Fe) et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux (+) ou d'un excès de métaux non ferreux (+++). Barre d'échelle = 10 μ m. (D) Ratio entre l'intensité du signal de fluorescence d'IRT1-mCitrine à la membrane plasmique et dans des compartiments intracellulaires mesuré à partir de "Z-stacks" réalisés sur des cellules épidermiques de la pointe racinaire de lignées transgéniques ayant poussé comme en C. Les barres d'erreur représentent la déviation standard (n=15). Les astérisques indiquent des différences significatives (Mann-Whitney, P<0.0001). ns = absence de différence significative.

Parmi les différentes familles de kinases de plantes, la famille CBL-interacting protein kinase (CIPK) a une importance capitale dans le contrôle de l'activité de certains transporteurs et canaux (Xu et al., 2006; Ho et al., 2009). Un test d'interaction double hybride entre la grande boucle cytosolique d'IRT1 et les 26 protéines CIPK d'*Arabidopsis thaliana* a mis en évidence que seule l'isoforme CIPK23 interagissait avec IRT1 (Dubeaux et al., 2018). Cette interaction a été confirmée *in vitro* par des approches de "pulldown" entre des formes recombinantes de la grande boucle cytosolique d'IRT1 et de CIPK23. En outre, une analyse phénotypique a montré qu'en absence de fer, le mutant perte de fonction *cipk23-5* était plus sensible à la toxicité induite par un excès de métaux non ferreux que des plantes sauvages, ce qui se traduisait par une diminution de la longueur racinaire (Figure 12 A et B). De plus, le mutant *cipk23-5* suraccumule plus de Zn, Mn et Co que des plantes sauvages. Cette suraccumulation de métaux est très certainement due à un défaut d'endocytose d'IRT1. En effet, la protéine IRT1-mCitrine exprimée dans le mutant *cipk23-5* est majoritairement localisée à la membrane plasmique en présence d'un excès de métaux non ferreux et n'est plus efficacement internalisée et dégradée (Figure 12 C et D). Ces analyses ont fourni des preuves génétiques fortes d'une implication de CIPK23 dans la réponse à un excès de métaux non ferreux. D'un point de vue moléculaire, nous avons montré que : i) CIPK23 induisait la phosphorylation de la grande boucle cytosolique

d'IRT1 *in vitro*, ii) l'interaction entre IRT1 et l'E3 ubiquitine ligase IDF1 était favorisée en présence de la protéine CIPK23 lors d'un test "split-ubiquitin", iii) la phosphorylation d'IRT1 au niveau de la thréonine 174 facilitait son interaction avec IDF1 comme déterminé en "split-ubiquitin" en utilisant des formes mutées d'IRT1 mimant une phosphorylation (IRT1_{T174D}) ou non phosphorylable (IRT1_{T174A}). Nous pensons donc que la phosphorylation d'IRT1 par CIPK23 en réponse à un excès de métaux non ferreux favorise son interaction avec IDF1 qui induit alors la polyubiquitination K63 d'IRT1 entraînant ainsi son endocytose (Dubeaux et al., 2018). La phosphorylation d'IRT1 pourrait également avoir une autre fonction, plus directe, dans l'endocytose d'IRT1 en constituant éventuellement un signal de reconnaissance pour la machinerie ESCRT.

II.4.3.4 Des histines présentes dans la grande boucle cytosolique d'IRT1 sont impliquées dans la perception directe des métaux non ferreux

Une séquence localisée dans la grande boucle cytosolique d'IRT1 et contenant 4 histidines (HGHHGHG) a la capacité de se lier directement aux métaux (Grossoehme et al., 2006). Afin de savoir dans quelle mesure cette séquence riche en histidines pouvait intervenir dans l'endocytose d'IRT1 médiée par les métaux non ferreux, nous avons généré des lignées transgéniques exprimant une version d'IRT1-mCitrine dans laquelle ces 4 histidines ont été mutées en alanines (IRT1_{4HA}-mCitrine). L'expression d'IRT1_{4HA}-mCitrine restaure la croissance du mutant *irt1-1* en absence de fer, montrant que les 4 histidines ne sont pas impliquées dans le transport des métaux. De façon intéressante, les plantes exprimant la protéine IRT1_{4HA}-mCitrine accumulent plus de métaux non ferreux que des plantes exprimant la version non mutée d'IRT1-mCitrine, ce qui a un effet délétère sur leur croissance (Dubeaux et al., 2018). En outre, des analyses de microscopie confocale montrent que la localisation d'IRT1_{4HA}-mCitrine demeure inchangée en présence d'un excès de métaux non ferreux, la protéine restant majoritairement au niveau de la membrane plasmique (Figure 13 A et B). Ce résultat suggère que les 4 histidines de la boucle d'IRT1 sont importantes pour l'endocytose d'IRT1 en réponse aux métaux. De façon très intéressante, nous avons démontré que la protéine IRT1_{4HA}-mCitrine n'est ni phosphorylée, ni ubiquitinée en réponse à l'excès de métaux, au contraire d'IRT1-mCitrine (Figure 13 C). Ces résultats, combinés à d'autres analyses montrant que la mutation de la séquence histidine induit une forte diminution de la capacité de liaison aux métaux d'IRT1, suggèrent que les 4 histidines de la grande boucle cytosolique d'IRT1 interviennent dans la perception de l'excès de métaux non ferreux. De plus, au cours d'un test d'interaction *in vitro* nous avons mis en évidence que ces 4 histidines étaient essentielles pour l'interaction de la boucle cytosolique d'IRT1 avec CIPK23, et que cette interaction était grandement favorisée en présence de métaux non ferreux. Ceci suggère que CIPK23 est directement recrutée sur la protéine IRT1 ayant lié des métaux non ferreux via les histidines de sa boucle cytosolique (Dubeaux et al., 2018). Ces résultats montrent la capacité d'IRT1 à jouer un rôle hybride entre un transporteur et un récepteur, faisant ainsi de cette protéine un trancepteur.

En conclusion, nous proposons un modèle dans lequel l'excès de métaux non ferreux est directement perçu par IRT1 via une liaison des métaux sur la séquence riche en histidine de la boucle d'IRT1. Ceci induit probablement un changement conformationnel permettant le recrutement de la kinase CIPK23. La phosphorylation d'IRT1 par CIPK23 créerait à son tour un site de liaison pour l'E3 ubiquitine ligase IDF1 qui réaliserait alors la conversion de la multi-monoubiquitination d'IRT1 en polyubiquitination de type K63, entraînant l'adressage d'IRT1 à la vacuole et sa dégradation. D'un point de vue physiologique, l'endocytose d'IRT1 en réponse à un excès de métaux non ferreux constitue très probablement pour la plante un

mécanisme de protection permettant de limiter l'absorption de métaux toxiques lorsque ces derniers sont présents en excès.

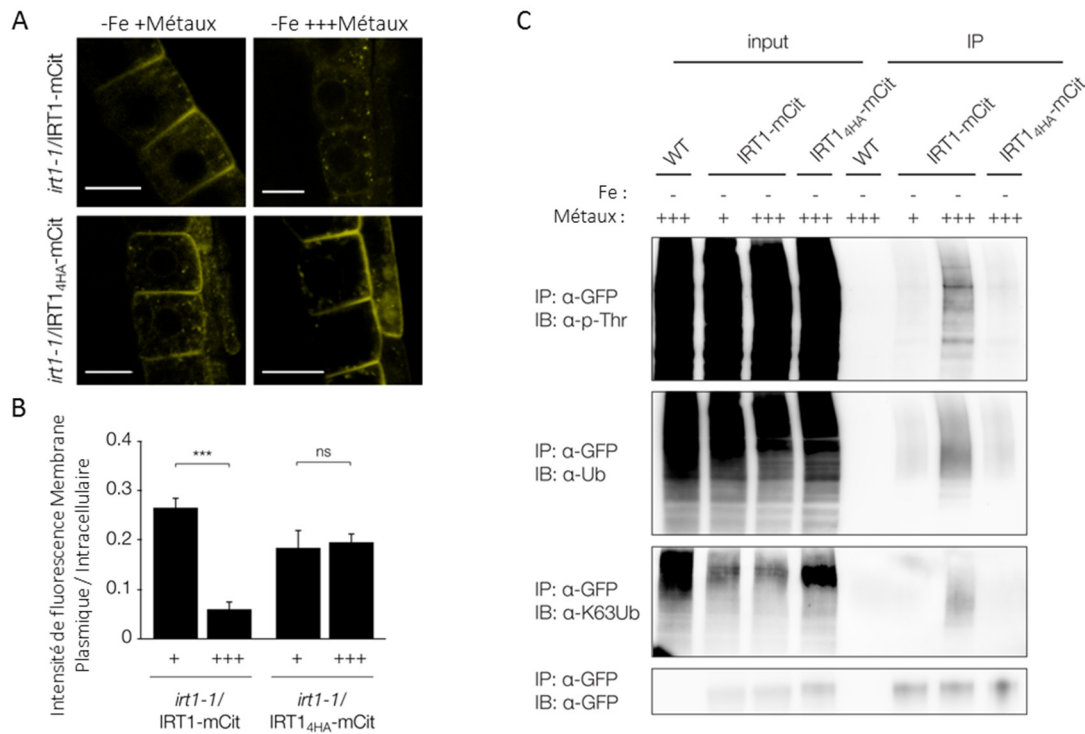


Figure 13 : Quatre histidines localisées dans la grande boucle cytosolique d'IRT1 interviennent directement dans la perception de l'excès de métaux non ferreux et sont importantes pour l'endocytose d'IRT1. (A) Analyse confocale de la localisation d'IRT1-mCitrine et de la forme mutée IRT1_{4HA}-mCitrine exprimées dans les racines du mutant *irt1-1*. Les lignées transgéniques ont été cultivées sur un milieu MS/2 sans fer (-Fe) et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux (+) ou d'un excès de métaux non ferreux (+++). Barre d'échelle = 10 µm. (B) Ratio entre l'intensité du signal de fluorescence d'IRT1-mCitrine ou IRT1_{4HA}-mCitrine à la membrane plasmique et dans des compartiments intracellulaires mesuré à partir de "Z-stacks" réalisés sur des cellules épidermiques de la pointe racinaire de lignées transgénique ayant poussé comme en A. Les barres d'erreur représentent la déviation standard (n=15). Les astérisques indiquent des différences significatives (Mann-Whitney, P<0.0001). ns = absence de différence significative. (C) Des immunoprécipitations (IP) ont été réalisées avec un anticorps anti-GFP à partir de protéines solubilisées de racines de plantes exprimant IRT1-mCitrine, IRT1_{4HA}-mCitrine ou de plantes sauvages (WT, contrôle) ayant poussé sur un milieu MS/2 sans fer contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux (+) ou un excès de ces métaux (+++). Différents immunoblots (IB) ont ensuite été réalisés avec des anticorps anti-phospho-thréonines (α-p-Thr), anti-ubiquitine P4D1 (α-Ub), anti-ubiquitine de type K63 (α-K63Ub) et anti-GFP (α-GFP).

II.4.4 Identification de nouveaux facteurs impliqués dans la dynamique ou l'activité d'IRT1

II.4.4.1 Recherche de protéines interagissant avec IRT1

Un des objectifs de mon projet était d'identifier de nouveaux facteurs intervenant dans le trafic ou l'activité d'IRT1 en recherchant des protéines interagissant avec IRT1 dans les cellules de l'épiderme de la racine. Pour cela, j'ai réalisé des IP de la protéine IRT1-mCitrine, exprimée sous le contrôle du promoteur *IRT1* dans le mutant *irt1-1*, combinées à la détection par spectrométrie de masse des protéines co-purifiées. En pratique, IRT1-mCitrine a été solubilisée à partir d'un extrait protéique de racine, puis immunopurifiée avec un anticorps anti-GFP. En parallèle, des IP ont été réalisées à partir d'extrait protéiques de racines de plantes sauvages utilisées comme contrôle négatif. Les analyses par spectrométrie de masse ont conduit

à l'identification de 142 protéines présentes spécifiquement dans la fraction IP IRT1-mCitrine. Cette approche a permis d'établir pour la première fois un interactome d'IRT1. J'ai par la suite décidé d'analyser treize candidats potentiellement liés au trafic et à l'activité d'IRT1. Par soucis de concision, je ne détaillerai dans ce rapport que les travaux concernant quatre protéines candidates interagissant avec IRT1.

Parmi les candidats sélectionnés se trouvait la protéine Hypersensitive Induced Reaction 2 (HIR2) contenant un domaine SPFH et décrite comme étant localisée dans les nanodomains de la membrane plasmique chez Arabidopsis (Qi et al., 2011). Bien que la fonction de HIR2 reste énigmatique, les protéines à domaine SPFH sont impliquées dans la régulation et le trafic de protéines membranaires chez les animaux (voir Contexte). De plus, la protéine à domaine SPFH Flot1 intervient dans une voie d'endocytose indépendante de la clathrine chez Arabidopsis. HIR2 constituait donc un candidat très intéressant au regard de l'étude des mécanismes de régulation de la dynamique d'IRT1 dans la cellule. Parmi les protéines identifiées par l'approche de co-IP, étaient également présentes la réductase ferrique FRO2 et la pompe à protons AHA2 qui sont toutes les deux essentielles à l'acquisition du fer chez Arabidopsis. Nous avons émis les hypothèses suivantes : (i) IRT1, FRO2 et AHA2 pourraient constituer une "plateforme" protéique qui permettrait d'optimiser l'absorption du fer chez Arabidopsis, (ii) cette "plateforme" pourrait être localisée dans certains domaines de la membrane plasmique via une interaction avec HIR2. L'étude de ces hypothèses a été l'objet d'une thèse réalisée sous ma direction par Amanda Martin-Barranco de novembre 2015 à juin 2019 et intitulée "Rôle de la protéine HIR2 et des microdomaines de la membrane plasmique dans le contrôle de la machinerie d'acquisition du fer chez les plantes". Cette thèse a été réalisée grâce à un financement que j'ai obtenu de la part du Labex "Saclay Plant Sciences" (projet HIRON).

Lorsque j'ai initié le projet visant à découvrir de nouveaux acteurs impliqués dans la régulation du trafic d'IRT1, notre équipe s'intéressait principalement aux événements d'endocytose d'IRT1 et les mécanismes impliqués dans le repliement de la protéine IRT1 après sa synthèse au niveau du RE ainsi que son trafic le long de la voie sécrétoire restaient inconnus. De façon intéressante, j'ai mis en évidence par les approches de co-IP décrites ci-dessus qu'IRT1 interagissait potentiellement avec la Protein Disulfide Isomerase 5 (PDI5). Bien que les protéines de la famille PDI soient connues pour catalyser la formation de ponts disulfures sur des protéines substrats au niveau du RE (Lu and Christopher, 2008), leur fonction physiologique demeure très peu étudiée chez les plantes. Jusqu'à présent, seules quelques protéines substrats de PDI5 ont été identifiées tel un transporteur putatif de proline appelé AFL1 ainsi que des transporteurs de sucrose de la famille SUT (Krugel et al., 2012; Kumar et al., 2015). Nous pensons que PDI5 pourrait être impliquée dans le repliement de la protéine IRT1, lui permettant ainsi d'acquérir sa conformation finale et son activité. Cette hypothèse est en cours d'analyse, comme décrit ci-dessous.

II.4.4.2 Contrôle dynamique du complexe d'acquisition du fer composé d'IRT1, FRO2 et AHA2

Dans cette section, je présenterai nos résultats décrivant l'existence d'une plateforme protéique contenant IRT1, FRO2 et AHA2 et permettant potentiellement d'optimiser l'absorption du fer chez Arabidopsis. Ces données sont regroupées dans un manuscrit intitulé "Dynamic control of the Arabidopsis high affinity iron uptake complex in root epidermal cells" qui est actuellement en révision à Plant Physiology. Amanda Martin-Barranco est première auteur et je suis dernier auteur et auteur de correspondance. Je tiens à préciser que par stratégie de publication, ce manuscrit n'inclut pas nos travaux concernant le rôle de HIR2 dans la régulation d'IRT1.

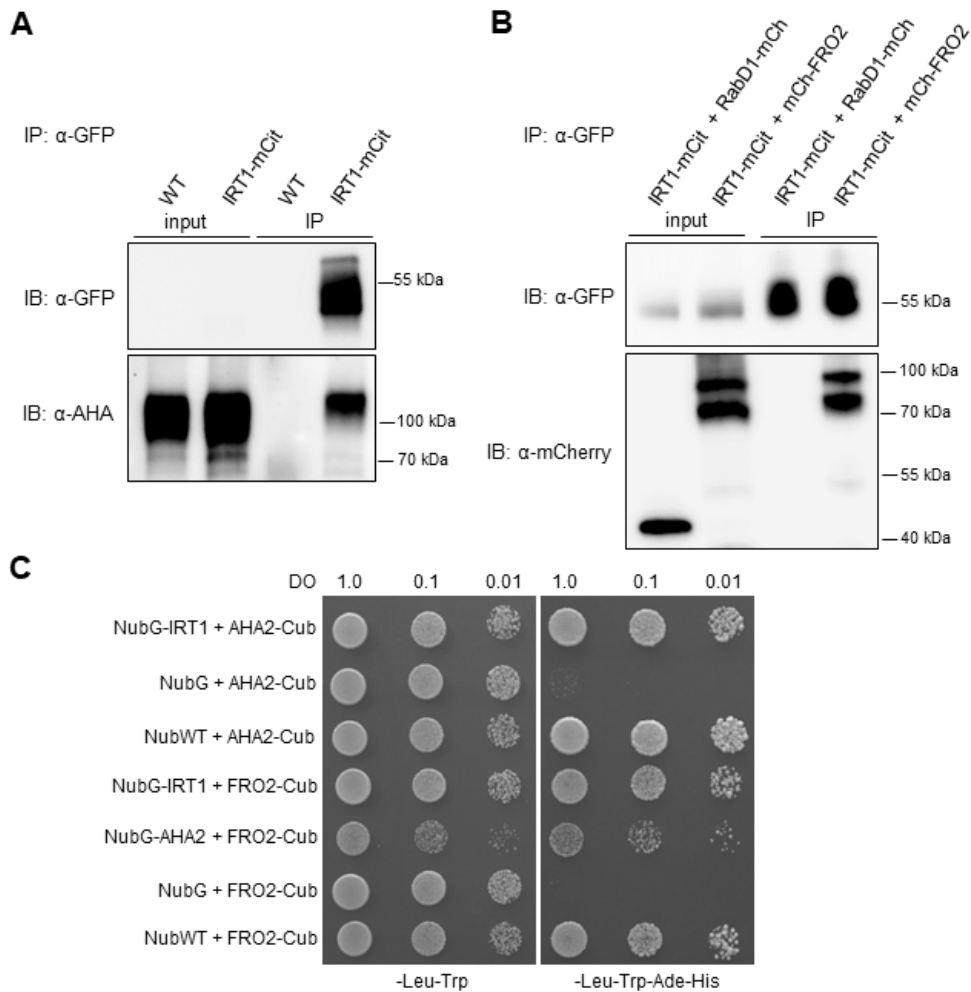


Figure 14 : IRT1, AHA2 et FRO2 forment un complexe protéique. (A) AHA2 endogène est co-immunoprépurifiée avec IRT1-mCitrine dans les cellules racinaires d'Arabidopsis. Des immunoprécipitations (IP) ont été réalisées avec un anticorps anti-GFP sur des extraits de protéines de racine solubilisées de lignée *irt1-1*/IRT1::IRT1-mCitrine et de plantes sauvage (WT, contrôle négatif). Les "inputs" et les fractions IP ont été soumises à des immunoblots (IB) avec des anticorps anti-GFP (haut) et anti-AHA/PMA2 (bas). En raison d'un niveau d'expression très bas, IRT1-mCitrine n'est pas détectée dans les "inputs" mais uniquement dans les fractions IP, après enrichissement. (B) mCherry-FRO2 est co-immunoprépurifiée avec IRT1-mCitrine. Des IP ont été réalisées avec un anticorps anti-GFP sur des extraits de protéines de racine solubilisées de plantes *irt1-1*/IRT1::IRT1-mCitrine co-exprimant FRO2::mCherry-FRO2 ou UBQ10::RabD1-mCherry, cette protéine co-localisant avec IRT1 dans les endosomes (contrôle négatif). Les "inputs" et les fractions IP ont été soumises à des IB avec des anticorps anti-GFP (haut) et anti-mCherry (bas). Notez que mCherry-FRO2 migre à la taille attendue (bande du haut) mais également à un poids moléculaire inférieur (bande du bas). Pour les expériences de co-IP, toutes les plantes ont été cultivées sur un milieu sans fer contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux. (C) IRT1 interagit directement avec FRO2 et AHA2 dans un test "split-ubiquitin". Des levures co-exprimant les protéines de fusion Cub-PLV avec NubG (contrôle négatif d'interaction) ou avec les protéines de fusion NubG ou avec NubWT (contrôle positif d'interaction) ont été déposées en dilutions en série sur un milieu synthétique sans Leu et Trp (milieu contrôle) ou sans Leu, Trp, His, Ade (milieu sélectif). La croissance des levures sur milieu contrôle et milieu sélectif a été enregistrée après 24h et 48h, respectivement. DO : densité optique

II.4.4.2.1 La protéine IRT1 interagit directement avec FRO2 et AHA2

Tout d'abord, l'interaction entre IRT1 et les protéines AHA2 et FRO2 a été confirmée par des approches complémentaires. En utilisant un anticorps reconnaissant la protéine AHA2 endogène, nous avons montré que cette dernière était co-immunoprépurifiée avec la protéine IRT1-mCitrine exprimée dans la racine d'Arabidopsis sous le contrôle du promoteur *IRT1* (Figure

14A). Ne disposant pas d'anticorps dirigé contre la protéine FRO2, nous avons généré une fusion fonctionnelle mCherry-FRO2, dont l'expression sous le contrôle du promoteur *FRO2* permet de compléter le défaut de développement et la chlorose du mutant perte de fonction *fro2* appelé *frd1-1*. Au même titre qu'AHA2, mCherry-FRO2 a été co-immunopurifiée avec IRT1-mCitrine à partir d'extrait protéiques de racines, prouvant ainsi que ces protéines sont présentes dans un complexe protéique contenant IRT1 chez *Arabidopsis* (Figure 14B). En outre, la technique du "split-ubiquitin" nous a permis de montrer que les interactions entre IRT1 et FRO2/AHA2 étaient directes (Figure 14C). De façon intéressante, les protéines FRO2 et AHA2 sont également capables d'interagir entre elles comme mis en évidence par des approches de "split-ubiquitin" et de co-IP. Les interactions physiques tripartites entre IRT1, FRO2 et AHA2 suggèrent l'existence d'un complexe protéique dédié à l'absorption du fer dans la racine d'*Arabidopsis*.

II.4.4.2.2 Régulation différentielle de l'ubiquitination et de l'endocytose des membres du complexe d'acquisition du fer

En présence d'un excès de métaux non ferreux, l'ubiquitination d'IRT1 augmente fortement, entraînant l'endocytose et la dégradation d'IRT1 dans la vacuole (Dubeaux et al., 2018). Des analyses protéomiques ayant permis d'identifier AHA2 et FRO2 comme faisant partie de l'ubiquitinome d'*Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2013; Walton et al., 2016), nous avons voulu déterminer si l'ubiquitination de ces protéines pouvait être co-régulée par la disponibilité en métaux non ferreux, étant donné qu'AHA2, FRO2 et IRT1 appartiennent à un même complexe protéique. Les profils d'ubiquitination d'AHA2-GFP et de mCherry-FRO2, immunopurifiées à partir de racines de lignées transgéniques cultivées en présence de différentes concentrations en métaux, ont été analysés avec l'anticorps anti-ubiquitine P4D1. Ces analyses ont révélé que : (i) comme pour IRT1, une fraction des protéines AHA2 et FRO2 est ubiquitinée dans les cellules de la racine, (ii) contrairement à IRT1, un excès de métaux non ferreux n'entraîne pas une augmentation de l'ubiquitination de AHA2 et FRO2. Ainsi, bien que AHA2, FRO2 et IRT1 appartiennent à un même complexe protéique impliqué dans un mécanisme commun, l'acquisition du fer, l'ubiquitination de ces protéines est régulée de manière différentielle par la disponibilité en métaux non ferreux.

Nous avons ensuite analysé les localisations respectives d'IRT1-mCitrine et de AHA2/FRO2 fusionnées à la mCherry dans les cellules épidermiques de la pointe racinaire d'*Arabidopsis*. En absence de fer et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux, FRO2 est polarisée au niveau du domaine externe de la membrane plasmique (Figure 15A), comme observé précédemment pour IRT1. La co-polarité entre FRO2 et IRT1 met en évidence la spécificité de leurs fonctions réalisées à l'interface entre la surface racinaire et la rhizosphère. En revanche, dans les mêmes conditions, AHA2 présente une localisation apolaire au niveau de la membrane plasmique (Figure 15B), suggérant qu'AHA2 n'interagit pas obligatoirement avec IRT1 et FRO2, ce qui est en accord avec la fonction de AHA2 ne se limitant pas à l'acquisition du fer. En présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux, FRO2 et AHA2 co-localisent également avec IRT1 dans des endosomes précoces. Nous avons ensuite analysé l'effet d'un excès de métaux non ferreux sur la localisation de AHA2 et FRO2. Contrairement à IRT1, les protéines AHA2 et FRO2 ne sont pas massivement endocytées dans ces conditions et restent localisées à la membrane plasmique, bien qu'elles co-localisent également avec IRT1 dans des MVB (Figure 15 A et B). Ce phénomène a été quantifié en montrant que le ratio entre l'intensité de fluorescence de la membrane plasmique et celle de l'intérieur de la cellule demeurerait inchangé pour AHA2 et FRO2 quels que soient les quantités de métaux non ferreux. Néanmoins, l'excès de métaux semble avoir un effet mineur

sur la localisation de FRO2, le niveau de co-localisation entre cette dernière et IRT1 dans les endosomes augmentant par rapport aux conditions contrôles.

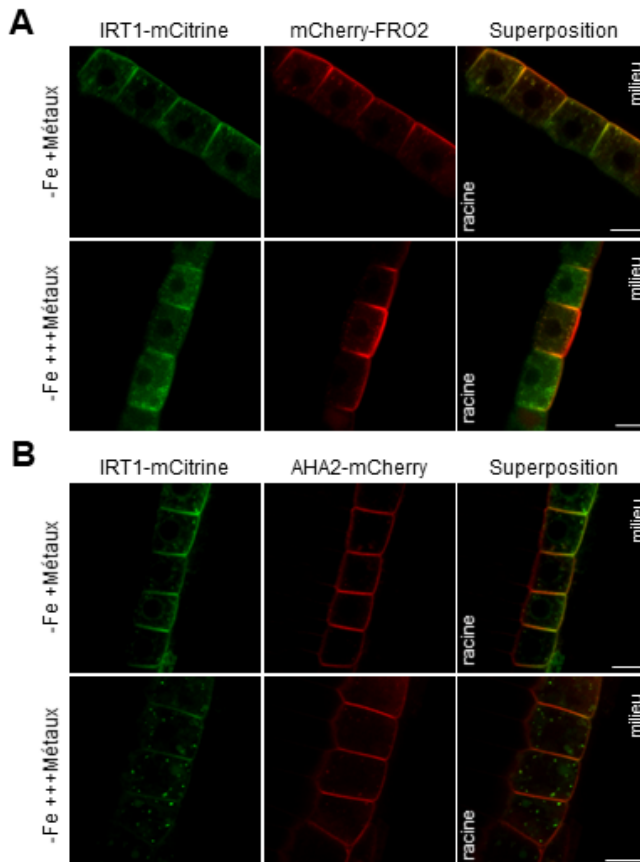


Figure 15 : L'endocytose d'IRT1 et de FRO2/AHA2 est régulée de manière différentielle par les métaux non ferreux dans les cellules épidermiques de la pointe racinaire. Analyses par microscopie confocale de cellules épidermiques racinaires de plantes *irt1-1/IRT1::IRT1-mCitrine* co-exprimant *IRT1::mCherry-FRO2* (A) ou *IRT1::AHA2-mCherry* (B). Les plantes ont été cultivées 11 jours en absence de fer et en présence de niveaux physiologique de métaux non ferreux puis transférées sur le même type de milieu (-Fe + Métaux) ou sur un milieu contenant un excès de métaux non ferreux (-Fe +++ Métaux), pendant 2 heures. Barre d'échelle = 10 μ m.

L'absence d'internalisation massive de FRO2 et AHA2 depuis la membrane plasmique en réponse à un excès de métaux non ferreux suggère une dissociation du complexe IRT1/FRO2/AHA2 avant l'endocytose d'IRT1. Bien que la phosphorylation soit souvent considérée comme une modification post-traductionnelle permettant de créer des interactions avec d'autres protéines, il y a un nombre d'évidences croissant qu'elle contrôle également le désassemblage de complexe protéique (Zhang et al., 2010; Couto et al., 2016). Afin de savoir si la phosphorylation d'IRT1, qui est un événement précoce de la réponse à l'excès de métaux non ferreux (Dubeaux et al., 2018), pouvait avoir un effet sur l'interaction entre IRT1 et AHA2/FRO2, des tests de "split-ubiquitin" ont été réalisés en utilisant les variantes d'IRT1 mimant une phosphorylation (*IRT1_{T174D}*) ou non phosphorylable (*IRT1_{T174A}*), ainsi qu'IRT1 non mutée. Nos résultats montrent que la version d'IRT1 mimant une phosphorylation présente une interaction réduite avec AHA2 et FRO2, suggérant un rôle de la phosphorylation dans la dissociation du complexe d'acquisition du fer. La phosphorylation d'IRT1 peut ainsi avoir des effets opposés puisque, a contrario, elle permet le recrutement de la protéine IDF1.

En conclusion, ces travaux montrent l'existence d'un complexe protéique regroupant les trois acteurs majeurs de l'acquisition du fer dans les cellules de l'épiderme de la racine d'*Arabidopsis* : IRT1, FRO2 et AHA2. Dans le futur, des analyses de FRET-FLIM permettront certainement de déterminer avec précision la dynamique d'association et de dissociation de ce complexe. Bien que la signification biologique de l'absorption du fer à l'aide d'un complexe spécifique reste à déterminer, nous pouvons émettre des hypothèses. Pendant le processus

d'acquisition du fer, l'acidification de la rhizosphère par la racine est essentielle pour solubiliser le fer et ainsi augmenter sa biodisponibilité. Cependant, ce processus d'acidification, principalement médié par AHA2 lors de la carence en fer (Santi and Schmidt, 2009), est très local, ce qui a probablement un impact sur l'efficacité de l'absorption du fer. De plus, la présence d'oxygène dans la plupart des sols provoque la réoxydation rapide de Fe^{2+} produit par FRO2 en Fe^{3+} qui n'est pas transporté par IRT1. Ainsi, nous proposons que le complexe protéique rassemblant IRT1, FRO2 et AHA2 crée un environnement local de pH et de concentration en Fe^{2+} dans la rhizosphère qui favorise une acquisition optimale du fer. Alternativement, nous pouvons également imaginer que le fer réduit est directement transféré de FRO2 vers IRT1 par un mécanisme de "channeling", permettant ainsi d'augmenter la cinétique de réaction. Des processus de "channeling" du fer ont été décrits chez la levure entre l'oxydase multi-cuivre Fet3p, qui oxyde le Fe^{2+} en Fe^{3+} et la perméase Ftr1p qui transporte les ions Fe^{3+} dans la cellule, ces deux protéines formant un complexe (Kwok et al., 2006; Singh et al., 2006).

II.4.4.3 Rôle de HIR2 dans le contrôle de la machinerie d'acquisition du fer, impact sur la nutrition en métaux

Les travaux présentés ci-dessous ont constitué l'axe majeur de recherche durant la thèse d'Amanda Martin-Barranco et doivent être poursuivis. Bien que des analyses complémentaires soient encore nécessaires afin d'élucider le rôle exact de HIR2 dans la régulation d'IRT1, j'espère pouvoir valoriser prochainement ces travaux à travers un article dans lequel Amanda Martin-Barranco sera première auteur et dans lequel je serai dernier auteur et auteur de correspondance.

II.4.4.3.1 Importance de HIR2 dans le maintien de l'homéostasie des métaux chez Arabidopsis thaliana

L'existence d'un complexe IRT1-HIR2 a tout d'abord été confirmée dans la racine d'Arabidopsis via des approches de co-IP montrant que la protéine de fusion HIR2-mCherry est efficacement co-immunopurifiée avec IRT1-mCitrine. Disposant d'un anticorps reconnaissant la protéine HIR2, nous avons conforté ce résultat en montrant que HIR2 endogène est également co-purifiée avec IRT1-mCitrine à partir d'extraits protéiques de racines. La technique du "split-ubiquitin" n'ayant pas permis de révéler une interaction directe entre IRT1 et HIR2, nous pensons que l'interaction entre ces deux protéines pourrait être médiée par un troisième partenaire, éventuellement la protéine AHA2, cette dernière interagissant à la fois avec IRT1 et HIR2 d'après nos analyses de "split-ubiquitin".

Afin d'étudier le rôle de HIR2 dans l'homéostasie des métaux, nous avons isolé un mutant perte de fonction appelé *hir2-2* puis réalisé des tests phénotypiques en faisant varier le statut en fer. Ces analyses ont révélé qu'en absence de fer et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux, le mutant *hir2-2* est beaucoup plus chlorotiques que des plantes sauvages (Figure 16A). Ainsi, nous observons une diminution de 64 % du contenu en chlorophylle chez le mutant *hir2-2* par rapport à des plantes sauvages en absence de fer. Il est important de mentionner que la chlorose du mutant *hir2-2* lors d'une carence en fer est en grande partie reversée par l'expression de la protéine de fusion HIR2-mCherry. Des phénotypes similaires ont été observés pour un autre mutant perte de fonction appelé *hir2-1* en absence de fer, bien que ces analyses doivent être approfondies. Nos résultats suggèrent que l'homéostasie des métaux est perturbée chez les mutants *hir2* et montre pour la première fois, à notre connaissance, le rôle d'une protéine des nanodomains membranaires dans la nutrition en métaux chez les plantes.

D'autre part, des immunoblots anti-IRT1 ont révélé que les mutants *hir2-1* et *hir2-2* accumulaient beaucoup plus de protéine IRT1 que des plantes sauvages lors de la carence en fer (Figure 16B). L'accumulation de la protéine IRT1 chez les mutants *hir2* fait très probablement intervenir un mécanisme post-traductionnel étant donné que nous ne détectons pas de différence d'accumulation du transcrite *IRT1* entre *hir2* et des plantes sauvages en absence de fer. Une diminution du "turn-over" de la protéine IRT1 chez les mutants *hir2* pourrait expliquer la suraccumulation de la protéine. L'étude de la dynamique intracellulaire d'IRT1 dans le mutant *hir2-2* devrait permettre d'analyser cette hypothèse, comme décrit ci-dessous.

Une des hypothèses pour expliquer la chlorose exacerbée des mutants *hir2* est que la suraccumulation de la protéine IRT1 pourrait entraîner, en absence de fer, une forte absorption par la plante des substrats secondaires d'IRT1 (Zn, Mn, Co) qui sont toxiques en excès. D'autre part, il a été démontré que l'environnement lipidique était important pour l'activité de certaines protéines membranaires chez les plantes (Oh et al., 2016). Alternativement à l'hypothèse énoncée ci-dessus, IRT1 pourrait être présente en grande quantité dans les cellules des mutants *hir2* mais être mal localisée en dehors des nanodomains membranaires, ce qui pourrait diminuer ou inhiber l'activité du transporteur en raison d'un contexte lipidique différent. L'absence de transport des métaux (Fe, Zn, Mn, Co) par IRT1 chez les mutants *hir2* pourrait alors expliquer la très forte chlorose observée. Des dosages de métaux par "Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy" (MP-AES) chez les mutants *hir2* et des plantes sauvages sont en cours et devraient permettre de déterminer si l'une ou l'autre de ces hypothèses est exacte.

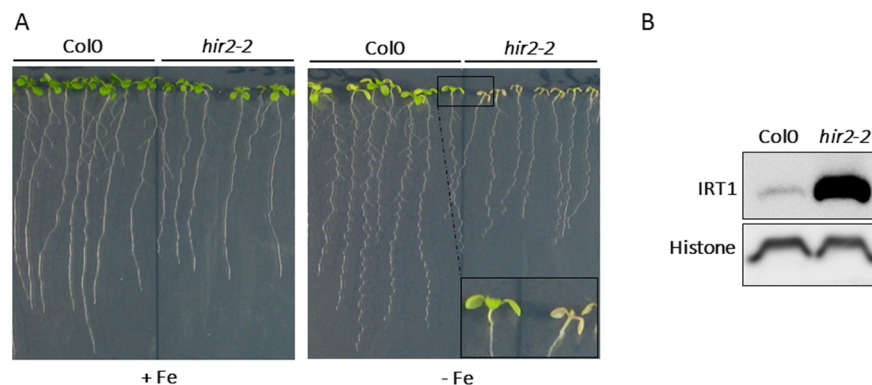


Figure 16 : L'homéostasie des métaux est dérégulée chez le mutant *hir2-2*. (A) Analyse phénotypique du mutant *hir2-2* en réponse à la carence en fer. Des plantes Col0 (contrôle) et *hir2-2* ont été cultivées 14 jours sur un milieu MS/2 contenant 50 μ M de Fe-EDTA (+Fe) ou dépourvu de fer (-Fe), en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux. (B) La protéine IRT1 est suraccumulée chez le mutant *hir2-2*. Des immunoblots anti-IRT1 et anti-histone (contrôle de charge) ont été réalisés sur les protéines totales de racines de plantes Col0 et *hir2-2* ayant poussé sur un milieu MS/2 pauvre en fer (2 μ M Fe-EDTA) durant 14 jours.

II.4.4.3.2 Rôle de HIR2 et des nanodomains membranaires dans la dynamique intracellulaire d'IRT1

Nous étudions actuellement comment HIR2 régule IRT1 dans la cellule végétale en explorant deux hypothèses. Premièrement, HIR2 pourrait agir comme une protéine d'assemblage permettant le recrutement d'IRT1 et de la plateforme d'acquisition du fer dans des nanodomains membranaires spécifiques. Deuxièmement, bien que nous ayons montré précédemment qu'IRT1 pouvait être endocytée de manière clathrine-dépendante (Barberon et al., 2011; Barberon et al., 2014), nous explorons la possibilité qu'IRT1 puisse également emprunter une autre voie d'endocytose médiée par des nanodomains membranaires et nécessitant HIR2. En effet : (i) les protéines membranaires de plantes peuvent être endocytées via une voie indépendante de la clathrine et faisant intervenir la protéine Flot1 qui appartient à

la même famille que HIR2, (ii) IRT1 et HIR2 interagissent et la protéine IRT1 est sur-accumulée en absence de HIR2, ce qui pourrait résulter d'un défaut d'endocytose et de dégradation. Il est important de considérer que ces deux hypothèses ne sont pas forcément exclusives. En effet HIR2 pourrait recruter IRT1 dans des nanodomains membranaires et également être impliquée dans son endocytose. Ces hypothèses étant en cours d'analyse, je décrirai dans le paragraphe ci-dessous les résultats que nous avons obtenus et les approches expérimentales envisagées dans un futur proche.

Nous avons tout d'abord analysé la localisation au niveau des nanodomains membranaires de HIR2 et IRT1. Jusqu'à présent, les territoires d'expression de la protéine HIR2 chez *Arabidopsis thaliana* demeuraient inconnus. En utilisant la protéine de fusion HIR2-mCherry fonctionnelle exprimée sous le contrôle du promoteur *HIR2*, nous avons mis en évidence que dans la racine HIR2 était uniquement présente dans les cellules de l'épiderme, au même titre qu'IRT1. HIR2 est localisée au niveau de la membrane plasmique de façon non uniforme, en effet elle est regroupée au sein de nanodomains, comme déterminé par microscopie de type "spinning disk" (Figure 17B). Récemment, un autre groupe a étudié la localisation dans les nanodomains membranaires de HIR2, mais également des trois autres isoformes HIR, et déterminé un certain nombre de paramètres tels que la densité et la mobilité latérale de ces domaines (Danek et al., 2020). Nous avons observé la protéine IRT1-mCitrine dans des nanodomains de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme de la racine, en microscopie "spinning disk" (Figure 17C). Cependant, IRT1-mCitrine peut également être distribuée de manière homogène à la surface des cellules, montrant qu'IRT1 n'est probablement pas une protéine obligatoire des nanodomains membranaires. L'origine de cette hétérogénéité n'a pour l'instant pas été déterminée. De façon surprenante, nous n'avons observé jusqu'à présent qu'une co-localisation très limitée dans des nanodomains de la membrane plasmique entre les protéines HIR2-mCherry et IRT1-mCitrine co-exprimées dans les cellules de l'épiderme de la racine (Figure 17D). Des analyses sont actuellement en cours afin de déterminer si IRT1 et HIR2 ne sont présentes dans les mêmes nanodomains membranaires que dans certains cas, comme par exemple dans des zones précises de la racine où à un stade déterminé du développement la plante.

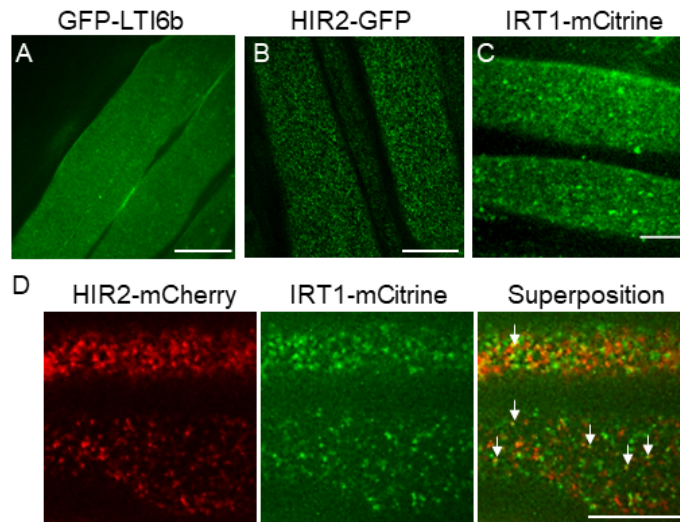


Figure 17 : Analyse de la localisation des protéines HIR2 et IRT1 dans les nanodomaines de la membrane plasmique des cellules épidermiques de la racine. Des analyses de microscopie "spinning-disk" ont été réalisées en surface de racines de lignées transgéniques d'Arabidopsis exprimant : GFP-LTI6b, qui est présente à la membrane plasmique et est utilisée ici comme contrôle négatif car elle est décrite comme n'étant pas localisée dans des nanodomaines (A), HIR2-GFP (B) et IRT1-mCitrine (C). HIR2-GFP et IRT1-mCitrine présente une distribution punctiforme au niveau de la membrane plasmique, alors que GFP-LTI6b est distribuée de façon homogène. Le même type d'analyse a été réalisé sur les racines de plantes co-exprimant HIR2-mCherry et IRT1-mCitrine (D). Les flèches blanches indiquent une co-localisation des deux protéines dans des nanodomaines. Barre d'échelle = 10 μ m.

IRT1 pourrait être recrutée dans des nanodomaines membranaires en interagissant avec HIR2, qui agirait comme une protéine d'assemblage. Pour tester cette hypothèse, des croisements ont été réalisés afin d'exprimer la protéine IRT1-mCitrine dans le mutant *hir2-2* et déterminer par microscopie si IRT1-mCitrine est toujours localisée dans des nanodomaines de la membrane plasmique. Ce type d'approche pourrait être étendu aux autres composantes du complexe d'acquisition du fer : FRO2 et AHA2. Il serait également intéressant de déterminer si HIR2 et le recrutement dans les nanodomaines membranaires sont requis pour l'établissement des interactions entre les protéines IRT1, FRO2 et AHA2. Actuellement, le terme nanodomaine/microdomaine est utilisé pour définir l'assemblage fonctionnel entre des sphingolipides, des stérols et des protéines spécifiques, lorsqu'il est déterminé par des techniques de microscopie (Tapken and Murphy, 2015). Cependant, des approches biochimiques peuvent être utilisées pour isoler des fractions membranaires appelées membranes insolubles aux détergents ("detergent-insoluble membranes", DIM), qui ne sont pas solubilisées par des détergents non ioniques tels que Triton X100 à froid et qui sont enrichies en stérols, sphingolipides et en certaines protéines (Simon-Plas et al., 2011). Par conséquent, l'analyse des DIM constitue un moyen biochimique d'étudier les nanodomaines membranaires. En plus des analyses par microscopie décrites ci-dessus, des approches biochimiques seront réalisées pour étudier le rôle de HIR2 dans le recrutement de la machinerie d'acquisition du fer dans certains domaines de la membrane plasmique. Il a été démontré que les HIR, mais également AHA2, étaient associées aux DIM (Borner et al., 2005; Qi et al., 2011), ce que nous avons confirmé en réalisant des immunoblots avec des anticorps anti-HIR et anti-AHA2 sur des DIM issues de racines d'Arabidopsis. Nous devons maintenant analyser la présence dans les DIM des protéines IRT1 et FRO2. Il est intéressant de mentionner que la protéine IRT1 de *Malus xiaojinesis* (MxIRT1) est décrite comme étant présente dans les DIM (Tan et al., 2018). Nous déterminerons par la suite si l'absence de HIR2 induit une relocalisation d'IRT1, FRO2 et AHA2 des DIM vers des fractions membranaires sensibles aux détergents non ioniques ("detergent-soluble membranes", DSM), montrant ainsi que HIR2 agit comme une protéine

d'assemblage permettant le recrutement d'un complexe protéique dédié à l'absorption du fer dans certains nanodomains membranaires.

Nous analysons également l'hypothèse selon laquelle HIR2 et les nanodomains membranaires pourraient être impliqués dans une voie d'endocytose d'IRT1 indépendante de la clathrine. Pour cela, des analyses de "Total Internal Reflection Fluorescence" (TIRF), qui permettent d'analyser l'internalisation depuis la membrane plasmique avec une très haute résolution temporelle et spatiale (Martins et al., 2015), sont en cours de réalisation afin de comparer les cinétiques d'internalisation d'IRT1-mCitrine exprimée dans le mutant *hir2-2* et dans des plantes sauvages. Au cours de ces analyses, il sera intéressant d'examiner l'impact de la nutrition en métaux non ferreux, étant donné que certains facteurs environnementaux peuvent stimuler l'endocytose indépendante de la clathrine (Li et al., 2011). Pour aller plus loin, nous réaliserons le même type d'analyse TIRF en présence de drogues qui détruisent la structure des nanodomains membranaires, comme le méthyl-beta-cyclodextrine, ou en utilisant des mutants de biosynthèse de stérol, tel que *cpil-1*, qui sont affectés dans la production des nanodomains membranaires (Men et al., 2008; Li et al., 2011; Zauber et al., 2013). Il est à noter que nous avons généré des lignées *cpil-1* exprimant la protéine IRT1-mCitrine.

En conclusion, nous avons mis en évidence que le transporteur de fer IRT1 interagit avec la protéine HIR2 et que cette dernière est impliquée dans le maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*, comme l'atteste l'extrême sensibilité à la carence en fer des mutants *hir2*. D'autre part, nous avons montré que la protéine IRT1 est sur-accumulée chez les mutants *hir2* par rapport à des plantes sauvages et ceci via un mécanisme post-traductionnel. Cette observation suggère une stabilisation de la protéine IRT1 en absence de HIR2, potentiellement due à un défaut d'endocytose. Une hypothèse serait qu'IRT1 emprunterait, à partir de la membrane plasmique, une voie d'internalisation médiée par des nanodomains membranaires contenant la protéine HIR2. Alternativement, HIR2 pourrait jouer le rôle de protéine d'assemblage permettant de recruter IRT1 dans des nanodomains spécifiques, ce qui pourrait constituer un prérequis pour qu'IRT1 exerce correctement sa fonction de transporteur de fer. La validité de ces hypothèses est en cours d'analyse.

II.4.4.4 Etude du rôle des flotillines dans l'endocytose d'IRT1 (projet collaboratif)

Nos résultats suggèrent que les nanodomains jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie des métaux et que ce mécanisme pourrait éventuellement être médié par la régulation de l'endocytose du transporteur IRT1. Chez les plantes, la protéine Flot1 est impliquée dans une voie d'endocytose indépendante de la clathrine (Li et al., 2012; Wang et al., 2015). Au-delà de l'étude de la protéine HIR2, nous avons cherché à savoir si Flot1, mais également les deux autres flotillines présentes chez *Arabidopsis thaliana*, Flot2 et Flot3, pouvaient être impliquées dans le contrôle de la dynamique intracellulaire d'IRT1. Lorsque nous avons débuté ces travaux, la fonction de Flot2 et Flot3 restait inconnue, mais nous supposions que ces protéines intervenaient dans le trafic intracellulaire car elles interagissaient avec des protéines impliquées dans l'endocytose et le trafic vésiculaire (<https://associomics.dpb.carnegiescience.edu/Associomics/Home.html>). En 2016, nous avons décidé de réaliser ce projet en collaboration avec l'équipe du professeur Jan Martinec de l'Institut de Botanique Expérimentale (IEB) de Prague, République Tchèque, qui possédait une expertise des flotillines. Le projet comprenait deux axes de recherche : l'étude du rôle éventuel des flotillines dans la nutrition métallique d'un point de vue physiologique et l'impact des flotillines sur l'endocytose d'IRT1 chez *Arabidopsis thaliana*. Ce projet de recherche a bénéficié en 2017 et 2018 d'un financement PHC Barrande (voir CV). Cette collaboration impliquait Jan Martinec et moi-même en tant que coordinateurs scientifiques ainsi qu'Amanda

Martin-Barranco et Michal Danek qui réalisaient une thèse, respectivement sous ma direction et celle de Jan Martinec. Amanda Martin Barranco s'est rendue à Prague en mai 2018 et Michal Danek est venu à l'I2BC en juin 2017 et octobre 2018 afin de réaliser des expérimentations. J'ai supervisé le travail de Michal Danek durant ses séjours en France.

En vue d'étudier un rôle éventuel des flotillines dans la nutrition en fer chez *Arabidopsis thaliana*, le phénotype de mutants perte de fonction *flot1*, *flot2* et *flot3* a été analysé en réponse à la disponibilité en fer. Des résultats préliminaires montrent que les mutants *flot1* et *flot3* présentent des racines plus courtes que les plantes sauvages lors d'un déficit en fer, ce qui est une caractéristique d'une hypersensibilité à la carence en fer, cette situation étant révertée par l'ajout de fer. En revanche, le mutant *flot2* se comporte comme des plantes sauvages en absence de fer. Ces résultats doivent maintenant être confirmés.

Si IRT1 subit une endocytose médiée par les flotillines, il est possible qu'IRT1 interagisse avec ces dernières. Néanmoins, des tests d'interaction "split-ubiquitin" ne nous ont pas permis de révéler une interaction entre IRT1 et les protéines Flot1, Flot2 ou Flot3. Nous ne pouvons cependant pas exclure qu'IRT1 puisse interagir indirectement avec certaines flotillines, au sein d'un complexe. Afin de déterminer si les flotillines sont impliquées dans certains mécanismes d'endocytose d'IRT1, nous avons réalisé des analyses de co-localisation dans la racine d'*Arabidopsis* entre IRT1-mCitrine et les protéines Flot1, Flot2 et Flot3 fusionnées à la mCherry. Nos résultats montrent que : (i) Flot2 et Flot3 sont exclusivement localisées au niveau de la membrane plasmique au contraire de Flot1 qui est présente également dans des endosomes distincts de ceux contenant IRT1, (ii) Flot1, Flot2 et Flot3 sont localisées dans des nanodomains de la membrane plasmique distincts de ceux marqués par IRT1, (iii) un traitement court avec un excès de métaux non ferreux, qui entraîne l'endocytose d'IRT1, n'induit pas de co-localisation entre IRT1 et Flot1/Flot2/Flot3 dans des endosomes ou dans des nanodomains de la membrane plasmique. En parallèle de ces analyses, nous avons réalisé des croisements entre le mutant *flot1* et la lignée exprimant IRT1-mCitrine afin de déterminer, par TIRF, si la cinétique d'internalisation d'IRT1 depuis la membrane plasmique était altérée. Cette analyse devrait permettre de trancher sur un rôle éventuel de Flot1 dans l'endocytose d'IRT1.

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de Jan Martinec, et indépendamment de mon projet sur IRT1, j'ai participé à un travail permettant d'établir un interactome de la protéine Flot2 (Junkova et al., 2018), principalement à travers la formation de Michal Danek à certaines techniques de mesures d'interactions entre protéines. En nous basant sur les fonctions des protéines retrouvées dans cet interactome, nous avons proposé que les complexes Flot2 pourraient être impliqués dans les interactions plante-pathogène, le transport de l'eau et le trafic intracellulaire. Il est intéressant de mentionner que la protéine HIR2 interagit avec Flot2.

II.4.4.5 Rôle de PDI5 dans la maturation de la protéine IRT1 et impact sur l'homéostasie du fer

II.4.4.5.1 Interaction entre IRT1 et PDI5, localisation de la protéine PDI5 dans la racine d'Arabidopsis

Riadh Takouachet, un étudiant en Master 2 que j'ai supervisé durant son stage réalisé dans notre laboratoire en 2018, a été impliqué dans la réalisation des travaux décrits ci-dessous.

Au cours de l'approche visant à identifier des protéines interagissant avec IRT1, nous avons isolé PDI5 dont la fonction est de catalyser la formation de ponts disulfures chez des protéines substrats. PDI5 pourrait jouer un rôle dans le repliement correct de la protéine IRT1 et influencer son activité et donc être indirectement un acteur du maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis*. Tout d'abord, l'interaction entre IRT1 et PDI5 a été confirmée par la technique du "split-ubiquitin" et doit maintenant être vérifiée *in planta*. PDI5 est décrite comme

étant principalement localisée au niveau du RE. Des analyses par microscopie de lignées transgéniques co-exprimant IRT1-mCitrine avec PDI5-mCherry ont montré que les deux protéines pouvaient être co-localisées au niveau du RE entourant le noyau des cellules épidermiques racinaires (Figure 18A). De façon intéressante, la protéine PDI5-GFP exprimée sous le contrôle du promoteur *PDI5* s'accumule préférentiellement dans les cellules de l'épiderme de la racine d'*Arabidopsis* (Figure 18B).

II.4.4.5.2 Etude du rôle de PDI5 dans l'homéostasie du fer

Afin d'étudier le rôle de PDI5 dans l'homéostasie du fer, nous avons isolé deux mutants *pdi5*, l'un présentant une très forte diminution du niveau de transcrite *PDI5* (*pdi5-1*), l'autre correspondant à un mutant perte de fonction (*pdi5-2*), puis nous avons analysé leur phénotype en réponse à la disponibilité en fer. En absence de fer et en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux, les mutants *pdi5-1* et *pdi5-2* sont plus chlorotiques que des plantes sauvages Col0, alors qu'en présence de fer ils présentent un phénotype comparable à celui de Col0 (Figure 18C). Des mesures de la longueur racinaire combinées à des tests statistiques nous ont permis de mettre en évidence une diminution de la longueur de la racine primaire chez les mutants *pdi5* en absence de fer par rapport aux plantes sauvages, un phénotype symptomatique d'une carence en fer exacerbée. La diminution de la longueur racinaire est plus importante chez le mutant perte de fonction *pdi5-2* que chez le mutant *pdi5-1* présentant simplement une diminution de transcrite. En présence de fer, les deux mutants *pdi5* ne présentent pas de racines statistiquement plus courtes que celles de Col0. Il apparaît donc que PDI5 joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie du fer chez *Arabidopsis thaliana*.

La carence en fer exacerbée observée chez les mutants *pdi5* pourrait résulter d'une dérégulation des niveaux d'accumulation de la protéine IRT1, engendrant ainsi une perturbation de l'homéostasie du fer. Etant donné la fonction putative de PDI5 sur la formation des ponts disulfures et l'interaction physique observée entre PDI5 et IRT1, nous avons émis l'hypothèse que PDI5 pourrait jouer un rôle dans la stabilité d'IRT1 via un mécanisme post-traductionnel. Pour tester ce scénario, en s'affranchissant des mécanismes de régulation transcriptionnels d'IRT1 par le fer, la protéine IRT1-mCitrine a été exprimée sous le contrôle du promoteur constitutif *35S* dans Col0 et dans le mutant *pdi5-2*, après croisement. Des immunoblots ont montré que la protéine IRT1-mCitrine était moins abondante chez le mutant *pdi5-2* que chez Col0 (Figure 18D). Les niveaux d'ARNm *IRT1-mCitrine* étant identiques pour Col0 et le mutant *pdi5-2*, ces résultats suggèrent que PDI5 joue un rôle dans la stabilité de la protéine IRT1. Une hypothèse est que des défauts de repliement d'IRT1 chez les mutants *pdi5* pourraient entraîner sa rétention dans le RE suivie de sa dégradation par le système endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD).

II.4.4.5.3 Rôle de PDI5 dans la formation des ponts disulfures chez IRT1

PDI5 pourrait influencer l'activité d'IRT1 en intervenant dans le repliement de ce transporteur via la formation de ponts disulfures. Afin de tester un rôle direct de PDI5 sur l'activité d'IRT1 dans un système hétérologue, nous avons utilisé le double mutant de levure *fet3fet4* dont la machinerie d'acquisition du fer est non fonctionnelle et qui est donc incapable de pousser sur un milieu pauvre en fer. L'expression hétérologue d'IRT1 dans cette souche permet l'entrée de fer et restaure la capacité des levures à croître sur un milieu carencé en fer (Eide et al., 1996). Nous avons observé que la co-expression de PDI5 avec IRT1 permettait aux levures *fet3fet4* de mieux se développer sur un milieu pauvre en fer par rapport à celles exprimant uniquement IRT1. D'autre part, l'expression de PDI5 seule ne conférait pas aux

levures un gain de croissance. PDI5 aurait donc un effet positif sur l'activité d'IRT1, bien que ces données doivent être confirmées.

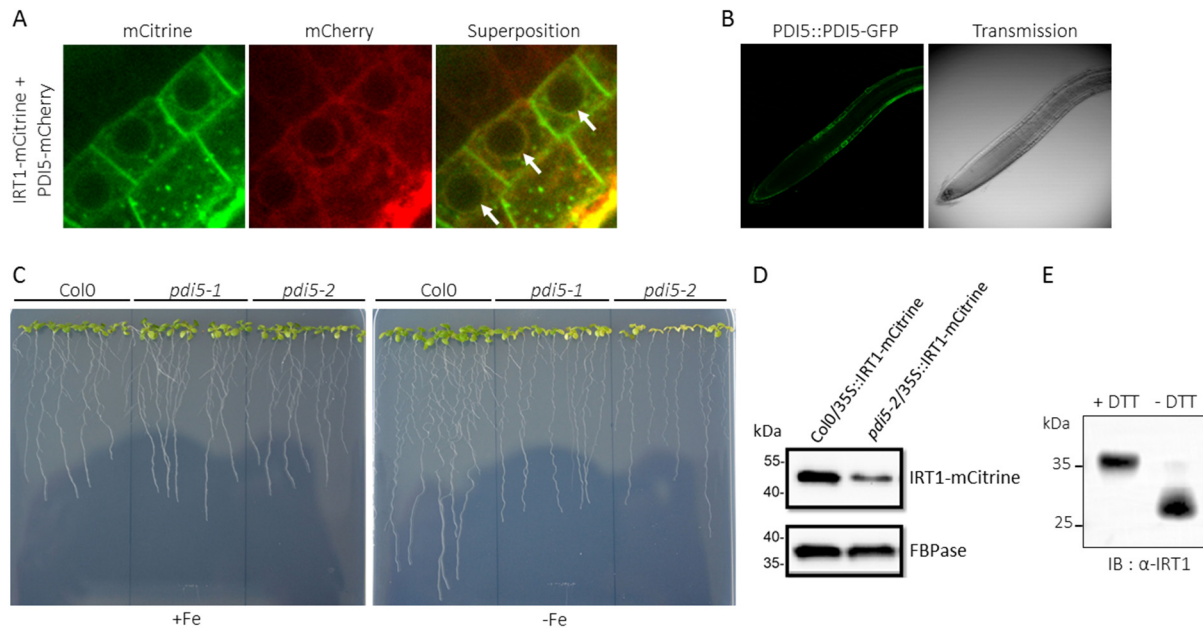


Figure 18 : PDI5 joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie du fer chez Arabidopsis. (A) Analyse confocale de cellules de la pointe racinaire de lignées transgéniques d'Arabidopsis co-exprimant IRT1-mCitrine sous le contrôle du promoteur *IRT1* et PDI5-mCherry sous le contrôle du promoteur *35S*. Les plantes ont été cultivées sur un milieu MS/2 sans fer en présence de concentrations physiologiques de métaux non ferreux. Les flèches blanches indiquent une co-localisation entre IRT1-mCitrine et PDI5-mCherry au niveau du RE entourant le noyau. (B) Analyse de la localisation de la protéine PDI5-GFP exprimée sous le contrôle du promoteur *PDI5* au niveau de la pointe racinaire. (C) Analyse phénotypique de deux mutant *pdi5* en réponse à la carence en fer. Des plantes Col0 (contrôle), *pdi5-1* et *pdi5-2* ont été cultivées 14 jours sur un milieu MS/2 contenant 50 µM de Fe-EDTA (+Fe) ou dépourvu de fer (-Fe) et contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux. (D) Immunodétection des protéines IRT1-mCitrine (anti-GFP) et FBPase (anti-FBPase, contrôle de charge) dans des protéines totales de racines de plantes Col0/35S::IRT1-mCitrine et *pdi5-2/35S::IRT1-mCitrine* ayant poussé 14 jours sur un milieu MS/2 sans fer et contenant des concentrations physiologiques de métaux non ferreux. (E) Immunoblot anti-IRT1 réalisé sur des extraits protéiques préparés en présence ou en absence de DTT à partir de racines de plantes sauvages cultivées en absence de fer.

En parallèle, nous avons cherché à savoir si IRT1 comportait des ponts disulfures intramoléculeaires en réalisant des immunoblots sur des extraits protéiques de racines de plantes sauvages exprimant IRT1 endogène, en présence ou non d'un agent réducteur, le DTT. En effet il est décrit dans la littérature qu'un décalage vers des poids moléculaires plus faibles en absence d'agent réducteur traduit la présence de ponts disulfures intramoléculeaires (Matsusaki et al., 2016), la protéine ayant dans ces conditions une structure plus compacte. En présence de DTT, IRT1 migre comme attendu à 36 kDa alors qu'en absence de DTT la protéine présente un poids moléculaire apparent beaucoup plus faible, montrant ainsi qu'IRT1 contient des ponts disulfures intramoléculeaires (Figure 18E).

En conclusion, l'étude des mutants *pdi5* a permis de montrer que PDI5 est impliquée dans l'homéostasie du fer chez Arabidopsis. Etant donnée la fonction putative de PDI5, le fait qu'elle interagisse physiquement avec IRT1 et qu'elle soit importante pour son accumulation, PDI5 pourrait jouer un rôle dans le repliement correct de la protéine IRT1 via la formation de ponts disulfures et ainsi influencer son activité.

Dans le futur, il sera intéressant de déterminer le nombre de ponts disulfures intramoléculeaires présents chez IRT1 en utilisant un réactif appelé mmPEG24 qui réagit avec

les groupements thiols réduits mais pas avec ceux oxydés (impliqués dans un pont disulfure) conduisant à un déplacement de masse de 2 kDa (par groupement) qui peut être révélé par SDS-PAGE (Ramesh et al., 2016). Parmi les dix cystéines présentes dans IRT1, nous pourrions éventuellement, dans une approche à plus long terme, déterminer quelles sont celles impliquées dans la formation du ou des ponts disulfures, via une stratégie de mutagenèse dirigée combinée à des analyses biochimiques utilisant le réactif mmPEG24. Il serait alors intéressant d'analyser la localisation subcellulaire de ces formes mutées d'IRT1 afin de mettre en évidence une éventuelle dérégulation de leur trafic telle que la rétention dans le RE. En outre, dans le but d'expliquer le phénotype des mutants *pdi5* en absence de fer, nous déterminerons si la formation des ponts disulfures au sein d'IRT1 est affectée chez les mutants *pdi5* par rapport à des plantes sauvages en utilisant le mmPEG24. Les résultats qui seront obtenus, combinés aux données générées préalablement, devraient conduire prochainement à la rédaction d'un manuscrit.

III. Projet de recherche et direction de recherche

III.1 Projet de recherche : Protéines HIR et nanodomains membranaires chez *Arabidopsis thaliana*

III.1.1 Contexte

L'objectif principal du projet présenté ci-dessous est de développer un nouveau domaine de recherche visant à mieux comprendre la fonction des protéines HIR et plus largement des nanodomains membranaires chez les plantes. Afin de réaliser ce projet, j'ai rejoint en janvier 2020 l'équipe "Eau, Signalisation et Architecture Hydraulique" (AQUA) dirigée par Christophe Maurel, dans le laboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes (BPMP), à Montpellier. Pour mener à bien ce projet je bénéficie actuellement d'un financement de l'ANR "Jeunes Chercheuses Jeunes Chercheurs" à travers le projet NUTRIR, dont je suis le coordinateur (voir CV). Dans ce cadre, un post-doctorant devait normalement être recruté en mars 2020 pour une durée minimum de 24 mois. Malheureusement, étant donné la situation actuelle, ce recrutement a été reporté de quelques mois. En outre, j'ai proposé en mars 2020, auprès de l'école doctorale GAIA de Montpellier, un sujet de thèse en relation avec le projet exposé ci-dessous. J'ai retenu un candidat qui présentera prochainement le concours de l'école doctorale.

Avant de présenter mon projet de recherche, je souhaite introduire un certain nombre de notions importantes pour sa compréhension. Actuellement le rôle des protéines HIR, qui sont spécifiques des plantes, reste énigmatique et ne se limite probablement pas à la défense de la plante contre les pathogènes, comme décrit jusqu'à présent dans la littérature. En effet, nos travaux mettent en évidence que HIR2 est notamment impliquée dans le maintien de l'homéostasie des métaux, montrant pour la première fois à notre connaissance le rôle d'une protéine des nanodomains membranaires dans la nutrition métallique chez les plantes. L'implication des HIR dans des processus biologiques variés est étayée par le fait que plusieurs isoformes HIR (HIR2, HIR3 et HIR4) ont été récemment démontrées comme faisant partie des interactomes des aquaporines PIP2;1 et PIP1;2 d'*Arabidopsis thaliana* (Bellati et al., 2016). Bien que l'impact physiologique de ces interactions reste à déterminer, il apparaît que les HIR pourraient jouer un rôle dans la régulation du transport de l'eau ou d'autres composés comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est également transporté par PIP2;1 (Rodrigues et al., 2017). Au-delà des interactions entre les protéines PIP et HIR, il est intéressant de mentionner que plus

de 20% des protéines interagissant avec PIP2;1 et PIP1;2 sont enrichies dans les nanodomains membranaires (Bellati et al., 2016), soulignant le lien étroit entre ces compartiments cellulaires et la fonction des aquaporines. Ce résultat est en adéquation avec des observations préalables montrant que différentes isoformes PIP sont présentes dans des fractions DIM chez les plantes (Borner et al., 2005; Morel et al., 2006).

En permettant le passage de l'eau à travers les membranes biologiques, les aquaporines jouent un rôle essentiel dans la croissance et le développement des plantes (Maurel et al., 2015; Laloux et al., 2018). L'activité de canal des aquaporines de plantes est étroitement régulée notamment via des mécanismes de phosphorylation (Tornroth-Horsefield et al., 2006; Rodrigues et al., 2017; Prado et al., 2019). Comme le montre mes travaux ainsi que ceux de collègues, un autre niveau de contrôle des aquaporines s'opère au niveau de leur trafic intracellulaire et de leur endocytose (Zelazny et al., 2007; Zelazny et al., 2009; Sorieul et al., 2011; Besserer et al., 2012; Hosity et al., 2015; Wudick et al., 2015). Il apparaît que les aquaporines, notamment les membres de la sous-famille PIP qui sont au nombre de treize chez *Arabidopsis thaliana*, constituent d'excellents modèles d'étude de la dynamique intracellulaire et de l'activité des protéines membranaires chez les plantes. Comme mentionné ci-dessus, certaines aquaporines PIP transportent également H₂O₂ (Tian et al., 2016; Rodrigues et al., 2017) qui constitue une molécule de signalisation permettant une réponse adaptée de la plante, notamment à l'acide abscissique ou aux pathogènes (Smirnoff and Arnaud, 2019). Chez les plantes, H₂O₂ est également généré en réponse à un stress osmotique via l'action de la NADPH oxydase Respiratory burst oxidase homolog D (RbohD) qui produit à partir d'O₂ apoplastique des ions O₂⁻ qui seront ensuite transformés en H₂O₂ via l'action d'une superoxyde dismutase (SOD) (Martiniere et al., 2019). Il est intéressant de noter que chez les mammifères, la NADPH oxydase NOX2 et l'aquaporine AQP3, qui produisent et transportent H₂O₂, respectivement, interagissent physiquement, ce qui pourrait permettre de faciliter le mouvement d'H₂O₂ à l'intérieur de la cellule (Hara-Chikuma et al., 2015). Chez les plantes, un mécanisme similaire n'a pour l'instant pas été décrit mais il est envisageable que RbohD et certaines PIP, qui sont toutes les deux présentes dans des nanodomains de la membrane plasmique (Li et al., 2011; Hao et al., 2014), puissent interagir et faire partie d'une plateforme de signalisation H₂O₂.

III.1.2 Objectifs

- Le premier axe de recherche consiste à caractériser la famille des protéines HIR d'*Arabidopsis thaliana*, afin de mettre en lumière leur rôle dans la cellule et découvrir de nouvelles fonctions physiologiques. Premièrement, en utilisant des approches de microscopie, nous étudierons la dynamique intracellulaire des différentes isoformes HIR, comme détaillé ci-après. Deuxièmement, pour découvrir de nouvelles fonctions de la protéine HIR2, les protéines interagissant avec cette dernière seront isolées en combinant deux approches différentes, puis la signification de ces interactions sera analysée.

- Le second axe de recherche est une approche ciblée visant à comprendre la fonction de l'interaction entre les protéines HIR et les aquaporines PIP. Les protéines HIR pourraient jouer le rôle de protéines d'assemblage permettant de recruter les PIP dans des nanodomains membranaires spécifiques. D'autre part, les HIR pourraient éventuellement être impliquées dans une voie d'endocytose des PIP indépendante de la clathrine, les PIP étant déjà connues pour être internalisées de manière nanodomaine-dépendante. Je propose donc d'analyser ces deux hypothèses et de déterminer, d'un point de vue physiologique, quel est l'impact de l'interaction HIR-PIP sur le transport de l'eau mais également de H₂O₂.

- Un troisième axe de recherche consistera à étudier la possibilité que RbohD et certaines aquaporines interagissent physiquement au sein de nanodomains membranaires

spécifiques pour constituer une plateforme de signalisation H₂O₂ assurant la production et le transport de cette molécule qui constitue un messager secondaire essentiel.

III.1.3 Projet scientifique

III.1.3.1 Axe 1 : Caractérisation de la famille des protéines HIR : dynamique intracellulaire et nouvelles fonctions

III.1.3.1.1 Dynamique intracellulaire des protéines HIR

Chez les animaux, les protéines contenant un domaine SPFH ont été détectées dans divers compartiments subcellulaires tels que la membrane plasmique, les endosomes, le réticulum endoplasmique et la membrane mitochondriale (Browman et al., 2007). Concernant la famille HIR, une étude récente utilisant des fusions HIR fluorescentes exprimées sous le contrôle du promoteur *35S*, montre que les isoformes HIR1, HIR2 et HIR4 sont présentes dans des nanodomains de la membrane plasmique alors que HIR3 est localisée au niveau du tonoplaste de manière plus diffuse (Danek et al., 2020). Dans un premier temps, nous générerons des lignées transgéniques, exprimant des fusions fonctionnelles HIR-GFP/mCherry sous le contrôle de promoteurs endogènes *HIR*, qui constitueront un outil important pour la réalisation de ce projet. Comme indiqué précédemment, nous disposons déjà d'une fusion fonctionnelle HIR2-mCherry exprimée sous le contrôle du promoteur *HIR2*. Par la suite, des analyses de co-localisation entre HIR2, HIR4, éventuellement HIR3 et des protéines marqueurs des nanodomains membranaires de plantes, telles que les rémorines et les flotillines, permettront d'établir une carte relative des nanodomains HIR dans la cellule (Raffaele et al., 2009; Li et al., 2012; Jarsch et al., 2014). Bien qu'il ait déjà été démontré que HIR1 co-localise partiellement avec la rémorine REM1.3 (Lv et al., 2017), HIR1 sera également incluse dans notre analyse car nous utiliserons d'autres marqueurs de nanodomains membranaires. En outre, nous déterminerons si HIR1, HIR2 et HIR4 sont localisées dans les mêmes nanodomains. Ceci est probable étant donné que ces protéines ont la capacité de former des hétéro-oligomères (Qi et al., 2011).

Jusqu'à présent, comment les protéines HIR, qui ne possèdent pas de domaine transmembranaire, sont adressées à la membrane plasmique et recrutées dans des nanodomains membranaires demeure inconnu. Cependant, les quatre isoformes HIR sont myristoylées en position N-terminale (glycine 2) (Majeran et al., 2018) et S-acylées (Hemsley et al., 2013), ce qui pourrait constituer un signal d'adressage. Bien que les acides aminés sur lesquels la S-acylation se produit n'aient pas été jusqu'à présent identifiés, une ou deux cystéines présentes dans la partie N-terminale des HIR pourraient constituer des cibles putatives. L'importance de ces modifications dans la localisation des HIR sera étudiée par microscopie en utilisant des formes mutées des HIR chez lesquels la myristoylation, la S-acylation, ou les deux simultanément, sont abolies. Étant donné que les HIR forment des oligomères (Qi et al., 2011), les versions mutées des protéines HIR pourraient avoir un effet négatif dominant, ce qui constituerait un outil intéressant. Afin de mieux comprendre l'adressage des protéines HIR, nous pourrions également étudier le rôle du domaine SPFH, étant donné que ce type de domaine peut se lier aux stéroïdes chez les animaux (Huber et al., 2006). En outre, la phosphorylation de certaines protéines résidentes des nanodomains de la membrane plasmique régule leur organisation au sein de ces domaines, comme démontré pour la rémorine REM1.3 (Perraki et al., 2018). Des données de phospho-protéomique obtenues dans notre équipe montrent que certaines HIR sont phosphorylées. Nous étudierons un rôle éventuel de la phosphorylation dans la dynamique intracellulaire des HIR en générant des formes mutées des HIR mimant une phosphorylation ou une déphosphorylation constitutive. Selon le niveau de résolution souhaité,

les analyses décrites ci-dessus seront réalisées par microscopie de type "spinning disk" ou à haute résolution via la technique de "single-particle-tracking photoactivated localization microscopy" (sptPALM) qui est maîtrisée au laboratoire. Pour le sptPALM, des fusions HIR-mEOS devront être générées.

En formant des complexes multimériques et en se liant à certains lipides, les protéines à domaine SPFH pourraient participer activement à la formation de nanodomains membranaires (Browman et al., 2007). Il est intéressant de noter que des travaux récents, réalisés chez les plantes, ont montré que la surexpression de la rémorine REM1.2 favorisait l'assemblage de nanodomains (Huang et al., 2019). Lors de cette étude, les auteurs ont utilisé la sonde di-4-ANEPPDHQ qui permet de détecter les modifications de potentiels dipolaires de la bicouche lipidique via un changement de la longueur d'onde d'émission de la sonde. Dans une phase désordonnée liquide (non-nanodomaine) et une phase ordonnée liquide (nanodomaine), le di-4-ANEPPDHQ présente des pics d'émission à 630 nm et 570 nm, respectivement. Dans le but d'analyser un rôle éventuel des HIR dans la création de certains nanodomains membranaires, des racines de mutants perte de fonction *hir* (disponibles au laboratoire) et de plantes sauvages seront marquées avec le di-4-ANEPPDHQ, puis nous comparerons la ségrégation latérale des espèces lipidiques en phase désordonnée liquide ou en phase ordonnée liquide, comme décrit par (Huang et al., 2019). Nous analyserons tout d'abord des mutants *hir* simples, mais en fonction des résultats des mutants *hir* multiples pourront être générés pour contourner une redondance fonctionnelle éventuelle. Des lignées CRISPR chez lesquelles plusieurs gènes *HIR* sont disruptés (en cours de génération) seront également utilisées au cours de cette analyse. En outre, des lignées transgéniques sur-exprimant les protéines HIR pourront éventuellement être générées.

L'analyse du profil d'expression et de la localisation subcellulaire des HIR ainsi que l'établissement d'une carte relative des nanodomains HIR dans les cellules végétales constituent un travail plutôt descriptif mais qui générera des données fondamentales sur cette famille de protéines encore très mal connues. Dans cette section, je propose également deux approches plus ambitieuses : (i) la détermination du mode d'adressage des HIR dans les nanodomains membranaires, (ii) l'analyse d'un rôle éventuel des HIR dans la création de nanodomains spécifiques.

III.1.3.1.2 Identification de nouvelles protéines interagissant avec HIR2 en vue de mieux comprendre sa fonction

Les fonctions de HIR2 restent mal connues et ne sont probablement pas limitées à la nutrition en fer et à la défense des plantes contre les pathogènes. D'autre part, les mécanismes impliqués dans l'acheminement de HIR2 et plus largement des protéines contenant des domaines SPFH vers les nanodomains membranaires ainsi que les processus assurant le "turn-over" de ces protéines demeurent totalement inconnus. Pour découvrir de nouveaux rôles de HIR2 et mieux comprendre comment sa dynamique intracellulaire est contrôlée, je propose de rechercher des protéines interagissant avec HIR2 par deux approches différentes : (i) des immunopurifications de HIR2-GFP, exprimée dans des lignées transgéniques d'*Arabidopsis*, combinées à la détection des protéines co-purifiées par spectrométrie de masse, (ii) un crible "split-ubiquitin" utilisant HIR2. Quelle que soit la technique utilisée, la présence de faux positifs est un problème majeur lors des approches de crible visant à rechercher des interactions protéine-protéine. La combinaison des résultats des deux approches indépendantes décrites ci-dessus nous permettra d'accroître considérablement la fiabilité de l'interactome HIR2. Néanmoins, il est important de mentionner qu'en raison de leurs spécificités, la co-IP et le "split-ubiquitin" peuvent révéler des interactions différentes mais néanmoins pertinentes. En effet, la

co-IP a le grand avantage de permettre l'identification d'interactions protéine-protéine dans des cellules végétales qui peuvent ne pas être révélées dans un système hétérologue tel que la levure. D'autre part, le "split-ubiquitin" est très intéressant pour identifier des interactions faibles ou transitoires pouvant être perdues au cours des étapes de solubilisation et de purification de la co-IP. Parmi les candidats identifiés lors de ces approches, nous pensons trouver de nouvelles protéines cargos recrutées dans des nanodomains membranaires contenant HIR2, telles que des transporteurs, des canaux ou des récepteurs, mais également des protéines d'assemblage pouvant interagir avec HIR2 pour assurer la formation de nanodomains et/ou leur maintien. Ces candidats pourraient inclure d'autres protéines à domaine SPFH et des protéines déjà connues pour être localisées dans les nanodomains membranaires. Un autre groupe de candidats très intéressant pourrait correspondre à des protéines importantes pour le trafic de HIR2, telles que des protéines impliquées dans la voie de sécrétion ou dans les voies d'endocytose.

La validation des interacteurs de HIR2 sera effectuée en utilisant plusieurs approches complémentaires. Premièrement, les interactions entre HIR2 et les protéines candidates seront rapidement confirmées en utilisant par exemple le BiFC. Ensuite, les protéines validées seront fusionnées à une protéine fluorescente telle que la mCherry et exprimées chez *Arabidopsis*, sous le contrôle de leur propre promoteur ou d'un promoteur constitutif tel que pUBQ10. Ces lignées transgéniques seront utiles pour : (i) déterminer par microscopie la localisation tissulaire et subcellulaire des protéines candidates et la co-localisation possible avec HIR2-GFP dans des nanodomains membranaires après croisement avec des lignées transgéniques HIR2-GFP, (ii) confirmer l'interaction physique entre les candidats étiquetés avec la mCherry et HIR2-GFP en effectuant des co-IP, (iii) étudier plus précisément ces interactions avec une grande résolution temporelle et spatiale par FRET-FLIM.

En parallèle, nous réaliserons les caractérisations moléculaires et phénotypiques nécessaires pour comprendre l'importance de ces interactions. Si nous pensons que HIR2 joue un rôle de protéine d'assemblage permettant le recrutement de la protéine candidate dans des nanodomains membranaires spécifiques, nous déterminerons si la localisation et la dynamique de cette protéine sont perturbées chez le mutant *hir2*. Si la fonction de la protéine candidate est connue, nous entreprendrons l'analyse phénotypique appropriée des mutants *hir2* afin de mettre en évidence le rôle de HIR2 dans une fonction physiologique donnée (absorption de nutriments, réponse hormonale, signalisation, etc...). Si la fonction du candidat est inconnue, nous isolerons des mutants perte de fonction des gènes correspondants et effectuerons des analyses phénotypiques afin de mieux comprendre son rôle physiologique. Par ailleurs, certaines protéines candidates pourraient être importantes pour l'adressage et le maintien de HIR2 dans les nanodomains membranaires. Dans ce cas, nous déterminerons si la dynamique intracellulaire de HIR2 est perturbée dans les mutants perte de fonction correspondant, qui auront été isolés au préalable. Si la localisation de HIR2 reste inchangée chez ces mutants, une stratégie de gain de fonction pourra être utile pour contourner une redondance éventuelle due à la présence d'homologues.

Nous nous attendons à ce que les approches proposées ci-dessus fournissent des informations importantes pour la compréhension du rôle et du fonctionnement de HIR2 qui restent énigmatiques. En ce qui concerne l'étude des protéines candidates potentiellement impliquées dans la dynamique intracellulaire de HIR2, je pense posséder l'expertise nécessaire pour étudier ces mécanismes car je m'intéresse depuis longtemps au trafic des protéines dans les cellules végétales. Nous nous attendons également à trouver des transporteurs, des canaux ou des récepteurs régulés par HIR2 et pour lesquels nous n'avons peut-être pas une expertise suffisante. Selon leur fonction, nous établirons des collaborations avec les groupes de recherche appropriés pour bénéficier de leurs connaissances et optimiser pleinement notre travail, en

particulier sur les aspects physiologiques. Notamment, s'il s'agit de transporteurs et de canaux liés à la nutrition minérale chez les plantes (potassium, nitrate etc...), je compte bénéficier de l'expertise d'autres groupes de recherche du laboratoire BPMP.

III.1.3.2 Axe 2 : Rôle des HIR dans la dynamique intracellulaire des aquaporines PIP et impact sur le transport de l'eau et de H₂O₂ chez *Arabidopsis*

III.1.3.2.1 Rôle des HIR dans le contrôle de la dynamique de PIP2;1

Les isoformes HIR2, HIR3 et HIR4 ont été démontrées comme faisant partie des interactomes des aquaporine PIP2;1 et PIP1;2 d'*Arabidopsis thaliana* (Bellati et al., 2016), mais la signification de ces interactions reste énigmatique. Dans une approche ciblée, je propose d'étudier le rôle des protéines HIR dans la régulation des aquaporines en me concentrant essentiellement, dans un premier temps, sur la protéine PIP2;1 qui est l'isoforme préférentiellement étudiée par l'équipe AQUA. Tout d'abord les interactions entre PIP2;1 et les protéines HIR seront vérifiées par co-IP, en utilisant des lignées transgéniques d'*Arabidopsis* co-exprimant les protéines de fusions GFP-PIP2;1 et HIR-mCherry sous le contrôle de promoteurs endogènes. En parallèle, nous déterminerons par des approches de microscopie les niveaux de co-localisation dans les nanodomains de la membrane plasmique entre GFP-PIP2;1 et les protéines de fusion HIR-mCherry.

Une hypothèse est que les HIR pourraient jouer un rôle de protéines d'assemblage assurant le recrutement de PIP2;1 dans certains nanodomains de la membrane plasmique. Afin de tester cette hypothèse, nous concentrerons dans un premier temps notre étude sur le couple HIR2/PIP2;1 étant donné que nous disposons déjà du matériel biologique permettant l'analyse de HIR2 (mutants perte de fonction, lignées transgéniques exprimant des versions étiquetées de HIR2, etc...). La localisation dans des nanodomains de la membrane plasmique de PIP2;1 exprimée dans des mutants *hir2* et dans des plantes sauvages sera comparée par microscopie de type spinning-disk (fusion GFP-PIP2;1) ou haute résolution par sptPALM (fusion PIP2;1-mEOS). Notre but est de mettre en évidence une éventuelle dérégulation de la localisation de PIP2;1 en absence de HIR2. Les résultats obtenus par ces approches de microscopie seront confortés par des analyses biochimiques visant à déterminer si l'absence de HIR2 (mutant *hir2*) induit une relocalisation de GFP-PIP2;1 des DIM, correspondant à une fraction membranaire issue des nanodomains, vers des fractions membranaires sensibles aux détergents non ioniques. Si nous ne mettons pas en évidence d'altération de la distribution de PIP2;1 chez le mutant *hir2*, nous réaliserons alors le même type d'analyse chez des mutants perte de fonction *hir* multiples ou dans des lignées CRISPR chez lesquelles plusieurs gènes *HIR* sont disruptés et qui sont en cours de génération.

La protéine PIP2;1 peut être internalisée depuis la membrane plasmique via des nanodomains membranaires contenant Flot1 et cette voie d'endocytose peut être stimulée par des facteurs environnementaux tels que des stressés salins (Li et al., 2011). Comme mentionné précédemment, une hypothèse est que HIR2, qui comme Flot1 appartient à la famille des protéines à domaine SPFH, pourrait être impliquée dans une voie d'endocytose. Cette notion est renforcée par le fait que HIR2 interagit physiquement avec certaines flotillines (Junkova et al., 2018). Alternativement à l'hypothèse selon laquelle HIR2 jouerait un rôle de protéine d'assemblage permettant de recruter PIP2;1 dans les nanodomains membranaires, il est envisageable que HIR2 puisse participer à certains mécanismes d'endocytose de PIP2;1. Afin d'étudier cette hypothèse, les cinétiques d'internalisation de GFP-PIP2;1 exprimée dans les mutants *hir2* et dans des plantes sauvages seront comparées par des analyses de TIRF. Ces analyses seront réalisées sur les cellules de l'épiderme de la racine d'*Arabidopsis* cultivée dans des conditions standard ou en présence de NaCl (stress). Il sera également intéressant

d'effectuer le même type d'analyse TIRF sur des mutant *hir* multiples et des lignées CRISPR chez lesquelles plusieurs gènes *HIR* sont disruptés.

Dans cette section, je propose d'approfondir l'étude du rôle potentiel des HIR (protéine d'assemblage/endocytose indépendante de la clathrine) en utilisant une protéine modèle autre qu'IRT1 : PIP2;1. Etant donné les fonctions essentielles assurées par les PIP (transport d'eau et de H₂O₂), une régulation de ces protéines par les HIR ou plus généralement les nanodomaines membranaires pourrait avoir un fort impact sur la physiologie de la plante.

III.1.3.2.2 Etude de l'impact physiologique de l'interaction HIR-PIP chez Arabidopsis

Il a été démontré que l'environnement lipidique pouvait modifier l'activité d'aquaporines animales ou de plantes (Tong et al., 2012; Kai and Kaldenhoff, 2014). En permettant le recrutement des PIP dans certains nanodomaines membranaires, les HIR pourraient moduler l'activité des PIP et ainsi se comporter comme des régulateurs indirects du transport de l'eau et d'autres molécules telles que H₂O₂. Cette régulation indirecte par les HIR devrait également s'opérer si ces dernières sont impliquées dans l'endocytose des PIP. La capacité de transport de l'eau des racines (conductivité hydraulique des racines, L_{p_r}) est déterminée en grande partie par les aquaporines et notamment les PIP (Postaire et al., 2010; Peret et al., 2012). Afin de tester notre hypothèse, les L_{p_r} de différents mutants perte de fonction *hir* (simple ou multiples) et de lignées CRISPR chez lesquelles plusieurs gènes *HIR* sont disruptés seront comparées avec la L_{p_r} de plantes sauvages. Il est important de noter que HIR2 est l'isoforme HIR la plus fortement exprimée dans la racine d'*Arabidopsis* et s'accumule préférentiellement dans les cellules de l'épiderme (Martin-Barranco et al., en préparation). HIR2 pourrait donc avoir un effet prépondérant sur une régulation éventuelle de la L_{p_r}. Si nous parvenons à générer des versions négatives dominantes des protéines HIR (voir ci-dessus), il sera intéressant de mesurer l'impact de l'expression de ces protéines sur la L_{p_r}. Certaines aquaporines, telles PIP1;4 et PIP2;1 sont capables de transporter H₂O₂ en plus des molécules d'eau chez *Arabidopsis* (Tian et al., 2016; Rodrigues et al., 2017). Aussi, il me paraît intéressant d'analyser un rôle éventuel des HIR dans la régulation du transport de H₂O₂. Afin de quantifier l'accumulation de cette molécule dans la plante, nous utiliserons un senseur fluorescent appelé HyPer, dont les propriétés spectrales sont modifiées par la concentration en H₂O₂ (Rodrigues et al., 2017), ou le dihydroéthidium (DHE) dont la fluorescence augmente suite à l'oxydation par les ROS (Martiniere et al., 2019). En pratique, l'accumulation d'H₂O₂ chez les mutants *hir*/lignées CRISPR et des plantes sauvages sera comparée dans des conditions de culture standard mais également en réponse à un stress osmotique (300 mM de sorbitol) qui augmente l'accumulation des ROS chez *Arabidopsis* (Martiniere et al., 2019). Nous avons montré que les mutants *hir2* sur-accumulaient IRT1 ce qui pourrait résulter d'un défaut d'endocytose et de dégradation d'IRT1. Dans le contexte de ce projet, il sera intéressant de déterminer une éventuelle dérégulation des niveaux d'accumulation des protéines PIP chez les mutants *hir* et de corréliser ces résultats avec les mesures de conductivité hydraulique des racines ainsi que le transport d'H₂O₂. Il est important de mentionner que l'équipe AQUA a été pionnière dans la mesure de la conductivité hydraulique des racines. D'autre part, les senseurs HyPer et DHE décrits ci-dessus sont utilisés en routine dans l'équipe. Cette expertise devrait donc me permettre d'analyser rapidement un rôle éventuel des HIR sur le transport de l'eau et d'H₂O₂.

III.1.3.3 Axe 3 : Etude de la formation d'une plateforme putative de signalisation H₂O₂ localisée dans des nanodomains de la membrane plasmique

Les nanodomains membranaires pourraient constituer des plateformes de signalisation en regroupant des protéines spécifiques. Nous pensons que la protéine RbohD, qui est impliquée dans la production de H₂O₂, et certaines aquaporines, qui peuvent transporter cette même molécule, pourraient interagir au sein d'une plateforme de signalisation H₂O₂ présente dans certains nanodomains de la membrane plasmique (Figure 19). Cette hypothèse est soutenue par le fait que : (i) RbohD et les PIP sont présentes dans des nanodomains de la membrane plasmique (ii) chez les mammifères, la production et le transport de H₂O₂ sont couplés via l'interaction entre NOX2 et AQP3, (iii) RbohD interagit avec l'aquaporine PIP1;5 d'Arabidopsis comme démontré par "split-ubiquitin" (<https://associomics.dpb.carnegiescience.edu/Associomics/Home.html>).

Premièrement, nous déterminerons parmi les 13 PIP d'Arabidopsis quelles sont celles qui peuvent interagir avec RbohD en utilisant la technique du "split-ubiquitin". Nous porterons une attention toute particulière aux isoformes PIP1;4 et PIP2;1 qui sont déjà connues pour transporter H₂O₂ chez Arabidopsis (Tian et al., 2016; Rodrigues et al., 2017). Deuxièmement, ces interactions seront confirmées en plante en utilisant par exemple les techniques de BiFC et de FRET-FLIM ; l'interaction RbohD-PIP1;5 sera alors vérifiée. Il est important de noter que des fusions fonctionnelles fluorescentes des PIP et de RbohD sont actuellement disponibles (Luu et al., 2012; Hao et al., 2014). La technique du "split-ubiquitin" présente le grand avantage de pouvoir tester rapidement l'interaction éventuelle entre deux protéines, mais elle ne permet de détecter que des interactions directes. Cependant, RbohD et certaines PIP pourraient être présentes au sein d'une même plateforme protéique mais sans être directement liées. Selon les résultats du "split-ubiquitin", nous pourrions également analyser l'existence de complexes RbohD-PIP par co-IP. Jusqu'à présent PIP1;4 et PIP2;1 d'Arabidopsis ont été démontrées *in planta* comme transportant H₂O₂ mais d'autres isoformes transportent également cette molécule en système hétérologue : PIP2;2, PIP2;4, PIP2;5 et PIP2;7 (Bienert and Chaumont, 2014). S'il s'avère que RbohD interagit avec des PIP qui ne sont pas connues jusqu'à présent pour transporter H₂O₂, telle PIP1;5, nous testerons alors les capacités de transport de H₂O₂ de ces isoformes dans la levure, comme décrit par (Dynowski et al., 2008).

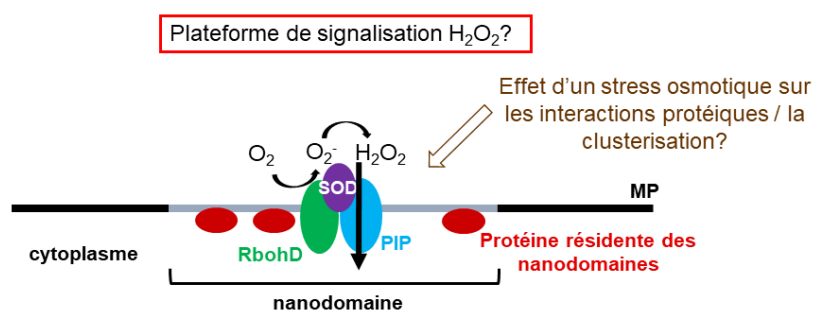


Figure 19 : Hypothèse de travail : une plateforme de signalisation H₂O₂ présente dans des nanodomains de la membrane plasmique chez Arabidopsis. La NADPH oxydase Respiratory burst oxidase homolog D (RbohD) produit à partir d'O₂ apoplastique des ions O₂⁻ qui sont ensuite transformés en H₂O₂ via l'action d'une superoxyde dismutase (SOD). Puis, H₂O₂ est transporté à l'intérieur de la cellule par une aquaporine PIP. Les protéines RbohD, SOD et PIP pourraient être localisées dans les mêmes nanodomains de la membrane plasmique et éventuellement interagir entre elles.

Si nous mettons en évidence que RbohD interagit avec certaines PIP, nous déterminerons par la suite par microscopie dans quelle mesure ces protéines sont co-localisées dans les nanodomains membranaires de racines de plantes cultivées dans des conditions

standard. S'il s'avère que les protéines HIR sont importantes pour le recrutement des PIP dans certains nanodomains membranaires, il sera intéressant de déterminer si la co-localisation et l'interaction entre RbohD et les PIP est maintenue en absence de HIR (mutants *hir*/lignées CRISPR). Certaines protéines peuvent être relocalisées dans des nanodomains membranaires en réponse à des stimuli. Ainsi, des approches de microscopie ont révélé que les protéines PIP2;1 et RbohD co-localisaient de manière accrue avec le marqueur de nanodomaine Flot1 en réponse à un stress salin (Li et al., 2011; Hao et al., 2014). Dans le cadre de ce projet, il sera intéressant de déterminer si un stress osmotique (300 mM de sorbitol), qui induit la production et l'accumulation de H₂O₂ chez *Arabidopsis* (Martiniere et al., 2019), résulte en une co-localisation accrue entre RbohD et certaines PIP dans les nanodomains membranaires. Nous compléterons ces travaux en analysant la proportion de ces protéines dans les fractions DIM et DSM préparées à partir de plantes traitées ou non avec du sorbitol. En parallèle, nous déterminerons si un stress osmotique induit une augmentation de l'interaction entre les protéines RbohD et les PIP.

Si nous mettons en évidence l'existence d'une plateforme de signalisation H₂O₂, au sein de laquelle RbohD et certaines PIP interagissent, il sera alors intéressant, dans une approche à long terme, de déterminer quelles peuvent être les autres composantes de cette plateforme. Les SOD pourraient constituer des candidats intéressants car, en permettant de générer H₂O₂, elles constituent un trait d'union entre la fonction de RbohD (production de O₂⁻) et des PIP (transport de H₂O₂) (Figure 19).

III.2 Direction de la Recherche

Dans les années à venir, je vais me consacrer à constituer un petit groupe de recherche qui aura pour but la réalisation du projet que je viens de détailler. Bien que les interactions au sein de l'équipe AQUA, que je viens de rejoindre, soient déjà fortes et très stimulantes, je pense qu'il sera nécessaire pour faire vivre ma thématique "nanodomains membranaires et HIR chez les plantes" qu'un certain nombre de personnes travaillent ensemble, échangent et confrontent leurs idées, construisent, tout cela dans un esprit d'émulation. Ce petit groupe comprendra un post-doctorant et je l'espère un ou plusieurs doctorant(e)s ainsi que des stagiaires, voire un/une technicien(ne). Outre la pertinence scientifique du projet, la gestion des différents membres de ce groupe sera une composante clef dans la réussite de ces travaux. Je présenterai, ci-dessous, ma vision de l'encadrement des doctorants et des post-doctorants.

La réalisation d'une thèse doit découler de l'envie de mieux comprendre et de décrypter le monde qui nous entoure. Pour moi, une motivation très saine peut être par exemple la joie de mettre à jour des mécanismes jusqu'alors inconnus, mais les raisons qui poussent une personne dans cette voie sont multiples et restent personnelles. Je trouve qu'il n'est pas toujours aisé pour un directeur de thèse de déceler si tel ou tel candidat réalisera une thèse de qualité mais certains critères tels que la motivation, l'enthousiasme et la capacité à se projeter dans le futur avec un objectif professionnel précis sont, à mon avis, des critères très importants. La thèse doit constituer une formation au métier de chercheur au cours de laquelle le doctorant, aidé de son directeur de thèse, apprend notamment à : (i) formuler des hypothèses et mettre en place les approches expérimentales adéquates, (ii) acquérir un esprit scientifique fécond et critique, (iii) respecter bien évidemment l'éthique de la Recherche. A la lumière d'évènements récents, je voudrais d'ailleurs insister sur ce dernier point. Outre la manipulation pure et simple de résultats, je pense que certaines dérives ne sont pas forcément volontaires et découlent d'une

mauvaise formation du chercheur, ce qui aboutit à la réalisation d'expérimentations incomplètes ne disposant pas par exemple des bons contrôles ou des répliques nécessaires. Il est donc de la responsabilité du directeur de thèse de veiller à la bonne conception et réalisation des expérimentations ainsi qu'à leur analyse. Ce suivi doit passer par des réunions fréquentes avec le doctorant, au cours desquelles ce dernier présente ses données brutes et les interprète. Concernant le déroulement de la thèse, je pense que cette dernière doit comprendre trois étapes successives : une phase d'apprentissage, une phase d'autonomie et une phase de prise d'initiative. La durée de ces différentes étapes varie d'un doctorant à un autre et pour ce dernier et le directeur de thèse il est intéressant que la dernière étape soit atteinte le plus rapidement possible. Mais chaque chose doit être faite en son temps et une phase d'apprentissage écourtée ou incomplète aura un effet contreproductif. Bien qu'un sujet de thèse comporte initialement un certains nombres de postulats et d'approches expérimentales à réaliser, une des plus grandes récompenses pour un directeur de thèse reste, à mon avis, que le doctorant fasse évoluer son sujet, ce qui est un signe de maturité scientifique.

Un des objectifs de la thèse est la publication des travaux réalisés, cette étape permettant, en plus des congrès et autres manifestations scientifiques, de partager les connaissances générées avec le reste de la communauté scientifique. De plus, la publication du travail d'un doctorant est essentielle pour la suite de sa carrière. La thèse se réalisant sur une période relativement courte, elle doit être optimisée pour maximiser les chances de publier. Je pense qu'il est par exemple important de proposer des projets de thèses comportant un certain nombre de résultats préliminaires constituant un socle. Cependant il faut garder à l'esprit que les travaux de thèses doivent rester ambitieux, le rôle du chercheur étant de découvrir et d'explorer, ce qui inclut forcément une prise de risque. Le doctorant doit être parfaitement au courant de cet aspect, au risque de rencontrer par la suite de grandes désillusions.

La thèse est une expérience personnelle unique qui va grandement déterminer l'avenir du doctorant. Dans bien des cas, la thèse est une période faste au cours de laquelle le doctorant va forger son esprit scientifique et sa motivation qui lui seront indispensables pour la suite de sa carrière. Malheureusement, cette période est vécue par certains comme trop difficile et peut, dans certains cas, engendrer un découragement. Afin d'éviter cet écueil, le directeur de thèse doit être attentif et capable d'identifier l'origine du problème et proposer des solutions. Si par exemple le doctorant a l'impression d'être "submergé" et ne parvient pas à gérer plusieurs approches en même temps, il faudra envisager de recentrer le projet, au moins provisoirement, afin de fixer des objectifs plus atteignables et permettre une reprise de confiance. Si le doctorant rencontre une période de démotivation, il peut être par exemple intéressant de lui proposer de superviser un stagiaire, ce qui créera une émulation. Cependant, une personne désirant faire une thèse doit être parfaitement consciente, avant de débiter, qu'il s'agit d'une période intense qui nécessite une grande motivation.

Un post-doctorant, notamment par son expérience, est à mon avis un moteur essentiel d'un groupe de recherche. Comme pour les doctorants, je pense qu'il est important avant tout de s'entourer de personnes passionnées et talentueuses qui ont un objectif professionnel précis et déploient le travail nécessaire pour atteindre cet objectif. Sans tomber dans l'excès, cette personne doit faire preuve d'ambition. Par rapport à un doctorant, j'attends d'un post-doctorant qu'il ait une grande autonomie et me surprenne, dans le bon sens du terme, par ses choix scientifiques. Le projet que je lui propose initialement doit comprendre, à mon avis, un volet comportant déjà un certain nombre de résultats lui permettant de publier assez rapidement, mais également un volet consistant en des approches totalement exploratoires, forcément plus

risquées mais également très stimulantes. La personne doit être capable de mener de front ces différents travaux, ce qui nécessite un grand sens de l'organisation. Je voudrais ouvrir une parenthèse concernant le contenu des projets de recherche. Bien qu'il soit essentiel que les différents membres du groupe interagissent, il est de ma responsabilité de proposer des projets complémentaires tout en limitant les "chevauchements", ce qui pourrait parfois aboutir à des tensions. Outre l'accompagnement de la démarche scientifique, mon rôle de superviseur est de placer le post-doctorant dans un environnement matériel optimal, afin de ne pas freiner sa créativité et son travail, lui permettant ainsi d'optimiser ses chances de publication. Cette étape passe bien évidemment, pour moi, par la recherche de financements. Bien que je n'ai pas encore rencontré cette situation, mon rôle sera également d'aider le post-doctorant à obtenir un poste permanent, idéalement dans mon équipe, en le faisant bénéficier de mon expérience et en le préparant par exemple pour des concours.

IV. Bibliographie

- Abas L, Benjamins R, Malenica N, Paciorek T, Wisniewska J, Moulinier-Anzola JC, Sieberer T, Friml J, Luschnig C** (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol* **8**: 249-256
- Attar N, Cullen PJ** (2010) The retromer complex. *Adv Enzyme Regul* **50**: 216-236
- Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, Zelazny E, Vert G** (2014) Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 8293-8298
- Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, Zelazny E, Vert G** (2014) Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conejero G, Curie C, Friml J, Vert G** (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: E450-458
- Bellati J, Champeyroux C, Hem S, Rofidal V, Krouk G, Maurel C, Santoni V** (2016) Novel Aquaporin Regulatory Mechanisms Revealed by Interactomics. *Mol Cell Proteomics* **15**: 3473-3487
- Besserer A, Burnotte E, Bienert GP, Chevalier AS, Errachid A, Grefen C, Blatt MR, Chaumont F** (2012) Selective regulation of maize plasma membrane aquaporin trafficking and activity by the SNARE SYP121. *Plant Cell* **24**: 3463-3481
- Bienert GP, Chaumont F** (2014) Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 1596-1604
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* **137**: 104-116
- Browman DT, Hoegg MB, Robbins SM** (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* **17**: 394-402
- Bucherl CA, Jarsch IK, Schudoma C, Segonzac C, Mbengue M, Robatzek S, MacLean D, Ott T, Zipfel C** (2017) Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *Elife* **6**
- Bucherl CA, van Esse GW, Kruis A, Luchtenberg J, Westphal AH, Aker J, van Hoek A, Albrecht C, Borst JW, de Vries SC** (2013) Visualization of BRI1 and BAK1(SERK3) membrane receptor heterooligomers during brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* **162**: 1911-1925
- Chaumont F, Barrieu F, Jung R, Chrispeels MJ** (2000) Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol* **122**: 1025-1034

- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R** (2001) Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* **125**: 1206-1215
- Connolly EL, Fett JP, Guerinot ML** (2002) Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* **14**: 1347-1357
- Couto D, Niebergall R, Liang X, Bucherl CA, Sklenar J, Macho AP, Ntoukakis V, Derbyshire P, Altenbach D, Maclean D, Robatzek S, Uhrig J, Menke F, Zhou JM, Zipfel C** (2016) The Arabidopsis Protein Phosphatase PP2C38 Negatively Regulates the Central Immune Kinase BIK1. *PLoS Pathog* **12**: e1005811
- Danek M, Angelini J, Malinska K, Andrejch J, Amlerova Z, Kocourkova D, Brouzdova J, Valentova O, Martinec J, Petrasek J** (2020) Cell wall contributes to the stability of plasma membrane nanodomain organization of Arabidopsis thaliana FLOTILLIN2 and HYPERSENSITIVE INDUCED REACTION1 proteins. *Plant J* **101**: 619-636
- Danek M, Valentova O, Martinec J** (2016) Flotillins, Erlins, and HIRs: From Animal Base Camp to Plant New Horizons. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**: 191-214
- Demir F, Hortrich C, Blachutzik JO, Scherzer S, Reinders Y, Kierszniowska S, Schulze WX, Harms GS, Hedrich R, Geiger D, Kreuzer I** (2013) Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8296-8301
- Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G** (2018) Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol Cell* **69**: 953-964 e955
- Dupre S, Urban-Grimal D, Haguenaer-Tsapis R** (2004) Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**: 89-111
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, Ludewig U** (2008) Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H₂O₂. *Biochem J* **414**: 53-61
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML** (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5624-5628
- Fetter K, Van Wilder V, Moshelion M, Chaumont F** (2004) Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* **16**: 215-228
- Gao C, Luo M, Zhao Q, Yang R, Cui Y, Zeng Y, Xia J, Jiang L** (2014) A unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Curr Biol* **24**: 2556-2563
- Gokool S, Tattersall D, Reddy JV, Seaman MN** (2007) Identification of a conserved motif required for Vps35p/Vps26p interaction and assembly of the retromer complex. *Biochem J*
- Grossoehme NE, Akilesh S, Guerinot ML, Wilcox DE** (2006) Metal-binding thermodynamics of the histidine-rich sequence from the metal-transport protein IRT1 of Arabidopsis thaliana. *Inorg Chem* **45**: 8500-8508
- Hanton SL, Renna L, Bortolotti LE, Chatre L, Stefano G, Brandizzi F** (2005) Diacidic motifs influence the export of transmembrane proteins from the endoplasmic reticulum in plant cells. *Plant Cell* **17**: 3081-3093
- Hao H, Fan L, Chen T, Li R, Li X, He Q, Botella MA, Lin J** (2014) Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 1729-1745
- Hara-Chikuma M, Satooka H, Watanabe S, Honda T, Miyachi Y, Watanabe T, Verkman AS** (2015) Aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide transport is required for NF-kappaB signalling in keratinocytes and development of psoriasis. *Nat Commun* **6**: 7454
- Hemsley PA, Weimar T, Lilley KS, Dupree P, Grierson CS** (2013) A proteomic approach identifies many novel palmitoylated proteins in Arabidopsis. *New Phytol* **197**: 805-814
- Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF** (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* **138**: 1184-1194
- Hosy E, Martiniere A, Choquet D, Maurel C, Luu DT** (2015) Super-resolved and dynamic imaging of membrane proteins in plant cells reveal contrasting kinetic profiles and multiple confinement mechanisms. *Mol Plant* **8**: 339-342
- Huang D, Sun Y, Ma Z, Ke M, Cui Y, Chen Z, Chen C, Ji C, Tran TM, Yang L, Lam SM, Han Y, Shu G, Friml J, Miao Y, Jiang L, Chen X** (2019) Salicylic acid-mediated plasmodesmal closure via Remorin-dependent lipid organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 21274-21284

- Huber TB, Schermer B, Muller RU, Hohne M, Bartram M, Calixto A, Hagemann H, Reinhardt C, Koos F, Kunzelmann K, Shirokova E, Krautwurst D, Harteneck C, Simons M, Pavenstadt H, Kerjaschki D, Thiele C, Walz G, Chalfie M, Benzing T** (2006) Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 17079-17086
- Jaillais Y, Santambrogio M, Rozier F, Fobis-Loisy I, Miege C, Gaude T** (2007) The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell* **130**: 1057-1070
- Jarsch IK, Konrad SS, Stratil TF, Urbanus SL, Szymanski W, Braun P, Braun KH, Ott T** (2014) Plasma Membranes Are Subcompartmentalized into a Plethora of Coexisting and Diverse Microdomains in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Cell* **26**: 1698-1711
- Junkova P, Danek M, Kocourkova D, Brouzdova J, Kroumanova K, Zelazny E, Janda M, Hynek R, Martinec J, Valentova O** (2018) Mapping of Plasma Membrane Proteins Interacting With Arabidopsis thaliana Flotillin 2. *Front Plant Sci* **9**: 991
- Kai L, Kaldenhoff R** (2014) A refined model of water and CO₂ membrane diffusion: effects and contribution of sterols and proteins. *Sci Rep* **4**: 6665
- Keinath NF, Kierszniowska S, Lorek J, Bourdais G, Kessler SA, Shimosato-Asano H, Grossniklaus U, Schulze WX, Robatzek S, Panstruga R** (2010) PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem* **285**: 39140-39149
- Kim DY, Scalf M, Smith LM, Vierstra RD** (2013) Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 1523-1540
- Krugel U, He HX, Gier K, Reins J, Chincinska I, Grimm B, Schulze WX, Kuhn C** (2012) The potato sucrose transporter StSUT1 interacts with a DRM-associated protein disulfide isomerase. *Mol Plant* **5**: 43-62
- Kumar KG, Krolewski JJ, Fuchs SY** (2004) Phosphorylation and specific ubiquitin acceptor sites are required for ubiquitination and degradation of the IFNAR1 subunit of type I interferon receptor. *J Biol Chem* **279**: 46614-46620
- Kumar MN, Hsieh YF, Verslues PE** (2015) At14a-Like1 participates in membrane-associated mechanisms promoting growth during drought in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 10545-10550
- Kwok EY, Severance S, Kosman DJ** (2006) Evidence for iron channeling in the Fet3p-Ftr1p high-affinity iron uptake complex in the yeast plasma membrane. *Biochemistry* **45**: 6317-6327
- Laloux T, Junqueira B, Maistriaux LC, Ahmed J, Jurkiewicz A, Chaumont F** (2018) Plant and Mammal Aquaporins: Same but Different. *Int J Mol Sci* **19**
- Lauwers E, Erpapazoglou Z, Haguenaer-Tsapis R, Andre B** (2010) The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* **20**: 196-204
- Li R, Liu P, Wan Y, Chen T, Wang Q, Mettbach U, Baluska F, Samaj J, Fang X, Lucas WJ, Lin J** (2012) A membrane microdomain-associated protein, Arabidopsis Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell* **24**: 2105-2122
- Li R, Liu P, Wan Y, Chen T, Wang Q, Mettbach U, Baluška F, Šamaj J, Fang X, Lucas WJ, Lin J** (2012) A Membrane Microdomain-Associated Protein, Arabidopsis Flot1, Is Involved in a Clathrin-Independent Endocytic Pathway and Is Required for Seedling Development. *The Plant Cell Online* **24**: 2105-2122
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu DT, Maurel C, Lin J** (2011) Single-molecule analysis of PIP₂;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* **23**: 3780-3797
- Liang P, Stratil TF, Popp C, Marin M, Folgmann J, Mysore KS, Wen J, Ott T** (2018) Symbiotic root infections in Medicago truncatula require remorin-mediated receptor stabilization in membrane nanodomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 5289-5294
- Lu DP, Christopher DA** (2008) Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in Arabidopsis thaliana. *Mol Genet Genomics* **280**: 199-210

- Luu DT, Martiniere A, Sorieul M, Runions J, Maurel C** (2012) Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. *Plant J* **69**: 894-905
- Lv X, Jing Y, Xiao J, Zhang Y, Zhu Y, Julian R, Lin J** (2017) Membrane microdomains and the cytoskeleton constrain AtHIR1 dynamics and facilitate the formation of an AtHIR1-associated immune complex. *Plant J*
- MacGurn JA, Hsu PC, Emr SD** (2012) Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem* **81**: 231-259
- Majeran W, Le Caer JP, Ponnala L, Meinnel T, Giglione C** (2018) Targeted Profiling of Arabidopsis thaliana Subproteomes Illuminates Co- and Posttranslationally N-Terminal Myristoylated Proteins. *Plant Cell* **30**: 543-562
- Martiniere A, Fiche JB, Smokvarska M, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C** (2019) Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion. *Plant Physiol* **179**: 1581-1593
- Martins S, Dohmann EM, Cayrel A, Johnson A, Fischer W, Pojer F, Satiat-Jeunemaitre B, Jaillais Y, Chory J, Geldner N, Vert G** (2015) Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* **6**: 6151
- Matsusaki M, Okuda A, Masuda T, Koishihara K, Mita R, Iwasaki K, Hara K, Naruo Y, Hirose A, Tsuchi Y, Urade R** (2016) Cooperative Protein Folding by Two Protein Thiol Disulfide Oxidoreductases and 1 in Soybean. *Plant Physiol* **170**: 774-789
- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L** (2015) Aquaporins in Plants. *Physiol Rev* **95**: 1321-1358
- Men S, Boutte Y, Ikeda Y, Li X, Palme K, Stierhof YD, Hartmann MA, Moritz T, Grebe M** (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* **10**: 237-244
- Morel J, Claverol S, Mongrand S, Furt F, Fromentin J, Bessoule JJ, Blein JP, Simon-Plas F** (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1396-1411
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y** (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **407**: 599-605
- Nishimura N, Balch WE** (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**: 556-558
- Oh YJ, Kim H, Seo SH, Hwang BG, Chang YS, Lee J, Lee DW, Sohn EJ, Lee SJ, Lee Y, Hwang I** (2016) Cytochrome b5 Reductase 1 Triggers Serial Reactions that Lead to Iron Uptake in Plants. *Mol Plant* **9**: 501-513
- Peret B, Li G, Zhao J, Band LR, Voss U, Postaire O, Luu DT, Da Ines O, Casimiro I, Lucas M, Wells DM, Lazzarini L, Nacry P, King JR, Jensen OE, Schaffner AR, Maurel C, Bennett MJ** (2012) Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **14**: 991-998
- Perraki A, Gronnier J, Gouguet P, Boudsocq M, Deroubaix AF, Simon V, German-Retana S, Legrand A, Habenstein B, Zipfel C, Bayer E, Mongrand S, Germain V** (2018) REM1.3's phospho-status defines its plasma membrane nanodomain organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLoS Pathog* **14**: e1007378
- Postaire O, Tournaire-Roux C, Grondin A, Boursiac Y, Morillon R, Schaffner AR, Maurel C** (2010) A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis. *Plant Physiol* **152**: 1418-1430
- Pourcher M, Santambrogio M, Thazar N, Thierry AM, Fobis-Loisy I, Miege C, Jaillais Y, Gaude T** (2010) Analyses of sorting nexins reveal distinct retromer-subcomplex functions in development and protein sorting in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**: 3980-3991
- Prado K, Cotellet V, Li G, Bellati J, Tang N, Tournaire-Roux C, Martiniere A, Santoni V, Maurel C** (2019) Oscillating Aquaporin Phosphorylation and 14-3-3 Proteins Mediate the Circadian Regulation of Leaf Hydraulics. *Plant Cell* **31**: 417-429

- Qi Y, Tsuda K, Nguyen le V, Wang X, Lin J, Murphy AS, Glazebrook J, Thordal-Christensen H, Katagiri F** (2011) Physical association of Arabidopsis hypersensitive induced reaction proteins (HIRs) with the immune receptor RPS2. *J Biol Chem* **286**: 31297-31307
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde JP, Lherminier J, Noirot E, Satiat-Jeunemaitre B, Laroche-Traineau J, Moreau P, Ott T, Maule AJ, Reymond P, Simon-Plas F, Farmer EE, Bessoule JJ, Mongrand S** (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**: 1541-1555
- Rai T, Sasaki S, Uchida S** (2006) Polarized trafficking of the aquaporin-3 water channel is mediated by an NH₂-terminal sorting signal. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C298-304
- Ramesh A, Peleh V, Martinez-Caballero S, Wollweber F, Sommer F, van der Laan M, Schroda M, Alexander RT, Campo ML, Herrmann JM** (2016) A disulfide bond in the TIM23 complex is crucial for voltage gating and mitochondrial protein import. *J Cell Biol* **214**: 417-431
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML** (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697
- Rodrigues O, Reshetnyak G, Grondin A, Saijo Y, Leonhardt N, Maurel C, Verdoucq L** (2017) Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 9200-9205
- Rogers EE, Eide DJ, Guerinot ML** (2000) Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12356-12360
- Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS** (2007) Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol* **27**: 1112-1124
- Rojas R, van Vlijmen T, Mardones GA, Prabhu Y, Rojas AL, Mohammed S, Heck AJ, Raposo G, van der Sluijs P, Bonifacino JS** (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* **183**: 513-526
- Rusinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC** (2004) Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* **16**: 3216-3229
- Santi S, Schmidt W** (2009) Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytol* **183**: 1072-1084
- Seaman MN, Harbour ME, Tattersall D, Read E, Bright N** (2009) Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* **122**: 2371-2382
- Shimada T, Koumoto Y, Li L, Yamazaki M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2006) AtVPS29, a putative component of a retromer complex, is required for the efficient sorting of seed storage proteins. *Plant Cell Physiol* **47**: 1187-1194
- Shin LJ, Lo JC, Chen GH, Callis J, Fu H, Yeh KC** (2013) IRT1 degradation factor1, a ring E3 ubiquitin ligase, regulates the degradation of iron-regulated transporter1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 3039-3051
- Sieben C, Mikosch M, Brandizzi F, Homann U** (2008) Interaction of the K⁽⁺⁾-channel KAT1 with the coat protein complex II coat component Sec24 depends on a di-acidic endoplasmic reticulum export motif. *Plant J* **56**: 997-1006
- Simon-Plas F, Perraki A, Bayer E, Gerbeau-Pissot P, Mongrand S** (2011) An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 642-649
- Singh A, Severance S, Kaur N, Wiltsie W, Kosman DJ** (2006) Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 13355-13364
- Smirnov N, Arnaud D** (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol* **221**: 1197-1214
- Sorieul M, Santoni V, Maurel C, Luu DT** (2011) Mechanisms and effects of retention of over-expressed aquaporin AtPIP2;1 in the endoplasmic reticulum. *Traffic* **12**: 473-482

- Tan S, Zhang P, Xiao W, Feng B, Chen LY, Li S, Li P, Zhao WZ, Qi XT, Yin LP** (2018) TMD1 domain and CRAC motif determine the association and disassociation of MxIRT1 with detergent-resistant membranes. *Traffic* **19**: 122-137
- Tapken W, Murphy AS** (2015) Membrane nanodomains in plants: capturing form, function, and movement. *J Exp Bot* **66**: 1573-1586
- Tian S, Wang X, Li P, Wang H, Ji H, Xie J, Qiu Q, Shen D, Dong H** (2016) Plant Aquaporin AtPIP1;4 Links Apoplastic H₂O₂ Induction to Disease Immunity Pathways. *Plant Physiol* **171**: 1635-1650
- Tong J, Briggs MM, McIntosh TJ** (2012) Water permeability of aquaporin-4 channel depends on bilayer composition, thickness, and elasticity. *Biophys J* **103**: 1899-1908
- Tornroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P** (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**: 688-694
- van Balkom BW, Graat MP, van Raak M, Hofman E, van der Sluijs P, Deen PM** (2004) Role of cytoplasmic termini in sorting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**: C372-379
- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C** (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* **14**: 1223-1233
- Walton A, Stes E, Cybulski N, Van Bel M, Inigo S, Durand AN, Timmerman E, Heyman J, Pauwels L, De Veylder L, Goossens A, De Smet I, Coppens F, Goormachtig S, Gevaert K** (2016) It's Time for Some "Site"-Seeing: Novel Tools to Monitor the Ubiquitin Landscape in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **28**: 6-16
- Wang L, Li H, Lv X, Chen T, Li R, Xue Y, Jiang J, Jin B, Baluska F, Samaj J, Wang X, Lin J** (2015) Spatiotemporal Dynamics of the BRI1 Receptor and its Regulation by Membrane Microdomains in Living Arabidopsis Cells. *Mol Plant* **8**: 1334-1349
- Wudick MM, Li X, Valentini V, Geldner N, Chory J, Lin J, Maurel C, Luu DT** (2015) Subcellular Redistribution of Root Aquaporins Induced by Hydrogen Peroxide. *Mol Plant* **8**: 1103-1114
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH** (2006) A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in Arabidopsis. *Cell* **125**: 1347-1360
- Yamazaki M, Shimada T, Takahashi H, Tamura K, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I** (2008) Arabidopsis VPS35, a Retromer Component, is Required for Vacuolar Protein Sorting and Involved in Plant Growth and Leaf Senescence. *Plant Cell Physiol* **49**: 142-156
- Zauber H, Szymanski W, Schulze WX** (2013) Unraveling sterol-dependent membrane phenotypes by analysis of protein abundance-ratio distributions in different membrane fractions under biochemical and endogenous sterol depletion. *Mol Cell Proteomics* **12**: 3732-3743
- Zelazny E, Barberon M, Curie C, Vert G** (2011) Ubiquitination of transporters at the forefront of plant nutrition. *Plant Signal Behav* **6**: 1597-1599
- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA, Chaumont F** (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12359-12364
- Zelazny E, Miecielica U, Borst JW, Hemminga MA, Chaumont F** (2009) An N-terminal diacidic motif is required for the trafficking of maize aquaporins ZmPIP2;4 and ZmPIP2;5 to the plasma membrane. *Plant J* **57**: 346-355
- Zelazny E, Santambrogio M, Gaude T** (2013) Retromer association with membranes: plants have their own rules! *Plant Signal Behav* **8**
- Zelazny E, Santambrogio M, Pourcher M, Chambrier P, Berne-Dedieu A, Fobis-Loisy I, Miege C, Jaillais Y, Gaude T** (2013) Mechanisms governing the endosomal membrane recruitment of the core retromer in Arabidopsis. *J Biol Chem* **288**: 8815-8825
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, Mengiste T, Zhang Y, Zhou JM** (2010) Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a Pseudomonas syringae effector. *Cell Host Microbe* **7**: 290-301

- Zhou L, Cheung MY, Li MW, Fu Y, Sun Z, Sun SM, Lam HM** (2010) Rice hypersensitive induced reaction protein 1 (OsHIR1) associates with plasma membrane and triggers hypersensitive cell death. *BMC Plant Biol* **10**: 290
- Zuzarte M, Rinne S, Schlichthorl G, Schubert A, Daut J, Preisig-Muller R** (2007) A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3. *Traffic* **8**: 1093-1100