



HAL
open science

Perception et signalisation précoce des plantes lors du signal hydrique

Alexandre Martinière

► **To cite this version:**

Alexandre Martinière. Perception et signalisation précoce des plantes lors du signal hydrique. *Vegetal Biology*. Université Montpellier, 2020. tel-04780509

HAL Id: tel-04780509

<https://hal.inrae.fr/tel-04780509v1>

Submitted on 13 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.

Université de Montpellier
École doctorale GAIA



Dossier présenté pour l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches

Alexandre Martinière

Laboratoire "Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes"

Chargé de recherche dans l'équipe "Eau, signalisation et architecture hydraulique".



1-CURRICULUM VITAE

Alexandre Martinière

Chargé de recherche de classe normale au CNRS

Né le 4 mai 1981 à Cholet, nationalité française

Laboratoire "Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes" (BPMP), Campus INRAE/SupAgro, 2 place Viala 34060 Montpellier

Tel : 04 99 61 20 21

Courriel : alexandre.martiniere@cnrs.fr

CURSUS :

- 2005-08 **Doctorat** de l'Université Montpellier II Biologie intégrative des plantes, boursier MRT.
- 2005-04 **DEA** Adaptation et Développement des Plantes à l'Université Montpellier II
- 2002-04 **Maîtrise Technique** en Bio-physiologie Appliquée aux Productions Végétales à l'Université d'Angers
- 2001-02 **DEUG** 2ème année de biologie à l'IEA d'Angers DEUG
- 1999-01 **BTS agricole** Technologies du Végétal à l'AGRITEC d'Angers

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES :

2015-présent Chargé de recherche de classe normale CNRS, UMR Biochimie et Physiologie moléculaire des plantes (BPMP), Montpellier, équipe Aqua. Dirigée par Christophe Maurel.

Projet de recherche : Mécanismes de la signalisation osmotique chez Arabidopsis thaliana

2013-2015 Chargé de recherche 2 CNRS, UMR Biochimie et Physiologie moléculaire des plantes (BPMP), Montpellier, équipe Aquaporines. Dirigée par Christophe Maurel.

Projet de recherche : Mécanismes de la signalisation osmotique chez Arabidopsis thaliana

2013 Chercheur post-doctoral, Biologie et génétique des interactions plantes-Parasites (BGPI), Montpellier, équipe Interaction Virus Plantes Insectes. Dirigée par Martin Drucker.

Projet de recherche ANR : Signalisation végétale impliquée dans la transmission des phytovirus

2011-12 Chercheur post-doctoral, UMR Biochimie et Physiologie moléculaire des plantes (BPMP), Montpellier, équipe Dynamique intracellulaire. Dirigée par Nadine Paris.

Projet de recherche RTRA Rhizopolis : Relation structure fonction de la racine : Analyse fonctionnelle du rôle du pH

2008-11 Chercheur post-doctoral, Oxford Brookes University, Oxford, equip Plant Endomembrane Research Group. Dirigée par Chris Hawes et John Runions.

Projet de recherche BBRC : Rôle du continuum paroi/membrane /cytosquelette dans l'organisation et la dynamique des protéines de la membrane plasmique des cellules.

2005-8 Étudiant en thèse, UMR Biologie et génétique des interactions plantes-Parasites (BGPI), Montpellier, équipe Interaction Virus Plantes Insectes. Dirigée par Stéphane Blanc et Martin Drucker.

Projet de recherche : Rôle de la cellule hôte dans les mécanismes de transmission du Cauliflower Mosaic virus (CaMV).

2-ENSEIGNEMENT

Chaque année, je participe à l'école thématique «Transport membranaire chez les plantes » organisée dans le cadre de la formation M2 « Biologie Fonctionnelle des Plantes » de l'université de Montpellier. En collaboration avec Carine Alcon, nous organisons des travaux pratiques autour des approches de microscopie à épifluorescence et confocale. Depuis 2019, je dispense également un cours sur la signalisation cellulaire.

De plus, en 2016 et 2018, j'ai pris part à l'École thématique internationale MISTRAL organisée par Hervé Sentenac, Anne-Aliénor Véry et Alain Gojon dans l'Unité (<http://www1.montpellier.inra.fr/ibip/mistral/>). J'y ai assuré un cours sur les approches de microscopie ainsi qu'une semaine de travaux pratiques.

Enfin, en 2019, j'ai participé à un workshop organisé par la plateforme mutualisée de Montpellier (MRI, Montpellier Ressource Imagerie). Les trois jours de formation étaient centrés sur l'utilisation des outils de microscopie à super résolution. J'ai ainsi pu montrer comment, avec nos collaborateurs du CBS, Montpellier, nous avons développé la microscopie single particule tracking PALM (sptPALM) sur des échantillons de plantes.

3-ENCADREMENT

Doctorants

Marija Smokvarska (2017-2020) Université de Montpellier, « Mécanismes de la signalisation osmotique chez *Arabidopsis thaliana* », co-encadrement Christophe Maurel. (un papier comme co-auteur)

Dominic Conquest (2009-2012), Oxford Brookes University, « Rôle des fatty acid desaturases dans la régulation de l'horloge circadienne », co-encadrement Harriet MacWatters et John Runions

Achuthanunni Chokkathukalam (2008-2011), Oxford University, « modélisation de réseaux métaboliques et prédiction de l'adressage d'isoenzyme », co-encadrement David Fell et John Runions

Master 2

Lucille Gogues (2020, Université de Montpellier)

Charbel Francis (2017, Université de Montpellier) (un papier comme co-auteur en révision)

Anouk Zancarini (2008, Université de Montpellier) (un papier comme co-auteure)

Master1

Marija Smokvarska (2016, Université de Montpellier) (un papier comme co-auteure)

Tristan Rubio (2013, Université de Montpellier)

Gatri Nageswaran (2009, Oxford Brookes University) (un papier comme co-auteure)

4-CONTRIBUTION AU FONCTIONNEMENT DE COLLECTIFS DE RECHERCHE

Au sein de mon UMR, je suis membre du comité d'organisation des séminaires. Par ailleurs, je suis responsable scientifique de la plateforme d'histologie et d'imagerie de la cellule végétale (PHIV, <http://phiv.cirad.fr/fr/organi.html>). Depuis mon arrivée, et en étroite collaboration avec Carine Alcon (IE-CNRS) et Tou Cheu Xiong (CR-INRA), mon travail a été principalement de réaliser l'animation scientifique dans l'UMR autour des techniques d'imagerie, ainsi que l'élaboration de demandes de financement pour l'acquisition de différents équipements de microscopie. Nous avons acquis durant les cinq dernières années environ 150k€ d'équipement, ce qui a permis de compléter le parc machine de la plateforme (Microscope Zeiss observer7 Apotome et Macroscopie Zeiss axiozoom V16). Nous avons également pour volonté de développer l'imagerie par biosenseurs (ROS, pH, hormones ...) au sein de l'unité. Dans ce contexte, un projet 'défis instrumentation' porté par Tou Cheu Xiong, et auquel je suis associé, a été financé par le CNRS. Ce projet a pour objectif de développer un poste d'imagerie verticale en bioluminescence multicolore. Cet outil, qui est unique en son genre, permettra de faire de l'imagerie « biosenseur » en temps long. Il sera particulièrement utile pour corréler les réponses signalétiques et développementales des racines d'Arabidopsis.

5-EXPERTISES

Activité de relecture pour les journaux TRAFFIC, PLoS One, Journal of Microscopy, Journal of Experimental Botany, AoB Plants, ...

Expertise pour le FWO : Research foundation-Flanders

Comités de thèse :

Hortence Moreau (Supervision Nadine Paris, Université de Montpellier)

Amel Maghiaoui (Supervision Lien Bach et Alain Gojon, Université de Montpellier)

Magali Grison (Supervision Emmanuelle Bayer, Université de Bordeaux)

Matthieu Platre (Supervision Yvon Jaillais, Université de Lyon)

Membre de jurys de thèse :

Valérie Wattelet-Boyer (Supervision Patrick Moreau, Université de Bordeaux)

Kevin Grojean (Supervision Patricia Gerbeau, Université de Bourgogne)

Membre de jury EPHE :

Valérie Wattelet-Boyer (Supervision Yohann Boute, Université de Bordeaux)

6-IMPLICATION DANS DES PROJETS DE RECHERCHE

Projet ANR JCJC (2020/2024, PI) : Mécanismes moléculaires de la signalisation osmotique précoce.

Projet CNRS défis instrumentation aux limites (2018, partenaire, PI Tou Cheu Xiong) : Développement d'un set up d'imagerie verticale multi couleurs lumineuses.

Projet INRA starter iRrobot (2017/18, co-PI avec Yvon Jaillais) : Développement de biosenseurs d'activité GTPase chez les plantes

Projet ANR SweetQualiGrape (2014/19- partenaire, PI Isabelle Gaillard) : Développement de senseurs pH résistants au pH acide.

7-COLLABORATIONS

Depuis mon recrutement, j'ai établi deux collaborations majeures : l'une avec l'équipe de Marcelo Nollmann au Centre de biologie structural (CBS) de Montpellier sur les aspects de microscopie à super résolution et l'autre, avec l'équipe d'Yvon Jaillais au laboratoire RDP de Lyon sur les petites GTPases. Je suis par ailleurs en interaction étroite avec Sébastien Mongrand et Patrick Moreau (Laboratoire de Biogénèse Membranaire, Bordeaux) qui travaillent tous les deux sur la signalisation lipidique. Plus récemment, j'ai développé une collaboration avec le groupe d'Herman Höfte (IJPB, Versailles) concernant les questions en lien avec les protéines kinases membranaires de la famille des CrRLK.

Au niveau local, mon travail sur la signalisation osmotique bénéficie tout d'abord d'interactions fortes avec mes collègues de l'équipe *Aqua*. En particulier, je travaille avec Yann Boursiac qui s'intéresse, par des approches de biophysique et de modélisation, à la perception du signal hydrique et de ses composantes osmotiques et hydriques. J'interagis également fortement avec Enric Zelazny, qui vient de rejoindre l'équipe. Son projet de recherche est centré sur le rôle des domaines membranaires dans la régulation du transport de l'eau et du peroxyde d'hydrogène et en particulier du rôle de la famille des protéines HIR dans ces mécanismes.

Au niveau de l'UMR, je travaille en collaboration avec Stéphane Mari (Equipe MeMo) sur les questions associées aux mécanismes de production de ROS par la voie fer/ascorbate. J'interagis également avec Gabriel Krouk et Clément Carre (Equipe Honude) pour le développement d'outils d'analyse d'images en super résolution fondée sur l'apprentissage machine. Enfin, je bénéficie de l'ensemble des équipements et des expertises de l'UMR pour la réalisation de mon travail.

8-INDICES BIBLIOGRAPHIQUES

28 publications

36 communications orales et posters à des congrès

Nombre total de citations : 1326

Indice h : 18

Communications orales invitées

June-2018 IJPB-Versailles France (invité par Herman Höfte)

- April-2018 Montpellier RIO imaging seminar, Montpellier France
- Oct-2014 3rd INRA microscopy days, Montpellier France
- Oct-2013 RDP, ENS-Lyon France (invité par Yvon Jaillais)
- Mar-2012 IRD, Montpellier France (invité par Laurent Laplaze)
- Jan-2011 BPMP, Montpellier France (invité par Christophe Maurel)
- Dec-2011 LBM, Bordeaux France (invité par Sébastien Mongrand)
- Nov-2011 IBMP, Strasbourg France (invité par Christophe Ritzenthaler)

Publications

% corresponding author

* author that contribute equally to the work

Encadrement

Berthelot E, Macia JL, **Martinière A**, Morisset A, Gallet R, Blanc S, Khelifa M, Drucker M. Pharmacological analysis of transmission activation of two aphid-vectored plant viruses, turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus. *Sci Rep.* 2019 Jun 28;9(1):9374.

Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marquès-Bueno MDM, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche JB, Nollmann M, Miège C, Moreau P, **Martinière A**, Jaillais Y. Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science.* 2019 Apr 5;364(6435):57-62.

Martinière A%, Fiche JB, **Smokvarska M**, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C. Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion. *Plant Physiol.* 2019 Apr;179(4):1581-1593.

Prado K, Cotelle V, Li G, Bellati J, Tang N, Tournaire-Roux C, **Martinière A**, Santoni V, Maurel C. Oscillating Aquaporin Phosphorylation and 14-3-3 Proteins Mediate the Circadian Regulation of Leaf Hydraulics. *Plant Cell.* 2019 Feb;31(2):417-429.

Martinière A, Gibrat R, Sentenac H, Dumont X, Gaillard I, Paris N. Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jun 19;115(25):6488-6493.

Poitout A, **Martinière A**, Kucharczyk B, Queruel N, Silva-Andia J, Mashkoor S, Gamet L, Varoquaux F, Paris N, Sentenac H, Touraine B, Desbrosses G. Local signaling pathways underlie the Arabidopsis root developmental response to Mesorhizobium loti inoculation. *J Exp Bot.* 2017 Feb 1 ;68(5):1199-1211

Shahzad Z, Canut M, Tournaire-Roux C, **Martinière A**, Boursiac Y, Loudet O, Maurel C. A potassium-dependent oxygen sensing pathway regulates plant root hydraulics. *Cell.* 2016 Sept 22;167(1):87-98

Bouguyon E, Perrine-Walker F, Pervent M, Rochette J, Cuesta Moliner C, Benkova E, **Martinière A**, Bach L, Krouk G, Gojon A, Nacry P. Nitrate Regulation of Lateral Root

Development in Arabidopsis Involves a Complex Post-Transcriptional Regulation of the NRT1.1/NPF6.3 Transceptor. *Plant Physiol.* 2016 Oct; 172(2):1237-1248

Hosy E, **Martinière A**, Choquet D, Maurel C, Luu DT. Super-resolved and dynamic imaging of membrane proteins in plant cells reveal contrasting kinetic profiles and multiple confinement mechanisms. *Mol Plant.* 2015 Feb;8(2):339-42.

Bak A, Blanc S, Gargani D, **Martinière A**, Drucker M. Multiple functions of viral factories : the example of mosaic virus of cauliflower (Cauliflower mosaic virus). *Virologie*, 2014, 18 (4), pp.201–210.

Verdoucq L, Rodrigues O, **Martinière A**, Luu DT, Maurel C. Plant aquaporins on the move: reversible phosphorylation, lateral motion and cycling. *Curr Opin Plant Biol.* 2014 Dec;22:101-7. Review.

Martinière A, Desbrosses G, Sentenac H, Paris N. Development and properties of genetically encoded pH sensors in plants. *Front Plant Sci.* 2013 Dec 18;4:523. Review.

Martinière A, Runions J. Protein diffusion in plant cell plasma membranes: the cell-wall corral. *Front Plant Sci.* 2013 Dec 17;4:515. Review.

Martinière A., Bassil E., Jublanc E., Alcon C., Reguera M., Sentenac H., Blumwald E., and Paris N. In vivo intracellular pH measurements reveal an unexpected pH gradient in the plant endomembrane system. *Plant Cell.* 2013 Oct;25(10):4028-43

Bak A, **Martinière A**, Blanc S and Drucker M. Early interactions during the encounter of plants, aphids and arboviruses. *Plant Signal Behav.* 2013 Mar 21;8(6). Review.

Martinière A.*, Bak A.*, Macia J.L., Lautredou N., Gargani D., Fereres A., Garzo E., Blanc S. and Drucker M. Perceiving the outside world: a virus uses the host sensory system for instantaneous transmission by an insect vector. *Elife.* 2013 Jan 22;2.

Martinière A., Lavagi I, **Nageswaran G.**, Rolfe D.J., Maneta-Peyret L., Luu D.T., Botchway S.W., Webb S.E., Mongrand S., Maurel C., Martin-Fernandez M.L., Kleine-Vehn J., Friml J., Moreau P. and Runions J. Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Pro Natl Acad Sci U S A.* 2012 July 31 (109) 12805-12810.

Martinière A., Li X., Runions J., Lin J. Maurel C. and Luu D.T. Salt stress triggers enhanced cycling of Arabidopsis root plasma-membrane aquaporins. *Plant Signal Behav.* 2011 Apr 1;7(4) Review.

Luu D.T.*, **Martinière A. ***, Sorieul M., Runions J. and Maurel C. Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. *Plant J.* 2012 Mar;69(5):894-905.

Kleine-Vehn J., Wabnik K, **Martinière A.**, Langowski L., Willing K., Naramoto S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robet S., Luschnig C., Govaerts H., Hell S., Runions J. and Friml J. Recycling, clustering and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol.* 2011 Oct 25;7:540

Bak A.*, Irons S.L.*, **Martinière A.***, Blanc S. and Drucker M. Host cell processes to accomplish mechanical and non-circulative virus transmission. *Protoplasma.* 2011 Oct 25;7:540. Review.

Martinière A., Macia J.L., Bagnolini G., Jridi C., Bak A., Blanc S. and Drucker M. VAPA, an innovative « virus-acquisition phenotyping assay » opens new horizons in research into the vector-transmission of plant viruses. *Plos One*. 2011;6(8):ee23241.

Martinière A., Shvedunova M., Thomson J.W.A., Evens H.E., Penfiel S., Runions J. and McWatters H.G. Plant temperature responses require FAD2-dependant homeostasis of membrane viscosity. *New Phytol*. 2011 Oct;192(2):328-37

Feraru E., Feraru M. I., Kleine-Vehn J., **Martinière A.**, Mouille G., Vannest S., Vernhettes S., Runions J. and Friml J. Cell polarity maintenance by extracellular matrix in *Arabidopsis*. *Curr Biol*. 22;21(4):338-43

Martinière A., Gayral P., Hawes C. and Runions J. Building bridges: FORMIN1 forms a link between the plant cell wall and the actin cytoskeleton. *Plant J*. 2011 Apr;66(2):354-65.

Sparkes I.A., Graumann K., **Martinière A.**, Schoberer J., Wang P. and Osterrieder A. Bleach it, switch it, bounce it, pull it: using laser to reveal plant cell. *J Exp Bot*. 2011 Jan;62(1):1-7 Review

Martinière A., **Zancarini A.** and Drucker M., Aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *Plant Signal Behav*. 2009 Jun;4(6):548-50. Review.

Martinière A., Gargani D., Uzest M., Lautredou N., Blanc S., Drucker M. A role of microtubule in the formation of transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower Mosaic Virus. *Plant J*. 2009 Apr;58(1):135-46

Laplaze L., Parizot B., Backer A., Ricaud L., **Martinière A.**, Auguy F., Franche C., Nussaume L., Bogusz D. and Haseloff J. GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot*. 2005 Sept;56(419)

9-TRAVAUX DE RECHERCHE

Par intérêt personnel, mes activités de recherche se sont toujours centrées autour des problématiques liées à la signalisation cellulaire, en particulier par des approches de biologie cellulaire. Tout d'abord, lors de ma thèse dans l'équipe du Dr. Stéphane Blanc (UMR BGPI, Montpellier), j'ai étudié l'implication de la cellule hôte dans les mécanismes de transmission du CaMV (Cauliflower Mosaic Virus). Les données obtenues ont permis la réalisation de 8 publications (4 articles de recherche). En particulier, nous avons démontré que les corps d'inclusion viraux sont des structures dynamiques dans les cellules. Ils réagissent à la présence des insectes vecteurs permettant une transmission optimisée du virus. Ce résultat suggère que les virus de plantes sont capables d'utiliser les mécanismes de perception des plantes lors de leur interaction avec les insectes (vecteurs de virus) pour assurer au mieux leur transmission. Ce travail de thèse m'a permis d'encadrer une étudiante en Master 2. Son travail a été valorisé par une publication. Je ne détaillerai pas dans ce rapport les travaux menés dans le cadre de ma thèse, malgré l'importance que je leur accorde dans mon parcours. Je me concentrerai uniquement sur mes travaux de recherche réalisés par la suite, tout d'abord lors de mes deux stages post doctoraux dans le laboratoire de Chris Hawes (Oxford Brook University, Oxford) et dans l'équipe de Nadine Paris (UMR BPMP, Montpellier), ainsi que le travail initié à partir de mon recrutement au CNRS, en 2013, dans l'équipe de Christophe Maurel (UMR BPMP, Montpellier). Effectivement, ces différents projets constituent le point de départ des travaux de recherche que je mène actuellement qui sont centrés sur la structure des membranes biologiques et leur rôle dans la signalisation cellulaire.

9.1-Structure de la membrane plasmique et la signalisation cellulaire.

La membrane plasmique constitue, avec la paroi, la frontière des cellules végétales avec leur milieu extérieur. En plus d'un rôle dans la formation de gradients chimiques essentiels aux fonctions de la cellule, la membrane plasmique est un point de contrôle crucial pour la perception et l'intégration des signaux extracellulaires avant leur transduction vers le cytoplasme (Gronnier et al., 2018).

La répartition des lipides et des protéines dans la membrane plasmique a tout d'abord été pensée comme très homogène, principalement à cause de leurs constantes de diffusion latérale. Désormais, nous savons qu'il n'en est rien. Effectivement, les membranes biologiques sont très fortement structurées et apparaissent comme une juxtaposition de domaines de taille et de composition variable. Ces domaines permettent une ségrégation latérale des protéines et lipides qui jouent un rôle majeur dans la signalisation membranaire que ce soit pour les étapes de perception, de spécificité ou d'intégration des signaux biologiques (Jaillais and Ott, 2020).

La vision compartimentée de la membrane a tout d'abord été illustrée dans des études de biochimie. De fait, les membranes biologiques ont été fractionnées de manière binaire entre une fraction résistante aux détergents et une autre qu'y est sensible. Désormais, les nouvelles approches de microscopie à fluorescence permettent de résoudre spatialement ces structures et montrent qu'il existe une multitude de domaines dans les membranes. De plus, il est apparu que ces domaines peuvent être très dynamiques avec des durées de

vie variables. Depuis les années 2010, un grand nombre de protéines de plantes ont été montré comme formant des domaines dans la membrane plasmique, montrant que la structuration de la membrane plasmique existe aussi dans les modèles végétaux. Néanmoins, comment les domaines membranaires se forment et en quoi ils participent à la signalisation cellulaire reste pour le moment énigmatique.

9.2-Stage post doctoral 1 : Étude de la continuité paroi/membrane /cytosquelette et de son rôle dans la dynamique des protéines de la membrane.

Mon premier stage post doctoral a eu lieu dans le laboratoire de Chris Hawes à Oxford Brookes University. J'ai, pendant trois ans, travaillé à mieux comprendre le lien fonctionnel qu'il peut exister entre la paroi, la membrane plasmique et le cytosquelette chez les plantes. Ce travail a été valorisé par 5 articles. J'ai également assuré le co-encadrement de deux thésards concernant la partie de biologie cellulaire de leurs projets respectifs. Une stagiaire en master a directement travaillé sur mes thématiques de recherche et son travail a été associé à l'article majeur de mon stage post doctoral (Martinière et al., 2012).

Contexte

Comme expliqué précédemment, les protéines, mais également les lipides de la membrane, diffusent latéralement. Ce phénomène devrait avoir pour conséquence une répartition homogène des constituants de la membrane. Néanmoins, il est apparu que les membranes biologiques sont hautement structurées. Elles sont constituées d'une juxtaposition de domaines de taille et forme variable entre lesquels les protéines/lipides peuvent être échangées. Ainsi la membrane est à la fois une mosaïque et une structure fluide.

D'un point de vue théorique, la vitesse de diffusion d'une protéine dans la membrane est en direct relation avec (i) l'agitation thermique (ii) son rayon hydrodynamique dans la membrane et (iii) son encombrement stérique face aux structures cellulaires à proximité. Depuis une dizaine d'années, il est apparu que ce dernier point était particulièrement important. Effectivement, le travail du groupe de Akihiro Kusumi (Université d'Okinawa) a mis en évidence que le cytosquelette d'actine qui est à proximité du feuillet interne de la membrane plasmique des cellules animales peut, par un effet de barrière (« fences ») restreindre la diffusion des protéines membranaires. De plus, il a été montré que des protéines « pikets » créent une jonction entre la membrane et les filaments d'actine, induisant un retard de diffusion des lipides même pour ceux du feuillet externe de la membrane (Fujiwara et al., 2002)(Figure 1).

Chez les plantes, aucun mécanisme diffusif similaire n'avait été décrit. Pourtant, de nombreux exemples montraient l'existence d'une micro-organisation des membranes chez *Arabidopsis thaliana* (Sutter et al., 2006; Raffaele et al., 2009).

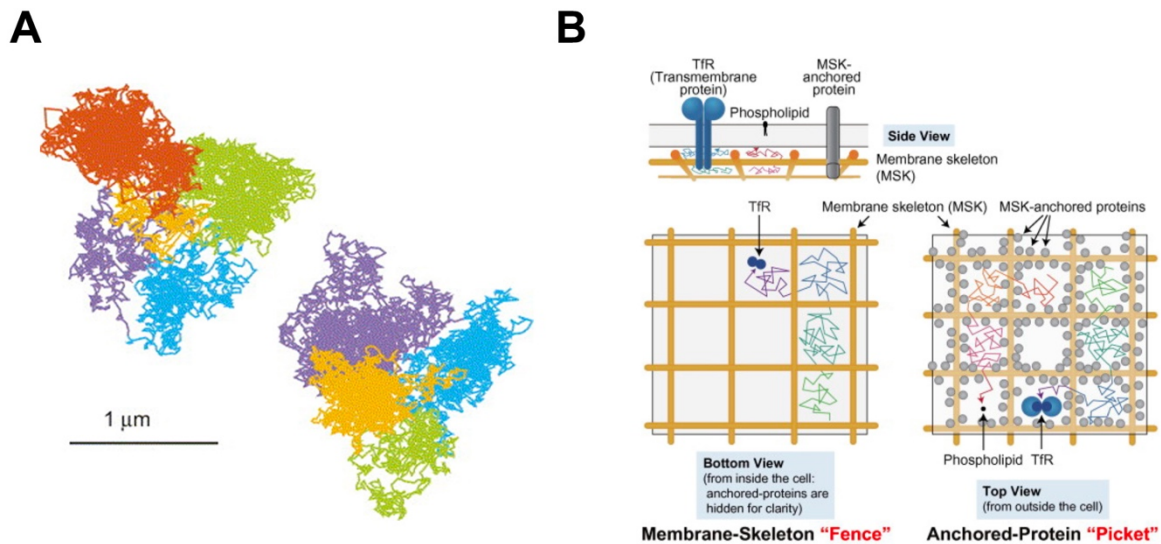


Figure 1 : Modèle en « barrières et piquets » de la membrane plasmique. (A) Trajectoires de deux molécules du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) observées grâce à une caméra à très haute vitesse d'acquisition. Leurs déplacements sont de type Brownien mais dans des domaines séparés. (B) Ce type de comportement de diffusion s'explique par la présence sur le feuillet interne de la membrane du cytosquelette d'actine (Membrane skeleton). Pour une protéine à domaine transmembranaire comme le récepteur à l'EGF, le cytosquelette crée une barrière de diffusion. Ainsi, sa diffusion est non contrainte (de type Brownien) dans le domaine entre les barrières de cytosquelette, mais des sauts peuvent avoir lieu faisant passer les molécules d'un domaine à l'autre. De plus, un grand nombre de protéines à domaine transmembranaire est associé au cytosquelette. Ces piquets, car ils traversent la membrane de part en part, contraignent aussi la diffusion des molécules qui ne sont ancrées que dans le feuillet externe de la membrane, comme des lipides ou des protéines à ancre GPI (D'après Kusumi et al., 2005)

La paroi des cellules participe au contrôle de la diffusion des protéines membranaires

Afin de décrire la mobilité des protéines dans la membrane plasmique, une série de 14 gènes a été clonée en fusion avec la GFP. Une fois exprimés en système hétérologue (feuille de *N. tabacum*), nous avons utilisé le FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching) avec un microscope confocal pour quantifier leur mobilité. De manière surprenante 12 protéines sur 14 se sont avérées très peu mobiles, voire immobiles. Ce résultat souligne deux points importants : (i) chez les plantes, la mobilité latérale des protéines dans la membrane plasmique est très faible, contrairement aux résultats publiés dans les modèles animaux, et (ii) il doit exister une structure qui limite l'effet de la diffusion de ces molécules. Nous avons ensuite généré 7 GFP fusionnées à un domaine minimal pour les adresser à la membrane plasmique (environ 10 acides aminés). Ces fusions représentent les différents types d'ancrages possibles e.g. domaine transmembranaire, modification lipidique. De nouveau, il a été possible d'enregistrer une mobilité latérale très variable d'une construction à une autre, soulignant qu'il existe bien des structures au sein des membranes ou à leur proximité pouvant limiter la diffusion. Nous avons par la suite montré que les radeaux lipidiques, le cytosquelette d'actine et de microtubule n'étaient pas responsables de l'immobilité de ces protéines membranaires. En revanche, la suppression de la paroi cellulaire par digestion enzymatique ou bien la rupture du continuum paroi/membrane cytoplasmique par plasmolyse, restaurent la mobilité des protéines (Figure 2). Ces résultats publiés en 2012 dans PNAS, montrent que la paroi végétale constitue un moyen original pour contrôler la mobilité des protéines de la membrane plasmique. Comme discuté dans un récent article de revue, il serait possible que le modèle « piquet and fences » proposé par le groupe de Kusumi soit inversé chez plantes (Jaillais and Ott, 2020). C'est-à-dire que la paroi jouerait un rôle structurant pour former des domaines membranaires (Figure 2). Cette hypothèse s'appuie sur de récentes observations montrant que certaines

protéines impliquées dans la signalisation cellulaire comme le récepteur à la flagelline, FLS2, et le transporteur d'auxine, PIN3, ont une mobilité latérale qui est contrôlée par la paroi cellulaire, mais aussi par le cytosquelette cellulaire (McKenna et al., 2019).

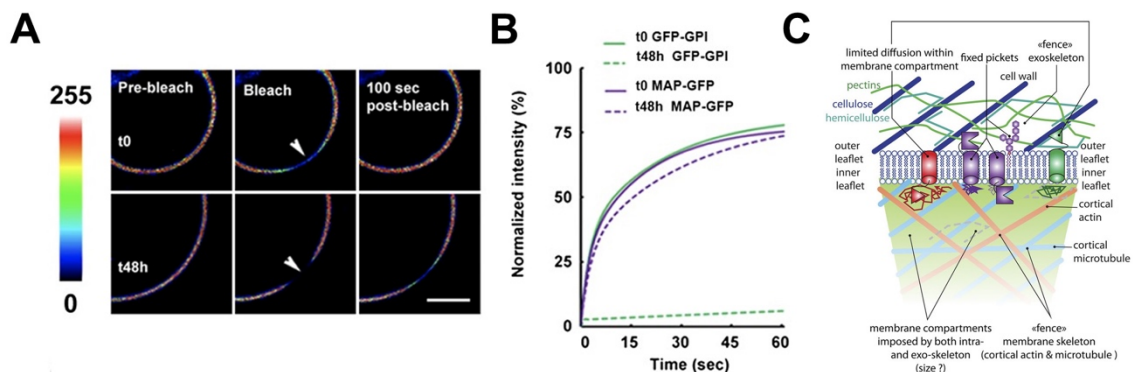


Figure 2 : Rôle de la paroi cellulaire sur la diffusion des protéines de la membrane plasmique. (A-B) Expérience de FRAP réalisée sur des protoplastes soit contrôle (t0) soit après qu'ils aient pu régénérer leurs parois (t48h). (A-B) Des protoplastes expriment une protéine fusion entre la GFP et le domaine d'ancrage GPI de AGP4, qui permet une association avec le feuillet externe de la membrane plasmique. La diffusion latérale de cette protéine est plus importante en condition contrôle (t0 ou ligne continue verte) qu'après régénération de la paroi (t48h ligne pointillée verte). Si les protoplastes expriment une fusion entre la GFP et le domaine d'adressage à la face interne de la membrane plasmique de GPA1 (protéine G alpha), aucun effet de la régénération de la paroi n'est observé (D'après Martinière et al., 2012). (C) Modèle inspiré par le modèle en barrières et piquets de Kusumi et appliqué aux végétaux. La paroi qui est en contact direct avec le feuillet externe de la membrane plasmique pourrait créer des barrières limitant la diffusion latérale des protéines. Il est également possible que des protéines transmembranaires agissent comme piquets en se liant à la paroi. Notons que le cytosquelette d'actine et/ou de microtubules peuvent également jouer un rôle limitant dans la diffusion des protéines (D'après Jaillais and Ott, 2020).

Par la suite et en collaboration avec Jurgen Kleine-Vehn, nous avons pu montrer, par des approches de génétique directe et de modélisation, un lien entre la paroi cellulaire et la localisation correcte du transporteur d'auxine PIN2 (Feraru et al., 2011; Kleine-Vehn et al., 2011), suggérant un rôle de l'interaction paroi/membrane dans les mécanismes de développement de la racine d'*Arabidopsis*. Néanmoins, une démonstration formelle du rôle fonctionnel de l'interaction membrane/paroi reste à faire. Ce manque est principalement dû à notre incapacité à mesurer de façon précise l'induction des signalisations cellulaires par des approches de microscopie.

Les Formines forment un pont moléculaire à travers le continuum paroi/membrane /cytosquelette

La deuxième partie de mon stage post doctoral, a cherché à trouver quel type de protéines pourrait agir comme des « pickets » et potentiellement relier la paroi cellulaire et le cytosquelette (Figure 2, C). Mon travail s'est centré sur le cytosquelette d'actine, qui comme expliqué plus haut, a un rôle central dans le contrôle de la diffusion des protéines dans les membranes plasmiques des cellules animales. Chez les plantes, les interactions entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine sont peu connues malgré qu'il existe un cytosquelette d'actine cortical à proximité de la membrane. De plus, les filaments d'actine sont connus pour réagir à de nombreux stimuli.

La formation *de novo* des câbles d'actine est réalisée à l'aide des complexes arp2/3 ou des formines (Blanchoin and Michelot, 2012). Ces protéines sont responsables de la nucléation et de la polymérisation de câbles d'actine dans la cellule. Contrairement à leurs orthologues animaux, les formines de plantes possèdent un domaine transmembranaire et sont localisées à la membrane plasmique. Cette famille de protéines semble donc fournir de bons candidats pour assurer un lien entre l'extérieur de la cellule et le cytosquelette d'actine, et ainsi participer à la transduction de signaux.

La formine 1 d'Arabidopsis (AtFH1) a été utilisée comme modèle d'étude pour déterminer l'existence d'un lien entre la paroi cellulaire et les filaments d'actine. Par une approche de microscopie confocale, j'ai démontré sa localisation dans la membrane plasmique. Une série de protéines tronquées a été utilisée pour démontrer le rôle du domaine extracellulaire dans plusieurs phénomènes : (i) la bonne localisation de la protéine dans la membrane plasmique (ii) son association avec la paroi cellulaire et (iii) la fonctionnalité de la protéine.

Cette étude, publiée dans Plant Journal en 2011, suggère l'existence d'une connexion directe entre la paroi cellulaire et le cytosquelette d'actine (Martinière et al., 2011). Il serait donc intéressant de poursuivre ce travail afin de confirmer l'interaction entre AtFH1 et la paroi, mais surtout de comprendre quel peut être le rôle de cette interaction. Sert-elle à la transduction de signaux ou est-elle simplement une structure pour l'organisation des membranes ? Il est également possible que ces points d'ancrage servent ou participent aux sites de contact entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique (RE). Effectivement, le RE est une structure très dynamique chez les plantes qui dépend principalement de la dynamique des filaments d'actine. Cette dernière hypothèse est soutenue par le fait qu'AtFH1 a été récemment localisé dans les plasmodesmes (PD) en système homologue, les PDs étant une structure où la membrane plasmique et le RE sont en interaction très étroite (Oulehlová et al., 2019).

9.3-Stage post doctoral 2 : Étude des microenvironnements de pH dans la racine d'Arabidopsis.

Le travail de recherche décrit plus haut a contribué à révéler la complexité de la membrane plasmique des plantes. En plus de ses constituants intrinsèques (protéines et lipides), la paroi et probablement le cytosquelette participent au maintien/à la dynamique de son organisation. Ainsi, la structure de la membrane plasmique ne peut pas être dissociée de son environnement proche. Néanmoins, après ce premier stage post doctoral, le rôle du continuum paroi/membrane/cytosquelette dans la signalisation cellulaire restait à démontrer.

J'ai donc choisi de réinvestir mes compétences en biologie cellulaire des plantes dans le domaine des biosenseurs. Effectivement, ces molécules permettent de suivre par des approches de microscopie, des événements de signalisation *in vivo* à l'échelle subcellulaire. Ils sont donc une voie d'entrée intéressante pour l'étude de la complexité de la signalisation membranaire. Pour cela, j'ai rejoint l'équipe du Dr. Nadine Paris (UMR BPMP) dans lequel j'ai développé un travail sur la relation structure fonction de la racine et l'établissement des gradients de protons grâce à des biosenseurs fluorescents encodés génétiquement. Deux articles ont découlé de ce travail. L'un concerne les gradients de pH le long de la voie sécrétoire et décrit comment ces gradients contrôlent l'adressage des protéines à la vacuole (Martinière et al., 2013). L'autre article est centré sur le rôle des gradients de pH à proximité de la membrane plasmique dans la racine d'Arabidopsis. C'est ce dernier que j'ai choisi de détailler, car il illustre la complexité des membranes biologiques et comment elles sont responsables de micro/nano environnement à leurs proximités.

Étude des gradients de protons à proximité de la membrane plasmique.

En croissance tout au long de leur vie, les racines garantissent l'adaptabilité du végétal à son environnement pédologique et hydrique. Elles assurent l'absorption de l'eau et des minéraux, via deux routes distinctes : la voie intercellulaire ou apoplastique et la voie intracellulaire ou symplastique. En amont des tissus vasculaires, l'endoderme forme grâce

au cadre de Caspary, une barrière de diffusion dans la voie apoplastique (Doblas et al., 2017). Les ions sont alors forcés de passer par le symplasma. Alors que les ions diffusent passivement dans l'apoplasme, ils pénètrent les cellules par un mécanisme actif. Ce transport actif est rendu possible par l'énergie accumulée sous forme d'un gradient de protons transmembranaires créé par des mécanismes d'efflux consommant de l'ATP. L'efflux de protons, nécessaire à l'énergisation de la membrane, est également important pour la croissance des cellules (modèle de la croissance acide) et la transduction de signaux. Bien qu'étudiées depuis de longues années, les variations de pH sont difficiles à quantifier dans le contexte physiologique de la racine.

Pour analyser le pH *in vivo* dans les cellules végétales, j'ai développé une nouvelle approche fondée sur la modulation de fluorescence en fonction du pH d'un variant de la GFP, la Phluorin (Miesenböck et al., 1998). Après avoir produit la protéine *in vitro* et décrit ses propriétés biochimiques, des constructions génétiques ont été réalisées. Ensuite, la Phluorin a été adressée dans l'apoplasme, à la surface de la membrane plasmique côté externe ou interne, ainsi que dans le cytoplasme de plantes transgéniques (Figure 3, A).

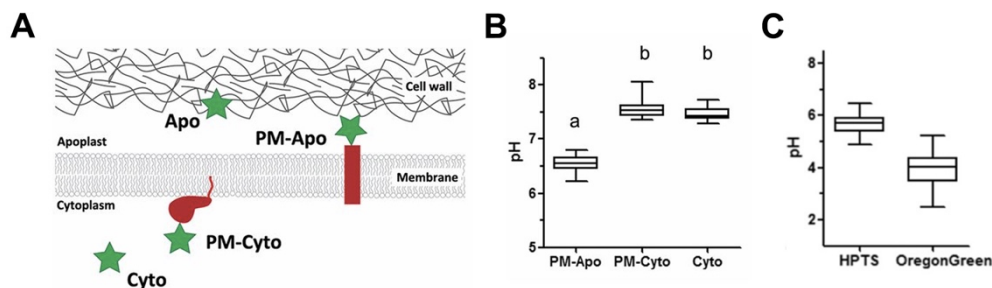


Figure 3 : Gradient de pH à proximité de la membrane plasmique chez *Arabidopsis*. (A) Schéma des différentes constructions utilisées permettant d'adresser le biosenseur pHluorin, soit libre dans le cytoplasme (Cyto), soit ancré à la surface du feuillet interne de la membrane plasmique grâce au domaine Kras (PM-Cyto). Le biosenseur a également été adressé à la surface de la membrane plasmique, ancré du côté externe (PM-Apo) ou libre dans l'apoplasme (Apo). (B) Le pH mesuré grâce à la pHluorin est identique pour PM-Cyto et Cyto. Par contre, il varie fortement (une unité de pH) de celui de PM-Apo. De manière surprenante, la fluorescence de la pHluorin est quenchée par l'acidité dans les plantes exprimant la construction Apo. (C) Pour évaluer le pH du liquide apoplastique, des sondes fluorescentes ont été utilisées (OregonGreen et HPTS). Dans les deux cas, les valeurs de pH mesurées sont bien plus basses que celle qui ont été obtenues avec PM-Apo. Ce résultat suggère que le pH du liquide apoplastique est bien plus acide à distance qu'à proximité de la membrane plasmique.

L'étude de ces différentes lignées a montré l'existence d'un gradient radial de pH entre le milieu extérieur et les différentes couches cellulaires de la racine : épiderme, cortex, endoderme et cylindre central (Martinière et al., 2018). En comparant les lignées exprimant la Phluorin ancrée à la membrane plasmique coté apoplastique et coté cytoplasmique, nous avons pu calculer le gradient transmembranaire de protons présent dans les cellules. Celui-ci change drastiquement des deux côtés du cadre de Caspary reflétant les activités d'influx d'ions des différents types cellulaires. Mais le résultat le plus surprenant concerne le fait que le pH au voisinage de la membrane plasmique coté externe (quelques nanomètres) est bien plus alcalin qu'attendu et surtout qu'il diffère d'au moins une unité de pH avec celui de l'apoplasme (à distance de la membrane) (Figure 3, B et C). Ce résultat montre que bien qu'il existe une continuité physique entre l'espace apoplastique et la membrane plasmique la nature ionique peut changer de manière drastique. De plus, le fait que l'apoplasme soit plus acide à distance qu'à proximité de la membrane suppose que la paroi puisse jouer un rôle de tampon ou soit capable d'être une source de protons au même titre que les transporteurs de la membrane plasmique tels que les P-ATPase.

Ainsi, les approches de biosenseurs permettent d'obtenir des données quantitatives *in vivo* avec une très grande acuité spatiale et sont des outils puissants pour l'étude de la signalisation cellulaire.

9.4 Signalisation précoce en réponse au stress osmotique

Fort de ces deux expériences, l'une centrée sur la structure de la membrane et l'autre sur les biosenseurs fluorescents, j'ai choisi de rejoindre l'équipe de Christophe Maurel comme CR CNRS pour développer une thématique nouvelle dans son équipe. Désormais, mon travail cherche à relier la structure de la membrane, en particulier le continuum paroi/membrane/cytosquelette, et la signalisation précoce des cellules en réponse à un signal osmotique.

La perception du stress hydrique

Les plantes subissent un stress hydrique lorsqu'elles sont soumises à des contraintes environnementales aussi diverses que la sécheresse, la salinité des sols, une faible humidité de l'air ou même des variations de température. Afin de s'adapter à ces contraintes, les racines des plantes peuvent, par exemple, modifier leur architecture (hydropatterning) et/ou réorienter leur croissance vers les zones du sol de plus fort potentiel hydrique (hydrotropisme) (Robbins and Dinneny, 2015; Dietrich et al., 2017). En plus de ces réponses à moyen ou long terme, les plantes sont aussi capables de réponses rapides, en quelques minutes à quelques dizaines de minutes. Par exemple, lors d'un stress salin ou osmotique, la perméabilité hydrique des racines est fortement réduite (Boursiac et al., 2005). En amont de ces réponses, les cellules végétales doivent percevoir et transduire le signal de « disponibilité en eau ». Différents types de mécanismes moléculaires contribuent au moins partiellement à la perception du signal hydrique, impliquant notamment des canaux mécanosensibles appartenant à la famille des MSLs ou à celle de OSCA1. Il a aussi été montré que le module MIZ1/ECA1 présent à la surface du réticulum endoplasmique détermine les flux de calcium induits dans les premiers moments de la signalisation hydrique (Yuan et al., 2014; Hamilton et al., 2015; Shkolnik et al., 2018).

Malgré ces quelques indications, les événements de signalisation cellulaires précoces restent largement inconnus. **Mon projet de recherche essaie de combler cette lacune et s'attache à décortiquer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la perception du signal hydrique chez les plantes.**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) agissent comme messagers secondaires en amont d'un certain nombre de réponses osmotiques.

Avant mon arrivée dans l'équipe, les travaux publiés par Boursiac et al., 2008 et plus récemment par Wudick et al., 2015, ont montré un lien étroit entre la signalisation ROS des cellules et la réponse des plantes au stress osmotique au niveau racinaire (Boursiac et al., 2008; Wudick et al., 2015). D'une part, l'application exogène de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) induit une réponse d'endocytose de AtPIP2;1, une aquaporine primordiale dans l'homéostasie hydrique des cellules; d'autre part, l'H₂O₂ exogène inhibe la conductivité hydraulique racinaire (Boursiac et al., 2008; Luu et al., 2012). De plus, un prétraitement des racines avec une catalase supprime l'effet inhibiteur du stress osmotique sur la conductivité hydraulique racinaire (Boursiac et al., 2008). Ainsi, il semble que la production de ROS puisse mimer les réponses des plantes au stress osmotique tant pour des réponses

cellulaires qu'à l'échelle d'un organe entier. Dès lors, la signalisation ROS apparaît comme un marqueur précoce de la réponse des cellules à une stimulation osmotique.

Stratégie et objectif de mon projet de recherche

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la signalisation précoce des plantes en réponse au signal hydrique, deux approches ont été initiées durant ces dernières années. D'une part, nous avons caractérisé plusieurs éléments de la voie de signalisation osmotique par une approche ascendante en partant des enzymes de production de ROS. D'autre part, nous avons cherché de nouveaux mécanismes moléculaires en utilisant la variation génétique naturelle observée dans les populations d'*Arabidopsis thaliana*.

Lors de mon arrivée dans l'équipe « Aquaporines », mon premier objectif a été de développer de nouvelles approches méthodologiques afin, d'une part, de quantifier *in vivo* l'accumulation des ROS dans la racine d'*Arabidopsis* et, d'autre part, de développer une approche de microscopie à super-résolution afin de mieux caractériser la dynamique moléculaire des protéines dans les membranes.

9.4.1 Développement d'outils pour la quantification de la production de ROS *in vivo* et pour l'étude en molécule unique de la diffusion et du clustering des protéines

*Quantification *in vivo* des ROS dans la racine d'*Arabidopsis*.*

De nombreuses références bibliographiques rapportent que le stress osmotique induit la production de ROS au niveau racinaire. J'ai donc cherché à reproduire ces résultats. Après avoir testé un nombre important de sondes sensibles aux ROS, qu'elles soient chimiques ou encodées génétiquement, mon choix s'est arrêté sur la sonde fluorescente dehydroethidium (DHE) (Chen et al., 2013). Cette sonde possède un triple avantage. Tout d'abord, elle a une grande sensibilité pour l'ion super oxyde qui est considéré comme la première espèce de l'oxygène produite lors de la signalisation ROS. Deuxièmement, cette sonde est très stable une fois oxydée, facilitant la quantification du signal et permettant une grande reproductibilité des résultats. Enfin, elle ne nécessite pas de manipulation génétique et permet donc de tester facilement un grand nombre de génotypes/accessions.

Mise au point d'un outil de suivi en molécule unique de la dynamique membranaire des protéines

La manière dont les protéines sont organisées dans les membranes est essentielle aux processus de signalisation cellulaire. Un des enjeux de mon travail consiste donc à relier la dynamique membranaire et les processus de signalisation cellulaire. Grâce aux récentes avancées de la microscopie à super-résolution, il est désormais possible de révéler la structure et la dynamique de nanodomains dans les membranes de cellules vivantes et d'étudier comment ces structures participent aux événements de signalisation (Figure 4 A). J'ai donc choisi d'investir une part de mon temps à adapter ces nouvelles techniques de microscopie aux échantillons végétaux.

Tout d'abord, j'ai aidé Doan Trung Luu (CR1-CNRS) pour la finalisation d'un article décrivant la première application d'une technique de super résolution, le sptPALM à des cellules végétales (Hosy et al., 2015). Cette technique permet de localiser des protéines avec une très grande résolution spatiale, dans des échantillons vivants. Les résultats obtenus en collaboration avec Eric Hosy (Institut Interdisciplinaire de Neurosciences,

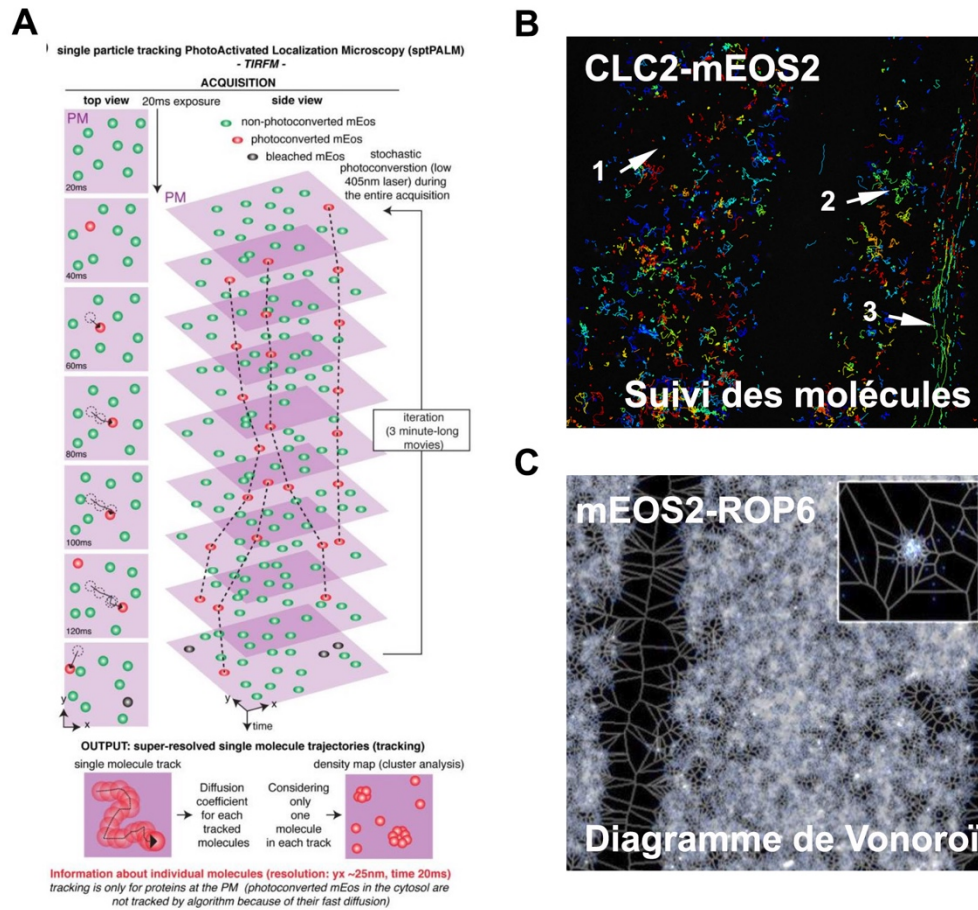


Figure 4 : Développement de la single particle tracking par Photoactivated Localisation Microscopy (sptPALM) chez les plantes. (A) Schéma explicatif du SptPALM. Grâce à l'utilisation de protéines fluorescentes photo convertibles telles que la mEOS2, l'observation des différentes molécules est séparée dans le temps. Une faible illumination avec un laser en proche UV, permet la conversion d'un petit nombre de molécules qui peuvent donc être réduites à une structure de 30-50 nm en fonction du rapport signal sur bruit. Comme cette expérience est réalisée sur des échantillons vivants, les molécules sont suivies en fonction du temps jusqu'à ce que la fluorescence de la mEOS2 disparaisse (phénomène de « bleaching » ou photoblanchiment). Ainsi, il est possible de décrire le comportement de diffusion molécule par molécule, mais aussi de réaliser des cartes de densité moléculaire (D'après Platre et al., 2019). (B) Exemple de suivi de molécules sur un échantillon exprimant la chaîne légère de la clathrine CLC2 en fusion avec la mEOS2. Chaque couleur représente le déplacement d'une molécule en fonction du temps. Plusieurs comportements de diffusion peuvent coexister dans la même cellule : la diffusion contrainte (flèche 1), libre (flèche 2) et dirigée (flèche 3). (C) Segmentation de l'espace par diagramme de Voronoï permettant le calcul de la densité locale pour chaque molécule détectée. Dans le cas de cellules exprimant une fusion entre la mEOS2 et la GTPase ROP6, des domaines de forte densité locale sont détectés (image zoomée).

Bordeaux) ont permis (i) de préciser la nano-organisation de l'aquaporine AtPIP2;1 dans la membrane plasmique (MP) (ii) de révéler que la paroi et les filaments d'actine contraignent sa diffusion latérale et (iii) que le stress osmotique induit une augmentation de sa diffusion latérale. Enfin, ce travail a démontré que la technique de sptPALM était totalement fonctionnelle pour des échantillons végétaux vivants. Ces résultats, tant du point de vue conceptuel que méthodologique, se sont avérés particulièrement fondateurs.

Dans un deuxième temps et pour des raisons pratiques, j'ai développé une collaboration locale avec l'équipe de Marcelo Nollmann (CBS, Montpellier) afin de pouvoir disposer plus facilement d'un microscope PALM. Durant les premiers mois de cet échange, Jean Bernard Fiche (IR INSERM) a développé un logiciel d'analyse d'images open source pour nous permettre une étude approfondie des données générées (Figure 4 B et C). Cette étape de transfert est désormais finie et nous disposons désormais d'un poste de travail opérationnel pour nos observations et d'un logiciel d'analyse qui permet, sur un même jeu de données,

d'extraire un grand nombre de paramètres dont la densité moléculaire, la diffusion et des informations sur l'organisation spatiale des protéines. Cette approche expérimentale est particulièrement intéressante pour mon projet de recherche, car elle permet de relier la signalisation cellulaire et la nano-organisation de la MP des plantes. Un article « méthode » est cours de rédaction sur cette partie.

9.4.2 Identifier la ou les voie(s) de production de ROS activées par un signal osmotique

Deux voies de production de ROS sont activées lors du stress osmotique

La deuxième étape de mon travail a consisté en une approche pharmacologique afin de déterminer la nature des mécanismes moléculaires aboutissant à la production de ROS. De par la bibliographie, la famille des NADPH oxydases semblait procurer de bons candidats (Baxter et al., 2014) (Figure 5). Pour ce faire, des plantes ont été prétraitées pendant 30 minutes avec du diphenyleneiodonium (DPI), un inhibiteur des NADPH oxydases, puis soumises à un stress osmotique en utilisant du sorbitol. De manière assez surprenante, l'effet du DPI reste modeste suggérant que les NADPH oxydases participent à la signalisation osmotique, mais ne sont pas les seuls acteurs impliqués.

Il est connu dans la littérature que la réaction de Fenton peut dans certaines conditions générer des ROS. En particulier, les ions ferreux (Fe^{2+}) peuvent réagir avec l'oxygène pour produire du super oxyde (O_2^-). J'ai donc testé l'effet de la déplétion en Fe^{2+} sur la production de ROS lors d'un stress osmotique. De manière similaire au DPI, une inhibition partielle de la réponse des cellules a été observée. En revanche, le co-traitement par du DPI et un chélateur de Fe^{2+} entraînent une inhibition totale de la réponse de production de ROS. Ces résultats démontrent que lors du stress osmotique deux voies coexistent, l'une impliquant les NADPH oxydases et l'autre le Fe^{2+} .

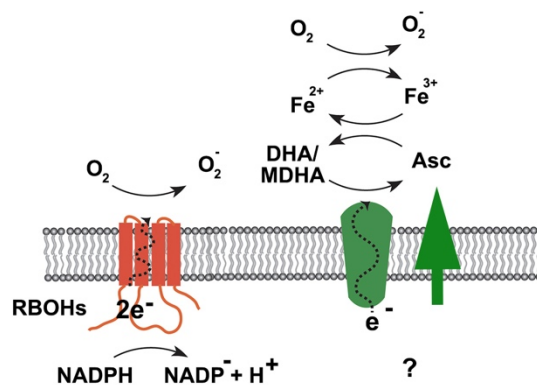


Figure 5 : Modèle de la production d'espèces réactives de l'oxygène lors de la stimulation osmotique. Deux mécanismes sont en jeu. Le premier nécessite l'activation de deux isoformes de RBOHs qui utilisent le NADPH cytosolique comme source d'électrons pour former du super oxyde (O_2^-) dans l'apoplaste des cellules. Le deuxième système de production de super oxyde utilise le fer réduit (Fe^{2+}), qui se forme grâce à la présence d'ascorbate (Asc) dans l'apoplaste des cellules lors de la stimulation osmotique. Le mécanisme moléculaire permettant cette augmentation est inconnu. Il pourrait s'agir soit de la régénération d'ascorbate à partir du déhydroascorbate (DHA) déjà présent dans l'apoplaste, soit plus directement de l'efflux d'ascorbate cytoplasmique (Martinière et al., 2019).

Cependant, le fer est présent majoritairement sous forme oxydée, Fe^{3+} , dans les plantes. Ceci suggère qu'il existerait un mécanisme qui permettrait la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} en réponse au stress. Cette conversion peut avoir lieu via de multiples voies, dont l'une met en jeu l'ascorbate comme agent réducteur (Figure 5). J'ai testé cette hypothèse en co-

incubant des plantes avec une enzyme, l'ascorbate oxydase. Nous montrons que la déplétion en ascorbate mime en tout point l'effet de la déplétion en Fe^{2+} , démontrant ainsi que la réduction du fer induit par le stress osmotique a lieu grâce à l'ascorbate apoplastique.

Ces résultats ont été confirmés génétiquement, en utilisant notamment des plantes déficientes pour RBOHD et F, les deux isoformes de NADPH oxydase de la voie DPI sensible. De plus, nous avons utilisé des plantes mutantes accumulant moins d'ascorbate (Collaboration S. Mari, BPMP). En accord avec notre modèle, nous avons observé que ces génotypes montrent une réponse ROS réduite lors d'un stimulus osmotique. Ainsi, deux mécanismes de production de ROS sont induits lors du signal osmotique, l'un étant dépendant des NADPH oxydases RBOHD et F, et l'autre mettant en jeu le couple ascorbate/fer. Néanmoins, nous n'avons pas été en mesure de déterminer par quels mécanismes exacts le transfert de pouvoir réducteurs avait lieu du cytoplasme vers l'apoplaste (Figure 5).

Les ROS produits par RBOHD et F contrôlent spécifiquement certaines réponses cellulaires

Nous avons ensuite cherché à tester les rôles respectifs de ces deux voies dans la réponse des cellules au signal osmotique. Alors que les voies NADPH oxydase et ascorbate/fer sont toutes deux nécessaires pour induire l'endocytose, nous avons montré que seuls les ROS produits par RBOHD et F sont nécessaires pour induire l'endocytose d'un cargo spécifique, l'aquaporine PIP2;1. Nous avons ensuite mis à profit l'approche de sptPALM décrite plus haut pour définir le rôle de la production de ROS dans le contrôle de la dynamique moléculaire de plusieurs protéines de la membrane plasmique. À nouveau, nous avons pu montrer que le clustering de PIP2;1 est dépendant des ROS produits par RBOHD et F, mais pas de ceux issus de la voie ascorbate/fer.

Ces résultats sont particulièrement intéressants, car ils montrent pour la première fois le rôle du couple ascorbate/fer dans un événement de signalisation cellulaire. De plus, nos résultats suggèrent que la nature du système de production de ROS peut encoder pour la spécificité de la réponse cellulaire. Ce travail a été publié en 2019 dans la revue *Plant Physiology* et j'en suis le « corresponding author » (Martinière et al., 2019).

9.4.3 Les nanodomains de la petite GTPase ROP6 servent de plateforme de signalisation pour induire la production de ROS en réponse à un signal osmotique.

Les résultats décrits ci-dessus ont révélé le rôle de la production de ROS, à la fois par RBOHD/F et par le couple ascorbate/fer, sur la régulation de l'activité endocytotique des cellules végétales, démontrant leur implication dans la signalisation osmotique. Mon objectif étant de décrypter cette voie par une approche ascendante, il apparaît désormais intéressant d'identifier les acteurs moléculaires qui régulent, dans un contexte de contrainte osmotique, l'activité de RBOHD/F et l'efflux d'ascorbate.

La régulation de RBOHD est bien décrite dans la bibliographie et pas moins de 5 mécanismes distincts ont été rapportés. Parmi les protéines impliquées, les petites GTPases de type ROP sont particulièrement intéressantes, car elles jouent également un rôle ubiquiste dans le trafic vésiculaire.

ROP6 régule la production de ROS, l'endocytose et la formation de lignine en réponse au signal osmotique

Dans la famille des ROP, ROP6 est la seule isoforme à être régulée transcriptionnellement par le stress osmotique. Elle a donc constitué un bon candidat à examiner dans notre modèle. De manière frappante, les plantes invalidées pour le gène ROP6 (*rop6.2*) ne sont plus capables de produire de ROS lors d'un stress osmotique et ce phénotype est totalement restauré dans des lignées complémentées (*rop6.2xpROP6:mcitrin-ROP6*). Ce résultat suggère que ROP6 agirait en amont de RBOHD/F, mais aussi du système d'efflux d'ascorbate. Nous avons ensuite testé des plantes invalidées pour d'autres isoformes de ROP exprimées dans la racine. Il est apparu que ni ROP2 ni ROP4 ne semblent nécessaires à la production de ROS induite par un stress osmotique.

Afin de confirmer ce résultat, j'ai également examiné l'induction de l'endocytose en réponse à un stress osmotique. Comme attendu, les plantes *rop6.2* (contrairement aux plantes complémentées) ne manifestent aucune endocytose accrue après un stress osmotique. Comme *rop6.2* semble être totalement insensible au stimulus osmotique, j'ai cherché à décrire son comportement concernant des réponses tissulaires et cellulaires plus tardives. Le dépôt de lignine autour de la stèle des racines est connu pour être induit rapidement après exposition au stress osmotique et d'être dépendant de RBOHF (Lee et al., 2013). Cette réponse est significativement atténuée dans le mutant *rop6.2*.

L'activation de la protéine ROP6, plutôt que sa quantité dans la membrane plasmique, semble limitante pour la signalisation osmotique.

Des lignées surexprimant ROP6 ont été générées. Leur analyse a montré que leur niveau de ROS en condition contrôle ou après un traitement osmotique est en tout point similaire à celui de plantes témoins. Ce résultat suggère que la quantité de protéine ROP6 n'est pas un facteur limitant pour l'accumulation de ROS dans les cellules. Les ROPs fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires. Elles existent sous deux formes. L'une est associée au GDP, inactive, et l'autre, active, est associée au GTP. Il est possible d'obtenir par mutation une ROP constitutivement active (CA) ou inactive (DN). Nous avons donc cherché à tester si l'activation de ROP6 pouvait être limitante pour la signalisation osmotique. Alors que des plantes *rop6.2xpROP6:mcitrin-ROP6(CA)* montrent un niveau de ROS toujours élevé, les lignées *rop6.2xpROP6:mcitrin-ROP6(DN)* maintiennent un niveau basal de ROS, indépendamment de la présence d'un stimulus osmotique. Ce résultat démontre que l'activation de ROP6 est nécessaire et suffisante pour induire la production de ROS.

Le signal osmotique induit un changement de dynamique moléculaire de la protéine ROP6
Le modèle d'activation des Rho GTPases, famille dont fait partie la protéine ROP6, suppose la localisation cytoplasmique des protéines à l'état inactif et membranaire lors de leur activation. Nous avons cherché à vérifier ce phénomène dans les différentes lignées générées : *rop6.2xpROP6:mcitrin-ROP6*, *rop6.2xpROP6:mcitrin-ROP6(CA)* et *rop6.2xpROP6:mcitrin-ROP6(DN)*. De manière inattendue, aucune différence de localisation n'a pu être observée, la protéine ROP6 étant majoritairement associée à la membrane plasmique des cellules.

Nous avons donc cherché à voir si des changements plus subtils pouvaient avoir lieu dans la membrane par une approche de microscopie TIRF. Alors que des plantes exprimant GFP-ROP6 montrent un marquage uniforme de la membrane, des spots de petite taille (environ 250nm) apparaissent une à deux minutes après une stimulation osmotique. Grâce à l'approche sptPALM détaillée plus haut, nous avons pu montrer que plusieurs populations de ROP6 coexistent dans la membrane plasmique. L'une est immobile et organisée en nanodomains, lors que l'autre diffuse et ne présente pas d'organisation particulière. De

manière intéressante, quelques minutes après l'application d'un stress osmotique environ 25% des protéines diffusibles deviennent immobiles formant de nouveaux nanodomains.

Nous avons ensuite cherché à déterminer si les nanodomains de ROP6 pouvaient être le support de la production de ROS des cellules. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de sptPALM sur des plantes exprimant la forme auto active de ROP6 qui, pour rappel, conduit à une accumulation constitutive de ROS dans les cellules. Dans ce cas, ROP6(CA) montre de manière constitutive une faible diffusion et un grand nombre de nanodomains ROP6 et, ce, même en absence de stimulation. D'autre part, nous avons également généré des plantes exprimant une forme mutée de ROP6 (ROP6^{C21A/C156A}). Les deux cystéines mutées sont connues pour être nécessaires à l'acylation de cette protéine et à sa localisation dans les membranes résistantes aux détergents (MRD) (Sorek et al., 2010). Dans ce cas, le traitement hyperosmotique n'est plus en mesure d'induire la formation de nanodomains de ROP6 et les plantes *rop6.2xpROP6:citr-ROP6^{C21A/C156A}* ne sont pas capables d'accumuler des ROS en réponse au signal osmotique. Ces résultats établissent que c'est bien la formation de nanodomains dans la membrane qui est nécessaire à l'induction de la production de ROS lors de la signalisation osmotique (Figure 6).

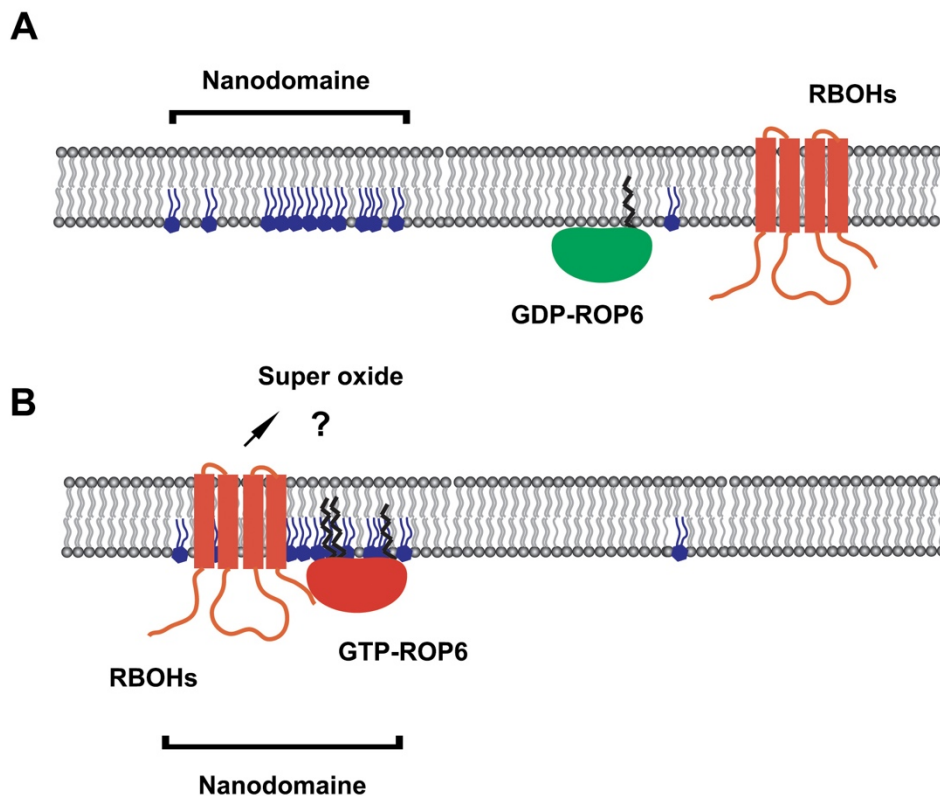


Figure 6 : Modèle d'activation de la production d'espèces réactives de l'oxygène dépendante de RBOH. (A) En condition contrôlée, la petite GTPase ROP6 est sous forme inactive (association au GDP) et diffuse dans la membrane plasmique. Elle est exclue des nanodomains comme le sont également les RBOHs. (B) Quelques minutes après une stimulation osmotique, ROP6 est activée (association au GTP) très probablement par une GEF. Elle peut alors interagir avec des protéines effectrices dont RBOHD et F. ROP6 est également acylée en C21 et C156, probablement par une acyl transférase (PAT). La protéine ROP6, probablement en complexe avec les RBOHs, est alors recrutée dans les nanodomains. On imagine que c'est dans ces nanodomains que les RBOHs sont activées et produisent du super oxyde.

RBOHD est recruté dans les nanodomains de ROP6 en réponse à un signal osmotique.

Nous avons ensuite cherché à déterminer comment ROP6 pouvait activer la production de ROS des cellules. Tout d'abord, en utilisant une approche de FRET-FLIM, nous avons montré que ROP6(CA) et non ROP6(DN) interagit avec les NADPH oxydases RBOHD et F en système hétérologue. En accord avec ce résultat, nous avons montré que GFP-RBOHD forme également des clusters dans la membrane plasmique suite au stress osmotique et qu'elle co-localise bien avec les nanodomains de ROP6. Nous avons ensuite cherché à déterminer si la présence de ROP6 pouvait contrôler la formation de clusters de RBOHD. Ainsi, des plantes exprimant ROP6(CA) montrent, même en absence de stimulation osmotique, des clusters de RBOHD dans la membrane. Ce dernier résultat suggère que la protéine ROP6, une fois activée, pourrait recruter RBOHD dans les nanodomains ROP6 pour ainsi stimuler la production de ROS et induire une partie des réponses des cellules au signal osmotique (Figure 6).

Ce travail qui est pour grande partie issu de la thèse de Marija Smokvarska (2017-2020), est actuellement en révision dans la revue *Current Biology*.

2.4.4 Les nanodomains de petite GTPase ROP6 servent également de plateforme de signalisation pour le signal auxine.

Le travail sur la petite GTPase ROP6 a été l'occasion d'initier une collaboration avec le groupe d'Yvon Jaillais (RDP, Lyon). Effectivement, nous avons pu mettre en évidence, en particulier par sptPALM, que la protéine ROP6 pouvait former des nanodomains en réponse à une stimulation par l'auxine (Platre et al., 2019). De plus, les collègues de l'équipe d'Yvon Jaillais ont montré que l'interaction entre l'extrémité C-terminale de cette protéine et les lipides anioniques de type phosphatidylsérine (PS) permettent de jouer un rôle de modulateur de la réponse auxine en modifiant le temps de résidence des protéines ROP6 dans les nanodomains (Platre et al., 2019). Ce travail très original a été publié l'année dernière dans la revue *Science*.

Ainsi, il est apparu à la lumière de ces travaux que la formation de nanodomains de ROP6 est un mécanisme général et qu'elle ne semblerait a priori pas en mesure de déterminer la spécificité du signal en amont. Néanmoins, à ce stade, il nous a été difficile de déterminer avec précision si les nanodomains de ROP6 induits par l'auxine ou par le signal osmotique sont en tout point similaires. Afin de tester cette hypothèse, nous avons traité avec de l'auxine des plantes exprimant GFP-RBOHD. Dans ces conditions, nous n'avons pas été en mesure de détecter la formation de clusters de RBOHD, *a contrario* de ce que nous avons trouvé pour le signal osmotique. De manière cohérente, nous n'avons pas non plus été en mesure de détecter une augmentation de l'accumulation de ROS dans les cellules après un traitement auxine. Ce résultat suppose que les nanodomains de ROP6 sont constitués de protéines effectrices différentes, en fonction des signaux amont (Figure 7). Il est donc envisageable que coexistent dans la membrane des nanodomains de ROP6 différents en fonction des signaux en amont. Cette hypothèse de travail soulève un grand nombre de questions (Figure 7). En particulier, elle implique que la structuration en domaines de la membrane pourrait permettre de déterminer une grande spécificité de signal avec un nombre très limité d'acteurs moléculaires, dans notre cas ROP6. L'étude de ce phénomène constitue une partie du projet de travail pour les années à venir, décrit dans la partie 6.

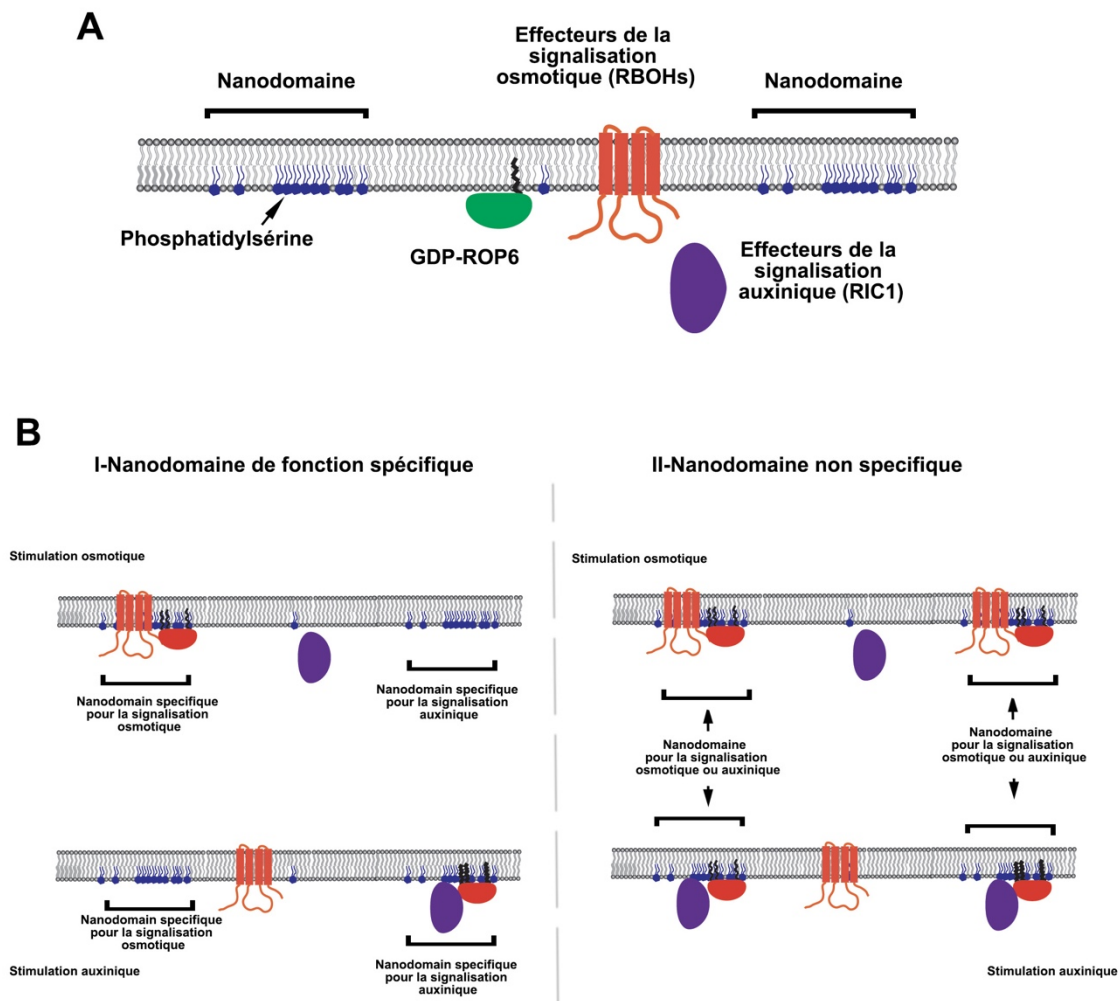


Figure 7 : Modèle d'activation de ROP6 par le signal osmotique ou auxinique. Platre et al. (2019) ont montré, qu'en réponse au signal auxine, les protéines ROP6 sont associées à des nanodomains très similaires en taille et forme à ceux décrits pour la signalisation osmotique. Ces auteurs ont aussi montré que le temps de résidence de ROP6 dans les nanodomains est déterminé par la présence de phosphatidylsérine. Enfin, la quantité de phosphatidylsérine dans les membranes conditionne de manière quantitative la réponse cellulaire au signal auxine. Malgré toutes ces similitudes, nous avons montré que l'activation par l'auxine de ROP6 ne permet pas le recrutement de RBOHs qui est donc un effecteur spécifique de la signalisation osmotique. Nous imaginons donc le modèle suivant. (A) En aval de ROP6, il coexiste dans la membrane plasmique des protéines effectrices pour la signalisation auxinique mais aussi osmotique. D'après Platre et al., 2019, des nanodomains contenant de la phosphatidylsérine préexistent dans la membrane (B) Lors de la stimulation des cellules, soit le recrutement des protéines effectrices a lieu dans des nanodomains différents en fonction du type de signal (Cas I), ou bien tous les nanodomains sont utilisés pour le recrutement des effecteurs osmotiques ou auxinique en fonction du signal en amont (Cas II).

9.4.5 Interaction entre la signalisation du statut de la paroi et la signalisation osmotique.

Depuis quelques années, des avancées majeures ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes de perception et de signalisation des cellules en réponse aux modifications de l'état de la paroi pecto-cellulosique (Wolf et al., 2012; Nissen et al., 2016). Des protéines kinases de la famille des CrRLK, dont un des membres est FERONIA, forment un complexe avec la protéine à ancre GPI appelée LRE-Like GPI-AP1 (LLG1), des peptides apoplastiques de la famille des Rapid alkalization factors (RALFs) et des extensines à domaine LRR de la famille Leucin-riche Repeat Extensin protein (LRXs) (Herger et al., 2019). Une fois activée, cette voie de signalisation entraîne une augmentation du calcium intracellulaire, ainsi qu'une accumulation de ROS contrôlée par les ROPs. Bien qu'il ne soit

pas encore très clair comment le complexe LRX/RALF/LGG1/CrRLK permet de percevoir le statut de la paroi, il a été montré que cette voie de signalisation est induite par de multiples stimuli au niveau de la racine, comme un stress salin, une stimulation mécanique, ou l'élongation cellulaire (Shih et al., 2014; Feng et al., 2018; Dünser et al., 2019).

Cette voie pourrait interagir avec la signalisation osmotique. Effectivement, la voie CrRLK partage un certain nombre d'acteurs moléculaires avec la signalisation osmotique comme l'activation des petites GTPase de la famille des ROPs et l'accumulation de ROS dans les cellules. De plus, il est vraisemblable que la stimulation osmotique modifie l'état de la paroi des cellules et donc pourrait activer les CrRLK. Nous avons donc cherché à tester si ces deux voies de signalisation pourraient interagir. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur FERONIA qui est sûrement la CrRLK la mieux décrite.

FERONIA est nécessaire pour le bon fonctionnement de la signalisation osmotique, mais agit en aval de l'activation de ROP6.

Ce travail qui est réalisé par Marija Smokvarska (thèse 2017-2020) a montré que les plantes invalidées pour le gène FERONIA ne sont plus en mesure d'accumuler des ROS lors d'une stimulation osmotique. Ce résultat bien qu'intéressant n'est pas étonnant, car le mutant *fer* a un phénotype développemental très fort et possède une importante altération de sa signalisation hormonale (auxine, ABA, ...) (Duan et al., 2010; Chen et al., 2016; Barbez et al., 2017). C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer si un traitement court avec le peptide RALF1 (activateur de la voie FERONIA) et RALF23 (inhibiteur de la voie FERONIA) pouvait agir sur la signalisation osmotique (Stegmann et al., 2017). Alors que RALF1 n'a pas d'effet, RALF23 inhibe complètement l'accumulation des ROS induite par un traitement osmotique. Nous avons ensuite généré une lignée ROP6CA x *fer* avec l'idée que si FERONIA agit en amont de ROP6, la mutation *fer* ne devrait pas voir d'effet sur le phénotype des plantes exprimant ROP6CA. Nous avons obtenu le résultat inverse, montrant que l'absence de FERONIA supprime le phénotype ROS constitutif de ROP6CA, et ce bien que la protéine ROP6CA soit toujours présente dans les cellules et localisée à la membrane. Comme nous savons que la formation de nanodomains de ROP6 est nécessaire pour la signalisation osmotique, nous avons réalisé des expériences de sptPALM sur des lignées EOS-ROP6 x *fer*. Dans ce fond génétique, la formation de nanodomains n'est plus induite par la stimulation osmotique. Ce résultat suppose que FERONIA agit sur la formation des nanodomains de ROP6, mais non sur l'activation de ROP6.

FERONIA permet la localisation correcte de PS à la membrane plasmique

Le travail de Platre et al., 2019, a clairement établi que les PS sont des lipides anioniques primordiaux pour la signalisation auxine en agissant sur le temps de rétention de ROP6 dans les nanodomains. De manière intéressante, le mutant de biosynthèse des PS, *pss1*, présente une forte altération développementale qui, par de nombreux aspects, ressemble à celle du mutant *fer* (Platre et al., 2018). Aussi, nous avons émis l'hypothèse que FERONIA pourrait intervenir dans l'accumulation des PS. Pour cela, nous avons collaboré avec Patrick Moreau (LBM, Bordeaux) afin de quantifier les lipides (PA, PS, PI, PE, et PC) dans différents mutants invalidés pour FERONIA. Aucune altération n'a pu être observée. Ensuite, nous avons utilisé deux biosenseurs, EVCT-Citr et LAC2-Citr, pour localiser les PS dans *fer* (Platre et al., 2018; Platre et al., 2019). Ces senseurs sont constitués par des domaines protéiques qui s'associent spécifiquement avec les PS et qui sont en fusion avec la protéine fluorescente mCitrin permettant la localisation subcellulaire des PS. Dans *fer*, mais aussi après un traitement avec RALF23, les PS sont absents de la membrane plasmique. À l'inverse, un traitement avec RALF1 induit la localisation des senseurs à la membrane, suggérant que FERONIA est nécessaire pour la localisation correcte des PS à la membrane

plasmique. Ce phénomène pourrait alors inhiber la formation des nanodomains de ROP6 et par conséquent la signalisation en aval.

*L'ajout exogène de Lyso-PS suffit à restaurer la signalisation osmotique dans le mutant *fer*.*

Le phénotype de développement, mais aussi le défaut de localisation des PS du mutant *pss1* peuvent être complétés par l'ajout exogène de Lyso-PS. Nous avons donc utilisé cette approche pour tester son effet sur le mutant *fer*. Nous avons pu montrer que, après seulement 30 minutes, le traitement Lyso-PS était en mesure de restaurer la localisation des PS dans des plantes invalidées pour le gène *FERONIA*. Dans les mêmes conditions, il est apparu que le Lyso-PS permettait la restauration de la production de ROS chez *fer* après une stimulation osmotique. De même les plantes ROP6CA x *fer* retrouvent un niveau de ROS comparable à celui des lignées ROP6CA après une incubation avec le Lyso-PS. Mais, comme attendu, aucune complémentation n'a été observée dans des plantes *rop6.2*, montrant que le PS agit bien en aval de *FERONIA* et en amont de ROP6. Ensuite, nous avons testé l'impact du Lyso-PA, qui est un autre type de lipide, non chargé négativement. Dans ce cas, aucune complémentation n'a été observée. Ces résultats permettent de confirmer le rôle de *FERONIA* dans la régulation de la signalisation osmotique. Comme expliqué plus haut, *FERONIA* est impliqué dans de nombreux mécanismes signalétiques dont ceux de l'ABA et des PAMPs. Nous avons donc testé si la localisation incorrecte des PS pouvait être à l'origine de ces défauts. La production de ROS induite par l'ABA ou le peptide bactérien flg22 est restaurée dans le fond *fer* en présence de Lyso-PS. De même, le défaut de polarité des cellules de l'épiderme de la feuille présent chez le mutant *fer* est également complété après un traitement long par du Lyso-PS. Ce dernier résultat est particulièrement intéressant, car le mutant *rop6.2* ne possède pas de défaut de polarité de ses cellules épidermiques et seuls des mutants multiples dans la famille des ROPs présentent ce type de phénotype. Par conséquent, il serait possible que la voie *FERONIA* contrôle de manière générique la signalisation ROPs chez les plantes. Dès lors, il semble que la voie de signalisation *FERONIA* intégrant très probablement le statut de la paroi des cellules agisse comme un modulateur de la signalisation ROPs, à travers un ajustement fin de la localisation des PS à la membrane plasmique (Figure 8). Ce type d'interaction serait particulièrement efficace dans le contexte de la régulation de l'expansion cellulaire. Effectivement, lors d'une élongation rapide des cellules, la voie *FERONIA* est activée. Par conséquent, l'accumulation des PS dans la membrane plasmique rendrait les cellules plus sensibles à d'autres signaux comme l'ABA, les PAMPs ou un signal hyperosmotique, qui agissent plutôt comme des régulateurs négatifs de l'élongation.

Les expérimentations concernant cette partie sont désormais finies. Un manuscrit est en cours de rédaction.

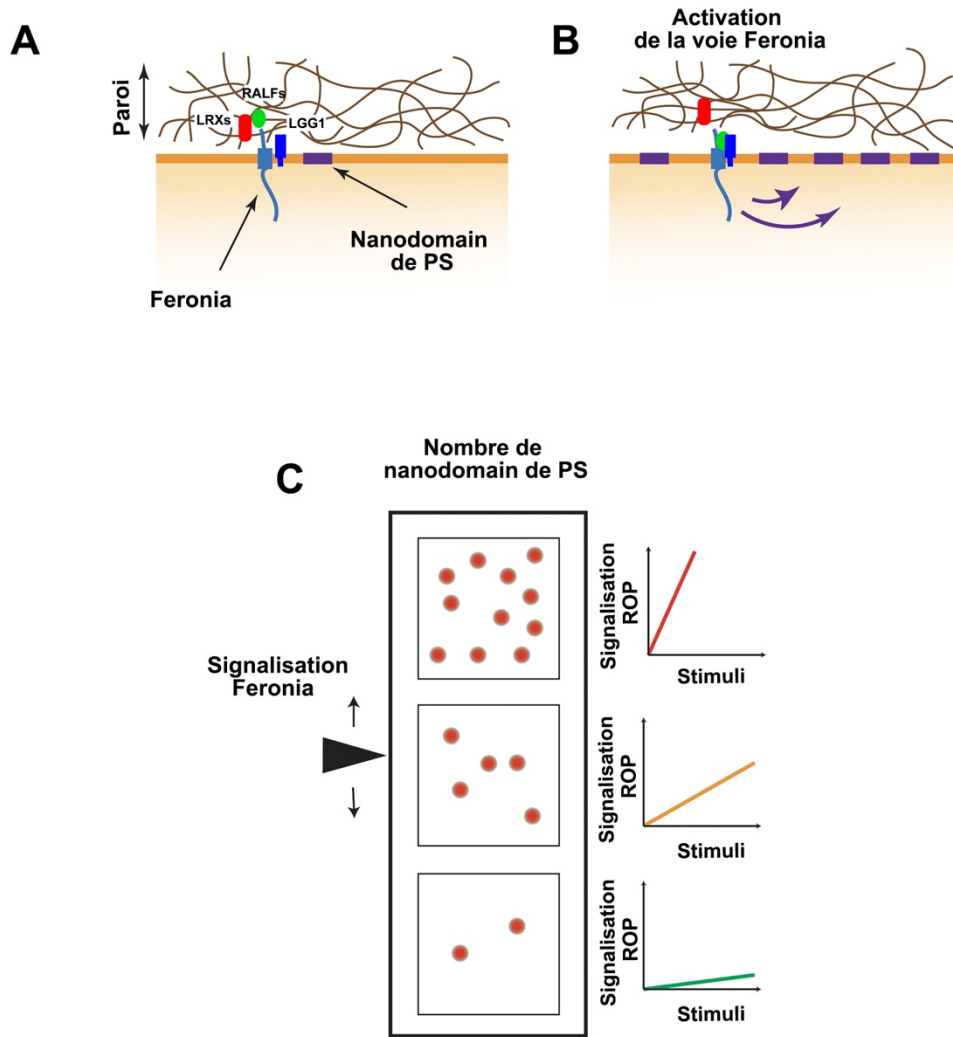


Figure 8 : Rôle de la signalisation Feronia comme modulateur des ROPs. (A-B) Le récepteur kinase membranaire Feronia fait partie d'un module de signalisation informant du statut de la paroi végétale (A). Ce module comprend des extensines de la famille des LRX, la protéine à ancre GPI LGG1 et les peptides RALFs. Un des effets de l'activation de Feronia est l'augmentation de la quantité de phosphatidylserine (PS) à la membrane plasmique et ce de préférence sous forme de nanodomains (B). (C) La signalisation dépendante de Feronia peut donc moduler la quantité de phosphatidylserine organisée en nanodomains et, par conséquent, agir comme un rhéostat sur l'amplitude de la réponse ROP pour une intensité de stimulus donnée.

10-PROJET DE RECHERCHE

Nos résultats obtenus au cours des 5 dernières années nous amènent à une situation paradoxale. D'une part, nous avons montré que la signalisation hyperosmotique nécessite l'activation d'une isoforme spécifique de ROP, ROP6. Effectivement, ni ROP2 ni ROP4, qui sont aussi exprimées dans la racine, ne semblent impliquées. D'autre part, nos résultats montrent que cette isoforme est nécessaire pour le bon fonctionnement d'un autre type de signalisation, la réponse à l'auxine des cellules. Naturellement, nous avons cherché à déterminer si le rôle pléiotrope de ROP6 dans la signalisation cellulaire pouvait être étendu à d'autres types de signaux. Nous avons trouvé que les ROS produits après une stimulation avec l'ABA ou bien après un traitement avec le peptide bactérien flg22 sont également dépendants de ROP6. Il apparaît donc qu'une isoforme unique de ROP peut agir comme une plaque tournante (hub) pour la signalisation membranaire.

De plus, notre travail a montré que les nanodomains de ROP6 dans les membranes peuvent déterminer une certaine spécificité du signal. De fait, RBOHD est recruté dans les nanodomains de ROP6 en réponse à un signal osmotique, mais non après une stimulation auxinique. Il semblerait donc que la composition des nanodomains de ROP6 diffère en fonction du signal en amont. Par conséquent, le plus gros enjeu de mon travail actuel consiste à trouver ce qui détermine la spécificité des nanodomains de ROP6 pour le signal osmotique. En particulier, je souhaite identifier les régulateurs en amont de ROP6 qui pourraient être activés spécifiquement. Répondre à ces questions fait partie d'un projet financé par l'ANR JCJC qui commencera au début de 2020.

10.1 Perception et signalisation des cellules en réponse au stress osmotique

10.1.1 Identification de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la signalisation osmotique

Approche candidat pour identifier les activateurs de ROP6 agissant de manière spécifique lors d'un stress osmotique.

Dans un premier temps, nous souhaitons centrer notre étude sur des régulateurs directs de ROP6. Ces régulateurs sont issus de deux approches. D'une part, avec le groupe d'Yvon Jaillais, nous avons identifié par une approche de double hybride en levure (Y2H), à partir d'une librairie de 12 000 ORFs complètes, 10 protéines qui interagissent avec ROP6 dont 7 qui sont spécifiques de l'interaction avec la forme autoactive de ROP6 (ROP6-CA). Dans cette liste se trouve MICROTUBULES DEPLETION DOMAIN1 (MIDD1) ainsi que BOUDARY OF ROP DOMAIN (BDR) qui sont connus pour interagir avec ROP11 (REF). En plus, nous souhaitons ajouter à cette liste, 10 candidats correspondant aux GDP-GTP EXCHANGE FACTOR (GEF) exprimés dans la racine. Effectivement, les produits de cette famille de gènes sont connus pour permettre la transition des ROP de leur forme inactive à active.

Grâce à notre méthode de phénotypage des ROS, nous allons tester directement des lignées invalidées pour les gènes identifiés. Nous anticipons deux types d'explication pour un défaut d'accumulation de ROS après une stimulation osmotique : soit la protéine candidate agit en amont de ROP6 et elle est spécifique de la signalisation osmotique, soit elle agit en aval de ROP6 et elle est probablement impliquée dans différents types de signalisation. Pour distinguer ces deux cas de figure, nous caractériserons aussi la production de ROS en réponse à d'autres types de signaux comme l'ABA et flg22.

Approche d'interatomique ciblée sur l'activation de ROP6.

Comme expliqué dans le rapport d'activité, nous avons caractérisé une série de lignées dans lesquelles différentes formes de ROP6 sont exprimées. En particulier, nous avons à notre disposition des formes constitutives actives, dominantes inactives, ainsi qu'une forme de ROP6 dont l'activité GTPase n'est pas touchée, mais qui ne se localise pas dans des nanodomains lors d'une stimulation osmotique. Ces 4 lignées sont exprimées sous le contrôle du promoteur endogène ROP6 et les différents mutants de ROP6 sont en fusion avec l'étiquette mCitrin. Nous souhaitons mettre en place des expériences de co-immunoprécipitation (Co-IP) couplées à de la spectrométrie de masse pour identifier les protéines qui co-purifient avec ROP6. Nous testerons cinq conditions : *rop6.2xpROP6-mCitrin-ROP6* en conditions contrôle ou de stress osmotique, et *rop6.2xpROP6-mCitrin-ROP6-CA*, *rop6.2xpROP6-mCitrin-ROP6^{C21A/C156A}*, et *rop6.2xpROP6-mCitrin-ROP6-DN* en conditions contrôle. Ainsi, en comparant les interactomes de ces différentes conditions, nous serons capables d'identifier d'une part les protéines agissant comme activateurs de ROP6, ainsi que les protéines agissant comme effecteurs spécifiques de ROP6 pour le signal osmotique. Des lignées invalidées pour les gènes candidats les plus prometteurs seront caractérisées. Comme dans la partie précédente, nous déterminerons la production de ROS de ces différentes lignées en réponse à une stimulation osmotique, à l'ABA ou au flg22. Il faut noter que ce type d'approche est bien maîtrisé dans l'équipe et s'appuiera sur l'expertise de la plateforme de protéomique de l'institut.

Approche de génétique d'association pour identifier des gènes impliqués dans la production de ROS induite par un traitement osmotique.

Ici, l'objectif est d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la perception cellulaire et la signalisation précoce induite par un signal osmotique. Pour cela, nous souhaitons utiliser la production de ROS, révélée par la sonde DHE, comme un marqueur de la réponse des cellules. L'accumulation relative de ROS dans 246 accessions naturelles d'*Arabidopsis* a été caractérisée dans le cadre de la thèse de Marija Smokvarska. Alors que certaines accessions comme Cvi-1 ou Blh-1 sont quasiment insensibles au traitement osmotique, d'autre comme Sha ou Bur-0 doublent leur accumulation de ROS dans les mêmes conditions. Par ailleurs, nous avons pu trouver une héritabilité d'environ 0.3, montrant qu'une partie de la variation observée entre les accessions peut s'expliquer par des facteurs génétiques. En plus, la variation relative de la réponse ROS est décorrélée d'autres paramètres explicatifs comme la taille des cellules, la longueur des racines ou le niveau basal d'accumulation de ROS. L'analyse GWAS réalisée nous a permis d'identifier 3 SNPs qui sont associés statistiquement avec notre phénotype de ROS. Pour le SNP1, nous avons identifié le gène STOP1, dont la lignée knockout ne produit plus de ROS après un traitement hyperosmotique. Cette protéine est un facteur de transcription à Cys2/His2 impliqué dans tolérance aux stress abiotiques comme la carence en phosphate, le stress aluminium ou les excès de protons. De manière intéressante, STOP1 est connu pour réguler l'activité peroxidase des racines. Il est donc lié au statut redox des cellules. Même si ces résultats sont préliminaires (un seul allèle de STOP1 a été testé pour le moment), ces données montrent la faisabilité de notre approche de génétique d'association.

Par la suite, notre objectif sera d'explorer les régions génomiques à proximité des SNP2 et 3. Des lignées invalidées pour les gènes présents dans une région de 10kpb autour de ces SNP seront caractérisées pour leur production de ROS. Tous les mutants qui présenteront une altération de l'accumulation de ROS en réponse au signal hyperosmotique seront également testés pour leur réponse à l'ABA et à flg22, afin déterminer la spécificité de leur altération.

Pour l'heure, nous pensons que cette approche nous permettra d'identifier au maximum 3 gènes. Lorsqu'un de ces 3 gènes candidats aura été validé par analyse de plusieurs mutants knock-out correspondants, des haplogroupes seront identifiés à partir des 89 accessions séquencées et présentes dans notre panel de diversité. Une approche de complémentation de la lignée knockout par ces variants alléliques pourra éventuellement révéler des fonctionnalités différentes. Par ailleurs, nous étudierons le profil d'expression et la localisation subcellulaire des protéines codées par les gènes d'intérêt. Enfin, la fonction moléculaire ou cellulaire de ces protéines sera testée en fonction des indications apportées par leur séquence.

10.1.2 Analyse fonctionnelle des différents acteurs moléculaires impliqués dans la signalisation osmotique.

À ce stade, nous devrions avoir caractérisé un jeu de gènes candidats qui agit spécifiquement sur la signalisation osmotique et un autre qui est commun à différentes voies de signalisation. En plus, nous devrions avoir caractérisé pour chacun de ces candidats des allèles hyper et/ou hypofonctionnels pour la réponse ROS à un traitement osmotique. Notre priorité sera d'analyser les gènes impliqués spécifiquement dans la perception osmotique, même si les candidats qui agissent sur l'amplitude de la réponse ROS pourraient être également très intéressants. À moyen terme, nous n'aurons pas les moyens de caractériser plus de 4-5 gènes. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous focaliserons sur les candidats qui auront été simultanément trouvés par plusieurs approches (Y2H, GEFs, Co-IP ou GWAS).

Interaction fonctionnelle entre les gènes candidats et la signalisation ROP6

Nous allons déterminer comment les gènes candidats sélectionnés peuvent agir sur la signalisation ROP6. Dans un premier temps, il sera possible d'utiliser des biosenseurs d'activité ROP développés avec l'équipe d'Yvon Jaillais dans le cadre d'un projet Starter-BAP (INRAE). Nous pourrions ainsi déterminer si les gènes candidats peuvent mener à une activation de ROP6. Ensuite, il sera possible de réaliser des croisements entre les lignées knockout pour les gènes d'intérêt et des versions actives constitutives ou dominantes négatives de ROP6, afin de tester leurs relations fonctionnelles. Enfin, nous chercherons à déterminer le rôle des candidats sur la localisation subcellulaire de ROP6 dans les cellules, avec une attention particulière pour les nanodomains de ROP6. Nous pouvons anticiper que certains de ces facteurs pourraient participer à la régulation de la formation des nanodomains ROP6. Ils pourraient également agir sur les temps de rétention de ROP6 dans les domaines, comme le font les lipides anioniques PS. Certains gènes candidats pourraient aussi participer à la régulation du nombre de molécules ROP6 qui s'accumulent dans les nanodomains. Pour tester ces hypothèses, il sera possible d'adapter nos mesures de diffusion/clustering en molécule unique afin de quantifier spécifiquement ces paramètres. Enfin, nous testerons aussi le rôle des candidats sur le recrutement de protéines effectrices dans les nanodomains, en utilisant une version de RBOHD étiquetée avec un rapporteur fluorescent.

Analyse approfondie des candidats les plus intéressants.

En fonction des résultats obtenus dans la partie précédente, une analyse plus approfondie des candidats sera réalisée. En particulier, nous testerons leurs interactions avec ROP6 par FRET-FLIM et des expériences de Co-IP. Ensuite, nous analyserons leurs profils d'expression, leurs localisations subcellulaires ainsi que leurs fonctions. Des lignées traductionnelles seront générées en fusion avec des protéines fluorescentes pour réaliser des expériences de complémentation. À ce stade, les différents allèles issus de l'analyse

de génétique d'association seront particulièrement intéressants à analyser. Par TIRF deux couleurs, nous testerons également la dynamique de ces nouveaux régulateurs vis-à-vis des nanodomains de ROP6. Finalement et si besoin, leurs dynamiques moléculaires pourront être étudiées par sptPALM.

Rôle des gènes candidats dans la réponse intégrée des plantes au signal osmotique.

Nous avons déjà montré que ROP6 participe à certaines réponses intégrées des plantes au signal osmotique. En particulier, l'induction de l'endocytose, la croissance polarisée des cellules, le dépôt ectopique de lignine sont partiellement sous le contrôle de ROP6. Ces différents phénotypes seront également testés pour les candidats les plus prometteurs et/ou les variants alléliques identifiés. Comme expliqué en introduction, la plasticité architecturale des racines constitue un trait majeur de l'acclimatation des plantes au stress hydrique. Ce projet pourrait permettre de tester le lien entre ces réponses et la perception/signalisation cellulaire. C'est pourquoi l'architecture racinaire des différents mutants/formes alléliques sera caractérisée. Cette partie pourra s'appuyer sur la plateforme de phénotypage racinaire de l'institut. Nous gardons également à l'esprit que, pour certains géotypes bien choisis, il pourra être intéressant d'explorer le rôle de la signalisation osmotique dans la réponse hydrotropique des racines.

10.2 Projet à moyen terme

Rôle des nanodomains ROP6 dans la signalisation membranaire

Alors que la partie précédente fixe les objectifs à court et moyen termes (3-4 ans) de mon projet de recherche, je souhaiterais aussi explorer de nouvelles pistes. Dans un premier temps, je souhaite déterminer par quels mécanismes généraux les nanodomains de ROP6 peuvent manifester une grande spécificité de signal. En effet, nous avons pu montrer que ces structures se forment en réponse à l'auxine, mais aussi que des lignées dans lesquelles ROP6 a été invalidée présentent un défaut de signalisation ROS induit par les PAMPs ou l'ABA. De plus, nous avons montré que RBOHD est recruté dans les nanodomains de ROP6 uniquement en réponse au signal osmotique, mais non en réponse à un traitement avec l'auxine. Il apparaît donc que la constitution des nanodomains de ROP6 diffère en fonction des stimuli agissant sur la cellule (Figure 9). Dès lors, il est possible que ce phénomène participe à la spécificité de la réponse des cellules.

Ce large projet constitue donc une généralisation de ce que nous allons trouver dans le cadre de la signalisation osmotique (Figure 9). Afin de tester cette hypothèse, il serait assez facile d'utiliser les différents interactants de ROP6 (partie précédente) pour tester leurs rôles dans les réponses au PAMPs, à l'auxine ou à l'ABA. Par exemple, il est possible que les ROPGEFs qui sont des activateurs directs des ROPs, (i) préexistent dans des domaines membranes et (ii) que certaines isoformes soient spécifiques de certains signaux. Ce travail pourrait être particulièrement intéressant dans le contexte de la signalisation auxinique. En effet, ROP6 contrôle une activation de l'endocytose lors d'un stress osmotique et sa répression en réponse à l'auxine. Cette partie pourrait être l'objet d'un dépôt d'ANR commune avec le groupe d'Yvon Jaillais (RDP, ENS Lyon).

Acteurs moléculaires en aval de ROP6 qui pourraient réguler la dynamique nucléaire.

Un autre aspect que je souhaiterais explorer concerne la déformation des cellules lors d'une baisse de potentiel hydrique dans leur milieu environnant. Effectivement, nos résultats ont montré qu'une partie du signal détecté par les cellules lors d'un stress osmotique nécessite une déformation des cellules, en particulier au niveau des connexions membrane/paroi. Je me demande à quel point ces déformations pourraient se propager dans les structures

internes des cellules, et en particulier au niveau du noyau. En utilisant un marqueur de la membrane nucléaire, j'ai quantifié les variations de surface et de volume du noyau. Il est apparu que le volume, et non la surface du noyau, change quelques minutes après l'application d'un traitement hyperosmotique. Comme la membrane nucléaire possède des pores, il est peu vraisemblable que ces changements de volume soient la conséquence d'une variation osmotique dans le noyau. Par ailleurs, en étudiant les gènes co-régulés avec ROP6 nous avons pu identifier un ensemble de fonctions moléculaires qui pourraient rendre compte d'une connexion entre la membrane plasmique et la membrane nucléaire par le biais du cytosquelette, en particulier via l'actine (Figure 9). Enfin, un récent article a démontré que ROP2 et ROP6 participent au positionnement des noyaux dans les cellules de la racine d'*Arabidopsis* lors de la différenciation cellulaire (Nakamura et al., 2018).

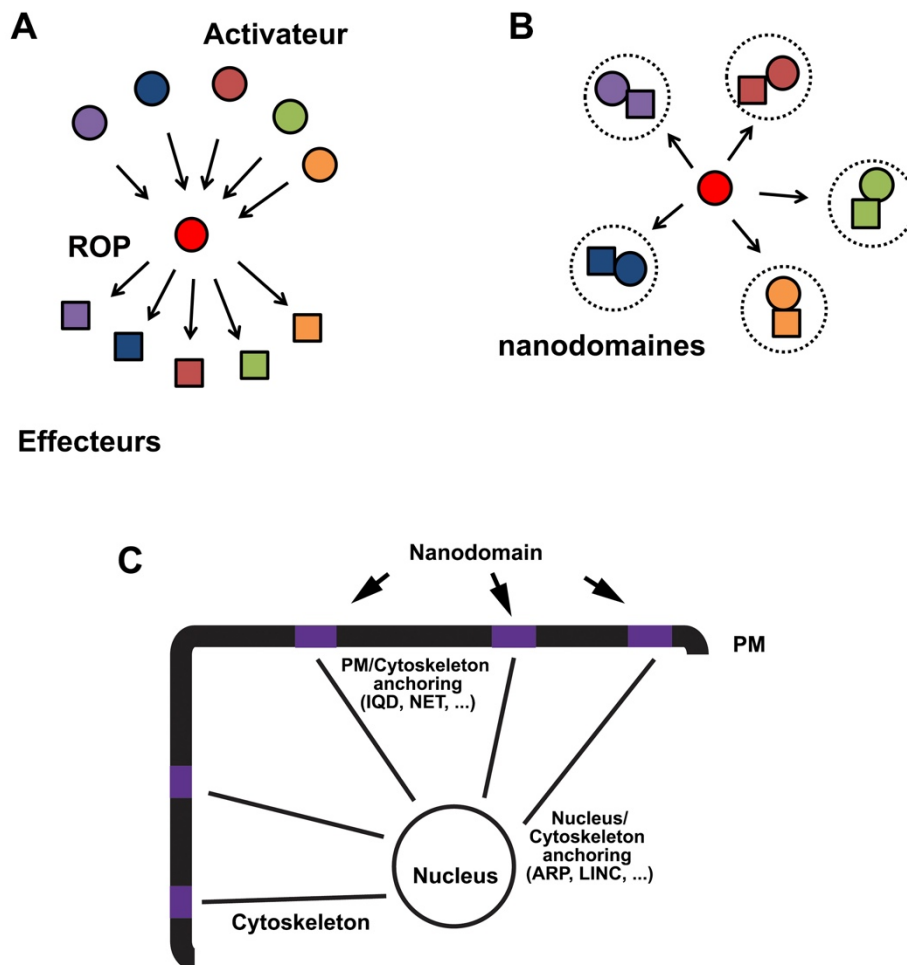


Figure 9 : Projet à moyen terme. (A) Modèle de signalisation pour ROP6. En amont, les activateurs spécifiques de chaque stimulus convergent vers une isoforme de ROP, ici ROP6. Une fois activée, ROP6 active elle-même un ou des effecteurs en aval, de manière spécifique à chaque stimulus. Une explication mécanistique de ce schéma fonctionnel pourrait impliquer l'organisation en nanodomains des activateurs et effecteurs, respectivement en amont et en aval de ROP6. (B) De fait, les différents activateurs de ROP6 pourraient être organisés dans des nanodomains, qui pourraient eux-mêmes contenir déjà les protéines effectrices. Ainsi, il préexisterait dans la cellule des nanodomains spécifiques pour chaque type de stimulus. Grâce à cette organisation dans l'espace, lors de la stimulation de la cellule par un signal donné, ROP6 serait recrutée nécessairement dans le nanodomaine qui contient le ou les effecteurs spécifiques du signal. (C) Modèle de la transduction du signal en aval de ROP6. Parmi les 15 gènes dont l'expression est corrélée le mieux avec celle de ROP6, certains pourraient assurer, d'une part, la connexion membrane plasmique/cytosquelette et, d'autre part, la connexion cytosquelette/enveloppe nucléaire. Ce pontage entre la membrane et l'enveloppe nucléaire pourrait servir à la transduction de signaux entre ces différents compartiments et peut être déclencher une reprogrammation transcriptionnelle, en aval de la voie de signalisation osmotique.

Pour le moment, ces observations restent très préliminaires. Toutefois, il pourrait être envisagé qu'en plus de la production de ROS, ROP6 induise une modification de la structure du noyau. Ces modifications pourraient par conséquent participer à la reprogrammation de l'expression de certains gènes en réponse au signal osmotique. Mon objectif pour cette

partie est d'une part de confirmer la réorganisation de structure du noyau dans des conditions hyperosmotiques et de vérifier le rôle de ROP6 dans ce contexte. Si ce rôle est avéré, il sera intéressant de décortiquer le rôle spécifique du cytosquelette dans ce processus et d'identifier des acteurs moléculaires impliqués.

Élargissement à la signalisation hypo-osmotique.

Le dernier aspect que je souhaite développer à moyen terme serait d'élargir ma thématique au stress hypo-osmotique. Effectivement, les plantes peuvent être confrontées à des contraintes hypo-osmotiques sévères, par exemple lors d'une pluie ou réirrigation, après une longue période de sécheresse, ou lors de l'imbibition d'organes comme la graine ou le grain de pollen. Elles peuvent également expérimenter une augmentation de leur pression de turgescence lors du phénomène de croissance cellulaire, ce qui constitue un des paramètres du signal hypo-osmotique. Or, peu de choses sont connues concernant les événements de signalisation précoces liés à ce signal. Les enzymes de la famille des NADPH oxydases semblent être impliquées, car le DPI qui inhibe leur activité supprime les ROS produits en réponse à un choc hypo osmotique imposé à des cultures cellulaires (Park et al., 2000). Dans un premier temps il serait intéressant de tester si la voie de signalisation que nous avons décrite jusqu'alors pourrait être également impliquée dans la réponse à un signal hypo osmotique ou si d'autres acteurs moléculaires sont mis en jeu.

6.3 Encadrement, animation et management de la recherche

Comme expliqué plus haut, j'encadre, depuis 2017, le travail de thèse de Marija Smokvarska. Je souhaite donc soutenir mon HRD auprès de l'école doctorale, avant sa soutenance de thèse. Dans le cadre du projet ANR CelloSmo, une ingénieure a été recrutée à partir de mars 2020 pour 20 mois. Elle va être en charge de la partie GWAS du projet ainsi que de la validation fonctionnelle d'une partie des candidats que nous avons déjà déterminés par Y2H. Ce même projet va également me permettre de recruter un(e) étudiant(e) en thèse. Cette personne travaillera en particulier sur les GEF et leurs rôles dans l'activation de ROP6 en réponse au signal osmotique, mais également ABA et flg22. Par ailleurs, la personne sera aussi impliquée dans les approches de protéomique du projet. En plus de leur importance pour la réalisation de cet ambitieux projet, ces différents recrutements me permettront de gagner en compétence managériale.

11-CONCLUSION

Les travaux de recherche que j'ai menés ont contribué à révéler la complexité de la membrane plasmique, identifiant un contrôle de la diffusion des protéines par la paroi et le cytosquelette et permettant de décrire des micro-environnements présents dans la membrane ou à son voisinage. Depuis mon arrivée à BPMP, j'ai développé une thématique de recherche qui, dans le futur, va me permettre d'explorer comment la structuration des protéines dans la membrane plasmique permet de réguler la signalisation cellulaire. Mon projet est articulé de manière à combiner un axe de recherche déjà productif et sans contrainte de faisabilité autour de la signalisation hyperosmotique chez les plantes, avec des aspects plus exploratoires et plus risqués. Dans le cadre du projet ANR CelloSmo, une ingénieure a été récemment recrutée et ce même projet va également me permettre de recruter un(e) étudiant(e) en thèse. En plus de leur importance pour la réalisation de cet ambitieux projet, ces différents recrutements me permettront d'augmenter et perfectionner mon activité d'encadrement. Pour finir, ce travail

est développé en étroite collaboration avec les différents membres de l'équipe AQUA qui abordent la signalisation hydrique à d'autres échelles. Cette complémentarité nous permet de développer une vision intégrée du statut hydrique des plantes et de mieux comprendre la plasticité des réponses des plantes face aux variations de l'environnement.

12-References

Barbez E, Dünser K, Gaidora A, Lendl T, Busch W (2017) Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: E4884–E4893

Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**: 1229–1240

Blanchoin L, Michelot A (2012) Actin cytoskeleton: a team effort during actin assembly. *Curr Biol CB* **22**: R643-645

Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu D-T, Tournaire-Roux C, Maurel C (2008) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J* **56**: 207–218

Boursiac Y, Chen S, Luu D-T, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* **139**: 790–805

Chen J, Rogers SC, Kavdia M (2013) Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Ann Biomed Eng* **41**: 327–337

Chen J, Yu F, Liu Y, Du C, Li X, Zhu S, Wang X, Lan W, Rodriguez PL, Liu X, et al (2016) FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E5519-5527

Dietrich D, Pang L, Kobayashi A, Fozard JA, Boudolf V, Bhosale R, Antoni R, Nguyen T, Hiratsuka S, Fujii N, et al (2017) Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nat Plants* **3**: 17057

Doblas VG, Geldner N, Barberon M (2017) The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr Opin Plant Biol* **39**: 136–143

Duan Q, Kita D, Li C, Cheung AY, Wu H-M (2010) FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17821–17826

Dünser K, Gupta S, Herger A, Feraru MI, Ringli C, Kleine-Vehn J (2019) Extracellular matrix sensing by FERONIA and Leucine-Rich Repeat Extensins controls vacuolar expansion during cellular elongation in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*. doi: 10.15252/embj.2018100353

Feng W, Kita D, Peaucelle A, Cartwright HN, Doan V, Duan Q, Liu M-C, Maman J, Steinhorst L, Schmitz-Thom I, et al (2018) The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca²⁺ Signaling. *Curr Biol CB* **28**: 666-675.e5

- Feraru E, Feraru MI, Kleine-Vehn J, Martinière A, Mouille G, Vanneste S, Vernhettes S, Runions J, Friml J** (2011) PIN polarity maintenance by the cell wall in Arabidopsis. *Curr Biol CB* **21**: 338–343
- Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A** (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* **157**: 1071–1082
- Gronnier J, Gerbeau-Pissot P, Germain V, Mongrand S, Simon-Plas F** (2018) Divide and Rule: Plant Plasma Membrane Organization. *Trends Plant Sci* **23**: 899–917
- Hamilton ES, Jensen GS, Maksaev G, Katims A, Sherp AM, Haswell ES** (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* **350**: 438–441
- Herger A, Dünser K, Kleine-Vehn J, Ringli C** (2019) Leucine-Rich Repeat Extensin Proteins and Their Role in Cell Wall Sensing. *Curr Biol CB* **29**: R851–R858
- Hosy E, Martinière A, Choquet D, Maurel C, Luu D-T** (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
- Jaillais Y, Ott T** (2020) The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective¹[OPEN]. *Plant Physiol* **182**: 1682–1696
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* **7**: 540
- Lee Y, Rubio MC, Alassimone J, Geldner N** (2013) A mechanism for localized lignin deposition in the endodermis. *Cell* **153**: 402–412
- Luu D-T, Martinière 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 Cell Mol Biol* **69**: 894–905
- Martinière A, Bassil E, Jublanc E, Alcon C, Reguera M, Sentenac H, Blumwald E, Paris N** (2013) In vivo intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell* **25**: 4028–4043
- Martinière 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
- Martinière A, Gayral P, Hawes C, Runions J** (2011) Building bridges: formin1 of Arabidopsis forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *Plant J Cell Mol Biol* **66**: 354–365
- Martinière A, Gibrat R, Sentenac H, Dumont X, Gaillard I, Paris N** (2018) Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 6488–6493

- Martinière A, Lavagi I, Nageswaran G, Rolfe DJ, Maneta-Peyret L, Luu D-T, Botchway SW, Webb SED, Mongrand S, Maurel C, et al** (2012) Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 12805–12810
- McKenna JF, Rolfe DJ, Webb SED, Tolmie AF, Botchway SW, Martin-Fernandez ML, Hawes C, Runions J** (2019) The cell wall regulates dynamics and size of plasma-membrane nanodomains in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 12857–12862
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE** (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**: 192–195
- Nakamura M, Claes AR, Grebe T, Hermkes R, Viotti C, Ikeda Y, Grebe M** (2018) Auxin and ROP GTPase Signaling of Polar Nuclear Migration in Root Epidermal Hair Cells. *Plant Physiol* **176**: 378–391
- Nissen KS, Willats WGT, Malinovsky FG** (2016) Understanding CrRLK1L Function: Cell Walls and Growth Control. *Trends Plant Sci* **21**: 516–527
- Oulehlová D, Kollárová E, Cifrová P, Pejchar P, Žárský V, Cvrčková F** (2019) Arabidopsis Class I Formin FH1 Relocates between Membrane Compartments during Root Cell Ontogeny and Associates with Plasmodesmata. *Plant Cell Physiol* **60**: 1855–1870
- Park J, Choi HJ, Lee S, Lee T, Yang Z, Lee Y** (2000) Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol* **124**: 725–732
- Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marquès-Bueno MDM, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche J-B, Nollmann M, Miège C, et al** (2019) Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* **364**: 57–62
- Platre MP, Noack LC, Doumane M, Bayle V, Simon MLA, Maneta-Peyret L, Fouillen L, Stanislas T, Armengot L, Pejchar P, et al** (2018) A Combinatorial Lipid Code Shapes the Electrostatic Landscape of Plant Endomembranes. *Dev Cell* **45**: 465–480.e11
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, German Retana S, Boubekeur T, Leborgne-Castel N, Carde J-P, Lherminier J, Noirot E, et al** (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**: 1541–1555
- Robbins NE, Dinneny JR** (2015) The divining root: moisture-driven responses of roots at the micro- and macro-scale. *J Exp Bot* **66**: 2145–2154
- Shih H-W, Miller ND, Dai C, Spalding EP, Monshausen GB** (2014) The receptor-like kinase FERONIA is required for mechanical signal transduction in Arabidopsis seedlings. *Curr Biol* **24**: 1887–1892
- Shkolnik D, Nuriel R, Bonza MC, Costa A, Fromm H** (2018) MIZ1 regulates ECA1 to generate a slow, long-distance phloem-transmitted Ca²⁺ signal essential for root water tracking in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: 8031–8036
- Sorek N, Segev O, Gutman O, Bar E, Richter S, Poraty L, Hirsch JA, Henis YI, Lewinsohn E, Jürgens G, et al** (2010) An S-acylation switch of conserved G

domain cysteines is required for polarity signaling by ROP GTPases. *Curr Biol CB* **20**: 914–920

Stegmann M, Monaghan J, Smakowska-Luzan E, Rovenich H, Lehner A, Holton N, Belkhadir Y, Zipfel C (2017) The receptor kinase FER is a RALF-regulated scaffold controlling plant immune signaling. *Science* **355**: 287–289

Sutter J-U, Campanoni P, Tyrrell M, Blatt MR (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *Plant Cell* **18**: 935–954

Wolf S, Hématy K, Höfte H (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 381–407

Wudick MM, Li X, Valentini V, Geldner N, Chory J, Lin J, Maurel C, Luu D-T (2015) Sub-cellular redistribution of root aquaporins induced by hydrogen peroxide. *Mol Plant*. doi: 10.1016/j.molp.2015.02.017

Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B, et al (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* **514**: 367–371

Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins

Alexandre Martinière^a, Irene Lavagi^a, Gayathri Nageswaran^a, Daniel J. Rolfe^b, Lilly Maneta-Peyret^c, Doan-Trung Luu^d, Stanley W. Botchway^b, Stephen E. D. Webb^b, Sebastien Mongrand^c, Christophe Maurel^d, Marisa L. Martin-Fernandez^b, Jürgen Kleine-Vehn^e, Jirí Friml^f, Patrick Moreau^c, and John Runions^{a,1}

^aDepartment of Biological and Medical Sciences, Oxford Brookes University, Oxford OX3 0BP, United Kingdom; ^bCentral Laser Facility, Research Complex at Harwell, Science and Technology Facilities Council, Rutherford Appleton Laboratory, Oxfordshire OX11 0QX, United Kingdom; ^cLaboratoire de Biogenèse Membranaire, Unité Mixte de Recherche 5200 Centre National de la Recherche Scientifique, Université Bordeaux Segalen, 33076 Bordeaux, France; ^dLaboratoire de Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Institut de Biologie Intégrative des Plantes, Unité Mixte de Recherche 5004, Centre National de la Recherche Scientifique/Unité Mixte de Recherche 0386 Institut National de la Recherche Agronomique, 34060 Montpellier, France; ^eDepartment of Applied Genetics and Cell Biology, University of Natural Resources and Life Sciences, 1190 Vienna, Austria; and ^fDepartment of Plant Biotechnology and Genetics, Ghent University, 9052 Ghent, Belgium

Edited by Daniel J. Cosgrove, Pennsylvania State University, University Park, PA, and approved May 16, 2012 (received for review February 3, 2012)

A cell membrane can be considered a liquid-phase plane in which lipids and proteins theoretically are free to diffuse. Numerous reports, however, describe retarded diffusion of membrane proteins in animal cells. This anomalous diffusion results from a combination of structuring factors including protein–protein interactions, cytoskeleton corraling, and lipid organization into microdomains. In plant cells, plasma-membrane (PM) proteins have been described as relatively immobile, but the control mechanisms that structure the PM have not been studied. Here, we use fluorescence recovery after photobleaching to estimate mobility of a set of minimal PM proteins. These proteins consist only of a PM-anchoring domain fused to a fluorescent protein, but their mobilities remained limited, as is the case for many full-length proteins. Neither the cytoskeleton nor membrane microdomain structure was involved in constraining the diffusion of these proteins. The cell wall, however, was shown to have a crucial role in immobilizing PM proteins. In addition, by single-molecule fluorescence imaging we confirmed that the pattern of cellulose deposition in the cell wall affects the trajectory and speed of PM protein diffusion. Regulation of PM protein dynamics by the plant cell wall can be interpreted as a mechanism for regulating protein interactions in processes such as trafficking and signal transduction.

Proteins within membranes play significant roles in signal perception and transduction, solute partitioning, and secretion. Accordingly, more than 25% of the proteome of higher plants is predicted to be membrane-associated proteins (1, 2).

Proteins diffuse within the plane of a membrane through thermal agitation. Each protein diffusing freely (3) has a diffusion constant that is dependent on the protein's hydrodynamic radius and the viscosity of the membrane and surrounding medium (4). In a hypothetical uniform membrane, proteins would be distributed randomly. However, biological membranes are spatially complex, with regions of protein and lipid concentration. Numerous reports describe retarded diffusion of membrane proteins (5–8) because of structuring factors such as protein–protein interactions (9), cytoskeleton corraling (10), and lipid organization into nanodomains (11). Membrane nanostructuring is crucial for protein–protein interactions and can either segregate or colocalize membrane proteins, thus optimizing protein interactions in processes such as trafficking and signal transduction (12).

Like yeast and animal cells, plant cells have a subcompartmentalized plasma membrane (PM). Membrane rafts (reviewed in ref. 13) have been demonstrated in plant PMs by proteomics on detergent-insoluble membranes (DIMs). DIMs are enriched in signaling, stress response, cellular trafficking, and cell-wall metabolism proteins (14–16). The *Chlorella kessleri* hexon-proton symporter HUP1 and *Solanum tuberosum* remorin StREM1.3 have been visualized in clusters within the PM (17, 18), and the clustering localization pattern of HUP1 is disrupted in mutant

yeast lines lacking typical ergosterol and sphingolipid microdomains (17). The physiological role of plant PM substructuring has been demonstrated in several studies. For instance, in the sterol mutant *cyclopropylsterol isomerase1-1* (*cpil.1*) of *Arabidopsis thaliana*, the asymmetric localization of PIN2 and, hence, polar auxin transport are perturbed (19). In polarized cells such as pollen tubes, perfusion with the sterol-binding toxin filipin not only perturbs membrane microdomain structure but also alters calcium gradients, production of reactive oxygen species, and normal cell elongation (20).

The relationship between membrane subcompartmentalization and protein diffusion has not been studied in detail, however, and only a few reports have quantified protein diffusion in plant-cell membranes. In the case of PM proteins, such as KAT1, PMA2 H⁺ATPase, PIN2, PIP2;1, BOR1, NIP5;1, and AtFH1, only a small fraction of the protein pool is mobile (19, 21–23). In contrast, endoplasmic reticulum-associated proteins, nuclear membrane proteins, and tonoplast-associated proteins diffuse more freely within the membrane (24–26). Consequently, we are led to believe that the plant cell has specific properties that constrain PM protein diffusion.

Here, we studied PM protein diffusion in plant cells to understand better PM structure and function. Protein mobility was quantified using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) for a set of 13 plant PM proteins fused to fluorescent proteins. Then we developed a set of modified PM proteins that we term “minimal” because only the membrane-interacting or -spanning domains are present. Minimal PM proteins were designed to reduce the effect of protein interactions on diffusion and showed that DIM association and cytoskeleton have very little effect on protein mobility. However, PM proteins that normally are almost immobile become mobile when the cell wall is absent or when the distance between PM and cell wall is increased. Then cell-wall interaction with PM proteins was confirmed by single-molecule tracking using total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. Our results show that the cell wall constrains protein diffusion, especially for proteins with larger extracellular domains, even in the absence of binding interactions between proteins and cell-wall components.

Author contributions: A.M., S.W.B., S.M., C.M., M.L.M.-F., P.M., and J.R. designed research; A.M., I.L., G.N., D.J.R., L.M.-P., D.-T.L., S.E.D.W., and J.R. performed research; D.J.R., D.-T.L., C.M., J.K.-V., J.F., P.M., and J.R. contributed new reagents/analytic tools; A.M., D.J.R., P.M., and J.R. analyzed data; and A.M. and J.R. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

See Commentary on page 12274.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: jrunions@brookes.ac.uk.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1202040109/-DCSupplemental.

Results

PM Proteins Are Relatively Immobile. Sutter et al. (27) demonstrated low lateral mobility of the potassium channel KAT1 and the H⁺-ATPase PMA2. These observations have been supported recently by similar results on other PM proteins (19, 21–23, 28, but systematic study of PM protein dynamics is lacking. We selected 10 *Arabidopsis* PM proteins, including examples of several different membrane-association types: transmembrane domains, lipid modifications, and peripheral membrane proteins (Table 1). These proteins were fused to fluorescent protein and transiently expressed in *Nicotiana tabacum* leaves (29). All 10 constructs marked the cell PM. We used FRAP experiments to quantify protein mobility. GFP fluorescence was bleached in a small region of PM, and fluorescence recovery within the region was monitored (Fig. 1A; see Fig. S1 for technique). Using a nonlinear curve-fitting approach, we determined the relative fraction of the protein free to diffuse within the bleached region during 60 s postbleaching (I60s). We observed large differences between constructs in this characteristic. For instance, the bleaching area of GFP-AGP4 remains visible much longer than that of GPA1-GFP (Fig. 1A). The implication is that I60s is lower for GFP-AGP4 than for these other proteins. This difference becomes clear when data are plotted (Fig. 1B). Indeed, I60s is highly variable among constructs (Table 1), indicating that a proportion of the protein potentially does not diffuse but is fixed in place, probably through interaction with other cellular components. Monitoring of this relatively short fluorescence-recovery phase was intended to exclude artifacts that would result from endo- or exocytotic removal or insertion of protein from the membrane (30). Relatively low levels of fluorescence that occur in the cytoplasm for some constructs (e.g., GFP-NPSN11 or PIP2;1-CFP) result in an apparent two-phase recovery process in which rapid initial recovery during the first few seconds is followed by a flat line indicating no subsequent recovery (Fig. 1B). The bleaching laser bleaches not only the PM but also the underlying cytoplasm, which recovers within seconds because of cytoplasmic streaming. Any subsequent change in fluorescence intensity within the bleached spot is the result of lateral diffusion within the PM.

Protein Crowding Within the PM Has a Limited Effect on Protein Diffusion. Protein crowding within membranes should reduce protein lateral mobility, because collision between molecules restricts diffusion (31). Consequently, we quantified diffusion of the overexpressed proteins p35S::GFP-LTI6b, p35S::PIP2;1-GFP, and pUBQ10::YFP-NPSN12 in hypocotyl cells of stably transformed *Arabidopsis*. Again we observed two typical types

of fluorescence-recovery curves: one-phase diffusion for GFP-LTI6b and two-phase with little diffusion for PIP2;1-GFP and YFP-NPSN12 (Fig. 1C). In addition, we tested two constructs under their endogenous promoters, pFLS2::FLS2-GFP and pPIN2::PIN2-GFP, and again found that a large proportion of each protein remains immobile. To test whether the relative amount of a protein within a membrane was related to the extent of fluorescence recovery in FRAP experiments, we plotted mean prebleach intensity within a bleaching region vs. maximum recovery (I60s). We also tested whether the relative amount of protein within the PM was associated with observed FRAP levels, but no relationship was observed ($R^2 = 0.03$) (Fig. S2).

Relative Immobility of Many PM Proteins Is Not Caused by Protein Interactions. Eleven of the 13 full-length PM protein constructs tested were shown to be relatively immobile (Table 1). Proteins can form larger complexes within membranes by self-association or through protein–protein interactions with other endogenous proteins. Complex formation could limit diffusion, so we designed a set of modified PM proteins as fluorescent protein fusions. These minimal PM proteins consist of only the membrane-anchoring residues, and we predicted that they would have no ability to interact with other cellular constituents. Several different membrane-anchoring types of minimal construct were generated, including a myristoylated and palmitoylated GFP (MAP-GFP), a prenylated GFP (GFP-PAP), a glycosylphosphatidylinositol-anchored GFP (GFP-GPI), a phosphatidylinositol-4-phosphate-binding protein YFP (PI-YFP) (32), and the LAMP1 transmembrane domain fused to GFP (GFP-TM23) (33) (Fig. S3A). We verified the correct targeting of all constructs to the PM in leaves (Fig. S3B). Minimal FP constructs in which the FP moiety was intracellular and anchored by a single transmembrane domain were tested but lost their targeting to the PM, presumably because of the removal of a C-terminal targeting signal (Fig. S4). As described previously (33), TM23 accumulates mainly in the PM but also is present in Golgi bodies and within the endoplasmic reticulum membrane. Then, we confirmed the predicted topology of these constructs (Fig. 2A) by incubating tobacco mesophyll protoplasts with an antibody against GFP or YFP. As expected, only GFP-GPI and GFP-TM23 showed labeling (Fig. S5). This result confirms that in two constructs the GFP is outside the cell in the apoplasmic space, whereas in MAP-GFP, GFP-PAP, and YFP-PI the fluorescent protein remains within the symplasmic space. Finally, *Arabidopsis* transgenic lines were generated for each minimal construct.

Table 1. Fluorescence recovery after photobleaching for different PM proteins fused to GFP

Gene (from <i>Arabidopsis</i>)	Type of anchoring*	No. of amino acids	Expressed in	Promoter	I60 s ± SEM (%)	R ² for curve fit
GFP-NPSN11	1 TM (type 2)	265	Tobacco	p35S	10.4 ± 0.8	0.75
PIP2;1-GFP	6TM (type 4)	287	<i>Arabidopsis</i>	p35S	10.8 ± 1.1	0.71
YFP-NPSN12	1 TM (type 2)	265	<i>Arabidopsis</i>	pUBQ10	11.8 ± 1.7	0.34
PIN2-GFP	9TM (type 4)	647	<i>Arabidopsis</i>	pPIN2	13.3 ± 0.8	0.42
AtFH1-GFP	1 TM (type 1)	1051	Tobacco	p35S	18.1 ± 0.5	0.76
FLS2-GFP	1 TM (type 1)	1173	<i>Arabidopsis</i>	pFLS2	19.0 ± 2.0	0.43
GFP-AGP4	GPI	135	Tobacco	p35S	20.0 ± 2.2	0.52
GFP-REM;3.1 [†]	Extrinsic - inner leaflet	198	Tobacco	p35S	23.4 ± 1.2	0.46
YFP-SYP121	1 TM (type 2)	346	Tobacco	p35S	23.7 ± 3.4	0.69
At1g14870-GFP	1 TM (type 2)	152	Tobacco	p35S	36.2 ± 2.7	0.74
PIP2;1-CFP	6TM (type 4)	287	Tobacco	p35S	43.7 ± 1.7	0.41
At3g17840-GFP	1 TM (type 1)	647	Tobacco	p35S	58.9 ± 3.8	0.73
GFP-LTI6b	2 TM (type 4)	54	Tobacco	p35S	72.4 ± 2.7	0.84
GPA1-GFP	Myristoylated and palmitoylated	383	Tobacco	p35S	79.8 ± 3.9	0.90
GFP-LTI6b	2 TM (type 4)	54	<i>Arabidopsis</i>	p35S	91.4 ± 3.6	0.99

Maximum recovery (I60s) of prebleaching fluorescence intensity during 133 s.

*TM, transmembrane domain. "Type" refers to membrane-anchoring topology.

[†]Gene from *Solanum tuberosum*.

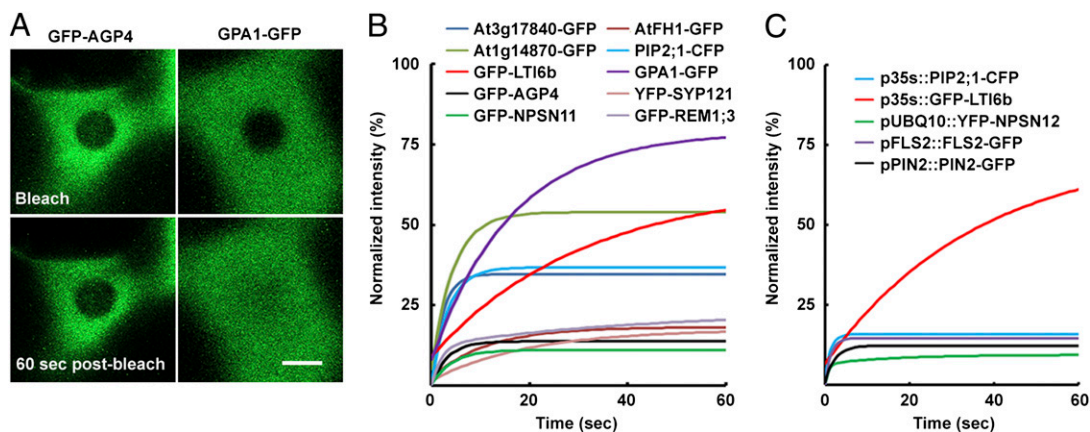


Fig. 1. Plant PM proteins are relatively immobile. (A) FRAP examples illustrating slow (GFP-AGP4) and fast (GPA1-GFP) membrane lateral diffusion. (Scale bar: 5 μm .) (B and C) FRAP curves of PM protein GFP fusions. (B) GFP fusions expressed in *N. tabacum* leaf cells. GFP-LTI6b and GPA1-GFP have relatively high mobility; others experience an initial rapid (2–10 s postbleaching) recovery of fluorescence that results from diffusion within the cytoplasmic fraction followed by almost no recovery during the subsequent 50 s, showing that they are highly immobile when anchored within the PM. (C) GFP fusions expressed in *A. thaliana*. p35s::GFP-LTI6b behaves with relatively high mobility, as in tobacco leaf cells, but all others tested (including pFLS2::FLS2-GFP and pPIN2::PIN2-GFP, both of which were expressed under native promoters) were very immobile.

FRAP experiments on constructs in which the GFP projects into the cell (i.e., MAP-GFP, GFP-PAP, and YFP-PI) showed the one-phase type of gradual but continuous recovery during 60 s postbleaching, with PM proteins finally recovering to relatively high levels [MAP-GFP I60s = $90.4 \pm 3.0\%$ ($R^2 = 0.80$); GFP-PAP I60s = $83.4 \pm 3.2\%$ ($R^2 = 0.86$); YFP-PI I60s = $80.3 \pm$

2.5% ($R^2 = 0.78$)] (Fig. 2B). In addition, for MAP-GFP, GFP-PAP, and YFP-PI, kymographic analysis clearly shows that recovery of fluorescence is centripetal and therefore results from lateral diffusion (Fig. 2C). The constructs in which GFP projects out of the cell (i.e., GFP-GPI and GFP-TM23) recover to significantly lower levels [GFP-GPI I60s = $26.6 \pm 3.1\%$ ($R^2 = 0.54$); GFP-TM23 I60s = $45.8 \pm 2.9\%$ ($R^2 = 0.66$)] (Fig. 2B). The shapes of their recovery curves are very similar to the ones that we describe for full-length proteins in the previous section. GFP-GPI and GFP-TM23 are relatively immobile, and kymographic analysis of their fluorescence recovery shows that recovery does not proceed from the margins of the bleached area (Fig. 2C). These results show that, even for minimal PM protein constructs, protein mobility can be limited and suggest that secondary protein association and interactions are not for the cause of limited diffusion within the PM.

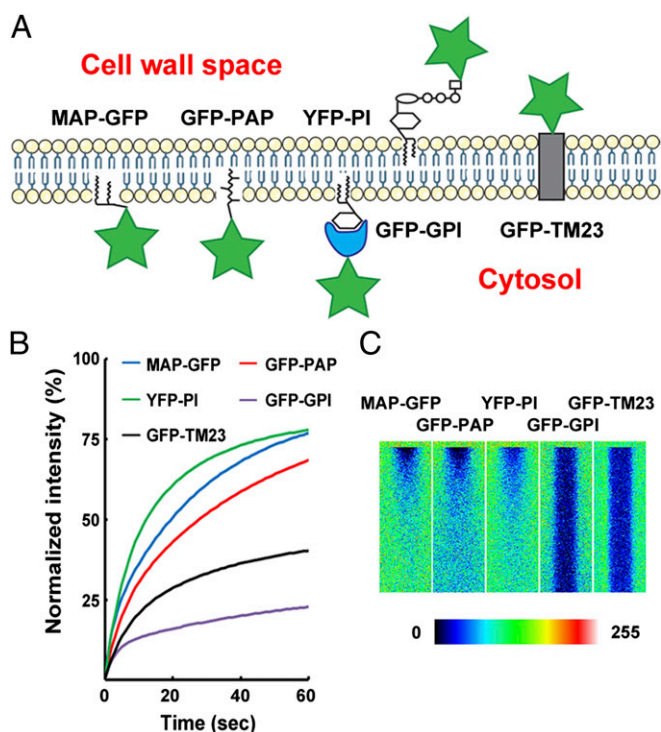


Fig. 2. Minimal FP constructs targeted to the PM have different diffusion dynamics in *A. thaliana*. (A) Schematic of the topology of minimal FPs. Green stars represent the fluorescent protein. (B) FRAP curves for minimal FPs. MAP-GFP, GFP-PAP, and YFP-PI are highly mobile; GFP-TM23 and GFP-GPI are relatively less mobile. (C) Kymograms of protein diffusion within the PM. MAP-GFP, GFP-PAP, and YFP-PI show a centripetal movement of fluorescence. No recovery is observable for GFP-GPI and GFP-TM23. Color scale indicates pixel intensity from 0 (black) to 255 (brightest intensity possible).

Lipid Domain Organization and the Cytoskeleton Have Little Effect on Protein Diffusion. Lipid organization resulting in inhomogeneity within the membrane could induce sequestration of proteins and influence their diffusion. We used detergent fractionation to isolate DIM proteins from solubilized membrane proteins and analyzed fractions to test for the presence of minimal PM protein constructs. As a control, GFP-REM, but not PMA2-GFP, appears in DIM fractions 1, 2, and 3, confirming its previously published DIM localization (Fig. S64) (18). Similar to GFP-REM, MAP-GFP and GFP-GPI co-occurred in DIM and non-DIM fractions. Myristoylated proteins (MAPs) and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPIs) often are abundant in DIM fractions (15). Finally, GFP-PAP occurred mostly in non-DIM fractions, and YFP-PI and GFP-TM23 occurred only in non-DIM fractions (Fig. S64). Surprisingly, however, minimal PM proteins that occurred in membrane microdomains (DIM fractions) had contrasting mobile fractions (I60s MAP-GFP = $90.4 \pm 3.0\%$; I60s GFP-GPI = $26.6 \pm 3.2\%$), indicating that there is no direct relationship between membrane subcompartmentation and mobility. Filipin III is a 3- β -hydroxysterol-binding antibiotic (34) that induces changes in cholesterol organization (35). In FRAP experiments on *Arabidopsis* treated with 100 μM filipin III, the mobile fraction of minimal PM protein constructs did not fluctuate (control vs. filipin, $P = 0.87$, two-way ANOVA) (Fig. S6B).

In animal cells the cytoskeleton has been shown to corral membrane proteins within subregions (36) by forming “fences” that limit protein diffusion. To test if actin or microtubule

cytoskeletons might exert a similar influence on membrane-protein mobility in plant cells, we incubated minimal GFP-expressing *Arabidopsis* seedlings with either cytochalasin D or oryzalin to depolymerize actin microfilaments or microtubules, respectively. No increase in mobile fraction for these constructs was observed (Fig. S6C). Consequently, we believe that the cytoskeleton is not responsible for the relative immobility of GFP-GPI or GFP-TM23.

Plant Cell Walls Have a Major Effect on Protein Lateral Mobility. The two least mobile of our minimal PM protein constructs, GFP-GPI and GFP-TM23 (Fig. 2A), orient in the PM with GFP projecting into the cell-wall space. The remaining three minimal proteins orient in the PM so that the fluorescent protein projects into the cytoplasm. We decided to investigate whether the cell wall influences protein diffusion within the PM. To do so, cell walls either were removed by protoplasting or were separated from the PM by plasmolysis. First, we studied protein mobility during neosynthesis of protoplast cell walls (Fig. S7). FRAP experiments were carried out both on freshly prepared protoplasts (cell-wall absent) and on protoplasts in which the cell wall had been regenerated for 24 or 48 h. GFP-GPI has a high mobile fraction in fresh protoplasts that decreases by a factor of more than 20 after cell-wall regrowth (GFP-GPI 160s $t_0 = 79.9 \pm 3.2\%$; 160s $t_{48h} = 2.6 \pm 0.6\%$; $P < 0.001$, t test) (Fig. 3A and B). In contrast, the mobile fraction of MAP-GFP, in which GFP projects into the cell, did not differ between fresh protoplasts and those with regrown cell walls (160s $t_0 = 76.6 \pm 1.8\%$; 160s $t_{48h} = 75.6 \pm 1.73\%$; $P = 0.71$, t test). This result suggests that the cell wall plays a role in immobilization of PM proteins that project into the cell-wall space.

These results were verified by incubating tissue in a hyperosmotic buffer to induce plasmolysis, a shrinkage of the protoplast that results in the creation of a space between the cell wall and the PM. FRAP experiments were carried out on control and plasmolyzed cells expressing GFP-GPI (Fig. 3C) and GFP-TM23 and showed a significant increase in mobility of the proteins' 160s in plasmolyzed cells (160s GFP-GPI control vs. plasmolysis, $P < 0.001$, t test; 160s GFP-TM23 control vs. plasmolysis, $P < 0.001$, t test) (Fig. 3D).

Single-Molecule Tracking Reveals an Effect of Cellulose Deposition on paGFP-LTI6b Diffusion. Single-molecule imaging by TIRF microscopy has been used previously to detect and track individual proteins in plant samples (37, 38). We used this technique to observe the PM of plants expressing photoactivable GFP (paGFP) (24, 39) fused to LTI6b. Before photoactivation, a small fraction of paGFP molecules occur naturally in the activated state, i.e., they behave as GFP without the requirement for photoactivation. This pool of autoactivated paGFP is of sufficiently low density to be useful for single-molecule tracking studies even when overexpressed. In these circumstances normal GFP is too bright, but paGFP-LTI6b has a very good signal-to-noise ratio and appears as discrete spots that are trackable over time (Fig. 4A–C and Movie S1). paGFP molecules show a typical blinking behavior (Fig. S8) with a short time of residence (1.28 ± 0.09 s) at the PM before bleaching. Mean squared displacement (MSD) describes the average motion in a population of diffusing molecules as a function of time and is a useful means of characterizing the type of molecular motion that occurs. LTI6b is a relatively mobile PM protein (Fig. 1B) with only two residues predicted to be in the extracellular space. Its MSD in control cells has a linear dependence on time (Fig. 4D), as predicted for molecules that diffuse freely (40). When seedlings were incubated with 20 μ M isoxaben for 1 h to disrupt cell-wall structure, we observed greatly restricted molecular movement and sublinear MSD, indicating constrained diffusion of paGFP-LTI6b in this condition (Fig. 4E).

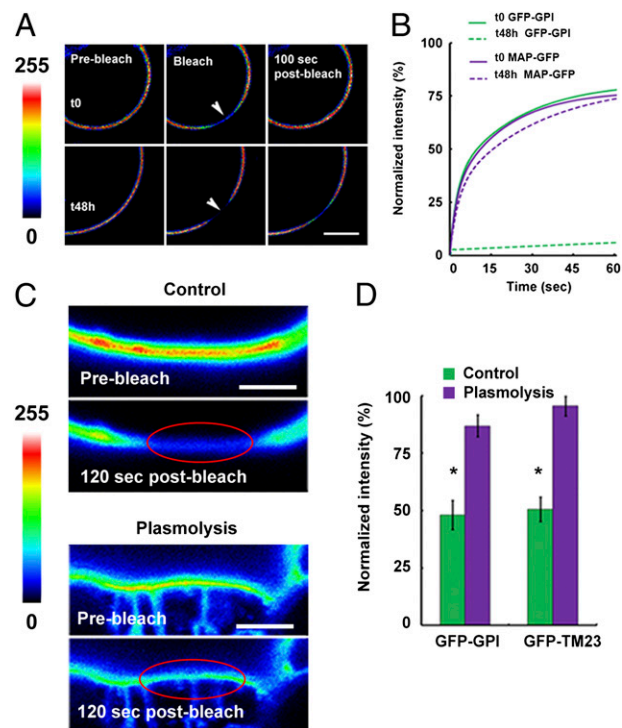


Fig. 3. The cell wall limits lateral mobility of plant PM proteins. (A) Protoplasts expressing GFP-GPI. Fluorescence recovers quickly in freshly prepared protoplasts, but the protein is much less mobile once the cell wall has regrown for 48 h. Arrowheads indicate the bleached region. Color scale indicates pixel intensity from 0 (black) to 255 (brightest intensity possible). (Scale bar: 5 μ m.) (B) Mobile fraction of GFP-GPI and MAP-GFP in freshly prepared protoplasts (t_0) and after cell-wall regeneration (t_{48h}). The mobile fraction (160s) of GFP-GPI decreased significantly as the cell wall was neosynthesized (160s GFP-GPI $t_0 = 79.9 \pm 3.2\%$; $t_{48h} = 2.6 \pm 0.6\%$; $P < 0.001$, t test), but that of MAP-GFP did not change. (C) GFP-GPI is relatively immobile in FRAP experiments in control cells but becomes mobile in cells plasmolyzed with 0.5 M mannitol. Color scale indicates pixel intensity from 0 (black) to 255 (brightest intensity possible). Red ellipse marks the bleached region. (Scale bars: 2 μ m.) (D) Plasmolysis induces a highly significant increase in fluorescence recovery ($*P < 0.001$ for both 160s GFP-GPI control vs. plasmolysis and 160s GFP-TM23 control vs. plasmolysis; t test).

Discussion

Measurement of protein mobility has been used in this report to get a better understanding of control mechanisms that structure the plant cell PM.

PM Proteins Have Relatively Low Lateral Mobility. Eleven of the 13 PM proteins fused with GFP were relatively immobile. This result is consistent with previous studies (19, 21, 23, 27). No doubt a subset of PM proteins is immobilized through specific physical interaction with cell-wall components. For instance, the potassium channel KAT1 is known to be strongly immobile at the PM (28) and forms dot patterns in the PM which coalign with cellulose microfibrils (41). The cell wall also anchors AtFH1 (23). We have demonstrated, however, that other low-mobility PM proteins have no physical interaction with cell-wall components and have tested for PM/cell-wall proximity effects that might mediate protein immobilization.

The two full-length proteins with the highest mobility were GFP-LTI6b and GPA1-GFP, which are predicted to have only two amino acids in the apoplast or to be inserted in the inner leaflet of the PM, respectively. Full-length proteins inserted only in the outer leaflet of the PM, such as GFP-GPI in which the GFP projects into the cell-wall space, were strongly immobilized by the cell wall.

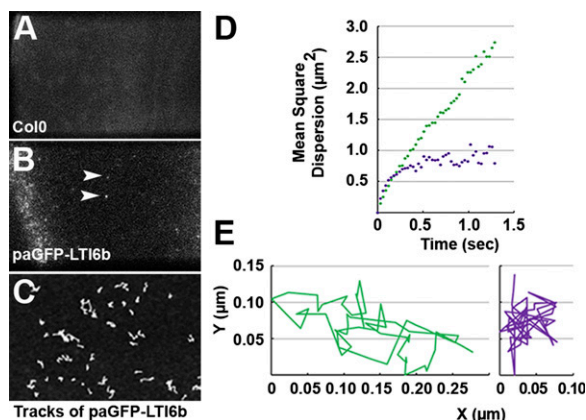


Fig. 4. Single-molecule tracking observations of paGFP-LTI6b molecules in the PM of *A. thaliana*. (A) Wild-type PM (Col0) did not show spots. (B) PM in plants expressing nonphotoactivated paGFP-LTI6b. A small population of paGFP molecules fluoresces without requiring photoactivation (arrowheads), and this density of emitting fluorochrome produced a signal-to-noise ratio sufficient to generate single-molecule tracking data sets. (Scale bar: 2 μm in A and B.) (C) Tracks of single molecules during a 2.5-s time series. (Scale bar: 1 μm .) (D) MSD of single paGFP-LTI6b molecules as a function of time. In control cells, movement of paGFP-LTI6b has a linear dependence on time (green). When seedlings were incubated with 20 μM isoxaben for 1 h to disrupt cell-wall structure, MSD of paGFP-LTI6b became sublinear (purple). (E) Single-molecule diffusion was more constrained in cells treated with isoxaben for 1 h (purple) than in control cells (green).

A set of minimal PM proteins that retain PM targeting ability but have been modified to prevent any protein–protein interaction were used to rule out protein interactions as a diffusion constraint. Lateral mobility of minimal PM proteins within the plane of the PM was constrained, as it was for many full length proteins, so we tried to identify other cellular factors that might limit protein mobility. Protein association, membrane microdomain structure, and cytoskeletons were shown to have little effect on protein dynamics. The cell wall, however, was shown to be involved in controlling protein mobility in the PM of plants. Plasmolysis to separate the PM and cell wall physically resulted in increased protein mobility, and, conversely, cell-wall regeneration in protoplasts led to a decrease in PM protein mobility. These results show the importance of the cell wall in limiting lateral diffusion of PM proteins, but an interesting distinction was made based on the extent to which a protein projects into the cell-wall space.

Cell Wall Corrals PM Proteins. Electron microscopy studies show that the distance between cell wall and PM must be smaller than a few tens of nanometers. This close association is highlighted by three factors. The first is the cellulose synthesis mechanism, which is mediated by the cellulose synthase complex (42). The cellulose synthase complex is a rosette protein complex inserted in the PM which secretes cellulose microfibrils directly to the apoplast, thus forming a direct link between the PM and one of the cell-wall components (43, 44). Second, some proteins, such as arabinogalactans (AGPs), wall-associated kinases, and formin1 (AtFH1), are known to form molecular bridges between the PM and cell wall (23). Third, plant cells have very high turgor pressure, which applies a pressure of 0.1–0.6 MPa on the PM in the direction of the cell wall (45). The cellulose microfibril meshwork and associated components of the cell wall such as pectins and hemicelluloses no doubt are appressed directly to the lipid bilayer. As a consequence, this meshwork might form bounded regions that serve to constrain the diffusion of PM proteins and phospholipids.

A cell-wall meshwork that acts as a constraint to PM protein lateral mobility is analogous with the animal cell anchored-protein picket model of Fujiwara et al. (36). Those authors used single-molecule tracking experiments to demonstrate that the

actin cytoskeleton corrals proteins and limits protein and lipid lateral mobility in NRK cells. Our experiments show that actin and microtubule cytoskeletons do not perform this same function in plant cells but that a mechanism to stabilize proteins is conserved at the PM/cell-wall interface. Maintenance of protein localization and association within the PM is vital for cell signaling and transport and is a key component in the mechanism that maintains asymmetric distribution of PM proteins such as the PIN auxin efflux facilitators (22, 46).

The herbicide isoxaben inhibits cellulose synthases 2, 3, 5, and 6 (47) and therefore has a very detrimental effect on cell-wall structure. In single-molecule tracking experiments, paGFP-LTI6b, with only two residues in the apoplast, experienced a significant change to a more constrained movement pattern after very short (1 h) isoxaben treatment. Short-duration treatment of mature cells with isoxaben is unlikely to alter cell-wall structure dramatically, as occurs when seedlings are grown in the drug. In the short term, slight alteration to cellulose microfibril patterning might result from isoxaben treatment, but deposition of other cell-wall components such as pectins might be affected also. That the mobility of LTI6b is constrained by short-term isoxaben treatment shows not only that interactions at the PM/cell-wall interface have an effect on proteins with extracellular domains but also that cell-wall organization universally influences protein diffusion.

Materials and Methods

A full discussion of materials and methods can be found in *SI Materials and Methods*. FRAP and single-molecule tracking methods are presented briefly here.

FRAP Experiments. The relative mobile fraction at time 60 s postbleaching (I_{60s}) of different fluorescent proteins was assessed by FRAP following the technique of Martinière et al. (23) (Fig. S1). Circular regions of interest (ROIs) (radius 4.3 μm) were bleached in median optical sections of the fluorescent PM. Recovery of fluorescence was recorded during 60 or 120 s with a delay of 1.5 s between frames. Fluorescence intensity data were normalized using the equation:

$$I_n = [(I_t - I_{\min}) / (I_{\max} - I_{\min})] \times 100$$

where I_n is the normalized intensity, I_t is the intensity at any time t , I_{\min} is the minimum intensity postphotobleaching, and I_{\max} is the mean intensity before photobleaching.

Nonlinear regression was used to model the normalized FRAP data. In this case, a two-phase exponential association equation was used:

$$Y_t = A + B(1 + \exp(-K_1(t))) + C(1 - \exp(-K_2(t)))$$

where Y_t is normalized intensity, A , B , C , K_1 , and K_2 are parameters of the curve, and t is time.

For each treatment, 10–20 cells were analyzed. The value of the fluorescence intensity recovery plateau was calculated for $t = 60$ and was used as an approximation of the relative mobile fraction (I_{60s}).

TIRF Microscopy and Single-Molecule Tracking. TIRF imaging was performed using a custom-built microscope equipped with a 100 \times objective (α -Plan-Fluar, NA = 1.45; Zeiss), 491-nm laser excitation (Cobolt), HQ525/50-nm emission filter (Chroma), and an electron-multiplication CCD (iXon; Andor) (48).

Cells overexpressing nonphotoactivated paGFP-LTI6b have a population of naturally fluorescent paGFP molecules that is at a suitable density for TIRF microscopy and single-particle tracking. Tracks were calculated as described in Rolfe et al. (49). We measured 939 spots in six repetitions. Mean time of PM residence and track length were recorded. The MSD was calculated for all molecules:

$$\text{MSD}(\Delta t) = \langle |r_i(t + \Delta t) - r_i(t)|^2 \rangle$$

where $|r_i(t + \Delta t) - r_i(t)|$ is the distance traveled by molecule i between time t and time $t + \Delta t$, and the expectation value is over all pairs of time points separated by Δt in each molecular track.

ACKNOWLEDGMENTS. J.R. and A.M. were funded by Biotechnology and Biological Sciences Research Council Grant BB/F01407/1.

1. Schwacke R, et al. (2003) ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant Physiol* 131:16–26.
2. Engelman DM (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438:578–580.
3. Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.
4. Saffman PG, Delbrück M (1975) Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3111–3113.
5. Thompson NL, Axelrod D (1980) Reduced lateral mobility of a fluorescent lipid probe in cholesterol-depleted erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 597:155–165.
6. Yechiel E, Edidin M (1987) Micrometer-scale domains in fibroblast plasma membranes. *J Cell Biol* 105:755–760.
7. Kwik J, et al. (2003) Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13964–13969.
8. Lenne PF, et al. (2006) Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J* 25:3245–3256.
9. Sieber JJ, et al. (2007) Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* 317:1072–1076.
10. Kusumi A, et al. (2005) Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 34:351–378.
11. Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.
12. Owen DM, Williamson D, Rentero C, Gaus K (2009) Quantitative microscopy: Protein dynamics and membrane organization. *Traffic* 10:962–971.
13. Mongrand S, Stanislas T, Bayer EM, Lherminier J, Simon-Plas F (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci* 15:656–663.
14. Borner GH, et al. (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol* 137:104–116.
15. Morel J, et al. (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol Cell Proteomics* 5:1396–1411.
16. Lefebvre B, et al. (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol* 144:402–418.
17. Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W (2006) Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 5:945–953.
18. Raffaele S, et al. (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* 21:1541–1555.
19. Men S, et al. (2008) Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nat Cell Biol* 10:237–244.
20. Liu P, et al. (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J* 60:303–313.
21. Takano J, et al. (2010) Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5220–5225.
22. Feraru E, et al. (2011) PIN polarity maintenance by the cell wall in Arabidopsis. *Curr Biol* 21:338–343.
23. Martinière A, Gayral P, Hawes C, Runions J (2011) Building bridges: Formin1 of Arabidopsis forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton. *Plant J* 66:354–365.
24. Runions J, Brach T, Kühner S, Hawes C (2006) Photoactivation of GFP reveals protein dynamics within the endoplasmic reticulum membrane. *J Exp Bot* 57:43–50.
25. Graumann K, Runions J, Evans DE (2010) Characterization of SUN-domain proteins at the higher plant nuclear envelope. *Plant J* 61:134–144.
26. Sparkes I, Runions J, Hawes C, Griffing L (2009) Movement and remodeling of the endoplasmic reticulum in nondividing cells of tobacco leaves. *Plant Cell* 21:3937–3949.
27. Sutter JU, Campanoni P, Tyrrell M, Blatt MR (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the Arabidopsis KAT1 K⁺ channel at the plasma membrane. *Plant Cell* 18:935–954.
28. 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.
29. Sparkes IA, Runions J, Kearns A, Hawes C (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat Protoc* 1:2019–2025.
30. Luu DT, et al. (2012) Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in Arabidopsis roots under salt stress. *Plant J* 69:894–905.
31. Umenishi F, Verbavatz JM, Verkman AS (2000) cAMP regulated membrane diffusion of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera. *Biophys J* 78:1024–1035.
32. Vermeer JE, et al. (2009) Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living plant cells. *Plant J* 57:356–372.
33. Brandizzi F, et al. (2002) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* 14:1077–1092.
34. Grebe M, et al. (2003) Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr Biol* 13:1378–1387.
35. Bonneau L, et al. (2010) Plasma membrane sterol complexation, generated by filipin, triggers signaling responses in tobacco cells. *Biochim Biophys Acta* 1798:2150–2159.
36. Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A (2002) Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* 157:1071–1081.
37. Li X, et al. (2011) Single-molecule analysis of PIP2:1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* 23:3780–3797.
38. Vizcay-Barrena G, Webb SE, Martin-Fernandez ML, Wilson ZA (2011) Subcellular and single-molecule imaging of plant fluorescent proteins using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *J Exp Bot* 62:5419–5428.
39. Patterson GH, Lippincott-Schwartz J (2002) A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* 297:1873–1877.
40. Holtzer L, Schmidt T (2010) The tracking of individual molecules in cells and tissues. *Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer*, eds Brauchle C, Lamb D, Michaelis J (Wiley-VCH, Weinheim, Germany).
41. Homann U, Meckel T, Hewing J, Hütt MT, Hurst AC (2007) Distinct fluorescent pattern of KAT1:GFP in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Eur J Cell Biol* 86:489–500.
42. Carpita NC (2011) Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis: How plants make cellulose and other (1->4)- β -D-glycans. *Plant Physiol* 155:171–184.
43. Giddings TH, Jr., Brower DL, Staehelin LA (1980) Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. *J Cell Biol* 84:327–339.
44. Mueller SC, Brown RM, Jr. (1980) Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *J Cell Biol* 84:315–326.
45. Wang L, Hukin D, Pritchard J, Thomas C (2006) Comparison of plant cell turgor pressure measurement by pressure probe and micromanipulation. *Biotechnol Lett* 28:1147–1150.
46. Kleine-Vehn J, et al. (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* 7:540.
47. Bischoff V, Cookson SJ, Wu S, Scheible WR (2009) Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in Arabidopsis thaliana seedlings. *J Exp Bot* 60:955–965.
48. Clarke DT, et al. (2011) Optics clustered to output unique solutions: A multi-laser facility for combined single molecule and ensemble microscopy. *Review of Scientific Instruments* 82, 093705.
49. Rolfe DJ, et al. (2011) Automated multidimensional single molecule fluorescence microscopy feature detection and tracking. *Eur Biophys J* 40:1167–1186.



Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging

Alexandre Martinière^a, Rémy Gibrat^a, Hervé Sentenac^a, Xavier Dumont^a, Isabelle Gaillard^a, and Nadine Paris^{a,1}

^aBiochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, Université de Montpellier, Centre National de Recherche Scientifique, L'Institut National de la Recherche Agronomique, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montpellier, France

Deborah J. Delmer, Emeritus University of California, Davis, CA, and approved April 16, 2018 (received for review December 15, 2017)

Building a proton gradient across a biological membrane and between different tissues is a matter of great importance for plant development and nutrition. To gain a better understanding of proton distribution in the plant root apoplast as well as across the plasma membrane, we generated *Arabidopsis* plants expressing stable membrane-anchored ratiometric fluorescent sensors based on pHluorin. These sensors enabled noninvasive pH-specific measurements in mature root cells from the medium–epidermis interface up to the inner cell layers that lie beyond the Casparian strip. The membrane-associated apoplastic pH was much more alkaline than the overall apoplastic space pH. Proton concentration associated with the plasma membrane was very stable, even when the growth medium pH was altered. This is in apparent contradiction with the direct connection between root intercellular space and the external medium. The plasma membrane-associated pH in the stele was the most preserved and displayed the lowest apoplastic pH (6.0 to 6.1) and the highest transmembrane delta pH (1.5 to 2.2). Both pH values also correlated well with optimal activities of channels and transporters involved in ion uptake and redistribution from the root to the aerial part. In growth medium where ionic content is minimized, the root plasma membrane-associated pH was more affected by environmental proton changes, especially for the most external cell layers. Calcium concentration appears to play a major role in apoplastic pH under these restrictive conditions, supporting a role for the cell wall in pH homeostasis of the unstirred surface layer of plasma membrane in mature roots.

pH | ratiometric sensor | root | plasma membrane

It is important for the cells of multicellular organisms to bathe in a protective interstitial environment that maintains optimal conditions for their functioning, with the potential to adapt to unfavorable external environments. In many cases, such as mammalian body fluid or insect hemolymph, the physicochemical properties of this interstitial liquid are tightly controlled by the organism (1–3). In the case of plants, a paradoxical situation exists at the level of the roots. This organ, dedicated to water and nutrient uptake, has its intercellular space (the apoplast) in direct contact with the soil. This has been demonstrated for numerous species, including the model plant *Arabidopsis*, by supplying small fluorescent dyes to the growth media, which easily penetrate the space between root cells (4, 5). From the soil, water and ions move radially through the root via an apoplastic flow, up to the cell layer known as the endodermis (6, 7). At this deep root tissue level, a polarized deposit of lignin and suberin within the apoplast forms the Casparian strip, a hydrophobic structure that prevents further diffusion toward internal cell layers. For this reason, the endodermis has been modeled as the “inner skin” of the root tissue, forcing minerals and water to enter into cells so that they can reach the internal vascular system connected to the aerial parts of the plant (8). Nevertheless, the apoplastic space of the two external cell layers, the epidermis and cortex, is not isolated from the soil and directly faces potentially unsuitable environments. This raises several questions: Are these cell layers able to regulate the physicochemical properties of their interstitial environment, and can they adjust to challenging soil compositions?

One of the physiological parameters tightly regulated in the interstitial fluid is pH. For plants, pH regulation is crucial for mineral nutrition, since it participates in the plasma membrane (PM) proton-motive force (PMF), along with the transmembrane pH gradient (PM delta pH) and an electrical component. The PMF is formed by the activity of a P-type H⁺-ATPase and provides the driving force for the uptake of minerals by transporters (symporters and antiporters) and channels (9). While the electrical component of the PMF can be studied by electrophysiological approaches, it is more difficult to measure the PM delta pH in vivo. It is known that plant cells build a proton gradient across the PM, in which the apoplast is more acidic than the cytoplasm. Whereas the cytoplasmic pH is considered to be around 7.5, the pH of the apoplast can vary greatly, depending on the plant species and the measuring method. In the case of *Arabidopsis* root cells, the apoplastic pH can range from 5 to 7 (10–16). The plant apoplastic space includes the cell wall, which consists of cellulose, hemicellulose, pectins, and proteins. Due to the cation exchange properties of their negatively charged residues, pectins are thought to confer a buffering capacity to the plant cell wall, in the range of the soil pH (17). Previous studies that used a modeling approach (and were later confirmed) suggest that the pH of the cell wall could be 2 pH units more acidic than the apoplastic liquid, depending on the ionic condition of the medium (18, 19). This finding reflects the potential pH heterogeneity of the apoplast and might explain the large range in documented pH values.

In the soil, pH can vary drastically from one area to another due to nitrogen fertilizer, manure decomposition, and even acidic rain (20, 21). As a consequence, roots that face changes in soil pH must adapt themselves to these modifications.

Significance

The pH on both sides of the plant plasma membrane was accurately measured in vivo using ratiometric fluorescent sensors. This enabled noninvasive access to membrane-associated pH and transmembrane delta pH values from the surface of the root up to the deepest cell layers beyond the Casparian strip barrier. We demonstrate that despite direct contact with the soil, the apoplastic pH close to the plasma membrane was maintained at values ranging from 6.0 to 6.4 in mature root cells, whereas the overall pH in the apoplastic space is far more acidic. Furthermore, we found that the cell wall plays a role in proton homeostasis in mature root.

Author contributions: A.M., R.G., H.S., and N.P. designed research; A.M., X.D., and N.P. performed research; A.M., R.G., H.S., I.G., and N.P. analyzed data; X.D. and I.G. contributed new reagents/analytic tools; and A.M. and N.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence should be addressed. Email: nadine.paris@supagro.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1721769115/-DCSupplemental.

Published online June 4, 2018.

Here, to better understand proton distribution in the plant root apoplast as well as across the PM, we quantified pH on both sides of the PM using fluorescent membrane-anchored ratiometric pH sensors. Noninvasive pH measurements revealed differences between the epidermis and the stele in mature roots for membrane-associated pH as well as for PM delta pH. Interestingly, the root apoplastic pH remains stable even when the pH of the bathing medium is changed. The pH values found close to the PM were more alkaline than in the overall apoplastic space, which correlates well with optimal activities of channels and transporters involved in ion uptake. Lastly, our results suggest a role of the cell wall in membrane-associated pH homeostasis.

Results

Noninvasive pH Sensors Are Anchored to the PM. To investigate proton homeostasis in intact roots, we utilized ratiometric pHluorin. This is the best-described genetically encoded pH sensor with little sensitivity to other parameters such as redox status, potassium, sodium, and calcium ions (15, 22, 23). To record pH values close to the PM, we fused pHluorin to a transmembrane domain such that the fusion protein would be anchored in the PM (24) with the pH-sensing moiety facing the apoplast. As represented in Fig. 1A, this apoplastic membrane pH sensor, PM-Apo, has its fluorochrome positioned a few nanometers away from the PM, which is nearly 1,000 times closer to the cell surface than what can be achieved using classical pH electrodes. When transiently expressed in tobacco leaf epidermis, PM-Apo fluorescence was evenly distributed at the cell periphery, as expected for PM labeling (Fig. 1B). This is in contrast to the labeling pattern obtained with Apo, a secreted soluble pHluorin that can diffuse away from the membrane in the apoplast (Fig. 1A). As shown in Fig. 1C, Apo fluorescence labeling was scarce, weak, and restricted to occasional “pockets” that are likely due to acidic quenching of the pHluorin in most of the apoplast (Fig. S1A).

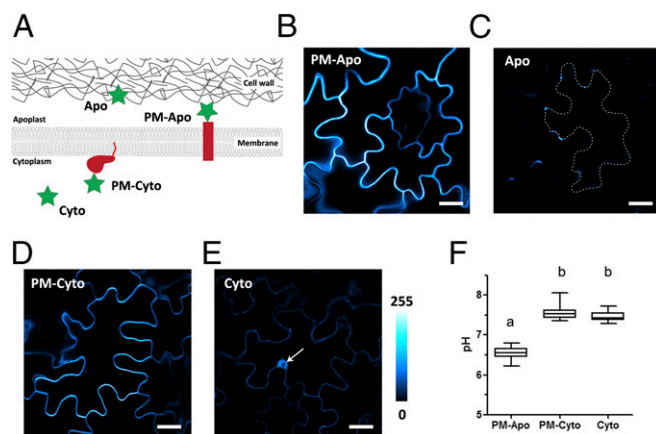


Fig. 1. Transient expression of apoplastic and cytoplasmic pH sensors in tobacco leaf epidermal cells. (A) Schematic representation of the pH sensors used in this study: PM-Apo and PM-Cyto are anchored at the PM on either side of the two membrane faces. PM-Apo is anchored by a 26-amino acid transmembrane domain, whereas PM-Cyto is anchored due to the C-terminal region of Ras, which includes a farnesylation signal. Cyto is a free soluble pHluorin expressed in the cytosol, and Apo is a soluble pHluorin secreted by default. (B–E) Confocal images of tobacco epidermal cells expressing PM-Apo (B), Apo (C), PM-Cyto (D), and Cyto (E) constructs (arrow in E indicates nucleus). The four images were taken using the same confocal settings. False color is indicative of fluorescence intensity. (Scale bars: 20 μm .) Apo barely labels the apoplast (see dotted line in C), whereas PM-Apo (shown in B) is evenly distributed at the cell periphery. (F) Comparison of apoplastic or cytoplasmic pH measurements obtained with free or membrane-anchored sensors. $n > 18$; ANOVA followed by Tukey’s test; $P < 0.05$ between a and b groups.

To quantify the PM delta pH, we also designed a sensor anchored in the inner face of the PM. For this, we fused pHluorin to the farnesylation sequence of Ras (25) and named it PM-Cyto (Fig. 1A). As shown in Fig. 1D, the labeling of tobacco epidermal cells expressing PM-Cyto is restricted to the cell periphery (Fig. 1D) and does not include the nucleus, in contrast to Cyto labeling (Fig. 1E) obtained with a cytoplasmic soluble pHluorin (Fig. 1A). The membrane localization of PM-Apo and PM-Cyto was further assayed by the plasmolysis experiment and microsomal fractionation (Fig. S1B and C, respectively).

Next, the fluorescence ratio was assessed from tobacco epidermal cells expressing the different sensors, and the corresponding pH values were calculated using an in situ calibration with a recombinant pHluorin (Fig. S2). An average pH value of 6.5 was detected at the outer face of the PM in the tobacco epidermis (PM-Apo, Fig. 1F). The different labeling patterns obtained for the two apoplastic sensors (Fig. 1B and C) and the acidic quenching of Apo (Fig. S1A) suggest that the extracellular environment has a heterogeneous pH. In contrast, the PM–cytosol interface and the entire cytosol (PM-Cyto and Cyto, respectively; Fig. 1F) both displayed a pH of 7.5. Due to the pH value obtained at the outer face of the PM, two altered versions of PM-Apo were generated with modified linkers between the sequences of the transmembrane domain and the pHluorin—PM-Apo(bis) and PM-Apo(ter)—and their PM localization was further assayed by plasmolysis (Fig. S3A). The three PM-Apo sensors are predicted to expose the pHluorin at various distances from the PM (Fig. S3B). The pH values obtained in tobacco epidermal cells with the two additional membrane-anchored sensors were slightly but significantly more alkaline than PM-Apo (Fig. S3C, P value < 0.05). Interestingly, in tobacco protoplasts, this difference is abolished (Fig. S3D). Altogether, this suggests that pH measurement in close vicinity to PM is little impacted by the linker structure but is affected by the cell wall. Lastly, the membrane orientation of the PM-associated pH sensors was assayed by two different approaches (Fig. S4). A proteinase K digest on living cells (26) was performed on tobacco protoplasts, which led to a clear decrease of PM-Apo fluorescence as compared to PM-Cyto (Fig. S4A). Similarly, a proteinase K digest on *Arabidopsis* microsomes led to opposite responses of two PM sensors (Fig. S4B), a result that is also in accordance with pHluorin being exposed outside of the cell for PM-Apo and protected from digestion in PM-Cyto configuration. Altogether, our results with membrane-anchored sensors revealed an apoplastic pH of 6.5 to 6.7 close to the PM, and a cytoplasmic pH of 7.5 in tobacco epidermal cells.

Arabidopsis Roots Present Radial Variation in pH at the Apoplastic Interface of the PM, Leading to a Maximal PM Delta pH in Stele Cells.

Transgenic *Arabidopsis* plants expressing one of the two pHluorin-based sensors anchored on either side of the PM (PM-Apo and PM-Cyto) were generated. These plants did not present any visible growth phenotype compared with wild-type plants (Fig. S5A) and were able to acidify their growth media (Fig. S5B and ref. 27). A detailed analysis of pH by confocal microscope on intact *Arabidopsis* plantlets revealed two acidic root zones (Fig. S6A), in agreement with previous reports using other approaches (11, 28–30). Next, the ability of PM-associated sensors to detect transmembrane transport mechanisms in mature root was confirmed using orthovanadate, an inhibitor of P-ATPase (Fig. S6B), and nigericin, a proton ionophore (Fig. S6C). In contrast, applying PM depolarization treatments either by increasing potassium concentration in the media or by adding the K^+ ionophore valinomycin (31) did not affect PM-Apo pH (Fig. S7B or C, respectively). To confirm the impact of the different treatment on membrane potential, we used the voltage-sensitive fluorescent dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol [DiBAC4(3)] which exhibits an enhanced fluorescence when bound to depolarized membranes (refs. 32 and 33 and Fig. S7A). This

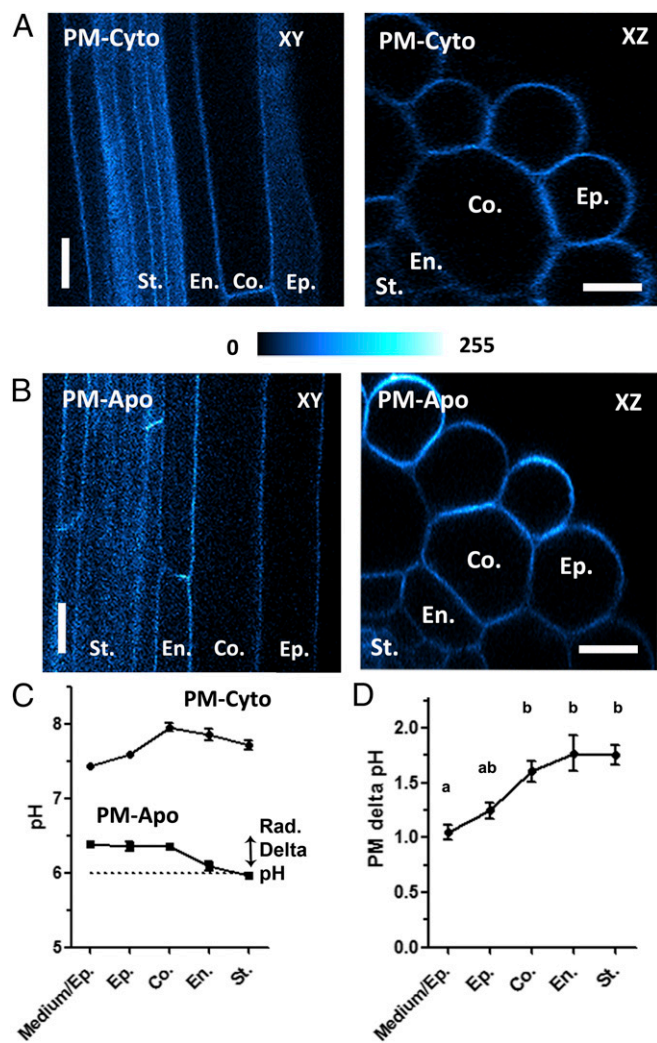


Fig. 2. Stable expression of membrane-anchored pH sensors in mature *Arabidopsis* roots. (A and B) Representative optical sectioning obtained by confocal microscopy of the mature roots of 6-d-old plantlets expressing PM-Cyto (A) or PM-Apo (B). XY: median longitudinal confocal section of 1 Airy; XZ: radial section obtained by 3D projection of 50- μ m z stacks. False color is indicative of fluorescence intensity. (Scale bars: 10 μ m.) (C) Cell type-specific measurements of pH along the radial axis of the mature root in MS/2 medium (pH 6, dotted line) and expressing either PM-Apo or PM-Cyto. Radial (Rad.) delta pH is the difference in $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ between the root surface and the stele. (D) The cell layer-specific PM delta pH for each cell layer (determined as the difference between the PM-Cyto and PM-Apo probed pH values). $n > 29$; mean \pm SEM; ANOVA followed by Tukey's test by cell layers; $P < 0.05$ between a and b groups. Co., cortex; En., endodermis; Ep., epidermis; Medium/Ep., the PM at the interface between the media and the root epidermis; St., stele.

suggests that fluorescence from PM-Apo was not affected by the electron motive force at the PM.

Subsequently, we analyzed PM-associated pH on the portion of roots with expanded hairs located roughly 2 cm from the apex and a fully differentiated Casparian strip, as confirmed by staining with propidium iodide (Fig. S8A, purple). The fluorescent signals of the PM-Cyto (Fig. 2A) and PM-Apo (Fig. 2B) sensors were limited to the periphery of the root cells and were detected all the way down to the stele using confocal microscopy on intact plantlets, as revealed in xy optical sections and xz projections (Fig. 2A and B). In comparison, no signal was detected from nontransformed plants (Fig. S9A).

Using xz projections of transformed mature roots, cell layer-specific fluorescence data were collected at the medium–epidermis

interface or between two isotypic cells (Fig. S8B), and the pH was calculated using in situ calibration curves (Fig. S2B). As shown in Fig. 2C (Bottom curve), the apoplastic pH observed close to the PM (i.e., $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$) was stable at pH 6.4, from the medium–epidermis interface up to the cortex. Several approaches were performed to investigate the apoplastic pH further away from the PM, including the transformation of *Arabidopsis* plants with the Apo construct. Unfortunately, as previously described for the pH sensor apopHusion (16), most of the fluorescence signal was retained in the endoplasmic reticulum (ER), especially in the mature part of the root (Fig. S10A, arrows), making accurate pH measurements extremely difficult. We then used the fluorescent probe 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (HPTS) (Fig. S10C) and estimated the overall apoplastic pH as 5.7 (Fig. S10H). This is likely an overestimation of the apoplastic space pH, since the 450-nm excitation peak of HPTS was missing at pH 5. Lastly, the pH dye Oregon Green dextran was used as previously described (34), except for application of an additional gentle vacuum (Fig. S10B); this permitted us to estimate the overall apoplastic pH to be close to 4 (Fig. S10H). Altogether, these results indicate that in mature roots, the apoplastic pH close to the PM is more alkaline than the average pH of the apoplastic space.

Deeper in the root tissue (e.g., the endodermis and the stele), $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ was significantly more acidic than in more peripheral cell layers (Fig. 2C and Fig. S11). This difference in $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ along the radial axis in the mature root was named radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ (Fig. 2C). This positive radial delta pH value is in opposition to a simple model of proton diffusion between the medium and the entire root apoplastic space and shows a tight regulation of PM-associated pH in the mature root (including the outermost cell layer).

Similarly, cell layer-specific cytoplasmic pH values were measured from roots expressing PM-Cyto (i.e., pH_{cyto}) (Fig. 2C, Top curve). Importantly, the two sets of collected pH values allowed us to calculate the transmembrane proton gradient (PM delta pH = $\text{pH}_{\text{cyto}} - \text{pH}_{\text{apo-PM}}$) for each cell layer in a noninvasive manner. This PM delta pH measurement is directly linked to the PMF of the PM, which increases from the medium–epidermis interface to the internal cell layers where it reaches an optimum of 1.7 pH units in the endodermis and the stele (Fig. 2D).

The Radial Variation of $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ Is Highly Robust in Mature Roots.

The root apoplastic space is in direct contact with the bulk media, shown by diffusion of propidium iodide in the root (Fig. S8A). As a consequence, the apoplastic liquid should be highly sensitive to any fluctuation in proton concentration in the medium. The impact of modifying the pH of half-strength Murashige and Skoog (MS/2) medium on steady-state apoplastic PM-associated pH was therefore investigated in mature roots and was found to have no effect at all on either the endodermis or the stele $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ (Fig. 3A). Only small changes were detected in the outer cell layers up to the cortex, where $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ was observed to increase even when a pH value of 5 was applied, although further analysis of the data revealed no statistical difference between pH 5 and pH 6 or between pH 7 and pH 8 for the epidermis and the cortex (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, the measured $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ was mostly preserved, even at the interface between the root and the medium, as changing the bulk proton concentration by up to 3 orders of magnitude resulted in only a variation of 0.7 pH units at most. No effect on the apoplastic pH was observed in the stele (Fig. 3B). We observed that the radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ was not abolished by acidifying the external medium, and it was even amplified in more alkaline conditions (Fig. 3C). A similar mild effect was observed with stronger buffering capacities of the medium (Fig. S12A and B).

These results demonstrate that the pH of the apoplast in close proximity to the PM is very stable in MS/2 medium and that it is mostly unaffected by external conditions. This indicates that a radial PM-associated apoplastic delta pH value of at least 0.4 pH

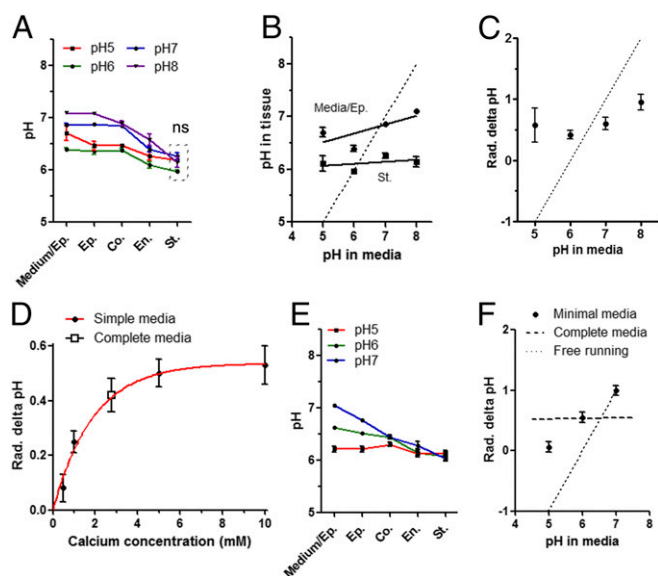


Fig. 3. Apoplastic pH homeostasis close to the PM in *Arabidopsis* mature roots. *Arabidopsis* plantlets expressing PM-Apo were grown for 5 d on MS/2 medium (pH 6) and transferred for 24 h onto complete MS/2 medium at different pH levels (A–C) or onto minimal KCl medium (D–F) before pH measurement in the mature part of the root. (A) Cell layer-specific $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ at various pH levels. (B) $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ at the medium–epidermis interface (Media/Ep.) and the stele as a function of the pH in the medium. (C) Radial (Rad.) apoplastic delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ as a function of the pH in the medium. (D) Root radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ at different calcium concentrations in minimal medium containing 10 mM KCl (pH 6; closed circles) or in complete MS/2 medium (containing 2 mM Ca^{2+} and 0.75 mM Mg^{2+} , pH 6; open square). (E) Cell layer-specific $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ at different pH levels. (F) Root radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ as a function of the pH. Dotted line in B, C, and F represents what would be expected for a free-running system, in which pH in the stele is equilibrated with the pH of the medium. $n > 16$; mean \pm SEM; ANOVA followed by Tukey's test by cell layers; $P < 0.05$; ns indicates non-significant difference for measures included in dashed line box. Co., cortex; En., endodermis; Ep., epidermis; Medium/Ep., the PM at the interface between the media and the root epidermis; St., stele.

units was preserved throughout the root tissue, with the pH in the stele strictly maintained at pH 6.1 in MS/2 medium.

The Calcium and Proton Variation in Minimal Medium Influences the PM-Associated pH Observed in Mature Roots. To further investigate the effect of ions on root pH, we replaced the complete medium with minimal ionic medium composed of 5 mM KCl to which we added various Ca^{2+} concentrations below and above that of MS/2 medium. At equilibrium, the calcium concentration was observed to have a major effect on the radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$, which appears to follow a saturating mechanism, with an optimum of 0.5 pH units for 5 mM calcium and above (Fig. 3D). The best fit was found using an exponential relation for radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ and calcium concentration ($R^2 = 0.97$, $K_d = 1.9$ mM). Moreover, the value previously obtained under MS/2 conditions (2 mM Ca^{2+} and 0.75 mM Mg^{2+}) fits perfectly with this curve (Fig. 3D, square).

For the following experiments, we chose a concentration of 10 mM CaCl_2 , which provides a CaCl_2/KCl ratio of 2 and, under this condition, the potassium concentration associated with the cell wall is predicted to be marginal (18). Using these conditions, the $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ values obtained in minimal medium were compared with those previously obtained in complete medium (MS/2 medium) at the same pH level (pH 6), and no differences were detected (Fig. S12C). Next, $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ robustness was challenged with various external proton concentrations. As shown in Fig. 3E, the $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ values followed the bulk pH in the most external cell layers, but not in the endodermis or the stele. Consequently,

the steady-state radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ increased in a linear manner together with the alkalization of the minimal medium, which is in contrast to what was observed in complete medium (see Fig. 3F vs. Fig. 3C).

For further insight into pH regulation across the PM, we monitored proton concentration at the inner face of the PM in mature roots (Fig. S12D) and calculated the PM delta pH (Fig. S12E). At any of the three pH levels tested, the PM delta pH increased from the epidermis to the stele where it reached an optimum of 2 pH units (Fig. S12E). For the endodermis, we observed an alkalization of pH_{cyto} at pH 7 (Fig. S12D, blue), suggesting that the plant can also compensate for environmental constraints by modulating cytoplasmic PM-associated pH by cell layer-specific mechanisms. As a result of decreasing the minimal medium pH to 5, the radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ is close to zero (Fig. 3E). This result strongly differs from those obtained in complete medium (Fig. 3A, red).

Altogether, these results demonstrate that K^+ , Cl^- , and Ca^{2+} are less efficient at maintaining proton homeostasis in the external cell layer than the complex set of ions provided by complete medium (MS/2). It also demonstrates that Ca^{2+} has a significant impact on the radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ in mature roots equilibrated with a minimal KCl medium.

In Minimal Medium, the Anion Species Has Little Impact on the PM-Associated pH Observed in Mature Roots.

After determining that minimal medium conditions conferred less root pH robustness to environmental constraints than complete medium, we next tested the impact of anion species. We chose two major anions that are expected to affect root pH: SO_4^{2-} , which is less absorbed than Cl^- ; and NO_3^- , which is more absorbed than Cl^- (35). Moreover, both SO_4^{2-} and NO_3^- require proton cotransport for their uptake: Sulfate is believed to consume three protons and nitrate is believed to consume two protons (36, 37). The pH on either side of the PM was measured in mature roots of plants expressing PM-Apo and PM-Cyto, after equilibration in either $\text{KNO}_3/\text{CaCl}_2$ or $\text{K}_2\text{SO}_4/\text{CaCl}_2$ conditions at pH 5, 6, or 7 (Fig. S13A, B, D, and E). Changing the nature of the anion had no effect on the radial delta $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ (Fig. S13C). The calculated PM delta pH of each cell layer for the NO_3^- (Fig. S13F) and SO_4^{2-} (Fig. S13G) conditions was unexpectedly stable in comparison with Cl^- (Fig. S12E). These results could be explained by the fact that a majority of the anion channels/transporters characterized so far transport both Cl^- and NO_3^- (38). Altogether, our results suggest that PM-associated pH is barely affected by the nature of the anion, suggesting the presence of potential compensatory mechanisms.

Discussion

Here, we established that membrane-anchored ratiometric pH sensors allow the noninvasive measurement of PM delta pH in various cell types of living *Arabidopsis* roots, including in the central cylinder. Our results demonstrate that the apoplastic pH in the unstirred surface layer of the PM is both strictly controlled and far from behaving as a free-running system, as initially expected from the continuity between the cell apoplast and the medium up to the endodermis. Lastly, the cell wall appears to have a regulatory role of the apoplastic pH.

Homeostatic Regulation of PM-Associated Apoplastic pH in *Arabidopsis* Roots.

Arabidopsis displays a conserved gradient of $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ in the mature root, wherein the stele is on average 0.4 pH units more acidic than the surface. When looking more closely at the distribution of pH at the level of each cell layer, it is clear that the proton concentration in the apoplastic interface of the PM does not gradually vary along a radial axis. Instead, the root is divided into two zones: an “alkaline” zone including the surface of the root, the epidermis, and the cortex; and an “acidic” zone containing the endodermis and the stele (Fig. S11). Because we performed our measurements in a fully developed part of the root

with a mature Casparian strip, the pH “break” in the root apoplast can be observed to coincide with this structure in the endodermis. The Casparian strip is the main barrier for apoplastic diffusion of solutes and plays a central role in current models of plant nutrient uptake by roots. Indeed, when this barrier is deficient, as in the *shengen3* mutant, a major defect in maintaining sufficient levels of macronutrients such as potassium can be observed (39). Therefore, it is possible that the Casparian strip contributes to the control of PM-associated apoplastic pH in plants.

Surprisingly, even the peripheral cell layers that are in direct contact with the medium appeared to “resist” against pH variation within the medium. These observations suggest the potential existence of strong compensatory mechanisms that appear more efficient in complete medium (Fig. S13H). The two major P-type ATPases in *Arabidopsis* roots, AHA1 and AHA2, are known to participate in media acidification and are necessary for plant growth in alkaline conditions (40–43). Interestingly, AHA2 activity is regulated by PKS5 kinase, which is in turn regulated by apoplastic pH (44). One *in vitro* study has elegantly demonstrated that a PM delta pH value higher than 2 acts directly on AHA2 activity via allosteric regulation (45). This illustrates the tight link between apoplastic pH and the activity of P-type ATPase, and might explain why in our *in vivo* measurement the PM delta pH saturates at 2 pH units. We could not exclude that the channel and transporter, in addition to the P-type ATPase regulation, participate in pH homeostasis. To test this hypothesis, we modified the anion species, but this resulted in little effect, suggesting that chloride, nitrate, or sulfate alone cannot restore the apoplastic pH robustness observed in complete medium. We also examined the role of calcium and determined that it acts on the radial difference of $\text{pH}_{\text{PM-Apo}}$ between the two sides of the endodermal cell layer. Cell wall appears to be the biggest pool of calcium ion in plant tissues (46), with a several-millimolar concentration in horse bean and yellow lupine root (18) and 6 mM in soybean roots (47). Calcium is known as a crucial regulator of growth and development in plants (48). Modification of cell wall extensibility and cell growth are essential for the processes leading to shape plants. These modifications in stiffness are in part attributed to Ca^{2+} interaction with pectate, more precisely to the free carboxyl groups that are present in pectin, a major component of primary cell wall (49, 50). Thus, calcium depletion could free up the cell wall acidic group and modify the cell wall cation exchange capacity or buffering effect of pectin. Interestingly, radial heterogeneity of calcium association with the cell wall has been described in *Brachypodium* roots (51).

The strong homeostatic behavior of root cell apoplastic pH at the membrane interface is paralleled by the conservation of the delta pH formed through the PM. In MS/2 medium, we found that the PM delta pH gradually increases from the outer cell layer to the stele (from 1 to almost 2 pH units). Numerous transport and channel activities are regulated by PM delta pH. Nitrate transporter 1/peptide transporter family (NPF) proteins like NPF6.3 or NPF2.7 that are expressed in root outer layers are functional in heterologous systems when the PM delta pH is close to 1 pH unit (31, 52, 53). By contrast, NPF7.2 or NPF4.6, which are found in the root inner tissue, require a higher PM delta pH (close to 2 pH units) to generate a substantial transport activity (54–56). The expression pattern of these NPF genes is in agreement with our *in vivo* observed PM delta pH, in which the outer layers of the root have smaller PM delta pH values than those in the stele. In the case of potassium channels, their regulation by pH at the PM is also well documented (57). For example, the stelar K^+ outward rectifier channel SKOR that is involved in potassium release into the xylem sap toward the shoot (58) is modulated both by inner and outer pH levels at the PM (59). Interestingly, with pH 7.7 in the cytosol and pH 6 in the apoplast in the stele (Fig. 2C), SKOR should only be at 50% of its optimal activity, suggesting a full potential to regulate potassium secretion into xylem via pH. The inwardly rectifying potassium channel AKT1 (60) is functional in

Sf9 with a PM delta pH of 1 unit (61) and is expressed in the root epidermis and cortex (62). It is therefore functional in the most external cell layers where PM delta pH values are the lowest, which agrees with the attributed function of AKT1 as the main channel for potassium uptake from the soil by roots in high potassium concentration (63).

Apoplastic pH Close to the PM Is More Alkaline than in the Overall Apoplastic Space. To date, apoplastic pH in plants has primarily been investigated using either electrodes or fluorescent ratio-metric components that diffuse into the apoplast. Although these methods allow the rapid measurement of pH, they are limited by the accessibility of the internal cell layers. Even small fluorescent molecules cannot pass through the Casparian strip, leaving the central cell layers inaccessible. This limitation was potentially surmounted by generating genetically encoded pH sensors that can accumulate in the apoplast via secretion. However, such sensors can diffuse out of the tissue and can also accumulate in the ER, which complicates apoplastic pH measurements, especially in turgid cells such as mature root cells (15, 16). We resolved these problems by anchoring pHluorin to the PM with a transmembrane domain and executing repetitive imaging of all root cell layers up to the central cylinder in *Arabidopsis*. The $\text{pH}_{\text{apo-PM}}$ values that were obtained with our PM-anchored sensor in mature roots grown in rich medium ranged from 6.0 to 6.3, depending on the cell type. This range is close to the value found using a secreted At-pHluorin (pH 6.3) in the lateral roots of 1- to 4-wk-old *Arabidopsis* plants (15, 16). This is in contrast to the more acidic cell wall measurements obtained from roots perfused with small fluorescent probes, with pH levels detected between 4 and 5.7 in mature roots (this work) and ranging from pH 4.2 to 5.3 in *Arabidopsis* root cells, from pH 5 to 6 in maize, or close to pH 5.2 in lupine tap roots (64, 65). Altogether, these results indicate the existence of a complex apoplastic environment, with a potential unstirred layer in the vicinity of the PM where pH is more alkaline than in the entire apoplastic liquid and with an acidic Donnan space associated with the cell wall. This raises the question of how such a gradient can be maintained, since the source of apoplast acidity should come from the activity of P-type ATPase localized at the PM (40). One possible explanation for this paradoxical situation is that the net proton extrusion recorded in Fig. S6 B and C is not coming from the root zone observed in our experiment. Indeed, it is generally accepted that the *Arabidopsis* root tip is acidic and therefore could alone be responsible for the medium acidification. If true, this would suggest that in fully differentiated tissue of *Arabidopsis*, a net influx of protons is taking place (66). It would be of great interest to further study this complex apoplastic environment, including in regions more than a few nanometers from the lipid bilayer, although this would require sensors that are not quenched below pH 5. The ability of these PM-associated sensors to monitor pH variation independent of membrane potential changes and within minutes after treatment also provides a great tool for the future study of pH on either side of the PM in potentially all cell types (including those not directly accessible), including using caged protons (67).

Materials and Methods

A full discussion of the materials and methods can be found in *SI Materials and Methods*.

Arabidopsis plants expressing PM-Apo and PM-Cyto were grown for 5 to 6 d in MS/2 medium supplemented with 2.5 mM MES-KOH (pH 6), 1% sucrose, and 0.8% agar type E. Before microscopy observations, plantlets were transferred to treatment plates for 24 h. Samples in the mature part of root were illuminated sequentially at 476 and 496 nm with a confocal microscope and a z stack was generated where indicated. Fluorescence ratios were obtained and were converted into pH values using a calibration curve generated *in situ* with a recombinant pHluorin produced in *Escherichia coli* (15, 23, 68, 69).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Yvon Jaillais for the 8K Farn construct, Gabriel Krouk for his help on statistical analysis, and the Montpellier Ressources Imagerie and the Histocytology and Plant Cell Imaging Platform

for providing the microscope facility. This work was funded by the Rhizopolis project from the Agropolis Foundation and the SweetKaliGrape project from the French National Research Agency.

- Beyenbach KW (2016) The plasticity of extracellular fluid homeostasis in insects. *J Exp Biol* 219:2596–2607.
- Cannon WB (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9:399–431.
- Takei Y (2000) Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. *Jpn J Physiol* 50:171–186.
- Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP (1979) Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* 205:1144–1147.
- Kramer EM, Frazer NL, Baskin TI (2007) Measurement of diffusion within the cell wall in living roots of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 58:3005–3015.
- Barberon M, Geldner N (2014) Radial transport of nutrients: The plant root as a polarized epithelium. *Plant Physiol* 166:528–537.
- Nawrath C, et al. (2013) Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Book* 11:e0167.
- Alasimone J, Roppolo D, Geldner N, Vermeer JEM (2012) The endodermis—Development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249:433–443.
- Nelson N (1994) Energizing porters by proton-motive force. *J Exp Biol* 196:7–13.
- Barbez E, Dünsen K, Gaidora A, Lendl T, Busch W (2017) Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E4884–E4893.
- Staal M, et al. (2011) Apoplastic alkalization is instrumental for the inhibition of cell elongation in the *Arabidopsis* root by the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Plant Physiol* 155:2049–2055.
- Bibikova TN, Jacob T, Dahse I, Gilroy S (1998) Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125:2925–2934.
- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S (2009) Ca²⁺ regulates reactive oxygen species production and pH during mechanosensing in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 21:2341–2356.
- Monshausen GB, Miller ND, Murphy AS, Gilroy S (2011) Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis. *Plant J* 65:309–318.
- Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C (2004) Self-reporting *Arabidopsis* expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol* 134:898–908.
- Gjetting KS, Ytting CK, Schulz A, Fuglsang AT (2012) Live imaging of intra- and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *J Exp Bot* 63:3207–3218.
- Meychik NR, Yermakov IP (2001) Ion exchange properties of plant root cell walls. *Plant Soil* 234:181–193.
- Sentenac H, Grignon C (1981) A model for predicting ionic equilibrium concentrations in cell walls. *Plant Physiol* 68:415–419.
- Sentenac H, Grignon C (1987) Effect of H excretion on the surface pH of corn root cells evaluated by using weak acid influx as a pH probe. *Plant Physiol* 84:1367–1372.
- López-Arredondo DL, Leyva-González MA, Alatorre-Cobos F, Herrera-Estrella L (2013) Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *Int J Dev Biol* 57:595–610.
- Singh A, Agrawal M (2008) Acid rain and its ecological consequences. *J Environ Biol* 29:15–24.
- Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE (1998) Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394:192–195.
- Martinière A, et al. (2013) In vivo intracellular pH measurements in tobacco and *Arabidopsis* reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell* 25:4028–4043.
- Brandizzi F, et al. (2002) The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* 14:1077–1092.
- Simon MLA, et al. (2016) A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat Plants* 2:16089.
- Lorenz H, Hailey DW, Wunder C, Lippincott-Schwartz J (2006) The fluorescence protease protection (FPP) assay to determine protein localization and membrane topology. *Nat Protoc* 1:276–279.
- Gujas B, Alonso-Blanco C, Hardtke CS (2012) Natural *Arabidopsis* brx loss-of-function alleles confer root adaptation to acidic soil. *Curr Biol* 22:1962–1968.
- Peters WS, Felle HH (1999) The correlation of profiles of surface pH and elongation growth in maize roots. *Plant Physiol* 121:905–912.
- Monshausen GB, Zieschang HE, Sievers A (1996) Differential proton secretion in the apical elongation zone caused by gravistimulation is induced by a signal from the root cap. *Plant Cell Environ* 19:1408–1414.
- Zieschang HE, Köhler K, Sievers A (1993) Changing proton concentrations at the surfaces of gravistimulated phleum roots. *Planta* 190:546–554.
- Segonzac C, et al. (2007) Nitrate efflux at the root plasma membrane: Identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *Plant Cell* 19:3760–3777.
- Konrad KR, Hedrich R (2008) The use of voltage-sensitive dyes to monitor signal-induced changes in membrane potential-ABA triggered membrane depolarization in guard cells. *Plant J* 55:161–173.
- Dejonghe W, et al. (2016) Mitochondrial uncouplers inhibit clathrin-mediated endocytosis largely through cytoplasmic acidification. *Nat Commun* 7:11710.
- Geilfus C-MMS, Mühling KH (2011) Real-time imaging of leaf apoplastic pH dynamics in response to NaCl stress. *Front Plant Sci* 2:13.
- Keltjens WG (1981) Absorption and transport of nutrient cations and anions in maize roots. *Plant Soil* 63:39–46.
- Hawkesford MJ (2011) Sulfate transport. *The Plant Plasma Membrane*, eds Murphy A, Schulz B, Peer W, Plant Cell Monographs (Springer, Berlin), Vo. 19, pp 291–301.
- Meharg AA, Blatt MR (1995) NO₃⁻ transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: Kinetic control by pH and membrane voltage. *J Membr Biol* 145:49–66.
- Barbier-Brygøo H, et al. (2011) Anion channels/transporters in plants: From molecular bases to regulatory networks. *Annu Rev Plant Biol* 62:25–51.
- Pfister A, et al. (2014) A receptor-like kinase mutant with absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife* 3:e03115.
- Falhof J, Pedersen JT, Fuglsang AT, Palmgren M (2016) Plasma membrane H⁺-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Mol Plant* 9:323–337.
- Haruta M, et al. (2010) Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *J Biol Chem* 285:17918–17929.
- Haruta M, Sussman MR (2012) The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 158:1158–1171.
- Haruta M, Tan LX, Bushey DB, Swanson SJ, Sussman MR (2018) Environmental and genetic factors regulating localization of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* 176:364–377.
- Fuglsang AT, et al. (2007) *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell* 19:1617–1634.
- Veshaguri S, et al. (2016) Direct observation of proton pumping by a eukaryotic P-type ATPase. *Science* 351:1469–1473.
- Demarty M, Morvan C, Thellier M (1984) Calcium and the cell wall. *Plant Cell Amp Environ* 7:441–448.
- Hayatsu M, Suzuki S (2015) Electron probe X-ray microanalysis studies on the distribution change of intra- and extracellular calcium in the elongation zone of horizontally reoriented soybean roots. *Microscopy (Oxf)* 64:327–334.
- Hepler PK (2005) Calcium: A central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* 17:2142–2155.
- Cosgrove DJ (2016) Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000 Res* 5:F1000 Faculty Rev-119.
- Hocq L, Pelloux J, Lefebvre V (2017) Connecting homogalacturonan-type pectin remodeling to acid growth. *Trends Plant Sci* 22:20–29.
- Pacheco-Villalobos D, et al. (2016) The effects of high steady state auxin levels on root cell elongation in *Brachypodium*. *Plant Cell* 28:1009–1024.
- Parker JL, Newstead S (2014) Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507:68–72.
- Noguero M, Lacombe B (2016) Transporters involved in root nitrate uptake and sensing by *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 7:1391.
- Li J-Y, et al. (2010) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. *Plant Cell* 22:1633–1646.
- Huang N-C, Liu K-H, Lo H-J, Tsay Y-F (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11:1381–1392.
- Kanno Y, et al. (2012) Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:9653–9658.
- Maathuis FJM, Sanders D (1996) Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant* 96:158–168.
- Gaynard F, et al. (1998) Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell* 94:647–655.
- Lacombe B, Pilot G, Gaynard F, Sentenac H, Thibaud J-B (2000) pH control of the plant outwardly-rectifying potassium channel SKOR. *FEBS Lett* 466:351–354.
- Sentenac H, et al. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256:663–665.
- Gaynard F, et al. (1996) The baculovirus/insect cell system as an alternative to *Xenopus* oocytes. First characterization of the AKT1 K⁺ channel from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 271:22863–22870.
- Lagarde D, et al. (1996) Tissue-specific expression of *Arabidopsis* AKT1 gene is consistent with a role in K⁺ nutrition. *Plant J* 9:195–203.
- Nieves-Cordones M, Alemán F, Martínez V, Rubio F (2014) K⁺ uptake in plant roots. The systems involved, their regulation and parallels in other organisms. *J Plant Physiol* 171:688–695.
- Kosegarten H, Grolig F, Esch A, Glösenkamp K-H, Mengel K (1999) Effects of NH₄⁺, NO₃⁻ and HCO₃⁻ on apoplast pH in the outer cortex of root zones of maize, as measured by the fluorescence ratio of fluorescein boronic acid. *Planta* 209:444–452.
- Yu Q, Kuo J, Tang C (2001) Using confocal laser scanning microscopy to measure apoplastic pH change in roots of *Lupinus angustifolius* L. in response to high pH. *Ann Bot* 87:47–52.
- Serowy S, et al. (2003) Structural proton diffusion along lipid bilayers. *Biophys J* 84:1031–1037.
- Fasano JM, et al. (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 13:907–921.
- Poitout A, et al. (2017) Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *J Exp Bot* 68:1199–1211.
- Schulte A, Lorenzen I, Böttcher M, Plieth C (2006) A novel fluorescent pH probe for expression in plants. *Plant Methods* 2:7.

Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion

Alexandre Martinière,^{a,1,2} Jean Bernard Fiche,^{b,1} Marija Smokvarska,^a Stéphane Mari,^a Carine Alcon,^a Xavier Dumont,^a Kian Hematy,^c Yvon Jaillais,^d Marcelo Nollmann,^b and Christophe Maurel^{a,3}

^aBPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRA, Montpellier SupAgro, 34090 Montpellier, France

^bCentre de Biochimie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5048, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1054, Université de Montpellier, 34090 Montpellier, France

^cInstitut Jean-Pierre Bourgin, Institut National de la Recherche Agronomique, AgroParisTech, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris-Saclay, 78026 Versailles, France

^dLaboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Université Lyon, École Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, F-69342 Lyon, France

ORCID IDs: 0000-0003-0663-6854 (A.M.); 0000-0002-3933-3852 (K.H.); 0000-0003-4923-883X (Y.J.); 0000-0002-4255-6440 (C.M.).

Physiological acclimation of plants to an everchanging environment is governed by complex combinatorial signaling networks that perceive and transduce various abiotic and biotic stimuli. Reactive oxygen species (ROS) serve as one of the second messengers in plant responses to hyperosmotic stress. The molecular bases of ROS production and the primary cellular processes that they target were investigated in the *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) root. Combined pharmacological and genetic approaches showed that the RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (RBOH) pathway and an additional pathway involving apoplastic ascorbate and iron can account for ROS production upon hyperosmotic stimulation. The two pathways determine synergistically the rate of membrane internalization, within minutes after activation. Live superresolution microscopy revealed at single-molecule scale how ROS control specific diffusion and nano-organization of membrane cargo proteins. In particular, ROS generated by RBOHs initiated clustering of the PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN2;1 aquaporin and its removal from the plasma membrane. This process is contributed to by clathrin-mediated endocytosis, with a positive role of RBOH-dependent ROS, specifically under hyperosmotic stress.

Terrestrial plants can experience dramatic changes in water availability when exposed to environmental challenges as diverse as drought, soil salinity, and fluctuations in air humidity or even temperature. To maintain their water status and acclimate to these environmental constraints, plants have evolved numerous physiological or developmental responses, including short-term regulation of stomatal aperture and tissue hydraulics and, on a longer term, alteration of root system architecture and leaf abscission. Despite their central role, the early cellular events that lead to these adaptive responses are largely unknown.

A few molecules and mechanisms that contribute, at least partially, to osmotic stress perception have emerged from recent studies. As first described in bacteria and now in plants, osmotic shocks result in mechanical stimuli that activate a group of nonselective mechanosensitive ion channels and help the cell to counteract excessive membrane tensions (Martinac et al., 1987; Hamilton et al., 2015). In addition, the transmembrane His kinase ATHK1 was suggested to act as an osmosensor, similar to its yeast homolog (Urao et al., 1999). Finally, a direct genetic screen identified cations channels of the Reduced Hyperosmolality, Induced Ca²⁺ Increase 1/Calcium Permeable Stress-Gated Cation Channel1 gene family as mediating calcium influx during hyperosmotic stress (Hou et al., 2014; Yuan et al., 2014). Loss-of-function mutant plants showed a reduced stomata closure and altered root growth responses in stress conditions (Yuan et al., 2014).

Several types of second messengers are possibly involved, downstream of osmotic signal perception. For instance, a substantial apoplastic alkalization occurs concomitant to calcium influx in the first minutes after exposure of roots to salt (Gao et al., 2004; Guo et al., 2009;

¹These authors contributed equally to this article.

²Author for contact: alexandre.martiniere@cnrs.fr.

³Senior author.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Alexandre Martinière (alexandre.martiniere@cnrs.fr).

A.M., M.S., C.A., X.D., K.H., and Y.J. performed research; J.B.F. and M.N. developed new analytic and computational tools; A.M. and S.M. designed research; A.M. and C.M. wrote the paper.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.18.01065

Choi et al., 2014; Stephan et al., 2016). Reactive oxygen species (ROS), which accumulate in the frame of tens of minutes after osmotic stress, also represent key second messengers during hyperosmotic signaling (Leshem et al., 2007). ROS signaling mediated by NADPH oxidases of the RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG (RBOH) family are generally accepted as the dominant pathway in plants (Baxter et al., 2014; Mittler, 2017). By using the cytoplasmic pool of NADPH, these enzymes catalyze the production of apoplastic superoxide, which is further transformed into hydrogen peroxide by spontaneous dismutation or superoxide dismutase activities (Fig. 1A). Loss-of-function plants for *RBOHD* or *RBOHF* showed a reduced ROS accumulation in response to numerous environmental stimuli, including salt stress (Leshem et al., 2007). In addition, *rbohD* or *rbohF* mutant plants displayed reduced proline accumulation in response to a long hyperosmotic treatment (Ben Rejeb et al., 2015). Thus, RBOHD or RBOHF represent good candidates for ROS production under osmotic stress

Osmotic stress exerts strong and rapid effects on cell membrane dynamics. Whereas membrane proteins should freely diffuse in the plane of the membrane due to thermal motion, a lot of plant plasma membrane (PM) proteins are essentially immobile (Martinière et al., 2012). This suggests an anchoring of these proteins to fix them in place. Within minutes after an osmotic or salt treatment, PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN2;1 (PIP2;1) was found to start diffusing within the PM (Li et al., 2011; Hosy et al., 2015). High salt and sorbitol concentrations also enhance exchanges between the PM and endosomes within the same time frame. In particular, a strong bulk membrane internalization was revealed by N-(3-triethylammoniumpropyl)-4(6-[4-(diethylamino)phenyl]hexatrienyl)pyridinium dibromide (FM4-64) uptake (Leshem et al., 2007; Zwiewka et al., 2015). In addition, all cargo proteins tested so far, among which are the PIP2;1 aquaporin, PIN-FORMED2 auxin transporter, and BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 brassinosteroid receptor, are depleted from the PM (Li et al., 2011; Zwiewka et al., 2015). Thus, osmotically induced bulk membrane internalization is thought to

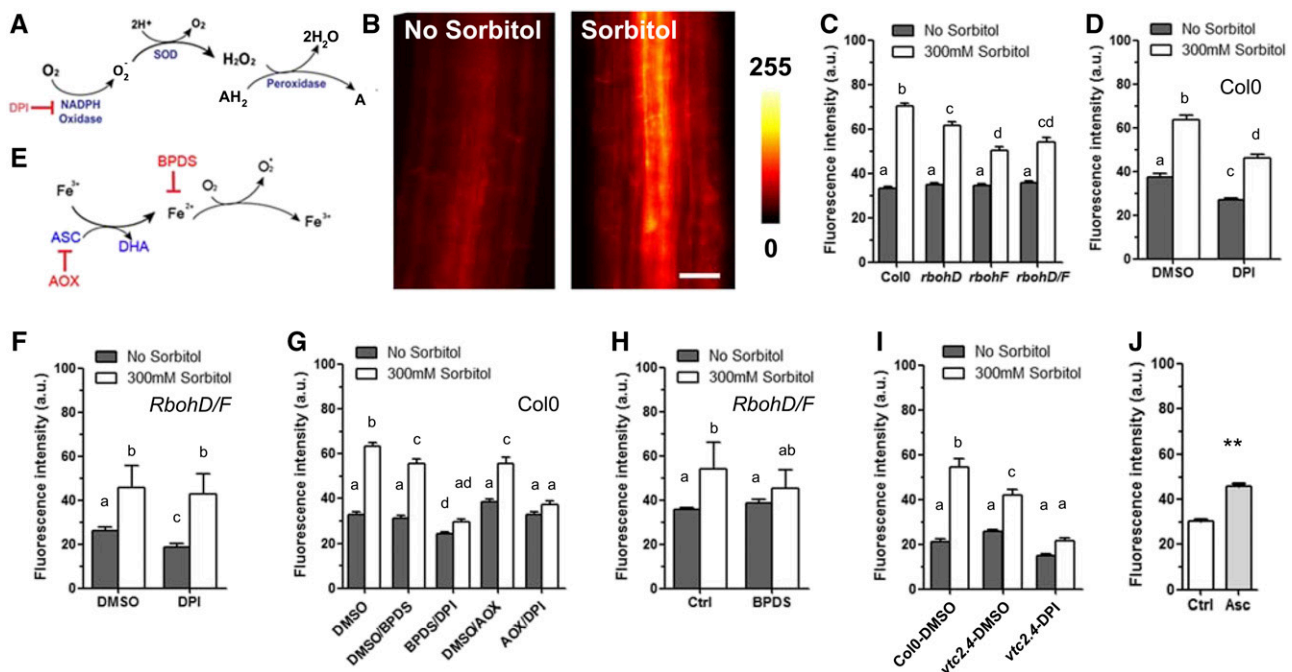


Figure 1. ROS accumulation in root cells after a sorbitol treatment. A, Schematic representation of ROS production as mediated by NADPH oxidases. B, ROS imaging using DHE fluorescence. Roots were incubated for 15 min with 5 μ M DHE in the presence or absence of 300 mM sorbitol and subsequently observed under an epifluorescence microscope. The figure shows the red fluorescent signal induced upon oxidation of DHE. C, Quantification of DHE fluorescence in Col-0, *rbohD*, *rbohF*, and *rbohD/F* plants subjected or not to the sorbitol treatment. Effects on DHE fluorescence of a 30-min pretreatment, with either dimethyl sulfoxide (DMSO) or DPI, before incubation for 15 min with 5 μ M DHE followed by a mock (no sorbitol) or 300 mM sorbitol treatment on Col-0 (D) or *rbohD/F* (F) plants. E, Schematic representation of ROS production by the putative Asc/Fe pathway. G, Effects on DHE fluorescence of a 30-min pretreatment with BPDS (Fe²⁺ chelation) or AOX (ascorbate depletion), alone or in combination with DPI (RBOH inhibition). H, Effect of a 30-min pretreatment with BPDS on DHE fluorescence in the *rbohD/F* double mutant. I, Averaged DHE fluorescence intensity in Col-0 or *vtc2.4* roots incubated for 15 min in the presence or absence of sorbitol. Dimethyl sulfoxide represents a mock condition for comparison to a DPI pretreatment. J, Averaged DHE fluorescence intensity in control plants or plants treated with 100 μ M Asc for 15 min. Histograms show mean values \pm SE ($n = 38$ –211 cells). Different letters indicate statistically different values of analyses of variance. Scale bars = 20 μ m.

drive the removal of cargo proteins from the PM. Wudick et al. (2015) recently demonstrated that external application of hydrogen peroxide on root cells enhances PIP2;1 lateral diffusion and endocytosis, thereby mimicking the effects of a salt or hyperosmotic treatment (Wudick et al., 2015). A link between membrane dynamics and ROS signaling has also been demonstrated upon cryptogenin elicitation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY2 cells. Cryptogenin induced clathrin-dependent endocytosis, and cells silenced for *NtRboh* had less clathrin foci at the PM than control ones (Leborgne-Castel et al., 2008). The exact mechanisms by which ROS act on membrane and cargo protein dynamics are not yet known.

In this work, we used *Arabidopsis thaliana* roots to investigate early cell responses to osmotic stress. We focused on the molecular mechanisms of stress-induced production of ROS and their subsequent impact on PM dynamics. We identified, besides RBOH family members, another source of ROS involving ascorbate (Asc) and iron (Fe). Whereas ROS play a general role in bulk endocytosis, we report on the behavior of individual membrane protein molecules and show that PIP2;1 nanodomain organization and endocytosis are strictly under the control of RBOH-dependent ROS. Superresolution microscopy was used to further investigate the role of the clathrin machinery in these specific membrane dynamic responses.

RESULTS

RBOHs Contribute Only Partially to Osmotically Induced ROS Production

Production in plant tissues of ROS, and superoxide (O_2^-) in particular, can be monitored through oxidation and enhanced fluorescence of dihydroethidium (DHE) dye (Fig. 1B; Tsukagoshi et al., 2010; Chen et al., 2013). A steady increase in fluorescence for up to 120 min was observed in 5-d-old plantlets incubated in the presence of DHE (Supplemental Fig. S1). When plantlets were concomitantly treated with 300 mM sorbitol, the rate of DHE fluorescence increase was enhanced 2-fold (Supplemental Fig. S1), within all cell types (Fig. 1B). Hydroxyphenyl fluorescein (HPF), another ROS-sensitive dye that is mostly reactive with hydroxyl radicals (Tsukagoshi et al., 2010), revealed an essentially similar osmotic-stress-induced staining pattern (Supplemental Fig. S2A). These observations conform to the idea that osmotic stress rapidly (i.e. within minutes) induces an overaccumulation of ROS in *Arabidopsis* roots.

Because the role of RBOH proteins was never formally tested in the context of osmotic stress, we used single (*rbohD* and *rbohF*) and double (*rbohD/F*) loss-of-function mutants. With respect to Col-0 plants, ROS accumulation in these genotypes was not altered in resting conditions. In contrast, the ROS response to sorbitol was partially reduced in each of the single mutants, with no further decrease in the *rbohD/F* double

mutant (Fig. 1C). The residual response of the latter plants suggested that other RBOH isoforms may be involved. Therefore, we used diphenylene iodonium (DPI), which inhibits all RBOHs by interacting with their FAD binding domain. In these experiments, plants were pretreated for 30 min with the inhibitor before staining with DHE for 15 min (Supplemental Fig. S3). DPI slightly reduced ROS accumulation in Col-0 roots under resting conditions and partially inhibited the sorbitol-induced ROS response (compare Fig. 1, C and D). In contrast, the ROS response to sorbitol was fully insensitive to DPI in the *rbohF/D* double mutant (Fig. 1F). These results show that RBOHD and RBOHF both contribute to osmotically induced ROS accumulation, though in a nonadditive manner. The data also show that an additional pathway, independent of RBOH, contributes to the osmotically induced ROS response.

Osmotically Induced ROS Production Also Involves Reduced Transition Metals

O_2^- can also be produced, independently of NADPH oxidases, by a Haber-Weiss reaction whereby reduced transition metals transfer one electron to dioxygen (Fig. 1E). To investigate the contribution of this mechanism to ROS accumulation under osmotic stress, we treated plants with bathophenanthrolinedisulfonic acid (BPDS), a membrane-impermeant Fe^{2+} chelator that depletes free Fe^{2+} in the cell apoplast. Whereas BPDS had no effect on DHE fluorescence in control conditions, it induced a significant reduction of ROS accumulation upon sorbitol treatment (Fig. 1G).

Concomitant treatment of plants with DPI and BPDS resulted in a slight decrease in ROS accumulation in resting conditions and totally abolished the sorbitol effects (Fig. 1G). When treated with BPDS, the *rbohD/F* double mutant also lost its sorbitol-induced ROS accumulation (Fig. 1H). When HPF staining was used, a single pretreatment with DPI or BPDS totally inhibited the sorbitol-induced ROS response (Supplemental Fig. S2B). These slight differences in response between DHE and HPF staining are likely due to their distinct sensitivity to the various ROS species (Tsukagoshi et al., 2010). Nevertheless, the overall data indicate that two ROS production pathways, mediated by RBOH and reduced Fe, respectively, contribute to most of, if not all, the overaccumulation of ROS in *Arabidopsis* roots under osmotic stress.

A Role of Apoplastic Asc in ROS Accumulation

Because reduced Fe is considered to be almost absent in cells due to its very high toxicity, an Fe reduction mechanism must be active during osmotic stress. We hypothesized that Asc could represent an alternative reducing agent (Grillet et al., 2014). Treatment of roots with purified ascorbate oxidase (AOX) did not alter DHE staining in resting conditions, whereas it reduced

the sorbitol-induced response by ~20% (Fig. 1G). When AOX was coincubated with DPI, the residual sorbitol-induced ROS accumulation was totally abolished (Fig. 1G). These results suggest that, complementary to RBOHs, Asc is necessary to trigger ROS accumulation, probably in association with Fe. To investigate this point further, we used a *vtc2.4* mutant that, with respect to Col-0, shows a reduction in Asc accumulation by two-thirds, without any major growth defect in standard condition (Grillet et al., 2014). Compared to Col-0, *vtc2.4* accumulated less ROS after osmotic stimulation; this response did not occur when plants were cotreated with DPI (Fig. 1I). To confirm the limiting role of Asc in ROS accumulation, we applied 100 μ M Asc onto roots and found a significant increase of ROS accumulation after 15 min (Fig. 1J).

The results presented above were obtained after treatment with 300 mM sorbitol, which induces cell incipient plasmolysis (Supplemental Fig. S4A). Under milder stress conditions (100 mM sorbitol), cells experience a reduction in turgor with no major change in volume (Supplemental Fig. S4A). Yet, this sorbitol treatment induced a ROS accumulation, of lower amplitude than with 300 mM, but with an essentially similar pharmacological inhibition profile. In particular, cotreatments with DPI and BPDS or DPI and AOX fully inhibited the osmotic response (Supplemental Fig. S4B). These results indicate that the RBOH and Fe/Asc pathways can be activated under a wide range of mild to pronounced osmotic stresses.

Due to their PM localization, RBOHD and RBOHF are expected to produce superoxide in the apoplast. In addition, exogenously supplied AOX, which is marginally permeable to cell membranes, inhibited ROS accumulation (Fig. 1G). Thus, the pool of Asc that contributes to osmotically induced ROS accumulation also seems to be localized in the apoplast. To assess ROS accumulation in this compartment, we investigated DHE staining with confocal microscopy. In control conditions, oxidized DHE was localized in small dotted structures (Supplemental Fig. S5, arrowheads) and in the nucleus (star). When cells were incubated with 300 mM sorbitol for 15 min, some staining was observed in the apoplast (Supplemental Fig. S5, arrows). These observations suggest that at least a part of the ROS accumulation triggered by osmotic stress takes place in this compartment.

The RBOH and Fe/Asc Pathways both Contribute To Activation of Membrane Internalization, But with Distinct Impacts on Cargo Proteins

Plant cells react to osmotic stress by modifying the rate of endocytosis. To investigate this process, we cotreated plants with the lipophilic fluorescent endocytic tracer FM4-64 and the fungal toxin Brefeldin A and quantified the number of FM4-64-labeled BFA bodies per cell (Geldner et al., 2003). As expected, an increase in FM4-64 labeling of intracellular structures

was observed in osmotically challenged plants (Fig. 2, A and B). In Col-0 plants treated with DPI or *rbohD/F* plants, intracellular labeling responses similar to those of Col-0 were observed under both control and sorbitol treatment conditions (Fig. 2, B and C). By comparison, Col-0 plants treated with BPDS showed a small decrease in osmotically induced FM4-64 labeling (Fig. 2B). Moreover, a full inhibition of this response was observed when a BPDS treatment was coupled to pharmacological (Fig. 2, A and B) or genetic (Fig. 2C) ablation of RBOH, using DPI or a *rbohD/F* genotype, respectively. Cell viability was checked after the experiment with fluorescein diacetate, with no visible effect of the inhibitors (Widholm, 1972; Supplemental Fig. S6). When the FM4-64 endocytotic index from our whole set of measurements (Fig. 2, B and C) was plotted against corresponding DHE signals, a significant correlation was found ($R^2 = 0.71$; Fig. 2D). These results support the idea that ROS activate endocytosis (Leshem et al., 2007; Wudick et al., 2015). More specifically, they indicate that ROS, produced by both the RBOH and the Asc/Fe pathways, quantitatively contribute to the enhancement of cell endocytosis under osmotic stress.

While FM4-64 labeling reports on bulk membrane lipid internalization, we wondered whether cargo proteins follow the same route. We first investigated the P-type H⁺-ATPase, PLASMA MEMBRANE PROTON ATPASE2, as one of most abundant PM proteins (Gaxiola et al., 2007). For this, we used plants expressing a pro35S:GFP-AHA2 construct and counted the average number of GFP-labeled BFA compartments per cell as a proxy of AHA2 internalization. Surprisingly, this number was not enhanced but rather slightly decreased by a sorbitol treatment (Fig. 2, E and F). In agreement with previous observations in plants treated with salt or hydrogen peroxide (Li et al., 2011; Luu et al., 2012), root cells expressing a proPIP2;1:PIP2;1-GFP construct showed a higher number of GFP-labeled BFA bodies after a sorbitol treatment (Fig. 2, G and H). It was previously demonstrated that this is due to a higher endocytosis rate (Zwiewka et al., 2015). Interestingly, a DPI treatment fully suppressed the effect of osmotic stress on BFA body formation, while BPDS had no effects (Fig. 2H). Thus, osmotic stress results in the selective endocytosis of certain cargos, which, in the case of PIP2;1, is fully dependent on RBOH-induced ROS accumulation.

Lateral Diffusion of PIP2;1 and AHA2 Is Enhanced by Osmotic Stress But Negatively Controlled by ROS

Major changes in the mobility and distribution of PM proteins are thought to underlie their endocytosis. For instance, a hyperosmotic treatment can induce a substantial increase in PIP2;1 diffusion (Li et al., 2011; Hosity et al., 2015). Here, we wondered whether this process is under the control of ROS signaling, as suggested by previous experiments using hydrogen peroxide treatments (Wudick et al., 2015). A superresolution microscopy

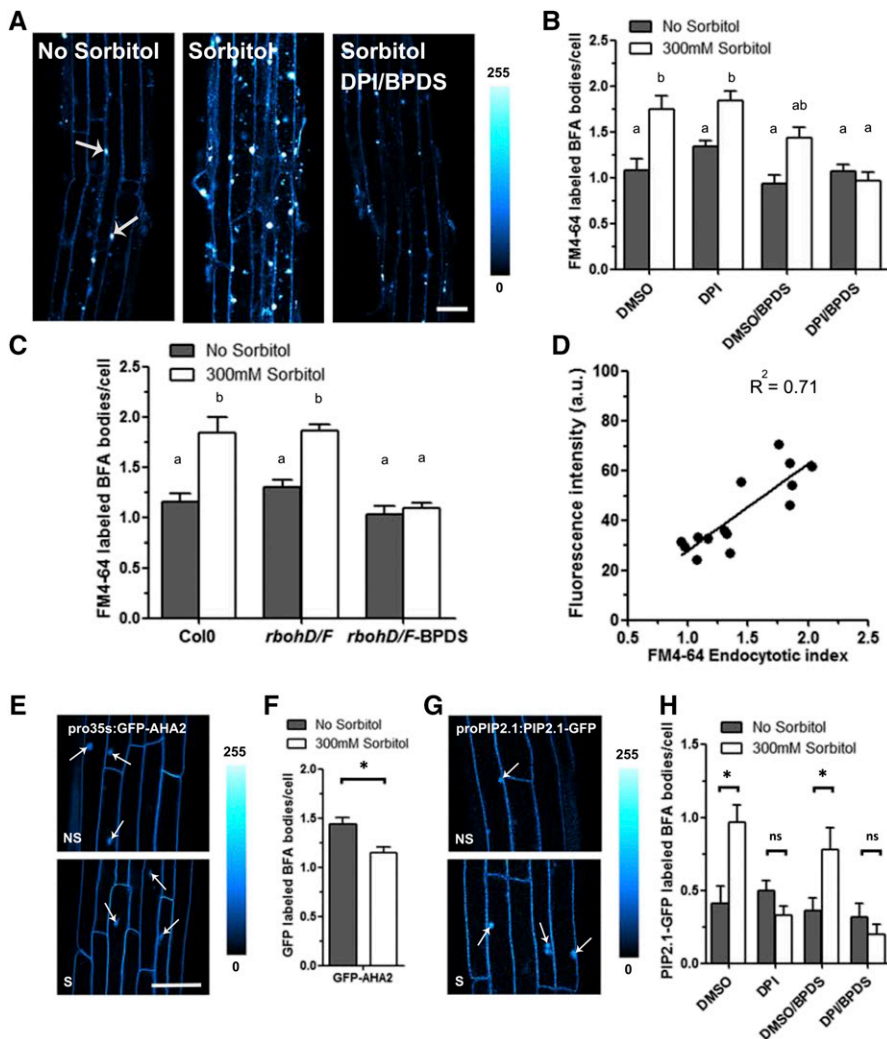


Figure 2. Effects of hyperosmotic sorbitol treatment on bulk membrane and protein cargo internalization. A, Roots were pre-treated with FM4-64 for 7 min followed by BFA for 1 h in the absence or presence of 300 mM sorbitol. FM4-64-labeled BFA bodies (arrows) indicate cellular bulk endocytosis. BFA bodies are more frequent in sorbitol-treated plants than in untreated plants, or plants cotreated with sorbitol, BPDS, and DPI. B, Average number of FM4-64-labeled BFA bodies per cells in control and sorbitol-treated plants. When indicated, plants were pretreated with BPDS and DPI, alone or in combination. C, Average number of FM4-64-labeled BFA bodies per cell in Col-0, *rbohD/F*, and *rbohD/F*-BPDS plants treated with BPDS. D, Fluorescence intensity values shown in Figure 1, C, D, and F, were plotted against corresponding numbers of FM4-64-labeled BFA bodies per cell. A significant linear correlation ($R^2 = 0.71$) was observed. E and G, Confocal observation of root cells expressing Pro35S:GFP-AHA2 (E) or ProPIP2.1:PIP2.1-GFP (G) after a 45-min BFA treatment in the presence (S) or absence (NS) of sorbitol. Only the ProPIP2.1:PIP2.1-GFP cells show a sorbitol-induced increase in GFP-labeled BFA bodies (arrows). F and H, Average number of GFP-AHA2- (F) or PIP2.1-GFP-labeled (H) BFA bodies per cell under control or sorbitol treatment conditions. For PIP2.1-GFP, the experiments were performed in the absence (Ctrl) or presence of a pretreatment with DPI or BPDS, alone or in combination. Histograms show means values \pm SE ($n = 10-19$). Scale bars = 20 μ m. DMSO = dimethyl sulfoxide.

approach called single-particle-tracking photoactivated localization microscopy (sptPALM) was used to visualize individual PIP2.1-mEOS molecules under total internal reflection fluorescence illumination in living cells (Hosy et al., 2015). In brief, the localization and displacement of several thousands of single molecules were reconstructed and used to assess the protein instantaneous diffusion constant (D) with a spatial resolution of ~ 30 nm and temporal resolution of 20 ms (Fig. 3A). For each reconstructed track, the mean square displacement (MSD) was computed and instantaneous diffusion coefficient was estimated with the help of homemade analysis software. In agreement with previous observations (Hosy et al., 2015), the diffusion of PIP2.1-mEOS within the PM was increased 2-fold after sorbitol treatment ($\log D_{\text{ctrl}} = -2.9$, $\log D_{\text{sorbitol}} = -2.6$, Fig. 3, B and C). While DPI or BPDS had no individual effects on AtPIP2.1-mEOS diffusion, both in the absence or presence of sorbitol, the combination of the two inhibitors markedly enhanced this parameter, specifically after a sorbitol treatment (Fig. 3C). The overall results (Figs. 2H and 3C) suggest an opposite ROS dependency of PIP2.1 diffusion and endocytosis. At variance with PIP2.1 internalization, its diffusion under

osmotic stress was negatively regulated by both the RBOHs and Fe/Asc pathways.

We used a similar sptPALM approach with transgenic lines expressing proUBQ10:mEOS2-AHA2 or proUBQ10:LTI6b-mEOS constructs to monitor diffusion within the PM of AHA2 and LOW TEMPERATURE INDUCED PROTEIN6B (LTI6b), two proteins that are typically immobile or highly mobile, respectively (Fig. 3; Supplemental Fig. S7). No change in diffusion of the already fast-diffusing LTI6b-mEOS molecules was observed after a sorbitol treatment (Supplemental Fig. S7, A and B). In contrast, diffusion of mEOS-AHA2, similar to that of PIP2.1-mEOS, was enhanced in these conditions (Fig. 3, D and E). Diffusion of mEOS-AHA2 was further enhanced by DPI and BPDS treatments, indicating that ROS accumulation generated by RBOHs or by the Fe/Asc-dependent pathway is acting as a negative regulator of mEOS2-AHA2 diffusion in sorbitol-treated plants (Fig. 3F). Overall, the data show that increased diffusion of cargo proteins can be clearly dissociated from their endocytic behavior, questioning their causal relation.

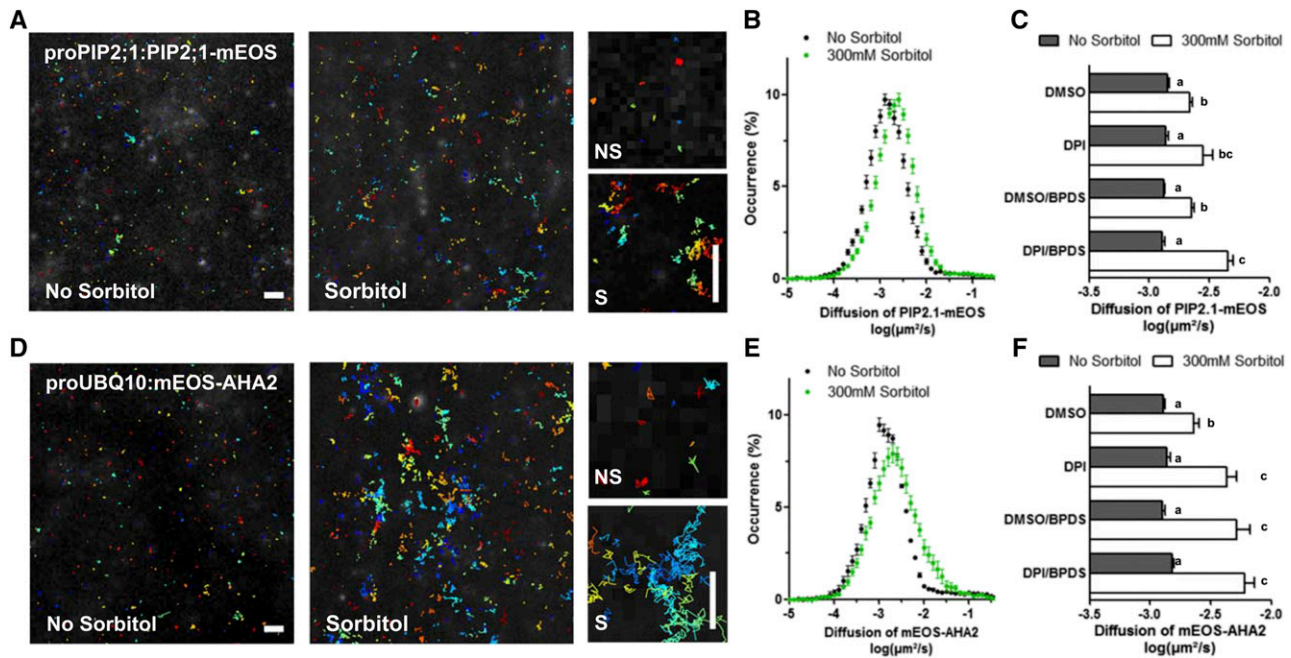


Figure 3. Effects of hyperosmotic sorbitol treatment on lateral diffusion of PIP2;1-mEOS and mEOS-AHA2. A and D, Track reconstructions in plants expressing ProPIP2;1:PIP2;1-mEOS (A) or ProUBQ10:mEOS-AHA2 (D), in the absence or presence of 300 mM sorbitol for 40 min. Each color represents a single molecule position over time. The right shows close-up views of tracks in the presence (S) or absence (NS) of sorbitol. B and E, Distribution of diffusion coefficients of PIP2;1-mEOS (B) and mEOS-AHA2 (E) in log scale. C and F, Mean diffusion coefficient values of PIP2;1-mEOS (C) and mEOS-AHA2 (F), in the absence or presence of sorbitol, and after treatment with the indicated inhibitors (DPI, BPDS, and DPI/BPDS). Histograms show mean values calculated from several thousands of individual tracks with \pm SE ($n = 12-30$). Scale bars = 1 μ m. DMSO = dimethyl sulfoxide.

PIP2;1, But Not AHA2, Shows Enhanced RBOH-Dependent Clustering in Response to Osmotic Stress

Superresolution imaging revealed that, in control conditions, PIP2;1-mEOS displayed a heterogeneous and sparse localization at the PM (Fig. 4A). To test if this spatial organization corresponds to a random distribution or not, movies with a comparable density (3.20 tracks/ μ m²) were generated by simulation (Supplemental Fig. S8A). The presence of clusters was assessed by calculating the local density of each track using a Voronoi tessellation and comparing it to the one obtained in cells expressing PIP2;1-mEOS (Levet et al., 2015; Supplemental Fig. S8, B and C). Whereas randomly generated data yielded a narrow repartition of local densities peaking at 3.5 tracks/ μ m², PIP2;1-mEOS local density distribution was broader (Supplemental Fig. S8, B and C), reflecting the coexistence of sparse to very dense clusters (from 0.3 to 100 tracks/ μ m²). After a sorbitol treatment, PIP2;1-mEOS showed a shift toward higher local densities (Fig. 4B; Supplemental Fig. S8B), which was even appreciable from the super-resolution intensity images (Fig. 4A). These results show that PIP2;1-mEOS molecules have a higher local density in response to a hyperosmotic treatment, but a similar number of PIP2;1-mEOS tracks per cell (Supplemental Fig. S8A). To investigate how this

phenomenon relates to other aspects of PIP2;1 dynamics (e.g. endocytosis and diffusion), we tested its dependency on ROS. Although the basal level of PIP2;1-mEOS clustering was sensitive to DPI, this inhibitor, but not BPDS, was able to prevent the enhancement of PIP2;1-mEOS local density by a hyperosmotic treatment (Fig. 4C). When expressed in a *rbohD* background, which has a similarly impaired ROS production compared to *rbohF* or *rbohD/F* (Fig. 1C), the pPIP:PIP2;1-mEOS construct yielded a reduced particle clustering and, most importantly, had become insensitive to osmotic treatment (Fig. 4D). This inhibition profile matches the one obtained for PIP2;1 endocytosis (Fig. 2H) and strongly suggests a causal chain linking, during osmotic stress, RBOH-dependent ROS accumulation, clustering of PIP2;1, and its eventual endocytosis.

mEOS2-AHA2 was also organized in small particle clusters, sparsely distributed in the PM (Fig. 4E). Voronoi tessellation indicated this clustering to be similar to the one obtained with pPIP:PIP2;1-mEOS-expressing plants (Fig. 4F; Supplemental Fig. S8, B and C). In contrast, the local density of mEOS2-AHA2 was insensitive to a sorbitol treatment (Fig. 4, E and F). LTI6b-mEOS-expressing lines showed a higher local density of fluorescent particles that, however, were also insensitive to a sorbitol treatment (Supplemental Fig. S7C). The data indicate that some cargo proteins, such as PIP2;1, at

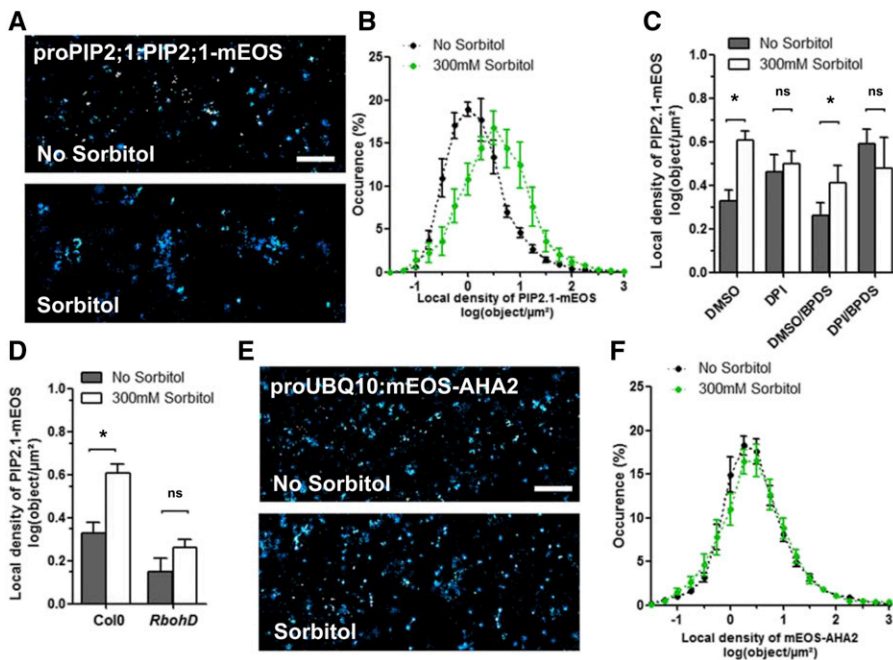


Figure 4. Effects of hyperosmotic sorbitol treatment on local density of PIP2;1-mEOS and mEOS-AHA2. A and E, Superresolution intensity map of PM of plants expressing ProPIP2;1:PIP2;1-mEOS (A) or ProUBQ10:mEOS-AHA2 (E), in the absence or presence of 300 mM sorbitol for 40 min. B and F, Local density distribution of PIP2;1-mEOS (B) or mEOS-AHA2 (F). C, Effects of DPI, BPDS, or their combination on the mean log value of local density of PIP2;1-mEOS, in the absence or presence of sorbitol. D, Effects of sorbitol on the mean log value of the local density of PIP2;1-mEOS in Col-0 or *rbohD* plants. Histograms show mean values calculated from several thousands of individual tracks with \pm SE ($n = 12-30$). Scale bars = 1 μ m. DMSO = dimethyl sulfoxide.

variance with others (AHA2 and LTI6b), are clustered in the PM and endocytosed upon a hyperosmotic treatment.

RbohD Controls CLC2 Diffusion in Response to Osmotic Treatment

Previous reports indicate that part of PIP2;1 constitutive cycling occurs through clathrin-mediated endocytosis (CME; Dhonukshe et al., 2007; Li et al., 2011; Luu et al., 2012; Ueda et al., 2016). For instance, PIP2;1-GFP showed a partial colocalization at the PM with CLATHRIN LIGHT CHAIN2 (CLC2) fused to mCherry (Li et al., 2011). Here, we expressed a pro35S:PIP2;1-GFP construct in proITAM > UAS-HUB1 plants (Dhonukshe et al., 2007). In the presence of tamoxifen (Tam), this line overaccumulates HUB1, a dominant-negative mutant form of CLATHRIN HEAVY CHAIN1, thereby compromising clathrin coat assembly. BFA bodies labeled by GFP-PIP2;1 were rarely observed in Tam-treated plants, whether they were treated or not by sorbitol (Fig. 5A). Thus, PIP2;1-GFP is internalized mostly through CME, in both control and osmotic stress conditions. To estimate how a hyperosmotic treatment acts on CME, we generated Col-0 plants expressing proUBQ10:CLC2-mEOS, used here as a core marker of the CME machinery (Konopka et al., 2008). Super-resolution imaging revealed that CLC2-mEOS was organized in clusters at the PM (Fig. 5B) and that its local density was insensitive to a sorbitol treatment (Fig. 5C). We also investigated the diffusion of individual CLC2-mEOS particles at the PM and its dependency on a sorbitol treatment. Tracks generated from sptPALM movies revealed two populations of CLC2 particles, with a low ($\sim 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$) and a high ($\sim 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$)

mean diffusion constant, respectively (Fig. 5D). The repartition between these so-called mobile and immobile fractions was not altered after a sorbitol treatment (Fig. 5, E and G). In *rbohD* plants; however, a significant decrease of the CLC2-mEOS mobile fraction was induced by a hyperosmotic treatment (Fig. 5, F and G). These results suggest that CLC2-mEOS molecular dynamics are enhanced by RBOHD, specifically under osmotic stress. These effects may support the specific endocytosis of some PM-localized proteins, such as PIP2;1.

DISCUSSION

Upon perception of an osmotic imbalance, plant cells generate multiple secondary messengers, such as H^+ , Ca^{2+} , and ROS, which in turn trigger a cascade of cell responses leading to physiological acclimation (Feng et al., 2016). In this work, we focused on ROS signaling, deciphered the molecular bases of their generation, and described their role in membrane dynamics and protein sorting at high resolution.

Two ROS-Producing Pathways Contribute to ROS Accumulation during Osmotic Signaling

RBOH proteins have emerged as central players of ROS signaling in plants. Here, we used pharmacological (DPI) and genetic tools (*rbohD* and *rbohF* mutants) to show their activation in the few minutes after hyperosmotic stimulation (Fig. 6). We further show that RBOHD and RBOHF individually contribute to ROS accumulation, but in a nonadditive manner. These findings support previous work on the role of ROS and RBOH in long-term accumulation of Pro in Arabidopsis roots under hyperosmotic stress (Ben Rejeb et al., 2015).

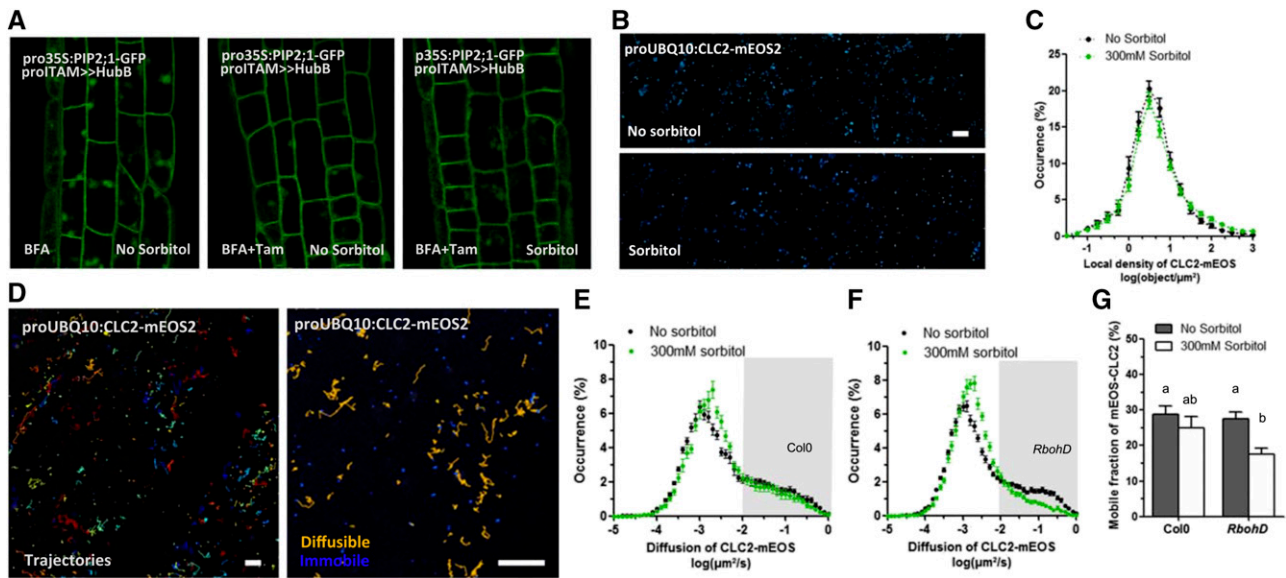


Figure 5. Effects of CME on PIP2;1-GFP internalization and molecular dynamics of CLC2-mEOS in response to a hyperosmotic sorbitol treatment. A, Root cells coexpressing ProTAM>>HUB and Pro-35S:PIP2;1-GFP in the presence of BFA for 45 min. PIP2;1-GFP labels BFA bodies in control conditions (left), but to a much lesser extent after induction of HUB with Tam (12 h), in the absence (center) or presence (right) of sorbitol. B, Superresolution intensity map of PM of a plant expressing ProUBQ10:CLC2-mEOS, in the absence or presence of 300 mM sorbitol for 20 min. C, Local density distribution of CLC2-mEOS. D, Track reconstruction in a ProUBQ10:CLC2-mEOS-expressing plant. Each color represents the displacement of a single molecule over time. Particles with a high (yellow) and low (blue) diffusion coefficient can be observed. E and F, Diffusion coefficient distribution of CLC2-mEOS, in the absence or presence of sorbitol, and in Col-0 (E) or *rbohD* (F). The gray box corresponds to the CLC2-mEOS mobile fraction. G, Corresponding graph showing the average percentage of CLC2-mEOS mobile fraction in Col-0 or *rbohD*, in the absence or presence of sorbitol. Histograms show mean values calculated from several thousands of individual tracks with se ($n > 15-31$). Scale bars = 1 μ m.

More surprising was the finding that osmotically induced ROS accumulation is only partially dependent of the presence of functional RBOHs (Fig. 1, C and D), indicating the contribution of an additional mechanism for ROS production.

In these respects, our work points to a significant, but counterintuitive, role of Asc. As a reducing agent, Asc should primarily diminish ROS accumulation. This is typically the case when Asc fuels cytoplasmic peroxidases, like ASCORBATE PEROXIDASE1 (Davletova et al., 2005; Koussevitzky et al., 2008). Here, we found Asc to positively regulate ROS accumulation. Exogenous application of Asc on roots almost doubled the DHE signal; conversely, its genetic or pharmacological depletion decreased the fluorescent signal (Fig. 1, F-I). Because in the latter approach most of the exogenously supplied AOX likely remains confined to the cell apoplast, we propose that Asc mainly acts in this compartment during the hyperosmotic response. The finding that specific chelation of metals with BPDS reduced the DHE signal indicates that Asc would reduce transition metals, such as Fe. The newly formed ferric iron would in turn promote the formation of superoxide from dioxygen through a Haber-Weiss reaction (Fig. 1E). However, how can significant Asc levels be maintained in the cell apoplast to sustain ROS production during osmotic treatment? An Asc efflux system at the cell PM, as was previously described in the

context of Fe nutrition in seeds (Grillet et al., 2014), represents one possibility (Fig. 6). Alternatively, cytoplasmic reducing power may be transferred through the cell membrane, by cytochrome proteins for instance, to regenerate the apoplastic dehydroascorbate (DHA) pool (Fig. 6). Finally, an osmotically induced efflux of DHA can also be hypothesized (Fig. 6). Interestingly, the balance between Asc and DHA in the apoplast has to be tightly controlled because misregulation of apoplastic AOXs in tobacco plants altered hormonal and plant pathogen responses (Pignocchi et al., 2006). In line with this work, we also note that a polyamine oxidase was recently shown to act in a feedforward loop with RBOH proteins to regulate ROS production in stomata (Gémes et al., 2016). Thus, multiple ROS enzymes or generating mechanisms seem to work in concert during plant stress signaling. Whether these mechanisms are functionally redundant or convey some kind of response specificity remains largely unknown. This question was addressed here by analyzing membrane dynamics and protein sorting in root cells under hyperosmotic stress.

The Two ROS-Producing Pathways Contribute in Synergy to Lipid Membrane Internalization

Within seconds or tens of seconds, hyperosmotic conditions induce a loss of cell water and consequently

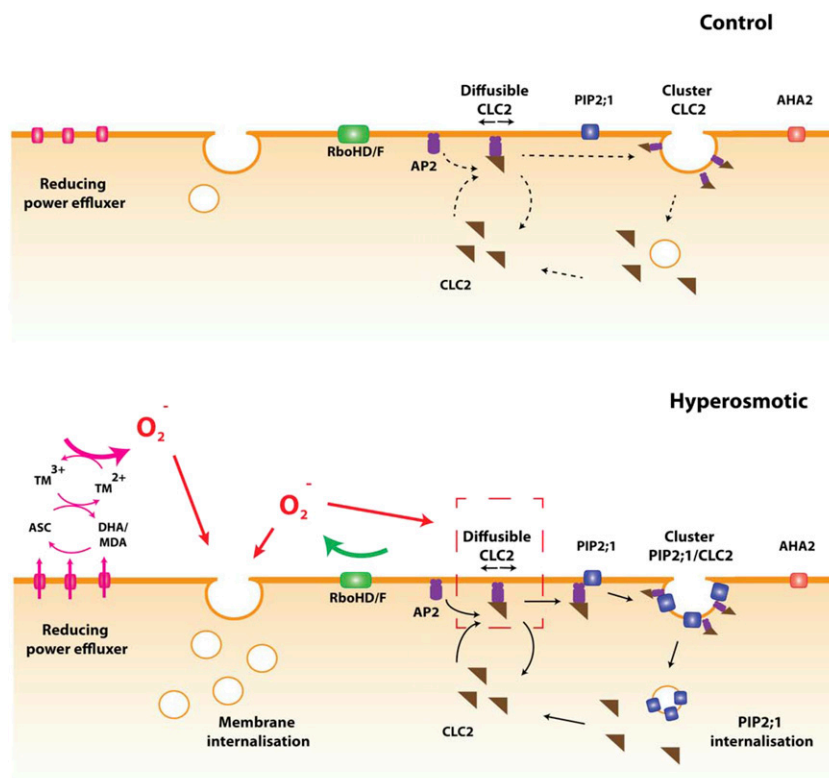


Figure 6. Diagram of ROS signaling and its impact on protein dynamics after a hyperosmotic treatment. In control conditions, RBOHD/F (green) and putative efflux machinery (pink) for reducing power are inactive. A basal level of membrane internalization exists. CLC2 (brown) is either associated with AP2 (purple) in its diffusible form or is associated with CCVs, yielding nondiffusible forms. PIP2;1 (blue) and AHA2 (red) are organized in clusters and are mostly immobile. After a hyperosmotic treatment, activation of RBOHD/F and the efflux machinery (pink) for reducing power leads to enhanced production of superoxide. In the case of the reducing power efflux, this is achieved either by a direct efflux of cytoplasmic Asc or an efflux or regeneration of DHA. The resulting reducing power reduces apoplastic transition metals, which in turn react with oxygen to generate ROS. The accumulation of ROS enhances lipid membrane internalization by an unknown mechanism. In parallel, ROS produced by RBOH facilitate PM association of CLC2/AP2 complexes by promoting interactions of AP2 with lipid at the membrane. An excess of these complexes can bind to PIP2;1, thereby facilitating its incorporation in CCVs. As a consequence, PIP2;1 clustering and endocytosis are enhanced. The rate of CLC2 dissociation from the CCV is intrinsically enhanced by the hyperosmotic stress, and this effect is compensated for by RBOH-dependent ROS and the above-mentioned effects on CL2/AP2 complex formation.

a decrease in turgor. This results in instantaneous changes in cell shape, as well as PM tensions and invaginations (Oparka, 1994). Membrane cycling between the cell surface and intracellular compartments is simultaneously enhanced (Leshem et al., 2007; Luu et al., 2012; Zwiewka et al., 2015). Consistent with this model, we observed that an enhanced internalization of FM4-64 occurs in osmotically challenged root cells. We further demonstrated that lipid membrane internalization was correlated to superoxide accumulation (Fig. 2) and that both inhibition of RBOH activities and Fe chelation were necessary for total suppression of this process (Figs. 2, B and C, and 6). While the data identify the two major sources of ROS involved in membrane reshaping, the mode of action of ROS on lipid membrane dynamics remains an intriguing question. ROS exert direct effects on phospholipid structure through peroxidation and can induce lipid–lipid crosslinking. These chemical effects could translate into changes in

membrane biophysical properties, such as viscosity or curvature, and act on membrane internalization (Eichenberger et al., 1982; Bruch and Thayer, 1983). In addition, it cannot be excluded that ROS accumulation triggers formation of ordered microdomains at the PM to promote endocytosis, as was described in cells exposed to pathogen elicitors (Sandor et al., 2016).

Osmotically Induced PIP2;1 Endocytosis Specifically Controlled by ROS Produced by RBOHs

While lipid membranes are largely internalized in response to a hyperosmotic challenge, we wondered whether protein cargoes would show the same movements. This seems to be case for the PIP2;1 aquaporin, which is internalized in response to a salt stress (Li et al., 2011; Luu et al., 2012), and showed here a similar response to a sorbitol hyperosmotic challenge. By

contrast, endocytosis of the AHA2 H⁺-ATPase was insensitive to the same treatment. Because AHA2 cycling is, along with AHA1, responsible for the maintenance of a proton gradient across the cell PM (Haruta and Sussman, 2012; Haruta et al., 2018), we speculate that this function has to be critically maintained for energizing turgor regulation under hyperosmotic conditions. Also unknown is the mechanism that allows selection of specific cargos for either internalization or retention.

Nevertheless, the most intriguing observation remained that, although RBOH and the Asc/Fe pathway generate the same end product (superoxide), PIP2;1 internalization is selectively dependent on the former pathway (Figs. 2H, 4, C and D, and 6). Because ROS show short life spans (milliseconds to seconds for superoxide), limiting their diffusion to a restricted area, we propose that RBOHs create a ROS microenvironment in their vicinity, thereby acting on a specific protein subpopulation. Thus, the ROS-producing machinery rather than the produced species (superoxide) itself can determine signal specificity.

A recent study showed that in the Arabidopsis hypocotyl, RBOHD is depleted from the PM and degraded at 30 min after a 100-mM NaCl treatment (Hao et al., 2014). Because this response seems to be triggered by activation of RBOHD itself, a similar PM depletion might happen during osmotic stress. In addition, AtPIP2;1, which acts as a facilitator of hydrogen peroxide diffusion through the PM (Rodrigues et al., 2017), could undergo coendocytosis with RBOHD. This putative complex between aquaporins and NADPH oxidases might participate in regulation of cytoplasmic ROS.

Linking Protein Diffusion, Clustering, and Cycling

Previous studies, including ours, have investigated lateral protein diffusion at the PM, with the implicit idea that this phenomenon supports subsequent endocytosis (Wudick et al., 2015). Using a sptPALM approach, we investigated protein clustering as an additional prerequisite for cellular endocytosis and tried to relate these different parameters with an unprecedented time and space resolution.

Most intrinsic PM proteins of plants, and PIPs especially, have a very low lateral diffusion ($\sim 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Yet, two recent reports have demonstrated that hyperosmotic and salt treatments can induce a substantial increase in PIP2;1 diffusion (Li et al., 2011; Hosy et al., 2015). In this work, first, we confirmed these results and extended them to AHA2, showing that, under a hyperosmotic treatment, both PIP2;1 and AHA2 shift to another organization through increased diffusion. In contrast, LTI6b diffusion and distribution were not modified in the same conditions. Thus, a hyperosmotic challenge can alter the lateral diffusion of some but not all PM proteins. Second, we found that neither RBOH nor the Asc/Fe ROS-generating system was required

for cargo mobilization. In contrast, their inhibition enhanced protein diffusion under hyperosmotic conditions, showing that ROS rather act as negative regulators of their diffusion, maybe by lipid peroxidation (Fig. 3).

This finding seems at variance with a previous experiment showing that exposure of root cells to exogenous H₂O₂ enhanced PIP2;1 diffusion (Wudick et al., 2015; A. Martinière, unpublished sptPALM data). Because production of apoplastic ROS is spatially regulated and involves complex interspecies conversion, we believe that these processes cannot be properly mimicked by treatment with exogenous H₂O₂. Overall, our comparative study of PIP2;1, AHA2, and LTI6b, together with ROS inhibition experiments, provides compelling evidence that an increase in protein diffusion is not linked to its subsequent endocytosis. More generally, protein diffusion may be corralled by PM/cell wall connections rather than being controlled by cellular ROS accumulation (Martinière et al., 2012). These ideas led us to consider, in closer detail, protein clustering as another marker of protein behavior at the cell surface. The superresolution microscopy approach indeed indicated that PIP2;1, AHA2, and LTI6b were not evenly distributed at the cell surface but were rather concentrated in small domains. After a hyperosmotic treatment, PIP2;1, but not AHA2 or LTI6b, showed higher clustering values, and this process was strictly RBOH-dependent. These data perfectly match the endocytosis data, pointing to a causal link between higher clustering and enhanced endocytosis.

Our next question was about the mechanisms that drive PIP2;1 internalization, a process known to involve canonical CME (Li et al., 2011). BFA experiments in plants expressing HUB1, a dominant-negative mutant form of CLATHRIN HEAVY CHAIN1, confirmed this notion in the context of cell responses to hyperosmolarity (Fig. 5A). Yet, inhibition of BFA compartment staining was only partial. Although we cannot exclude that conditional *HUB1* expression was not able to fully suppress CME, these partial effects may reflect, in agreement with previous work (Li et al., 2011; Wudick et al., 2015), an additional pathway for PIP2;1 internalization, independent of CME. Next, we investigated the effects of an osmotic stress on the molecular dynamics of CLC2, another major component of CME. CLC2-mEOS molecules showed two types of kinetic behavior, with either a high or a low diffusion. In animals, adaptor complex proteins (AP2) are known to bind to the PM by stochastic association with phosphatidylinositol two phosphates (PIP2), before clathrin-coated vesicle initiation, growth, and maturation (Kadlecova et al., 2017). This binding induces an allosteric activation of the AP2 complex, thereby allowing interaction with clathrin triskelion (Jackson et al., 2010; Kelly et al., 2014). At this stage, cargo proteins can bind to AP2, and clathrin polymerization is primed. Alternatively, AP2/clathrin can dissociate from the PM. Due to its large size, the diffusion of CLC2-mEOS2 associated within CCV is supposed to be highly restricted.

In contrast, when associated with PIP2/AP2/CLC complexes, CLC2-mEOS likely has a much higher diffusion coefficient. Thus, CLC2 diffusion can be used to reveal CCVs and the proportion of clathrin stochastic assemblies at the PM. In our experiments, the fraction of diffusible CLC2-mEOS was specifically reduced in *rbohD* under osmotic treatment, suggesting that clathrin stochastic assembly is perturbed in this context. Thus, the association between PIP2/AP2/CLC complexes and the PM might be supported by RBOHD-mediated ROS production, specifically in hyperosmotic conditions (Fig. 6).

In conclusion, we have shown that PM dynamics are tightly controlled by cell signaling processes involving ROS, allowing the cell to respond to its osmotic environment. In our model, a hyperosmotic constraint activates RBOHs and a redox system coupling Asc and transition metals. The resulting ROS trigger overall cell membrane internalization. However, the nano-organization, lateral diffusion, and endocytosis of cargo proteins reveal highly specific behaviors and can be independently modulated depending on the cargo. While we demonstrate that an increase in protein lateral diffusion is not sufficient for triggering clustering and endocytosis, it will be interesting to see to what extent this upregulation remains necessary.

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

The cDNAs of At4g30190 (*AHA2*) and At2g40060 (*CLC2*) were amplified by PCR and cloned into pENTR-D-TOPO (Invitrogen). The resulting constructs were used to generate N- or C-terminal fusions with mEOS, under the control of the *UBQ10* promoter (*ProUBQ10*), by cloning into pUBNEosFP and pUB-CEosFP vectors, respectively (Grefen et al., 2010). The cDNA of At3g05890 (LTI6b-RCi2B) was cloned into pDONR207 by BP cloning. Multisite Gateway was then used to clone 2×35S_{prom}::LTI6b-mEos in pB7m34GW by LR clone recombination, using 2×35S_{prom}/pDONRP4RP1, LTI6bnoSTOP/pDONR207, and mEOS/pDONRP2RP3 as donor vectors (Karimi et al., 2007). mEOS/pDONRP2RP3 was obtained by amplifying mEOS and subsequent BP cloning into pDONRP2RP3 (Jaillais et al., 2011). Stable transformation of *Arabidopsis thaliana* accession Col-0 was performed according to the floral dip method (Clough and Bent, 1998). proPIP2;1:PIP2;1-mEOS2 (Hosy et al., 2015) and proUBQ:CLC2-mEOS were also introduced into *rbohD* (Torres et al., 2002) by crossing. *Arabidopsis* plants expressing proPIP2;1:PIP2;1-GFP, proTAM>>HUB1, and mutants lines *RbohD*, *RbohF*, *RbohDxRbohF*, and *vtc2-4* were described elsewhere (Torres et al., 2002; Grillet et al., 2014; Wudick et al., 2015; Zwiewka et al., 2015).

Plant Growth

Seeds were surface-sterilized by agitation for 10 min in a solution containing 3.4 g/L BayroChlore and 0.02% (v/v) TWEEN 20 detergent. Seeds were then rinsed three times with sterile water and sown on square plates containing half-strength Murashige & Skoog medium (MS/2) complemented with 2.5 mM 4-morpholineethanesulfonic acid-KOH, pH 6, and 1% Suc. Plates were placed vertically in a growth chamber with 16-h light (200 μmol m⁻² s⁻¹) and 8-h dark cycles at 21°C and 70% of relative humidity for 5 d.

Osmotic and Pharmacological Treatments

Five-d-old *Arabidopsis* plantlets were bathed in a liquid MS/2 medium to allow recovery from transplanting. When indicated, 20 μM DPI, 50 μM BPDS,

100 μM Asc, or 1.5 units/mL AOX was included. After 30 min, plantlets were gently transferred for an additional 15 min into a control MS/2 medium, in the absence or presence of 100 mM (mild osmotic stress) or 300 mM (severe osmotic stress) sorbitol, and with or without the corresponding inhibitors.

ROS Measurements

The accumulation of O₂⁻ or hydroxyl radicals (•OH) was probed using 5 μM DHE or 10 μM HPF, respectively. The two dyes show increased fluorescence when oxidized. Observations were performed on the root elongation zone using an Axiovert 200M inverted fluorescence microscope (20×/0.8 objective; Zeiss), with 512/25-nm excitation and 600/50 emission filters for DHE, and 475/28-nm excitation and 535/30 emission filters for HPF. Exposure time was 500 and 200 ms, for DHE and HPF, respectively. Images were acquired using a charge-coupled device camera (Cooled SNAP HQ; PhotoMetrics), controlled by fluorescence imaging software (MetaFluor; Molecular Devices). To quantify the fluorescence signal, the images were analyzed using ImageJ software. After subtraction of the background noise, an average mean gray value was calculated from epidermal and cortical cells.

Endocytosis Assay

For estimation of bulk endocytosis, seedlings were first pretreated in liquid MS/2 medium for 30 min in the absence or presence of the appropriate inhibitors. Seedlings were then transferred in 1 μM FM4-64 in MS/2. After 7 min, the seedlings were washed in a liquid MS/2 medium deprived of FM4-64. They were then treated with 25 μM BFA for 1 h, in the presence or absence of the appropriate inhibitors. To monitor the internalization of PIP2;1-GFP or GFP-AHA2, seedlings were treated for 45 min with 25 μM BFA. The number of BFA bodies per cell stained with FM4-64 or GFP was manually counted from images taken with a confocal microscope.

Confocal Laser Scanning Microscopy

A Leica SP8 microscope with a 40×/1.1 water objective and the 488-nm line of its argon laser was used for live-cell imaging. Fluorescence emission was detected at 600–650 nm for FM4-64 and at 500–540 nm for GFP. To explore the full volume of epidermal cells, z-stacks of epidermal cell layers were made within seven steps per acquisition, covering a 15-μm depth. For quantitative measurements of BFA bodies, the laser power, pinhole, and gain settings of the confocal microscope were identical among different treatments or genotypes.

sptPALM

Seedlings were transferred from vertically oriented plates to a petri dish containing MS/2 for 30 min, to allow recovery before incubation for 40 min in MS/2 complemented or not with 300 mM sorbitol. This last step was shortened to 15 min in the case of CLC2 experiments. Root cells were observed with a homemade total internal reflection fluorescence microscope equipped with an electron-multiplying charge-coupled device camera (Andor iXON XU_897) and a 100× oil immersion objective (Apochromat NA = 1.45; Zeiss). Laser angle was selected to be close to supercritical angle and generate evanescent waves and to give the maximum signal-to-noise ratio (Konopka and Bednarek, 2008; Johnson and Vert, 2017). To ensure PALM localization of proteins, a continuous low-intensity illumination at 405 nm (OBIS LX 50mW; Coherent) was used for photoactivation, while 561 nm (SAPPHIRE 100mW; Coherent) with 600/50 (Chroma) emission filter was selected for image acquisition. The acquisition was steered by LabVIEW software (National Instruments) in streaming mode at 50 images/s (20 ms exposure time). Ten-thousand images were recorded per region of interest. From 10 to 20 regions of interest were collected out of three biological replicates.

Single-Particle Tracking and Voronoi Tessellation

Individual single molecules were localized and tracked using the software MTT (Sergé et al., 2008). Dynamic properties of single emitters in root cells were then inferred from the tracks using homemade analysis software written in MatLab (The MathWorks). From each track, the MSD was computed. To reduce the statistical noise while keeping a sufficiently high number of trajectories per cell, tracks of at least five steps (i.e. ≥ 6 localizations) were used. Missing frames due to mEOS blinking were allowed up to a maximum of three consecutive

frames. The diffusion coefficient D was then calculated by fitting the MSD curve using the first four points. For the clustering analysis, the centroid of each individual track was calculated and used to implement SR-Tesseler software (Levet et al., 2015). Local densities of each track were calculated as the invert of their minimal surface.

Statistical Analysis

For each condition or treatment, 9–12 cells were analyzed from at least 5–7 different seedlings. All experiments were independently repeated 2–3 times. Data are expressed as mean \pm SE. Statistical analyses were performed in GraphPad Prism (GraphPad Software), using analysis of variance followed by a Tukey's post hoc test or Student's t test depending on the needs ($P < 0.05$ was considered significant). Different letters in histograms indicate statistically different values.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/European Molecular Biology Laboratory databases under the following accession numbers: *PIP2.1*, *At3G53420*; *AHA2*, *At4G30190*; *LTI6-b*, *At3G05890*; *CLC2*, *At2G40060*.

Supplemental Data

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Kinetics of DHE staining after a hyperosmotic treatment.

Supplemental Figure S2. ROS accumulation in root cells after a sorbitol treatment as revealed by HPF.

Supplemental Figure S3. Diagram of experimental design.

Supplemental Figure S4. Effects of various sorbitol concentrations on cell plasmolysis and ROS accumulation.

Supplemental Figure S5. Localization using confocal microscopy of DHE fluorescence induced after 15 min of a mock or sorbitol treatment.

Supplemental Figure S6. Cell viability of root cells after a multiple inhibitor treatment (DPI plus BPDS).

Supplemental Figure S7. Lateral diffusion and local density of LTI6b-mEOS in response to a hyperosmotic sorbitol treatment.

Supplemental Figure S8. Effect of a hyperosmotic sorbitol treatment on PIP2;1-mEOS2 and mEOS-AHA2 cluster formation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the plateforme d'hisocytologie et d'imagerie cellulaire végétale (PHIV) and Montpellier ressources imagerie (MRI) platform for access to microscopes, Jiri Friml for his kind HUB lines donation, and Vincent Bayle for comment on the manuscript.

Received August 30, 2018; accepted January 24, 2019; published February 4, 2019.

LITERATURE CITED

- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**: 1229–1240
- Ben Rejeb K, Lefebvre-De Vos D, Le Disquet I, Leprince A-S, Bordenave M, Maldiney R, Jdey A, Abdely C, Savouré A (2015) Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **208**: 1138–1148
- Bruch RC, Thayer WS (1983) Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim Biophys Acta* **733**: 216–222

- Chen J, Rogers SC, Kavdia M (2013) Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Ann Biomed Eng* **41**: 327–337
- Choi, W.-G., Toyota, M., Kim, S.-H., Hilleary, R., and Gilroy, S. (2014). Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 6497–6502
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 268–281
- Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof Y-D, Friml J (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol* **17**: 520–527
- Eichenberger K, Böhni P, Winterhalter KH, Kawato S, Richter C (1982) Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. *FEBS Lett* **142**: 59–62
- Feng W, Lindner H, Robbins II NE, Dinneny JR (2016) Growing out of stress: The role of cell- and organ-scale growth control in plant water-stress responses. *Plant Cell* **28**: 1769–1782
- Gao D, Knight MR, Trewavas AJ, Sattelmacher B, Plieth C (2004) Self-reporting Arabidopsis expressing pH and [Ca²⁺] indicators unveil ion dynamics in the cytoplasm and in the apoplast under abiotic stress. *Plant Physiol* **134**: 898–908
- Gaxiola RA, Palmgren MG, Schumacher K (2007) Plant proton pumps. *FEBS Lett* **581**: 2204–2214
- Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Müller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* **112**: 219–230
- Gémes K, Kim YJ, Park KY, Moschou PN, Andronis E, Valassaki C, Roussis A, Roubelakis-Angelakis KA (2016) An NADPH-oxidase/polyamine oxidase feedback loop controls oxidative burst under salinity. *Plant Physiol* **172**: 1418–1431
- Grefen C, Donald N, Hashimoto K, Kudla J, Schumacher K, Blatt MR (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J* **64**: 355–365
- Grillet L, Ouerdane L, Flis P, Hoang MTT, Isaure M-P, Lobinski R, Curie C, Mari S (2014) Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. *J Biol Chem* **289**: 2515–2525
- Guo K-M, Babourina O, Rengel Z (2009) Na⁺/H⁺ antiporter activity of the SOS1 gene: Lifetime imaging analysis and electrophysiological studies on Arabidopsis seedlings. *Physiol Plant* **137**: 155–165
- Hamilton ES, Schlegel AM, Haswell ES (2015) United in diversity: Mechanosensitive ion channels in plants. *Annu Rev Plant Biol* **66**: 113–137
- 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
- Haruta M, Sussman MR (2012) The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of Arabidopsis. *Plant Physiol* **158**: 1158–1171
- Haruta M, Tan LX, Bushey DB, Swanson SJ, Sussman MR (2018) Environmental and genetic factors regulating localization of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* **176**: 364–377
- Hosy E, Martinière A, Choquet D, Maurel C, Luu D-T (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
- Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, Hao Y, Luan S, Li L (2014) DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Res* **24**: 632–635
- Jackson LP, Kelly BT, McCoy AJ, Gaffry T, James LC, Collins BM, Höning S, Evans PR, Owen DJ (2010) A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell* **141**: 1220–1229
- Jaillais Y, Hothorn M, Belkhadir Y, Dabi T, Nimchuk ZL, Meyerowitz EM, Chory J (2011) Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev* **25**: 232–237

- Johnson A, Vert G** (2017) Single event resolution of plant plasma membrane protein endocytosis by TIRF microscopy. *Front Plant Sci* **8**: 612
- Kadlecova Z, Spielman SJ, Loerke D, Mohanakrishnan A, Reed DK, Schmid SL** (2017) Regulation of clathrin-mediated endocytosis by hierarchical allosteric activation of AP2. *J Cell Biol* **216**: 167–179
- Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P** (2007) Building blocks for plant gene assembly. *Plant Physiol* **145**: 1183–1191
- Kelly BT, Graham SC, Liska N, Dannhauser PN, Höning S, Ungewickell EJ, Owen DJ** (2014) Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science* **345**: 459–463
- Konopka CA, Bednarek SY** (2008) Variable-angle epifluorescence microscopy: A new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *Plant J* **53**: 186–196
- Konopka CA, Backues SK, Bednarek SY** (2008) Dynamics of Arabidopsis dynamin-related protein 1C and a clathrin light chain at the plasma membrane. *Plant Cell* **20**: 1363–1380
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R** (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J Biol Chem* **283**: 34197–34203
- Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F** (2008) The plant defense elicitor cryptogenin stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* **146**: 1255–1266
- Leshem Y, Seri L, Levine A** (2007) Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J* **51**: 185–197
- Levet F, Hosy E, Kechkar A, Butler C, Beghin A, Choquet D, Sibarita J-B** (2015) SR-Tesseler: A method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat Methods* **12**: 1065–1071
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu D-T, 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
- Luu D-T, Martinière 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
- Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, Kung C** (1987) Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2297–2301
- Martinière A, Lavagi I, Nageswaran G, Rolfe DJ, Maneta-Peyret L, Luu DT, Botchway SW, Webb SE, Mongrand S, Maurel C, et al** (2012) Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 12805–12810
- Mittler R** (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci* **22**: 11–19
- Oparka KJ** (1994) Plasmolysis: New insights into an old process. *New Phytol* **126**: 571–591
- Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster SJ, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer CH** (2006) Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol* **141**: 423–435
- 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 USA* **114**: 9200–9205
- Sandor R, Der C, Grosjean K, Anca I, Noirot E, Leborgne-Castel N, Lochman J, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P** (2016) Plasma membrane order and fluidity are diversely triggered by elicitors of plant defence. *J Exp Bot* **67**: 5173–5185
- Sergé A, Bertaux N, Rigneault H, Marguet D** (2008) Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Methods* **5**: 687–694
- Stephan AB, Kunz H-H, Yang E, Schroeder JI** (2016) Rapid hyperosmotic-induced Ca²⁺ responses in *Arabidopsis thaliana* exhibit sensory potentiation and involvement of plastidial KEA transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: E5242–E5249
- Torres MA, Dangel JL, Jones JDG** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 517–522
- Tsakagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606–616
- Ueda M, Tsutsumi N, Fujimoto M** (2016) Salt stress induces internalization of plasma membrane aquaporin into the vacuole in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **474**: 742–746
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K** (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in Arabidopsis functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743–1754
- Widholm JM** (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* **47**: 189–194
- Wudick MM, Li X, Valentini V, Geldner N, Chory J, Lin J, Maurel C, Luu D-T** (2015) Subcellular redistribution of root aquaporins induced by hydrogen peroxide. *Mol Plant* **8**: 1103–1114
- Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B, et al** (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in Arabidopsis. *Nature* **514**: 367–371
- Zwiewka M, Nodzyński T, Robert S, Vanneste S, Friml J** (2015) Osmotic stress modulates the balance between exocytosis and clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **8**: 1175–1187