



HAL
open science

Rôles des modifications post-traductionnelles dans l'internalisation du récepteur des brassinostéroïdes BRI1

Florian Deligne

► **To cite this version:**

Florian Deligne. Rôles des modifications post-traductionnelles dans l'internalisation du récepteur des brassinostéroïdes BRI1. Biologie végétale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30032 . tel-04191737

HAL Id: tel-04191737

<https://theses.hal.science/tel-04191737v1>

Submitted on 30 Aug 2023

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Florian DELIGNE

Le 27 mars 2023

**Rôles des modifications post-traductionnelles dans
l'internalisation du récepteur des brassinostéroïdes BRI1.**

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et
Bioingenieries**

Spécialité : **Developpement des plantes, interactions biotiques et abiotiques**

Unité de recherche :
LRSV - Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales

Thèse dirigée par
Grégory VERT

Jury

Mme Véronique SANTONI, Rapporteur
M. Jean COLCOMBET, Rapporteur
Mme Isabelle FOBIS-LOISY, Examinatrice
M. Pascal GENSHIK, Examinateur
M. Grégory VERT, Directeur de thèse
M. Vincent BURLAT, Président

Remerciements

Je tiens à remercier Grégory Vert pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son équipe de recherche, pour m'avoir poussé à me dépasser, pour m'avoir motivé à poursuivre dans une carrière académique, pour ses conseils toujours de grande qualité, sa rigueur et son incroyable connaissance de la bibliographie.

Je tiens également à remercier l'équipe Ubiquitination et Signalisation cellulaire, Julie Neveu, l'experte des manips, toujours pleine d'idées et souvent disponible malgré que tout le monde vienne lui poser des questions, Valérie Cotelle, la spécialiste des protéines et des techniques « old school » professeure investie pour ses étudiants, un véritable atout pour l'équipe, Satoshi Fujita, toujours présent pour prodiguer de bons conseils, Charlotte Delesalle, thésarde motivée, acolyte des western blots qui ratent et de la déprime de la thèse, (tu finis bientôt t'inquiètes pas ça va bien se passer), Liza Pellegrin, le sang frais de l'équipe, nouvelle thésarde sur-vitaminée qui va faire une super thèse, Julien Spielmann, le post-doc faussement calme, qui m'a particulièrement appris que la quantité permettait d'obtenir des résultats, Reyes Rodenas Castillo, la post-doc fêtarde, toujours présente pour la vie en parallèle de la thèse quand elle ne se casse pas quelque chose, Miguel, dernier post-doc à avoir rejoint l'équipe qui va prendre ma relève dans la mise d'ambiance du laboratoire.

Sans oublier les anciens membres de l'équipe, Alvaro Montiel Jorda, thésard puis post-doc qui m'a transmis ses connaissances en techniques d'étude au niveau de la protéine, toujours plein de bonnes idées au début de mon projet de thèse, Maria Naranjo, post-doc reine de la SUMOylation en plus de faire de super barbecues, elle m'a permis de finir son projet de recherche, Ulla Dolde, post-doc OVNI de l'équipe (pour pas citer UFO) travaillant plutôt sur la fleur et spécialiste du trafic de chocolat allemand, Virginia Cointry, qui avait de super protocoles pour les levures (merci le CEA).

Je tiens à remercier mes amis pour leur soutien, la thèse est une épreuve difficile, l'approche de la trentaine aussi, je n'aurais pas réussi à garder le moral sans eux, particulièrement Amandine Lucchin, acolyte de l'équipe calcium avec qui on s'est livré à un trafic de consommable inter-équipe et qui a été d'un grand soutien pendant toute ma thèse et à côté. Je remercie également mes potes de toujours, Julien Lévêque, Clément Gasser, Erwann Porret, Camille Moine, Yoann Leite qui m'ont fourni un vrai bol d'air frais à chaque fois que j'allais les voir. Ma camarade de Master, Célestine Beloeil, (dire que 5 ans auparavant nous avions tous les deux les cheveux bleus au fond d'un amphi froid pour finir par soutenir nos thèses à 15j d'écart).

Je tiens à remercier ma famille et particulièrement mes parents Patrice et Françoise Deligne, pour leur soutien, leur amour et qu'ils m'aient donné les moyens d'arriver là où je suis.

Je tiens également à remercier les collaborateurs qui ont permis de réaliser ces papiers dans lesquels figurent mes recherches, l'équipe de Marco Trujillo, rencontrée lors de la conférence ICAR 2022 avec qui on a réalisé le papier ubiquitination, et l'équipe de Ari Sadanandom, avec qui nous avons réalisé le papier sur la SUMOylation.

Je veux aussi remercier les différentes personnes du LRSV qui en font un lieu de travail vivant et convivial, tous les permanents chercheurs, enseignants ultra investis, les ITA qui sont d'une aide cruciale pour faire tourner le labo, les non permanents qui donnent vie au labo, le service d'administration pour son efficacité et sa gentillesse, le service laverie, qui reste efficace malgré les jours chargés et acceptant les demandes spéciales pour des milieux plus fragiles, le service de gestion des plantes, qui a réussi à remettre de l'ordre dans un système vieillissant et qui a su s'adapter au mieux à des locaux très/trop vétustes.

Je remercie également la FRAIB, pour avoir financé mon side projet « jeune chercheur ». Et la plateforme de microscopie TRI-Genotoul de cette fédération, pour avoir mis à notre disposition leurs microscopes et leur expertise toujours avec enthousiasme et passion.

Je remercie aussi l'université Toulouse 3 Paul Sabatier et l'école doctorale SEVAB pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans un bon cadre avec des secrétaires ultra réactives et pour le financement de ces 3 ans et demi.

Je remercie également les stagiaires que j'ai pu encadrer pendant ces années de thèses pour leur aide précieuse, Alizée, Alice et Thomas.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse et ceux de mon jury pour le suivi de mon projet de thèse et son évaluation.

Je remercie très chaleureusement mes professeurs de lycée, Pascale Champeix et Frédéric Rondu pour m'avoir conforté dans mon attrait pour les sciences, pour leurs conseils avisés sur mes études, pour leur gentillesse, leur pédagogie et leur incroyable dynamisme.

Je remercie également ma professeure de BTS, Caroline Levis pour m'avoir conseillé de faire un stage à l'INRA qui m'a donné une véritable passion pour la biologie végétale.

Avant de finir ces remerciements j'aimerais ne pas remercier, les pucerons, les trips, la Covid-19, le groupe froid des chambres de culture et le serveur informatique du LRSV.

Merci à tous pour ces 3 ans et demi, ce fut vraiment une expérience incroyable de travailler ici, merci à tous ceux avec qui j'ai travaillé, discuté, mangé, fais la fête, pleuré, ri. Merci à vous tous ces années me manqueront !

Sommaire

Liste des figures.....	3
Liste des abréviations.....	5
Chapitre 1 : Introduction.....	6
1.1 Les brassinostéroïdes (BRs), d'hormones de croissance à signaux moléculaires.....	7
1.1.1 Découverte et caractérisation des BRs.....	7
1.1.2 Voie de biosynthèse des BRs.....	11
1.1.3 Découverte et caractérisation du récepteur membranaire BRI1.....	13
1.1.4 Voie de signalisation des BRs et activation de gènes résultant de cette voie.	17
1.2 BRI1, un récepteur finement régulé.....	21
1.2.1 Inhibiteurs de l'activation du récepteur.....	21
1.2.2 Endocytose des récepteurs membranaires.....	22
1.2.3 Rôle des nanodomains dans l'inactivation de la voie de signalisation des BRs.....	27
1.3 L'ubiquitination en K63, une modification post traductionnelle centrale au trafic cellulaire	
1.3.1 Les différents types d'ubiquitinations.....	30
1.3.2 L'ubiquitination en K63, impliquée dans le trafic cellulaire.....	32
1.4 La SUMOylation, nouvelle modification post traductionnelle pouvant moduler la stabilité des protéines	35
1.5 Contexte.....	37
1.6 Références.....	40
Chapitre 2 : Le rôle de la poly-ubiquitination en K63 dans l'internalisation de BRI1.....	49
2.1 Avant-Propos.....	49
2.2 K63-linked ubiquitin chains are a global signal for endocytosis and contribute to selective autophagy in plants.....	52
2.3 Addendum.....	78
2.3.1 Inhibition de la poly-ubiquitination en K63 par approche pharmacologique.	78
2.3.2 Test d'interaction entre les récepteurs membranaires BRI1, FLS2 et les E2 ligases UBC35, UBC36 par co-immunoprécipitation.	80
2.4 Références.....	82

Chapitre 3 : Le mécanisme sous-jacent à la poly-ubiquitination de BRI1.....	86
3.1 Avant-Propos.....	86
3.2 Interaction of the UBC35/36 E2 conjugating enzymes and the PUB13 E3 ubiquitin ligase mediates BRI1 K63 polyubiquitination.....	88
3.3 Références.....	101
 Chapitre 4 : Le rôle de la SUMOylation en K63 dans l'internalisation de BRI1.....	 103
4.1 Avant-Propos.....	103
4.2 SUMO/deSUMOylation of the BRI1 brassinosteroid receptor modulates plant growth responses to temperature.....	105
4.3 La K63 poly-ubiquitination de BRI1 permet toujours l'internalisation de BRI1 en réponse à la température.....	142
4.4 Références.....	144
 Chapitre 5 : Discussion Générale.....	 149
5.1 Ubiquitination en K63 impliquée dans l'internalisation et le trafic cellulaire des récepteurs membranaires.....	151
5.2 SUMOylation, un mécanisme d'évitement pour l'internalisation et dépendant de la température.....	154
5.3 De nouveaux axes de recherches à approfondir dans la caractérisation des régulations dynamiques des récepteurs membranaires.....	155
5.4 Références.....	159

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique d'un Brassinolide.	8
Figure 2 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des Brassinostéroïdes.	10
Figure 3 : BRI1, récepteur kinase principal des Brassinostéroïdes.	14
Figure 4 : Représentation schématique de la voie de signalisation des brassinostéroïdes activée par la présence de brassinostéroïdes.	18
Figure 5 : Schéma simplifié représentant les deux voies d'endocytose de BRI1 et le trafic cellulaire qui en découle.	24
Figure 6 : Modélisation 3D du changement de type de diffusion de BRI1 restreint dans des nanodomains en présence de son ligand.	29
Figure 7 : Schéma résumant les différentes fonctions connues des chaînes de poly-ubiquitination.....	31
Figure 8 : UBC35 et UBC36 sont responsables de la poly-ubiquitination en K63, affectant BRI1.....	33
Figure 9 : BRI1-25KR est fortement affecté dans son internalisation.	38
Figure 10 : <i>ubc35 ubc36</i> mutant shows pleiotropic phenotypes related to immune and hormone signalling.	55
Figure 11 : K63-Ub chains control protein levels.	58
Figure 12 : Endocytosis of FLS2 and BRI1 requires K63-Ub chains.	61
Figure 13 : K63-Ub chains contribute to selective autophagy.	63
Figure 14 : L'inhibiteur NSC677923 du complexe E2 enzyme chez les animaux ne semble pas réduire l'ubiquitination globale chez les plantes dans nos conditions.	79
Figure 15 : UBC35 et UBC36 semblent faiblement interagir <i>in planta</i> avec BRI1 et FLS2.	81
Figure 16 : The UBC35 E2 conjugating enzyme co-localizes with the E3 ligase PUB13.	93
Figure 17 : Yeast two Hybrid assay to test the interaction between UBC35 or UBC36 with PUB13.....	95
Figure 18 : UBC35 and UBC36 interact with PUB13 in coimmunoprecipitation experiments.	97
Figure 19 : BRI1 is SUMOylated in vivo on two intracellular lysine residues.....	112
Figure 20 : The SUMO protease Desi3a interacts with BRI1 and negatively regulates BR signaling.....	114
Figure 21 : Desi3a deSUMOylates BRI1 upon changes in ambient temperature.	117
Figure 22 : Desi3a is a negative regulator of plant responses to temperature elevation.	120

Figure 23 : Desi3a-dependent deSUMOylation regulates BRI1 endocytosis and interaction with BIK1.	122
Figure 24 : Desi3a-dependent deSUMOylation regulates BRI1 interaction with BIK1.	124
Figure 25 : La poly-ubiquitination en K63 semble toujours nécessaire à l'internalisation de BRI1 en stress chaleur.	143
Table S1 : Primers used in this study.	73
Figure S2 : Characterization of <i>ubc35 ubc36</i> mutant.....	74
Figure S3 : Altered proteins levels in <i>ubc35 ubc36</i> mutant are independent of transcript levels..	75
Figure S4 : GFP-UBC35 is mainly cytosolic, but can associate with membranes.....	76
Figure S5 : GFP-UBC35 is degraded via the vacuole.....	77
Figure S6 : BRI1 is SUMOylated <i>in vivo</i> on two intracellular lysine residues.	134
Figure S7 : <i>Desi3a</i> and <i>BRI1</i> expression profiles overlap in plants.	135
Figure S8 : Colocalization of Desi3a with the plasma membrane-localized receptors FLS2 and BRI1.....	136
Figure S9 : Phenotype of the <i>desi3a/Desi3a-HA</i> complemented line upon BR treatment and temperature elevation.	137
Figure S10 : Impact of temperature elevation on BR signaling.	138
Figure S11 : Phenotype of the <i>bik1/BIK1-HA</i> complemented line at 21°C and 26°C.	139
Figure S12 : Model for Desi3a function in the control of BR signaling at 21°C and 26°C.	140
Table S13 : Primers used in this study.	141

Liste des abréviations

AP2 : ADAPTATOR PROTEIN 2
BAK : BRI1 ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1
BAS1 : PHYBACTIVATION TAGGED SUPPRESSOR 1
BES1 : BRI1 EMS SUPPRESSOR 1
BFA : BREFELDIN A
BIK1 : BOTRYTIS INDUCED KINASE 1
BIN2 : BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2
BKI1 : BRI1 KINASE INHIBITOR 1
BL : BRASSINOLIDE
BR : BRASSINOSTEROID
BRI1 : BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
BSU : SERINE THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE
BZR1 : BRASSINAZOLE RESISTANT 1
CIE : CLATHRIN INDEPENDANT ENDOCYTOSIS
CME : CLATHRIN MEDIATED ENDOCYTOSIS
DESI3A : DESUMOYLATING ISOPEPTIDASE 3A
DWF4 : DWARF 4
DWF7 : DWARF 7
eBL : epi BRASSINOLIDE
EE : EARLY ENDOSOME
ESCRT : ENDOSOMAL SORTING COMPLEX REQUIRED FOR TRANSPORT
FLOT1 : FLOTILLIN 1
FLS2 : FLAGELLIN INSENSITIVE 2
IRT1 : IRON REGULATED TRANSPORTER 1
K63 poly-Ub : Polyubiquitination liée par des chaines sur lysine 63
LE : LATE ENDOSOME
MVB : MULTI VESICULAR BODY
PIN : ARABIDOPSIS THALIANA PIN FORMED
PP2A : PROTEIN PHOSPHATASE 2A
PPZ : PROPICONAZOLE
PTM : POST TRANSLATIONNAL MODIFICATION
PUB : PLANT UBOX TYPE E3 UBIQUITIN LIGASE
RLK : RECEPTOR LIKE KINASE
SERK : SOMATIC EMBRIOGENIC RECEPTOR LIKE KINASE
Ub : UBIQUITIN
UBC : UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME
UBP : UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASE

Chapitre 1 : Introduction

Par leur caractère sessile, les plantes font face depuis toujours aux aléas de leur environnement. Afin de se défendre contre bactéries, champignons ou herbivores pour tolérer des stress abiotiques comme la chaleur, le froid, la sécheresse ou encore la salinité, les plantes utilisent des hormones. Au niveau de la plante, ces petites molécules messagers vont servir de signal perçu par des récepteurs spécifiques qui permettront d'activer des voies de signalisations qui vont à leur tour moduler l'expression de gènes de réponses. Ces derniers vont alors jouer un rôle clé sur le développement de la plante. Les hormones végétales sont donc essentielles à la survie de la plante. Les étudier nous permet d'avoir un regard sur les mécanismes sous-jacent la croissance de la plante. Pour étudier une hormone, de nombreux facteurs doivent être pris en compte, d'un point de vue moléculaire sa biosynthèse, son inactivation et sa dégradation mais aussi son transport, sa perception par un récepteur, l'activation de la voie de signalisation qui découle de cette reconnaissance, l'effet sur les gènes de réponses et enfin les réponses physiologiques et développementales au niveau de la plante. Parmi les hormones végétales, les hormones stéroïdiennes appelées brassinostéroïdes (BRs) sont parmi les plus étudiées et les mieux comprises à ce jour. En effet, les mécanismes impliqués dans la biosynthèse des BRs, leur perception et l'activation de leur voie de signalisation ainsi que les gènes de réponses et leurs impacts sur le développement et la croissance des plantes, ont été largement étudiés ces dernières années. La régulation fine de leur récepteur BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) est aujourd'hui une thématique pouvant servir de levier de contrôle sur le développement des plantes. Ma thèse a donc pour but de caractériser la régulation post-traductionnelle du récepteur BRI1 dans la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Je vais donc poursuivre mon introduction en me focalisant sur les brassinostéroïdes et leur voie de

signalisation, puis sur les différents mécanismes permettant de réguler un récepteur membranaire, enfin sur le rôle des modifications post-traductionnelles avec un focus particulier sur l'ubiquitination en K63.

1.1 Les brassinostéroïdes (BRs), d'hormones de croissance à signaux moléculaires

1.1.1 Découverte et caractérisation des BRs

Les BRs ont été isolés à partir de grains de pollen (collectés sur des abeilles) de *Brassica napus*. Leur faculté à promouvoir la croissance des plantes lorsqu'ils sont appliqués de façon exogène a généré un intérêt scientifique important. Parmi les BRs, une molécule particulièrement active est connue sous le nom de brassinolide (BL) (**Figure 1**). La structure moléculaire du BL est très proche des hormones stéroïdiennes que l'on peut retrouver dans le règne animal, comme la testostérone, hormone sexuelle chez l'Homme (Bishop 2002). Une différence majeure entre les BRs et les stéroïdes animaux est que les BRs sont polyhydroxylés (4 hydroxylations chez les BRs contre 1 seule hydroxylation sur la testostérone). Dans les cellules animales, les hormones stéroïdiennes sont directement perçues par des récepteurs nucléaires capable de promouvoir ou de réprimer des gènes de réponses (Beato et al., 1995). Chez les plantes, ces hormones stéroïdiennes polyhydroxylées, moins hydrophobes, ont certainement plus de mal à franchir la membrane plasmique. Elles vont alors être reconnues spécifiquement par des récepteurs membranaires qui activent une voie de signalisation dont en découle l'activation de gènes de réponse (Tang et al., 2016).

L'application exogène de BL ou d'autres BRs proches conduit à la croissance de divers organes dont le mieux caractérisés est l'hypocotyle, la tige embryonnaire. L'hypocotyle de plantules ayant poussé à la lumière ne croit que par élongation cellulaire, et n'implique pas

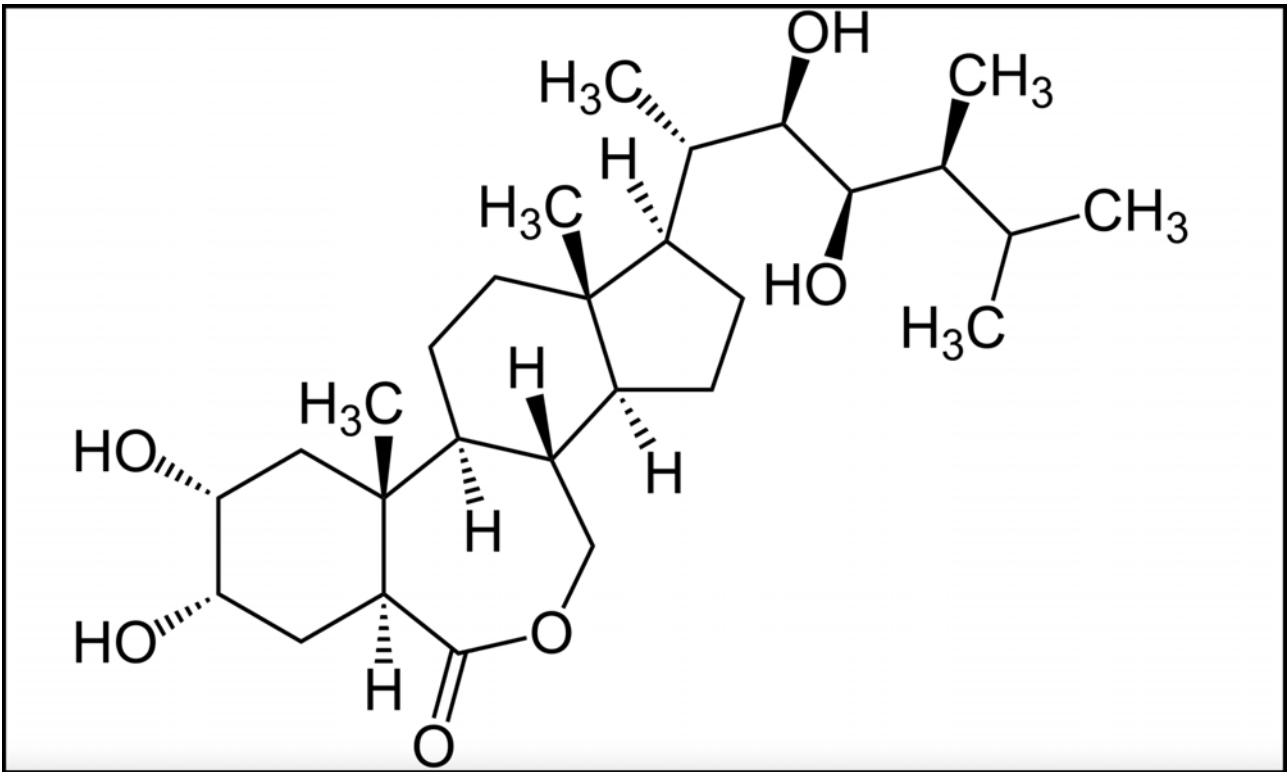


Figure 1 : Structure chimique d'un Brassinolide, forme active des Brassinostéroïdes (adapté de Bishop and Koncz, 2002)

de division cellulaire, suggérant que les BRs jouent un rôle majeur dans la croissance des cellules. Cependant, il a fallu attendre l'obtention de mutants affectés dans la voie de biosynthèse ou dans la voie de signalisation des BRs pour pouvoir vraiment définir le rôle physiologique de ces hormones. L'étude de tels mutants a permis de déterminer que les BRs ont des effets pléiotropiques sur le développement et la croissance de la plante. En effet, les plantes affectées dans la biosynthèse ou la voie de signalisation des BRs présentent un phénotype de nanisme, des feuilles plus sombres avec une épinnostie, une fertilité grandement réduite voire une stérilité, des pétioles plus courts et une réponse altérée aux changements lumineux (Li and Chory, 1997, Clouse, 2002). Ces phénotypes montrent l'importance des BRs dans le développement et la croissance des plantes. Lors d'une croissance à l'obscurité, des plantules mutantes pour la biosynthèse et la voie de signalisation des BRs montrent des hypocotyles plus courts, mais des cotylédons ouverts et une expression constitutive des gènes de réponse à la lumière (Clouse, 2002). Ces observations confirment le rôle majeur joué par les BRs dans la croissance et l'élongation cellulaire (Clouse et al., 1996).

Il est important de noter que lors d'une croissance à l'obscurité, l'ajout de BL exogène sature totalement la voie de perception/signalisation, ce qui conduit à la diminution de la taille de l'hypocotyle (Mussig et al., 2003). A la lumière en revanche, l'apport de BL exogène provoque une forte élongation de l'hypocotyle. Cela démontre l'importance pour la plante de finement réguler la quantité de BRs et leur voie de signalisation afin d'être dans des conditions optimales de croissance selon l'organe considéré, les conditions environnementales ou encore le stade de développement.

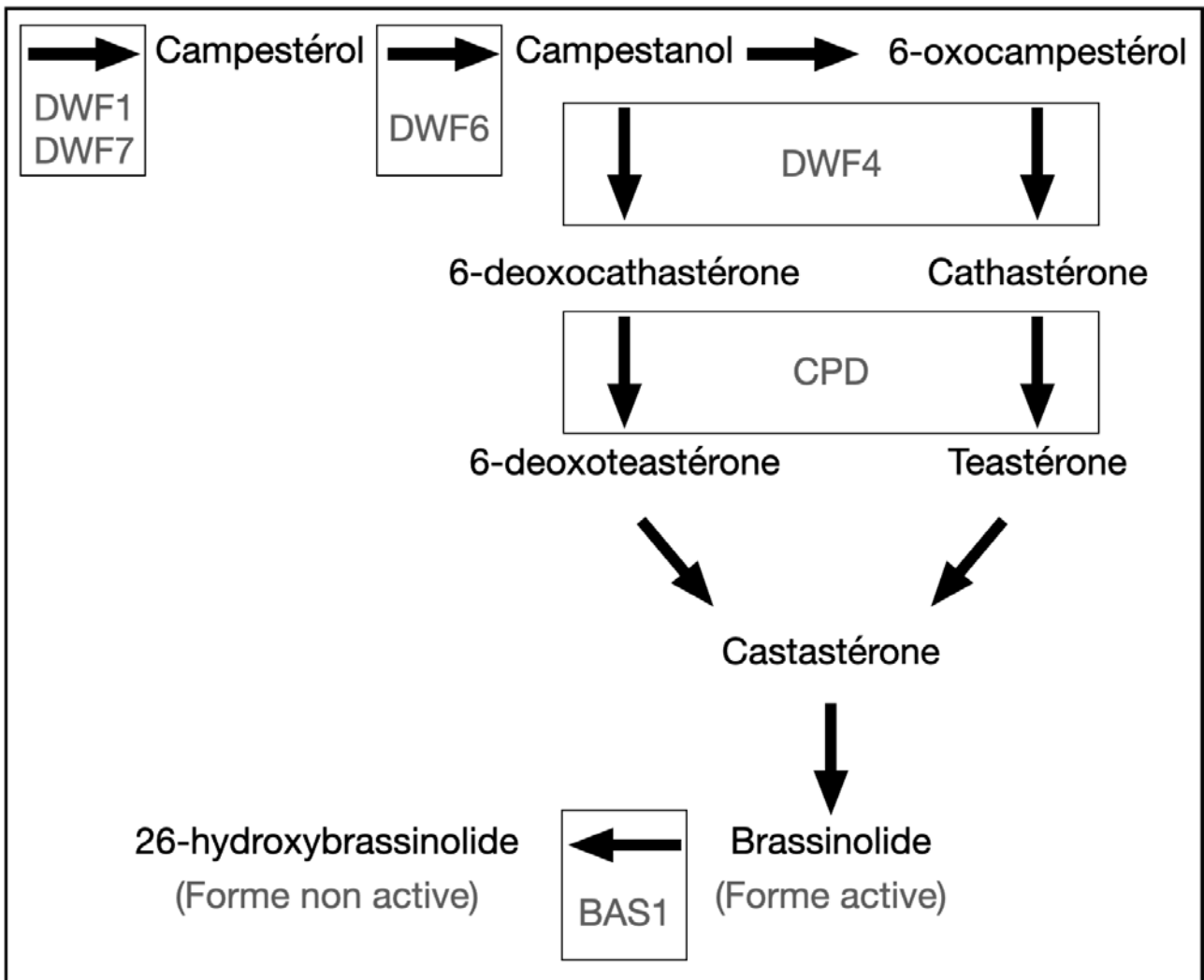


Figure 2 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des Brassinostéroïdes (adapté de Bishop and Koncz, 2002 et de Butenko and Aalen 2002). Y figure les étapes clés pour passer du précurseur des brassinostéroïdes le campésterol à la forme la plus active des BRs le brassinolide, les flèches noires représentent les réactions enzymatiques, la dernière réaction montre l'inhibition des brassinolides par l'enzyme BAS1.

1.1.2 Voie de biosynthèse des BRs

La voie de biosynthèse des BRs est une chaîne complexe de réactions enzymatiques comprenant des centaines d'étapes (**Figure 2**). En amont de cette voie, 2 enzymes bien caractérisées DWF1 (DWARF 1) (Cloe et al., 1999), STE1 (DWF7 / DWARF 7) (Cloe et al., 1999) permettent de produire le campestérol, précurseur des BRs. Ce sous-chapitre se concentrera sur les réactions essentielles permettant de passer du Campestérol jusqu'au BL.

Dans un premier temps, une enzyme ressemblant à une 5-alpha réductase permet de faire passer le Campestérol au Campestanol. Elle est codée par le gène *DET2* (*DE-ETIOLATED 2 / DWARF 6*). Ce dernier a été découvert lors d'un criblage de mutants montrant des phénotypes de croissance à la lumière (dé-étiolé) alors qu'ils ont poussé à l'obscurité. De plus, la plante mutante *det2* possède un fort phénotype de nanisme lors d'une croissance à la lumière. Ce mutant a été identifié comme pouvant affecter la voie de biosynthèse des BRs car *det2* montre un phénotype sauvage lors d'un traitement avec du BL (Li et al., 1996). Ensuite, c'est par marquage radioactif qu'il a été montré que le mutant *det2* est impacté dans la conversion du Campesterol au Campestanol (Fujioka et al., 1997).

A la suite de cette réaction, un cytochrome P450, DWF4 (DWARF 4), va permettre la transformation du Campestanol en 6-Deoxocathastérone et du 6-oxocampestérol (issu du Campestanol) en Cathastérone. *DWF4* a été identifié à la suite une analyse en génétique inverse, utilisant des banques de mutant à ADN-T, recherchant des phénotypes de nanisme similaire à *det2* (Choe et al., 1998).

Par cette même technique de criblage, un autre cytochrome P450 a été identifié, CPD (DWF3 / DWARF 3). (Szekeres et al., 1996) La Cathastérone s'est montrée inefficace pour restaurer le phénotype sauvage dans le mutant *cpd*. Là où la Teastérone et la 6-

Deoxoteastérone restaurent totalement le phénotype. Il en a été alors conclu que CPD est capable de transformer la Cathastérone en Teastérone et le 6-oxocampesterol en 6-Deoxoteastérone.

Enfin, la Teastérone et la 6-Deoxoteastérone vont alors entrer dans la voie de l'« oxydation C6 tardive », une chaîne de réactions qui conduisent à la formation de BL (Noguchi et al., 2000).

La voie de biosynthèse des BRs étant un levier important pour le développement de la plante, elle est fortement régulée par les BRs eux mêmes. La voie de signalisation qui en découle amène à la répression de la transcription de nombreux gènes de la voie de biosynthèse, tel que *DWF4*, *DWF7* et *CPD*.

Dans ce mécanisme de retro-contrôle, l'activation de la voie de signalisation va également activer la transcription du gène *BAS1* (*PHYBACTIVATION-TAGGED SUPPRESSOR1*). Ce dernier code pour une cytochrome P450 capable d'hydroxyler les BL en C-26 ce qui les inactive totalement. *BAS1* a été identifié par « activation tagging », technique qui consiste à générer aléatoirement des mutations dominantes par surexpression (Weigel et al., 2000). *bas1-D* restaure le phénotype de *phyB-4* (mutation d'un phytochrome provoquant l'élongation de l'hypocotyle) mais surtout ne possède plus de brassinolide. A l'inverse, la mutation *bas1* réduit la réponse à la lumière et provoque une accumulation de la forme brassinolide (Neff et al., 1999).

Une autre voie pour inhiber directement les BRs existe, en effet il a été montré dans *Brassica napus* que par O-Sulfonation de l'enzyme BNST3, il est possible de rendre les BL inactifs (Rouleau et al., 1999)

1.1.3 Découverte et caractérisation du récepteur membranaire BRI1

Pour essayer de mieux comprendre la voie de signalisation des brassinostéroïdes, deux cribles génétiques différents ont été effectués. Le premier a consisté à rechercher des mutants mutagénéisés à l'éthylméthylsulfonate résistants à la diminution de l'élongation racinaire induite par l'ajout de BL exogène (Clouse et al., 1996), alors que le deuxième était porté sur la recherche de phénotype de nanisme similaire à *det2* ou *cpd* ne pouvant revenir à l'état sauvage par l'ajout de BL (Li and Chory, 1997). Un mutant nommé *bri1* (ou *bin1*) a été découvert, ce dernier est insensible à un traitement BL et possède les caractéristiques d'un mutant impacté dans la voie des brassinostéroïdes : nanisme sévère, feuilles vertes foncées, dominance apicale, et stérilité (Li and Chory, 1997) (**Figure 3A**).

Le clonage positionnel du gène muté responsable du phénotype du mutant *bri1* a permis l'identification d'un récepteur de type Leucine Rich Repeat (LRR) Receptor Like Kinase (RLK) nommé BRI1 (Li and Chory, 1997). Sa partie extracellulaire possède une succession de 25 LRRs et d'un domaine appelé island domaine de 70 acides aminés situé entre le 21ème et le 22ème LRR (Li and Chory, 1997) (**Figure 3B**). Dès lors, comme BRI1 est un LRR-RLK, l'hypothèse que BRI1 serait le récepteur des brassinostéroïdes a été formulée. En effet, BRI1 est situé sur la membrane plasmique (Friedrichsen et al., 2000) et une étude va venir confirmer cette hypothèse en fusionnant le domaine extra cellulaire de BRI1 avec la kinase du LRR-RLK XA21 (responsable de l'activation de défense à un pathogène chez le riz) (He et al 2000). Lors d'ajout de BL dans le riz transformé avec cette construction, la plante induit une réponse de défense, montrant l'importance du domaine extracellulaire dans la perception des brassinostéroïdes en même temps qu'un mécanisme global autour

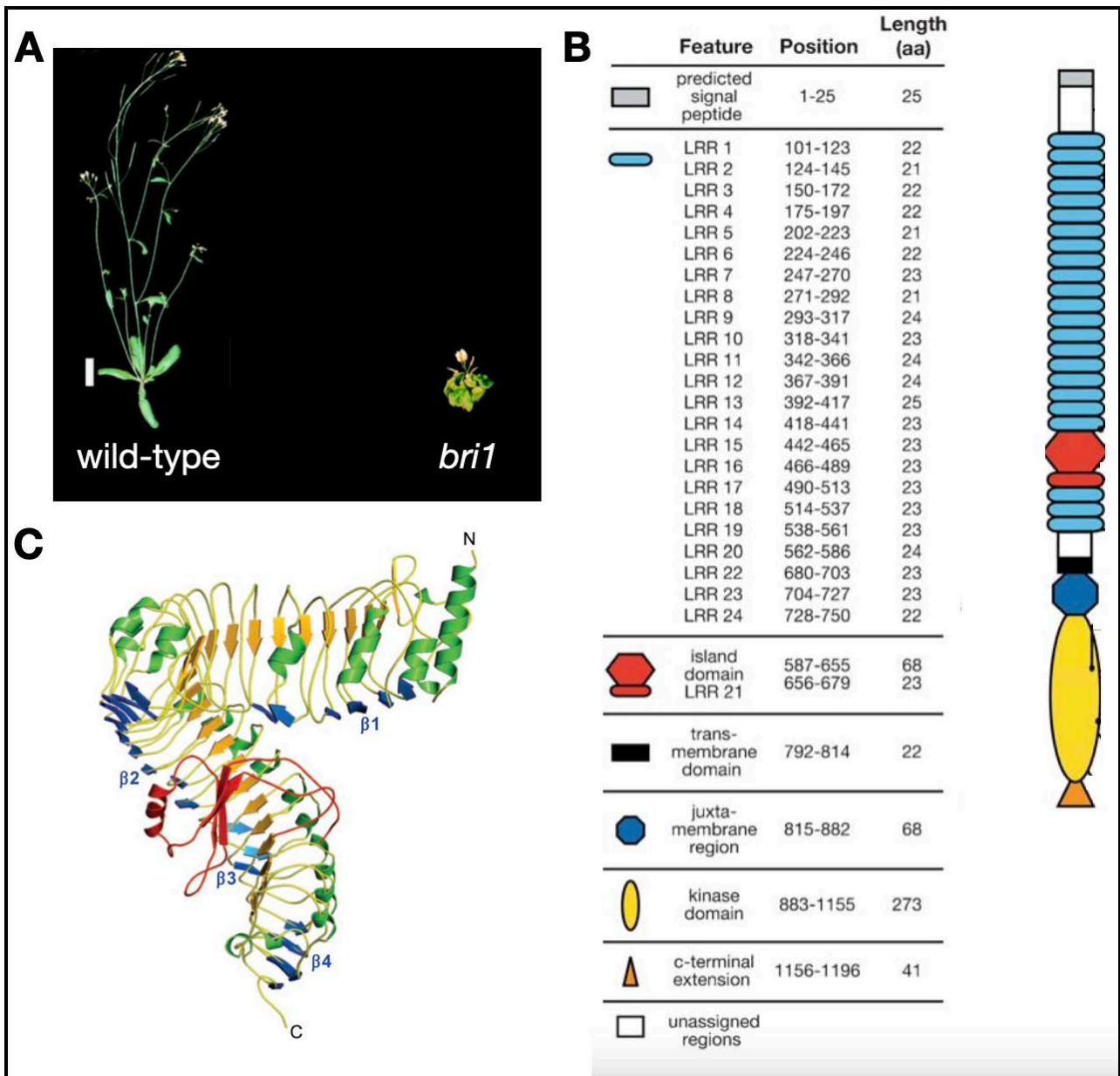


Figure 3 : BRI1, récepteur kinase principal des Brassinostéroïdes. A : phénotype du mutant *bri1* impacté dans la perception des brassinostéroïdes. B : Représentation schématique de l'architecture de BRI1 (adapté de Vert et al., 2005). C : Structure 3D issue de cristallographie du domaine extracellulaire de BRI1, en rouge le island domain où se fixe le ligand (adapté de Hothorn et al., 2011).

de la signalisation induite par des LRR-RLK (He et al 2000). Plus tard, il sera montré une interaction directe entre BRI1 et les brassinostéroïdes en utilisant des BLs radiomarqués dans une plante surexprimant BRI1-GFP (Wang et al., 2001). Toujours dans cette idée de mieux comprendre comment s'effectue la reconnaissance des brassinostéroïdes par BRI1, en utilisant de la Catastérone marquée avec de la biotine « photoaffinity » (BPCS) et différents fragments du domaine extra cellulaire de BRI1 produite chez *Escherichia coli*, il a été montré que les brassinostéroïdes sont capables de se lier avec le « island domain » et les LRRs 21 et 22 (Kinoshita et al., 2005). Le domaine extra cellulaire de BRI1 est séparé du domaine intracellulaire par un domaine transmembranaire constitué d'une seule hélice hydrophobe permettant son insertion dans la membrane plasmique (Nam et al., 2002). Grâce à de la cristallographie qui a révélé la structure 3D de BRI1, il a été mis en évidence que BRI1 peut former, lorsque son ligand s'est lié avec le « island domain », un dock d'amarrage afin d'interagir avec un co-récepteur (Hothorn et al., 2011) (**Figure 3C**).

Le domaine intracellulaire de BRI1 est quant à lui divisé en 3 sous domaines, un domaine juxtamembranaire, un domaine kinase et un domaine C-terminal (Vert et al., 2005). Chez les plantes, le domaine kinase est bien conservé et le mécanisme d'activation est similaire pour les RLK, là où on trouve plus de variabilité pour les domaines juxtamembranaire et C-terminal (Walker, 1994). Ces deux derniers domaines ont été montrés comme importants pour la régulation de l'activité du domaine kinase des RLK (Ullrich and Schlessinger, 1990). En mutant le domaine C-terminal de BRI1, une étude a démontré que le domaine C-terminal de BRI1 joue un rôle dans l'inhibition de l'activation de la kinase *in vitro* drastiquement mais plus légèrement *in planta* (Wang et al., 2005). De plus, en réalisant des versions tronquées de BRI1 et en testant l'état de phosphorylation de BRI1 à l'aide de différents anticorps anti-phosphorylation, il a été montré que le domaine juxtamembranaire de BRI1 est nécessaire pour l'autophosphorylation du domaine kinase (Oh et al., 2012).

Le domaine kinase quant à lui, a tout d'abord été caractérisé d'une activité sérine/thréonine kinase *in vitro* (Wang et al., 2005). Des études lui ont également montré une activité tyrosine kinase, avec deux tyrosines Tyr-831 et Tyr-956 jouant un important rôle dans l'autophosphorylation de BRI1 *in vitro* et *in vivo* (Oh et al., 2009).

A la recherche d'autres récepteurs des brassinostéroïdes, 3 autres LRR-RLKs ont été découverts par homologie de séquences dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, BRL1 (Brassinosteroid Receptor Like 1), BRL2 (Brassinosteroid Receptor Like 2) et BRL3 (Brassinosteroid Receptor Like 3) (Cano-Delgado et al., 2004). Seuls BRL1 et BRL3 sont capables de percevoir les brassinostéroïdes et ont un phénotype de nanisme lorsque mutés. Le triple mutant *bri1 bri1 bri3* montre un phénotype de nanisme plus fort que celui du simple mutant *bri1* avec une différenciation vasculaire anormale, ce qui appuierait l'hypothèse de la redondance fonctionnelle (Cano-Delgado et al., 2004). BRL2 ne possédant pas le island domaine permettant l'interaction avec les brassinostéroïdes, cela peut expliquer son incapacité à percevoir les BR (Cano-Delgado et al., 2004). La surexpression de BRL1 peut restaurer partiellement le phénotype de *bri1*, ce qui montre, malgré la redondance fonctionnelle, l'importance de BRI1 dans la perception des BR (Zhou et al., 2004)

Enfin le récepteur BRI1 est capable d'interagir avec lui-même et ainsi de former des homodimères (Friedrichsen et al., 2000). Le rôle de cette dimérisation BRI1/BRI1 reste encore flou à ce jour. L'homodimérisation de BRI1 pourrait permettre un changement de conformation et ainsi faciliter la liaison avec son ligand ou avec son corécepteur (Wang et al., 2005). L'hétérodimérisation avec les BRLs n'a jamais été encore montré cependant une hétérodimérisation avec d'autres LRR-RLKs de la famille des SERK (Somatic Embriogenic

Receptor-like Kinase) est possible mais aussi nécessaire à la perception et à l'activation de la voie de signalisation des brassinostéroïdes (Gou et al., 2012).

1.1.4 Voie de signalisation des BRs et activation de gènes résultant de cette voie.

Pour activer la voie de signalisation, BRI1 perçoit les BRs en interagissant avec un SERK. Parmi les SERKs, BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 / SERK3) a été finement étudié. BAK1 a été identifié par une technique d'« Activation tagging » (Li et al., 2002). L'identification de *bak1-D*, mutant restaurant partiellement la mutation de *bri1-5* (allèle faible de *BRI1*) a permis le clonage de BAK1 (Li et al., 2002). Les brassinostéroïdes ne se lient pas directement à BAK1 (Cano-Delgado, 2004) mais par cristallographie une étude a montré qu'ils s'insèrent dans un complexe entre BRI1, et les co-récepteurs SERK1 et BAK1 (Santiago et al., 2013). BAK1 comme BRI1 se retrouve à la membrane plasmique et montre une activité Serine/Thréonine kinase (Li et al., 2002). BAK1 a été montré comme interagissant avec la kinase de BRI1 dans un test de double hybride de levure (Nam and Li, 2002). Mais il a aussi été montré que les parties extracellulaires peuvent interagir entre elles (Jaillais et al., 2011). BRI1 et BAK1 sont capables de s'auto et se *trans*-phosphoryler entre eux (Li et al., 2002). BAK1 comme d'autres membres de la famille des SERKs peut servir de co-récepteur à d'autres LRR-RLK et donc influencer sur des voies de signalisation diverses activant *in fine* des réponses pour jouer sur le développement de la plante ou même activer des défenses face à des pathogènes (Clouse, 2011).

En présence de brassinostéroïdes, BRI1 change de conformation permettant l'interaction de BRI1 avec BAK1 (He et al., 2007) (**Figure 4**). BRI1 et BAK1 sont alors soumis à une *cis*- et *trans*-phosphorylation qui déclenche une cascade de phosphorylations (Belkhadir and Jaillais, 2015). Le complexe BRI1/BAK1 activé permet la phosphorylation des BSKs (BRASSINOSTEROID SIGNALING KINASE) (Sreeramulu et al., 2013). La phosphorylation

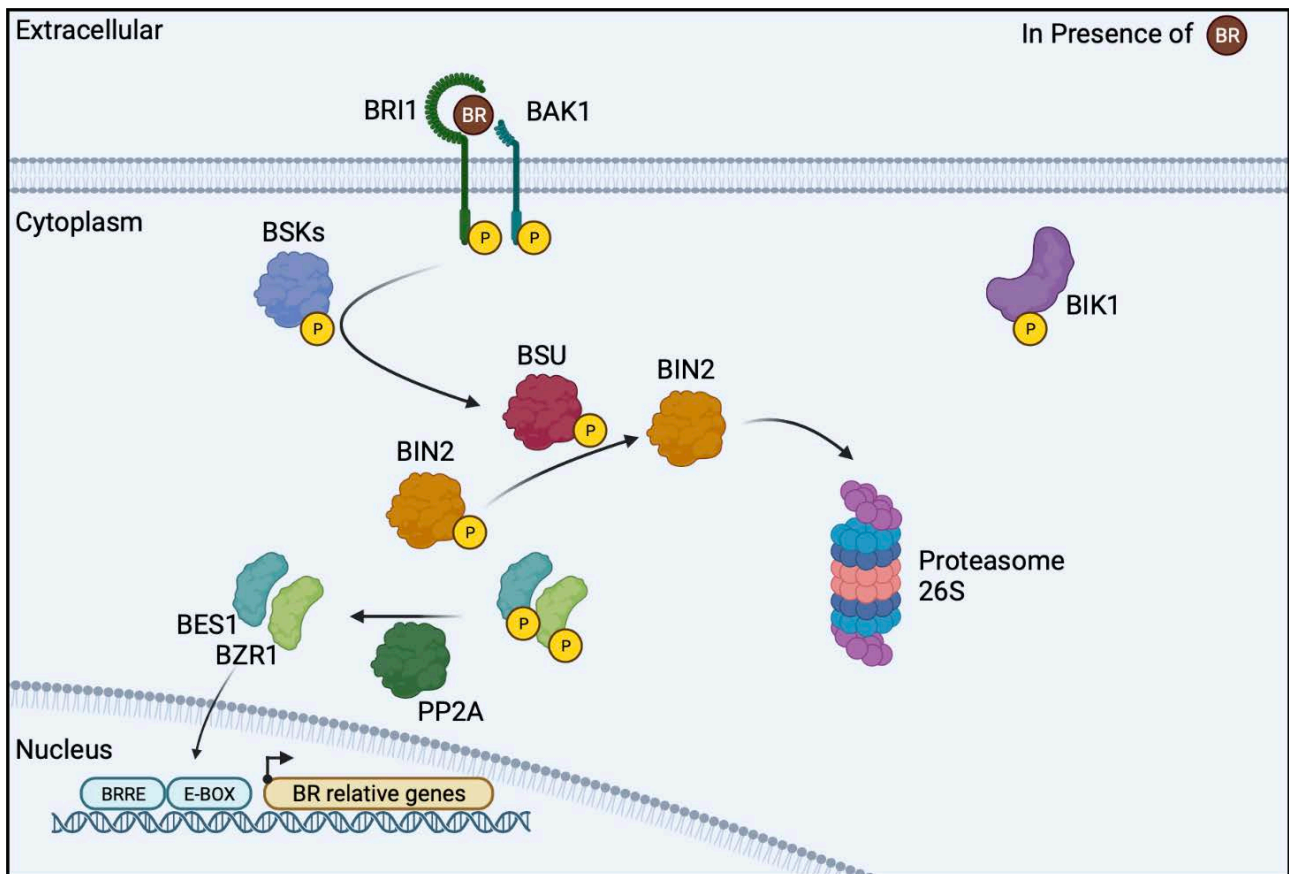


Figure 4 : Représentation schématique de la voie de signalisation des brassinostéroïdes activée par la présence de brassinostéroïdes (adapté de Wang et al., 2012). A la perception des brassinostéroïdes, BRI1 et BAK1 activent une cascade de phosphorylations envoyant BIN2 à la dégradation ce qui permet aux facteurs de transcription BES1 et BZR1 de réguler des gènes de réponses.

de la Sérine 230 de BSK1 promeut alors son interaction avec BSU1 (SERINE THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 1) et active sa kinase (Kim et al., 2009).

BSU1 est une Sérine/Thréonine phosphatase identifiée en recherchant des mutants dominants supprimant la mutant *bri1* (Mora-Garcia et al., 2004). BSU1, activé par la phosphorylation de BSK1, déphosphoryle le régulateur négatif de la voie de signalisation des brassinostéroïdes BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2) (Kim et al., 2009).

BIN2 a été identifié lors du même crible génétique que celui qui a permis d'identifier BRI1 (Li et al., 2001). Le mutant gain de fonction dominant *bin2-1* a un fort phénotype de nanisme quasiment similaire à l'absence de perception de BRs du mutant *bri1* (Li et al., 2001). Le gène *BIN2* code pour une kinase GSK3-like, et agit négativement sur la voie de signalisation des BR (Nam and Li, 2002). D'autres homologues de BIN2 ont été découverts par la suite dans la famille des GSK3 et agissent tous comme régulateurs négatifs (Vert and Chory, 2006, De Rybel et al., 2009). Plus tard, il a été montré que les kinases GSK3-like agissent globalement comme régulateurs des voies de signalisation chez les plantes (Youn and Kim, 2015). En absence de brassinostéroïdes, BIN2 est capable d'autophosphoryler sa Tyrosine 200, ce qui lui permet d'activer sa kinase et de jouer son rôle de régulateur négatif en phosphorylant et inactivant les facteurs de transcription BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1) et BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) (Wang et al., 2002, Yin et al., 2002). En plus d'inactiver ces facteurs de transcriptions, cette phosphorylation a été proposée comme les conduisant à une dégradation par le protéasome 26S (He et al., 2002), inhibant l'import, activant l'export nucléaire et empêchant leur fixation au niveau de leurs promoteurs cible. De plus, il a été montré que BIN2 catalyse la liaison de BZR1 avec les 14-3-3 qui vont ainsi favoriser la désactivation de BZR1 (Gampala et al., 2007).

En présence de brassinostéroïdes, BSU1 déphosphoryle les GSK3s dont BIN2 ce qui les conduit à une désactivation (Kim et al., 2011). Cette déphosphoration amorce la dégradation de BIN2 par le protéasome 26S (Peng et al., 2008). Les GSK3s ainsi désactivées, une phosphatase PP2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A) peut alors déphosphoryler les facteurs de transcription BES1 et BZR1 (Tang et al., 2011).

BES1 et BZR1, une fois déphosphorylés, vont alors s'accumuler dans le noyau et interagir avec l'ADN pour réguler la transcription des gènes cibles de réponses à la voie de signalisation des brassinostéroïdes (Vert and Chory, 2006). Ces deux facteurs, qui sont des bHLH (basic Helix Loop Helix-type), reconnaissent différentes séquences dans les promoteurs des gènes de réponses aux brassinostéroïdes (Shi et al., 2022). BZR1 reconnaît des motifs contenant CGTGT/CG appelés BRRE (BRassinosteroid Response Element) (He et al., 2005). BES1 s'associe avec BIM1 (BES1-INTERACTING MYC LIKE 1) pour reconnaître des motifs CANNTG appelés « E-box element » (Yin et al., 2005). Plus tard d'autres facteurs de transcriptions régulés par des GSK3s et régulant des gènes de réponses ont été découverts BEH1 (BES1/BZR1 HOMOLOG 1), BEH2 (BES1/BZR1 HOMOLOG 2), BEH3 (BES1/BZR1 HOMOLOG 3) et BEH4 (BES1/BZR1 HOMOLOG 4) (Shi et al., 2022). BEH3 et BEH4 ont été montrés comme capables tous les deux de reconnaître à la fois des motifs BRRE et des motifs E-box (Furuya et al., 2021). Les premiers travaux sur BES1 et BZR1 avaient conclu sur un rôle de répresseur pour BZR1 et d'activateur pour BES1, cependant des expériences d'immunoprécipitation de chromatine couplées à l'utilisation de puces à ADN (ChIP-chip) ont révélé que BES1 et BZR1 peuvent réguler positivement et négativement la transcription de leurs gènes cibles (Sun et al., 2010). Ces facteurs de transcription contrôlent la transcription des gènes de réponse aux brassinostéroïdes qui interviennent dans de nombreux modes de développement des plantes, comme l'élongation cellulaire et l'organisation de la paroi cellulaire par la régulation

des gènes liés aux auxines et des canaux de transport des ions comme les canaux K⁺ (Goda et al., 2002). De plus, ils peuvent également réguler d'autres voies en agissant sur les protéines liées à la calmoduline et la voie de l'acide jasmonique (Goda et al., 2002). Mais ils sont aussi capables de réguler directement d'autres facteurs de transcription, et ainsi d'agir globalement sur d'autres voies de signalisation, ce qui montre l'aspect central de la voie de signalisation des brassinostéroïdes sur le développement de la plante (Yu et al., 2011).

Outre l'activation des gènes intervenant dans le développement et la croissance de la plante, lors d'une trop grande activation de la voie de signalisation des BRs, BZR1 et BES1 vont également servir à l'inactivation de la production des brassinostéroïdes en activant la transcription de gènes de rétro-contrôle, comme BAS1 (PHYB-4 ACTIVATION-TAGGED SUPPRESSOR 1) et SOB7 (CYP72C1) qui inhibent directement la forme bioactive des BR par une hydroxylation en C-26 (Li et al., 2018) (Turk et al., 2005). La plante va également inhiber la voie de biosynthèse des BRs pour compenser, BES1 et BZR1 vont alors inhiber la transcription des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse comme STE1 (DWF7), CPD ou DWF4 (Tanaka et al., 2005).

1.2 BRI1, un récepteur finement régulé

1.2.1 Inhibiteurs de l'activation du récepteur

La voie de signalisation des brassinostéroïdes se doit d'être finement régulée pour éviter une croissance anarchique de la plante. Pour cela de nombreux mécanismes sont mis en place, particulièrement en réprimant l'activité de BRI1.

BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR 1) joue un rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation des BR (Jaillais et al., 2011). BKI1 est ancré dans la membrane plasmique et

interagit avec elle de manière électrostatique grâce sa boucle membranaire, et ses acides aminés chargé positivement, Lysines et Arginines, interagissent avec PtdIns(4)P qui est lui chargé négativement (Simon et al., 2016). Cette interaction à la membrane plasmique peut être levée par l'ajout de BR qui va phosphoryler une tyrosine de la boucle membranaire de BKI1, ce qui entraîne l'internalisation de BKI1 depuis la membrane plasmique (Jaillais et al., 2011). En absence de brassinostéroïde, BKI1 forme un complexe avec BRI1 (Wang and Chory, 2006). Ceci empêche l'interaction de BRI1 avec BAK1 et donc empêche leur auto et trans-phosphorylation (Belkhadir and Jaillais, 2015).

PP2A, bien qu'essentiel à l'activation de la voie de signalisation des BR en convertissant les facteurs de transcription en leur forme active, les sous unités B de la famille des PP2A peuvent également déphosphoryler BRI1 et ainsi le rendre inactif (Wang et al., 2016). La localisation de ces déphosphorylases impacteraient donc leur rôle et ainsi peuvent activer ou réprimer la voie de signalisation des BRs.

1.2.2 Endocytose des récepteurs membranaires

L'endocytose est également un mécanisme essentiel dans la régulation des protéines membranaires et de BRI1. L'endocytose consiste en l'internalisation de protéines membranaires, de lipides et autres constituants de la membrane vers de petites vésicules appelées endosomes (Valencia et al., 2016).

L'endocytose permet de réguler rapidement la réponse d'une voie de signalisation, la plante peut donc l'utiliser face à des stress biotiques comme c'est le cas pour FLS2 (FLAGELLIN-SENSITIVE 2) où la reconnaissance du ligand est associée à l'endocytose du récepteur (Robatzek et al., 2006). L'endocytose joue un rôle également dans la tolérance aux stress abiotiques, BRI1 est internalisé lors d'une élévation légère de la température

(Martins et al., 2017). Elle est induite dans le développement de la plante par des concentrations en nutriments comme le sucrose qui internalise PIN2 (ARABIDOPSIS THALIANA PIN-FORMED 2) (Osorio-Navarro et al., 2022). Enfin l'excès de métaux (Mn, Zn et Co) conduit à l'internalisation d'IRT1 (IRON-REGULATED TRANSPORTER 1) (Dubeaux et al., 2018).

La première étape de ce mécanisme consiste au retrait d'une protéine de la membrane plasmique, permettant à la protéine internalisée d'être recrutée au sein d'un endosome qui fusionne ensuite avec des vésicules dérivées du Golgi (Valencia et al., 2016). Ce procédé d'internalisation encore très peu détaillé dans le domaine végétal peut déjà se différencier en 2 catégories, l'internalisation CME (clathrin-mediated endocytosis) et l'internalisation CIE (clathrin-independant endocytosis) (Valencia et al., 2016) (**Figure 5**). La voie passant par la CME semble prédominante chez les plantes (Dhonukshe et al., 2007). Elle est centrale à l'internalisation d'un grand nombre de protéines membranaires agissant dans la croissance, le développement, l'apport de nutriment et les stress biotiques et abiotiques (Narasimhan et al., 2020). De nombreuses protéines membranaires ont été montrées comme pouvant être internalisées par l'intermédiaire des cages de clathrines, tels que PIN1 (ARABIDOPSIS THALIANA PIN-FORMED 1) et PIN2 (Dhonukshe et al., 2007), FLS2 (Mbengue et al., 2018) ou même BRI1 (Irani et al., 2012). Chez les animaux, la CME est bien plus décrite que chez les plantes, malgré un mécanisme similaire des différences subsistent (Valencia et al., 2016). Les clathrines n'interagissent pas directement avec la membrane où les protéines membranaires à endocyter, mais à travers d'adaptateurs comme le complexe AP2 (ADAPTATOR PROTEIN 2). Dans le domaine animal, ce complexe est montré comme essentiel au recrutement des clathrines (McMahon and Boucrot, 2011). Les plantes, quant à elles, restent viables même si fortement affectées sur leur

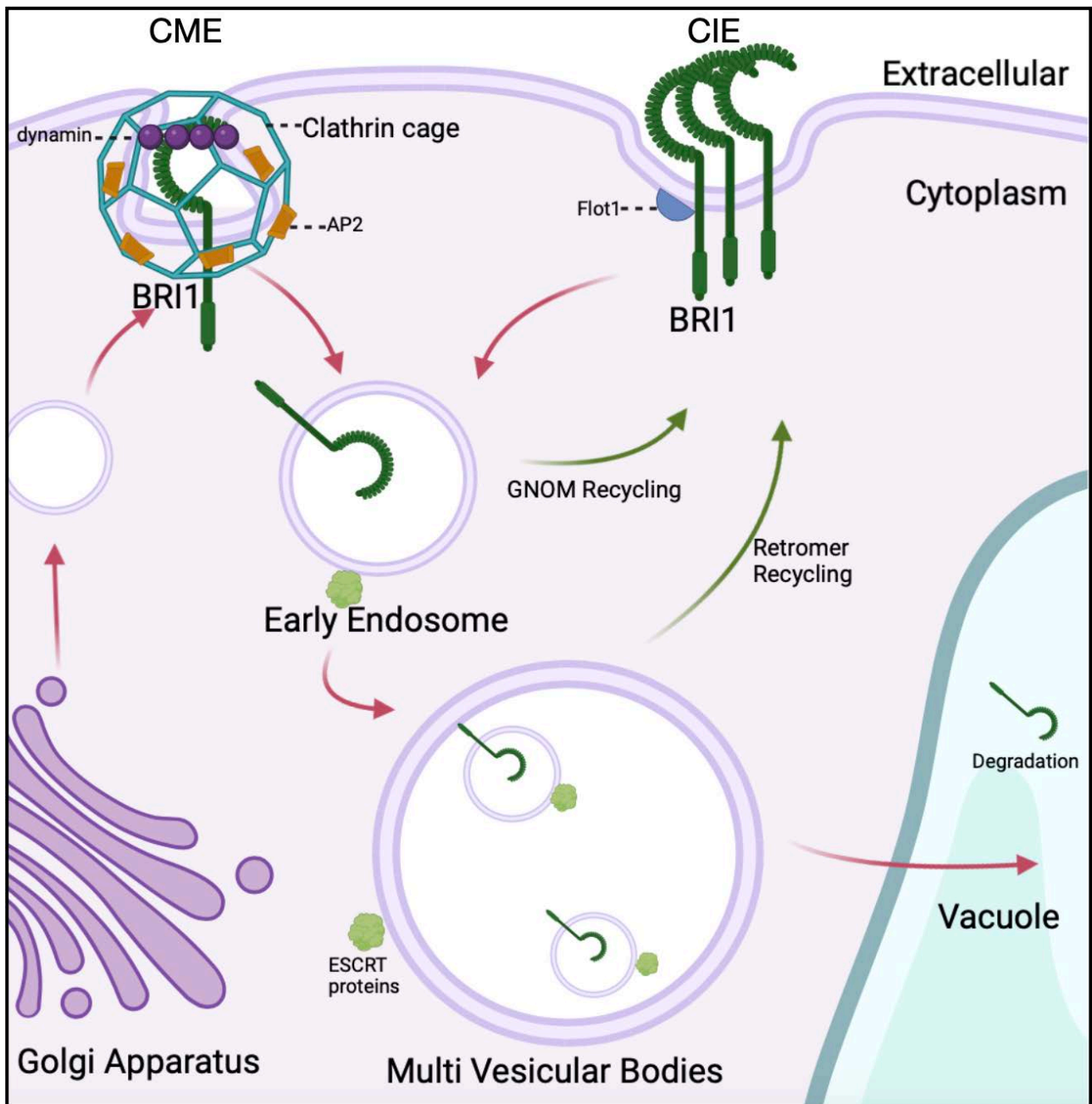


Figure 5 : Schéma simplifié représentant les deux voies d'endocytose de BRI1 et le trafic cellulaire qui en découle (adapté de Valencia et al., 2016). BRI1 peut être internalisé par l'intermédiaire ou non des cages de clathrines, les endosomes convergent avec le TGN et sont ensuite maturés sous forme de MVBs puis envoyés à la vacuole pour dégradation. Des recyclages peuvent avoir lieu à différents stades pour relocaliser les protéines membranaires vers la membrane plasmique.

développement lorsque des sous-unités composant AP2 sont mutées (Fan et al., 2013, Valencia et al., 2016). Autre différence avec les animaux, les plantes possèdent encore un complexe d'adaptateurs ancestral appelé TPLATE. Ce complexe composé de 8 sous unités est requis chez les plantes pour initier la CME en recrutant des adaptateurs comme AP2 (Gadeyne et al., 2014). Il interagit avec les clathrines et également avec des protéines liées aux dynamines (DRPs) qui assurent le maintien et la scission de la vésicule issue de la membrane plasmique (Gadeyne et al., 2014, Antony et al., 2016). La CIE moins décrite dans la littérature reste une voie alternative importante pour les plantes (Ivanov and Vert, 2021). Dans des conditions de croissances normales, des protéines ancrées à la membrane plasmique peuvent être internalisées par CIE (Baral et al., 2015). Sous stress salin, des protéines transmembranaires sont également internalisées par cette voie comme pour l'aquaporine PIP2;1 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;1) (Li et al., 2011). Lors d'ajout de BRs, BRI1 est recruté au sein de nanodomains et interagit avec FLOT1 (FLOTILLIN1) (Wang et al., 2015). Cette protéine associée aux nanodomains ne co-localisant pas avec les clathrines participe à la CIE (Li et al., 2012). L'internalisation de BRI1 peut donc être dépendant de la CME ou de la CIE en fonction des conditions environnantes et de la localisation au sein de la membrane (Irani et al., 2012, Wang et al., 2015). Le type d'internalisation n'est donc pas fixé pour une protéine donnée mais variable en fonction de la situation.

Une fois internalisées, ces protéines sont transportées dans des vésicules appelées endosome précoce (EE), ces derniers convergent avec les voies du trafic sécrétoire de l'appareil de Golgi (Dettmer et al., 2006). Là, ils peuvent maturer sous forme d'endosome tardif (LE). Ces endosomes tardifs peuvent devenir des corps multi-vésiculaires (MVB) en intégrant par invagination des vésicules intraluminales endosomales

(ILVs). Ces MVBs peuvent fusionner avec la vacuole où les protéines membranaires seront dégradées par hydrolyse (Reyes et al., 2011).

Durant ce trafic cellulaire, les endosomes sont escortés par des complexes protéiques nommés ESCRT (ENDOSOMAL SORTING COMPLEX REQUIRED FOR TRANSPORT) (Valencia et al., 2016). Chez les plantes il en existe 3, ESCRT-I, II, III (Fan et al., 2015). Agissant de l'EE au MVB, les complexes ESCRT ont également été montrés comme essentiels à la formation des MVBs (Gao et al., 2015). En cascade de réactions, ils déforment la membrane de l'endosomes pour invaginer les protéines membranaires dans les ILVs (Gao et al., 2017). Chez les animaux, ESCRT-0 initie le mécanisme. Chez les plantes on retrouve un complexe similaire, appelé ESCRT-0 like, constitué de protéines TOLs (TOM1-LIKE), il interagit avec les clathrines et est reconnu par ESCRT-I pour démarrer la machinerie conduisant à la formation des MVBs (Korbei et al., 2013). ESCRT-I et ESCRT-II déforment la membrane pour préparer l'invagination puis ESCRT-III termine la déformation, permet de faire une constriction et une scission (Wollert et al., 2009, Wollert and Hurley, 2010, Elia et al., 2011). Enfin un dernier complexe SKD1/VPS4 (SUPPRESSOR OF K⁺ TRANSPORT GROWTH DEFECT1 / VACUOLAR PROTEIN SORTING 4) recycle les complexes ESCRT, (Gao et al., 2017).

Une fois internalisées, toutes les protéines ne sont pas pour autant directement envoyées à la vacuole pour dégradation, il existe un mécanisme de recyclage permettant de renvoyer ces protéines à la membrane plasmique (Valencia et al., 2016). Ce recyclage permet de répondre rapidement à un changement environnemental tout en évitant la néo-production de protéines (Clague and Urbe, 2006). Il peut intervenir au stade EE, LE ou même aux premiers stades de formation des MVB (Robinson and Neuhaus, 2016). Ce procédé n'utilise pas la même machinerie que pour le trafic cellulaire, au lieu d'utiliser les complexes ESCRT

ce sont des petites GTPases qui vont conduire les endosomes à revenir à la membrane plasmique (Rodriguez-Furlan et al., 2019). Parmi elles, GNOM (EMBRYO DEFECTIVE 30) semble jouer un rôle important dans le recyclage des endosomes vers la membrane plasmique, en atteste l'incapacité de recycler la protéine PIN1 dans le mutant *gnom* (Naramoto et al., 2014). Il existe également un complexe appelé retromer capable de recycler des protéines membranaires comme PIN1 au stade du MVB (Jaillais et al., 2006, Jaillais and Gaude, 2007).

Différents colorants et drogues ont été utilisées pour étudier et caractériser l'endocytose parmi elle un colorant FM4-64 et un inhibiteur la BFA (Brefeldin A) restent à ce jour encore essentiels. Le FM4-64 est un colorant marquant spécifiquement les membranes et les vésicules membranaires (Bolte et al., 2004). Il a été utilisé pour découvrir de nombreux gènes jouant un rôle dans l'endocytose et dans le trafic cellulaire qui en découle (Dettmer et al., 2006). La BFA, bloque le trafic cellulaire (Lippincott-Schwartz et al., 1991). Formant des agrégats à partir des endosomes, elle permet également de quantifier plus facilement les endosomes par microscopie (Lam et al., 2009).

1.2.3 Rôle des nanodomains dans l'inactivation de la voie de signalisation des BRs

La membrane plasmique accueille un très grand nombre de protéines ancrées ou transmembranaires. Historiquement, la membrane plasmique était compartimentée biochimiquement en deux fractions, la fraction résistante aux détergents et l'autre sensible (Jaillais and Ott, 2020). Les nouvelles techniques de microscopie comme le TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) et la microscopie à super résolution ont permis de sous diviser la membrane en nanodomains où diffusent les protéines (Johnson and Vert, 2017, Schubert, 2017). La diffusion des protéines au sein de ces nanodomains a pu être étudiée

grâce au FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ou à l'imagerie de molécule unique (SMLM : Single Molecule Localization Microscopy) (Jaillais and Ott, 2020).

On retrouve localisées exclusivement dans ces nanodomaines des protéines appartenant à la famille des REMs (REMORIN) spécifiques au domaine végétal et à la famille des SPFH qui comprend différentes sous familles de protéines Stomatine, Prohibitine, Flotilline, Erline et des protéines de réponses à des stress les HIRs (HYPERSENSITIVE INDUCED REACTION) (Martinière and Zelazny, 2021). La surexpression de REM1;2 provoque une augmentation des nanodomaines dans la membrane (Huang et al., 2019). REM1;2 et REM1;3 co-localisent avec les nanodomaines de FLS2, là où REM6;2 se retrouve dans les nanodomaines contenant BRI1 (Bücherl et al., 2017). Les remorines et les flotillines semblent jouer un rôle important dans la stabilité des nanodomaines (Jaillais and Ott, 2020).

Un exemple de la régulation par les nanodomaines, est l'inhibition du transporteur d'ammonium AMT1;3 (AMMONIUM TRANSPORTER 1;3) qui est inactif lors qu'il se forme des trimères d'AMT1;3 au sein d'un nanodomaine, ce qui a pour conséquence de protéger la plante d'un niveau toxique d'ammonium dans son milieu (Wang et al., 2013).

De plus, il a été montré que ces nanodomaines peuvent jouer un rôle important et indépendant de la CME dans l'endocytose de protéines membranaires (Fan et al., 2015). Des protéines comme RbohD (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D) peuvent lors d'un stress salin être internalisées après leur accumulation dans un nanodomaine (Hao et al., 2014).

La diffusion de BRI1 semble restreinte dans certains nanodomaines (Wang et al., 2015) (**Figure 6**). Une étude a mis en évidence l'impact de ces nanodomaines sur la perception

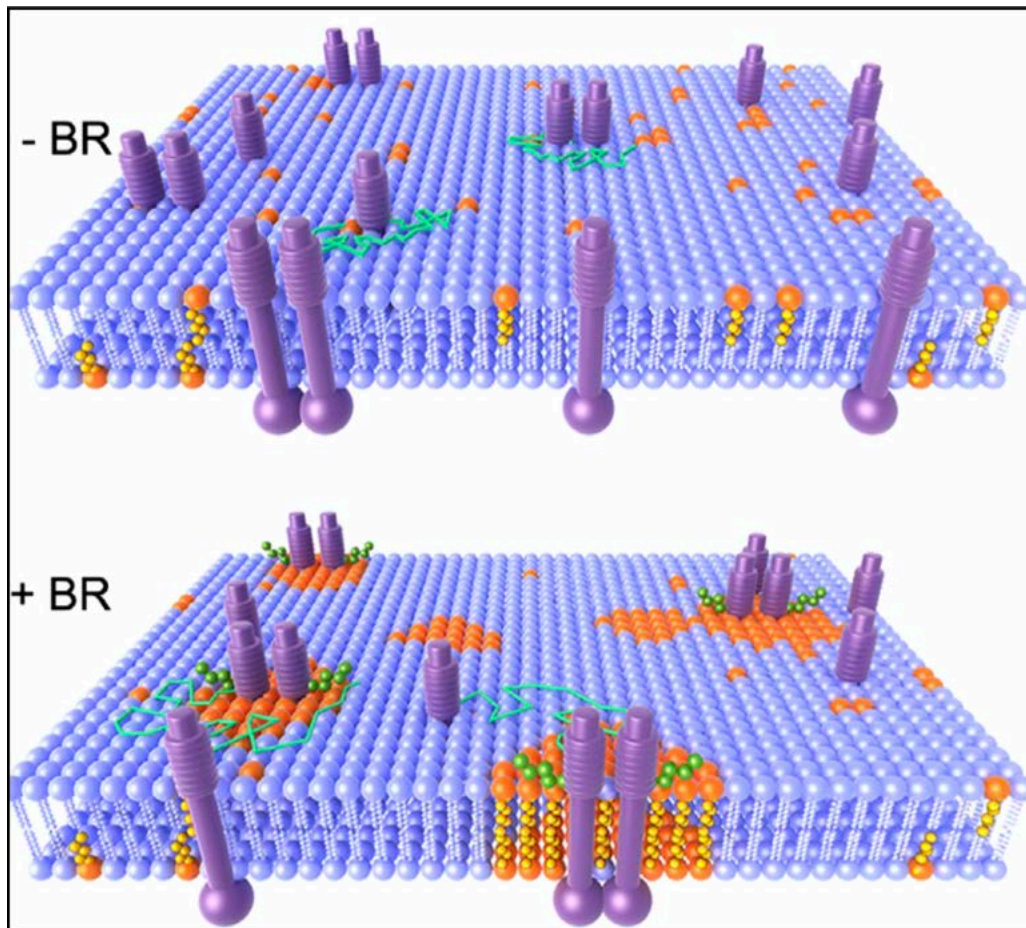


Figure 6 : Modélisation 3D du changement de type de diffusion de BRI1 restreint dans des nanodomains en présence de son ligand (adapté de Wang et al., 2015). L'ajout de brassinostéroïdes exogènes conduit BRI1 à se concentrer au sein de nanodomains dans la membrane plasmique représentés en orange.

de BRI1 des brassinostéroïdes et donc sur l'activation de la voie de signalisation (Wang et al., 2015). Par la même méthode, plus tard il a été montré que BRI1 et BAK1 évoluent dans des nanodomains distincts en absence de BRs (Hutten et al., 2017). Cependant, lors d'ajout de BRs, ils n'ont pas réussi à montrer le regroupement de BRI1 et BAK1 au sein d'un même nanodomaine ce qui pourtant doit être le cas comme ils interagissent l'un avec l'autre pour transmettre le signal (Hutten et al., 2017).

1.3 L'ubiquitination en K63, une modification post traductionnelle centrale au trafic intracellulaire

1.3.1 Les différents types d'ubiquitinations

Plusieurs modifications post traductionnelles (PTM) régulent l'activité et la stabilité de BRI1. Comme décrit précédemment, les Tyr-831 et Tyr-956 peuvent être phosphorylées permettant ainsi d'activer la kinase de BRI1 (Oh et al., 2009). Mais BRI1 est également cible d'ubiquitination.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle majeure qui agit de différentes manières sur la régulation des protéines (Clague et al., 2015). Chez la levure et les animaux, cette PTM a été montrée comme essentielle pour internaliser des protéines membranaires (Lauwers et al., 2010). L'ubiquitination consiste à fixer un polypeptide de 76 acides aminés, appelé ubiquitine (Ub), sur une protéine cible (Mukhopadhyay and Riezman, 2007).

Le mécanisme d'ubiquitination est un processus avec 3 acteurs différents, une enzyme E1 dite d'activation, une enzyme E2 dite de conjugaison et une enzyme E3 dite ligase qui permet la reconnaissance de la protéine cible. Ensemble, elles vont permettre la liaison de manière covalente du polypeptide d'ubiquitine sur une lysine (K) de la protéine cible.

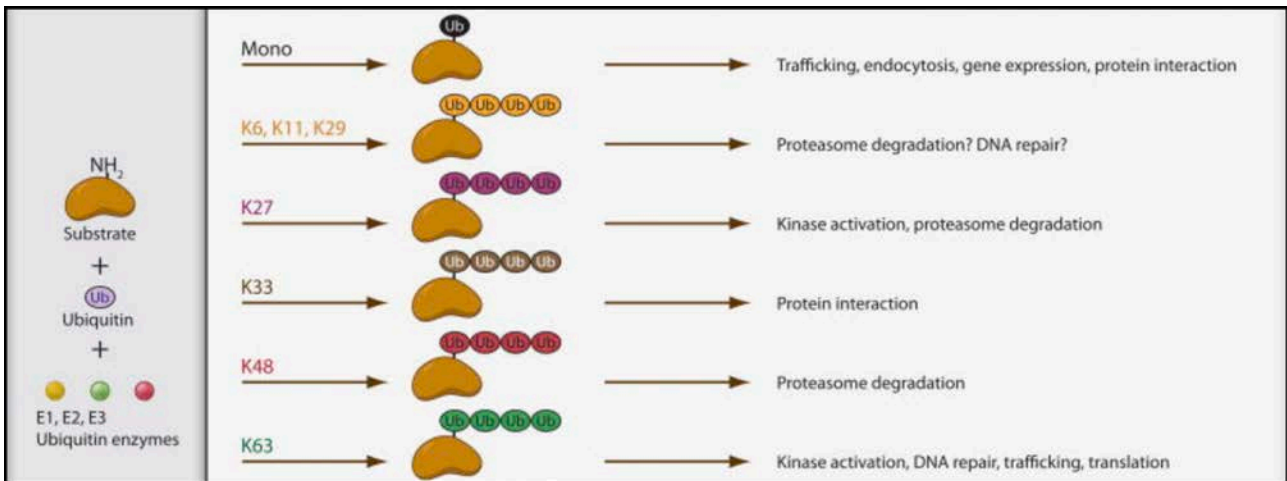


Figure 7 : Schéma résumant les différentes fonctions connues des chaînes de poly-ubiquitination (adapté de Malynn and Ma, 2010). L'enzyme de conjugaison E2 permet une topologie spécifique des chaînes de poly-ubiquitination conduisant à des fonctions variées sur la protéine cible.

Comme la séquence de la molécule d'ubiquitine contient elle aussi des lysines, elle peut aussi être cible d'ubiquitination et ainsi former des chaînes de poly-ubiquitine à partir d'une de ses 7 lysines. On les appelle donc K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63 selon la Lysine impliquée dans la formation de la chaîne. (Adhikari and Chen, 2009). Une protéine peut donc être mono- ou poly-ubiquitinée. Chaque type d'ubiquitination peut conduire à des rôles différents sur la protéine cible (**Figure 7**).

Les principales poly-ubiquitinations (poly-Ub) chez les plantes sont la poly-Ub en K48 et en K63. La poly-Ub en K48 est caractérisée comme menant à la dégradation par le protéasome 26S, comme dans la voie de signalisation de l'auxine où des protéines régulatrices de transcriptions, les Aux/IAAs comme BDL ou SHY2, sont dégradées après avoir été cibles d'une poly-Ub en K48 par le complexe SCF(TIR) (Maraschin et al 2009). La poly-Ub en K63 a été montrée elle comme agissant dans l'endocytose, le trafic intracellulaire, la réponse aux dommages de l'ADN ou encore l'activation des kinases (Breeze, 2020).

L'enzyme de conjugaison E2 est vraiment centrale à la poly-ubiquitination car c'est elle qui détermine le type de chaînes d'ubiquitine formée (Brillada and Trujillo, 2022), sauf pour les E3 de la famille HECT. Enfin, il existe plus de 1500 ligases E3 spécifiques à leurs cibles et capables de s'associer avec les 43 enzymes E2 trouvées dans le génome d'*Arabidopsis* (Gao et al., 2017) (Romero Barrios and Vert, 2018).

1.3.2 L'ubiquitination en K63 et le trafic intracellulaire

Chez *Arabidopsis thaliana*, la poly-ubiquitination en K63 est seulement produite par deux E2 enzymes, UBC35 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 35) et UBC36 (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME 36) (Romero Barrios et al., 2019) (**Figure 8A**).

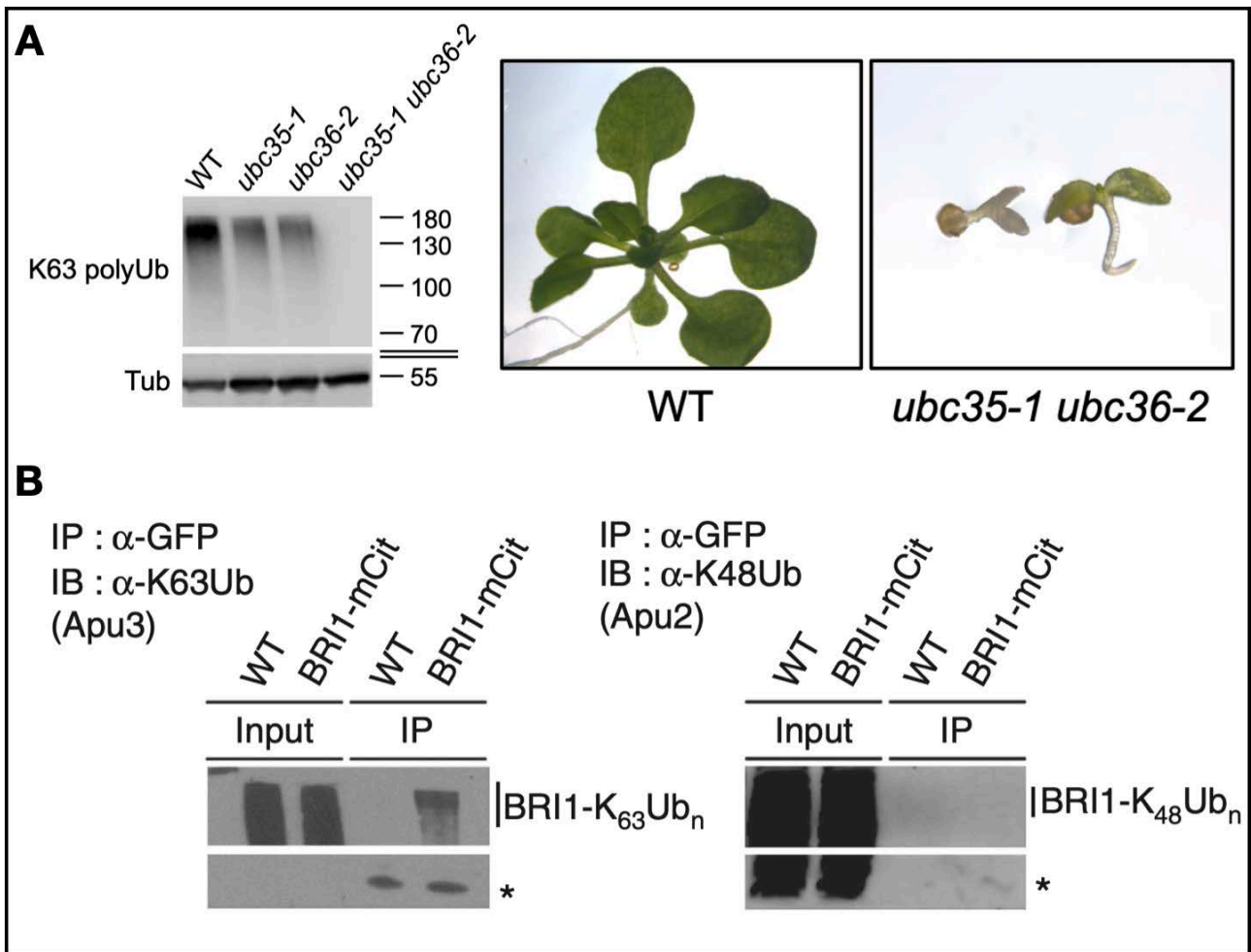


Figure 8 : UBC35 et UBC36 sont responsables de la poly-ubiquitination en K63, affectant BRI1. A : A gauche, western blot anti chaînes de poly-ubiquitination en K63 dans les mutants *ubc35*, *ubc36* et *ubc35 ubc36*, à droite, phénotype fort de retard développemental du double mutant *ubc35 ubc36* (adapté de Romero-Barrios et al., 2019). B : Profil d'ubiquitination de BRI1*mCitrine* en utilisant différents anticorps spécifiques des chaînes de poly-ubiquitination après une immunoprécipitation sur la *mCitrine* (adapté de Martins et al., 2015).

Ces E2 enzymes forment des complexes comme les autres E2 avec 4 différentes UEV1 (de UEV1A à UEV1D) pour former la chaîne d'ubiquitine en K63 (Guo et al., 2016). Le double mutant *ubc35-1 ubc36-2* montre des plantules avec un fort défaut de germination, un développement fortement impacté avec parfois une impossibilité de dépasser le stade post cotylédon, ce qui montre l'importance de la polyUb en K63 sur le développement de la plante en général (Romero Barrios et al., 2019). Il a été montré que la mutation *ubc35-1* est suffisante pour empêcher la ramification racinaire lors d'une carence en fer et pour déréguler les gènes exprimés dans cette condition (Li and Schmidt, 2010). En réalisant des mutants non ubiquitinables, KR (où des Lysines ont été remplacées par des Arginines), le lien entre la polyUb en K63 et l'endocytose a été suggéré, comme dans le cas du transporteur du fer IRT1 est inhibée (Dubeaux et al., 2018). La polyUb en K63 semble aussi nécessaire pour l'internalisation et le trafic cellulaire de PIN2 (Leitner et al., 2012). Enfin, BRI1 n'est plus internalisé dans un mutant 25KR, et inversement il est davantage internalisé dans une forme artificiellement ubiquitiné (Martins et al., 2015).

BRI1 peut être mono et poly-ubiquitiné indépendamment de la reconnaissance de son ligand (Martin et al., 2015). Les lysines cibles de ses ubiquitinations restent encore à ce jour à déterminer. Cette même étude démontre que BRI1 est sujet à une poly-ubiquitination en K63 (Martins et al., 2015) (**Figure 8B**).

Très récemment, il a également été montré qu'en mutant deux dé-ubiquitinases, UBP12 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 12) et UBP13 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 13), qui retirent les chaînes d'ubiquitine en K63 sur les protéines cibles, cela stabilise BRI1 à la membrane plasmique (Luo et al., 2022).

L'ensemble de ses résultats nous laisse suggérer qu'il pourrait y avoir une voie d'internalisation chez les plantes utilisant la polyUb en K63 comme marqueur d'internalisation.

1.4 La SUMOylation, nouvelle modification post traductionnelle pouvant moduler la stabilité des protéines

Récemment, des résultats préliminaires obtenus au sein de l'équipe ont montré que BRI1 peut aussi être SUMOylé. La SUMOylation est une modification post traductionnelle au mécanisme triparti similaire à celui de l'ubiquitination.

Bien que très peu caractérisée chez les plantes, elle semble étroitement liée aux stress abiotiques. La mutation d'une SUMO E3 ligase, SIZ1, restaure le phénotype du mutant *sos3* et montre une hypersensibilité à la déficience en Phosphate caractérisée par des racines plus courtes et une augmentation des racines latérales (Miura et al., 2005). Cette même SUMO E3 ligase favorise la tolérance au stress froid au dépend de la tolérance à la chaleur. *siz1* accumule l'acide salicylique et ainsi active l'expression des HSP (Heat Shock Proteins) qui induisent la thermotolérance (Yoo et al., 2006). A l'inverse *siz1* provoque une hypersensitivité au froid dû à la dégradation de ICE1 (facteur de transcription activant les gènes de réponse au froid) (Miura et al., 2007). De plus une mutation de la lysine responsable de la SUMOylation d'ICE1 a montré que la SUMOylation d'ICE1 par SIZ1 permet la stabilité de la protéine (Miura et al., 2007).

Une récente étude a montré que la SUMOylation impactait également la voie de signalisation des brassinostéroïdes. Le mutant *siz1* est hypersensible au BL et l'activité de BES1 semble légèrement réduite indiquant que la SUMOylation de BES1 par SIZ1 provoque une inhibition de son activité (Zhang et al., 2019).

La SUMOylation et l'ubiquitination sont encore vues comme deux voies distinctes de modifications post traductionnelle des protéines. Chez les animaux, il existe des cas de compétition entre les deux voies comme par exemple pour I κ B α qui peut être SUMOylé ou ubiquitiné. La SUMOylation conduit dans ce cas à la stabilité de I κ B α , là où l'ubiquitination conduit à sa dégradation (Ulrich, 2005). Le manque encore évident d'informations sur la SUMOylation ne nous permet pas encore d'affirmer la présence d'une telle compétition chez les plantes. Cependant les résultats obtenus au cours de cette thèse sont déjà peut être un élément de réponse.

1.5 Contexte

Le principal objectif de ma thèse fut de caractériser l'internalisation de BRI1 lors de l'endocytose médiée par l'ubiquitination. Précédemment, afin de déterminer si l'internalisation de BRI1 était dû à des modifications post traductionnelles, un mutant BRI1-25KR a été étudié (Martins et al., 2015). Il s'agit un mutant de BRI1 où 25 de ses plus importantes Lysines ont été remplacées par des Arginines. Dans ce mutant, BRI1 n'est plus ni internalisé et ni dégradé (**Figure 9**). Cela permet de conclure que les modifications post traditionnelles jouent un rôle sur l'internalisation de BRI1, mais ne permet d'affirmer avec certitude qu'ils s'agissent d'ubiquitination. D'autres modifications peuvent très bien cibler ces lysines de BRI1, comme la SUMOylation (Zhang et al., 2019, Park et al., 2011). Afin d'investiguer sur le rôle précis de la poly-ubiquitination sur l'internalisation de BRI1 au cours de l'endocytose, j'ai caractérisé le double mutant *ubc35 ubc36*, incapable de former des chaînes d'ubiquitine en K63 (Romero-Barrios et al., 2019), en réponses aux brassinostéroïdes et j'ai utilisé la protéine de fusion BRI1-mCITRINE dans une lignée de ce double mutant afin de visualiser l'internalisation de BRI1 dans ce fond génétique. L'ensemble de ces travaux figurent dans le deuxième chapitre de cette thèse.

Juste avant le début de la thèse, une étude a montré que deux E3 ligases PUB12 et PUB13 sont capables d'ubiquitiner BRI1 et d'impacter son endocytose (Zhou et al., 2018). Dans le troisième chapitre de cette thèse, j'ai mis en relation une de ces E3 ligases, PUB13 avec les deux enzymes E2 responsables de la poly-ubiquitination en K63. Et ainsi j'ai essayé d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme permettant l'ubiquitination en K63 de BRI1 conduisant à son endocytose.

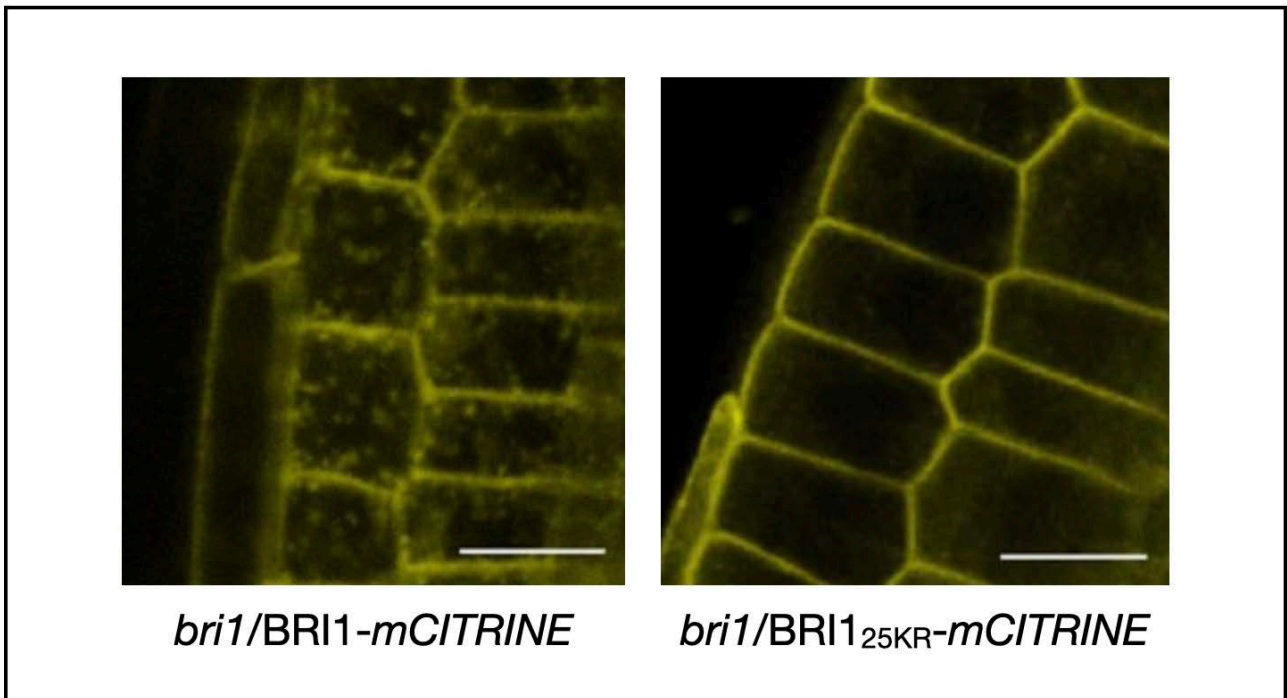


Figure 9 : BRI1-25KR est fortement affecté dans son internalisation (adapté de Martins et al., 2015). L'observation en microscopie confocale *bri1/BRI1_{25KR}-mCITRINE* montre une absence d'internalisation de BRI1 quand celui-ci est muté sur 25 de ses résidus lysines comparé à l'internalisation normale de BRI1 dans le fond *bri1/BRI1-mCITRINE*.

L'endocytose est un procédé rapide qui permet d'adapter le développement de la plante lors d'un stress abiotique. Lors d'une croissance à 26°C, des résultats internes dans l'équipe ont montré que BRI1 est désumoylé, cette désumoylation étant accompagnée de l'accumulation de la désSUMOylase DESI3A. De plus il a été montré que la température élevée amorce l'internalisation et la dégradation de BRI1. Dans le quatrième chapitre de cette thèse, j'ai cherché à comprendre si le mécanisme de SUMOylation pouvait jouer un rôle dans l'internalisation de BRI1 en étudiant le fond mutant *desi3a*.

Enfin le cinquième chapitre servira de discussion générale aux différents résultats de cette thèse.

1.6 Références

- Adhikari A, Chen ZJ. Diversity of Polyubiquitin Chains. *Dev Cell* 2009; 16:485–6.
- Antonny B, Burd C, Camilli PD, Chen E, Daumke O, Faelber K, Ford M, Frolov VA, Frost A, Hinshaw JE, et al. Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *Embo J* 2016; 35:2270–84.
- Baral A, Shruthi KS, Mathew MK. Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *Plant Life* 2015; 67:677–86.
- Barberon M, Zelazny E, Robert S, Conéjéro G, Curie C, Friml J, Vert G. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc National Acad Sci* 2011; 108:E450–8.
- Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: Many Actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83:851–7.
- Belkhadir Y, Jaillais Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol* 2015; 206:522–40.
- Bishop GJ, Koncz C. Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling. *Plant Cell* 2002; 14:S97–110.
- Bolte S, Talbot C, Boutte Y, Catrice O, Read ND, Satiat-Jeunemaitre B. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc-oxford* 2004; 214:159–73.
- Breeze E. Ubiquitous Ubiquitin: The K63 Ubiquitinome. *Plant Cell* 2019; 32:8–9.
- Brillada C, Trujillo M. E2 ubiquitin-conjugating enzymes (UBCs): drivers of ubiquitin signalling in plants. *Essays Biochem* 2022; 66:99–110.
- Butenko MA, Aalen RB. Receptor-like Kinases in Plants. *Signal Commun Plants* 2011; :195–226.
- Bücherl CA, Jarsch IK, Schudoma C, Segonzac C, Mbengue M, Robatzek S, MacLean D, Ott T, Zipfel C. Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *Elife* 2017; 6:e25114.
- Caño-Delgado A, Yin Y, Yu C, Vafeados D, Mora-García S, Cheng J-C, Nam KH, Li J, Chory J. BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* 2004; 131:5341–51.
- Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S, et al. The *Arabidopsis* dwarf1 Mutant Is Defective in the Conversion of 24-Methylenecholesterol to Campesterol in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Physiol* 1999; 119:897–908.
- Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, Gregory BD, Ross AS, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE, et al. The *Arabidopsis* dwarf7/ste1 mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 1999; 11:207–21.
- Choe S, Dilkes BP, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA. The DWF4 gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* 1998; 10:231–43.

CHORY J, LI J. Gibberellins, brassinosteroids and light-regulated development. *Plant Cell Environ* 1997; 20:801–6.

Clague MJ, Urbé S. Endocytosis: the DUB version. *Trends Cell Biol* 2006; 16:551–9.

Clague MJ, Heride C, Urbé S. The demographics of the ubiquitin system. *Trends Cell Biol* 2015; 25:417–26.

Clouse SD, Langford M, McMorris TC. A Brassinosteroid-Insensitive Mutant in *Arabidopsis thaliana* Exhibits Multiple Defects in Growth and Development. *Plant Physiol* 1996; 111:671–8.

Clouse SD. Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *Plant Cell* 2011; 23:1219–30.

Clouse SD. Brassinosteroids. *Arabidopsis Book* 2002; :e0009.

Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof Y-D, Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; 18:715–30.

Dhonukshe P, Aniento F, Hwang I, Robinson DG, Mravec J, Stierhof Y-D, Friml J. Clathrin-Mediated Constitutive Endocytosis of PIN Auxin Efflux Carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; 17:520–7.

Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G. Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol Cell* 2018; 69:953-964.e5.

Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, Lippincott-Schwartz J. Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc National Acad Sci* 2011; 108:4846–51.

Fan L, Hao H, Xue Y, Zhang L, Song K, Ding Z, Botella MA, Wang H, Lin J. Dynamic analysis of *Arabidopsis* AP2 σ subunit reveals a key role in clathrin-mediated endocytosis and plant development. *Development* 2013; 140:3826–37.

Fan L, Li R, Pan J, Ding Z, Lin J. Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci* 2015; 20:388–97.

Friedrichsen DM, Joazeiro CAP, Li J, Hunter T, Chory J. Brassinosteroid-Insensitive-1 Is a Ubiquitously Expressed Leucine-Rich Repeat Receptor Serine/Threonine Kinase. *Plant Physiol* 2000; 123:1247–56.

Fujioka S, Li J, Choi Y-H, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J, et al. The *Arabidopsis* *deetiolated2* Mutant Is Blocked Early in Brassinosteroid Biosynthesis. *Plant Cell* 1997; 9:1951.

Furuya T, Saito M, Uchimura H, Satake A, Nosaki S, Miyakawa T, Shimadzu S, Yamori W, Tanokura M, Fukuda H, et al. Gene co-expression network analysis identifies BEH3 as a stabilizer of secondary vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2021; 33:2618–36.

Gadeyne A, Sánchez-Rodríguez C, Vanneste S, Di Rubbo S, Zauber H, Vanneste K, Van Leene J, De Winne N, Eeckhout D, Persiau G, et al. The TPLATE Adaptor Complex Drives Clathrin-Mediated Endocytosis in Plants. *Cell* 2014; 156:691–704.

Gampala SS, Kim T-W, He J-X, Tang W, Deng Z, Bai M-Y, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM, et al. An Essential Role for 14-3-3 Proteins in Brassinosteroid Signal Transduction in Arabidopsis. *Dev Cell* 2007; 13:177–89.

Gao C, Zhuang X, Cui Y, Fu X, He Y, Zhao Q, Zeng Y, Shen J, Luo M, Jiang L. Dual roles of an Arabidopsis ESCRT component FREE1 in regulating vacuolar protein transport and autophagic degradation. *Proc National Acad Sci* 2015; 112:1886–91.

Gao C, Zhuang X, Shen J, Jiang L. Plant ESCRT Complexes: Moving Beyond Endosomal Sorting. *Trends Plant Sci* 2017; 22:986–98.

Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S. Microarray Analysis of Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2002; 130:1319–34.

Gou X, Yin H, He K, Du J, Yi J, Xu S, Lin H, Clouse SD, Li J. Genetic Evidence for an Indispensable Role of Somatic Embryogenesis Receptor Kinases in Brassinosteroid Signaling. *Plos Genet* 2012; 8:e1002452.

Guo H, Wen R, Wang Q, Datla R, Xiao W. Three *Brachypodium distachyon* Uev1s Promote Ubc13-Mediated Lys63-Linked Polyubiquitination and Confer Different Functions. *Front Plant Sci* 2016; 7:1551.

Hao H, Fan L, Chen T, Li R, Li X, He Q, Botella MA, Lin J. Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *Plant Cell* 2014; 26:1729–45.

He K, Gou X, Yuan T, Lin H, Asami T, Yoshida S, Russell SD, Li J. BAK1 and BKK1 Regulate Brassinosteroid-Dependent Growth and Brassinosteroid-Independent Cell-Death Pathways. *Curr Biol* 2007; 17:1109–15.

He J-X, Gendron JM, Sun Y, Gampala SSL, Gendron N, Sun CQ, Wang Z-Y. BZR1 Is a Transcriptional Repressor with Dual Roles in Brassinosteroid Homeostasis and Growth Responses. *Science* 2005; 307:1634–8.

He Z, Wang Z-Y, Li J, Zhu Q, Lamb C, Ronald P, Chory J. Perception of Brassinosteroids by the Extracellular Domain of the Receptor Kinase BRI1. *Science* 2000; 288:2360–3.

He J-X, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang Z-Y. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc National Acad Sci* 2002; 99:10185–90.

Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, Dabi T, Noel Joseph P, Wilson IA, Chory J. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* 2011; 474:467–71.

Huang D, Sun Y, Ma Z, Ke M, Cui Y, Chen Z, Chen C, Ji C, Tran TM, Yang L, et al. Salicylic acid-mediated plasmodesmal closure via Remorin-dependent lipid organization. *Proc National Acad Sci* 2019; 116:21274–84.

Hutten SJ, Hamers DS, Toorn MA den, Esse W van, Nolles A, Bücherl CA, Vries SC de, Hohlbein J, Borst JW. Visualization of BRI1 and SERK3/BAK1 Nanoclusters in Arabidopsis Roots. *Plos One* 2017; 12:e0169905.

Irani NG, Rubbo SD, Mylle E, Begin JV den, Schneider-Pizoń J, Hniliková J, Šíša M, Buyst D, Vilarrasa-Blasi J, Szatmári A-M, et al. Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nat Chem Biol* 2012; 8:583–9.

Ivanov R, Vert G. Endocytosis in plants: Peculiarities and roles in the regulated trafficking of plant metal transporters. *Biol Cell* 2021; 113:1–13.

Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miège C, Rollin C, Gaude T. AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature* 2006; 443:106–9.

Jaillais Y, Gaude T. Sorting Out the Sorting Functions of Endosomes in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 2007; 2:556–8.

Jaillais Y, Ott T. The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective . *Plant Physiol* 2019; 182:1682–96.

Jaillais Y, Hothorn M, Belkhadir Y, Dabi T, Nimchuk ZL, Meyerowitz EM, Chory J. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Gene Dev* 2011; 25:232–7.

Johnson A, Vert G. Single Event Resolution of Plant Plasma Membrane Protein Endocytosis by TIRF Microscopy. *Front Plant Sci* 2017; 8:612.

Kim T-W, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, Shang J-X, Sun Y, Burlingame AL, Wang Z-Y. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* 2009; 11:1254–60.

Kim T-W, Guan S, Burlingame AL, Wang Z-Y. The CDG1 Kinase Mediates Brassinosteroid Signal Transduction from BRI1 Receptor Kinase to BSU1 Phosphatase and GSK3-like Kinase BIN2. *Mol Cell* 2011; 43:561–71.

Kinoshita T, Caño-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 2005; 433:167–71.

Korbei B, Moulinier-Anzola J, De-Araujo L, Lucyshyn D, Retzer K, Khan MA, Luschnig C. *Arabidopsis* TOL Proteins Act as Gatekeepers for Vacuolar Sorting of PIN2 Plasma Membrane Protein. *Curr Biol* 2013; 23:2500–5.

Lam SK, Cai Y, Tse YC, Wang J, Law AHY, Pimpl P, Chan HYE, Xia J, Jiang L. BFA-induced compartments from the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells: Distinct BFA compartments. *Plant J* 2009; 60:865–81.

Lauwers E, Erpapazoglou Z, Haguenaer-Tsapir R, André B. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol* 2010; 20:196–204.

Leitner J, Petrášek J, Tomanov K, Retzer K, Pařezová M, Korbei B, Bachmair A, Zařímalová E, Luschnig C. Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of *Arabidopsis* root growth. *Proc National Acad Sci* 2012; 109:8322–7.

Li W, Schmidt W. A lysine-63-linked ubiquitin chain-forming conjugase, UBC13, promotes the developmental responses to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *Plant J* 2010; 62:330–43.

Li R, Liu P, Wan Y, Chen T, Wang Q, Mettbach U, Baluska F, Samaj J, Fang X, Lucas WJ, et al. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell* 2012; 24:2105–22.

- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. A Role for Brassinosteroids in Light-Dependent Development of Arabidopsis. *Science* 1996; 272:398–401.
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell* 2002; 110:213–22.
- Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J. BIN2, a New Brassinosteroid-Insensitive Locus in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2001; 127:14–22.
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu D-T, Maurel C, Lin J. Single-Molecule Analysis of PIP2;1 Dynamics and Partitioning Reveals Multiple Modes of Arabidopsis Plasma Membrane Aquaporin Regulation. *Plant Cell* 2011; 23:3780–97.
- Li Q-F, Lu J, Yu J-W, Zhang C-Q, He J-X, Liu Q-Q. The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba - Gene Regul Mech* 2018; 1861:561–71.
- Lippincott-Schwartz J, Yuan L, Tipper C, Amherdt M, Orci L, Klausner RD. Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 1991; 67:601–16.
- Luo Y, Yasuda S, Takagi J, Hasegawa Y, Chiba Y, Yamaguchi J, Sato T. Deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 regulate carbon/nitrogen-nutrient stress responses by interacting with the membrane-localized ubiquitin ligase ATL31 in Arabidopsis. *Biochem Bioph Res Co* 2022; 636:55–61.
- Malynn BA, Ma A. Ubiquitin Makes Its Mark on Immune Regulation. *Immunity* 2010; 33:843–52.
- Maraschin FDS, Memelink J, Offringa R. Auxin-induced, SCFTIR1-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J* 2009; 59:100–9.
- Martinière A, Zelazny E. Membrane nanodomains and transport functions in plant. *Plant Physiol* 2021; 187:1839–55.
- Martins S, Montiel-Jorda A, Cayrel A, Huguet S, Roux CP-L, Ljung K, Vert G. Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nat Commun* 2017; 8:309.
- Martins S, Dohmann EMN, Cayrel A, Johnson A, Fischer W, Pojer F, Satiat-Jeunemaître B, Jaillais Y, Chory J, Geldner N, et al. Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* 2015; 6:6151.
- McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2011; 12:517–33.
- Miura K, Jin JB, Lee J, Yoo CY, Stirn V, Miura T, Ashworth EN, Bressan RA, Yun D-J, Hasegawa PM. SIZ1-Mediated Sumoylation of ICE1 Controls CBF3/DREB1A Expression and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 2007; 19:1403–14.
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, et al. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc National Acad Sci* 2005; 102:7760–5.

Mora-García S, Vert G, Yin Y, Caño-Delgado A, Cheong H, Chory J. Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Gene Dev* 2004; 18:448–60.

Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science* 2007; 315:201–5.

Müssig C, Shin G-H, Altmann T. Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2003; 133:1261–71.

Nam KH, Li J. BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid Signaling. *Cell* 2002; 110:203–12.

Naramoto S, Otegui MS, Kutsuna N, Rycke R de, Dainobu T, Karampelias M, Fujimoto M, Feraru E, Miki D, Fukuda H, et al. Insights into the localization and function of the membrane trafficking regulator GNOM ARF-GEF at the Golgi apparatus in Arabidopsis. *Plant Cell* 2014; 26:3062–76.

Narasimhan M, Johnson A, Prizak R, Kaufmann WA, Tan S, Casillas-Pérez B, Friml J. Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants. *Elife* 2020; 9:e52067.

Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, et al. BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in Arabidopsis. *Proc National Acad Sci* 1999; 96:15316–23.

Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA. Biosynthetic Pathways of Brassinolide in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2000; 124:201–10.

Oh E, Zhu J-Y, Wang Z-Y. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol* 2012; 14:802–9.

Oh M-H, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proc National Acad Sci* 2009; 106:658–63.

Osorio-Navarro C, Toledo J, Norambuena L. Sucrose targets clathrin-mediated endocytosis kinetics supporting cell elongation in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci* 2022; 13:987191.

Park HJ, Kim W-Y, Park HC, Lee SY, Bohnert HJ, Yun D-J. SUMO and SUMOylation in plants. *Mol Cells* 2011; 32:305.

Peng P, Yan Z, Zhu Y, Li J. Regulation of the Arabidopsis GSK3-like Kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through Proteasome-Mediated Protein Degradation. *Mol Plant* 2008; 1:338–46.

Reyes FC, Buono R, Otegui MS. Plant endosomal trafficking pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2011; 14:666–73.

Robatzek S, Chinchilla D, Boller T. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Gene Dev* 2006; 20:537–42.

Robinson DG, Neuhaus J-M. Receptor-mediated sorting of soluble vacuolar proteins: myths, facts, and a new model. *J Exp Bot* 2016; 67:4435–49.

Rodriguez-Furlan C, Minina EA, Hicks GR. Remove, Recycle, Degrade: Regulating Plasma Membrane Protein Accumulation. *Plant Cell* 2019; 31:2833–54.

Romero-Barrios N, Monachello D, Dolde U, Wong A, Clemente HS, Cayrel A, Johnson A, Lurin C, Vert G. Advanced Cataloging of Lysine-63 Polyubiquitin Networks by Genomic, Interactome, and Sensor-Based Proteomic Analyses. *Plant Cell* 2019; 32:123–38.

Romero-Barrios N, Vert G. Proteasome-independent functions of lysine-63 polyubiquitination in plants. *New Phytol* 2018; 217:995–1011.

Rouleau M, Marsolais F, Richard M, Nicolle L, Voigt B, Adam G, Varin L. Inactivation of Brassinosteroid Biological Activity by a Salicylate-inducible Steroid Sulfotransferase from *Brassica napus* *. *J Biol Chem* 1999; 274:20925–30.

Rybel BD, Audenaert D, Vert G, Rozhon W, Mayerhofer J, Peelman F, Coutuer S, Denayer T, Jansen L, Nguyen L, et al. Chemical Inhibition of a Subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like Kinases Activates Brassinosteroid Signaling. *Chem Biol* 2009; 16:594–604.

Santiago J, Henzler C, Hothorn M. Molecular Mechanism for Plant Steroid Receptor Activation by Somatic Embryogenesis Co-Receptor Kinases. *Science* 2013; 341:889–92.

Schubert V. Super-resolution Microscopy – Applications in Plant Cell Research. *Front Plant Sci* 2017; 8:531.

Shi H, Li X, Lv M, Li J. BES1/BZR1 Family Transcription Factors Regulate Plant Development via Brassinosteroid-Dependent and Independent Pathways. *Int J Mol Sci* 2022; 23:10149.

Simon MLA, Platre MP, Marquès-Bueno MM, Armengot L, Stanislas T, Bayle V, Caillaud M-C, Jaillais Y. A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat Plants* 2016; 2:16089.

Sreeramulu S, Mostizky Y, Sunitha S, Shani E, Nahum H, Salomon D, Hayun LB, Gruetter C, Rauh D, Ori N, et al. BSKs are partially redundant positive regulators of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* 2013; 74:905–19.

Sun Y, Fan X-Y, Cao D-M, Tang W, He K, Zhu J-Y, He J-X, Bai M-Y, Zhu S, Oh E, et al. Integration of Brassinosteroid Signal Transduction with the Transcription Network for Plant Growth Regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 2010; 19:765–77.

Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, a Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 1996; 85:171–82.

Tanaka K, Asami T, Yoshida S, Nakamura Y, Matsuo T, Okamoto S. Brassinosteroid Homeostasis in *Arabidopsis* Is Ensured by Feedback Expressions of Multiple Genes Involved in Its Metabolism. *Plant Physiol* 2005; 138:1117–25.

Tang W, Yuan M, Wang R, Yang Y, Wang C, Oses-Prieto JA, Kim T-W, Zhou H-W, Deng Z, Gampala SS, et al. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* 2011; 13:124–31.

Tang J, Han Z, Chai J. Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants? *Bmc Biol* 2016; 14:113.

Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Wang H, Torres QI, Ward JM, Murthy G, et al. BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J* 2005; 42:23–34.

- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61:203–12.
- Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems: a plea of no contest. *Trends Cell Biol* 2005; 15:525–32.
- Valencia JP, Goodman K, Otegui MS. Endocytosis and Endosomal Trafficking in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 2016; 67:309–35.
- Vert G, Chory J. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 2006; 441:96–100.
- Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J. MOLECULAR MECHANISMS OF STEROID HORMONE SIGNALING IN PLANTS. *Annu Rev Cell Dev Bi* 2005; 21:177–201.
- Walker JC. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol* 1994; 26:1599–609.
- Wang Z-Y, Bai M-Y, Oh E, Zhu J-Y. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annu Rev Genet* 2012; 46:701–24.
- Wang X, Chory J. Brassinosteroids Regulate Dissociation of BKI1, a Negative Regulator of BRI1 Signaling, from the Plasma Membrane. *Science* 2006; 313:1118–22.
- Wang Z-Y, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 2001; 410:380–3.
- Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC, Clouse SD. Identification and Functional Analysis of in Vivo Phosphorylation Sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 Receptor Kinase. *Plant Cell* 2005; 17:1685–703.
- Wang Z-Y, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, et al. Nuclear-Localized BZR1 Mediates Brassinosteroid-Induced Growth and Feedback Suppression of Brassinosteroid Biosynthesis. *Dev Cell* 2002; 2:505–13.
- Wang Q, Zhao Y, Luo W, Li R, He Q, Fang X, Michele RD, Ast C, Wirén N von, Lin J. Single-particle analysis reveals shutoff control of the Arabidopsis ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc National Acad Sci* 2013; 110:13204–9.
- Wang L, Li H, Lv X, Chen T, Li R, Xue Y, Jiang J, Jin B, Baluška F, Šamaj J, et al. Spatiotemporal Dynamics of the BRI1 Receptor and its Regulation by Membrane Microdomains in Living Arabidopsis Cells. *Mol Plant* 2015; 8:1334–49.
- Wang R, Liu M, Yuan M, Osés-Prieto JA, Cai X, Sun Y, Burlingame AL, Wang Z-Y, Tang W. The Brassinosteroid-Activated BRI1 Receptor Kinase Is Switched off by Dephosphorylation Mediated by Cytoplasm-Localized PP2A B' Subunits. *Mol Plant* 2016; 9:148–57.
- Weigel D, Ahn JH, Blázquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, Ferrándiz C, Kardailsky I, Malancharuvil EJ, Neff MM, et al. Activation Tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2000; 122:1003–14.
- Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 2009; 458:172–7.

- Wollert T, Hurley JH. Molecular Mechanism of Multivesicular Body Biogenesis by ESCRT Complexes. *Nature* 2010; 464:864–9.
- Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in Arabidopsis. *Cell* 2005; 120:249–59.
- Yin Y, Wang Z-Y, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J. BES1 Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation. *Cell* 2002; 109:181–91.
- Yoo CY, Miura K, Jin JB, Lee J, Park HC, Salt DE, Yun D-J, Bressan RA, Hasegawa PM. SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. *Plant Physiol* 2006; 142:1548–58.
- Youn J-H, Kim T-W. Functional Insights of Plant GSK3-like Kinases: Multi-Taskers in Diverse Cellular Signal Transduction Pathways. *Mol Plant* 2015; 8:552–65.
- Yu X, Li L, Zola J, Aluru M, Ye H, Foudree A, Guo H, Anderson S, Aluru S, Liu P, et al. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana. *Plant J* 2011; 65:634–46.
- Zhang K, Xiong Y, Sun W, Wang G-L, Liu W. Global Proteomic Analysis Reveals Widespread Lysine Succinylation in Rice Seedlings. *Int J Mol Sci* 2019; 20:5911.
- Zhang L, Han Q, Xiong J, Zheng T, Han J, Zhou H, Lin H, Yin Y, Zhang D. Sumoylation of BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) by the SUMO E3 Ligase SIZ1 Negatively Regulates Brassinosteroids Signaling in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol* 2019; 60:2282–92.
- Zhou A, Wang H, Walker JC, Li J. BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant J* 2004; 40:399–409.
- Zhou J, Liu D, Wang P, Ma X, Lin W, Chen S, Mishev K, Lu D, Kumar R, Vanhoutte I, et al. Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc National Acad Sci* 2018; 115:E1906–15.

Chapitre 2 : Le rôle de la poly-ubiquitination en K63 dans l'internalisation de BRI1

2.1 Avant-Propos

L'endocytose des protéines membranaires est encore un mécanisme à éclaircir chez les plantes. L'internalisation amorcée par la poly-ubiquitination en K63, dûe à 2 E2 enzymes UBC35 et UBC36, est actuellement l'hypothèse la plus probable. Jusqu'à lors, des versions non ubiquitinables de BRI1 ou artificiellement ubiquitinées ont été utilisées [6] avec les biais que la modification de ces protéines peut apporter. Afin de vérifier cette hypothèse et d'affirmer que l'internalisation de BRI1 est vraiment dû à la poly-ubiquitination en K63, une version étiquetée de BRI1 a été étudié dans un fond muté *ubc35 ubc36* incapable de former les chaînes K63.

Ce chapitre présente un article réalisé en collaboration avec l'équipe de Marco Trujillo à l'institut de biologie II, à Freiburg en Allemagne. Il détaille l'impact global de la poly-ubiquitination en K63 sur l'endocytose des récepteurs membranaires, en utilisant comme modèle BRI1 et FLS2, et sur l'autophagie.

Ma contribution au sein de cet article a été de révéler le rôle de la poly-ubiquitination en K63 sur l'endocytose de BRI1. Ainsi est présent au sein de cet article, une analyse phénotypique de la sensibilité aux brassinostéroïdes du fond mutant *ubc35 ubc36* face au fond sauvage Col-0, en traitant à l'eBL (Brassinolide de synthèse) et au PPZ (Brassinazole de synthèse, inhibiteur de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes). Ce phénotypage a révélé une hypersensibilité aux brassinostéroïdes. L'activité de la voie de signalisation des BRs a été mesurée de deux manières : premièrement, par analyses de l'expression des

gènes de réponses aux BRs dans le double mutant *ubc35 ubc36* comparée à leur expression dans Col-0, puis par quantification de l'état de phosphorylation du facteur de transcription de la voie de signalisation des BRs, BES1. Les deux expériences complémentaires mettent en évidence une suractivation de la voie de signalisation dans le fond mutant n'étant pas capable de produire des chaînes d'ubiquitines en K63. L'ensemble de ces éléments suggère que la poly-ubiquitination en K63 pourrait être responsable de l'internalisation de BRI1 et que ce dernier pourrait être stabilisé à la membrane plasmique en l'absence de cette PTM, ce qui dans ces conditions suractiverait la voie de signalisation des BRs. Afin de tester cette hypothèse, une lignée permettant de visualiser le récepteur membranaire, BRI1 chez un mutant privé de poly-Ub en K63 a été générée. Pour cela, le double mutant *ubc35 ubc36* a été croisé avec une lignée exprimant une version étiquetée de BRI1 sous le contrôle de son promoteur endogène, pBRI1::BRI1mCITRINE. Les analyses de microscopie confocale de cette lignée, couplées à des traitements au FM4-64 et/ou à la BFA ont mis en évidence l'importance du rôle de la poly-Ub en K63 dans l'internalisation de BRI1 notamment et plus généralement dans le processus d'endocytose.

Diverses expériences complémentaires ont été menées et publiées dans cet article. Le double mutant *ubc35 ubc36* n'ayant jamais été caractérisé en réponse aux brassinostéroïdes, la complémentation du double mutant *ubc35 ubc36* a été testée. L'expression de *BRI1* dans *ubc35 ubc36* a également permis d'affirmer que l'effet que l'on observe dans le mutant n'est pas dû à un effet sur la transcription de *BRI1*. L'absence de poly-ubiquitination en K63 sur BRI1 dans le croisement *ubc35 ubc36*/pBRI1::BRI1mCITRINE par immunoprécipitation a également été vérifiée. Enfin l'interaction entre BRI1, FLS2 avec UBC35, UBC36 a été montrée par BiFC.

A la suite de cet article, se trouvent également des résultats complémentaires non publiés à ce jour et portant sur (i) le test chez *Arabidopsis thaliana* d'une drogue inhibant UBC13 l'homologue des E2 UBC35 et UBC36 chez l'Homme, ce qui aurait permis d'avoir une autre visualisation de l'absence d'internalisation de BRI1-*mCITRINE*; et (ii) la confirmation de l'interaction *in planta* entre BRI1 et UBC35 UBC36 et entre FLS2 et UBC35 UBC36 par co-immunoprécipitation.

2.2 K63-Linked Ubiquitin Chains are a Global Signal for Endocytosis and Contribute to Selective Autophagy in Plants

Bushra Saeed^{1,2†}, Florian Deligne^{3,†}, Carla Brillada^{1, †}, Kai Dünser¹, Franck Aniset Ditengou^{1,4,5}, Ilona Turek⁶, Alaa Allahham^{1,8}, Nenad Grujic⁷, Yasin Dagdas⁷, Thomas Ott^{1,4}, Jürgen Kleine-Vehn^{1,4}, Grégory Vert^{3,*}, Marco Trujillo^{1,8,*}

1. Albert-Ludwigs-University Freiburg, Institute for Biology II, Cell Biology, 79104 Freiburg, Germany

2. Present address: Institute of Molecular Plant Sciences, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3BF, United Kingdom

3. Plant Science Research Laboratory (LRSV), UMR5546 CNRS/University Toulouse 3, 31320 Auzeville Tolosane, France

4. Center for Integrative Biological Signalling Studies (CIBSS), University of Freiburg, 79104 Freiburg, Germany

5. Bio Imaging Core Light Microscopy (BiMiC), Institute for Disease Modeling and Targeted Medicine (IMITATE), Medical Center University of Freiburg, Albert Ludwigs University Freiburg, Breisacher Str. 113 79106 Freiburg, Germany

6. Department of Rural Clinical Sciences, La Trobe Rural Health School, La Trobe University, Bendigo, Victoria 3552, Australia

7. Gregor Mendel Institute (GMI), Austrian Academy of Sciences, Vienna BioCenter (VBC), Vienna, Austria.

8. Current Address: RWTH Aachen University, Department of Plant Physiology, 52056 Aachen, Germany

† contributed equally

*correspondence: marco.trujillo@biologie.uni-freiburg.de, Gregory.Vert@univ-tlse3.fr

SUMMARY

In contrast to other eukaryotic model organisms, the closely related ubiquitin-conjugating enzymes UBC35 and UBC36 are the main sources of K63-linked ubiquitin (Ub) chains in Arabidopsis. Although K63-linked chains have been associated with the regulation of vesicle trafficking, definitive proof for their role in endocytosis was missing. We show that the *ubc35 ubc36* mutant has pleiotropic phenotypes related to hormone and immune signalling. Specifically, we reveal that *ubc35-1 ubc36-1* plants have altered turnover of integral membrane proteins including FLS2, BRI1 and PIN1 at the plasma membrane. Our data indicate that K63-Ub chains are generally required for endocytic trafficking in plants. In addition, we show that in plants K63-Ub chains are involved in selective autophagy, the second major pathway delivering cargoes to the vacuole for degradation. Similar to autophagy-defective mutants, *ubc35-1 ubc36-1* plants display an accumulation of autophagy markers. Moreover, autophagy receptor NBR1 interacts with K63-Ub chains, which are required for its delivery to the lytic vacuole. Together, we show that K63-Ub chains act as a general signal required for the two main pathways delivering cargo to the vacuole and thus, to maintain proteostasis.

Keywords: Ubiquitin, E2, ubiquitin-conjugating enzymes, endocytosis, vesicle trafficking, signalling

Highlights:

- K63-Ub chains are a general signal for early endocytosis in plants
- UBC35 and UBC36-generated K63-Ub chains are central for vacuolar degradation of PM proteins
- Selective autophagy receptor NBR1 interacts with K63-Ub chains, which contributes to its vacuolar recruitment
- UBC35 and UBC36 are transported into the vacuole by autophagy

RESULTS AND DISCUSSION

K63-linked ubiquitin chains are required for both immune and developmental responses

In a previous study we showed that the closely related pair of ubiquitin-conjugating enzymes (UBC) UBC35 and UBC36 are responsible for most of the generated K63-Ub-linked chains in *Arabidopsis* (Romero-Barrios et al., 2020). K63-Ub chains have been associated with various stages of vesicle trafficking in metazoans and fungi (Erpapazoglou et al., 2014, Mettlen et al., 2018). In plants, various integral membrane proteins have been shown to be modified with K63-Ub chains including the metal transporter IRT1 (Dubeaux et al., 2018), the auxin efflux carrier PIN2 (Leitner et al., 2012) and brassinosteroid receptor BRI1 (Martins et al., 2015), suggesting a conserved role. These and other observations have led to the assumption that K63-Ub chains act as an early signal for selective endocytosis of cargo proteins. Notably, Ub chains are required during later stages by the ESCRT during the formation of multivesicular bodies/late endosomes (Gao et al., 2014, Nagel et al., 2017, Kalinowska et al., 2015, Katsiarimpa et al., 2011, Moulinier et al., 2020).

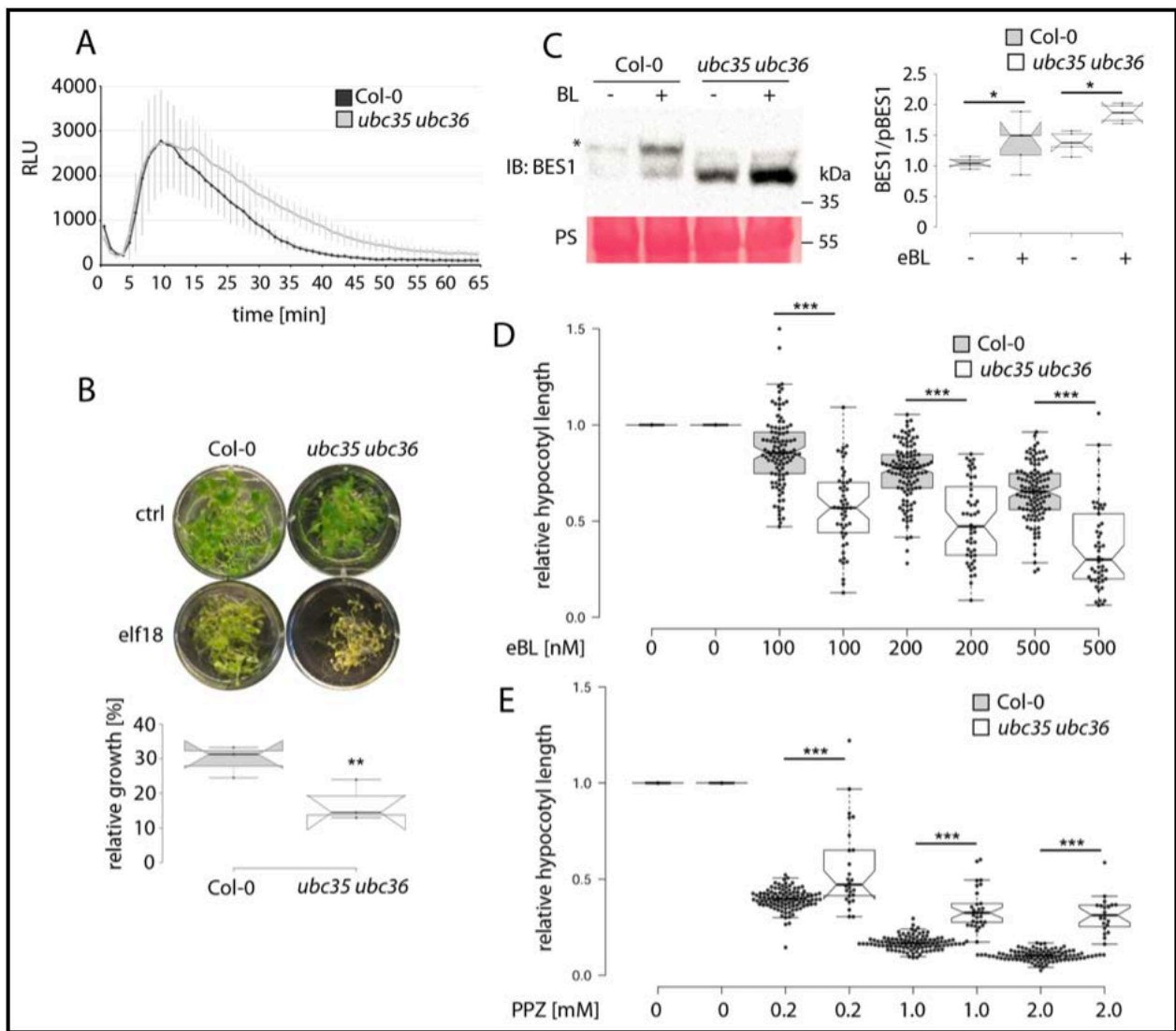


Figure 10: *ubc35 ubc36* mutant shows pleiotropic phenotypes related to immune and hormone signalling. (A) Reactive oxygen species burst shown as Relative Light Unit (RLU) after elicitation with 250 nM elf18. Data shown as averages \pm S.D. ($n=12$, leaf discs from four plants). (B) WT Col-0 and *ubc35 ubc36* seedlings grown in liquid media \pm 50 nM elf18 for 9 days. Relative growth is shown as the percentage of the fresh weight of 30 seedlings grown under mock conditions compared to treated ones ($n=3$, biological replicates). Asterisks indicate significant differences between samples (Student's t-test $**P < 0.01$). (C) Immunoblot shows BES1 and phosphorylated BES1 (pBES1, indicated with the asterisk), as well as Ponceau S (PS) total protein staining for equal loading. 7-day-old seedlings were treated for 15 min \pm 1 μ M epi-brassinolide (eBL). Quantification of signal intensity ratios shown as boxplots ($n=5$, biological replicates). Asterisks indicate significantly different values (Wilcoxon Mann Whitney U-Test $*P < 0.05$). (D-E) Ratio between hypocotyl lengths of 10-day-old seedlings grown in dark conditions with the indicated concentrations of eBL (D) or propiconazole (PPZ, E) relative to seedlings grown in mock plates ($n \geq 20$). Experiment was repeated three times with similar results.

Previous analyses of K63-Ub-linked chains in plant endocytosis have used lysine-less cargo variants that cannot be ubiquitinated. Substitution of lysine residues may potentially have multiple functional consequences (Dubeaux et al., 2018, Leitner et al., 2012, Martins et al., 2015). However, the knock-out mutants of UBC35 and UBC36 are non-viable (Romero-Barrios et al., 2020). Therefore, to carry out a deeper analysis of the role of K63-Ub chains, we employed the *ubc35-1 ubc36-1* double mutant (from here on referred to as *ubc35 ubc36*, **Figure S2A**), which is a knock-out for *UBC35* and a knock-down for *UBC36* (Romero-Barrios et al., 2020, Li and Schmidt 2010), but nonetheless is impaired in the production of K63-Ub chains (**Figure S2B; Figure S2C**)(Li and Schmidt, 2010). We had shown that responses to the immunogenic peptide flg22 were enhanced in the double mutant (Turek et al., 2014). Similarly, enhanced early reactive oxygen species production and long-term growth inhibition were also observed in response to the EF-Tu derived peptide elf18 (Zipfel and al., 2006) (**Figure 10A and 10B**). To test whether this was a general deregulation of plasma membrane (PM) localized immune receptors, we analysed signalling triggered by the brassinosteroid hormone receptor BRI1 (Wang et al., 2001). Brassinosteroid (BR) signalling appeared constitutively increased, as reflected by a higher ratio of unphosphorylated to phosphorylated BES1 (**Figure 10C**), which was further enhanced by treatment with epi-brassinolide (eBL) and supported by increased transcriptional inhibition of the BR-repressed *STE1* and *DWF4* genes, and enhanced induction of the BR-induced *BAS1* gene (**Figure S2D**). Accordingly, *ubc35 ubc36* seedlings were hyperresponsive to eBL and the BR synthesis inhibitor propiconazole, compared to wild-type or complemented lines (PPZ; **Figure 10D, Figure 10E and Figure S2E**). To further validate these observations, we tested additional responses known to require integral PM proteins. Etiolation, which requires the interplay between various hormones, was inhibited

in *ubc35 ubc36* (**Figure S2A**, lower panels), and gravitropism that is dependent on auxin was also impaired (**Figure S2F**).

Levels of integral membrane proteins are increased in *ubc35 ubc36*

The deregulated responses observed in the *ubc35 ubc36* mutant suggested a general defect in vesicular trafficking of PM proteins. To test its impact on protein levels, we analysed protein fractions of different integral PM proteins including FLS2, BRI1 and the auxin efflux carrier PIN1 (Sauer and Kleine, 2019). PIN1 displays a strong accumulation in the *ubc35 ubc36* background, which is particularly evident in the PM fraction (**Figure 11A**), but also visible in the organelle fraction that includes ER and Golgi membranes. Detection of PIN1 by immunohistochemistry confirmed increased signal intensity of PIN1 at the PM (**Figure S3A**). Similarly, increased levels of BRI1 and FLS2 were also visible in the *ubc35 ubc36* mutant (**Figure 11A**). In addition, immunostimulation of seedlings with FLS2's cognate agonist flg22 (Chinchilla et al., 2006), induced FLS2 degradation in the Col-0 WT background, but was delayed in *ubc35 ubc36* (**Figure 11B**). The delayed degradation also correlated with delayed downregulation of the reactive oxygen burst induced by flg22 (Turek and al., 2018) and elf18 in *ubc35 ubc36* (**Figure 10A**). Therefore, *ubc35 ubc36* mutants, which have reduced levels of K63-Ub chains show deregulated levels of integral PM proteins independently of transcription (**Figure S3B**), potentially caused by defects in vesicular trafficking. Of note, we show for BRI1 that the enhanced levels in the mutant background correlate with reduced K63 ubiquitination (**Figure 11C**).

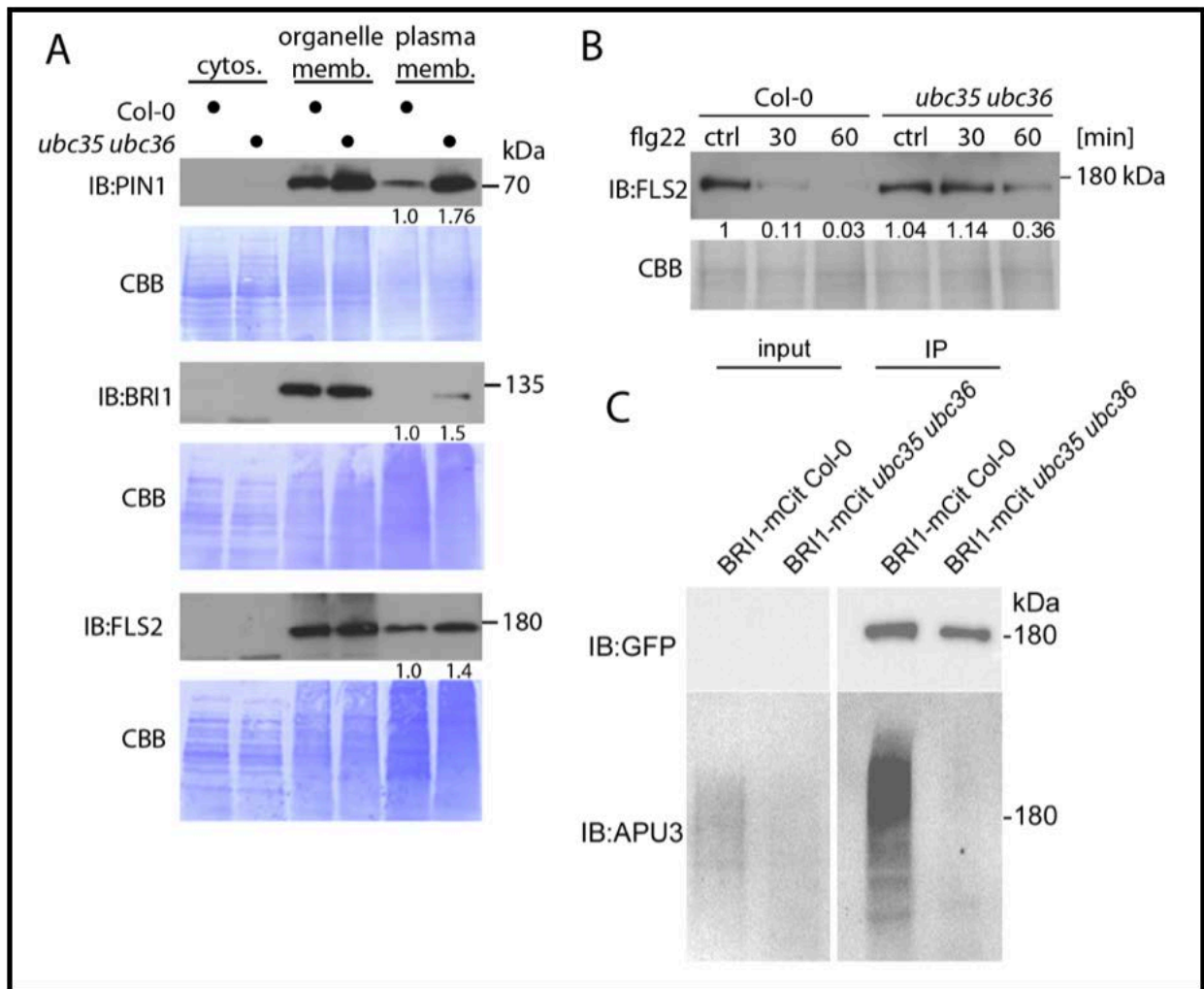


Figure 11: K63-Ub chains control protein levels. (A) Immunoblot analyses using the indicated protein fractions of the integral plasma membrane proteins PIN1, BRI1 and FLS2 in Col-0 and *ubc35 ubc36* using eight-day-old seedlings. Coomassie brilliant blue (CBB) staining shows equal loading. Lower panel shows signal intensity difference between WT Col-0 and *ubc35 ubc36*. Experiments were repeated three with similar results. (B) Immunoblot analysis of FLS2 levels after elicitation with 1 μ M flg22. CBB staining shows equal loading of total protein. Quantified signal was normalized to CBB and values are relative to WT Col-0. Experiment was repeated two times with similar results. (C) K63 chains ubiquitination profile of BRI1 in 7-days-old seedlings expressing BRI1-mCITRINE. Protein was immunoprecipitated with anti-GFP and K63-Ub modification detected with the specific APU3 antibody. Experiment was repeated three times with similar results.

K63-Ub chains have a global impact on endocytosis

The levels of integral PM proteins are determined by the interplay between de novo protein synthesis and degradation (Theodoulou et al., 2022). In plants, the latter takes place in the lytic vacuole, which receives proteins delivered by the endocytic pathway (Romero-Barrios and Vert, 2018, Aniento et al., 2022). Based on our results, we hypothesized that modification of cargoes with K63-Ub chains would impact their endocytosis. Immunostimulation of WT Col-0 seedlings expressing FLS2-GFP resulted in its internalization seen as GFP-labelled endosomes (Robatzek et al., 2006), which in the *ubc35 ubc36* background was significantly reduced (**Figure 12A**). A similar reduction of internalization was observed for BRI1, reflected by a significantly increased signal ratio of PM to endosomes (**Figure 12B**), as well as the absence of BRI1 from brefeldin A (BFA) bodies in *ubc35 ubc36* (**Figure 12C and Figure S4C**). We next asked whether these were punctual defects or in fact reflected a more general dependency of endocytosis on K63-Ub chains. First, we tested endocytic activity employing the membrane dye FM4-64 to quantify its uptake into early endosomes. Of note, the level of endosomes was reduced, as reflected by an increased PM to endosome ratio (**Figure 12D**). Moreover, we confirmed these results using BFA, which results in the accumulation of early endosomes in plants, reasoning that an impaired endocytosis will negatively impact BFA-body formation. In line with these assumptions, FM4-64 accumulation in BFA-bodies was significantly reduced in the *ubc35 ubc36* background (**Figure 12E**).

Organisms from different kingdoms seem to have evolved specific strategies to generate K63 chains and regulate endocytosis. In yeast for instance, K63-Ub chains are essential to initiate endocytosis (Shih et al., 2000, MacGurn et al., 2012), which by contrast is not the case in metazoans that rely on distinct signals and endocytosis pathways (MacGrun et al., 2012). In addition, the HECT-type E3 ligase RSP5, which directly participates in chain

building, is the main source of K63-Ub chains required for endocytosis and vacuolar degradation in yeast (Erpapazoglou et al., 2014, Dunn and Hicke, 2001). However, in humans the RSP5 orthologue Nedd4 and its homologues, together with RING/U-box type E3 ligases (prominently the E3 c-CBL) that pair with the UBC35/UBC36 orthologue UBE2N, generate K63-Ub chains in concert to regulate endocytosis (Erpapazoglou et al., 2014, Fotia et al., 2004, Zhou et al., 2007, Persaud et al., 2011, Joazeiro et al., 1999, Schmidt and Dikic, 2005). By contrast, Arabidopsis fully relies on UBC35 and UBC36 to generate K63-Ub chains as the main signal to mediate early steps in endocytosis.

Although our results demonstrate that UBC35 and UBC36 regulate the trafficking of PM proteins, both enzymes are mostly composed of the core UBC domain (Turek et al., 2018, Brillada and Trujillo, 2022) and display nucleo-cytoplasmic localization (**Figure S4A**). Also, UBC35 and UBC36 co-factors, such as the inactive UBC variants, are not known to be associated with the PM. Nevertheless, we show that UBC35 is detectable in PM-enriched fractions (**Figure S4B**), suggesting an indirect recruitment by E3s that target PM proteins, which is not affected by flg22 treatment (Turek et al., 2018, Zhou et al., 2018). Given the dynamic E2-E3 pairing that results from their low affinity interaction (Brzovic et al., 2003), it is not surprising that only a fraction of UBC35 is detected in the PM (**Figure S4B**), possibly also masking PM-localisation because of higher cytoplasmic signal (**Figure S4A**). However, further supporting a function at the PM, UBC35 and UBC36 interacted with FLS2 and BRI1 in a split-YFP BiFC assay, suggesting that they associate to PM targets.

Together, our observations indicate that in plants UBC35 and UBC36 generated K63-Ub chains play a major role during the endocytosis of cargoes, revealing significant differences with other systems.

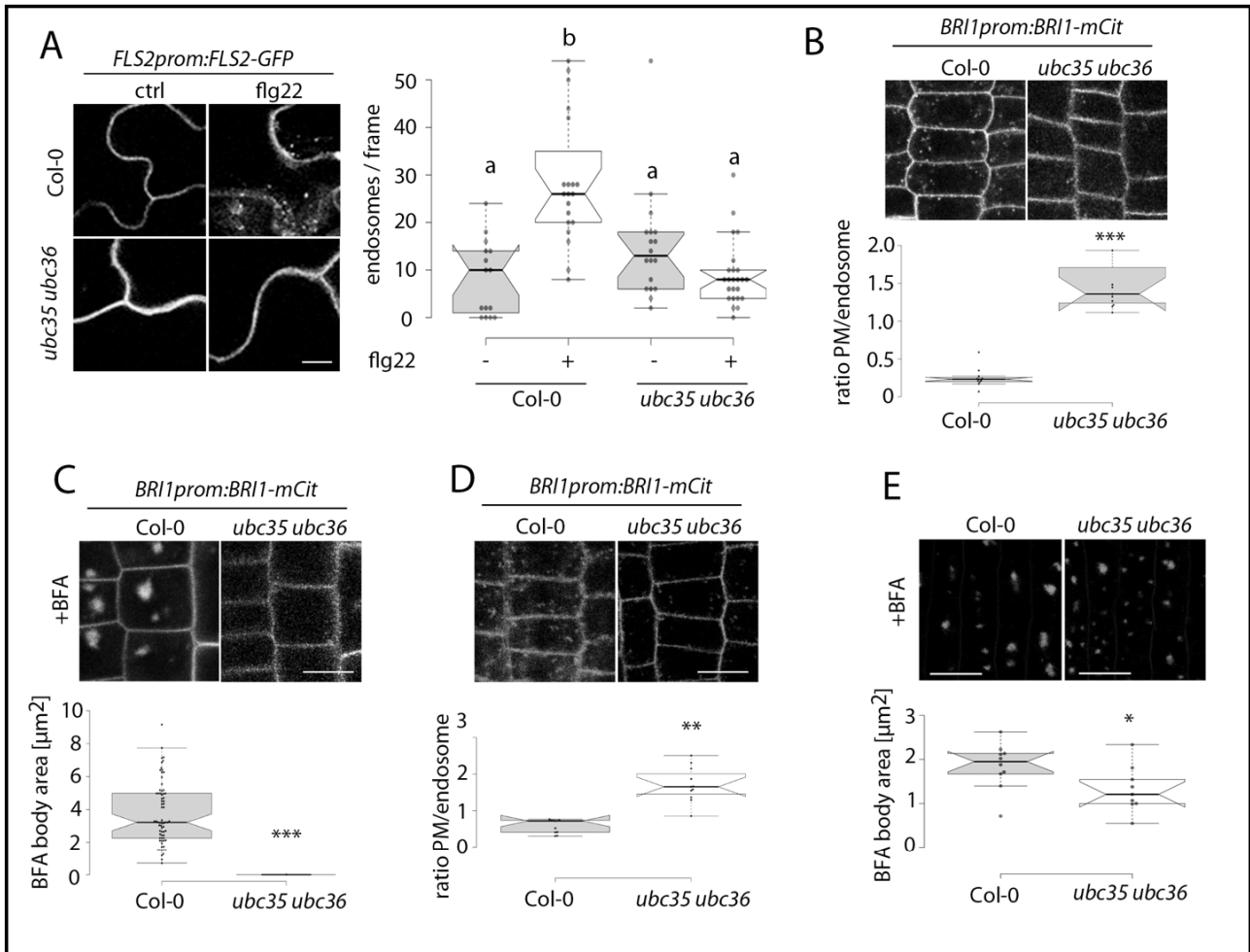


Figure 12: Endocytosis of FLS2 and BRI1 requires K63-Ub chains. (A) Leaves of nine-day-old seedlings expressing *FLS2prom:FLS2-GFP* were elicited with 1 μ M flg22 and were analysed by confocal laser-scanning microscopy (CLSM) after approx. 30 min treatment. Right panel shows the quantification of FLS2 internalisation. Scale bar is 10 μ M; $n \geq 15$, analysed frames. Statistically significant differences indicated by lower case letters were determined by Tukey-HSD test ($P < 0.05$). (B) Analysis of BRI1-mCit internalisation by CLSM and its corresponding quantification ($n=11$, frames). (C) Accumulation of BRI1-mCit in BFA bodies after endocytosis and corresponding quantification of BFA body size ($n=70$). (D) Analysis of general endocytosis in seedling roots using FM4-64 and quantification of endosomes ($n=11$, frames). (E) Analysis of general BFA body formation in seedling roots using FM4-64 treated with 50 μ M for 20 min after and corresponding quantification in WT Col-0 ($n=9$) and *ubc35 ubc36* ($n=10$). Scale bar is 20 μ M; n =frames. (B-E) Seven-day-old seedlings of WT Col-0, *ubc35 ubc36*, as well as expressing *BRI1prom:BRI1-mCit* in WT Col-0, *ubc35 ubc36* backgrounds were analysed by CLSM. Scale bar is 10 μ M; n =analysed frames. Asterisks indicate significant differences between samples (Wilcoxon Mann Whitney U-Test * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). All experiments were repeated at least three times with similar results.

K63-Ub chains contribute to selective autophagy by NBR1

An increasing number of studies have underscored a role of ubiquitin in autophagy, which is the second major pathway that delivers cargo to the lytic vacuole (Michaeli et al., 2016). To interrogate a possible role in autophagy, we first tested the levels of the autophagy receptor NBR1 and the ubiquitin-like protein ATG8, which in its active form is attached to the growing phagophore through lipidation (Ichimura et al., 2000). We observed that both the marker levels and the lipidated form of ATG8 were increased in *ubc35 ubc36* (**Figure 13A and Figure S5A**). This accumulation is characteristic for mutants defective in autophagy, such as *atg7-3* and *atg2-1* (**Figure 13A, Figure S5B**). However, ATG8e was still delivered to the vacuole in the *ubc35 ubc36* background, as visualized by inhibition of vacuolar degradation by concanamycin A (ConA), suggesting that bulk autophagy was active (**Figure 13B**).

In recent years, ubiquitin and particularly K63-Ub has surfaced as a signal mediating selective autophagy in metazoans (Michaeli et al., 2016, Kirkin et al., 2009, Kwon and Ciechanover, 2017). K63-Ub chains are recognized by autophagy receptors, which simultaneously bind to ATG8 to physically connect cargo and the growing phagophore (Kirkin et al., 2009, Kwon and Ciechanover, 2017). The Arabidopsis NBR1 is a canonical autophagy receptor that displays conserved features also found in the human orthologue (Svenning et al., 2011, Zhou et al., 2014, Kirkin et al., 2009). However, whether the plant NBR1 specifically binds to K63-Ub chains remains unknown. To test this, we immunoprecipitated a GFP-tagged Ub sensor that specifically recognizes K63-Ub chain and a mutated non-binding control (Johnson and Vert, 2016, Sims et al., 2012). NBR1 co-immunoprecipitated with the sensor, which was increased after autophagy activation with DTT (**Figure 13C**). Accordingly, in comparison to WT, where the number of NBR1-labelled

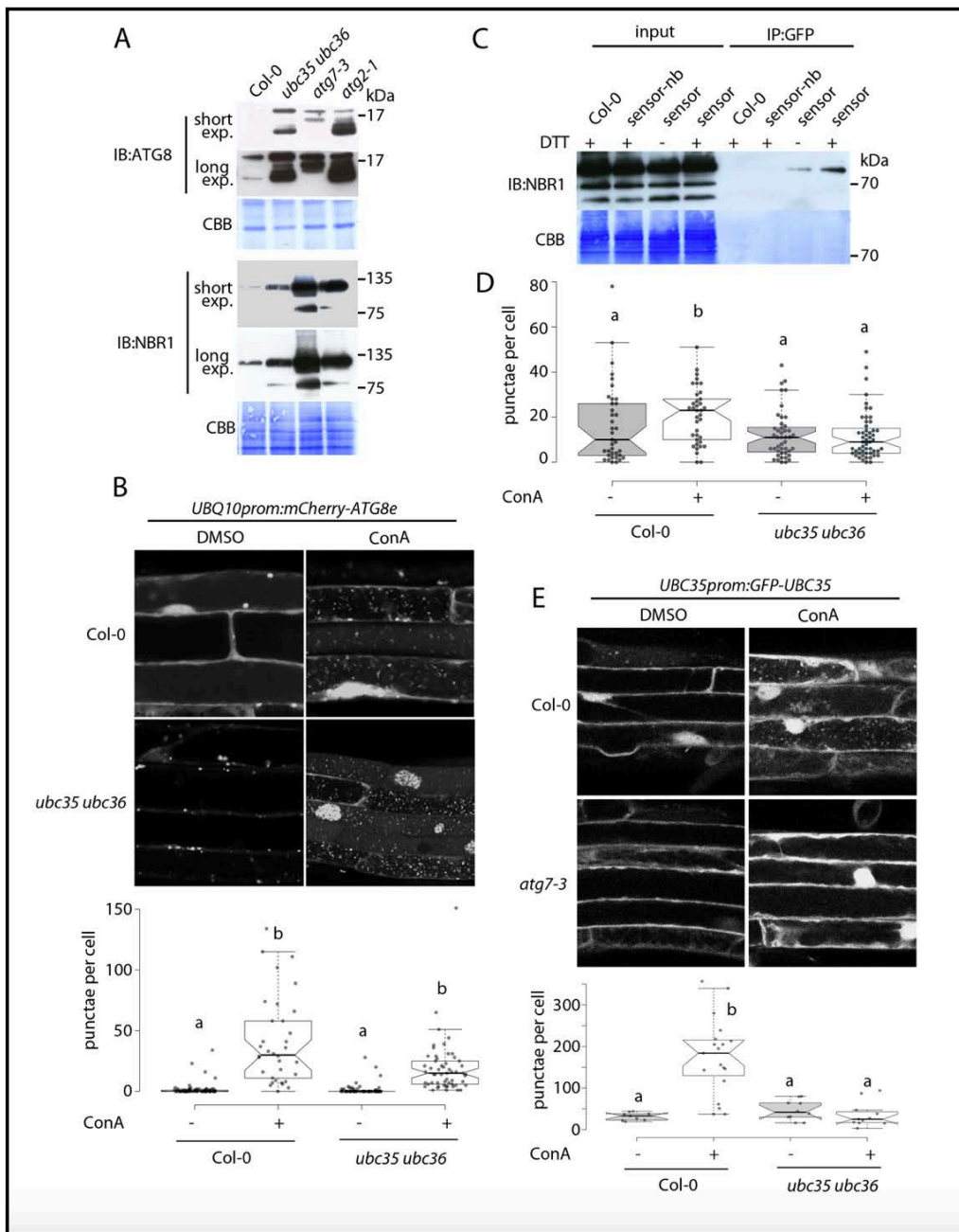


Figure 13: K63-Ub chains contribute to selective autophagy. (A) Levels of autophagy markers ATG8 and NBR1 were analysed in seven-day-old seedlings by immunoblot in the WT Col-0 and *ubc35 ubc36*, *atg7-3* and *atg2-1* mutant backgrounds. Long and short exposures are shown. CBB staining shows equal loading of total protein. (B) Five-day-old seedlings expressing *UBQ10prom:mCherry-ATG8e* in WT and *ubc35 ubc36* backgrounds were treated with 2 μ M concanamycin A (ConA), analysed by confocal laser-scanning microscopy after 6h and ATG8e-labelled autophagosomes were quantified. Statistically significant differences indicated by lower case letters were determined by Tukey-HSD test ($P < 0.05$). (C) Co-immunoprecipitation of NBR1 was performed after 2mM DTT or mock treatment for 6h. Total protein extracts from lines expressing the GFP-tagged K63-Ub chain-specific sensor or the non-binding control were immunoprecipitated using GFP-trap. CBB shows equal loading. (D) NBR1-labelled autophagosomes were quantified in the WT Col-0 and *ubc35 ubc36* backgrounds \pm 2 μ M ConA for 12h. Statistically significant differences indicated by lower case letters were determined by Tukey-HSD test ($P < 0.05$). (E) Five-day-old seedlings expressing *UBC35prom:GFP-UBC35* in WT Col-0 and the autophagy deficient mutant *atg7-3* were treated for 6h with 2 μ M ConA before analysis and quantification. Statistically significant differences indicated by lower case letters were determined by Tukey-HSD test ($P < 0.05$).

autophagosomes increased after ConA treatment, *ubc35 ubc36* showed unchanged levels, suggesting an impaired autophagic flux of NBR1 (**Figure 13D**).

Because K63-Ub chains participate in selective autophagy, we also sought to determine which pathway was primarily responsible for the degradation of UBC35. GFP-UBC35 protein levels decreased after inhibiting translation with cycloheximide (**Figure S5C**), and as expected for a soluble protein in the cytosol, proteasome inhibition led to an increase in UBC35 levels (**Figure S5C**). However, ConA treatment also stabilized UBC35, suggesting that it is additionally degraded in the vacuole (**Figure S5B**). Notably, GFP-UBC35 transport into the vacuole was strongly impaired in the autophagy deficient *atg7-3* background (**Figure 13E**). How UBC35 is recruited into the vacuole remains unclear, but it is conceivable that the UBC35-Ub-conjugating enzyme variant (UEV) heterodimer is recruited to the autophagosome by binding ubiquitin on the cargo (Eddins et al., 2006) or through an interacting E3 ligase.

Taken together, we provide evidence that in plants K63-Ub chains generated by the E2 pair UBC35 and UBC36 are a general signal that orchestrates the initial internalization step during endocytosis of integral PM proteins. Moreover, the additional link to selective autophagy, which is the second major route for the delivery of cargo to the lytic vacuole, reveals a plant-specific strategy by relying on the UBC35 and UBC36 pair to generate K63 chains to modulate both processes.

Acknowledgements

This work was supported by the Heisenberg Program from the German Research Foundation (DFG, to M.T.), SERB -Overseas Postdoctoral Fellowship (to B.S.; SB/OS/PDF-286/2016-17), the Austrian Academy of Sciences (ÖAW) (DOC fellowship to K.D., core funding to Y.D.), Austrian science fund (FWF; P 33044 to J.K.-V., P 34944-B to Y.D.),

German Research Foundation (DFG; 470007283 (J.K.-V.), 411532690 (T.O.) and CIBSS – EXC-2189 to J.K.-V. and T.O.), the Alexander von Humboldt Stipend for Advanced Researcher (to C.B.), a PhD fellowship from the University Toulouse 3-Paul Sabatier (to F.D.), and research grants from Agence Nationale de la Recherche (to G.V.; ANR-13-JSV2-0004-01; ANR-17-CE20-0026-01), the French Laboratory of Excellence project “TULIP” (to G.V.; ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02). We thank the staff of the Life Imaging Centre (LIC) of the Albert-Ludwigs-University of Freiburg and the Fédération de Recherche Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité of Toulouse (FRAIB) for confocal microscopy resources and support. We are very grateful to William Teal and Klaus Palme for providing the PIN1 antibody.

Author contributions

Conceptualization M.T. and G.V.; Investigation B.S., F.D., C.B., F.D., I.T., A.A., N.G. and K.D.; Writing – Original Draft M.T. and C.B.; Writing – Review & Editing B.S., C.B., J.K.-V., T.O., Y.D., G.V. and M.T.; Supervision M.T. and G.V.; Funding Acquisition J.K.-V., T.O., Y.D., G.V. and M.T.

Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

MATERIAL AND METHODS

Plant Materials, Growth Conditions and transformation

Arabidopsis thaliana ecotype Col-0 (wildtype) was used in this study. *ubc35-1 ubc36-1* double mutant (WiscDsLox323H12-CS851269 SALK_047381)(Li and Schmidt, 2010); *atg7-3* (SAIL_11_H07) (Naumann et al., 2019), *atg2-1* (SALK_076727) (Yoshimoto et al., 2009) and *UBQ10prom:V3KO* (K63 polyubiquitin sensor) and *UBQ10prom:V3NB* (control not binding) (Johnson and Vert, 2016) lines were previously described. *BRI1prom:BRI1-mCit* (Jaillais et al., 2011), *FLS2prom:FLS2-GFP* (Robatzek et al., 2006) and mCherry-ATG8e lines in *ubc35-1 ubc36-1* were generated by crossing. Primers used for genotyping are listed in table S1. Seeds were surface sterilized, and stratified for at least 24 h at 4° C in dark. Seedlings were grown vertically under sterile conditions in half-strength MS media supplemented with 1% sucrose; 500 mg/L MES pH 5.7 and 0.8% phyto agar, or in half-strength Linsmaier and Skoog Medium without sucrose and with 0.8% agar (where indicated). Plates were incubated at 21-22°C under long day conditions (16 h light/8 h dark; 90-100 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ irradiance) for five days (for imaging) or eight days (for protein extraction), unless otherwise stated. Plants used for ROS burst assay and protoplast isolation were grown in soil in phytochambers at 22°C under short day (8 h light, 16 h dark) conditions, for five to six weeks or four weeks, respectively. Stable *Arabidopsis* transgenic lines were generated by floral dipping using *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 and selected on 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ glufosinate for *UBQ10prom:GFP-UBC35* or 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin for *UBC35prom:GFP-UBC35*.

Growth, etiolation and gravity response assay

To test growth, five-day-old seedlings were transferred to liquid half-strength MS media containing 1% sucrose supplemented with 50 nM elf18 in sterile 6-well plates (30 seedlings/well). Fresh weight was measured after nine days of treatment.

In order to determine hypocotyl length, seeds were plated on half-strength Linsmaier and Skoog media without sucrose containing the indicated concentrations of epibrassinolide (eBL) (Sigma Ref E1641), propiconazole (PPZ) (Sigma Ref 45642), or mock. After stratification for three days, plants were grown in dark for seven days. Hypocotyl lengths were measured using Fiji.

Seedlings of the indicated genotypes were grown in half-strength MS media containing 0.25% sucrose, germinated in light (control) or darkness and grown for five days, for the etiolation assay.

The root length (light grown) and the hypocotyl length (dark grown) were measured using Fiji. For the gravity response, four-day-old seedlings grown in half-strength MS media containing 1% sucrose were turned 90° and incubated for 24 h. The bending angle was then measured using Fiji. Experiments were repeated at least twice.

ROS burst measurement

Leaf discs (0.125 cm²) from five to six-week-old Col-0 and *ubc35-1 ubc36-1* plants were gently excised and incubated overnight in water in a 96-well plate. ROS production was measured using a luminol-based assay (20 µg/mL of horseradish peroxidase and 30 µg/mL luminol). The discs were incubated for 20 min in the luminol buffer, treated with 250 nM elf18, and signal was measured over 1 h using Tecan Infinite F200 PRO plate reader. Luminescence signal is shown as Relative Light Units (RLU) over time. The experiment was repeated 3 times.

Protein purification, fractionation, in vivo GFP-trap precipitation and Immunoblot

For BES1 and phospho-BES1 protein level analyses, seven-day-old seedlings were treated with mock or 1 μM eBL in liquid medium for 15 minutes. Tissue was frozen and proteins extracted directly in Laemmli 4X buffer. For other protein level analyses, seedlings were grown for 7 days in plates and transferred to liquid half strength MS media 16 h prior to treatment. The following concentrations were used for treatments: 1 μM eBL, 1 μM flg22, 50 μM MG132, 100 μM Cycloheximide (CHX), 2 μM ConcanamycinA (ConA), 2 mM Dithiothreitol (DTT) for the indicated time points. The seedlings were blot dried on tissue paper and flash frozen in liquid nitrogen. The frozen tissue was ground in a mortar and total proteins were extracted using RIPA buffer (140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, SDS, 25 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA), or (for ATG8 and NBR1 detection) 1% (v/v) Triton x-100 buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplemented with proteases inhibitor cocktail. Samples were mixed with loading dye (final concentration: 0.1 M DTT, 10% glycerol, 1% SDS, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.01% Bromophenol Blue), denatured for 15 min at 65°C and cleared by centrifugation at 13,000 rpm for 10 min. Proteins were then analyzed by immunoblotting.

Protein fractionation was performed using MinuteTM plasma membrane protein isolation and cell fractionation kit (Invent) for plants. Briefly, 200-300 mg of fresh weight plant material was ground in liquid nitrogen and processed according to the manufacturer's instructions. The resulting fractions were then analyzed by immunoblotting.

For in vivo GFP-trap precipitation, 300-400 mg of material was flash-frozen, ground, and extracted in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 μM MG132, 50 μM PR-619, 1% proteinase inhibitor cocktail, 1 mM NaF, 0,5

mM Na_3VO_4 , 15 mM β -glycerophosphate and 1% Nonidet P-40). After clearing by centrifugation (14000 x g, 10 min at 4°C) an aliquot (1/10 of total) was sampled as input. The remaining proteins were immobilized on GFP-trap-A beads (Chromotek) incubating in rotation at 4°C for 3 h. The beads were then washed three times (chilled lysis buffer without Nonidet P-40), and proteins eluted by adding 2X SDS-PAGE loading dye and incubating at 65°C for 15 min. Proteins were then analyzed by immunoblotting.

Protein samples were resolved on bis-acrylamide Tris/glycine SDS-PAGE gel and blotted onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) or nitrocellulose membranes. Signal was detected on films using chemiluminescence. Signal intensity quantification was done using Fiji. Two to five replicates were done for each blot. The following antibodies were used: anti-BES1 1:5000 (Yu et al., 2011), Apu3 1:1000 (Millipore), anti-BRI1 1:5000 (Agrisera), anti-FLS2 1:500 (Chinchilla et al., 2006), anti-GFP JL-8 1:5000 (Takara-Clontech), anti-PIN1 clone 7E7 1:100 (Blilou et al., 2005), anti ATG8 1:5000 (Agrisera), anti NBR1 1:5000 (Agrisera), anti-mouse 1:5000 (Sigma) and anti-Rabbit 1:5000 (Sigma).

Cloning

The entry clone *pDONR201-UBC35* was used for LR recombination with *pUBN-GFP-Dest* (Grefen et al., 2010) destination vector by Gateway cloning (Invitrogen) generating *UBQ10prom:GFP-UBC35*. The genomic fragment containing 2058 bp upstream regulatory region and the genomic region of *UBC35* were amplified to generate *UBC35prom:GFP-gUBC35* using GoldenGate based modular assembly toolkit (Binder et al., 2014). All constructs were confirmed by sequencing. Primers used for the generation of the genomic construct are listed in table S1.

cDNA Synthesis and Quantitative Realtime PCR

Total RNA was extracted from one-week-old seedlings using NucleoSpin RNA purification kit and on-column DNaseI digestion was performed as per manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). Integrity and quality of RNA preparation was assessed using agarose gel electrophoresis and NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). 1 µg total RNA was used for first strand cDNA synthesis using M-MLV reverse transcriptase (Promega) or Maxima first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) as per manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was performed in a 15 µL reaction, containing approximately 10 ng cDNA, 0.3 µM of each gene specific primer (Table S1) and Maxima SYBR green qPCR Master mix (Thermo Fisher Scientific or Roche). PCR was performed using Realtime PCR system (Applied Biosystems or CFX OPUS 384 Biorad). Data represents two or three independent experiments using three technical replicates each.

Live-imaging and chemical treatment

For the immunolocalization Col-0 and *ubc35-1 ubc36-1* seedlings were fixed using 2% formaldehyde and permeabilized using Nonidet 40 before partial cell wall digestion and blocking in 3% BSA (Pasternak et al., 2015). Primary antibody (anti-PIN1 clone 7E7) was used at a dilution of 1:50 and Alexa conjugated anti mouse 488 (1:500) was used as secondary antibody. Images were acquired using Confocal Laser Scanner Microscope (CLSM).

To quantify changes in FLS2-GFP localization, seedlings were grown in half-strength MS media supplemented with 1% sucrose; 500 mg/L MES pH 5.7 and 0.8% phyto agar plates with high humidity for 9 days under short day conditions. Leaves were detached and incubated for 30 min in 20 µM flg22 or control and observed using CLSM. Z-stacks were acquired and analyzed using maximum projection in Fiji.

To image BRI1-mCit seedlings were grown for seven days in Linsmaier and Skoog Medium without sucrose and treated in liquid media with 100 μ M CHX for 1 hour prior to treatment with 50 μ M BFA for 30 min. To visualize BFA compartments, five or seven-day-old seedlings were pre-stained with 2-4 μ M FM4-64 for 5 min in dark followed by incubation in 50 μ M BFA for the indicated time. To visualize vacuolar accumulation of GFP-UBC35 and mCherry-ATG8e, seedlings were treated in liquid for 6 h with 2 μ M ConA before acquisition using confocal.

Protoplasts 6 μ g of *UBQ10prom::RFP-NBR1* (Brillada and Trujillo, 2022) were transformed in 100 μ l of Col-0 or *ubc35-1 ubc36-1*. Transformed protoplasts were incubated then treated for 12 h with 2 μ M ConA before CLSM imaging.

Subcellular localization was performed using the Zeiss LSM880, or TCS SP5 (Leica), or SP8 (Leica) laser scanning confocal microscopes. GFP was excited using the 488 nm laser in conjunction with a 505-550 band-pass, mCit was excited at 514 nm and emission collected between 524 and 574 nm, excitation at 561 nm with 588–696 nm band-pass was used for mCherry and excitation at 514 nm or 561 with emission collection at 600-680 or 620-660 nm for FM4-64. Image analysis was done using Fiji. FLS2 internalization, BFA bodies and NBR1 punctae were analyzed using the Particles plugin.

Split-YFP assays

28 day-old *Nicotiana benthamiana* were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* carrying the constructs *p35S::UBC35-mCitrine(Cter)*, *p35S::UBC36-mCitrine(Cter)*, *p35S::BRI1-mCitrine(Cter)*, *p35S::BRI1-mCitrine(Nter)*, *p35S::FLS2-mCitrine(Nter)* and *P19*. 48 hours after infiltration, water-mounted leaves were imaged with an SP8 confocal laser scanning microscope (Leica). To visualize the reconstituted mCitrine, a 514-laser line was used for excitation. Laser intensity and detection settings were kept constant.

Quantification and statistical analysis

Statistical analyses were performed using excel and/or BoxPlotR [56]. BoxPlots show median and inter quantile range (IQR), outliers (41.5 times IQR) Tukey - whiskers extend and notches (defined as $\pm 1.58 \cdot \text{IQR} / \sqrt{n}$) representing the 95% confidence interval for each median are shown. Number of measurements and the employed statistical methods can be found in the corresponding figure legends and, or in the results section.

SUPPLEMENTAL DATA

Primer	Sequence	Use
ubc35-1 F	GCACTCTTCTTTGCCTTATGG	genotyping
ubc35-1 R	ACACAACCAAAGACATGCTCC	genotyping
ubc36-1 F	ACAATCCGAACATGAGCAATC	genotyping
ubc36-1 R	ATCGAGTCATCGAGATCATGG	genotyping
p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	genotyping
LBb1-3	ATTTTGCCGATTTGGAAC	genotyping
atg7-3 F	CAGCGTGATCTGTGAGAACTG	genotyping
atg7-3 R	TTC TTG GAG CTG GTA CAT TGG	genotyping
Sail LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	genotyping
bri1 F	CGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTT	genotyping
bri1 R	CCACACGGCGGAAGATTGCGAT	genotyping

act2 F	GCCCAGAAGTCTTGTTCCAG	qRT-PCR
act2 R	TCATACTCGGCCTTGGAGAT	qRT-PCR
dwf4 F	GGTGATCTCAGCCGTACATTTGGA	qRT-PCR
dwf4 R	CCCCACGTGCAAAAACTACCACTTC	qRT-PCR
ste1 F	ACGTGGTTGGACCAAATGTT	qRT-PCR
ste1 R	GATGGGTGGCATGGAGATAC	qRT-PCR
bas F	CCAAGGACCATGTCGTTAAGC	qRT-PCR
bas1 R	CCTGAAGTATAGCAAGATTCTGACC	qRT-PCR
Tub6 F	TGGGCTAAAGGGCATTACAC	qRT-PCR
Tub6 R	GACCTTTGGTGATGGGAAGA	qRT-PCR
PIN1 F	TACTCCGAGACCTTCCAACACTACG	qRT-PCR[16]
PIN1 R	TCCACCGCCACCACTTCC	qRT-PCR[16]
FLS2 F	ACTCTCCTCCAGGGGCTAAGGAT	qRT-PCR[17]
FLS2 R	AGCTAACAGCTCTCCAGGGATGG	qRT-PCR[17]
BRI1 F	CCGTGTACTTTCGATGGCGTTA	qRT-PCR[18]
BRI1 R	GAGAGACAGGAGAGACGAGGAC	qRT-PCR[18]
UBC35.GG.F1	ATGGTCTCAGCGGCGACTAACAGTGGTTCAACTTGTGCTTG	cloning
UBC35.GG.F2	ATGGTCTCAGTTCTGATAATCCGAGTATTAGATTTTTTGC	cloning
UBC35.GG.F3	ATGGTCTCAACTCTGAGATCCATGATTCTGGTTGGATTATG	cloning
UBC35.GG.F4	ATGGTCTCACACCATGGCCAACAGTAATTTGCCGCG	cloning
UBC35.GG.R1	TAGGTCTCTGAACACTATTTGACTACCTTCATAAGGTGATTG	cloning
UBC35.GG.R2	TAGGTCTCTGAGTCCATTTGGTATGTGTACAAATAAATACC	cloning
UBC35.GG.R3	TAGGTCTCTCCTTTGCGCCGCTTGATAAAGACGGGTCCATTCC	cloning
UBC35.GG.R4	TAGGTCTCTCAGATATCACTTGTGATCGAGCTCAGAGAG	cloning

Table S1: Primers used in this study

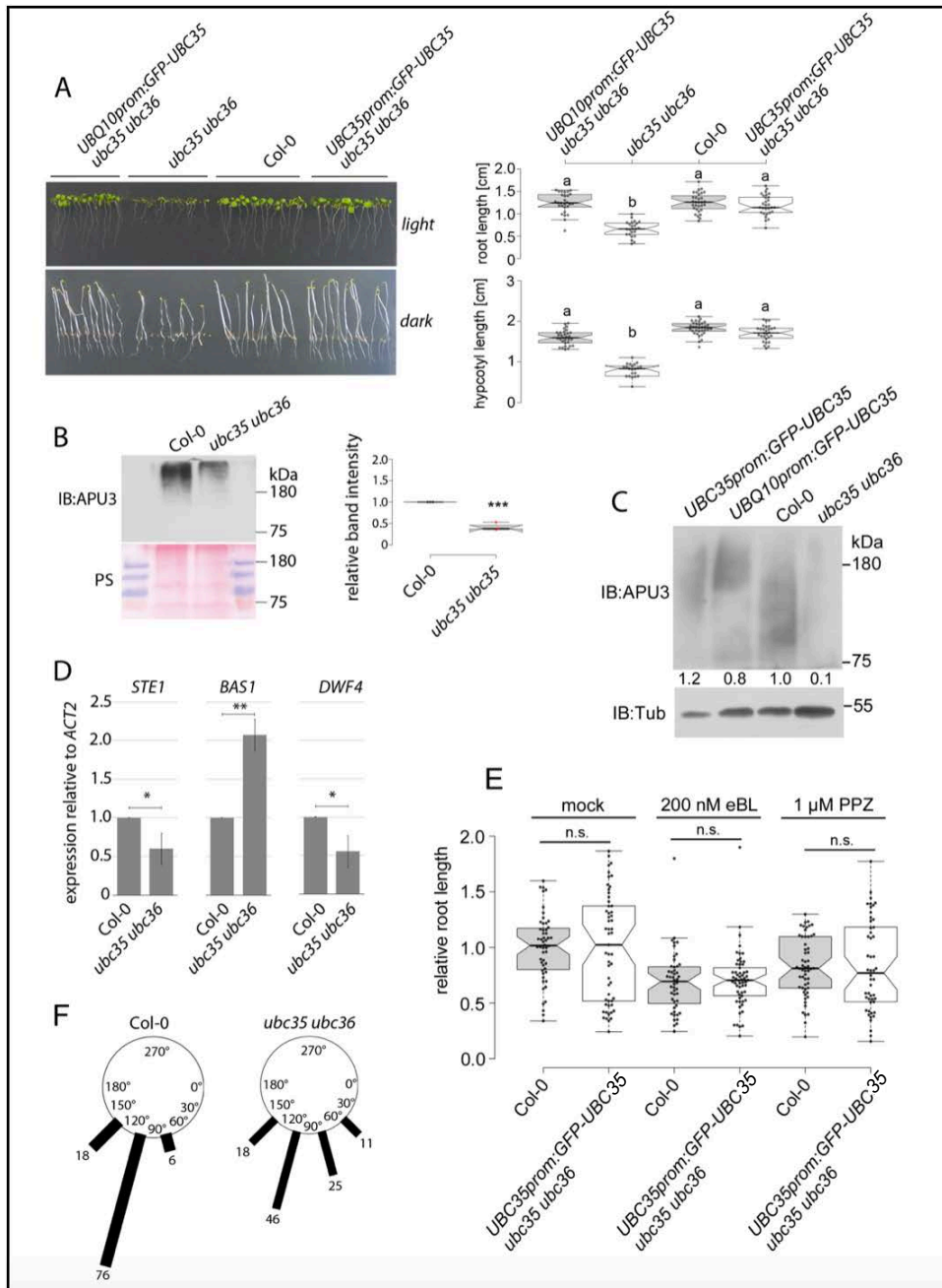


Figure S2: Characterization of *ubc35 ubc36* mutant. **A.** Five-day-old seedlings of *ubc35 ubc36* grown under long-day conditions (upper panel) or etiolated for 5 days. General development and etiolation phenotypes are complemented in *UBQ10prom:GFP-UBC35* and *UBC35prom:GFP-UBC35* transgenic seedlings. **B.** Immunoblot using total protein extracts from 7-day-old WT Col-0 and *ubc35 ubc36* seedlings using the Ub-K63-specific antibody Apu3. Ponceau S (PS) shows equal loading. Band intensity was quantified and normalized to PS. **C.** Immunoblot using total protein extracts from 7-day-old WT Col-0, pUBC35:GFP-UBC35, pUBI10:GFP-UBC35 and *ubc35 ubc36* seedlings using the Ub-K63-specific antibody Apu3. Tubulin (tub) shows equal loading. K63 polyubiquitination are complemented in *UBQ10prom:GFP-UBC35* and *UBC35prom:GFP-UBC35* transgenic seedlings. **D.** Relative expression of the brassinosteroid regulated genes *STE1/DWF7*, *BAS1/CYP72B1*, and *DWF4* compared to *ACTIN2* analysed by real-time quantitative PCR (n=9). Asterisks indicate statistically significant difference using Mann-Whitney test, (*:P≤0.05,**:P≤0.01). **E.** Seven-day-old seedlings of *ubc35 ubc36* grown under long-day with 200nM eBL, 1 μM PPZ and mock conditions. Root lengths were measured and ratio under mock condition are represented. Root length BR phenotypes are complemented in *UBC35prom:GFP-UBC35* transgenic seedlings. **F.** Analysis of gravitropic responses in WT Col-0 and *ubc35 ubc35* showing the bending angle distribution measured 24 h after a 90° rotation of five-day-old seedlings.

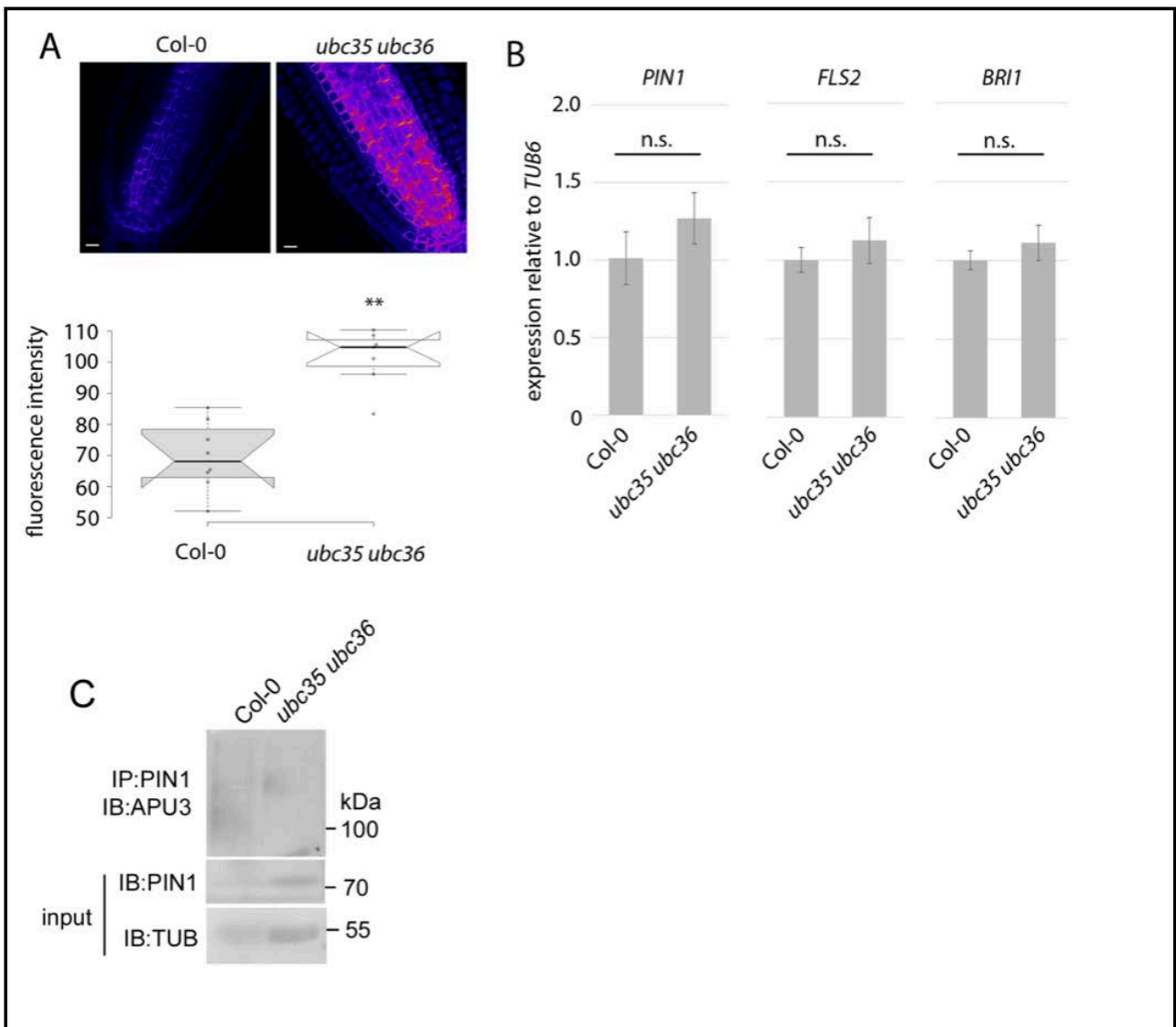


Figure S3: Altered protein levels in *ubc35 ubc36* mutant are independent of transcript levels. A. Representative image of PIN1 localization by immunohistochemistry in five-day-old seedling root tip. Fluorescence intensity was quantified and is shown as area unit (au) (n=6). B. Transcript levels of selected membrane proteins (as in figure 2A) in the WT Col-0 and *ubc35 ubc36* backgrounds (n=4). *Tubulin 6 (TUB6)* was used as a reference gene. C. Immunoblot using total protein extracts from 7-day-old WT Col-0, and *ubc35 ubc36* seedlings after a PIN1 immunoprecipitation using the Ub-K63-specific antibody APU3. Tubulin (tub) shows equal loading.

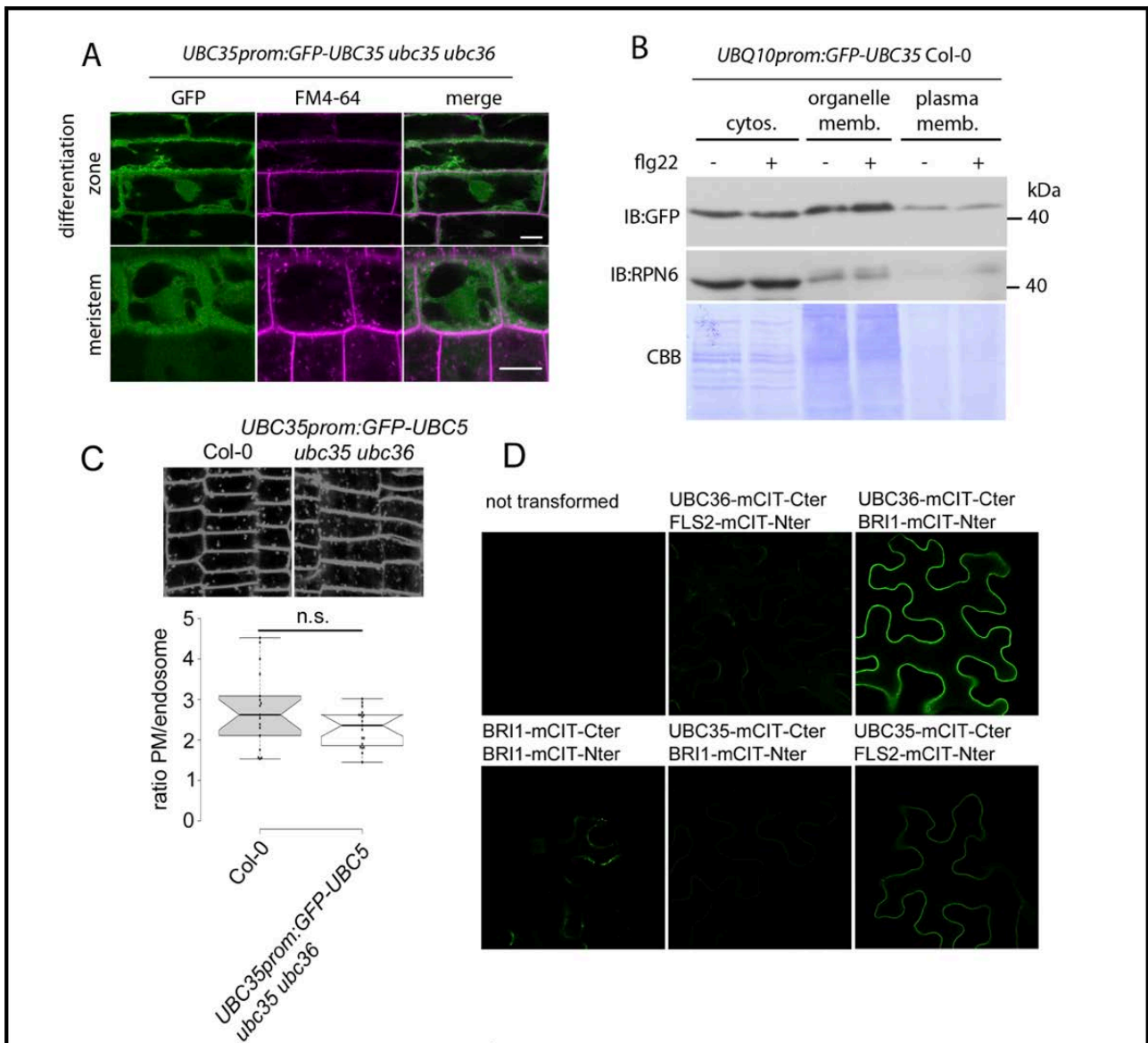


Figure S4: GFP-UBC35 is mainly cytosolic, but can associate with membranes. A. Seedling expressing *UBQ10prom:GFP-UBC35* in *ubc35 ubc36* background stained with FM4-64 (5 μ M), analysed by CLSM. Shown are meristematic and differentiation zones of 6-day-old seedling roots. Scale bar = 10 μ m. B. Protein fractions of six-day-old seedlings expressing *UBQ10prom:GFP-UBC35* in *ubc35 ubc36* \pm 2 μ M flg22 30 min or mock treatment, analysed by immunoblot using anti-GFP and anti-RPN6 (cytosolic protein). CBB shows equal loading. C. Seedling expressing *UBQ10prom:GFP-UBC35* in *ubc35 ubc36* and Col-0 background stained with FM4-64 (5 μ M), Fluorescence intensity was quantified and is shown as area unit (au). D. BiFC in tobacco of UBC35mCITRINE-Cter and UBC36mCITRINE-Cter with BRI1mCITRINE-Nter and FLS2mCITRINE-Nter, BRI1 homodimerization was used as a positive control.

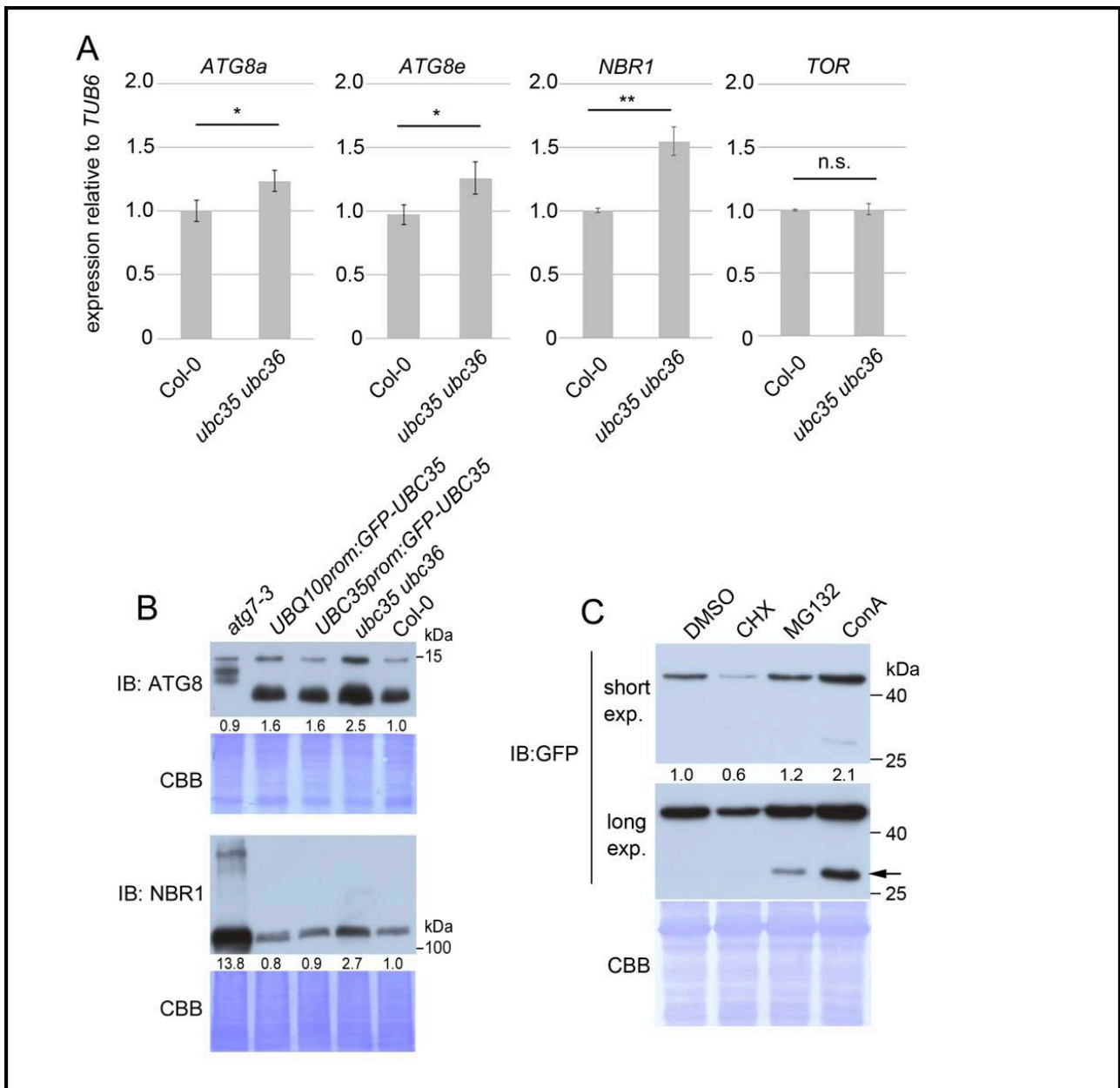


Figure S5: GFP-UBC35 is degraded via the vacuole. A. Transcript levels of *ATG8a*, *ATG8e*, *NBR1* and *TOR* in the WT Col-0 and *ubc35 ubc36* backgrounds (n=4). *Tubulin 6 (TUB6)* was used as a reference gene. B. Immunoblot using total protein extracts from 7-day-old WT Col-0, pUBC35:GFP-UBC35, pUBI10:GFP-UBC35, *atg7-3* and *ubc35 ubc36* seedlings using the ATG8 and NBR1 antibodies. CBB shows equal loading. ATG8 and NBR1 protein levels are complemented in *UBQ10prom:GFP-UBC35* and *UBC35prom:GFP-UBC35* transgenic seedlings. C. Protein samples from six-day-old seedlings expressing *UBQ10prom:GFP-UBC35* seedlings and were treated with 100 μ M DMSO, 100 μ M CHX, 100 μ M MG132 or 2 μ M ConcA for 5 h and total proteins were analysed by immunoblot. CBB shows equal loading.

2.3 Addendum

2.3.1 Inhibition de la poly-ubiquitination en K63 par approche pharmacologique.

Afin de répondre plus rapidement à l'hypothèse formulée à la suite des phénotypages, et de visualiser BRI1 dans un fond génétique sans poly-ubiquitination en K63, une approche pharmacologique a été mise en place en parallèle des croisements. En effet chez l'Homme, il a été montré que la drogue NSC697923 inhibe le complexe de l'E2 ligase UBC13, altérant en conséquent la poly-ubiquitination en K63 (Pulvino et al., 2012). Sous réserve d'une activité similaire chez les plantes, cette drogue représenterait un bon outil pour caractériser le rôle de la poly-Ub en K63 sur l'endocytose de BRI1. Avant de tester cette drogue sur BRI1-*mCITRINE*, cette drogue a été testée afin de s'assurer de sa fonctionnalité chez les végétaux. Pour cela, le fond sauvage Col-0 a été traité avec une gamme de concentrations de NSC697923 (de 0 à 100mM) pendant 3h. Le niveau global d'ubiquitination a été évalué avec l'anticorps P4D1, à partir d'extraits bruts de plantules âgées de 7 jours. Le double mutant *ubc35 ubc36*, altéré dans son ubiquitination en K63 a été utilisé comme témoin positif. L'ubiquitination en K63 étant une des chaînes majoritaires chez les plantes, on observe chez ce mutant un niveau d'ubiquitination global grandement réduit (**Figure 14**). En revanche, quelle que soit la concentration de NSC697923 appliquée aux plantules Col-0, aucune modification du taux d'ubiquitination global n'est observée, même à la concentration la plus forte 50 fois supérieure à celle utilisée chez l'Homme (**Figure 14**), suggérant que le traitement dans ces conditions d'expérimentation n'est pas efficace chez *Arabidopsis thaliana*.

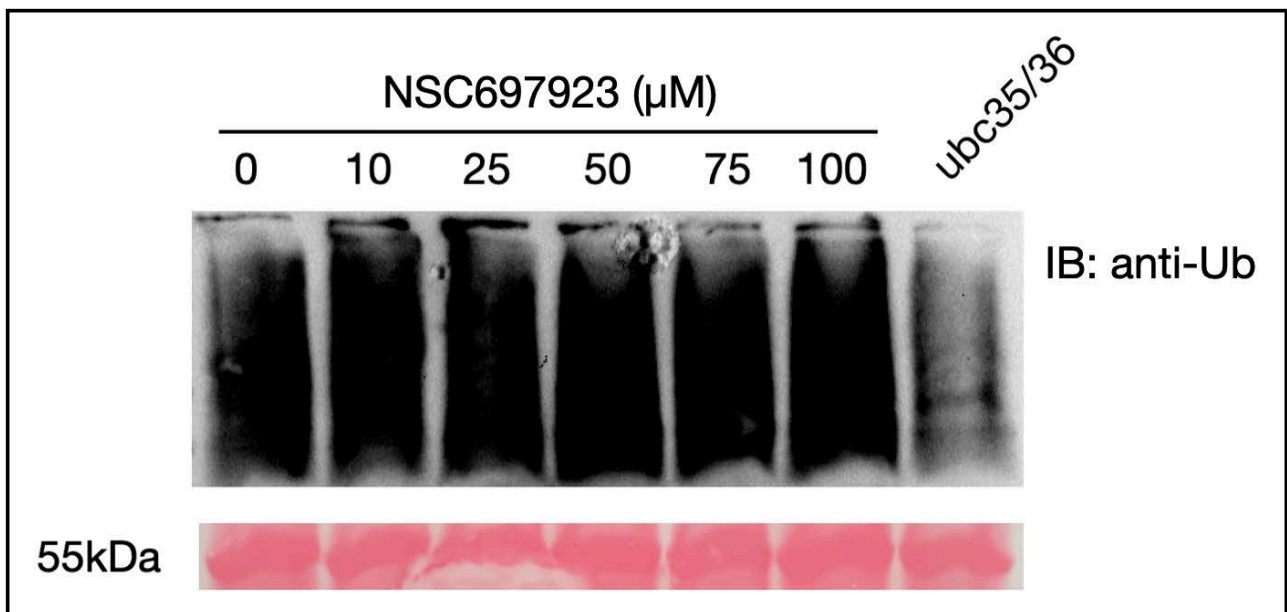


Figure 14 : L'inhibiteur NSC677923 du complexe E2 enzyme chez les animaux ne semble pas réduire l'ubiquitination globale chez les plantes dans nos conditions. Western blot anti-ubiquitination totale (P4D1) réalisé sur des extraits bruts de plantules de Col-0 âgées 7 jours traitées 3h en milieu liquide avec différentes concentrations de NSC697923. *ubc35 ubc36* est utilisé comme témoin positif et un traitement mock comme négatif.

2.3.2 Test d'interaction entre les récepteurs membranaires BRI1, FLS2 et les E2 ligases UBC35, UBC36 par co-immunoprécipitation.

En complément des analyses de BiFC présentées au sein de ce premier article, l'interaction entre BRI1 et UBC35, BRI1 et UBC36, FLS2 et UBC35, FLS2 et UBC36 a été évaluée *in planta* par co-immunoprécipitation. Les constructions p35S::BRI1*mCHERRY* ou p35S::FLS2*mCHERRY* et p35S::UBC35-*GFP* ou p35S::UBC36-*GFP* ont été agro-infiltrées dans des feuilles de tabacs, en présence de P19 afin de stabiliser les protéines de fusions produites. En parallèle, la construction p35S::*mCHERRY* qui n'interagit ni avec UBC35 ni avec UBC36 a été utilisée comme témoin négatif. A la suite d'un enrichissement microsomal, réalisé afin de concentrer les protéines membranaires et d'une immunoprécipitation utilisant des billes couplées à un anticorps anti-RFP, on observe des bandes révélant la présence d'UBC35 et d'UBC36 dans les éluats des tests d'interaction avec BRI1 et FLS2 (**Figure 15**), suggérant que UBC35 et UBC36 pourraient interagir avec les deux récepteurs membranaires *in planta*.

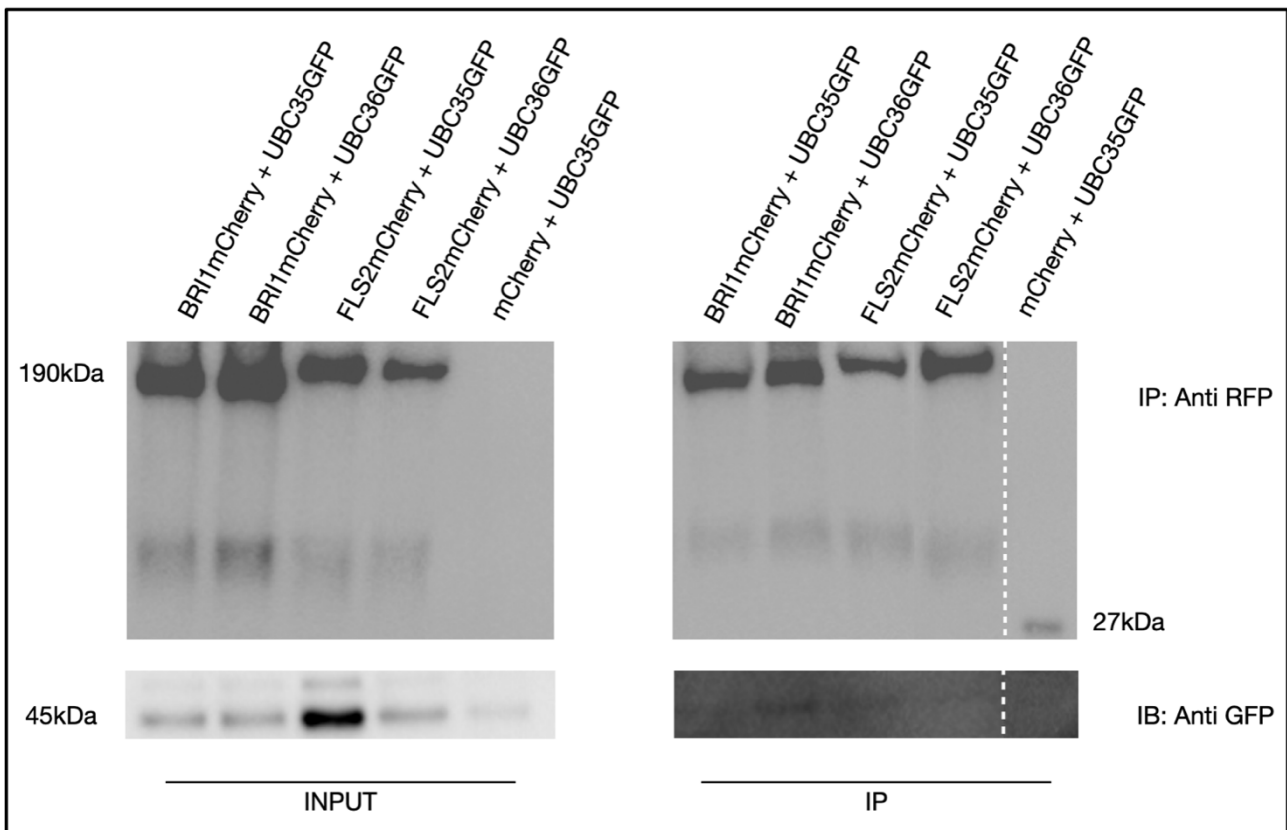


Figure 15 : UBC35 et UBC36 semblent faiblement interagir *in planta* avec BRI1 et FLS2. Co-immunoprécipitation de BRI1mCherry et de FLS2mCherry en présence de UBC35GFP et UBC36GFP, après agro-infiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana*, révélation d'UBC35GFP et d'UBC36GFP avec un western blot anti-GFP. La mCherry non fusionnée à une protéine a été utilisée comme contrôle négatif et un western blot anti-RFP(mCherry) a été réalisé pour vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation.

2.4 Références

- Aniento, F., Sanchez de Medina Hernandez, V., Dagdas, Y., Rojas-Pierce, M., and Russinova, E. (2022). Molecular mechanisms of endomembrane trafficking in plants. *Plant Cell* 34, 146-173.
- Binder, A., Lambert, J., Morbitzer, R., Popp, C., Ott, T., Lahaye, T., and Parniske, M. (2014). A modular plasmid assembly kit for multigene expression, gene silencing and silencing rescue in plants. *PLoS One* 9, e88218.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433, 39-44.
- Brillada, C., and Trujillo, M. (2022). E2 ubiquitin-conjugating enzymes (UBCs): drivers of ubiquitin signalling in plants. *Essays Biochem* 66, 99-110.
- Brzovic, P.S., Keeffe, J.R., Nishikawa, H., Miyamoto, K., Fox, D., 3rd, Fukuda, M., Ohta, T., and Klevit, R. (2003). Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5646-5651.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G. (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* 18, 465-476.
- Dubeaux, G., Neveu, J., Zelazny, E., and Vert, G. (2018). Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol. Cell* 69, 953-964 e955.
- Dunn, R., and Hicke, L. (2001). Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Molecular biology of the cell* 12, 421-435.
- Eddins, M.J., Carlile, C.M., Gomez, K.M., Pickart, C.M., and Wolberger, C. (2006). Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nature structural & molecular biology* 13, 915-920.
- Erpapazoglou, Z., Walker, O., and Haguenuer-Tsapis, R. (2014). Versatile roles of k63-linked ubiquitin chains in trafficking. *Cells* 3, 1027-1088.
- Fotia, A.B., Ekberg, J., Adams, D.J., Cook, D.I., Poronnik, P., and Kumar, S. (2004). Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J. Biol. Chem.* 279, 28930-28935.
- Gao, C., Luo, M., Zhao, Q., Yang, R., Cui, Y., Zeng, Y., Xia, J., and Jiang, L. (2014). A unique plant ESCRT component, FREE1, regulates multivesicular body protein sorting and plant growth. *Curr Biol* 24, 2556-2563.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M.R. (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.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492.

- Jaillais, Y., Belkhadir, Y., Balsemao-Pires, E., Dangl, J.L., and Chory, J. (2011). Extracellular leucine-rich repeats as a platform for receptor/coreceptor complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8503-8507.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T., and Liu, Y.C. (1999). The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 286, 309-312.
- Johnson, A., and Vert, G. (2016). Unraveling K63 Polyubiquitination Networks by Sensor-Based Proteomics. *Plant physiology* 171, 1808-1820.
- Kalinowska, K., Nagel, M.K., Goodman, K., Cuyas, L., Anzenberger, F., Alkofer, A., Paz-Ares, J., Braun, P., Rubio, V., Otegui, M.S., et al. (2015). Arabidopsis ALIX is required for the endosomal localization of the deubiquitinating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E5543-5551.
- Katsiarimpa, A., Anzenberger, F., Schlager, N., Neubert, S., Hauser, M.T., Schwechheimer, C., and Isono, E. (2011). The Arabidopsis deubiquitinating enzyme AMSH3 interacts with ESCRT-III subunits and regulates their localization. *The Plant cell* 23, 3026-3040.
- Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T., and Dikic, I. (2009). NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy* 5, 732-733.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 34, 259-269.
- Kwon, Y.T., and Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci*.
- Leitner, J., Petrasek, J., Tomanov, K., Retzer, K., Parezova, M., Korbei, B., Bachmair, A., Zazimalova, E., and Luschnig, C. (2012). Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of Arabidopsis root growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 8322-8327.
- Li, W., and Schmidt, W. (2010). A lysine-63-linked ubiquitin chain-forming conjugase, UBC13, promotes the developmental responses to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant J.* 62, 330-343.
- Li, W., and Schmidt, W. (2010). Non-proteolytic protein ubiquitination is crucial for iron deficiency signaling. *Plant Signal Behav* 5, 561-563.
- MacGurn, J.A., Hsu, P.C., and Emr, S.D. (2012). Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem* 81, 231-259.
- Martins, S., Dohmann, E.M., Cayrel, A., Johnson, A., Fischer, W., Pojer, F., Satiat-Jeunemaitre, B., Jaillais, Y., Chory, J., Geldner, N., et al. (2015). Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* 6, 6151.
- Mettlen, M., Chen, P.H., Srinivasan, S., Danuser, G., and Schmid, S.L. (2018). Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 87, 871-896.
- Michaeli, S., Galili, G., Genschik, P., Fernie, A.R., and Avin-Wittenberg, T. (2016). Autophagy in Plants--What's New on the Menu? *Trends Plant Sci* 21, 134-144.

Moulinier-Anzola, J., Schwihla, M., De-Araujo, L., Artner, C., Jorg, L., Konstantinova, N., Luschnig, C., and Korbei, B. (2020). TOLs Function as Ubiquitin Receptors in the Early Steps of the ESCRT Pathway in Higher Plants. *Mol Plant* 13, 717-731.

Nagel, M.K., Kalinowska, K., Vogel, K., Reynolds, G.D., Wu, Z., Anzenberger, F., Ichikawa, M., Tsutsumi, C., Sato, M.H., Kuster, B., et al. (2017). Arabidopsis SH3P2 is an ubiquitin-binding protein that functions together with ESCRT-I and the deubiquitylating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E7197-E7204.

Naumann, C., Muller, J., Sakhonwasee, S., Wiegand, A., Hause, G., Heisters, M., Burstenbinder, K., and Abel, S. (2019). The Local Phosphate Deficiency Response Activates Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Autophagy. *Plant Physiol* 179, 460-476.

Pasternak, T., Tietz, O., Rapp, K., Begheldo, M., Nitschke, R., Ruperti, B., and Palme, K. (2015). Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* 11, 50.

Persaud, A., Alberts, P., Hayes, M., Guettler, S., Clarke, I., Sicheri, F., Dirks, P., Ciruna, B., and Rotin, D. (2011). Nedd4-1 binds and ubiquitylates activated FGFR1 to control its endocytosis and function. *Embo J* 30, 3259-3273.

Pulvino, M. et al. Inhibition of proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma cells by a small-molecule inhibitor of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13-Uev1A. *Blood* 120, 1668-1677 (2012).

Robatzek, S., Chinchilla, D., and Boller, T. (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev.* 20, 537-542.

Romero-Barrios, N., Monachello, D., Dolde, U., Wong, A., San Clemente, H., Cayrel, A., Johnson, A., Lurin, C., and Vert, G. (2020). Advanced Cataloging of Lysine-63 Polyubiquitin Networks by Genomic, Interactome, and Sensor-Based Proteomic Analyses. *Plant Cell* 32, 123-138.

Romero-Barrios, N., and Vert, G. (2018). Proteasome-independent functions of lysine-63 polyubiquitination in plants. *New Phytol* 217, 995-1011.

Sauer, M., and Kleine-Vehn, J. (2019). PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. *Development* 146.

Schmidt, M.H.H., and Dikic, I. (2005). The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 907-918.

Shih, S.C., Sloper-Mould, K.E., and Hicke, L. (2000). Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* 19, 187-198.

Sims, J.J., Scavone, F., Cooper, E.M., Kane, L.A., Youle, R.J., Boeke, J.D., and Cohen, R.E. (2012). Polyubiquitin-sensor proteins reveal localization and linkage-type dependence of cellular ubiquitin signaling. *Nat Methods* 9, 303-309.

Spitzer, M., Wildenhain, J., Rappsilber, J., and Tyers, M. (2014). BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. *Nat Methods* 11, 121-122.

Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., and Johansen, T. (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* 7, 993-1010.

- Theodoulou, F.L., Orosa-Puente, B., Trujillo, M., and Rubio, V. (2022). Plant proteostasis: a proven and promising target for crop improvement. *Essays Biochem* 66, 75-85.
- Turek, I., Tischer, N., Lassig, R., and Trujillo, M. (2018). Multi-tiered pairing selectivity between E2 ubiquitin-conjugating enzymes and E3 ligases. *J. Biol. Chem.* 293, 16324-16336.
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380-383.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., and Shirasu, K. (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2914-2927.
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., et al. (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65, 634-646.
- Zhou, J., Liu, D., Wang, P., Ma, X., Lin, W., Chen, S., Mishev, K., Lu, D., Kumar, R., Vanhoutte, I., et al. (2018). Regulation of *Arabidopsis* brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E1906-E1915.
- Zhou, J., Zhang, Y., Qi, J., Chi, Y., Fan, B., Yu, J.Q., and Chen, Z. (2014). E3 ubiquitin ligase CHIP and NBR1-mediated selective autophagy protect additively against proteotoxicity in plant stress responses. *PLoS Genet* 10, e1004116.
- Zhou, R., Patel, S.V., and Snyder, P.M. (2007). Nedd4-2 catalyzes ubiquitination and degradation of cell surface ENaC. *J. Biol. Chem.* 282, 20207-20212.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125, 749-760.

Chapitre 3 : Le mécanisme sous-jacent à la poly-ubiquitination de BRI1

3.1 Avant-Propos

Dans le chapitre précédent, il a été mis en avant que deux enzymes E2, UBC35 et UBC36, sont capables d'ubiquitiner BRI1 en K63. Le processus à l'origine de cette modification post-traductionnelle implique initialement la reconnaissance par l'enzyme E2 d'une E3 ligase liée à BRI1.

Les E3 ligases confèrent la spécificité du substrat de l'ubiquitination (Lee and Kim., 2011). Ces enzymes se retrouvent largement plus présentes dans le domaine végétal que chez les autres espèces eucaryotes, où elles sont impliquées principalement dans l'initiation à la dégradation de protéines (Patterson, 2002), suggérant des fonctions biologiques associées bien plus diverses chez les végétaux. Elles sont catégorisées par leur mécanisme d'action et la présence de domaines spécifiques tels que des domaines F-box, RING, HECT ou U-box (Stone and Callis, 2007). Parmi ces enzymes, les E3 ligases à domaine U-box (PUB, Plant U-box type ubiquitin ligases), spécifiques aux plantes, ont été décrites comme fortement régulées par des stress biotiques et abiotiques (Yee and Goring, 2009, Turek et al., 2018). Deux d'entre elles, PUB12 et PUB13 ont été montrées comme interagissant avec des récepteurs membranaires. PUB13 interagit avec FLS2 (Lu et al., 2011), LYK5 (Liao et al., 2017), et BRI1 (Zhou et al., 2018). Par ailleurs, des profils d'ubiquitination sur BRI1 *in vitro* ont montré que PUB12 et PUB13 jouent un rôle sur l'ubiquitination globale de BRI1. A l'aide d'un mutant *bri1* « Kinase Dead », muté sur la lysine 911 empêchant la phosphorylation induite par les BRs, il a également été démontré

in vitro que l'activité kinase de BRI1 est nécessaire pour l'interaction avec PUB13 et par extension son activité d'ubiquitination. Enfin PUB12 et PUB13 sont nécessaires à l'internalisation de BRI1 ce qui se traduit par un défaut d'endocytose de BRI1 chez les mutants correspondants. On observe par ailleurs chez le double mutant *pub12 pub13* une hypersensibilité aux BRs, semblable mais moindre à celle décrite chez le double mutant *ubc35 ubc36*. (Zhou et al., 2018, Saeed, Deligne et al., en révision).

Les similitudes de phénotypes de sensibilités aux BRs entre les deux doubles mutants et l'implication sur l'internalisation de BRI1 des E3 ligases PUB12 et PUB13 suggèrent que BRI1 pourrait être poly-ubiquitiné en K63 par UBC35 et UBC36, à la suite de la reconnaissance du récepteur par PUB13. Afin de tester cette hypothèse, il est nécessaire de déterminer si UBC35 et UBC36 sont capables d'interagir avec PUB13, cette question est adressée dans l'article suivant (Deligne et al., en préparation) qui sera soumis à Plant Signaling and Behavior en tant qu'Addendum suite à la publication de l'article sur la caractérisation d'UBC35 et UBC36 dans l'endocytose de BRI1.

3.2 Interaction of the UBC35/36 E2 conjugating enzymes and the PUB13 E3 ubiquitin ligase mediates BRI1 K63 polyubiquitination

Florian Deligne and Grégory Vert*

Plant Science Research Laboratory (LRSV), UMR5546 CNRS/University of Toulouse
3/Toulouse INP, 24 chemin de Borde Rouge, 31320 Auzeville Tolosane, France

* Corresponding: gregory.vert@univ-tlse.fr

Abstract

Brassinosteroids are plant steroid hormones controlling many aspects of plant growth and development, and that are perceived by the plasma membrane-localized receptor kinase BRI1. BRI1 is post-translationally modified by K63 polyubiquitination, controlling its endocytosis and vacuolar degradation. This involves the E2 ubiquitin conjugating enzymes UBC35 and UBC36, presumably the E3 ubiquitin ligases PUB12 and PUB13, and the deubiquitinases UBP12 and UBP13. Here, we confirm this proposed model for the decoration of BRI1 with K63-linked ubiquitin chains by demonstrating that PUB13 colocalizes and interacts with the K63 polyubiquitin-dedicated E2s UBC35 and UBC36. Our results, combined with the recent work performed by us and others have therefore identified the machinery controlling the formation and removal of K63-linked ubiquitin chains to control BRI1 stability at the cell surface and BR responses.

Introduction

Plants use a vast number of cell surface receptors to constantly monitor endogenous and exogenous signals. Such receptors not only perceive signals but also transduce the corresponding information culminating in the regulation of gene expression. Brassinosteroids (BRs) are central plant polyhydroxylated steroid hormones controlling plant growth and development (Clouse and Sasse 1998). The major BR receptor named BR INSENSITIVE 1 (BRI1) belongs to the leucine-rich repeat receptor like kinase family which possesses about 200 members in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Meng et al., 2020). BRI1 is controlled through an intricate array of post-translational modifications, tightly controlling its activity, subcellular localization and levels to ensure appropriate BR

signaling (Claus et al., 2022). As such, BRI1 serves as the archetypal receptor in plants to study how post-translational modifications regulate receptor-mediated signaling.

Among the post-translational modifications targeting BRI1, ubiquitination recently emerged as critical to control its endocytosis and vacuolar degradation (Martins et al., 2015, Saeed, Deligne in press). Ubiquitination is a post-translational modification where the 76 amino acid polypeptide ubiquitin is covalently attached to a target lysine in a protein through the successive action of the E1 ubiquitin activating enzyme, the E2 ubiquitin conjugating enzyme and the E3 ubiquitin ligase (Komander and Rape, 2012). Ubiquitination often occurs as polyubiquitin chains of different topologies depending on the arrangement of the ubiquitin moieties with the chains (Miricescu et al., 2018). The type of chain is specified by the E2, while the E3 confers specificity in the substrate recruitment (Lee and Kim., 2011). BRI1 was shown to be heavily decorated by lysine(K)63-linked polyubiquitin chains covalently attached to many intracellular lysine residues (Martins et al., 2015). The ubiquitination of BRI1 was shown to be regulated by BRs as increased ubiquitination is observed after brassinolide treatment, and reduced ubiquitination seen for a signaling-defective BRI1 kinase-dead variant or in the *bak1* mutant background impaired in full BRI1 activation. The substitution of 25 target lysine residues within BRI1 (BRI1_{25KR}) prevents BRI1 ubiquitination and is associated with hypersensitivity to BRs. BRI1 ubiquitination was also associated with plant responses to elevated ambient temperature (Martins et al., 2017). Plants facing slightly elevated temperature decrease BRI1 levels and this is abolished for the non-ubiquitinatable BRI1_{25KR}. At the cellular level, BRI1_{25KR} showed slower internalization kinetics from the cell surface and was defective in endosomal sorting and thus failed to reach the vacuole, leading to increased cell surface BRI1 levels. Such observations were recently confirmed through the analysis of the *ubc35ubc36* mutant impaired in global K63

polyubiquitination, where BRI1 internalization was strongly impacted, and bulk endocytosis slowed down (Saeed, Deligne in press). This, together with work on other cell surface proteins, established a crucial role for K63 polyubiquitination in endocytosis and vacuolar degradation of plasma membrane proteins and global endocytosis in plants.

The machinery driving the ubiquitination of BRI1 has recently been identified. The formation of K63 polyubiquitin-linked chain in *Arabidopsis* requires the E2 UBIQUITIN CONJUGATING ENZYMES 35 (UBC35) and UBC36 (Romero-Barrios et al., 2020). Both UBC35 and UBC36 are involved in the K63 polyubiquitination of BRI1 and its endocytosis (Saeed, Deligne in press). The E3 ubiquitin ligases PLANT U-BOX 12 (PUB12) and PUB13 were shown to interact with and ubiquitinate BRI1, although the type of ubiquitin chain catalyzed has not been determined (Zhou et al., 2018). Surprisingly, PUB13 poorly interacts with UBC35 in split luciferase complementation assay, questioning the ability of PUB13 to recruit BRI1 for K63 polyubiquitination. Two deubiquitinases (DUBs), UBIQUITIN BINDING PROTEASE 12 (UBP12) and UB13, directly interact with and effectively removes K63-linked polyubiquitin chains from BRI1, thereby negatively modulating BRI1 vacuolar degradation (Luo et al., 2022). Here, we demonstrate that the PUB13 E3 ubiquitin ligases that targets BRI1 for ubiquitination does interact with UBC35 and UBC36 E2 ubiquitin conjugating enzymes, strongly suggesting that PUB13 is responsible for BRI1 K63 polyubiquitination.

Results

To investigate the role of PUB13 in BRI1 K63 polyubiquitination, we examined the ability of PUB13 to interact with the UBC35 and UBC36 E2 ubiquitin conjugating enzymes, which catalyze K63-linked polyubiquitin chains in Arabidopsis.

We first checked if PUB13 and UBC35 or UBC36 were found in the same subcellular territories, as both were reported to be found in multiple locations. UBC35-GFP or UBC36-GFP were transiently expressed with PUB13-mCherry in *Nicotiana benthamiana* leaves. UBC35 and UBC36 localized to the nucleus and the cytosol (**Figure 16A**). In contrast, PUB13 appeared to be only localized in the cytosol under the same conditions (**Figure 16B**). Together, these results indicate that UBC35, UBC36 and PUB13 are all found in the cytosol, a localization compatible with them ubiquitinating plasma membrane proteins. To confirm such interaction, yeast two hybrid tests were carried out where the coding sequences of UBC35 or UBC36 were fused to the GAL4 DNA binding domain and PUB13 to the GAL4 activation domain. We used the UBIQUITIN E2 VARIANT 1D (UEV1-D) as positive control since already known to interact with both UBC35 and UBC36 (Wen 2008). The GAL4BD-UBC35 and GAL4BD-UBC36 failed to grow on selective media, indicating that both failed to autoactivate the transcription of reporter genes under the conditions used (**Figure 17**). When co-expressed with GAL4AD-PUB13 or the positive control GAL4AD-UEV1D, yeast grew on selective media attesting of the ability of UBC35 or UBC36 to interact with PUB13 in yeast. All yeast combinations grew similarly on non-selective media, suggesting that the difference observed in selective media do not result from global growth defects. To determine if UBC35 and UBC36 interact in vivo, we took advantage of the transient co-expression of UBC35-GFP and UBC36-GFP with PUB13-mCherry in *N. benthamiana* to perform coimmunoprecipitation. To this purpose, PUB13-mCherry was immunoprecipitated using micromagnetic beads coupled to anti-RFP antibodies and the

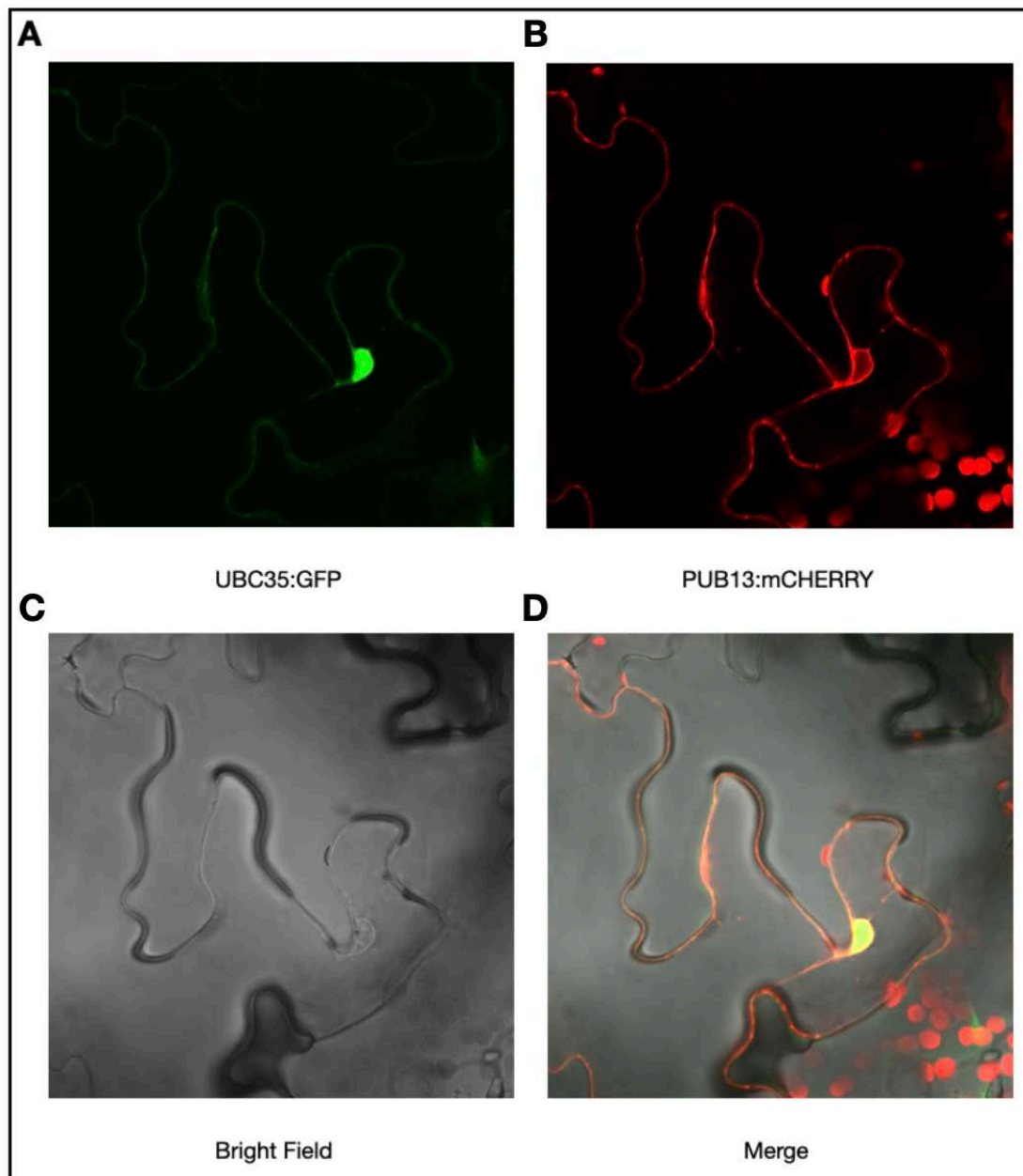


Figure 16: The UBC35 E2 conjugating enzyme co-localizes with the E3 ligase PUB13. Confocal microscopy images of *Nicotiana benthamiana* infiltrated leaf cells co-expressing UBC35-GFP and PUB13-mCherry. The following channels are shown: GFP (A) mCherry (B), bright field (C) and merge (D).

presence of UBC35-GFP or UBC36-GFP revealed using anti-GFP antibodies (**Figure 18**). GFP alone was used as a negative control to ascertain that interaction observed would result from the GFP tag. These experiments revealed the ability of PUB13-mCherry to interact in planta with both UBC35-GFP and UBC36-GFP, while no interaction was observed with GFP alone.

Altogether, these results indicate that the pairing of the K63 polyubiquitination-dedicated E2s UBC35 and UBC36 with PUB13 triggers the decoration of BRI1 with K63-linked chains.

Discussion

The importance of protein ubiquitination in the regulation of signaling pathways has been long established. BRI1 offers a rather unique scenario where the machinery controlling the formation of K63-linked polyubiquitin chains, and their removal had been identified. The UBC35 and UBC36 E2 have recently been reported to control global K63 polyubiquitination and in particular BRI1 decoration with K63-linked chains (Romero-Barrios et al., 2020). The PUB12 and PUB13 E3 ligases interact with and mediates the K63 polyubiquitination of BRI1, presumably through the interaction with UBC35 and UBC36 (Zhou et al., 2018). The UBP12 and UBP 13 DUBs ensure the trimming and removal of K63 polyubiquitin chains from BRI1 (Luo et al., 2022). Altogether, these mechanisms control the pool of ubiquitinated BRI1, impacting on the cell surface levels of the receptor and the sensitivity to BRs. PUB13 was however demonstrated using split luciferase assays to show very poor interaction, if any, to UBC35 thus questioning its role in the K63 polyubiquitination of BRI1. Using several complementary approaches, we have demonstrated that PUB13 and UBC35 or UBC36 coexist in the cytosol, and that these proteins are able to interact using yeast two hybrid and co-immunoprecipitation. These observations confirm the scenario where the

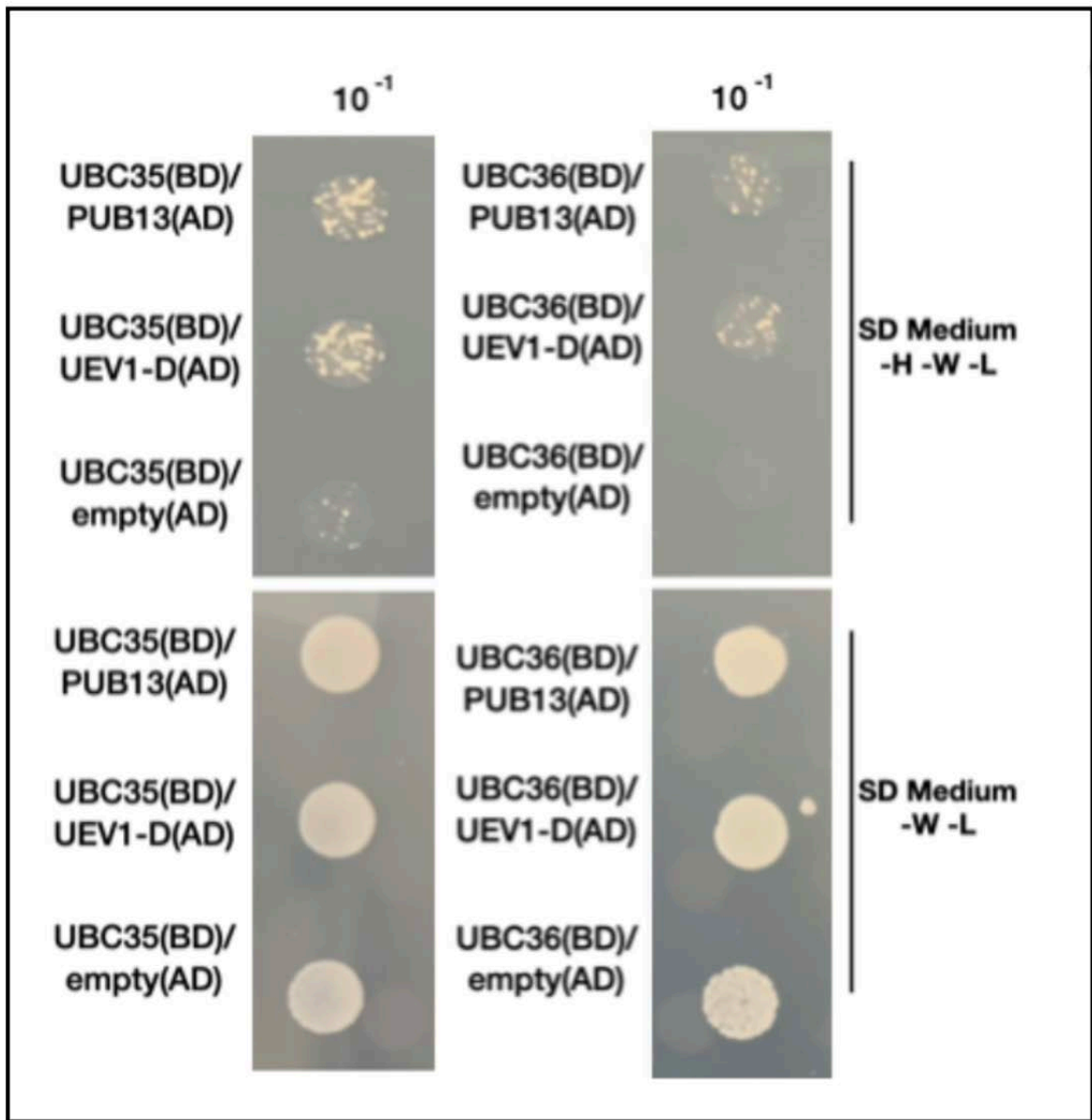


Figure 17: Yeast two Hybrid assays to test the interaction between UBC35 or UBC36 with PUB13. Yeast was transformed with the bait construct consisting of Gal4-DNA binding domain (BD) fused to UBC35 or UBC36 and the Gal4 activation domain (AD) fused to PUB13. The empty AD vector was used as negative control, and UEV1D used as positive control for the interaction with UBC35 and UBC36. Interactions between each pair of test proteins were determined by selection for growth on SD -Leu -Trp -His media. Non-selective SD -Leu -Trp media serves as a control for yeast growth.

UBC35/36-PUB13 E2-E3 pair drives BRI1 K63 polyubiquitination and endocytosis-mediated degradation.

It is very likely that BRI1 is ubiquitinated via other E3 ubiquitin ligases in response to endogenous or exogenous cues. The contribution of PUB13 and its close homolog PUB12 to BR signaling indeed appears limited, as attested by the weak phenotype of a *pub12pub13* double mutant (Zhou et al., 2018). Only in the SA biosynthesis-deficient mutant *sid2* is the functional importance of PUB12 and PUB13 revealed. A deep understanding of the nature of ubiquitin modifications targeting BRI1, E2s importance for BRI1 ubiquitination and identification of the pairs of E2-E3 acting on BRI1 will provide us with the global landscape of BRI1 ubiquitination and regulation. Considering the wide array of processes regulated by ubiquitination in cells, ranging from protein stability, localization, activity, and interaction with other proteins, unravelling the mechanisms of BRI1 ubiquitination will certainly shed light on new regulatory mechanisms regulating BR signaling in plants.

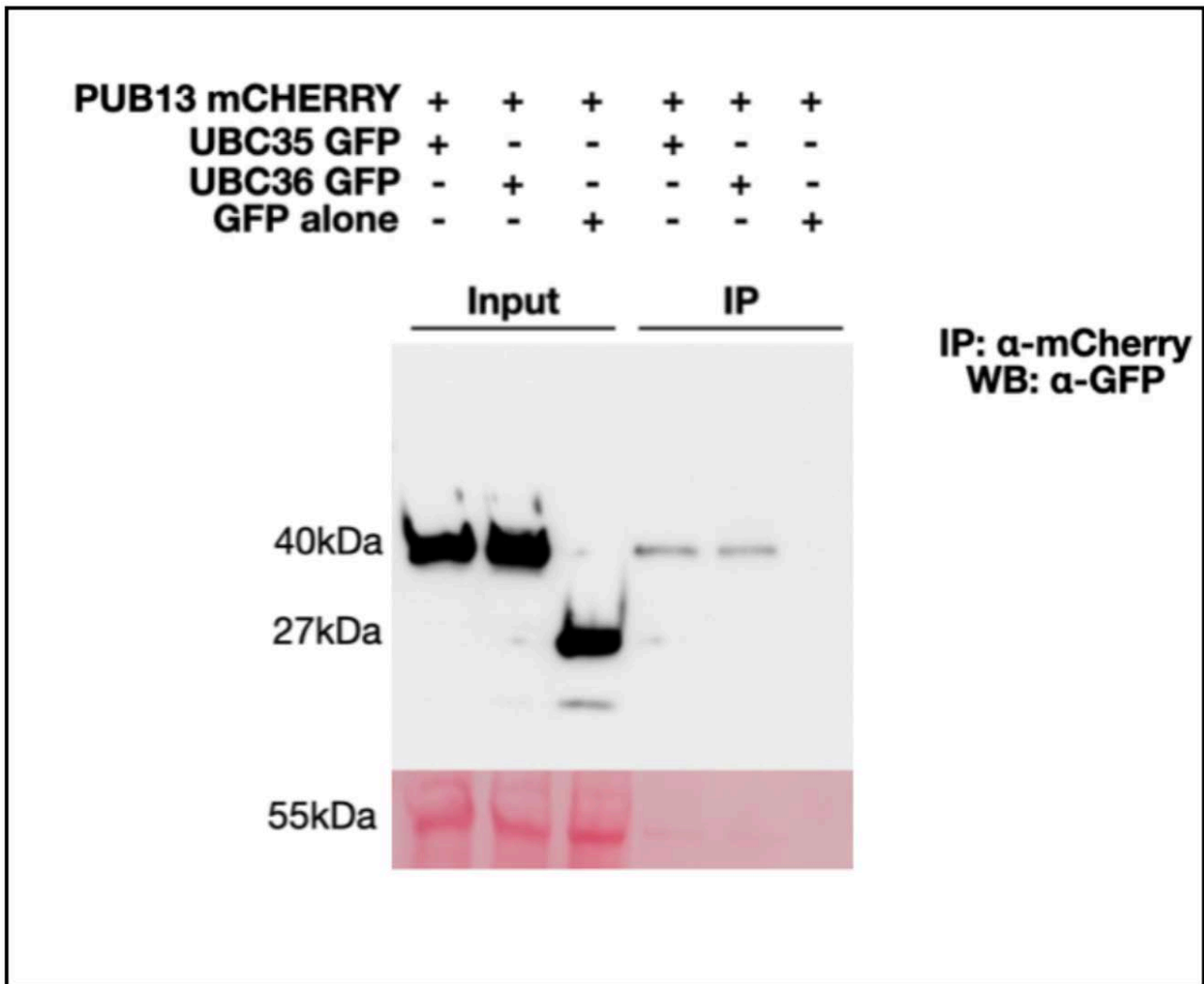


Figure 18: UBC35 and UBC36 interact with PUB13 in coimmunoprecipitation experiments. Immunoprecipitation was performed on total protein extract from *N. benthamiana* leaves expressing PUB13-mCherry together with UBC35-GFP, UBC36-GFP or GFP alone. PUB13-mCherry was immunoprecipitated using anti-RFP antibodies and the presence of GFP assayed by immunoblot using anti-GFP antibodies.

Materials and Methods

Plasmids and Constructs

The UBI10::UBC35-GFP, UBI10::UBC36-GFP, and UBI10::GFP plants expression vectors were previously described (Johnson and Vert, 2016). The 35S::PUB13-mCherry was constructed by multisite Gateway recombination between the pK7m34GW destination vector, and the entry vectors pDONRP4P1r-UBI10, pDONR221-PUB13, and pDONRP2rP3-GFP. For yeast two hybrid, the pGBKT7-UBC35, pGBKT7-UBC36 and pGADT7-UEV1D were previously described (Johnson and Vert, 2016). pGADT7-PUB13 was generated by Gateway recombination between pGADT7 and the pDONR-PUB13 vectors.

Co-localization studies

Twenty eight-day-old *N. benthamiana* were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* carrying the pUBI10::UBC35-GFP, pUBI10::UBC36-GFP, p35::GFP, p35S::PUB13-mCherry constructs and P19. Forty-eight hours after infiltration, images were taken from leaf disks mounted in water and observed under a SP8 confocal laser scanning microscope (Leica). To image GFP and mCherry, fluorophores were excited at 488nm and 561nm respectively. Experiments were done in 3 biological replicates.

Yeast two hybrid

Bait and prey vectors were transformed into *Saccharomyces cerevisiae* AH-109. Transformed yeast cells were grown in a suspension at 2×10^7 cells/mL and 10 μ L droplets of 10-fold serial dilutions spotted on SD-Leu -Trp non-selective media and on SD-Leu -Trp

-His selective plates. Plates were incubated 3 days before scanning. Experiments were done in 3 biological replicates.

Co-immunoprecipitation

Protein extractions were performed using infiltrated tobacco leaves with the respective constructs. Total proteins were extracted from 1g of leaves and resuspended in ice-cold RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0). Immunoprecipitation was carried out using anti-RFP magnetic beads (Chromotek). Beads were washed 3 times in ice-cold RIPA buffer before elution and PAGE separation. For protein detection, anti-GFP-HRP antibodies (HRP-coupled GFP antibody Miltenyi, 1/5000). Ponceau red was used as loading control. Experiments were done in 3 biological replicates.

Funding details

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche under Grant ANR-13-JSV2-0004-01; ANR-17-CE20-0026-01; the French Laboratory of Excellence project “TULIP” under Grant ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02.

Acknowledgments

We thank the staff of the Fédération de Recherche Agrobiosciences, Interactions et Biodiversité of Toulouse (FRAIB) for confocal microscopy resources and support.

Authors Contribution

Conceptualization G.V.; Investigation F.D.; Writing – Original Draft G.V., F.D.; Writing – Review & Editing G.V., F.D.; Supervision G.V.; Funding Acquisition G.V.

Declaration of interest

The authors declare no competing interests.

3.3 Références

- Claus LAN, Liu D, Hohmann U, Vukašinović N, Pleskot R, Liu J, Schiffner A, Jaillais Y, Wu G, Wolf S, et al. Phosphorylation and ubiquitination independent endocytosis of BRI1. *Biorxiv* 2022; :2022.07.11.499622.
- Clouse SD, Sasse JM. BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Plant Physiology Plant Mol Biology* 1998; 49:427–51.
- Johnson A, Vert G. Unraveling K63 Polyubiquitination Networks by Sensor-Based Proteomics. *Plant Physiol* 2016; 171:1808–20.
- Komander D, Rape M. The Ubiquitin Code. *Annu Rev Biochem* 2012; 81:203–29.
- Lee J-H, Kim WT. Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in *Arabidopsis*. *Mol Cells* 2011; 31:201–8.
- Liao D, Cao Y, Sun X, Espinoza C, Nguyen CT, Liang Y, Stacey G. *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase PLANT U-BOX13 (PUB13) regulates chitin receptor LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) protein abundance. *New Phytol* 2017; 214:1646–56.
- Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L. Direct Ubiquitination of Pattern Recognition Receptor FLS2 Attenuates Plant Innate Immunity. *Science* 2011; 332:1439–42.
- Luo Y, Takagi J, Claus LAN, Zhang C, Yasuda S, Hasegawa Y, Yamaguchi J, Shan L, Russinova E, Sato T. Deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 stabilize the brassinosteroid receptor BRI1. *Embo Rep* 2022; 23:e53354.
- Martins S, Dohmann EMN, Cayrel A, Johnson A, Fischer W, Pojer F, Satiat-Jeunemaître B, Jaillais Y, Chory J, Geldner N, et al. Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* 2015; 6:6151.
- Martins S, Montiel-Jorda A, Cayrel A, Huguet S, Roux CP-L, Ljung K, Vert G. Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nat Commun* 2017; 8:309.
- Meng J, Yang J, Peng M, Liu X, He H. Genome-Wide Characterization, Evolution, and Expression Analysis of the Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Protein Kinase (LRR-RLK) Gene Family in *Medicago truncatula*. *Life* 2020; 10:176.
- Miricescu A, Goslin K, Graciet E. Ubiquitylation in plants: signaling hub for the integration of environmental signals. *J Exp Bot* 2018; 69:4511–27.
- Patterson C. A New Gun in Town: The U Box Is a Ubiquitin Ligase Domain. *Sci Signal* 2002; 2002:pe4–pe4.
- Romero-Barrios N, Monachello D, Dolde U, Wong A, Clemente HS, Cayrel A, Johnson A, Lurin C, Vert G. Advanced Cataloging of Lysine-63 Polyubiquitin Networks by Genomic, Interactome, and Sensor-Based Proteomic Analyses. *Plant Cell* 2019; 32:123–38.
- Stone SL, Callis J. Ubiquitin ligases mediate growth and development by promoting protein death. *Curr Opin Plant Biol* 2007; 10:624–32.
- Turek I, Tischer N, Lassig R, Trujillo M. Multi-tiered pairing selectivity between E2 ubiquitin-conjugating enzymes and E3 ligases. *J Biol Chem* 2018; 293:16324–36.

Wen R, Torres-Acosta JA, Pastushok L, Lai X, Pelzer L, Wang H, Xiao W. Arabidopsis UEV1D promotes Lysine-63-linked polyubiquitination and is involved in DNA damage response. *Plant Cell* 2008; 20:213–27.

Yee D, Goring DR. The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J Exp Bot* 2009; 60:1109–21.

Zhou J, Liu D, Wang P, Ma X, Lin W, Chen S, Mishev K, Lu D, Kumar R, Vanhoutte I, et al. Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc National Acad Sci* 2018; 115:E1906–15.

Chapitre 4 : Le rôle de la SUMOylation en K63 dans l'internalisation de BRI1

4.1 Avant-Propos

Parmi les modifications post-traditionnelles, la SUMOylation joue aussi un rôle important dans la régulation des voies de signalisation. En effet, il a été montré que la SUMOylation permet de dissocier le récepteur membranaire FLS2 de son inhibiteur BIK1 et ainsi d'activer la voie de signalisation immunitaire de la flagelline (Orosa et al., 2018). A l'inverse, JAZ le répresseur de la transcription des gènes de la voie de l'acide jasmonique peut être SUMOylé, empêchant sa liaison avec COI1 le récepteur des JAs, inhibant sa dégradation par le protéasome. La SUMOylation permet ainsi maintenir la voie de signalisation des JAs désactivée (Srivastava et al., 2018).

La SUMOylation est un mécanisme liant un peptide appelé SUMO similaire dans sa structure 3D à l'ubiquitine mais ne possédant que 18% de similarité de séquence (Bayer et al., 1998). Le procédé derrière la SUMOylation reste tout de même très similaire à l'ubiquitination. Comme cette dernière, il s'agit d'un mécanisme en trois étapes, il existe 2 SUMO E1 enzymes, SAE1a et SAE1b, une SUMO E2 enzyme SCE liant la molécule de SUMO à un résidu lysine d'une protéine cible médié par des SUMO E3 ligases spécifiques de la cible (Park et al., 2011).

Outre un rôle essentiel dans le développement de la plante, la SUMOylation joue également un rôle clé dans la tolérance aux stress abiotiques tels que le froid, la sécheresse, le stress oxydatif et la chaleur (Park et al., 2011). Lors d'un choc thermique à 39°C, on peut voir une

accumulation de SUMOylation qui conduit à une thermotolérance basale des plantes (Yoo et al., 2006).

Il a été montré que lors d'une élévation de la température de 21°C à 26°C, BRI1 est internalisé et adressé à la vacuole pour être dégradé (Martins et al., 2017). Des résultats obtenus au sein de l'équipe ont montré qu'à cette température BRI1 est désumoylé et qu'en parallèle la désSUMOylase DESI3a s'accumule au sein dans les plantes, suggérant que la SUMOylation pourrait inhiber l'internalisation de BRI1 et donc stabiliser le récepteur à la membrane plasmique.

L'article présenté dans ce chapitre porte sur cette hypothèse. Ma contribution lors de cet article a été de déterminer si BRI1 est bien stabilisé à la membrane plasmique et donc indirectement si la voie de signalisation des brassinostéroïdes est suractivée. Afin d'évaluer leur sensibilité aux brassinostéroïdes en réponse à la température, des expériences de phénotypages sur les fonds mutant *desi3a* et sauvage Col-0 ont été réalisées en réponse à des traitements à l'eBL (Brassinolide de synthèse) ou au PPZ (Brassinazole de synthèse, inhibiteur de la voie de biosynthèse des brassinostéroïdes) à 21 et à 26°C. En complément, afin de tester l'activation de la voie de signalisation des BRs en réponse à la température, l'état de phosphorylation du facteur de transcription BES1 a été évalué en condition standard ou à la suite d'un traitement à l'eBL, à température normale 21°C ou élevée 26°C. Enfin, dans le but de confirmer que les résultats générés soit bien dépendant des mutations de *desi3a* et de *bik1*, des tests de complémentation des mutants ont été menés.

4.2 SUMO/deSUMOylation of the BRI1 brassinosteroid receptor modulates plant growth responses to temperature

Maria Naranjo-Arcos^{1,#}, Moumita Srivastava^{2,#}, Florian Deligne¹, Prakash Bhagat²,
Mansi Bhardwarj², Ari Sadanandom^{2*} and Grégory Vert^{1*}

¹ Plant Science Research Laboratory (LRSV), UMR5546 CNRS/Université Toulouse
3/Toulouse- INP, 24 chemin de Borde Rouge, 31320 Auzeville Tolosane, France

² Department of Biosciences, Durham University, Stockton Road, Durham, DH1 3LE,
United Kingdom

These authors contributed equally

* For correspondence : Gregory.Vert@univ-tlse3.fr ; ari.sadanandom@durham.ac.uk

Classification: Biological Sciences, Plant Biology

Keywords : Arabidopsis, Brassinosteroids, Receptor, BRI1, SUMO, temperature

ABSTRACT

Brassinosteroids (BRs) are a class of steroid molecules perceived at the cell surface that act as plant hormones. The BR receptor BRI1 offers a model to understand receptor-mediated signaling in plants and the role of post-translational modifications. Here we identify SUMOylation as a new modification targeting BRI1 to regulate its activity. BRI1 is SUMOylated *in planta* on two lysine residues and the levels of BRI1-SUMO conjugates are controlled by the Desi3a SUMO protease. Loss of Desi3a leads to hypersensitivity to BRs, indicating that Desi3a acts as a negative regulator of BR signaling. Besides, we demonstrate that BRI1 is deSUMOylated at elevated temperature by Desi3a, leading to increased BRI1 interaction with the negative regulator of BR signaling BIK1 and to enhanced BRI1 endocytosis. Loss of Desi3a or BIK1 results in increased response to temperature elevation, indicating that BRI1 deSUMOylation acts as a safety mechanism necessary to keep temperature responses in check. Altogether, our work establishes BRI1 deSUMOylation as a molecular crosstalk mechanism between temperature and BR signaling, allowing plants to translate environmental inputs into growth response.

SIGNIFICANCE STATEMENT

The brassinosteroid (BR) receptor BRI1 provides a paradigm for understanding receptor-mediated signaling in plants and contribution of post-translational modifications. Here, we show that BRI carries SUMO modifications in planta on two intracellular lysine residues and that temperature elevation triggers BRI1 deSUMOylation mediated by the Desi3a SUMO protease. Importantly, BRI1 deSUMOylation leads to downregulation of BR signaling via

increased BRI1 interaction with the BIK1 negative regulator and increased BRI1 endocytosis. Loss of BRI1 deSUMOylation in *desi3a* mutants boosts plant responses to elevated ambient temperature, indicating that BRI1 deSUMOylation acts as a brake to keep temperature responses in check. Our study uncovers a new post-translational modification targeting BRI1 and sheds light on its functional outcome for environmentally-controlled plant growth.

INTRODUCTION

Brassinosteroids (BRs) are a class of plant hormones controlling various aspects of plant development and stress responses (Clouse, 2011). Genetic, biochemical, and structural biology studies have revealed that BRs are perceived at the cell surface by the BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) leucine-rich-repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) (He et al., 2000, Hothorn et al., 2011, Kinoshita et al., 2005, Chory, 1997, She et al., 2011, Wang et al., 2001). BR binding to BRI1 promotes its heterodimerization with the LRR-RLK BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE (BAK1) (Li et al., 2002, Nam and Li, 2002) to form a competent receptor complex. *cis* and *trans* phosphorylation of BRI1 and BAK1 fully activates the receptor complex and initiates a protein phosphorylation-mediated signaling cascade, which ultimately regulates the activity of the BRASSINAZOLE RESISTANT (BZR)-family of transcription factors (Wang et al., 2002, Yin et al., 2002). Among these, BZR1 and BZR2 (BES1) were shown to control the expression of thousands of BR-responsive genes important for plant growth and stress response (Sun et al., 2010, Yu et al., 2011).

Inability to properly produce, sense or transduce the BR signal results in characteristic BR-deficient/insensitive phenotypes that include short hypocotyls in the dark, dwarf stature in the light, altered vascular development, prolonged vegetative phase, and reduced male fertility (Chory, 1997, Clouse et al., 1996, Nagpal et al., 1996, Szekeres et al., 1996). In

contrast, BR overproduction or enhanced signaling activities are associated with increased growth (Wang et al., 2001). The precise control of BR perception at the cell surface is therefore crucial to ensure proper plant development and completion of the plant life cycle in an ever-changing environment. As the major BR receptor and a long-lived protein, BRI1 is regulated by several mechanisms to keep its basal activity in check and to desensitize BRI1 after BR signaling. The BRI1 kinase is first kept in its basal state by an autoinhibitory C-terminal tail (Wang and Chory, 2005). Phosphorylation of the C-terminal tail upon BR binding likely releases autoinhibition for the full activation of BRI1. BRI1 also interacts with an inhibitory protein named BRI1 KINASE INHIBITOR1 (BKI1) that prevents interaction between BRI1 and BAK1 in resting cells (Wang and Chory, 2006). BR binding to BRI1 triggers BKI1 tyrosine phosphorylation and release in the cytosol, allowing the formation of an active BRI1-BAK1 receptor complex (Wang and Chory, 2006, Jaillais et al., 2011). Additional mechanisms were coopted to stop BRI1 from firing after perception of BRs and allow plant cells to go back to the resting state. Autophosphorylation of residue S891 in the G-loop occurs late after BR perception and deactivates BRI1 via inhibiting its ATP binding (Oh et al., 2012). BRI1 is also subjected to internalization from the cell surface and vacuolar degradation using several mechanisms. First, the KINASE-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE (KAPP) was proposed to regulate BRI1 through interaction between its forkhead-associated (FHA) domain and BRI1's cytoplasmic domain (Stone et al., 1998). KAPP also co-localizes with the BAK1-related coreceptor SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 (SERK1) at the plasma membrane and interacts with SERK1 in endosomes suggesting that KAPP-mediated dephosphorylation of BRI1 and SERK1 downregulates BR signaling (Shah et al., 2002). Second, BRI1 degradation was shown to require PROTEIN PHOSPHATASE2A (PP2A)-mediated dephosphorylation triggered by methylation of the PP2A using a leucine carboxymethyltransferase (Wu et al., 2011). Most

importantly, BRI1 undergoes endocytosis and degradation in the vacuole (Geldner et al., 2007). This is controlled by lysine(K)-63 linked polyubiquitin chain conjugation to BRI1 intracellular domain driven by the PLANT U-BOX12 (PUB12) and PUB13 E3 ligases (Martins et al., 2015, Zhou et al., 2018). BRI1 ubiquitination promotes BRI1 internalization from the cell surface and is essential for proper sorting in endosomes and vacuolar targeting (Martins et al., 2015). BRI1 endocytosis was initially thought to be independent of ligand binding (Geldner et al., 2007). However, the fact that BRI1 ubiquitination is dependent on both BRI1 kinase activity and ligand perception suggests that BRI1 internalization and vacuolar degradation may be regulated by BRs (Martins et al., 2015, Zhou et al., 2018). BRI1 endocytosis is also under the control of environmental signals that impinge on growth via BR responses. Elevation of ambient growth temperature decrease BRI1 protein accumulation to boost root elongation (Martins et al., 2017). The crosstalk between BR signaling and temperature responses likely uses BRI1 ubiquitination as the expression of an ubiquitination-defective BRI1 variant lacking 25 lysine residues in BRI1 intracellular domain abolishes BRI1 degradation upon warmer temperature (Martins et al., 2017).

BRI1 serves as the archetypal plant receptor protein in the study of PTMs and their interplay, and their role in signaling/signal integration. Here show that BRI1 is SUMOylated and that BRI1- SUMO conjugates are regulated by the DESUMOYLATING ISOPEPTIDASE 3a (Desi3a) SUMO protease. Most importantly, we uncover that BRI1 SUMOylation drops following growth at heightened temperatures, leading to increased BRI1 interaction with the negative regulator BOTRYTIS-INDUCED KINASE 1 (BIK1) and increased BRI1 endocytosis to attenuate BR-dependent growth. Finally, we demonstrate that such downregulation in BR signaling is required to restrict elevated temperature-induced growth responses. Overall, our work shed light on a new PTM targeting BRI1 and highlights its

interplay with BRI1 ubiquitin-mediated endocytosis in the control of environmentally-regulated plant growth.

RESULTS

BRI1 is decorated with SUMO modifications *in planta*.

BRI1 was previously demonstrated to be modified by ubiquitination on intracellular lysine residues (Martins et al., 2015). Ubiquitin is the founding member of a class of PTMs named Ubiquitin-Like modifiers (UBLs) that share a core β -grasp fold of approximately 70 amino acids and that can be reversibly attached to proteins or other cellular constituents such as lipids to regulate their activity (Vierstra, 2012). To evaluate if BRI1 is modified by other ubiquitin-like modifications, we first sought to monitor if BRI1 is SUMOylated *in planta*. Transgenic plants expressing a functional BRI1 fusion to the *mCITRINE* yellow fluorescent protein (*mCITRINE*) under the control of *BRI1* promoter were used to immunoprecipitate BRI1-*mCITRINE* protein with micromagnetic beads coupled to anti-GFP antibodies. Probing BRI1-*mCITRINE* immunoprecipitates with anti-SUMO1 (AtSUMO1) revealed a SUMO specific signal at the size of BRI1-*mCITRINE*, similar to what is observed for the positive controls JASMONATE ZIM DOMAIN PROTEIN 6 (JAZ6) fused to GFP (29) (**Figure 19A**). This indicates that BRI1 is conjugated with SUMO1 under standard growth conditions. In contrast to the smear-like signals obtained for BRI1 with anti-Ub antibodies (Martins et al., 2015, Zhou et al., 2018), the SUMO1-specific signal associated to BRI1 migrated as a sharp band close to the molecular weight of BRI1 indicating that BRI1 carries a very limited number of SUMO modifications.

To gain further insight into BRI1 SUMOylation, we searched for possible SUMO sites in BRI1 as previously done with FLS2 (Orosa et al., 2018). We identified lysine residues K1066 and K1118 in the BRI1 kinase domain as putative SUMO sites. Residue K1066 is strictly

conserved in Arabidopsis BRI1-like proteins and more generally in plant BRI1 homologs (**Figure S6A**). A conserved lysine is also found in a close context to K1118 in Arabidopsis BRLs and plant BRI1 homologs. To decipher if both lysine residues are actual targets of SUMO *in planta*, we generated the K1066R and K1118R BRI1 variants where the corresponding lysine have been substituted to arginine to maintain the positive charge while preventing SUMOylation. Mutation of each of the two lysine residues in BRI1 decreased SUMO conjugation compared to wild-type BRI1 when transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* (**Figure S6B**), suggesting that these are *bona fide* SUMO sites. Mutation of both lysine residues completely abolished BRI1 SUMOylation (**Figure 19B**), indicating that these are the only SUMO sites in BRI1. Mutation of K1066 and K1118 however did not alter significantly the overall ubiquitination pattern of BRI1 (**Figure 19B**). This observation is consistent with the fact that BRI1 is heavily ubiquitinated *in planta* and that mutation of 25 lysine residues in BRI1 intracellular domain, including K1066 and K1118, is required to completely abolish BRI1 ubiquitination (Martins et al., 2015). Altogether, our work reveals that BRI1 can be post-translationally modified at residues K1066 and K1118 by either ubiquitin or SUMO.

BRI1 SUMOylation is regulated by the SUMO protease Desi3a.

The levels of SUMO conjugates of another plant plasma membrane protein, FLS2, are controlled by the balance between SUMO E2-CONJUGATING ENZYME 1 (SCE1), which is capable of directly transferring SUMO onto target residues (Tozluoglu et al., 2010), and the Desi3a SUMO protease that deSUMOylates FLS2 (Orosa et al., 2018). Desi3a has been shown to be degraded upon flagellin perception, allowing the accumulation of SUMO-FLS2 conjugates and triggering intracellular immune signaling. To examine if Desi3a also controls the levels of SUMO-BRI1, we first determined whether Desi3a is found in overlapping

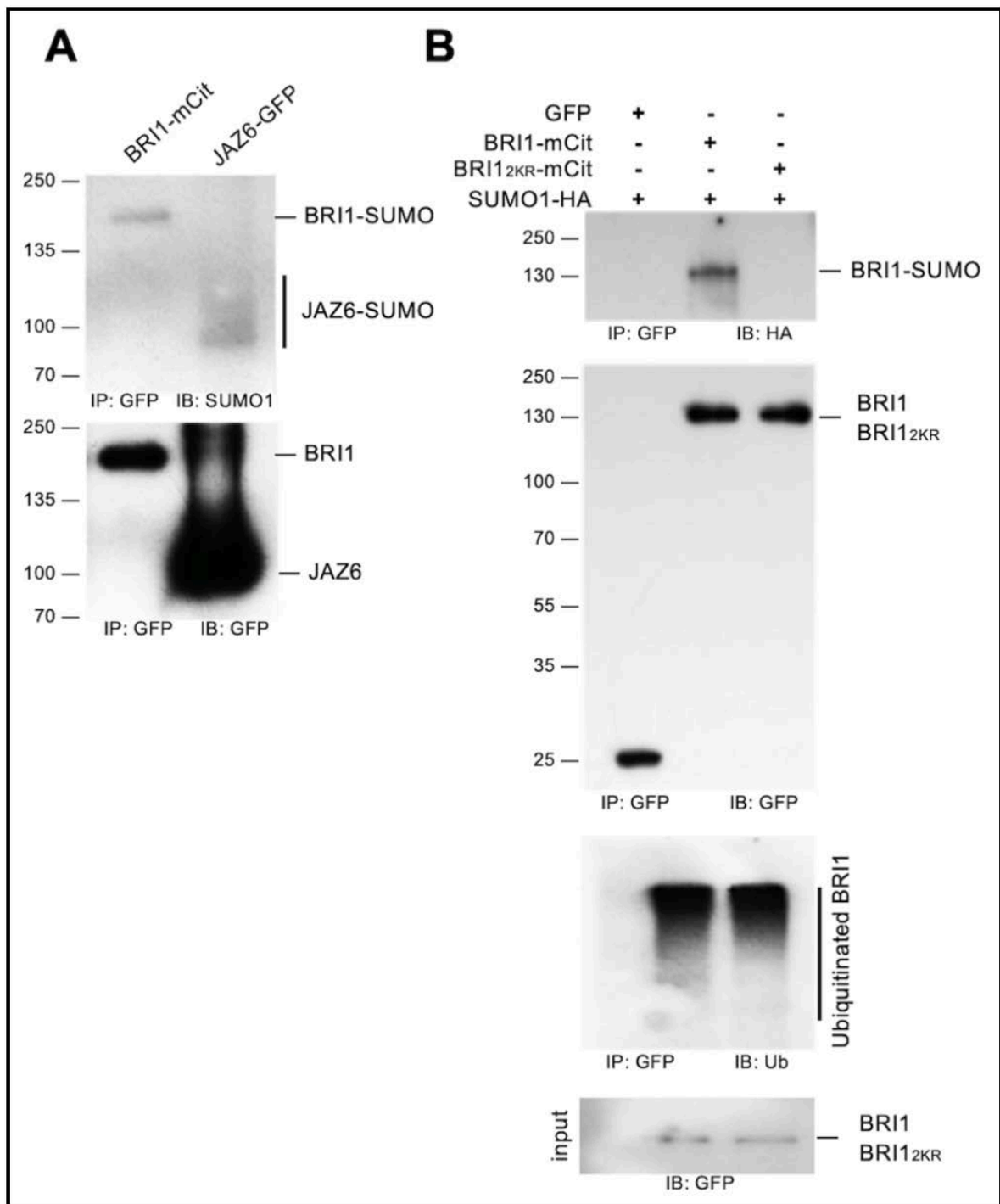


Figure 19: BRI1 is SUMOylated in vivo on two intracellular lysine residues. A. In vivo SUMOylation analyses of BRI1. Immunoprecipitation was carried out using anti-GFP antibodies on solubilized protein extracts from mono-insertional homozygous BRI1-mCitrine plants or the JAZ6-GFP positive control plants. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-GFP (bottom) and anti-SUMO1 (top) antibodies. B. In vivo SUMOylation analyses of BRI1 and BRI1_{2KR}. BRI1-mCit and the BRI1_{2KR}-mCit variant mutated for residues K1066,1118R were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves prior to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies on solubilized protein extracts. GFP alone was used as negative control. All constructs were co-expressed with SUMO1-HA. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-SUMO1, anti-GFP and anti-ubiquitin antibodies.

expression territories with BRI1. Publicly available genome-wide expression data reveals that *Desi3a* has a broad expression profile overlapping with *BRI1*. We confirmed these observations by RT-PCR using RNA extracted from various *Arabidopsis* tissues (**Figure S7**). We next addressed whether *Desi3a* protein co-localizes with BRI1 at the plasma membrane. Transient expression of a *Desi3a-mCHERRY* fusion protein in *N. benthamiana* confirmed the presence of *Desi3a* at the cell surface (**Figure 20A**). A similar pattern was observed with the *BRI1-mCITRINE* or *FLS2-GFP* functional fusions. In addition, a clear colocalization at the cell surface is observed between *Desi3a* and BRI1 or FLS2 (Manders coefficient $MBRI1 = 0.83$ and $MFLS2 = 0.80$), to the resolution of the confocal microscope. Besides, the fluorescence profile of *Desi3a-mCHERRY* clearly overlapped with *BRI1-mCITRINE* at the plasma membrane, similarly to what is observed for *FLS2-GFP* (**Figure S8**) (Orosa et al., 2018). We next tested whether the *Desi3a* SUMO protease had the ability to interact with BRI1. To this purpose, we took advantage of the transient expression in *N. benthamiana* since BRI1 is also SUMOylated in this experimental system. *BRI1-mCITRINE* was transiently expressed together with *Desi3a-HA* and subjected to immunoprecipitation using GFP beads. Probing *BRI1-mCITRINE* immunoprecipitates with anti-HA antibodies revealed the presence of *Desi3a-HA* (**Figure 20B**). Expression of GFP alone with *Desi3a* was used as a negative control and failed to capture any interaction (**Figure 20B**), indicating that BRI1 interacts *in vivo* with *Desi3a*. Furthermore, we used the ULP1a SUMO protease that deSUMOylates the BZR1 transcription factor (Srivastava et al., 2020) as another negative control and observed no interaction with BRI1 (**Figure 20B**).

Altogether, this indicates that BRI1 specifically interacts with the plasma membrane-localized *Desi3a* SUMO protease and that the SUMOylation status of BRI1 is controlled by the *Desi3a* SUMO protease.

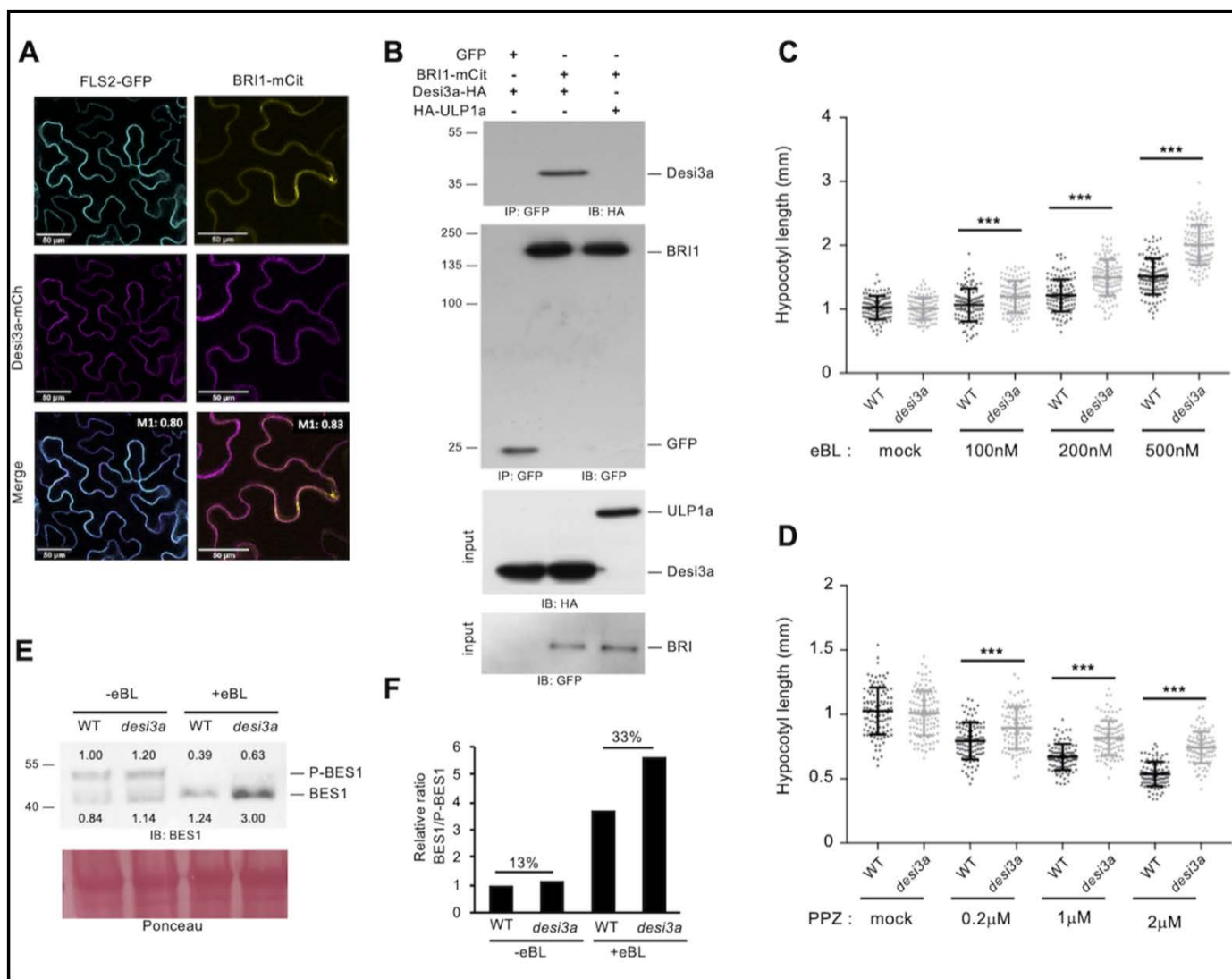


Figure 20: The SUMO protease Desi3a interacts with BRI1 and negatively regulates BR signaling. A. Confocal microscopy and colocalization analyses between BRI1 and Desi3a. BRI1-mCit and Desi3a-mCherry (Desi3a-mCh) were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves. The Manders colocalization coefficient are shown in the overlay channel. Scale bars=50 μ m. B. In vivo interaction between BRI1 and Desi3a. BRI1-mCit and Desi3a-HA were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves prior to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies on solubilized protein extracts. GFP alone and the ULP1a SUMO protease were used as negative controls. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-HA and anti-GFP antibodies. C. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT) and *desi3a* mutant plants grown on plates containing mock or increasing concentrations of epibrassinolide (eBL). Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference between WT and *desi3a* (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test). D. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT) and *desi3a* mutant plants on plates containing mock or increasing concentrations of propiconazole (PPZ). Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference between WT and *desi3a* (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test). E. Phosphorylation state of the BES1 transcription factor in wild-type (WT) or *desi3a* plants treated with mock or 1 μ M epibrassinolide (eBL) for 20 minutes. Detection of BES1 was performed with anti-BES1 antibodies. A representative blot is shown. Signal intensities of BES1 and P-BES1 are indicated. F. Quantification of the ratio between BES1 and phosphorylated BES1 (P-BES1) shown in E. Percentage increase compared to mock is shown.

Desi3a-mediated deSUMOylation of BRI1 controls BR signaling.

The fact that Desi3a interacts with BRI1 prompted us to investigate the role of Desi3a in BR signaling. To this purpose, we measured hypocotyl length of wild-type and *desi3a* knock-out plants grown in light and treated with mock, epibrassinolide (eBL) or the BR biosynthetic inhibitor propiconazole (PPZ). Consistent with previous observations, wild-type plants exposed to eBL showed longer hypocotyls (**Figure 20C**). *desi3a* mutant plants however displayed a stronger sensitivity to exogenous eBL, as attested by the longer hypocotyl length for eBL-treated plants relative to mock. Such hypersensitivity to BRs is also highlighted by the increased resistance to the dwarfing effect of PPZ (**Figure 20D**). The *desi3a*/Desi3a-HA line, which is complemented for the *desi3a* immune phenotypes (Orosa et al., 2018), also failed to show such BR-related phenotypes when grown on eBL or PPZ (**Figure S9A-S9D**). These observations provide genetic proof for the role of Desi3a in BR signaling and indicate that Desi3a acts as a negative regulator of the BR pathway.

To better characterize the role of Desi3a in plant BR responses, we next investigated the phosphorylation status of the BR pathway downstream transcription factor BES1 that serves as readout of BR signaling. BES1 indeed exists under a phosphorylated inactive form (P-BES1) and dephosphorylated active form (BES1), and exogenous BR application promotes the conversion of P-BES1 into its dephosphorylated active BES1 form (Yin et al., 2002). Wild-type and *desi3a* plants were therefore treated with mock or eBL and BES1 phosphorylation status revealed by immunoblotting using anti-BES1 antibodies. *desi3a* displayed a greater sensitivity to BL compared to wild-type plants, as attested by the enhanced conversion of the BES1 pool into its unphosphorylated fast migrating form (**Figure 20E, 20F**), consistent with the results from the eBL/PPZ dose-response analyses.

Altogether, these observations clearly argue for a role of Desi3a in negatively regulating BR signaling through its control of BRI1 SUMOylation.

Temperature elevation regulates BRI1 deSUMOylation

To shed light on the biological relevance of Desi3a and BRI1 SUMOylation, we first searched for possible stimuli/conditions increasing or decreasing the accumulation of BRI1 SUMO conjugates. Among conditions tested, we focused our attention on the role of ambient temperature elevation since previously reported to post-translationally regulate BRI1 (Martins et al., 2017). We first evaluated if BRI1 protein levels were affected by growth temperature elevation. Seedlings from plants expressing BRI1-*mCITRINE* were grown at 21°C and 26°C as previously done (Martins et al., 2017), and protein levels determined by immunoblotting. Plants subjected to elevated temperature displayed lower BRI1 levels (**Figure S10A**), similarly to what has been described in roots only (Martins et al., 2017). To determine the impact of temperature on BRI1 SUMOylation, BRI1-*mCITRINE* was immunoprecipitated from plants grown at 21°C or 26°C. More tissues were harvested for 26°C-grown plants to compensate for the lower BRI1 levels and immunoprecipitates normalized to show equivalent BRI1-*mCITRINE* signals, as visualized using anti-GFP antibodies (**Figure 21A**), before being probed with anti-SUMO1 antibodies to detect the SUMOylated pool of BRI1. Plants grown at 21°C or 26°C clearly showed different accumulation of BRI1 SUMO conjugates. Notably, temperature elevation was accompanied with lower SUMOylated BRI1 (**Figure 21A**). Quantification of the BRI1-SUMO signals obtained, relative to the levels of immunoprecipitated BRI1 revealed a 7-fold decrease at elevated temperature (**Figure 21B**). Such a drop in BRI1-SUMO levels at higher temperature may be a direct consequence of increased Desi3a levels. To test this, we first investigated the influence of temperature on the accumulation of BRI1 and Desi3a proteins

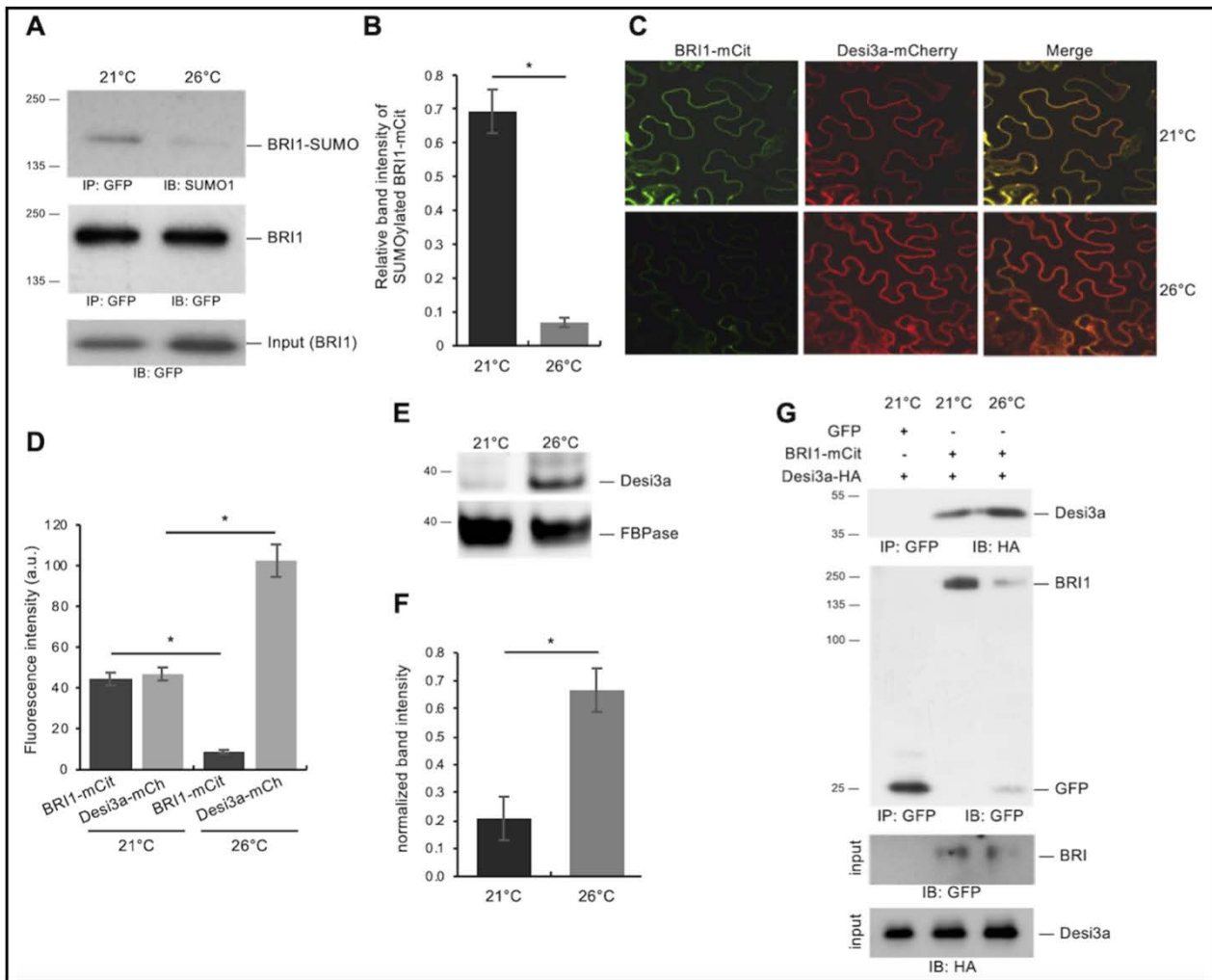


Figure 21: Desi3a deSUMOylates BRI1 upon changes in ambient temperature. A. In vivo SUMOylation analyses of BRI1 at 21°C or 26°C. Immunoprecipitation was carried out using anti-GFP antibodies on solubilized protein extracts from mono-insertional homozygous BRI1-mCitrine plants grown at 21°C or 26°C. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-SUMO1 and anti-GFP antibodies. B. Quantification of BRI1 SUMO at 21°C and 26°C relative to immunoprecipitated BRI1-mCit levels. Error bars represent SD (n=3). The asterisks indicate a statistically significant difference between 21°C and 26°C (Mann-Whitney). C. Confocal microscopy analyses of BRI1 and Desi3a at 21°C and 26°C. BRI1-mCit and Desi3a-mch were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves and incubated at 21°C or 26°C for 2 days. Similar confocal detection settings were used to compare the effect of temperature on BRI1 and Desi3a protein levels. Several independent experiments were carried out and multiple regions of interest analyzed to overcome the variability in transformation efficiency. Scale bars=20 μ m. D. Quantification of BRI1 and Desi3a fluorescence levels in experiments carried out as in C. Multiple regions of interest analyzed for to overcome the variability in transformation efficiency. Error bars represent SD (n=15). The asterisk indicates a statistically significant difference between BRI1-mCit or Desi3a-mCh at 21°C and 26°C (Mann-Whitney). E. Western blot analyses monitoring the accumulation of Desi3a-HA protein in *Arabidopsis* plants grown at 21°C or 26°C. Detection of Desi3a-HA was performed with anti-HA antibodies. The membrane was stripped and probed with anti-FBPase antibodies as loading control. F. Quantification of Desi3a protein at 21°C and 26°C relative to FBPase levels. Error bars represent SD (n=3). The asterisks indicate a statistically significant difference in Desi3a protein level at 21°C and 26°C (Mann-Whitney). G. In vivo interaction between BRI1 and Desi3a at 21°C and 26°C. BRI1-mCit and Desi3a-HA were transiently expressed in *N. benthamiana* and incubated at 21°C or 26°C for 2 days prior to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies on solubilized protein extracts. GFP alone was used as negative control. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-HA and anti-GFP antibodies.

using transient expression in *N. benthamiana*. Plants agroinfiltrated with BRI1-*mCITRINE* and Desi3a-*mCHERRY* were exposed to either 21°C or 26°C for 2 days and imaged at the confocal microscope. Several independent experiments were carried out and multiple regions of interest analyzed to overcome the variability in transformation efficiency. Overall, temperature elevation reproducibly decreased BRI1-*mCITRINE* accumulation when co-expressed with Desi3a-*mCHERRY* (**Figure 21C, 21D**), reminiscent of the effect of warmer temperature on BRI1 accumulation previously observed in *Arabidopsis* roots (Martins et al., 2017). This was also accompanied by an increase in the fluorescence associated with Desi3a (**Figure 21C, 21D**). The impact of temperature elevation on Desi3a accumulation was confirmed using the *desi3a/Desi3a-HA* transgenic *Arabidopsis* plants constitutively expressing the Desi3a-HA fusion protein. Temperature elevation promoted the accumulation of Desi3a-HA protein (**Figure 21E, F**), pointing to a post-transcriptional regulation of Desi3a by temperature. We then addressed how temperature affects the ability of BRI1 and Desi3a to interact *in vivo*. Agroinfiltrated plants exposed to 26°C reproducibly harbored lower BRI1-*mCITRINE* accumulation (**Figure 21G**), consistent with our confocal microscopy observations. BRI1 immunoprecipitates however showed increased Desi3a-HA proteins levels at 26°C, pointing to the increased interaction between BRI1 and Desi3a when plant experience heightened temperature (**Figure 21G**). Taken together, these observations indicate that the increased accumulation of Desi3a and stronger interaction with BRI1 likely explains the drop in BRI1 SUMOylation observed at 26°C.

Desi3a-mediated deSUMOylation of BRI1 controls temperature responses

Plant responses to temperature are highly dependent on plant hormones and other environmental factors such as light (Martins et al., 2017, Fei et al., 2019). We therefore

assessed the genetic contribution of BR signaling to plant responses to elevated temperature in our own conditions by scoring hypocotyl length of wild-type, *bri1*, and the *bes1-D* constitutive BR response mutant at 21°C or 26°C. Consistent with previous observations, wild-type seedlings grown at elevated temperature elongated their hypocotyls (**Figure S10B-S10D**). *bes1-D* showed much greater responses to increased temperature than wild-type while *bri1* failed to respond (**Figure S10B-S10D**), suggesting that BR signaling positively impinges on plant temperature responses in hypocotyls. We next investigated the role of SUMO/deSUMOylation upon temperature elevation by comparing hypocotyl length of wild-type, and *desi3a* at 21°C or 26°C. *desi3a* mutants showed slightly shorter hypocotyls at 21°C compared to wild-type seedlings, but elongated more at 26°C (**Figure 22A, 22B**). The increased response to temperature of *desi3a* is also highlighted by the elevated ratio of hypocotyl length at 26°C/21°C for *desi3a* (**Figure 22B**). In contrast to *desi3a*, the *desi3a*/DESI3a-HA line did not show hypersensitivity to temperature elevation (**Figure S9E, S9F**), attesting that the loss of *Desi3a* is responsible for the observed effect. This suggests that *Desi3a* is a negative regulator of temperature responses or that conversely, SUMOylation has a positive role on hypocotyl elongation during temperature elevation. We next monitored the phosphorylation status of BES1 as a readout of BR pathway activation upon increased temperature. Compared to wild-type plants, *desi3a* reproducibly showed a mild increase in dephosphorylated BES1:phosphorylated BES1 ratio when exposed to a small change in ambient temperature (**Figure 22C, 22D ; Figure S10E-S10H**). Although exogenous application of saturating concentrations of BRs triggers full conversion of P-BES1 in BES1, the mild response observed to a subtle change in environmental conditions confirms that loss of *Desi3a* yields enhanced BR signaling and BR-dependent growth at 26°C. Furthermore, this is consistent with *bes1-D* greatly over-responding to higher temperature.

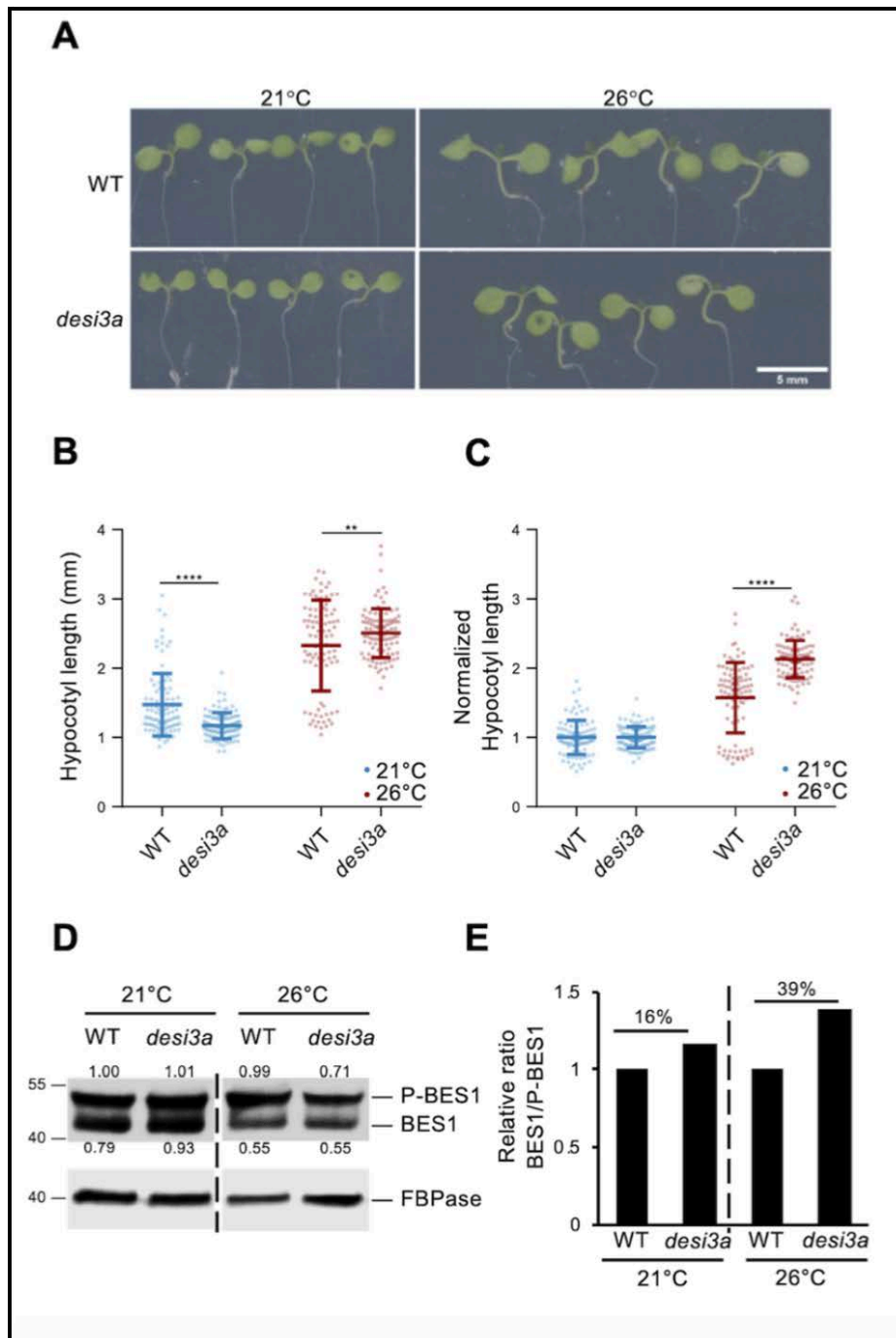


Figure 22: Desi3a is a negative regulator of plant responses to temperature elevation. A. Phenotype of 6-day-old wild-type (WT) and *desi3a* mutant plants grown at 21°C or 26°C. Representative pictures are shown. B. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT) and *desi3a* mutant plants grown at 21°C or 26 °C. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference between WT and *desi3a* (two-way ANOVA with Sidak’s multiple comparison test). C. Normalized hypocotyl length from wild-type (WT) and *desi3a* mutant plants grown at 21°C and 26 °C for 6 days, relative to 21°C. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference between wild-type and *desi3a* (two-way ANOVA with Sidak’s multiple comparison test). D. Phosphorylation state of the BES1 transcription factor in wild-type (WT) or *desi3a* plants grown at 21°C or 26 °C. Detection of BES1 was performed with anti-BES1 antibodies. Signal intensities of BES1 and P-BES1 are indicated. E. Normalized BES1 to phosphorylated BES1 (P-BES1) ratios from western blot shown in D, relative to wild-type. Replicate experiments are shown in Figure S10E-S10H.

Next, we sought to decipher the specific role of BRI1 SUMO/deSUMOylation in plant responses to elevated temperature and the underlying mechanism(s) by genetically impacting on BRI1 SUMOylation. We reasoned that generating transgenic plants expressing the non-SUMOylated BRI1^{2KR} version would prevent us from reaching any solid conclusion on the role of BRI1 SUMO/deSUMOylation since mutation of K1066 and K1118 would also impact on BRI1 ubiquitination. We decided instead to characterize deeper the impact of altered BRI1-SUMO levels at residues K1066 and K1118 using the *desi3a* mutant background. This offers the great advantage to grasp the interplay between both post-translational modifications at K1066 and K1118. We therefore crossed *desi3a* with the BRI1-*mCITRINE* reporter line and isolated *desi3a*/BRI1-*mCITRINE* double homozygous plants. These plants were imaged at the confocal microscope to observe any possible change in BRI1 distribution in the cell. No obvious change in BRI1 distribution between the plasma membrane in endosomes of BRI1-*mCITRINE* or *desi3a*/BRI1-*mCITRINE* lines. To better investigate the possible effect of BRI1 SUMO on BRI1 dynamics, we then took advantage of the fungal toxin Brefeldin A (BFA) that inhibits endosomal trafficking in *Arabidopsis* roots and hypocotyls (Rakusova et al., 2016, Robinson et al., 2008), and thus creates large aggregates of *trans*-Golgi network/early endosomal compartments. Endocytosed BRI1-*mCITRINE* was found in BFA bodies when plants were challenged with BFA in the presence of the translation inhibitor cycloheximide (CHX) (**Figure 23A**), similar to what has been reported in roots (Geldner et al., 2007, Martins et al., 2015, Di Rubbo et al., 2013). However, quantification of several parameters pointed to a reduction in BRI1 endocytosis in the *desi3a* mutant compared to wild-type plants. First, the ratio of plasma membrane over intracellular BFA-trapped BRI1-*mCITRINE* fluorescence is increased in *desi3a* compared to the wild-type background (**Figure 23B**). Second, loss of *Desi3a* is accompanied with a reduction in the number of BFA bodies per cell (**Figure 23C**).

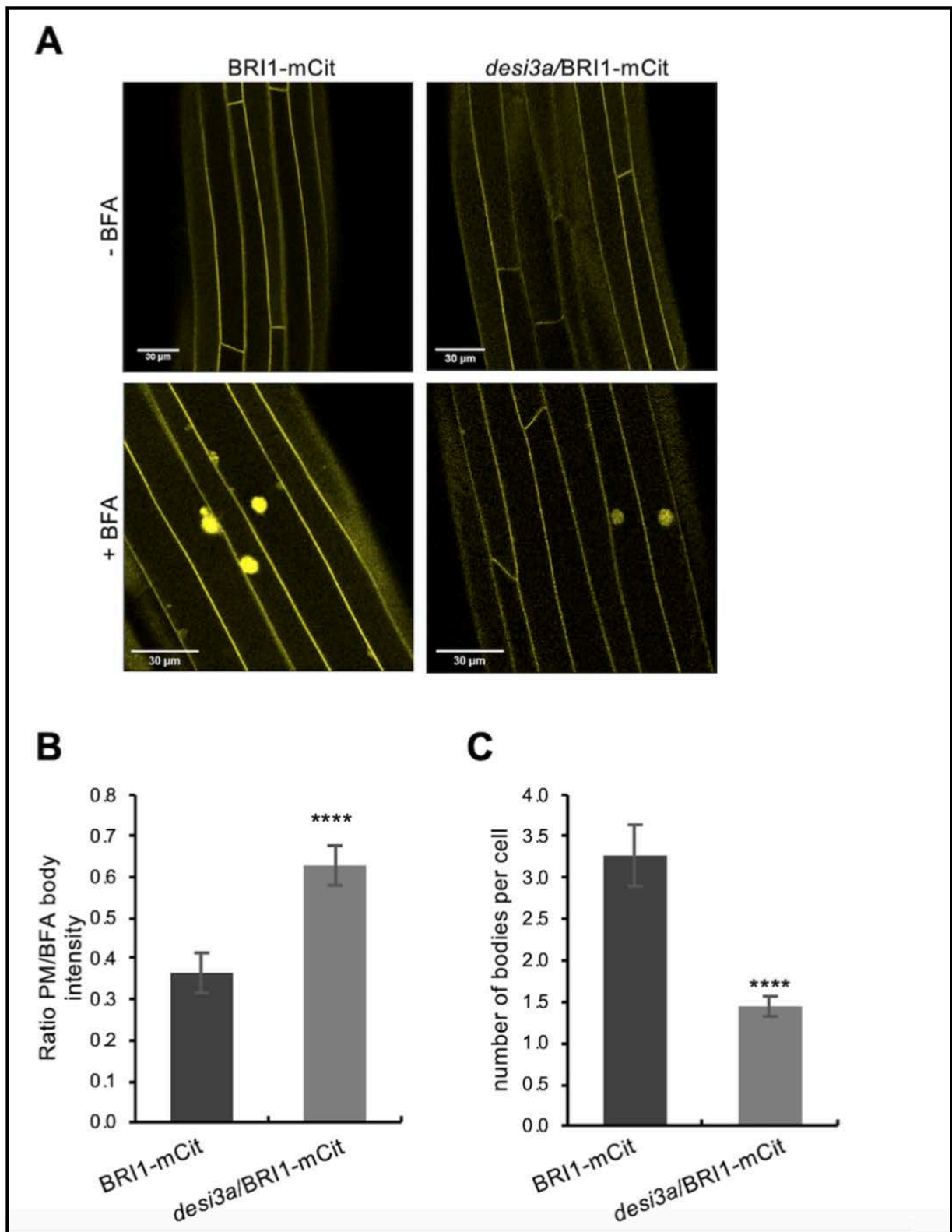


Figure 23: Desi3a-dependent deSUMOylation regulates BRI1 endocytosis and interaction with BIK1. A. Confocal microscopy analyses of BRI1-mCit and *desi3a/BRI1-mCit* dark-grown hypocotyls. Similar confocal detection settings were used to compare the fluorescence intensity in the two transgenic lines. Scale bars=30 μm . B. Quantification of the ratio between plasma membrane and BFA body fluorescence signal intensities of BRI1-mCit and *desi3a/BRI1-mCit*. C. Quantification of the number of BFA bodies per cell in BRI1-mCit and *desi3a/BRI1-mCit*. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=9). The asterisks indicate a statistically significant difference between BRI1-mCit and *desi3a/BRI1-mCit* (Mann-Whitney).

Taken together, these observations indicate the loss of Desi3a and SUMOylation at residues K1066 and K1118 directly or indirectly decreased the endocytic flux of BRI1.

BIK1 is recruited to deSUMOylated BRI1 to dampen temperature responses

Lack of SUMOylation renders FLS2 unable to mount proper immune responses due to the increased interaction with the downstream receptor-like cytoplasmic kinase (RLCK) BIK1 (Orosa et al., 2018), which acts as a positive regulator of FLS2-mediated signaling (Lu et al., 2010). BIK1 is also known to participate to BR signaling, although as negative regulator, where it is associated with BRI1 in resting cells and is released from the BRI1-BAK1 receptor complex upon BR perception (Lin et al., 2013). To shed light on the direct functional consequences of BRI1 SUMO/deSUMOylation, we therefore investigated if BRI1 SUMOylation affects the BRI1-BIK1 interaction using transient expression in *N. benthamiana*. Immunoprecipitation of BIK1-HA using HA beads followed by probing with anti-GFP antibodies failed to detect any interaction with free GFP (**Figure 24A**). In contrast, BIK1-HA was able to interact with BRI1-*mCITRINE* (**Figure 24A**), consistent with previous reports (Lin et al., 2013). Strikingly, BIK1-HA showed a much stronger interaction with the SUMO-defective BRI1_{2KR} (**Figure 24A**). Considering that BRI1 SUMO levels are lower at 26°C, we sought to determine the influence of temperature elevation on the BRI1-BIK1 interaction. BRI1 immunoprecipitates recovered higher BIK1 protein levels at 26°C compared to 21°C (**Figure 24B**), consistent with the fact that BIK1 shows stronger interaction with the non-SUMOylatable BRI1_{2KR} variant. This evidence indicates that, similarly to what was observed for FLS2 (Orosa et al., 2018), SUMOylation reduces the interaction of BRI1 with the downstream kinase BIK1. Genetically, BIK1 negatively regulates BR signaling, with *bik1* mutant showing increased BR responses even upon high concentration of the BRZ BR biosynthetic inhibitor (Lin et al., 2013). To further illustrate the

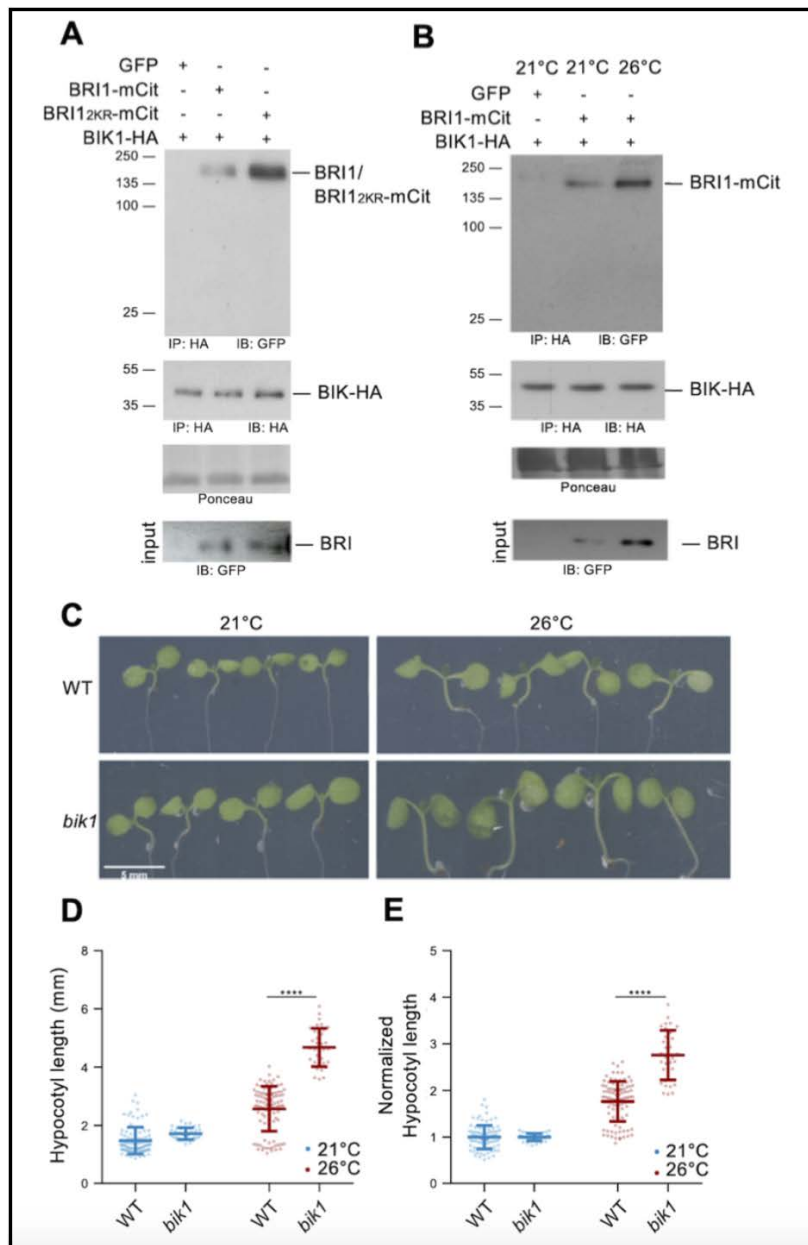


Figure 24: Desi3a-dependent deSUMOylation regulates BRI1 interaction with BIK1. **A.** In vivo interaction between BIK1 and wild-type BRI1 or BRI1_{2KR}. BIK1-HA was coexpressed with BRI1-mCit or BRI1_{2KR}-mCit in *N. benthamiana* leaves prior to immunoprecipitation using anti-HA antibodies on solubilized protein extracts. GFP alone was used as negative control. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-GFP and anti-HA antibodies. **B.** In vivo interaction between BIK1 and BRI1 at 21°C or 26°C. BIK1-HA and BRI1-mCit were transiently expressed in *N. benthamiana* and incubated at 21°C or 26°C for 2 days prior to immunoprecipitation using anti-HA antibodies. GFP alone was used as negative control. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-GFP and anti-HA antibodies. **C.** Phenotype of 6-day-old wild-type (WT) and *bik1* mutant plants grown at 21°C or 26°C. Representative pictures are shown. **D.** Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT) and *bik1* mutant plants grown at 21°C or 26°C. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference between WT and *bik1* (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test). **E.** Normalized hypocotyl length from wild-type (WT) and *bik1* mutant plants grown at 21°C and 26°C for 6 days, relative to 21°C. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference between wild-type and *bik1* (two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test).

contribution of BRI1 SUMOylation to temperature responses and determine the possible role of BIK1 in this process, we phenotyped the previously published *bik1* loss-of-function mutant at 21°C and 26°C. In contrast to the mild increase in hypocotyl length observed in wild-type seedlings, *bik1* hypocotyls dramatically elongated in response to heightened temperature (**Figure 24C, 24D, 24E**), illustrating that BIK1 is a negative regulator of plant responses to warmth. A *bik1*/BIK1::BIK1-HA line, which complements the *bik1* BR phenotypes (Lin et al., 2013), did not show such hypersensitivity to increased temperature (**Figure S11A, S11B**). Altogether, these observations indicate that BIK1 is recruited to deSUMOylated BRI1 when plants experience increased temperature to limit growth responses.

DISCUSSION

The BR receptor BRI1 serves as a model to grasp the intricate mechanisms of RLK-mediated signaling in plants (Belkhadir and Jaillais, 2015). The activity of BRI1 is regulated by post-translational modifications required to initiate, amplify or dampen BR signaling. Phosphorylation between BRI1, the SERK coreceptors, and different downstream receptor-like cytoplasmic kinases mostly activates BR signaling (Belkhadir and Jaillais, 2015), while ubiquitination leads to BRI1 degradation and signal attenuation (Martins et al., 2015, Zhou et al., 2018).

Several endogenous and exogenous cues also converge at the level of BRI1 protein to influence BR-dependent growth. For example, glucose was shown to increase BRI1 endocytosis to control, in part, changes in root architecture associated with fluctuations in light intensity and photosynthetic activity (Singh et al., 2014). Similarly, elevation of ambient temperature impinges on BR-dependent root growth by triggering BRI1 destabilization (Martins et al., 2017). We show here that BRI1 is subjected to SUMO/deSUMOylation and

that this is also required to control plant responses to increased temperature. BRI1 is decorated with SUMO under standard conditions, and deSUMOylated by the Desi3a SUMO protease when plants are grown at warmer temperature (**Figure S12**). Desi3a-mediated BRI1 deSUMOylation favors BRI1 interaction with the negative regulator of BR signaling BIK1 and also promotes BRI1 endocytosis. *desi3a* and *bik1* mutants both overrespond to heightened temperature, indicating that both Desi3a and BIK1 act as negative regulators of temperature responses. Thus, our work revealed a new role for SUMO in the regulation of BR signaling, in addition to the SUMO/deSUMOylation of the BZR1, BES1 and CESTA (CES) BR transcription factors (Srivastava et al., 2020, Khan et al., 2014, Zhang et al., 2019), and also highlights an original mechanism to integrate temperature input into BR-dependent growth responses.

Heat stress triggers growth repression in plants and has been associated with an increase in global levels of SUMO conjugates (Kurepa et al., 2003). In contrast, exposure to elevated ambient temperature boosts plant growth, and here we show that this is accompanied with reduced BRI1 SUMOylation. The major driver of the elongation observed when plants face warmth is the phytohormone auxin (De Lima et al., 2021). Temperature elevation reduces PHYTOCHROME B activity and induces *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4 (PIF4)* expression to increase auxin biosynthesis (Fiorucci et al., 2020, Gray et al., 1998, Jung et al., 2016, Koini et al., 2009, Legris et al., 2016, Stavang et al., 2009, Sun et al., 2012, Franklin et al., 2011). PIF4, as well as other PIFs, directly binds to the promoters of auxin biosynthesis genes, such as *YUCCA8 (YUC8)* and *YUC9*, *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1 (TAA1)* and *CYTOCHROME P450 FAMILY79B (CYP79B2)* to increase auxin-responsive gene expression and tissue elongation (Fiorucci et al., 2020, Gray et al., 1998, Koini et al., 2009, Stavang et al., 2009, Sun et al., 2012, Franklin et al., 2011, Chung et al., 2020). BRs were also reported to participate to warmer

temperature response in both aerial and underground tissues, although their contribution is opposite in both organs where BRs are known to differentially regulate growth (Clouse et al., 1996, Gonzalez-Garcia et al., 2011). In roots, temperature elevation promotes BRI1 destabilization to downregulate BR signaling and to stimulate root elongation (Martins et al., 2017). In aerial parts, PIF4 boosts BR biosynthesis and BZR1 binds to the promoter of *PIF4* at elevated temperature to increase its expression (Ibanez et al., 2018, Martinez et al., 2018), thus amplifying shoot transcriptional responses to heightened temperature and promoting hypocotyl elongation.

Our findings now shed light on another level of control of BR signaling by temperature in aerial parts, with increased temperature promoting BIK1 recruitment to the BR receptor complex and decreasing BRI1 levels through Desi3a-mediated BRI1 deSUMOylation (**Figure S12**). This new layer of integration between BR signaling and temperature elevation negatively regulates temperature-dependent growth responses, as loss of Desi3a or BIK1 yields increased hypocotyl elongation upon heightened temperature. Auxin and BRs are well-known to act synergistically to promote the transcription of growth-promoting genes and cell elongation (Nemhauser et al., 2004). The SUMO-dependent regulation of BRI1 we have uncovered likely allows plants to dampen BR signaling to balance the synergistic effect between auxin and BRs and to attenuate the BR-dependent feedforward loop activating PIF4, thus preventing plants from over-elongating upon warm temperature. The precise molecular mechanisms underlying this new regulatory level are still unclear. SUMOylation may have a direct inhibitory role on BRI1 endocytosis so that Desi3a-triggered BRI1 deSUMOylation at 26°C increases internalization of BRI1. There are few reports describing a role for SUMO in inhibiting endocytosis. For example, SUMOylation of the TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CATION CHANNEL SUBFAMILY M4 (TRPM4) Ca^{2+} -activated nonselective cation channel impairs TRPM4 endocytosis and leads to

elevated TRPM4 density at the cell surface (Kruse et al., 2009). Alternatively, SUMO/deSUMOylation of BRI1 may indirectly impact on BRI1 dynamics *via* the interplay between SUMO and Ub in the control of BRI1 endocytosis. BRI1 internalization from the cell surface is driven by massive ubiquitination decorating many cytosol-exposed lysine residues through the PUB12 and PUB13 E3 Ub ligases (Martins et al., 2015, Zhou et al., 2018). Additionally, elevated ambient temperature was shown in roots to destabilize BRI1 in an ubiquitin-dependent manner (Martins et al., 2017). Similarly to Ub, SUMO is covalently attached to proteins using lysine indicating that SUMO modifications potentially compete with Ub for the same sites to alter protein functions (Cuijpers et al., 2017). During NF- κ B activation for example, I κ B α is ubiquitinated and degraded to release its inhibition of NF- κ B (Chen et al., 2013). In contrast, SUMOylation at the same site prevents ubiquitination and turnover of I κ B α (Desterro et al., 1998), therefore inhibiting NF- κ B activation. BRI1 SUMOylation at residues K1066 and K1118 may therefore limit its ubiquitination at standard growth temperature. The deSUMOylation of BRI1 observed at elevated temperature and driven by Desi3a would free additional lysine residues for ubiquitination, thus boosting Ub-mediated endocytosis of BRI1. No significant difference in the Ub profile of BRI1 could however be observed in the SUMO-defective BRI1_{2KR} form. The presence of many target lysines for Ub in BRI1 yields a large high molecular weight BRI1-Ub smear that likely masks the effect of lack of ubiquitination at K1066 and K1118 in BRI1_{2KR}. Consistently, the mutation of a single Ub target lysine in BRI1 identified by proteomics had no significant impact of the overall Ub profile of BRI1 (Martins et al., 2015). Considering the prominent role of Ub in endocytosis of plasma membrane proteins, we propose that temperature-regulated SUMO/deSUMOylation of BRI1 allows plant to fine tune BRI1 Ub-mediated endocytosis and BR signaling (**Figure S12**). Whether PUB12 and PUB13 are responsible for the linkage of additional Ub chains to deSUMOylated BRI1 upon increased

temperature or whether a yet to be characterized temperature-regulated E3 Ub ligase is involved will have to be tackled in the future. The FLS2 LRR-RLK flagellin receptor shows increased SUMOylation upon flagellin perception mediated by Desi3a degradation, thus releasing BIK1 from FLS2 (Orosa et al., 2018). BIK1 being a positive regulator of FLS2 signaling, FLS2-SUMO conjugates positively regulate downstream innate immune signaling (Orosa et al., 2018 Lu et al., 2010). BRI1 and FLS2 are often compared since both representing model for the large plant LRR-RLK family. Despite their radically different biological outputs, BRI1- and FLS2-mediated signaling pathways share striking parallels. Both receptors predominantly localize at the plasma membrane where they bind their respective ligands and fire (Irani et al., 2012, Robatzek et al., 2006). BRI1 and FLS2 both use the same subset of co-receptors to initiate signaling (Li et al., 2002, Nam and Li, 2002, Chinchilla et al., 2007, Heese et al., 2007). Structural and biochemical studies revealed that BRs and the flg22 flagellin peptide both act as molecular glue to form or stabilize signaling-competent receptor complexes (Hothorn et al., 2011, She et al., 2011, Sun et al., 2013). In both cases, ligand binding triggers *cis*- and *trans*-phosphorylation events within the receptor complexes to reach full activation (Schulze et al., 2010, Wang et al., 2008). Downstream of the receptor complexes are found RLCKs that are direct substrates of the receptor complexes (Ortiz-Morea et al., 2020). In particular, the RLCK BIK1 is shared between both pathways but is a positive regulator for immune responses and a negative regulator for BR signaling (Lu et al., 2010, Lin et al., 2013, Zhang et al., 2010). BIK1 has been shown to negatively regulate BR signaling through direct association with BRI1 (Lin et al., 2013). After BR perception, BIK1 is phosphorylated by BRI1, causing its dissociation from the receptor. The precise function of BIK1 in BR signaling is therefore still unclear. Regardless, the Desi3a- and SUMO-regulated interaction of BIK1 with BRI1 and FLS2 now emerges as a possible common regulatory mechanisms of ligand-binding LRR-RLKs and

corresponding signaling pathways. Although BRI1 and FLS2 have been shown to be confined to different nanodomains at the plasma membrane and the corresponding pathways to use different phosphocode in early phases (Perraki et al., 2018), how signaling specificity is maintained along both pathways that rely on several shared components will deserve more attention in the future.

MATERIAL & METHODS

Plant material and growth conditions

The genotypes used in this study are wild-type (Col0), *bri1* T-DNA knockout (GABI_134E10) (Jaillais et al., 2011), BRI1::BRI1-*mCITRINE* (Jaillais et al., 2011), *desi3a-1* T-DNA knockout (SALK_151016C) (Orosa et al., 2018), *desi3a/Desi3a-HA* (Orosa et al., 2018), *bik1* T-DNA knock-out (SALK_005291) (Lu et al., 2010), *bik1/BIK1::BIK1-HA* (Lin et al., 2013), *bes1-D* (Yin et al., 2022), and 35S::JAZ6-*GFP* (Srivastava et al., 2018). BRI1K1066R, BRI1K1118R and the BRI12KR variant carrying the K1066R and K1118R substitutions were generated by site-directed mutagenesis of the pDONR221-BRI1 (Jaillais et al., 2011) using the primers listed (**Table S13**). Final destination vectors obtained by recombination using the pB7m34GW destination vectors (Karimi et al., 2007), and the entry vectors pDONRP4P1r-BRI1prom (Jaillais et al., 2011), pDONR221-BRI1 or mutated BRI1 versions, and pDONRP2rP3-*mCITRINE* (Jaillais et al., 2011). After seed sterilisation and stratification, seeds were placed for germination on solid agar plates containing half-strength Linsmaier and Skoog medium without sucrose. They were grown vertically in growth chambers under long-day conditions (16 h light/8 h dark, $90 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) at 21°C or 26°C. For the specific growth conditions, refer to figure legends. Infiltration of *N. benthamiana* leaves was performed using standard procedures and used the binary vectors carrying BRI1::BRI1-

mCITRINE (Jaillais et al., 2011), *35S::Desi3a-mCHERRY* and *FLS2::FLS2-GFP* (Orosa et al., 2018).

Chemical treatments

The final concentrations of the chemicals are indicated in the figure legends. The chemical stock solutions are in the following concentrations: 6 mM eBL (Sigma) in DMSO, 1 mM PPZ (Sigma), in water, 100 mM cycloheximide (Sigma) in EtOH, 10 mM BFA (Sigma) in DMSO.

Hypocotyl measurements

Seeds were sterilized and stratified for four-days. For dark-grown hypocotyl measurements, seeds were exposed to the light for 6h and then placed in dark at 21°C or 26°C for 3 days. For light-grown hypocotyl measurements, seeds were directly exposed to light at 21°C or 26°C for 6 days. Plates were scanned and hypocotyls measured using Fiji imageJ software. The mean and standard deviation (SD) were calculated by combining the three replicates.

Immunoprecipitation and western blot analysis

For detection of proteins from crude extracts, total proteins were extracted from ~50 mg plant material using Laemmli extraction buffer, using a 1:3 w/v ratio between tissue powder and extraction buffer. After debris elimination, proteins were separated by SDS-PAGE. Protein detection was carried out using peroxidase-coupled anti-HA-Peroxidase antibodies (Roche, dilution 1/4000), peroxidase-coupled anti-GFP antibodies (Miltenevi, dilution 1/5000), anti-SUMO1 antibodies 1/5000 (Conti et al., 2007), anti-BES1 antibodies 1/5000 (Yin et al., 2002), anti-FBPase (Agrisera, dilution 1/5000). To quantify the ratio between BES1 and P-BES1, signal intensity obtained with anti-BES1 antibodies and corresponding to BES1 and P-BES1 was determined using Image J. Western blot analyses were

performed in triplicates. Representative blots are shown in figures. For the loading control using anti-FBPase antibodies, the same membranes were stripped and used. Immunoprecipitation experiments were carried out as previously described (Martins et al., 2015), using the μ MACS GFP and HA isolation kits (Miltenyi Biotec). Input and immunoprecipitated fractions were separated by SDS-PAGE and subjected to western blot analyses as described above.

Confocal microscopy

Dark-grown hypocotyls were treated with 100 μ M CHX and 50 μ M BFA for 15 min under vacuum before transfer to the corresponding temperatures prior to imaging. Hypocotyls were mounted in the same solution and imaged on a Leica SP8 confocal laser scanning microscopes (www.leica-microsystems.com). The 514-nm laser line was used to image BRI1-*mCITRINE*. Laser intensity and detection settings were kept constant in individual sets of experiments to allow the direct comparison of fluorescence levels. To image entire hypocotyl cells, the TileScan and Z-stack option was used. Due to the length of hypocotyl cells, the fluorescence intensity of the total plasma membrane (PM) was not possible. Rather, the intensity of different region of interest of equivalent size and corresponding to the plasma membrane was measured. The PM/BFA body ratio corresponds to the mean fluorescence of the PM portions and the mean fluorescence of BFA bodies. For localization and colocalization of transiently expressed proteins in *N. benthamiana*, the 488, 514, 561 nm laser line were used to image FLS2-*GFP*, BRI1-*mCITRINE* and Desi3a-*mCHERRY*, respectively. Colocalization analyses and determination of the Manders' coefficient, highlighting the fraction of *GFP/mCITRINE* signals colocalizing with *mCHERRY*, were carried out using the ImageJ plugin JACoP (Bolte et al., 2006).

Statistical analyses

Data are shown as the average of three individual biological replicates, unless stated otherwise. Statistical analyses were performed with the software GraphPad Prism 7 software. Statistical significance of hypocotyl length between genotypes and/or conditions was assessed using one- way or two-way analysis of variance with post hoc Sidak or Tukey post hoc tests. Experiments had at least $n=40$ seedlings in each biological replicate. Quantification of western blots used the non-parametric Mann-Whitney (two genotypes/conditions) or Kruskal-Wallis (from three genotypes or conditions) tests. Statistical significance is defined as follow: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ and ****, $P \leq 0.0001$. Different letters indicate means that were statistically different by Tukey's multiple testing method ($P \leq 0.05$).

Acknowledgements

We thank Cyril Zipfel, Libo Shan, Yanhai Yin and Eugenia Russinova for sharing the *bik1* mutant and *bik1*/BIK1::BIK1-HA complemented lines, and anti-BES1 antibodies. We would also like to acknowledge the Imaging facility from the Fédération de Recherche Agrobiosciences Interactions et Biodiversité of Toulouse (FRAIB). This work was supported by research grants from the French National Research Agency (ANR-17-CE20-0026-01 to G.V.) and the French Laboratory of Excellence (project "TULIP" grant nos. ANR-10-LABX-41 and ANR-11-IDEX-0002-02 to G.V.).

SUPPLEMENTAL DATA

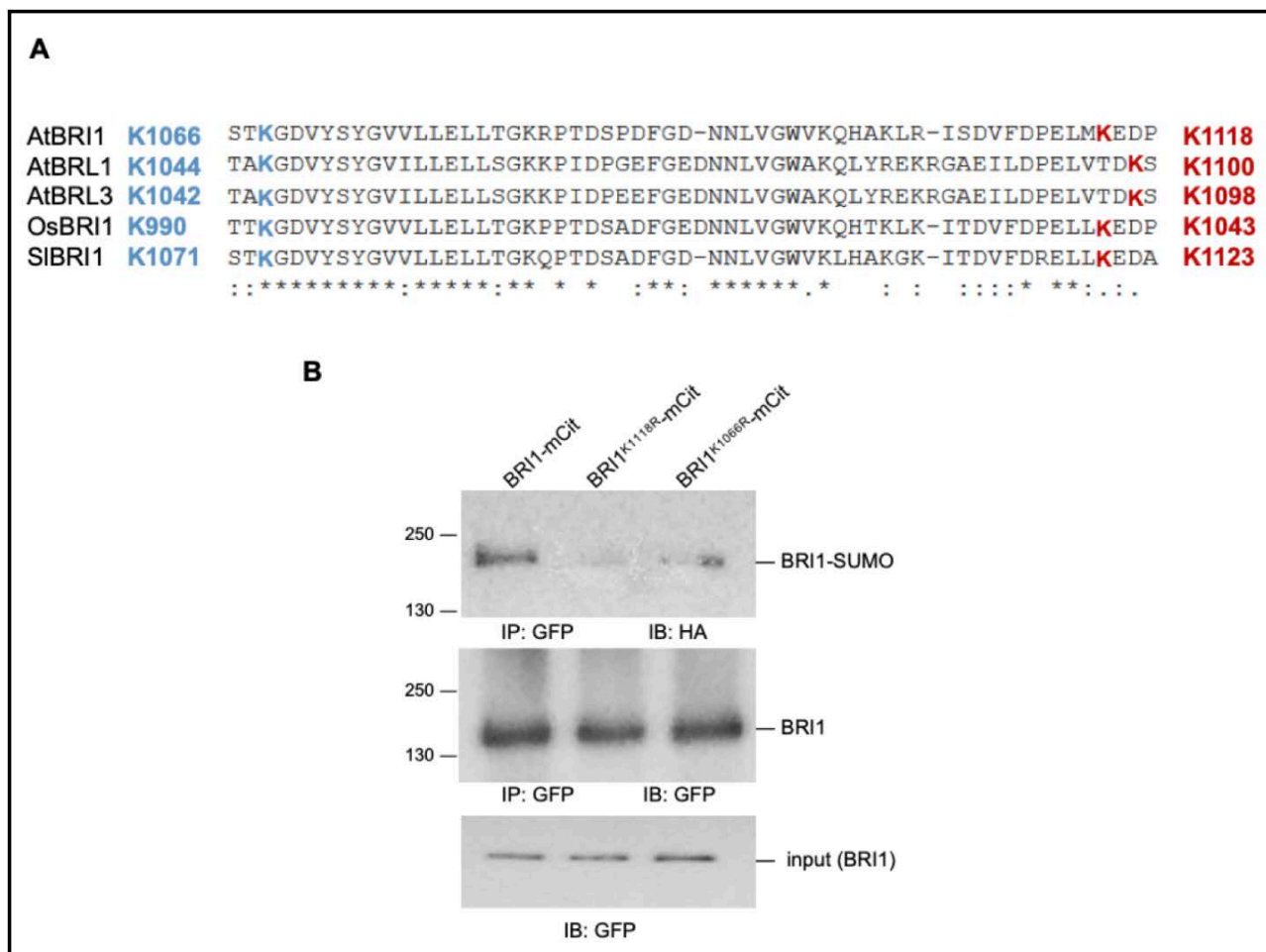


Figure S6: BRI1 is SUMOylated in vivo on two intracellular lysine residues. A. Sequence alignment of the cytosolic domains of BRI1 (amino acids 1064-1121) and its homologs BRL1 and BRL3. Predicted SUMO targets in BRI1 and homologs are shown. B. In vivo SUMOylation analyses of BRI1, BRI1^{K1066R} and BRI1^{K1118R}. BRI1-mCit, BRI1^{K1066R}-mCit and BRI1^{K1118R}-mCit were transiently expressed in *N. benthamiana* leaves prior to immunoprecipitation using anti-GFP antibodies on solubilized protein extracts. All constructs were co-expressed with SUMO1-HA. Detection of immunoprecipitated proteins used the anti-SUMO1 and anti-GFP antibodies.

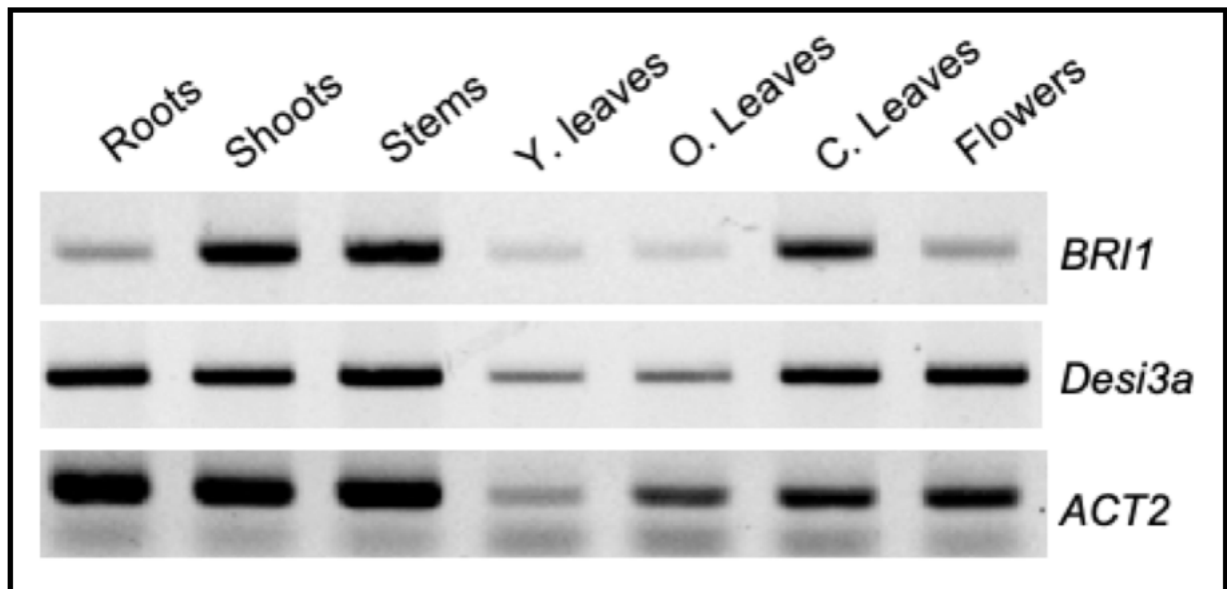


Figure S7: *Desi3a* and *BRI1* expression profiles overlap in plants. Semi-quantitative RT-PCR analyses of *Desi3a* and *BRI1* mRNA accumulation in different tissues of wild-type plants.

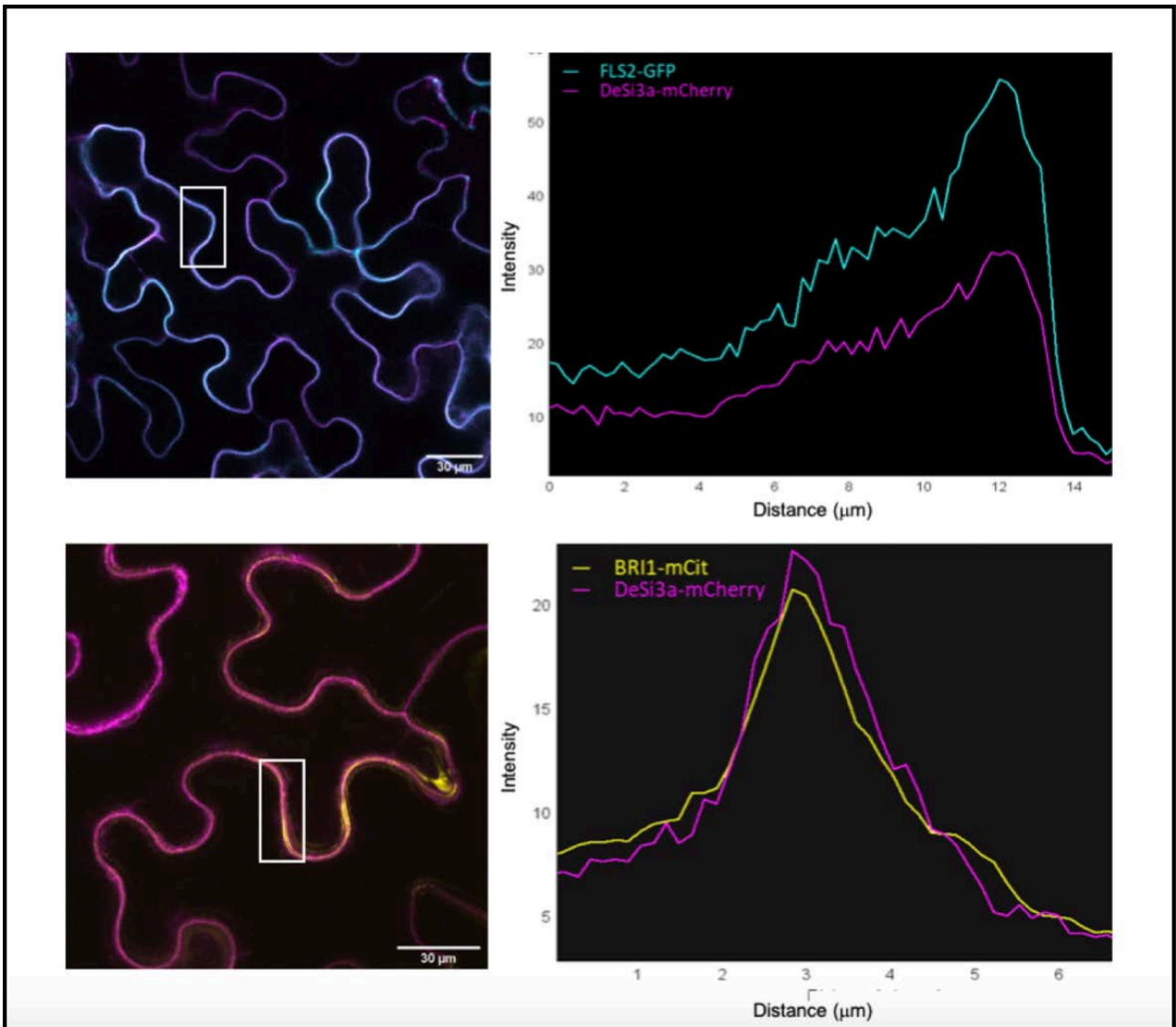


Figure S8: Colocalization of Desi3a with the plasma membrane-localized receptors FLS2 and BRI1. Fluorescence intensity profiles of Desi3a-mCh with FLS2-GFP (top) and BRI1-mCit (bottom), respectively. The regions of interest used to monitor fluorescence profiles are shown.

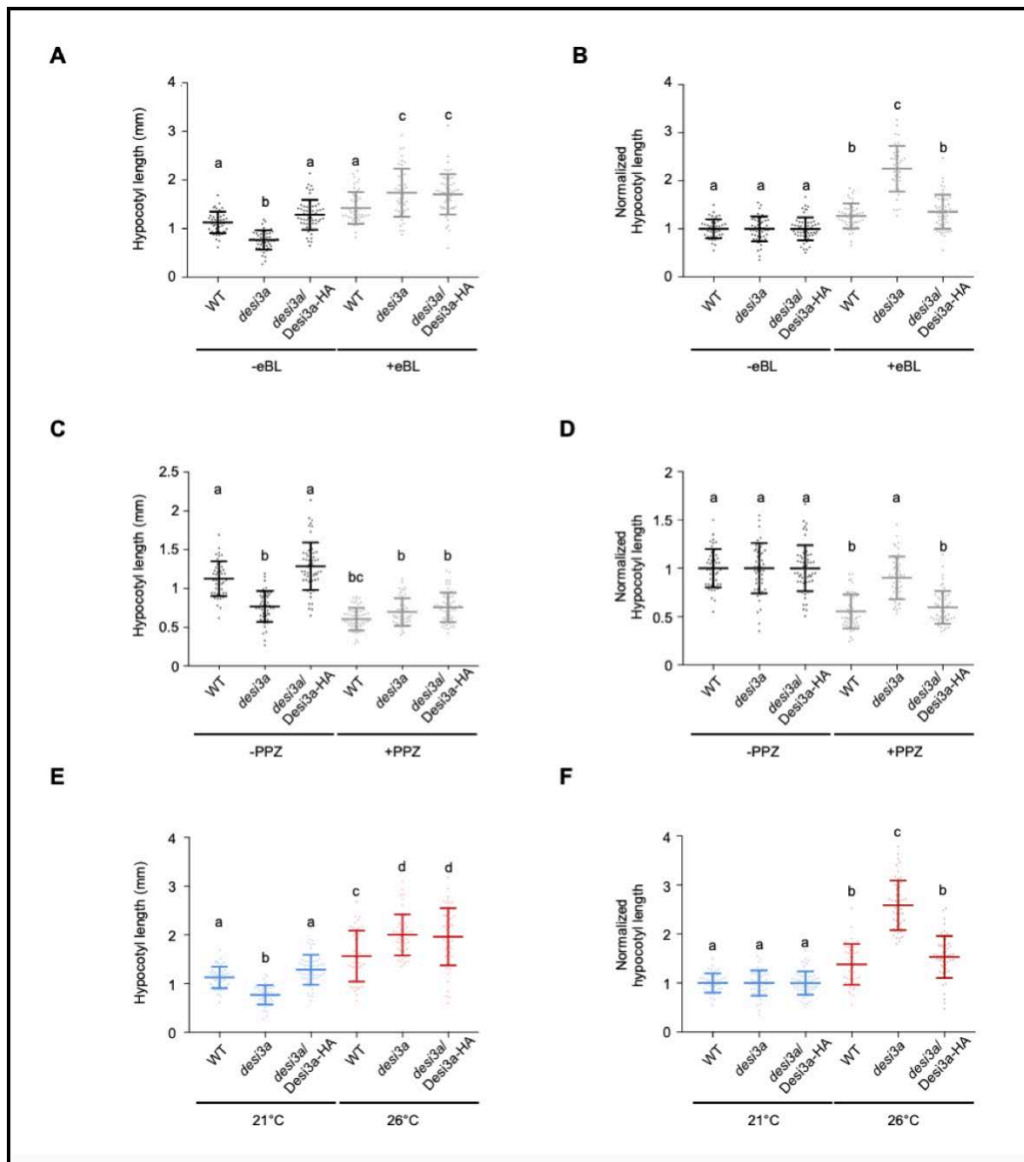


Figure S9: Phenotype of the *desi3a/Desi3a-HA* complemented line upon BR treatment and temperature elevation. A. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT), *desi3a*, and *desi3a/Desi3a-HA* complemented plants grown on plates containing mock or 500 nM epibrassinolide (eBL). Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. B. Normalized hypocotyl length from wild-type (WT) *desi3a*, and *desi3a/Desi3a-HA* plants grown as in A. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. C. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT), *desi3a*, and *desi3a/Desi3a-HA* complemented plants grown on plates containing mock or 2 μM propiconazole (PPZ). Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. D. Normalized hypocotyl length from wild-type (WT) *desi3a*, and *desi3a/Desi3a-HA* plants grown as in C. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. E. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT), *desi3a*, and *desi3a/Desi3a-HA* complemented plants grown at 21°C or 26°C. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. F. Normalized hypocotyl length from wild-type (WT) *desi3a*, and *desi3a/Desi3a-HA* plants grown as in E. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

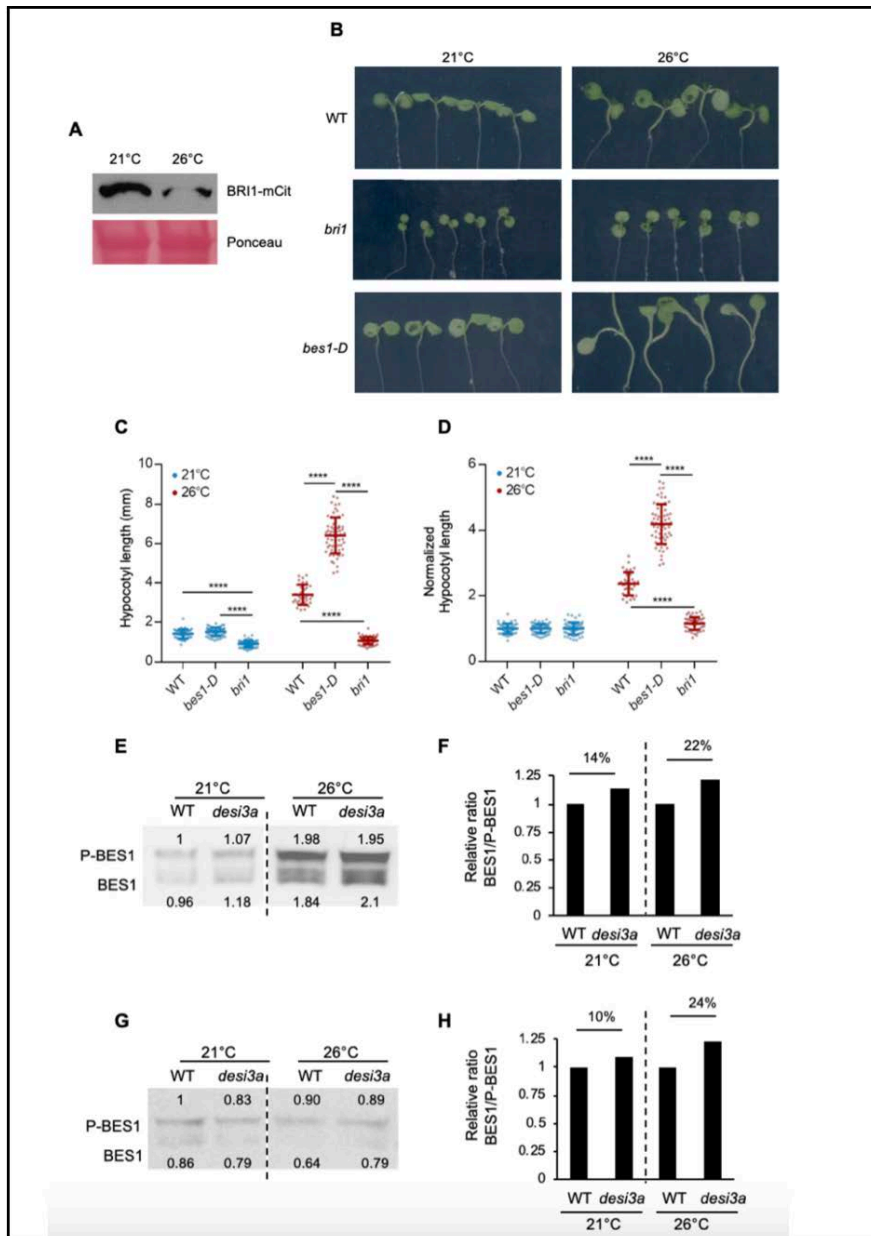


Figure S10: Impact of temperature elevation on BR signaling. A. Influence of warm temperature on BRI1 protein levels. Western blot analyses monitoring BRI1 protein accumulation in BRI1-mCit-expressing plants grown at 21°C or 26°C using anti- GFP antibodies. Ponceau red is used as loading control. B. Phenotype of 6-day-old wild-type (WT), *bri1* and *bes1-D* mutant plants grown at 21°C or 26 °C in the light. C. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT), *bri1* and *bes1-D* mutant plants grown as in B. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference with wild-type plants (two-way ANOVA with Sidak’s multiple comparison test). D. Ratio of hypocotyl length from wild-type (WT), *bri1* and *bes1-D* mutant plants grown at 21°C and 26 °C for 6 days. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). The asterisks indicate a statistically significant difference with wild- type (two-way ANOVA with Sidak’s multiple comparison test). E. First replicate of BES1 phosphorylation state in wild-type (WT) or *desi3a* plants grown at 21°C or 26 °C. Detection of BES1 was performed with anti-BES1 antibodies. Signal intensities of BES1 and P-BES1 are indicated. F. Normalized BES1 to phosphorylated BES1 (P-BES1) ratios from the western blot shown in E, relative to wild-type. G. Second replicate of BES1 phosphorylation state in wild- type (WT) or *desi3a* plants grown at 21°C or 26 °C. Detection of BES1 was performed with anti-BES1 antibodies. Signal intensities of BES1 and P-BES1 are indicated. H. Normalized BES1 to phosphorylated BES1 (P-BES1) ratios from the western blot shown in G, relative to wild-type.

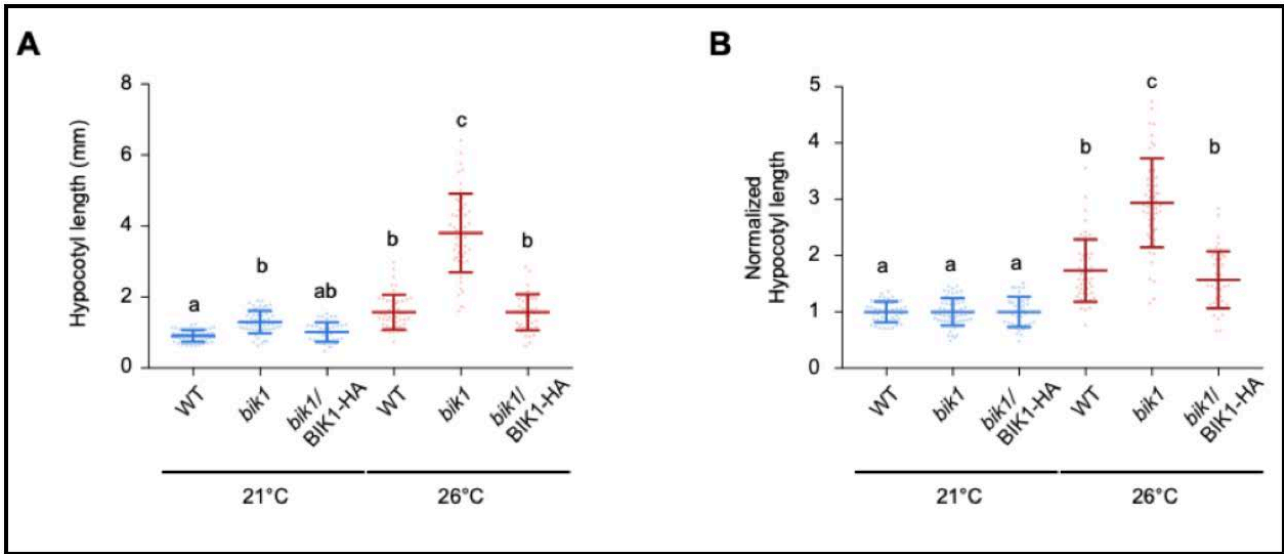


Figure S11: Phenotype of the *bik1*/BIK1-HA complemented line at 21°C and 26°C. A. Hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT), *bik1* and *bik1*/BIK1-HA complemented line grown at 21°C or 26°C in the light. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. B. Normalized hypocotyl length of 6-day-old wild-type (WT), *bik1* and *bik1*/BIK1-HA complemented line grown as in A. Experiments were carried out in triplicates. Error bars represent SD (n=40). Statistical differences were calculated by two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test.

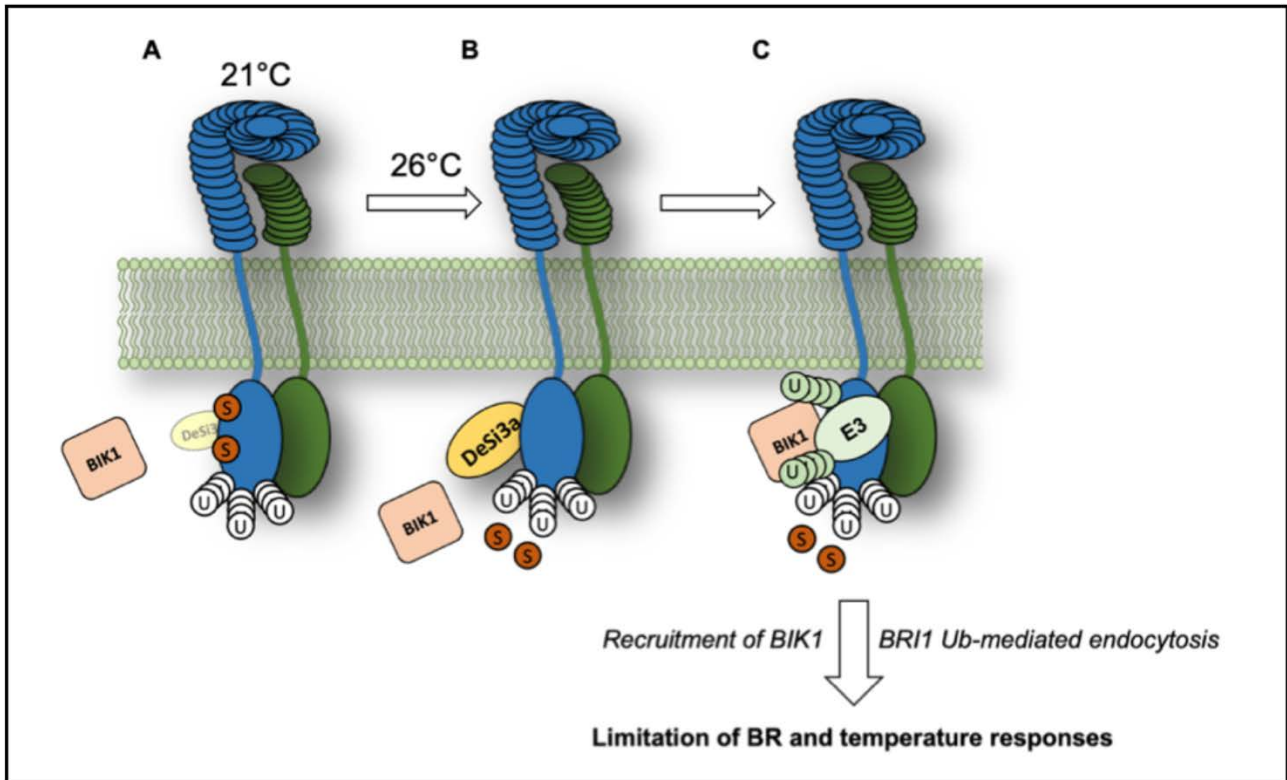


Figure S12: Model for Desi3a function in the control of BR signaling at 21°C and 26°C. A. At standard growth temperature (21°C), Desi3a SUMO protease levels are low and BRI1 is SUMOylated at residues K1066 and K1118. B. At warmer growth temperature (26°C), Desi3a accumulates leading to the deSUMOylation of BRI1. C. DeSUMOylated BRI1 shows increased interaction with the negative regulator of the brassinosteroid signaling pathway BIK1 and promotes BRI1 internalization from the plasma membrane. These two parallel mechanisms downregulate BRI1, thus preventing plants from over-growing in response to temperature elevation. We postulate that the increased internalization and degradation of BRI1 observed at 26°C results from the ubiquitination of BRI1 at residues K1066 and K1118.

Name	Sequence	Purpose
BRI1-K1066R-F	GGTGTTCAACAAGAGGAGACGTTTATAGTTACGG	SDM
BRI1-K1066R-R	CCGTA ACTATAAAACGTCTCCTCTTGTTGAACACC	SDM
BRI1 K1118R F	CGAGCTTATGAGGGAAGATCCAG	SDM
BRI1 K1118R R	CTGGATCTTCCCTCATAAGCTCG	SDM
DESI3a_qPCR_F	CATACTTCCCGAGTCCCTCA	RT-PCR
DESI3a_qPCR_R	AGTTGCCAAGGAGGTAAGCA	RT-PCR
BRI1 RT-PCR F	TCCGCGGTGTGATCCTTCAAAT	RT-PCR
BRI1 RT-PCR R	GCCGTGTGGACCAGTTTAGTTT	RT-PCR
ACT2 F	GCCCAGAAGTCTTGTTCCAG	RT-PCR
ACT2 R	TCATACTCGGCCTTGGAGAT	RT-PCR

Table S13: Primers used in this study

4.3 La K63 poly-ubiquitination de BRI1 permet toujours l'internalisation de BRI1 en réponse à la température.

Au sein de cet article, nous mettons en évidence le rôle de la SUMOylation dans la régulation de l'internalisation de BRI1. Il est alors légitime de s'interroger si cette voie de régulation par la SUMOylation sur l'internalisation de BRI1 est indépendante de la voie passant par la poly-ubiquitination en K63. Pour avoir un premier élément de réponse face à cette interrogation, l'altération de l'internalisation de BRI1 à température plus élevée a été évaluée en l'absence de poly-ubiquitination en K63. Des plantules âgées de 3 jours, exprimant la construction BRI1-*mCITRINE* dans les fonds génétiques Col-0 et *ubc35 ubc36* et cultivées dans les mêmes conditions que l'observation de BRI1-*mCITRINE* dans le fond *desi3a*, ont été observées en microscopie confocale. De manière similaire à la condition standard où les plantules ont été cultivées à 21°C, on observe une absence d'internalisation de BRI1 à 26°C dans le fond *ubc35 ubc36* (**Figure 25**). Il semblerait donc que l'internalisation de BRI1 à 26°C nécessite donc toujours la poly-ubiquitination en K63 pour être amorcée. L'ensemble de ces données suggèrent que le fait d'être désSUMOylé ne suffise pas à provoquer l'internalisation de BRI1 à 26°C. La désSUMOylation activée par la température permettrait donc peut être à BRI1 d'être plus facilement poly-ubiquitiné en K63 sur les résidus désSUMOylés et donc expliquerait son internalisation.

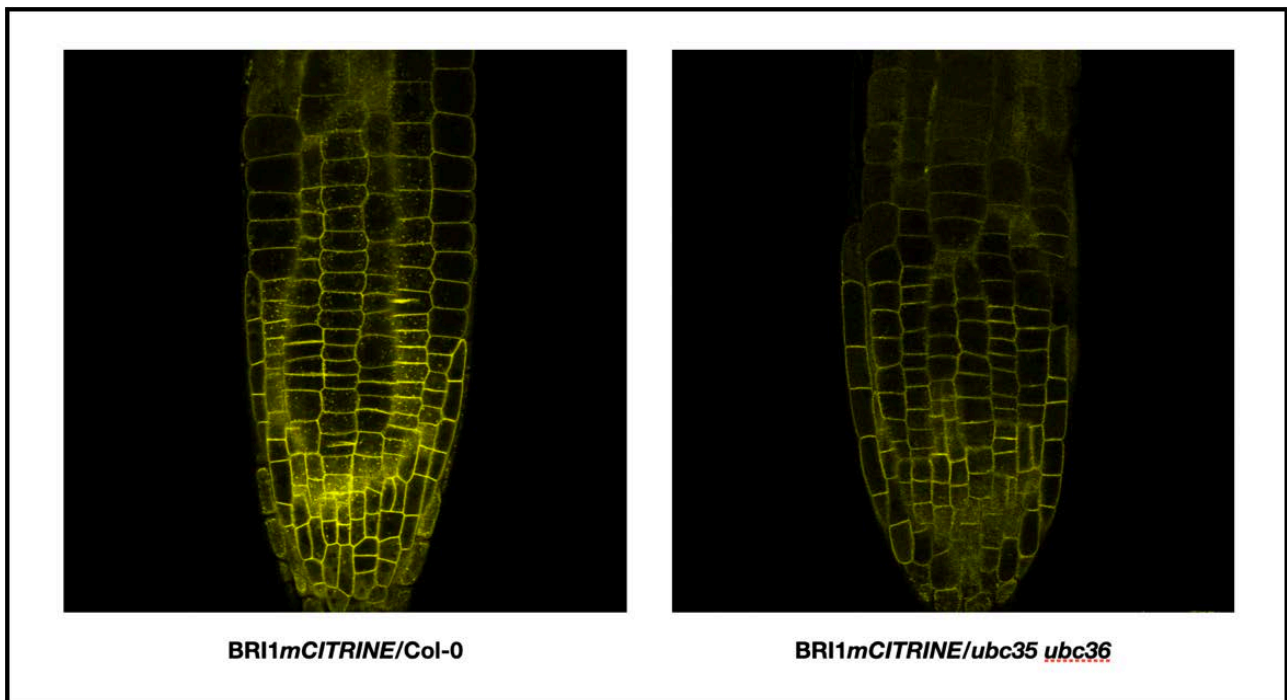


Figure 25 : La polyubiquitination en K63 semble toujours nécessaire à l'internalisation de BRI1 en stress chaleur. Observation de la *mCITRINE* après excitation à 514nm, en microscopie confocale (Leica SP8 - objectif x64) de pointes racinaires de plantules 3 jours cultivées à 26°C, à gauche pBRI1::*BRI1mCITRINE* dans le fond sauvage Col-0, à droite pBRI1::*BRI1mCITRINE* croisé avec le double mutant *ubc35 ubc36*.

4.4 Références

- Bayer *et al.* Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. *J Mol Biol* **280**, 275–286 (1998).
- Belkhadir, Jaillais, The molecular circuitry of brassinosteroid signaling. *New Phytol.* **206**, 522–540 (2015).
- Bolte, Cordelieres, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232 (2006).
- Chen, Chen, Regulation of NF-kappaB by ubiquitination. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 4–12 (2013).
- Chinchilla *et al.*, A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500 (2007).
- Chung *et al.*, An RNA thermoswitch regulates daytime growth in Arabidopsis. *Nat. Plants* **6**, 522–532 (2020).
- Clouse, Brassinosteroid signal transduction: From receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* **23**, 1219–1230 (2011).
- Clouse, Langford, McMorris, A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol.* **111**, 671–678 (1996).
- Conti *et al.*, Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 2894–2908 (2008).
- Cuijpers, Willemstein, Vertegaal, Converging Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) and ubiquitin signaling: Improved methodology identifies co-modified target proteins. *Mol. Cell Proteomics* **16**, 2281–2295 (2017).
- De Lima, Kleine-Vehn, De Smet, Feraru, Getting to the root of belowground high temperature responses in plants. *J. Exp. Bot.* **10**, 202 (2021).
- Desterro, Rodriguez, Hay, SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol. Cell* **2**, 233–239 (1998).
- Di Rubbo *et al.*, The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 2986–2997 (2013).
- Fei *et al.*, Effects of auxin and ethylene on root growth adaptation to different ambient temperatures in Arabidopsis. *Plant Sci.* **281**, 159–172 (2019).
- Fiorucci *et al.*, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 is important for early responses to elevated temperature in Arabidopsis seedlings. *New Phytol.* **226**, 50–58 (2020).
- Franklin *et al.*, Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 20231–20235 (2011).

Geldner, Hyman, Wang, Schumacher, Chory, Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev.* **21**, 1598–1602 (2007).

Gonzalez-Garcia *et al.*, Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* **138**, 849–859 (2011).

Gray, Ostin, Sandberg, Romano, Estelle, High temperature promotes auxin- mediated hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7197–7202 (1998).

He *et al.*, Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* **288**, 2360–2363 (2000).

Heese *et al.*, The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12217–12222 (2007).

Hothorn *et al.*, Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* **474**, 467–471 (2011).

Ibanez *et al.*, Brassinosteroids dominate hormonal regulation of plant thermomorphogenesis via BZR1. *Curr. Biol.* **28**, 303–310.e303 (2018).

Irani *et al.*, Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 583–589 (2012).

Jaillais *et al.*, Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev.* **25**, 232–237 (2011).

Jung *et al.*, Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis. *Science* **354**, 886–889 (2016).

Karimi, Depicker, Hilson, Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiol.* **145**, 1144–1154 (2007).

Khan *et al.*, Interplay between phosphorylation and SUMOylation events determines CESTA protein fate in brassinosteroid signalling. *Nat. Commun.* **5**, 4687 (2014).

Kinoshita *et al.*, Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* **433**, 167–171 (2005).

Koini *et al.*, High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr. Biol.* **19**, 408–413 (2009).

Kruse *et al.*, Impaired endocytosis of the ion channel TRPM4 is associated with human progressive familial heart block type I. *J. Clin. Invest.* **119**, 2737–2744 (2009).

Kurepa *et al.*, The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 6862–6872 (2003).

Legris *et al.*, Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science* **354**, 897–900 (2016).

- Li *et al.*, BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 213–222 (2002).
- Li, Chory, A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**, 929–938 (1997).
- Li, Nagpal, Vitart, McMorris, Chory, A role for brassinosteroids in light-dependent development of Arabidopsis. *Science* **272**, 398–401 (1996).
- Lin *et al.*, Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 12114–12119 (2013).
- Lu *et al.*, A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 496–501 (2010).
- Martinez *et al.*, PIF4-induced BR synthesis is critical to diurnal and thermomorphogenic growth. *EMBO J.* **37**, e99552 (2018).
- Martins *et al.*, Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nat. Commun.* **8**, 309 (2017).
- Martins *et al.*, Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat. Commun.* **6**, 6151 (2015).
- Nam, Li, BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**, 203–212 (2002).
- Nemhauser, T. C. Mockler, J. Chory, Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **2**, E258 (2004).
- Oh, Wang, Clouse, Huber, Deactivation of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1) receptor kinase by autophosphorylation within the glycine-rich loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 327–332 (2012).
- Orosa *et al.*, SUMO conjugation to the pattern recognition receptor FLS2 triggers intracellular signalling in plant innate immunity. *Nat. Commun.* **9**, 5185 (2018).
- Ortiz-Morea, He, Shan, Russinova, It takes two to tango - molecular links between plant immunity and brassinosteroid signalling. *J. Cell Sci.* **133**, 246728 (2020).
- Park *et al.* SUMO and SUMOylation in plants. *Mol Cells* **32**, 305 (2011).
- Perraki *et al.*, Phosphocode-dependent functional dichotomy of a common co-receptor in plant signalling. *Nature* **561**, 248–252 (2018).
- Rakusova *et al.*, Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity. *Curr. Biol.* **26**, 3026–3032 (2016).
- Robatzek, Chinchilla, Boller, Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev.* **20**, 537–542 (2006).
- Robinson, Jiang, Schumacher, The endosomal system of plants: Charting new and familiar territories. *Plant Physiol.* **147**, 1482–1492 (2008).

Schulze *et al.*, Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J. Biol. Chem.* **285**, 9444–9451 (2010).

Shah, Russinova, Gadella, Willemse, De Vries, The Arabidopsis kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev.* **16**, 1707–1720 (2002).

She *et al.*, Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **474**, 472–476 (2011).

Singh, Gupta, Laxmi, Glucose control of root growth direction in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* **65**, 2981–2993 (2014).

Srivastava *et al.*, SUMO conjugation to BZR1 enables Brassinosteroid signalling to integrate environmental cues to shape plant growth. *Curr. Biol.* **30**, 1410–1423 (2020).

Srivastava *et al.*, SUMO suppresses the activity of the Jasmonic acid receptor CORONATINE INSENSITIVE1. *Plant Cell* **30**, 2099–2115 (2018).

Stavang *et al.*, Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *Plant J.* **60**, 589–601 (2009).

Stone, Trotochaud, Walker, Clark, Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol.* **117**, 1217–1225 (1998).

Sun *et al.*, Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev. Cell* **19**, 765–777 (2010).

Sun *et al.*, Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* **342**, 624–628 (2013).

Sun, Qi, Li, Chu, Li, PIF4-mediated activation of YUCCA8 expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating arabidopsis hypocotyl growth. *PLoS Genet.* **8**, e1002594 (2012).

Szekeress *et al.*, Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell* **85**, 171–182 (1996).

Tozluoglu, Karaca, Nussinov, Haliloglu, A mechanistic view of the role of E3 in sumoylation. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000913 (2010).

Vierstra, The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol.* **160**, 2–14 (2012).

Wang *et al.*, Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Dev. Cell* **8**, 855–865 (2005).

Wang *et al.*, Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev. Cell* **2**, 505–513 (2002).

Wang *et al.*, Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev. Cell* **15**, 220–235 (2008).

Wang, J. Chory, Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**, 1118–1122 (2006).

Wang, Seto, Fujioka, Yoshida, Chory, BRI1 is a critical component of a plasma- membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**, 380–383 (2001).

Wu *et al.*, Methylation of a phosphatase specifies dephosphorylation and degradation of activated brassinosteroid receptors. *Sci. Signal* **4**, ra29 (2011).

Yin *et al.*, BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* **109**, 181–191 (2002).

Yoo *et al.* SIZ1 small ubiquitin-like modifier E3 ligase facilitates basal thermotolerance in Arabidopsis independent of salicylic acid. *Plant Physiol* **142**, 1548–58 (2006).

Yu *et al.*, A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **65**, 634–646 (2011).

Zhang *et al.*, Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a Pseudomonas syringae effector. *Cell Host Microbe* **7**, 290–301 (2010)

Zhang *et al.*, Sumoylation of BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1) by the SUMO E3 ligase SIZ1 negatively regulates Brassinosteroids signaling in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **60**, 2282–2292 (2019).

Zhou *et al.*, Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E1906–E1915 (2018).

Chapitre 5 : Discussion Générale

L'internalisation des récepteurs membranaires et leur trafic intracellulaire conduisant à leur dégradation lytique dans la vacuole ou dans des lysosomes ont déjà été très étudiés chez la levure et les animaux.

Chez la levure, des travaux ont montré que le récepteur STE2p est internalisé en présence de son ligand, et que ce processus est amorcé par son ubiquitination (Hicke and Riezman., 1996). De même, la protéine PHM5 requière une ubiquitination pour être internalisée (Reggiori and Pelham., 2001). Depuis, il a été montré que la poly-ubiquitination en K63 permet ces internalisations et le trafic intracellulaire à travers les MVBs (Erpapazoglou et al., 2008). Chez les animaux le consensus est un peu moins clair surtout à cause de l'endocytose du récepteur modèle EGFR (EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR) qui a donné des résultats contrastés. En effet, il a tout d'abord été montré que l'ubiquitination n'est pas nécessaire à l'internalisation du récepteur (Huglund et al., 2003). Plus tard il a été montré que la poly-ubiquitination en K63 était tout de même nécessaire à sa dégradation lysosomale (Huang et al., 2013). Des travaux utilisant des mutants 15KR et 25 KR ont également montré que ces résidus lysines permettaient le recrutement des complexes AP-2 nécessaires à l'internalisation par l'intermédiaire des clathrines (Goh et al., 2010). A cela s'ajoute le fait que l'internalisation d'EGFR semble dépendre de sa liaison avec son ligand (Sigismund et al., 2005). Lors d'ajout de faible concentration de son ligand, EGFR est internalisé à travers la CME. A l'inverse lors d'un ajout d'une forte concentration de son ligand la voie d'internalisation principale semble être la CIE nécessitant l'ubiquitination (Sigismund et al., 2005). L'hypothèse qui a été formulée, prenant en compte l'ensemble de ses résultats, est qu'en réponse à de faibles concentrations de son ligand,

EGFR est internalisé par CME puis recyclé vers la membrane plasmique, là où de fortes concentrations de son ligand vont permettre son ubiquitination et donc son internalisation et sa dégradation à la vacuole/ lysosome (Sigismund et al., 2008).

Chez les plantes, de nombreuses protéines impliquées dans ce mécanisme restent encore à être identifiées, et on ne connaît pas encore les déterminants moléculaires conduisant aux deux voies distinctes d'internalisation (passant ou non par l'intermédiaire de cages de clathrine). L'ubiquitination a cependant été montrée comme une modification post traductionnelle clé pour l'endocytose des récepteurs membranaires. De nombreuses études ont utilisé des mutants K - R ou K - A afin de substituer les lysines pouvant servir à l'ubiquitination des récepteurs membranaires par un résidu non-ubiquitable. C'est ainsi le cas pour BOR1 K509A (Kasai et al., 2011), PIN2 12KR (Leitner et al., 2012), IRT1 2KR (Dubeaux et al., 2018), BRI1 25KR (Martins et al., 2015) et bien d'autres encore. Bien que sans doute correctes, les conclusions de ces articles scientifiques conduisent toujours à affirmer que, comme chez la levure, l'ubiquitination en K63 est responsable de l'internalisation et du trafic cellulaire (Erpapazoglou et al., 2014). Pour BOR1 et PIN2 le résultat est plus discuté car la présence de ces transporteurs non ubiquitables est toujours détectée dans des corps BFA (Kasai et al., 2011, Leitner et al., 2012), traduisant le fait que l'internalisation depuis la surface cellulaire est toujours active. Plusieurs hypothèses peuvent être dressées pour expliquer ce phénomène, i) la poly-ubiquitination en K63 ne serait pas la seule responsable de leurs internalisation, ii) d'autres lysines, non-mutées, pourraient jouer un rôle dans l'ubiquitination en K63 (bien que pour PIN2 il semblerait que ce mutant empêche totalement la poly-Ub en K63). Pour BRI1, la mutation 25KR impacte fortement son internalisation (Martins et al., 2015). De plus, BRI1 peut être internalisé aussi bien par la CME que par la CIE (Wang et al., 2015). Par l'absence d'endosome, BRI1-25KR montre donc l'importance des lysines pour l'internalisation de

BRI1 dans les deux voies d'internalisations. Les mutants K-R ne permettent pas d'affirmer que l'absence d'ubiquitination à elle seule stabilise les protéines membranaires à la membrane plasmique. En effet, pour toutes ces protéines membranaires d'autres modifications post traductionnelles pourraient jouer un rôle essentiel dans l'internalisation de ces protéines. Au cours de ma thèse, j'ai essayé de passer au-delà de ces problématiques en regardant l'internalisation d'un récepteur membranaire non modifié dans des fonds génétiques impactés pour certaines modifications post traductionnelles.

5.1 Ubiquitination en K63 impliquée dans l'internalisation et le trafic cellulaire des récepteurs membranaires

A l'aide de diverses approches expérimentales, à l'aide de mutants affectés pour les 2 enzymes de conjugaisons E2 UBC35 et UBC36 qui sont responsables des chaînes d'ubiquitination en K63, nous avons réussi à démontrer que ces dernières permettent l'internalisation de récepteur membranaire comme BRI1 depuis la surface cellulaire.

Il semble intéressant de savoir si cette poly-ubiquitination intervient dans la CME et la CIE. BRI1 peut interagir avec AP2A du complexe AP-2 (Rubbo et al., 2013) et avec le complexe TPLATE (Gadeyne et al., 2014), confortant l'idée que l'internalisation de BRI1 pourrait être médiée via la CME. Une étude a récemment montré que BRI1 pouvait former des nanodomains dans la membrane plasmique et interagir avec Flot1 afin de réaliser une internalisation via la CIE (Wang et al., 2015). Lors d'un traitement exogène d'eBL, BRI1 interagit davantage avec Flot1 et sa diffusion devient plus restreinte, suggérant que l'ajout de BRs facilite le regroupement de BRI1 au sein de nanodomains (Wang et al., 2015). Comme l'endocytose de BRI1 est totalement inhibée par le manque des deux E2 UBC35 et UBC36, on peut alors imaginer que la poly-ubiquitination en K63 serait un marqueur commun à l'internalisation dans le cas des deux voies clathrine-dépendante et -

indépendante. Même si dans notre cas on ne peut pas totalement exclure l'idée qu'une autre protéine doit être polyubiquitinée en K63 pour permettre l'internalisation de BRI1, les travaux menés sur BRI1-25KR ont tout de même permis d'avancer que c'est bien une modification post traductionnelle sur BRI1 lui-même qui permettrait son internalisation (Martins et al., 2015).

L'utilisation du double mutant *ubc35 ubc36* nous permet d'avancer l'hypothèse que l'internalisation de BRI1 est entièrement dépendante de la polyubiquitination en K63. La présence de BRI1-25KR dans des corps BFA laissait supposer qu'il est toujours un peu internalisé mais quasiment aussi tôt recyclé vers la membrane plasmique (Martins et al., 2015). Cependant, l'absence de BRI1 au sein de corps BFA dans le double mutant *ubc35 ubc36* suggère que la poly-ubiquitination en K63 est nécessaire à l'internalisation de BRI1 (**Figure 12C**).

Une récente étude a également montré que l'internalisation de BRI1 n'était pas affectée par la liaison avec son ligand (Claus et al., 2023). Cela a été réalisé en utilisant un mutant, BRI1^Q, incapable de se lier aux BRs. Dans ce mutant, il a également été montré que la phosphorylation et l'ubiquitination totale de BRI1 sont affectés en absence de liaison avec son ligand (Claus et al., 2023). Les auteurs en ont conclu qu'il pouvait exister une voie d'internalisation non canonique à l'ubiquitination comme pour EGFR chez les animaux (Sigismund et al., 2008). Cependant, l'absence totale d'endocytose de BRI1 dans le fond *ubc35 ubc36* (**Figure 12B**) suggère que la fixation des BRs n'est pas requis pour l'internalisation de BRI1 à travers la poly-ubiquitination en K63. Cela décrit ainsi un mécanisme différent à celui montré pour EGFR. De plus, malgré la diminution globale de l'ubiquitination, il est possible que la poly-ubiquitination en K63 reste inchangée dans ce

mutant. L'utilisation d'anticorps anti-K63 après une immunoprécipitation de BRI1^Q permettrait de clarifier cette hypothèse.

En utilisant comme modèle BRI1, nous avons mis en évidence que la poly-ubiquitination en K63 agit comme voie de la régulation de l'homéostasie des protéines membranaires. Cependant même si on remarque une baisse de l'endocytose totale au sein de la cellule dans le double mutant *ubc35 ubc36*, il reste toujours des endosomes présents dans la cellule (révélés par un traitement au FM4-64) (**Figure 12E**) ce qui montrent que la formation des endosomes ne requiert que marginalement l'ubiquitination et qu'il existe également une voie d'internalisation indépendante de la poly-ubiquitination en K63 pour les protéines à endocyter.

Nous avons ensuite pu connecter le rôle de ces deux enzymes de conjugaison E2 avec une E3 ligase déjà caractérisée précédemment, PUB13. Elle interagit avec différents récepteurs membranaires tel que FLS2, LYK5 ou BRI1 (Lu et al., 2011, Liao et al., 2017, Zhou et al., 2018). L'absence de PUB13 entraîne une diminution de l'internalisation de BRI1 (Zhou et al., 2018). De façon intéressante, le double mutant *pub12 pub13* montre un phénotype après un traitement au BRs bien moindre que pour le double mutant *ubc35 ubc36*, tout en ayant un ratio PM/endosome pour BRI1 identique en microscopie confocale (Zhou et al., 2018, Saeed, Deligne et al., en révision). Différentes raisons pour expliquer ses différences, i) pour *ubc35 ubc36*, j'ai utilisé l'eBL qui, bien que supposés reproduire les effets des BLs naturels, pourrait avoir une activité légèrement différente en terme de perception, ii) une autre E3 ligase pourrait agir de façon redondante cependant on ne devrait pas observer le même effet en microscopie confocale, iii) peut être plus probable, le double mutant *ubc35 ubc36* empêche également aux BRL d'être polyubiquitiné en K63 ce qui pourrait stabiliser les BRLs à la membrane plasmique sachant que certains d'entre eux sont capables de

percevoir les BRs cela peut également augmenter plus fortement la voie de signalisation et donc augmenter le phénotype au traitement BRs. PUB12 et PUB13 agissant sur d'autres récepteurs membranaires, il est possible que cette dernière hypothèse soit réfutée s'ils s'avèrent capables d'interagir également avec les BRLs.

5.2 SUMOylation, un mécanisme d'évitement pour l'internalisation et dépendant de la température

La SUMOylation permet de réguler de nombreuses voies de signalisation et peut réguler l'activité de récepteurs membranaires (Park et al., 2011, Orosa et al., 2018). Nous avons montré que la régulation du récepteur des brassinostéroïdes, BRI1, est modulée par cette modification post traductionnelle (Naranjo et al., 2023). En effet lorsque ce dernier est SUMOylé, il se retrouve maintenu à la membrane plasmique et l'activité de la voie de signalisation des BRs est augmentée. Lors d'une croissance à 26°C, BRI1 est désSUMOylé par DESI3A ce qui conduit à sa dégradation à la suite de son internalisation.

DésSUMOylé BRI1 permet à la plante en réponse à la température, de réguler négativement et rapidement la voie de signalisation des BRs, et ainsi de réduire l'expression de gènes cibles de BRs impliqués dans la croissance. Pourtant, il est connu que les BRs peuvent agir sur l'élongation des parties aériennes notamment en activant l'expression de *PIF4* (*PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4*) qui promeut la synthèse d'auxine (Franklin et al., 2011). Ce phénotype d'élongation des parties aérienne est observé chez Col-0 et amplifié dans le fond *desi3a* (**Figure 20C, D**). Un élément qui pourrait permettre de comprendre pourquoi les plantes désSUMOylent BRI1 en température élevée pourrait venir du fait que l'expression de gènes de la biosynthèse des BRs comme *DWF4* est grandement augmentée dans ces conditions (Maharjan and Choe, 2011). Ainsi la plante pourrait en

déSUMOylant BRI1 moduler la perception des BRs afin d'obtenir une activation contrôlée de la voie de signalisation des BRs.

La mutation *desi3a* régule négativement l'internalisation de BRI1 (**Figure 23**). Cependant, dans le mutant incapable de produire des chaînes de polyUb en K63, *ubc35 ubc36*, à 26°C nous avons montré que BRI1 n'est plus internalisé (**Figure 25**). L'internalisation de BRI1 en condition de stress chaleur est donc toujours dépendante de ces deux E2 enzymes. Nous pouvons alors nous demander si ces deux modifications post traductionnelles sont indépendantes ou si la SUMOylation permettrait d'empêcher la polyubiquitination en K63. Dans le mutant 2KR empêchant la SUMOylation, nous n'avons pas vu de différence sur l'ubiquitination de BRI1 (Naranjo et al., 2023), donc la SUMOylation et la polyUb en K63 ne serait pas en compétition sur la même lysine. Une autre explication serait que la présence de très nombreuses ubiquitinations sur BRI1 empêche de visualiser la possible ubiquitination sur ces deux résidus lysines déSUMOylés en réponse à la température. Il serait intéressant d'étudier l'impact de la déSUMOylation de BRI1 sur l'ubiquitination de BRI1 aux deux sites en question en utilisant un fond génétique où le niveau d'ubiquitination de BRI1 est fortement réduit.

5.3 De nouveaux axes de recherches à approfondir dans la caractérisation des régulations dynamiques des récepteurs membranaires

Afin d'identifier de nouveaux facteurs agissant sur la régulation dynamique de BRI1, y compris dans son internalisation, un développement de nouvelles approches biochimiques pour identifier de nouvelles protéines interagissant avec BRI1 fut débuté pendant ma thèse. Nous avons cherché à mettre en œuvre des méthodes de marquage de proximité permettant l'identification d'interactions faibles ou transitoires (Qin et al., 2021). Une biotine ligase, la TurboID a été choisi pour son efficacité de marquage, sa petite taille et qu'elle a

déjà été utilisée chez les plantes. Notamment pour découvrir le réseau d'interaction de la kinase centrale à la voie de signalisation des BRs, BIN2 et ainsi confirmer son rôle dans d'autres voies comme sur le transport de l'auxine ou le phototropisme (Kim et al., 2022). A l'heure actuelle, le TurboID n'a jamais été réalisé avec des protéines membranaires mais rien ne semble être contre indiqué. Ce qui s'en rapproche le plus est une approche par TurboID réalisée dans le but de trouver des interactants à AvrPto (un effecteur de *Pseudomonas syringae*) chez *Nicotiana benthamiana* (Conlan et al., 2018). Des plantes transgéniques ont été générées comportant la protéine de fusion BRI1-TurboID ou des protéines de fusion contrôles utilisant une version « kinase dead » de BRI1 (K911E) (Oh et al., 2000) et une version délétée de BRI1 où il ne reste que le domaine transmembranaire afin d'éliminer les faux positifs.

Les travaux menés pour mettre en place une recherche d'interactants de BRI1 par marquage de proximité nous permettra sans doute à l'avenir de découvrir des protéines jouant un rôle dans l'endocytose de BRI1. En effet, l'endocytose de BRI1, régulée par la poly-ubiquitination en K63 (Martins et al., 2015, Saeed, Deligne et al., en révision), semble jouer un rôle essentiel dans sa régulation et son ciblage vers la vacuole pour sa dégradation. De nombreuses protéines intervenant dans son transport et dans l'internalisation de BRI1 reste à être caractérisées pour avoir plus de détails sur ces mécanismes encore incompris. D'autre part, l'endocytose semble agir elle-même comme un mécanisme de signalisation à part entière, puisqu'il a été montré qu'elle peut déclencher une réaction de résistance aux stress abiotiques (Martins et al., 2017). Ce processus reste à ce jour peu clair. De même des E3 ligases spécifiques aux stress chaleurs pourraient être identifiées par le TurboID.

La littérature montre comment BRI1 est conduit à l'endosome précoce et comment cet endosome évolue en corps multi vésiculaires qui sont amenés à la vacuole où ils sont dégradés (Jaillais et al., 2008), mais le recyclage de BRI1 vers la membrane plasmique ainsi que toute la dynamique d'inactivation du récepteur reste des processus inconnus. Deux déubiquitinasés (DUBs) UBP12 et UBP13 ont été montrées comme capables de stabiliser BRI1 à la membrane plasmique en lui retirant les chaînes de polyUb en K63 (Luo et al., 2022). Les DUBs jouent sans doute un rôle majeur dans le recyclage de BRI1 mais il reste à identifier tous les interactants et le mécanisme permettant de rediriger ces endosomes vers une fusion avec la membrane plasmique.

BRI1 comme d'autres protéines membranaires est restreint à des nanodomains (Hutten et al., 2017). Ces nanodomains jouent autant un rôle dans l'activité de ces protéines ainsi que dans leur internalisation par la CIE (Jaillais and Ott, 2019, Wang et al., 2015). Les modifications post traductionnelles telles que l'ubiquitination et la SUMOylation jouent sans doute un rôle sur le maintien ou influence la localisation de BRI1 dans ces nanodomains. Deux évidences permettent d'avancer cette hypothèse, i) l'ubiquitination en K63 jouent un rôle clé dans l'internalisation en général donc y compris dans la CIE (Saeed, Deligne et al., en révision), ii) la SUMOylation stabilise l'interaction entre BIK1 et FLS2 ce qui les restreint dans un nanodomaine (Orosa et al., 2018).

L'étude des nanodomains nécessite le développement d'une approche microscopique à l'échelle du nanomètre et de la molécule unique. Dans le domaine végétal, seul le SPT-PALM (single particle tracking – Photo Activable Localization Microscopy) permet d'obtenir des images de diffusions de protéines dans la membrane plasmique *in vivo*. Récemment, le SPT-PALM a été utilisé dans différentes études afin de caractériser la diffusion de plusieurs protéines membranaires. Par exemple, il a été montré grâce à cette technique que l'ATPase AHA2 et PIP2;1, une aquaporine, ont une diffusion restreinte dans la

membrane plasmique se traduisant par leur regroupement dans des nanodomains (Martinière et al., 2019). Autre exemple d'utilisation du SPT-PALM, ROP6, régulateur négatif l'endocytose des transporteurs d'auxine PIN1 et PIN2 (Chen et al., 2012), présente un changement de type de diffusion. En réponse à un traitement à l'auxine (Platre et al., 2019) ou lors d'un stress osmotique (Smokvarska et al., 2020), la protéine initialement caractérisée par une diffusion libre, devient quasiment immobile.

Dans l'objectif d'étudier la régulation dynamique de BRI1 au sein des nanodomains, des lignées stables contenant des constructions avec BRI1 ou son corécepteur BAK1 fusionnés avec des protéines photoactivables ont été générées au cours de ma thèse. Ces dernières restent aujourd'hui à être caractérisées.

Une fois mise en place, la microscopie à super résolution permettra de déterminer si ces modifications post traductionnelles participent à la régulation de la diffusion de BRI1 et son interaction avec d'autres protéines au sein de ces nanodomains.

5.4 Références

- Chen X, Naramoto S, Robert S, Tejos R, Löffke C, Lin D, Yang Z, Friml J. ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in Arabidopsis Roots. *Curr Biol* 2012; 22:1326–32.
- Claus LAN, Liu D, Hohmann U, Vukašinović N, Pleskot R, Liu J, Schiffner A, Jaillais Y, Wu G, Wolf S, et al. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 internalization can occur independent of ligand binding. *Plant Physiol* 2023;
- Conlan B, Stoll T, Gorman JJ, Saur I, Rathjen JP. Development of a Rapid in planta BioID System as a Probe for Plasma Membrane-Associated Immunity Proteins. *Front Plant Sci* 2018; 9:1882.
- Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G. Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol Cell* 2018; 69:953-964.e5.
- Erpapazoglou Z, Froissard M, Nondier I, Lesuisse E, Haguenaer-Tsapis R, Belgareh-Touzé N. Substrate- and Ubiquitin-Dependent Trafficking of the Yeast Siderophore Transporter Sit1. *Traffic* 2008; 9:1372–91.
- Erpapazoglou Z, Walker O, Haguenaer-Tsapis R. Versatile Roles of K63-Linked Ubiquitin Chains in Trafficking. *Cells* 2014; 3:1027–88.
- Franklin KA, Lee SH, Patel D, Kumar SV, Spartz AK, Gu C, Ye S, Yu P, Breen G, Cohen JD, et al. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc National Acad Sci* 2011; 108:20231–5.
- Gadeyne A, Sánchez-Rodríguez C, Vanneste S, Di Rubbo S, Zauber H, Vanneste K, Van Leene J, De Winne N, Eeckhout D, Persiau G, et al. The TPLATE Adaptor Complex Drives Clathrin-Mediated Endocytosis in Plants. *Cell* 2014; 156:691–704.
- Goh LK, Huang F, Kim W, Gygi S, Sorkin A. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biology* 2010; 189:871–83.
- Kim T-W, Park CH, Hsu C-C, Kim Y-W, Ko Y-W, Zhang Z, Zhu J-Y, Hsiao Y-C, Branon T, Kaasik K, et al. Mapping the signaling network of BIN2 kinase using TurboID-mediated biotin labeling and phosphoproteomics. *Plant Cell* 2022;
- Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Fiore PPD, Dikic I. Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 2003; 5:461–6.
- Hicke L, Riezman H. Ubiquitination of a Yeast Plasma Membrane Receptor Signals Its Ligand-Stimulated Endocytosis. *Cell* 1996; 84:277–87.
- Huang F, Zeng X, Kim W, Balasubramani M, Fortian A, Gygi SP, Yates NA, Sorkin A. Lysine 63-linked polyubiquitination is required for EGF receptor degradation. *Proc National Acad Sci* 2013; 110:15722–7.
- Hutten SJ, Hamers DS, Toorn MA den, Esse W van, Nolles A, Bücherl CA, Vries SC de, Hohlbein J, Borst JW. Visualization of BRI1 and SERK3/BAK1 Nanoclusters in Arabidopsis Roots. *Plos One* 2017; 12:e0169905.
- Jaillais Y, Fobis-Loisy I, Miège C, Gaude T. Evidence for a sorting endosome in Arabidopsis root cells. *Plant J* 2008; 53:237–47.

- Jaillais Y, Ott T. The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective . *Plant Physiol* 2019; 182:1682–96.
- Kasai K, Takano J, Miwa K, Toyoda A, Fujiwara T. High Boron-induced Ubiquitination Regulates Vacuolar Sorting of the BOR1 Borate Transporter in *Arabidopsis thaliana* *. *J Biol Chem* 2011; 286:6175–83.
- Leitner J, Petrášek J, Tomanov K, Retzer K, Pařezová M, Korbei B, Bachmair A, Zažímalová E, Luschnig C. Lysine63-linked ubiquitylation of PIN2 auxin carrier protein governs hormonally controlled adaptation of *Arabidopsis* root growth. *Proc National Acad Sci* 2012; 109:8322–7.
- Liao D, Cao Y, Sun X, Espinoza C, Nguyen CT, Liang Y, Stacey G. *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase PLANT U-BOX13 (PUB13) regulates chitin receptor LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) protein abundance. *New Phytol* 2017; 214:1646–56.
- Lu D, Lin W, Gao X, Wu S, Cheng C, Avila J, Heese A, Devarenne TP, He P, Shan L. Direct Ubiquitination of Pattern Recognition Receptor FLS2 Attenuates Plant Innate Immunity. *Science* 2011; 332:1439–42.
- Luo Y, Takagi J, Claus LAN, Zhang C, Yasuda S, Hasegawa Y, Yamaguchi J, Shan L, Russinova E, Sato T. Deubiquitinating enzymes UBP12 and UBP13 stabilize the brassinosteroid receptor BRI1. *Embo Rep* 2022; 23:e53354.
- Maharjan PM, Choe S. High Temperature Stimulates DWARF4 (DWF4) Expression to Increase Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis*. *J Plant Biol* 2011; 54:425.
- 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; 179:1581–93.
- Martins S, Montiel-Jorda A, Cayrel A, Huguet S, Roux CP-L, Ljung K, Vert G. Brassinosteroid signaling-dependent root responses to prolonged elevated ambient temperature. *Nat Commun* 2017; 8:309.
- Martins S, Dohmann EMN, Cayrel A, Johnson A, Fischer W, Pojer F, Satiat-Jeunemaître B, Jaillais Y, Chory J, Geldner N, et al. Internalization and vacuolar targeting of the brassinosteroid hormone receptor BRI1 are regulated by ubiquitination. *Nat Commun* 2015; 6:6151.
- Naranjo-Arcos M, Srivastava M, Deligne F, Bhagat PK, Mansi M, Sadanandom A, Vert G. SUMO/deSUMOylation of the BRI1 brassinosteroid receptor modulates plant growth responses to temperature. *Proc National Acad Sci* 2023; 120:e2217255120.
- Oh M-H, Ray WK, Huber SC, Asara JM, Gage DA, Clouse SD. Recombinant Brassinosteroid Insensitive 1 Receptor-Like Kinase Autophosphorylates on Serine and Threonine Residues and Phosphorylates a Conserved Peptide Motif in Vitro. *Plant Physiol* 2000; 124:751–66.
- Orosa B, Yates G, Verma V, Srivastava AK, Srivastava M, Campanaro A, Vega DD, Fernandes A, Zhang C, Lee J, et al. SUMO conjugation to the pattern recognition receptor FLS2 triggers intracellular signalling in plant innate immunity. *Nat Commun* 2018; 9:5185.
- Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marquès-Bueno M del M, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche J-B, Nollmann M, Miège C, et al. Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* 2019; 364:57–62.
- Qin W, Cho KF, Cavanagh PE, Ting AY. Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat Methods* 2021; 18:133–43.

Park HJ, Kim W-Y, Park HC, Lee SY, Bohnert HJ, Yun D-J. SUMO and SUMOylation in plants. *Mol Cells* 2011; 32:305.

Reggiori F, Pelham HRB. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo J* 2001; 20:5176–86.

Rubbo SD, Irani NG, Kim SY, Xu Z-Y, Gadeyne A, Dejonghe W, Vanhoutte I, Persiau G, Eeckhout D, Simon S, et al. The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis. *Plant Cell* 2013; 25:2986–97.

Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Fiore PPD, Polo S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc National Acad Sci* 2005; 102:2760–5.

Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Fiore PPD. Clathrin-Mediated Internalization Is Essential for Sustained EGFR Signaling but Dispensable for Degradation. *Dev Cell* 2008; 15:209–19.

Smokvarska M, Francis C, Platre MP, Fiche J-B, Alcon C, Dumont X, Nacry P, Bayle V, Nollmann M, Maurel C, et al. A Plasma Membrane Nanodomain Ensures Signal Specificity during Osmotic Signaling in Plants. *Curr Biol* 2020; 30:4654-4664.e4.

Wang X, Chory J. Brassinosteroids Regulate Dissociation of BKI1, a Negative Regulator of BRI1 Signaling, from the Plasma Membrane. *Science* 2006; 313:1118–22.

Wang L, Li H, Lv X, Chen T, Li R, Xue Y, Jiang J, Jin B, Baluška F, Šamaj J, et al. Spatiotemporal Dynamics of the BRI1 Receptor and its Regulation by Membrane Microdomains in Living Arabidopsis Cells. *Mol Plant* 2015; 8:1334–49.

Zhou J, Liu D, Wang P, Ma X, Lin W, Chen S, Mishev K, Lu D, Kumar R, Vanhoutte I, et al. Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc National Acad Sci* 2018; 115:E1906–15.

