



**HAL**  
open science

# Role et fonction des plateformes de signalisation membranaires contenant la Rho GTPase ROP6 lors de la signalisation cellulaire

Lucille Gorgues

► **To cite this version:**

Lucille Gorgues. Role et fonction des plateformes de signalisation membranaires contenant la Rho GTPase ROP6 lors de la signalisation cellulaire. Biologie cellulaire. Université de Montpellier, 2023. Français. NNT : 2023UMONG054 . tel-04829587

**HAL Id: tel-04829587**

**<https://theses.hal.science/tel-04829587v1>**

Submitted on 10 Dec 2024

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie, Intégrations, Diversité Adaptative des Plantes

École doctorale GAIA

Unité de recherche Institut des Sciences des Plantes de Montpellier (IPSiM)

## Rôle et fonction des plateformes de signalisation membranaires contenant la Rho GTPase ROP6 lors de la signalisation cellulaire

Présentée par Lucille GORGUES

Le 08 Novembre 2023

Sous la direction de Alexandre MARTINIERE

Devant le jury composé de

Yohann BOUTTE, Directeur de recherche CNRS, Bordeaux

Marie-Cécile CAILLAUD, Directrice de recherche CNRS, Lyon

Marie BOUDSOCQ, Chargée de recherche CNRS, Gif-sur-Yvette

Laurent LAPLAZE, Directeur de recherche IRD, Montpellier

Alexandre MARTINIERE, Directeur de recherche CNRS, Montpellier

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

## Résumé

La membrane cellulaire est composée d'une myriade de lipides et de protéines différentes. Elle est connue pour être à la fois hétérogène (juxtaposition de domaines) et dynamique (diffusion de ces constituants). En outre, la membrane plasmique est l'interface de la cellule permettant la perception et l'intégration des signaux biologiques. Les acteurs moléculaires membranaires peuvent être compartimentés pour répondre à différents signaux (Jaillais et Ott, 2020). C'est le cas des GTPases Rho of Plant (ROP) qui ont été décrites comme une famille d'acteurs clés dans la réponse à différents signaux : Auxine, ABA, réponse aux pathogènes, signalisation osmotique, symbiose (Basu et al., 2008 ; Lin et al., 2012 ; Poraty-Gavra et al., 2013 ; Choi et al., 2014 ; Lin et al., 2015 ; Engelsdorf et al., 2018 ; Feiguelman et al., 2018 ; Platre et al., 2019 ; Smokvarska et al., 2020). De manière intéressante, ce rôle pléiotrope existe également à l'échelle d'une seule isoforme de ROP. En effet, ROP6 a été décrite comme régulateur de la signalisation auxinique et osmotique (Platre et al., 2019 ; Smokvarska et al., 2020). Dans les racines, nous avons constaté que ROP6 forme des nanodomains lors ces deux signalisations. Lors de la signalisation osmotique, ROP6 forment des nanodomains en association avec RBOHD et F permettant l'accumulation d'espèce réactive de l'oxygène ou ROS. En revanche, en réponse à l'auxine, les nanodomains de ROP6 ne s'associent pas avec RBOH (Platre et al., 2019 ; Smokvarska et al., 2020). Une question émerge : comment l'organisation des nanodomains de ROP6 peut-elle induire une réponse spécifique en aval de différents signaux ? Nous avons donc cherché à déterminer comment les activateurs de ROP6 peuvent participer à encoder une réponse spécifique au niveau cellulaire. Par un crible génétique inverse, nous avons découvert que le facteur d'échange de guanine 14 (GEF14) est nécessaire et spécifique pour induire la signalisation osmotique dans les cellules végétales. Sur la base d'expériences génétiques et de senseurs d'activation des GTPases, nous montrons que GEF14 agit comme un activateur de ROP6 *in planta*. Par microscopie à super-résolution, nous avons montré que les nanodomains ROP6 induits par le signal osmotique, mais pas ceux induits par l'auxine, ont besoin de GEF14 pour se former. Enfin, nous montrons que GEF14 se restructure en cluster sous l'effet d'un signal osmotique. Nous avons étendu notre modèle à la signalisation immunitaire où nous avons identifié de la même manière un isoforme GEF agissant spécifiquement. Dans une seconde partie, j'ai cherché à déterminer comment GEF14 était activé par le signal osmotique. Par une approche de biochimie comparative, j'ai mis en évidence 5 sites de phosphorylations dans le domaine PRONE de GEF14. L'interactome de GEF14 nous a orienté sur des kinases candidates qui devront être confirmées par des approches de génétique inverse.

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'activation d'une isoforme GEF peut déterminer les premières étapes de la signalisation et agir sur le recrutement spécifique de protéines effectrices. Ce mécanisme permettant de maintenir et contrôler la signalisation cellulaire précoce chez les plantes.

## Abstract

The cell membrane is composed of a myriad of different lipids and proteins. It is known to be both heterogeneous (juxtaposition of domains) and dynamic (diffusion of these constituents). In addition, the plasma membrane is at the interface of the cell and control the perception and integration of biological signals. The molecular players can be compartmentalised to respond to different signals (Jaillais and Ott, 2020). This is the case for Rho of Plant (ROP) GTPases, which have been described as a family of key players in the response to different signals: Auxin, ABA, response to pathogen response, osmotic signalling and symbiosis (Basu et al., 2008; Lin et al, 2012 ; Poraty-Gavra et al., 2013 ; Choi et al., 2014 ; Lin et al., 2015 ; Engelsdorf et al., 2018; Feiguelman et al., 2018; Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2020). Interestingly, this pleiotropic role also exists at the level of a single ROP isoform. ROP6 has been described as a regulator of auxin and osmotic signalling (Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2020). In roots, we found that ROP6 forms nanodomains during these two signalling processes. During osmotic signalling, ROP6 forms nanodomains in association with RBOHDs and F allowing the accumulation of reactive oxygen species (ROS). However, in response to auxin, ROP6 nanodomains do not associate with RBOHDs (Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2020). Thus, a question is emerging: How can the organisation of ROP6 nanodomains induce a specific response downstream of the different signals? We therefore set out to determine how ROP6 activators can help encode a specific response at the cellular level. Using a reverse genetic screen, we found that guanine exchange factor 14 (GEF14) is necessary and specific for inducing osmotic signalling in plant cells. Based on genetic and GTPase activation sensor experiments, we show that GEF14 acts as an activator of ROP6 in planta. Using super-resolution microscopy, we showed that ROP6 nanodomains induced by the osmotic signal, but not those induced by auxin, require GEF14 to form. Finally, we show that GEF14 restructures into clusters after an osmotic signal. We extended our model to immune signalling where we similarly identified a specific GEF isoform. In a second part, I sought to determine how GEF14 was activated by the osmotic signal. Using a comparative biochemical approach, I identified 5 phosphorylation sites in the PRONE domain of GEF14. The GEF14 interactome led us to identify candidate kinases and phosphatases that need to be confirmed by reverse genetic approaches.

Our results suggest that the activation of a GEF isoform can determine the early stages of signalling and act on the specific recruitment of effector proteins. This mechanism makes it possible to maintain and control early cell signalling in plants.



## Remerciements

J'écris ces remerciements dans le train me menant vers la dernière conférence de ma thèse. C'est un moment parfait pour faire une rétrospective des 3 superbes années que la thèse a pu m'apporter. C'est donc avec nostalgie et émotions que je tiens à remercier les personnes ayant contribué directement et indirectement à la réalisation de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury : Yohann Boutté, Marie-Cécile Caillaud, Marie Boudsocq, Laurent Laplaze, d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse : Thomas Kroj, Antoine Martin, Véronique Santoni, Yvon Jaillais, de m'avoir conseillé et d'avoir suivi mon travail.

Merci à la plateforme MSPP pour la réalisation de la partie protéomique de ma thèse. Merci également à Carine Alcon de m'avoir formé et conseillé sur les différents microscopes du laboratoire, et merci à Jean-Bernard Fiche de m'avoir permis de réaliser le TIRF et le sptPALM. Je te remercie pour ton extrême gentillesse et pour ta pédagogie. Merci également à Laurence Marquès et à Bruno Touraine qui m'ont permis d'enseigner.

Il est particulièrement important pour moi de remercier les membres de l'équipe AQUA dans laquelle j'ai réalisé cette thèse, et naturellement je tiens à dire un immense merci à Alexandre Martinière, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir encadré et transmis avec attention et avec pédagogie ta passion pour la biologie cellulaire et la microscopie. Cela a été un réel plaisir de travailler avec toi, étant toujours aussi enthousiaste et positif. J'ai énormément apprécié les moments de réflexion (dans ton bureau, couloir, balcon, un peu partout ahaha) sur notre modèle d'étude où tu encourages toujours la créativité et l'esprit d'initiative. Merci également de m'avoir donné l'opportunité d'aller à plusieurs conférences toutes aussi géniales les unes que les autres. Au-delà de la science, merci pour les moments partagés, comme à la Gordon Conférence. Promis, je ne te ferai plus prendre un télésiège (ahah). Merci à Christophe Maurel de m'avoir accueilli au sein de son équipe, merci pour tes remarques pour challenger notre modèle d'étude, nous permettant toujours d'aller plus loin. Merci également de m'avoir impliqué dans la vie du laboratoire via l'organisation de la retraite et les conseils d'unité. Merci à Enric Zelazny pour tes conseils et de m'avoir initié à la biochimie. Je remercie aussi Lionel Verdoucq, Yann Boursiac, Philippe Nacry pour leurs conseils et leurs questions toujours pleines d'esprit. Merci à Véronique pour son expertise en protéomique. Merci également à Amandine de veiller au bon fonctionnement du laboratoire et de nous traquer lorsque l'on met le bazar (hihi). Je tiens par ailleurs à remercier Colette, Xavier, Jeonghwa, Xuelian, Laura, pour leurs gentillesse. Merci à Caroline pour ses encouragements pendant la rédaction. Merci également à mes colocataires de bureau : Yunji pour ses leçons de chinois ; Omar mon autre colocataire pour nos rigolades, et pour nos aventures touristiques en congrès. Merci aux anciens collègues Jessica, Hela, Louais, et particulièrement merci à Marija pour avoir son travail précédent et également pour les moments partagés. Je souhaite aussi remercier mon binôme du labo, Arthur, qui est finalement devenu un réel ami même s'il est biterrois (ahaha). Merci pour ton aide précieuse et ton soutien, pour toutes les rigolades pendant les pauses, pour cette magnifique miniprep qui restera dans les annales, pour les Ricards, les soirées coinche et les parties de pêche où l'on a ramené plus de bières vides que de poissons (ahaha). Tout simplement merci pour le fun.

Puis vient le temps de remercier mes autres collègues :

Merci à Virginia, mon homologue. Je suis tellement heureuse d'avoir partagé notre bureau pendant un temps. Merci d'écouter toujours avec attention mes aventures, pour les moments au labo, pour les aventures en dehors, pour les apéros, ou encore pour le festival dans le coin le plus froid du Portugal ahaha. Merci pour ton soutien sans faille pendant la rédaction et merci de m'avoir initié à la grimpe (on va s'y remettre à fond DAI MILITARI ahaha). Merci à l'autre représentant italien, Mattia, le fidèle supporter de l'Inter, d'avoir toujours la main sur le cœur, pour ton aide pour la biochimie et également pour toutes les aventures à l'extérieur partagées (Barcelone, le ski, les weekends d'anniversaire). Merci de nous faire rire ! Merci à Stasis, le Grec du groupe. Merci pour tes blagues au 4ème degré, toujours partant pour aller à la plage avec la mafia grecque. Merci tout particulièrement aux membres des teams Systems/Honude pour les moments de convivialité partagés le midi et les apéros également. Merci à Benoit pour ces conseils avisés sur la recherche et les moments de convivialité. Merci à Chanchan pour toutes nos discussions pendant ton tour du labo ! Merci à Sandrine pour sa bonne humeur et son énergie égayant les midis. Merci à Gabriel pour son humour aiguisé, les moments de convivialité. Merci à Anna pour son énergie, j'étais heureuse de partager l'organisation de la retraite avec toi. Merci à Laura pour son accent chantant et sa constante bonne humeur, ainsi qu'à Amélie, notre gardoise préférée (même si personne n'est parfait), pour sa gentillesse et son enthousiasme pour la recherche de champignons. Un grand merci à Thibaut, le roi du cocktail, pour son soutien sans faille, et d'avoir apporté la générosité et l'esprit convivial du sud-ouest ici. Merci pour tous les apéros mémorables qu'on essaie de se remémorer et pour tes aventures avec les clés (ahah). Jordan, merci pour ta bienveillance et tes blagues. JB, merci de nous raconter tes aventures, notamment de randonnées nocturnes (ahah).

Je tiens également à remercier Lien et Loren pour tous les moments partagés au laboratoire et en dehors. C'était un réel plaisir. Merci à Alexis De Angeli pour nos discussions toujours agréables. Un grand merci à tous les non permanents que j'ai eu le plaisir de côtoyer et avec qui j'ai partagé d'excellents moments : Alex, Roxanne, Hortense pour ses conseils et sa gentillesse, Alexis, Thibault, Tamara. Tim avec qui on se suit depuis plusieurs années. Merci pour toutes ces aventures et moments partagés, et bientôt nous naviguerons ensemble ! Morgan, l'auvergnat supporter de l'ASM, merci pour tous les délires, pour la complicité et pour les fêtes. Léo, ou monsieur "pas-tant", merci pour tous les délires sans fin au *Copains d'Albert*, pour la cuisine et le goût de la fête !

Je tiens également à remercier mes amis « d'ici » qui m'ont soutenu tout au long de ma thèse. Ces quelques mots sont bien trop limités pour exprimer ma gratitude, notamment envers Noémie (ma none, ma partenaire de crime préférée). Merci d'avoir toujours été là, d'écouter mes histoires, de jouer à « tu préfères », et merci simplement d'être toi. Merci à Carmen et à Lulu, pour nos soirées et de nous faire vivre tant de moments de bonheur, comme aux cargolades et ailleurs. Merci à Baptou, notre animateur préféré, ainsi qu'à Xavier (Fernando) le plus fou de tous ; à Grégoire (Gandalf l'aigri) pour son amitié et son soutien ; à Marceau, pour ces années délirantes ; ou encore à Pierro pour sa gentillesse. Merci à Christophe et à PM d'être toujours là malgré la distance.

Un énorme merci à Louis pour le soutien que tu m'as apporté pendant ma thèse, pour ta gentillesse, ta patience, tes encouragements pendant ma rédaction. Merci également d'être la personne la plus lente que nous connaissions tous (ahah), et merci de me faire tant rire !

Un merci spécial à ma deuxième famille d'Auch, avec qui j'ai vécu des moments incroyables à l'IUT et qui m'ont soutenu pendant la thèse. Merci aux parrains/marraines : à Jean, avec qui j'ai fait toutes mes études, pour les rires, ton soutien, les pipas et les nuits blanches. À Julie, merci de m'avoir inclus dans Initiative, de nous divertir à chaque Mont de Marsan en ravivant des souvenirs du passé, et pour les "allez laaa !". Merci à Patoche ou Mamene pour ses performances de chanteur et athlétiques en féria, et pour ses « anecdotes ». À Vincent, le dernier couché et le plus motivé de tous, merci pour la meilleure rue de Vic. À Camille, merci de nous faire vivre d'excellents moments à Mont de Marsan, merci pour Guernica. À Quentin, pour ton sens de la danse et toutes les parties de coinche mémorables. À Guewen, merci d'être là quand tu es là, d'avoir été un parrain/bizu au top ! Un merci particulier aux génies : Lise, merci pour toutes les soirées, pour tes jeux de mots, ton soutien et notre meilleur été. Anne Cé pour ton soutien sans faille, pour les rires, pour défendre tes convictions comme tu le fais. Maelys, merci pour tes débats et tes questions existentielles, pour les histoires les plus improbables et aussi pour ton soutien. Thomas "ennemiiiiis", merci pour tous nos délires inexplicables et pour le meilleur TP de microbiologie. Pauline, merci d'être une interlocutrice si débattante sur tes convictions et pour toutes les rigolades. Manu, merci pour tes moments de malice en soirée.

Je remercie Gérard mon entraîneur d'Aïkido durant 14 ans m'ayant appris la persévérance, ce qui est utile pour la thèse (ahah).

Un merci tout particulier à Yohan pour avoir partagé tant de moments de vie durant ma thèse, pour m'avoir rassuré, sa compréhension, ses attentions pendant ma thèse, et pour être toujours là quand il le faut. Merci d'être toi.

Enfin, un grand merci à mes parents, mes grands-parents et mon frère pour leurs amours, leurs soutiens et leurs encouragements inconditionnels.

**Citation :**

*En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.*

*Les shadoks de Jacques Rouxel*

## Liste des abréviations

ABA - Acide abscissique

ABI1 - ABA-INSENSITIVE 1

AGP - Arabinogalactan Protein

AMT1;3 - Ammonium Transporter 1

AOX - Ascorbate oxydase

ARF - ADP-Ribosylation Factor

ARO - Armadillo repeat1

ASGs - Acyl steryl glycosides

BAK1 - Brassinosteroid Insensitive 1-Associated Kinase 1

BPDS - Bathophénanthrolineisulfonique

BR - Brassinostéroïde

BRI1 - Brassinosteroid Insensitive 1

BRI2 - Brassinosteroid Insensitive 2

CA - Constitutivement actif

CBL - Calcineurin B-Like Protein

cdc42 - Cell Division Control Protein 42 Homolog

CERK - Chitin Elicitor Receptor Kinase

CIPK - CBL-Interacting Protein Kinase

CPK - Calcium-Dependent Protein Kinase

CRK - Cytosine riche receptor kinase

DHE - Dihydroethidium

DHR2 - Domain dock homology region 2

DN - dominant negative

EGF - Epidermal Growth Factor

FAD - Flavin Adenine Dinucleotide

FER - FERONIA

flg22 - flagelline 22

FLOT - Flotillin

FLS2 - Flagellin-Sensitive 2

GAP - GTPase Activating Protein

GDI - Guanosine nucleotide dissociation inhibitors

GDP - Guanosine Diphosphate

GEF - Guanine nucleotide exchange factor

GIPC - Glycosyl inositol phosphorylceramide

GL2 - GLABRA2

GPI - Glycosylphosphatidylinositol

GTP - Guanosine Triphosphate

HVR - Hyper variable region

LFQ - Label free quantification

LPT1 - Lipid transfer protein 1

MAMP - Microbe-Associated Molecular Pattern

MAPK - Mitogen activated protein kinase

MAP - Microtubule-associated protein

NADPH - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

OST1 - Open Stomata 1

PA - Acide phosphatidique

PAMPs - Pattern associated molecular patterns

PC - Phosphatylcholine

PE - Phosphatidyléthanolamine

PG - Phosphatidylglycérol

PH - Plekstrin homology

PI3K - Phosphatidylinositol 3 kinase

PIP2;1 - Plasma membrane intrinsèque protéine

PI - Phosphatidylinositol

PP2C - Protein Phosphatase 2C

PRK2 - Protein receptor like Kinase

PS - Phosphatidylsérine

PTI - Pathogène trigger immunity

RAB - Ras-related Proteins in Brain

RAC - Ras-related C3 botulinum toxin substrate

RAN - Ras-related nuclear proteins

RAS - Rat Sarcoma

RBOH - Respiratory Burst Oxidase Homolog

RHID - Root Hair Initiation Domaine

RIC - Rop-Interactive CRIB Motif-Containing Protein

RLK - Receptor like kinase

ROP - Rho of Plant

ROS - Reactive oxygene species

Ses - Steryl esters

SGs - Steryl glycosides

SHS1 - Sodium hypersensitive proteine

SNRK - Related protein kinase

sptPALM - Single particule tracking photo activated localization microscopy

TGN - Trans golgi network

TIRF - Total internal reflection fluorescence microscopy

TMK - Transmembrane kinase

TOR - Target Of Rapamycin

# Table des matières

<b>1) Introduction générale</b> .....	1
<b>1) Contexte</b> .....	1
<b>2) La membrane plasmique, un patchwork dynamique</b> .....	1
2.1) Structure hétérogène de la membrane plasmique.....	1
2.2) Dynamique de la membrane plasmique.....	5
2.3) Nano-organisation de la membrane, un haut lieu de signalisation ? .....	9
<b>3) Les petites GTPases membranaires, des protéines clés de la signalisation cellulaire</b> .....	12
3.1) Mécanismes de régulation des petites GTPases .....	12
3.2) Les Rho of Plant (ROP) .....	15
3.3) Les ROP et leurs organisations en domaines membranaires .....	16
3.4) Une analogie entre les nanodomains des Rho de plantes et les RAS animales .....	25
<b>4) Signalisation précoce et longue distance en réponse au signal osmotique</b> .....	26
<b>5) ROPGEF</b> .....	48
5.1) Structure .....	48
5.2) ROPGEF et signalisation .....	49
<b>6) Objectifs</b> .....	51
<b>2) Chapitre I : GEF14 un acteur clé de la signalisation osmotique</b> .....	53
<b>Partie 1 : GEF14 is a specific activator of the plant osmotic signaling pathway by controlling ROP6 nanodomain formation</b> .....	53
<b>Partie 2 : Rôle des GEF dans les signalisations ROP6-dependante, impact sur l'organisation de RBOHD et importance de l'identité cellulaire</b> .....	75
1) Est-ce que GEF14 contrôle également la clusterisation de RBOHD lors de la signalisation osmotique ? .....	75
2) Est-ce que les cellules atrichoblastiques réagissent au signal osmotique ? .....	81
3) Est-ce que d'autres GEF pourraient être impliquées dans l'accumulation de ROS induit par le peptide flg22 ? .....	85
<b>Discussion</b> .....	89
<b>3) Chapitre II : Mécanisme d'activation de la protéine GEF14 lors du signal osmotique</b> .....	91
<b>1) Introduction</b> .....	91
1.1) Phosphorylation des GEF.....	91
1.2) Objectifs.....	93
<b>2) Résultats</b> .....	94
<b>3) Discussion</b> .....	102
<b>4) Discussion générale</b> .....	107
<b>5) Matériel et Méthodes</b> .....	117
<b>6) Références</b> .....	127

# 1) Introduction générale

## 1) Contexte

Les plantes sont des organismes sessiles qui sont soumises aux contraintes de leur environnement. Elles doivent donc constamment développer diverses stratégies afin de réaliser leurs cycles de vie. Cette fascinante plasticité développementale et physiologique est régie d'une part par la perception des divers signaux environnementaux et d'autre part leurs intégrations dans la plante, permettant ainsi des réponses appropriées. Une des questions cruciales en biologie est de comprendre comment les organismes intègrent ces différentes informations du milieu, qui sont parfois antagonistes. Alors que de nombreuses études montrent que l'intégration des signaux s'effectue à l'échelle génomique, il existe aussi de nombreux acteurs qui jouent ce rôle de manière non-transcriptionnel (Smith, 1990). La signalisation membranaire en est un bon exemple. Cette dernière constitue l'objet d'étude de mon travail de thèse.

## 2) La membrane plasmique, un patchwork dynamique

### **2.1) Structure hétérogène de la membrane plasmique**

La membrane plasmique des eucaryotes est composée de différents lipides qui par leurs propriétés amphipathiques s'organisent sous une forme d'une bicouche lipidique. Celle-ci est formée de deux feuillets : le feuillet interne et le feuillet externe. Le centre de la bicouche lipidique concentre les chaînes hydrocarbonées hydrophobes, alors que les extrémités des feuillets sont constituées par leurs têtes polaires hydrophiles. Ces deux feuillets séparent le cytosol de la matrice extracellulaire. Les membranes sont composées de 3 grands groupes de lipides : les glycérolipides, les sphingolipides, et les stérols qui représentent une multitude d'espèces moléculaires (Lemmon, 2008; Shevchenko and Simons, 2010; Cacas et al., 2016; Platre and Jaillais, 2017) (Figure 1). À titre d'exemple, la membrane plasmique de culture cellulaire d'*Arabidopsis* est constituée de près de 400 espèces lipidiques différents (Bahammou et al., 2023).





### *Les Glycérolipides*

Les glycérolipides sont composés d'un squelette de glycérol estérifié par des acides gras (Figure 1). Ils représentent les lipides majoritaires des membranes plasmiques. Les phospholipides se distinguent par des variations de longueur et de saturation de leurs chaînes carbonées mais aussi par la nature des modifications de leur tête polaire. Les deux phospholipides neutres, la phosphatylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) composent jusqu'à 80% des lipides totaux de la membrane, vient ensuite le phosphatidylglycérol (PG), ainsi que les phospholipides chargés négativement : la phosphatidylsérine (PS), l'acide phosphatidique (PA) et les phosphatidylinositol (PI). Les phosphatidylinositols (PI) peuvent être mono, bi ou tri phosphorylés en 3 positions aboutissant à 5 différentes espèces de PIP. Contrairement aux autres lipides, les lipides anioniques sont présents en très faible proportion dans la membrane. Par exemple, les PIP représentent seulement 1% des lipides anioniques, et ils jouent cependant un rôle majeur dans les processus de signalisation cellulaire (Jouhet et al., 2007; Platre and Jaillais, 2017).

### *Les sphingolipides*

200 types de sphingolipides ont été répertoriés (Cacas et al., 2013). Ils sont formés d'une tête polaire et d'un groupement céramide. Ce groupement céramide se compose d'une longue chaîne amidée ainsi que d'un acide gras à longue chaîne (LCFA) ou à très longue chaîne, c'est à dire avec plus de 22 atomes de carbone (VLCFA) (Sperling and Heinz, 2003; Cacas et al., 2013). La variation des sphingolipides réside dans les différentes longueurs de chaîne, leurs hydroxylations et leurs désaturations. Les glycosyl inositol phosphorylceramide (GIPC) est la classe la plus représentée et est spécifique des plantes. Les GIPC possèdent une tête polaire comportant un groupe phosphoinositol, qui dans certains cas peut être substitué par d'autre groupement sucre (Mamode Cassim et al., 2021). Il existe une grande variété de GIPC qui sont classées en fonction des variations de leur groupe polaire mais aussi de leurs degrés de glycosylation (Cacas et al., 2012). La structure des têtes polaires des GIPC reste encore peu connue (Figure 1). Les GIPC occupent un rôle clef dans la structuration de la membrane. Ils sont aussi importants dans la signalisation cellulaire (Pontier and Schweisguth, 2012; Buré et al., 2014; Cacas et al., 2016; Gronnier et al., 2016). Effectivement, le mutant *moca1*, gène qui

code pour une enzyme clef de la biosynthèse des GIPC, est incapable de répondre correctement en réponse à un stress salin (Jiang et al., 2019).

### *Les stérols*

Chez les plantes, les stérols font parties des 3 grands groupes de lipides composant la membrane plasmique. Contrairement aux animaux et aux levures qui synthétisent seulement une espèce de stérol respectivement le cholestérol et l'ergostérol, les plantes en synthétisent différentes formes (Mongrand et al., 2004). Les principaux stérols composant la membrane plasmique des plantes sont le sitostérol, le stigmastérol et le campestérol (Watson and Preedy, 2003; Furt et al., 2011) (Figure 1). La structure générale des stérols est composée d'un noyau stérane comportant une fonction alcool. Les stérols existent sous forme conjuguée comme libre. Parmi les stérols conjugués on retrouve les steryl esters (SEs), les steryl glycosides (SGs) et les acyl steryl glycosides (ASGs) (Ferrer et al., 2017). Les stérols influencent la viscosité membranaire, mais aussi les échanges de membrane entre les compartiments cellulaires (Boutté and Grebe, 2009).

### *Les protéines de la membrane plasmique*

Les membranes ne sont pas seulement composées de lipides, mais aussi de protéines. En effet les protéines associées aux membranes représenteraient environ 25% du protéome d'Arabidopsis (Schwacke et al., 2003). En fonction de leurs associations à la membrane on distingue deux classes de protéines membranaires : les protéines intrinsèques et les protéines périphériques.

Les protéines intrinsèques sont des protéines intégrées dans la membrane. Ces protéines possèdent des domaines hydrophobes et des boucles hydrophiles débouchant sur le milieu extracellulaire et/ou le cytosol. Le ou les domaines hydrophobes peuvent s'organiser en hélices  $\alpha$  hydrophobes transmembranaires ou en tonneau  $\beta$  transmembranaire. Elles représentent environ 51% des protéines membranaire chez Arabidopsis (Marmagne et al., 2004). Les protéines périphériques ne sont pas quant à elles intégrées dans la membrane. Elles peuvent être liées à la membrane de plusieurs manières : (i) une liaison covalente avec un lipide, (ii) des interactions électrostatiques avec les lipides chargés de la membrane, (iii) ou

des interactions avec une/des protéines elle-même en association avec la membrane. Les modifications lipidiques peuvent être de 4 grands types : la prénylation, la myristoylation, l'acylation et en s'associant à des ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Silvius and l'Heureux, 2002). Les protéines membranaires vont assurer une communication entre le milieu intra et extracellulaire, mais elles ont également un rôle structurant de la membrane.

Depuis que la bicouche lipidique a été décrite par Gorter et Grendel en 1925 pour la première fois, la vision de sa structure et de sa dynamique n'a cessé d'évoluer. Tout d'abord vue comme une structure figée permettant seulement la séparation entre le milieu intra et extra cellulaire, elle est désormais vue comme une structure dynamique en constant remodelage. Cet aspect dynamique est essentiel dans les processus de signalisation cellulaire. Ce phénomène est particulièrement vrai pour la membrane plasmique.

## 2.2) Dynamique de la membrane plasmique

### *Une hétérogénéité et des échanges entre les deux feuillets de la membrane*

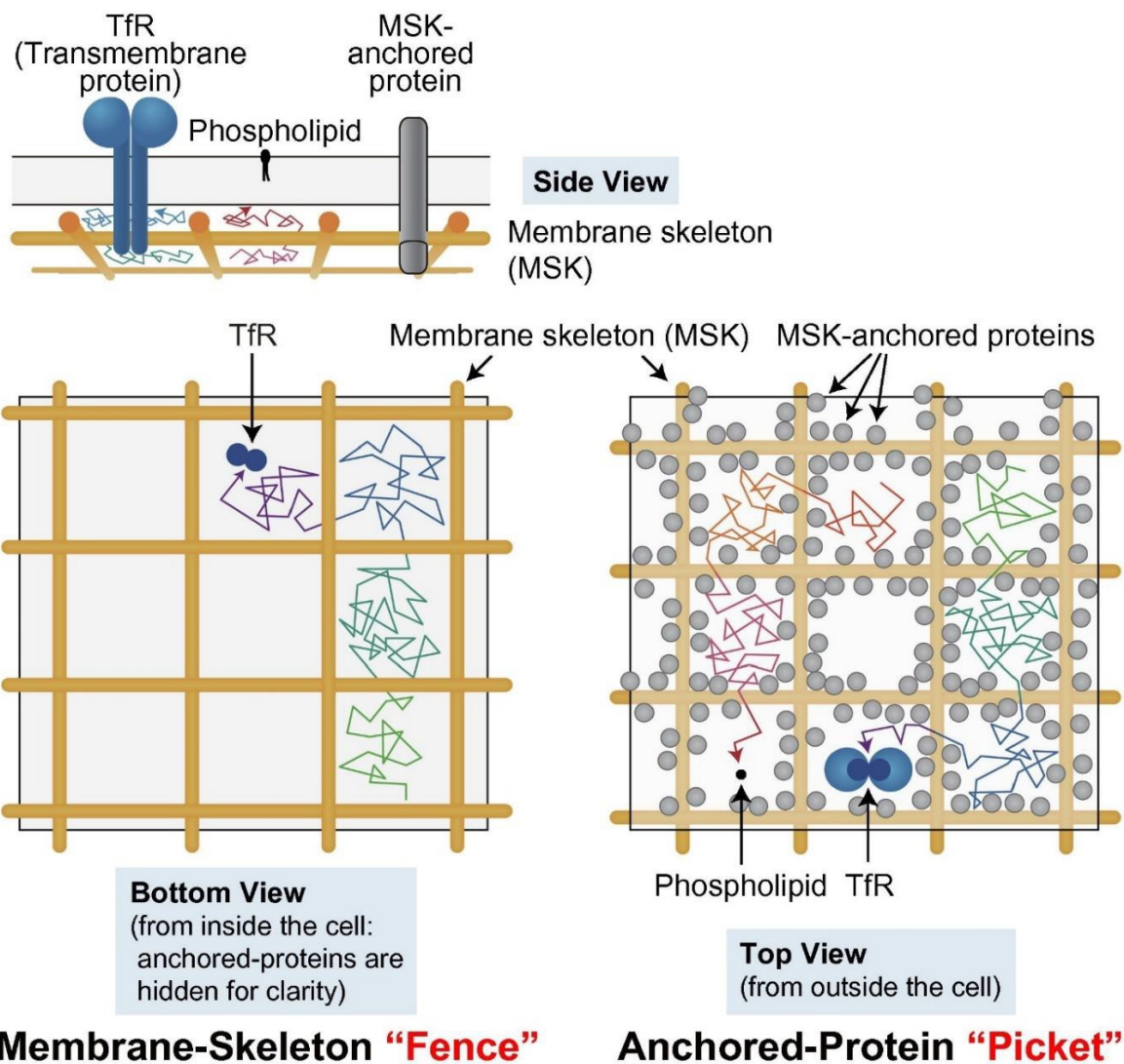
Les différents composants de la membrane plasmique, lipidique ou protéique, sont disposés de manière asymétrique entre les deux feuilles. Certains lipides étant que sur la face externe comme les GIPC, d'autres uniquement sur la face interne comme les PS. Cette asymétrie crée des propriétés émergentes. Par exemple, la courbure de la membrane est une des résultantes les plus illustrées dans l'asymétrie lipidique. Le feuillet interne a une courbure négative du fait de son enrichissement en PS et PE (Ikeda et al., 2006; Zimmerberg and Kozlov, 2006; Daleke, 2007; Nicolson).

La distribution asymétrique des lipides membranaires et leur mouvement au sein des membranes sont conditionnées par leurs propriétés physico-chimiques. Ces mouvements appelés « flip-flop » de lipides sont assurés et maintenus par des acteurs enzymatiques pouvant être bidirectionnel ATP indépendant (scramblases), des transporteurs ATP dépendant (flippases), ou encore ATP indépendant (floppases) (Pomorski et al., 2001; Daleke, 2007; Tjellström et al., 2010).

Les protéines sont elles aussi réparties de manière asymétrique dans la membrane. Par exemple, les protéines qui subissent des modifications lipidiques telles que les myristilations, les acylations et les prénylations sont présentes uniquement sur le feuillet interne des cellules. *A contrario*, les protéines à ancres GPI sont associées uniquement aux feuillets externes (Sharom and Lehto, 2002; Lorent et al., 2020). Contrairement aux lipides, les protéines ne changent pas de feuillets membranaires.

#### *Les interactions entre les constituants de la membrane*

L'interaction entre les différents éléments de la membrane participe à sa structuration. Par exemple, les phospholipides peuvent interagir entre eux, en fonction du degré de saturations de leurs chaînes carbonnées (Bagatolli and Gratton, 2000). Des études *in vitro* montrent que les chaînes saturées des phospholipides ont tendance à s'associer entre elles, alors que les chaînes insaturées se repoussent entre elles (Engberg et al., 2016). Outre les phospholipides, les stérols ont été montrés pour interagir avec les chaînes saturées par des liaisons hydrogènes (Ferrer et al., 2017; Garcia-Molina et al., 2020). Les stérols, mais aussi les sphingolipides, peuvent interagir par des liaisons intra et intermoléculaires agissant sur la diffusion latérale des composants de la membrane (Talbot et al., 2000; Ramstedt and Slotte, 2002). Ainsi, la dynamique latérale de la membrane est en partie conditionnée par des interactions lipides/lipides à travers des liaisons hydrogènes, hydrophobiques, et les forces de van der Waals (van Meer et al., 2008; Simons and Sampaio, 2011; Nicolson). De plus, la présence des protéines dans les membranes biologiques agissent également sur la dynamique des lipides, potentiellement en changeant leurs interactions (Grosjean et al., 2018).



**Figure 2 : Le modèle de membrane-skeleton (MSK) et le modèle de « picket and fence » à protéines ancrées**

La membrane plasmique peut être subdivisée en compartiments distincts. Parmi ces compartiments, les protéines transmembranaires et les lipides subissent une diffusion restreinte à court terme au sein de chaque compartiment, tandis qu'ils peuvent également effectuer des sauts à long terme entre ces compartiments. Cette restriction à court terme est principalement due à deux mécanismes, à savoir les "fence" "clôtures" ou de la Matrice membrane-skeleton (MSK) et aux "clôtures" de la membrane. D'autre part, les protéines ancrées à la MSK, qui comprennent diverses protéines transmembranaires liées temporairement à la MSK, sont immobiles et jouent un rôle similaire à des "piquets". Pour donner une représentation visuelle, imaginez une protéine transmembranaire dans le feuillet externe de la membrane, ainsi qu'un phospholipide et une protéine ancrée à la MSK. Les deux premiers éléments sont mobiles, tandis que les protéines ancrées à la MSK, qui agissent comme des "piquets", sont stationnaires.

En examinant la surface cytoplasmique de la membrane depuis l'intérieur de la cellule, vous pouvez observer le modèle de "clôture" de la MSK. Il s'agit d'un réseau de mailles d'actine qui confine temporairement les protéines transmembranaires en raison de la collision de leurs domaines cytoplasmiques avec la MSK. Un autre modèle, celui des "piquets", montre comment les protéines transmembranaires sont ancrées à la MSK à base d'actine et fonctionnent comme des rangées de "piquets" le long des "clôtures" de la MSK, empêchant ainsi la libre diffusion des protéines transmembranaires et des lipides (Kusumi et al., 2010).

*Le cytosquelette et la paroi végétale agissent sur l'organisation et la dynamique des constituants de la membrane plasmique.*

Chez les végétaux la membrane plasmique forme un continuum entre la paroi (côté extracellulaire) et le cytosquelette (côté intracellulaire). Le cytosquelette des plantes est un réseau composé de deux types de fibres protéiques : le réseau d'actine et celui des microtubules. Une partie de ce cytosquelette d'actine et de microtubule est en association étroite avec la membrane. Ce cytosquelette membranaire est à l'origine d'un nouveau modèle des membranes biologiques, proposé par le groupe de Kusumi et appelé « picket and fence » (Figure 2). Dans ce modèle, les protéines « pikets » qui associent le cytosquelette à la membrane, mais aussi le cytosquelette lui-même « fences » agirait sur la diffusion des constituants de la membrane qu'il soit de nature lipidique ou protéique (Kusumi et al., 2012; Martinière et al., 2012). Ainsi, la diffusion latérale des constituants de la membrane est contrainte par le cytosquelette soit de part une interaction directe avec celui-ci ou par le seul effet d'encombrement stérique. Chez les plantes certaines protéines de la membrane plasmique ont une diffusion latérale qui est dépendant du cytosquelette (McKenna et al., 2019). De manière intéressante, le cytosquelette est une structure très dynamique. Par exemple, l'organisation des microtubules change lors des processus d'élongation des cellules. Ainsi, les processus de croissance qui agissent sur la dynamique du cytosquelette pourrait entraîner des conséquences sur l'organisation des protéines de la membrane plasmique.

La paroi qui représente la matrice extracellulaire des plantes, est composée de microfibrilles de cellulose enrobée d'une matrice hydratée de polysaccharides (hemicellulose et pectine) ainsi que des protéines structurantes. La membrane et la paroi sont intimement liées du fait de la pression de turgescence présent dans les cellules végétales. La paroi forme donc avec la membrane un continuum. La paroi a été décrite comme altérant la diffusion latérale des protéines de la membrane (Martinière et al., 2012; Ott, 2017). En effet, de nombreux protéines et lipides sont connus pour interagir avec les constituants de la paroi. Par exemple, le complexe de cellulose synthase qui est associé dans la membrane plasmique synthétise les microfibrilles de cellulose directement dans l'apoplaste. De même, les protéines AGP (Arabinogalactan Protein) qui sont associées à la membrane par une ancre GPI interagissent avec la paroi.

Les GIPC peuvent interagir grâce à leurs charges avec le rhamnogalacturonan II (pectines) (Voxeur and Fry, 2014). En plus de ces interactions directes, la paroi agit également sur la diffusion de protéine par encombrement stérique, de manière similaire à ce qui a été décrit pour le cytosquelette (Martinière et al., 2011; Martinière et al., 2012). Ainsi, chez les plantes, le modèle « pikets and fences », pourrait être élargi aux interactions avec la matrice extracellulaire (Martinière et al., 2012; Jaillais and Ott, 2020). La paroi, la membrane et le cytosquelette formeront ainsi un continuum et certains acteurs protéiques forment un pont moléculaire liant directement la paroi au cytosquelette à travers la membrane (Martinière et al., 2011). Un tel mécanisme pourrait participer aux processus de signalisation lors de la symbiose bactérienne ou lors des réponses aux pathogènes par exemple.

Ainsi pour résumer, l'organisation des protéines au sein des membranes est donc conditionnée par des interactions protéine-protéine, lipide-lipide et lipide-protéine, mais en plus par l'action du cytosquelette et par l'impact de la matrice extracellulaire (paroi). Alors que l'on comprend de mieux en mieux la manière dont les domaines protéiques sont formés, l'implication fonctionnelle d'une telle organisation reste mal comprise.

### **2.3) Nano-organisation de la membrane, un haut lieu de signalisation ?**

Comme expliqué précédemment notre conception de la membrane n'a cessé d'évoluer. Il est désormais clair que les composants de la membrane sont répartis de manière inhomogène, aboutissant à la formation de domaines membranaires. Il s'agit donc d'un regroupement de composants (protéiques/lipidiques) localisé au sein de la membrane. Actuellement ces domaines peuvent être catégorisés selon leur taille : les microdomaines supérieur à 1 $\mu$ m (domaine polaire, Casparian strip domaine, ou plasmodesmes) et les nanodomaines en dessous du 1 $\mu$ m (Ott, 2017; Jaillais and Ott, 2020; Martinière and Zelazny, 2021).

Les domaines polaires correspondent à des accumulations protéiques ou lipidiques en réponse à un processus de polarisation de la cellule (Elliott and Kirchhelle, 2020; Gorelova et al., 2021). Ces domaines polaires sont impliqués dans des processus de polarisation cellulaire tels que la mise en place du tube pollinique, l'initiation des poils racinaires ou par exemple la distribution apico-basale du transporteur d'efflux d'auxine PIN2. Notons tout de même que les domaines polaires peuvent être eux même constitués par un regroupement de nanodomaines.

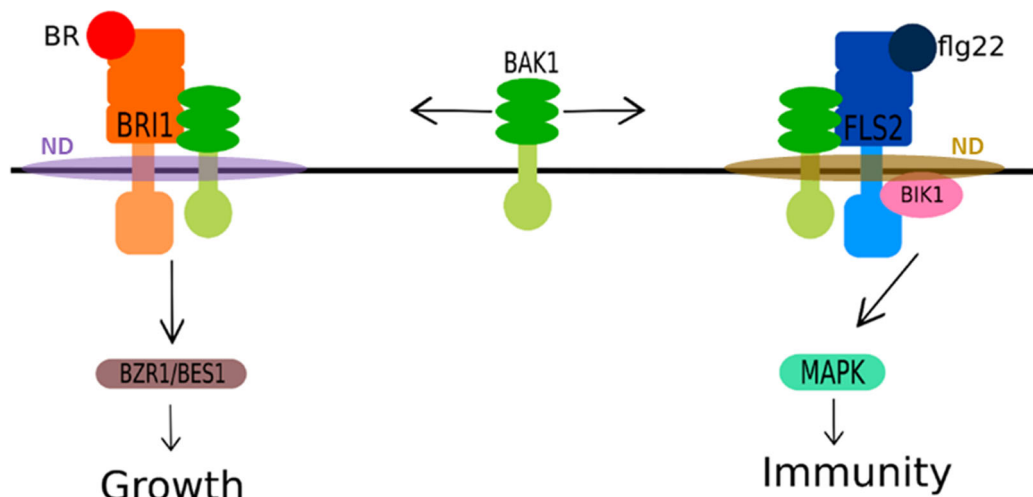


C'est en particulier le cas de la formation du domaine d'initiation des poils racinaires ou Root Hair Initiation Domaine (RHID) (Figure 3). La croissance polarisée du poil absorbant nécessite le recrutement ciblé de protéines. Un des déterminants cellulaires initiant cette polarisation, est une petite GTPase : Rho of Plant 2 (ROP2) qui s'organiserait en nanodomains dans une zone de la cellule le RHID (Fuchs et al., 2021). Cette super structure permet ensuite le recrutement polarisé des effecteurs en aval aboutissant au développement du poil racinaire (Denninger et al., 2019). Un autre exemple de domaine polaire formé par un ensemble de nanodomains, c'est le cas du transporteur d'efflux d'auxine PIN2 qui se répartie dans des structures nanométriques uniquement dans les membranes apicales/basales des cellules épidermiques et corticales de la racine (Feraru et al., 2011; Kleine-Vehn et al., 2011).

Les nanodomains ne sont pas uniquement impliqués dans des fonctions développementales. En effet certains transporteurs et canaux ont été rapportés comme formant des nanodomains. Par exemple, AMT1;3 (Ammonium Transporter 1) forme des nanodomains avant d'être internalisé dans le cytoplasme. Cette dynamique dépend du statut azoté de la cellule et pourrait participer à la régulation de l'absorption de l'ammonium (Wang et al., 2013). Les canaux à eau ont également été rapportés comme formant des nanodomains dans la membrane. C'est le cas par exemple de PIP2;1 (plasma membrane intrinsèque protéine). Néanmoins, le rôle fonctionnel des nanodomains de PIP2;1 reste peu claire pour le moment (Li et al., 2011; Martinière et al., 2012).

L'étude des récepteurs kinases membranaires illustre parfaitement la diversité de signaux étant intégrée via des nanodomains. C'est le cas du récepteur immunitaire FLS2 (Flagellin-Sensitive 2) et du récepteur à brassinostéroïdes BRI1 (Brassinosteroid Insensitive 1). Lors de l'activation de leurs signalisations par flg22 (flagelline 22) et les BR (Brassinostéroïdes) respectivement, ces récepteurs interagissent avec un corécepteur commun BAK1 (Brassinosteroid Insensitive 1- Associated Kinase 1) (Figure 3). BAK1 est un régulateur positif dans les deux voies (Chinchilla et al., 2009; Schwessinger et al., 2011). Une question reste cependant entière : comment des réponses spécifiques peuvent être induites en utilisant des acteurs communs en aval ? Or, la distribution spatiale au niveau de la membrane de ces deux récepteurs est la clef pour induire des réponses spécifiques. En effet ils forment des nanodomains distincts en fonction du lien avec le ligand (flg22 et BR) (Bücherl et al., 2017). Les récepteurs recruteront alors BAK1 pour

induire la signalisation en aval (Robatzek et al., 2006; Sun et al., 2013; Koller and Bent, 2014). Ainsi, la composition des nanodomaines serait donc un élément crucial dans la spécificité de la réponse flg22 et BR (Figure 3).



**Figure 3 : Modèle du crosstalk des signalisations Brassinostéroïdes et Flagelline 22**

BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1) est un corécepteur commun entre la voie de la croissance induite par les brassinostéroïdes (BRs) et l'immunité. BAK1 interagit dans des nanodomaines avec le récepteur des BR, du BRI1 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1) indépendamment de son interaction avec dans d'autres nanodomaines (ND) avec FLS2 (flg-sensing2) le récepteur de la flg22 (flagelline 22) étant un motif moléculaire associé aux pathogènes (MAMP/PAMP). FLS2 interagit également avec le corecepteur BIK1. Lorsque les récepteurs BRI1 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1) et FLS2 lient leur ligand respectif (flg22 ou BR), ceci induit les voies de signalisation. Dans le cas des BR il y aura une induction de BZR1/BES1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1/BRI1-EMS SUPPRESSOR 1) permettant la croissance. De manière antagoniste lorsque FLS2 se lie à la flg22 les corécepteurs BAK1 et BIK1 induisent la voie des MAPK, permettant aux réponses immunitaires de se mettre en place (adaptée de Peres et al., 2019).

À travers, ces exemples on peut discriminer différents types de nanodomaines en fonction de leur rôle fonctionnel. Cependant le contrôle de la ségrégation des protéines dans les nanodomaines est encore peu connu. Outre la composition protéique du domaine, la mise en place et le maintien de ceux-ci seraient liés à différents acteurs. La composition lipidique fait partie d'un de ces facteurs. Par exemple pour les nanodomaines de FLS2, l'enrichissement en stérol serait nécessaire pour la stabilisation des nanodomaines de FLS2 (Cui et al., 2018).

Les S-acylations des protéines jouent un rôle également. Cette modification post traductionnelle consiste à l'ajout d'acide gras sur les résidus cystéines des protéines. Cette modification appliquée aux récepteurs FLS2 est nécessaire à la signalisation immunitaire médiée par FLS2-BAK1 (Hurst et al., 2023). En effet, elle participe à la rétention des complexes protéiques tel que FLS2 permettant d'augmenter la stabilisation et la rétention des complexes protéiques dans la membrane augmentant donc l'efficacité de la signalisation (Hurst et al., 2023).

Outre les acteurs impliqués dans l'induction de la réponse et décrits dans les différentes signalisations ci-dessus, d'autres acteurs qui ne sont pas impliqués directement dans la signalisation jouent un rôle régulateur. Par exemple la mobilité et stabilisation du complexe FLS2/BAK1 dans des nanodomains est régulée par le récepteur kinase FERONIA (Gronnier et al., 2022). FERONIA est un récepteur kinase de la membrane plasmique qui participe à la surveillance de l'état de la paroi, en particulier lors des processus d'élongation (Haruta et al., 2014). Ainsi, FERONIA agirait comme un régulateur de l'immunité en modulant les nanodomains de FLS2 et BAK1 (Gronnier et al., 2022).

Nous avons essentiellement abordé la nano-organisation des protéines principalement sous l'angle des récepteurs kinases membranaires. Cependant, d'autres protéines sont également connues pour former des nanodomains. C'est particulièrement le cas des petites GTPase. Dans la section suivante, je décrirai leurs rôles et leurs fonctions car il s'agit de l'objet moléculaire au centre de mon travail de thèse.

3) Les petites GTPases membranaires, des protéines clés de la signalisation cellulaire

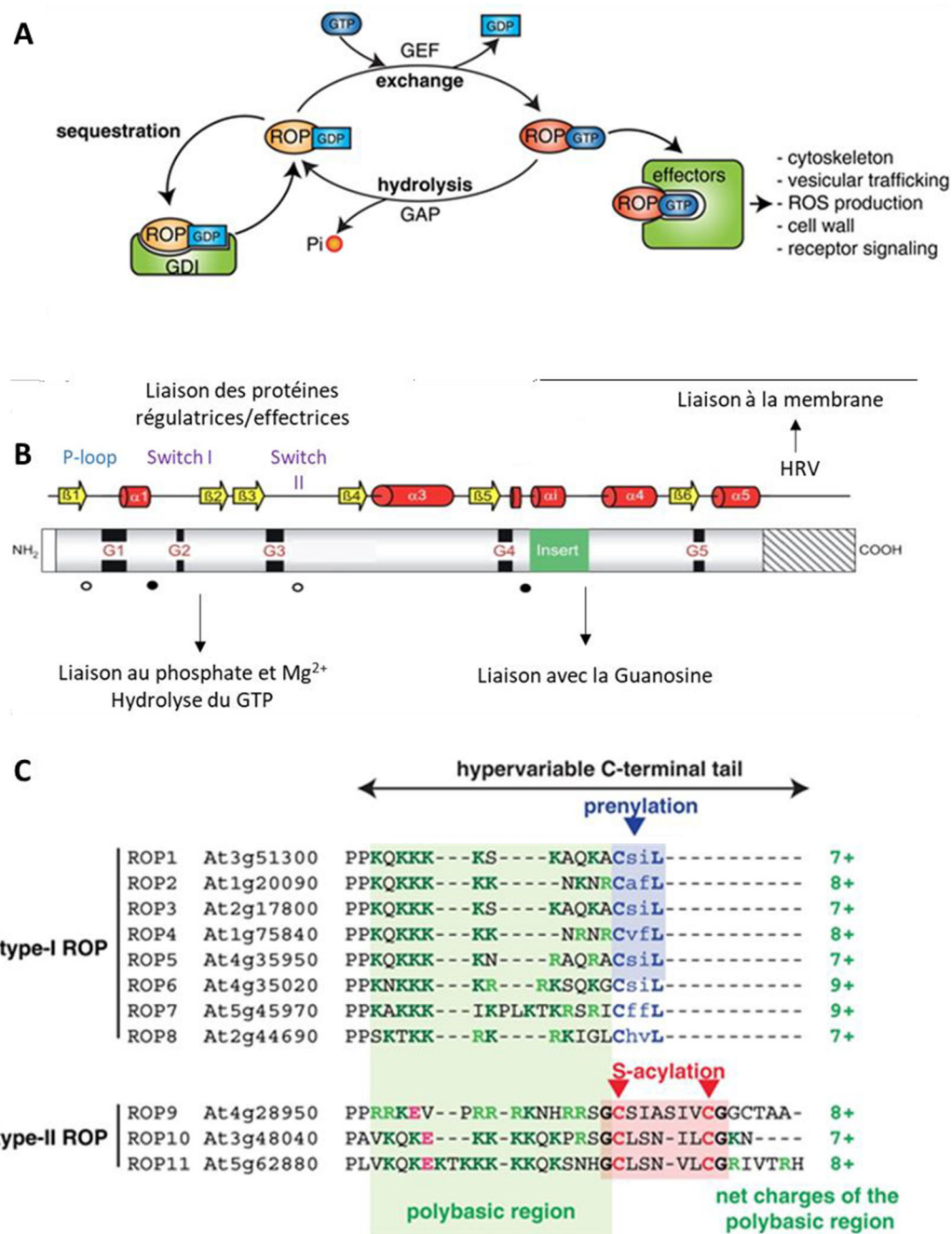
### **3.1) Mécanismes de régulation des petites GTPases**

Les petites GTPases sont une classe importante d'enzyme qui catalyse l'hydrolyse du GTP libérant du GDP (Guanosine Diphosphate) et un ion phosphate. Leurs associations au GTP (Guanine Triphosphate) se font grâce à un domaine très conservé dans l'évolution appelé domaine G. Leur activité est couplée à diverses voies de signalisations. Effectivement, le cycle GTP/GDP conditionne leur état d'activation à travers un changement de conformation de la protéine. Lorsque la GTPase lie le GDP, la protéine est en conformation inactive. À l'inverse

lorsqu'elle est en conformation active, elle lie le GTP (Bourne et al., 1991). Sans stimulation les petites GTPases sont généralement sous formes inactives dans la cellule. Mais lors d'un évènement de signalisation, la protéine devient active ce qui permet l'association avec des acteurs moléculaires appelés effecteurs.

Cet échange moléculaire actif/inactif est favorisé par deux grandes classes de protéines. Comme le GDP est en générale très fortement lié à la petite GTPase, des protéines appelées GEF (guanine nucléotide exchange facteurs) facilitent alors la dissociation du GDP, contrôlant ainsi le passage de l'état inactif à actif (Bourne et al., 1991; Berken and Wittinghofer, 2008). À l'inverse, le passage de l'état actif à inactif est dû à l'hydrolyse du GTP par la petite GTPase. Ce phénomène est favorisé par les GAP (GTPase activating proteine). Enfin, un autre régulateur intervient dans la dynamique des petites GTPases. Il s'agit des GDI (guanosine nucleotide dissociation inhibitors) qui agissent sur certaines petites GTPases en modifiant leurs capacités à s'associer aux membranes (Berken and Wittinghofer, 2008; Smokvarska et al., 2021) (Figure 4A).

Les petites GTPases sont réparties en 5 familles chez les eucaryotes : Rab, Ras, Arf/Sar, Ran et Rho/Rac. Chaque famille est impliquée dans des processus cellulaires distincts. Les Ran (Ras-related nuclear proteins) participent aux échanges nucléo-cytoplasmiques via les pores nucléaires mais aussi à la re-formation de l'enveloppe nucléaire lors de la mitose (Kalab et al., 2002; Clarke and Zhang, 2008). Les ARF (ADP-Ribosylation Factor) et les Rab sont impliqués dans le trafic vésiculaire entre les différents compartiments de la cellule (Gillingham and Munro, 2007). Les Ras et les Rho/Rac/cdc42 (Cell Division Control Protein 42 Homolog) sont quant à elles, des régulateurs de la signalisation membranaire. Ces dernières agissent sur l'organisation du cytosquelette et le trafic vésiculaire, modulant ainsi la polarisation, la croissance et la motilité de cellules (Kawasaki et al., 2006).



**Figure 4 : le cycle des GTPases et leur structure**

A) Représentation du cycle des GTPases. B) La structure des protéines ROP composée du domaine G (gris), l'insert Rho (vert), la région hypervariable HVR (rayé). La structure secondaire est représentée par les cylindres rouges ( $\alpha$ -hélices), flèches jaunes ( $\beta$ -brins), lignes noires (boucles) composent la structure tertiaire des ROP. Celles-ci sont basées sur ROP9 (Sørmo et al., 2006). Le domaine G comporte des régions notées de G1 à G5 permettant la liaison au  $Mg^{2+}$ , l'hydrolyse du GTP. Les boucles switch permettent la liaison des protéines régulatrices et effectrices. Le HRV est une région permettant l'adressage à la membrane et varie en fonction des deux types de ROP. C) Alignement de la partie hypervariable (HRV). Les ROP sont réparties en 2 classes. Les résidus cathioniques sont en vert, les résidus acides sont mis en évidence en rose. Le motif CaaX permet la prénylation (en bleue) soit le

motif CaaL: geranylgeranylation, et CaaM: farnesylation. Le motif GC-CG S permet l'acylation (rouge) (Smokvarska et al., 2021).

### 3.2) Les Rho of Plant (ROP)

Chez Arabidopsis, 93 gènes encodent pour des homologues des petites GTPases comprenant les RAN, les ARF, les RAB et les Rho, la classe des Ras étant absente du phylum des plantes (Vernoud et al., 2003). Les Rho des plantes sont nommés Rho of plante (ROP) ou encore RAC et sont impliquées dans la signalisation de la membrane plasmique.

Cette famille fut identifiée pour la première fois chez les algues (rouge et verte) (Berken and Wittinghofer, 2008; Eliáš and Klimeš, 2012; Feiguelman et al., 2018). Les ROP ont une taille entre 21 et 24 Kda. Elles sont composées en N-ter d'un domaine catalytique permettant de lier d'une part le GTP/GDP et d'autre part le  $Mg^{2+}$ . Ce domaine ou G-box est très conservé et contient 5 motifs notés de G1 à G5. Parmi ces motifs G4 et G5 sont impliqués directement dans la liaison avec le GTP/GDP. Les domaines G2 et G3 sont des boucles (switch I et switch II), voyant leur conformation changer à la suite de la liaison GDP/GTP l'interaction avec les protéines régulatrices et les protéines effectrices est possible (Berken and Wittinghofer, 2008; Smokvarska et al., 2021) (Figure 4B). De manière intéressante, il est possible d'introduire des mutations ponctuelles dans le domaine G-box empêchant que l'hydrolyse du GTP maintienne les protéines en conformation active. Ces mutants sont donc constitutivement actifs (CA). À l'inverse, d'autres mutations permettent de créer des ROP dominantes négatives c'est-à-dire bloquées en conformation constitutivement inactive. Outre les motifs G1 à G4, on retrouve une hélice hélicoïdale ( $\alpha$ i) qui est propre des ROP. Effectivement et contrairement au Rho animal, le C-terminal des ROP est constitué par un domaine hyper variable (Hyper variable region, HVR) (Figure 4C). Le HVR permet l'adressage de la protéine aux membranes.

Chez Arabidopsis, il existe 11 ROP réparties en 2 classes : ROP type I et ROP de type II (Figure 4C). La différence entre ces 2 catégories de ROP est basée sur organisation de leurs HVR. Les ROP de type I (ROP1 à ROP8) possèdent un domaine canonique CaaL box. Il induit une prénylation de la protéine sur la cystéine et permet l'adressage membranaire des ROP par une modification lipidique de type geranyl-geranylation (Sorek et al., 2011; Feiguelman et al., 2018). En revanche chez les ROP de type II, le HVR se termine par une GC-GC box avec 5 résidus aliphatiques séparant les cystéines subissant des S-acylation associant soit un acide palmitique (C16), ou stéarique (C18) (Wu et al., 2011) (Figure 4C).

Le domaine HVR est également un domaine polybasique riche en arginine-lysine, rappelant celui des protéines Ras animal (Hancock et al., 1990). Chez les ROP, ce domaine possède un motif lysines/arginines de charges positives (de +7 à +9). De manière intéressante, ces charges ont été montrées comme importantes pour l'association avec les lipides anioniques de la membrane plasmique (Platre et al., 2019). Ainsi, lorsque ces résidus sont mutés, AtROP6 n'est plus fonctionnel bien que sa capacité à interagir avec des protéines effectrices est maintenue (Platre et al., 2019). À l'inverse dans un mutant dépourvu de phosphatidylserine (PS), qui est un des lipides anioniques de la membrane plasmique, la signalisation dépendante de AtROP6 est perdue. Au niveau de la membrane, les PS forme des nanodomains qui co-localisent avec ROP6 lors de la signalisation auxinique, leurs pertes entraînant des défauts de maintien de ROP6 dans des nanodomains (Platre et al., 2019).

Enfin, certaines ROP possèdent des sites d'acylation dans leurs domaines G. Ces S-acylations ont été démontrées comme une modification post-traductionnelle cruciale pour la signalisation des ROP (Sorek et al., 2011; 2017). Elles contrôlent en particulier l'adressage des ROP dans les nanodomains (Sorek et al., 2011; 2017; Smokvarska et al., 2020). Il faut noter que d'autres ROP sont aussi S-acylées comme ROP2 et ROP10, bien que le rôle fonctionnel de ces modifications lipidiques soit moins clair (Lavy and Yalovsky, 2006; Wan et al., 2017).

### **3.3) Les ROP et leurs organisations en domaines membranaires**

Comme explicité précédemment par leur structure et leur fonction les ROP sont associées à la membrane et se répartissent latéralement dans la membrane dans des domaines qui peuvent être polarisés ou non dans la cellule. Je vais détailler les différents types de domaines de ROP décrits dans la littérature et leurs fonctions dans la partie suivante.

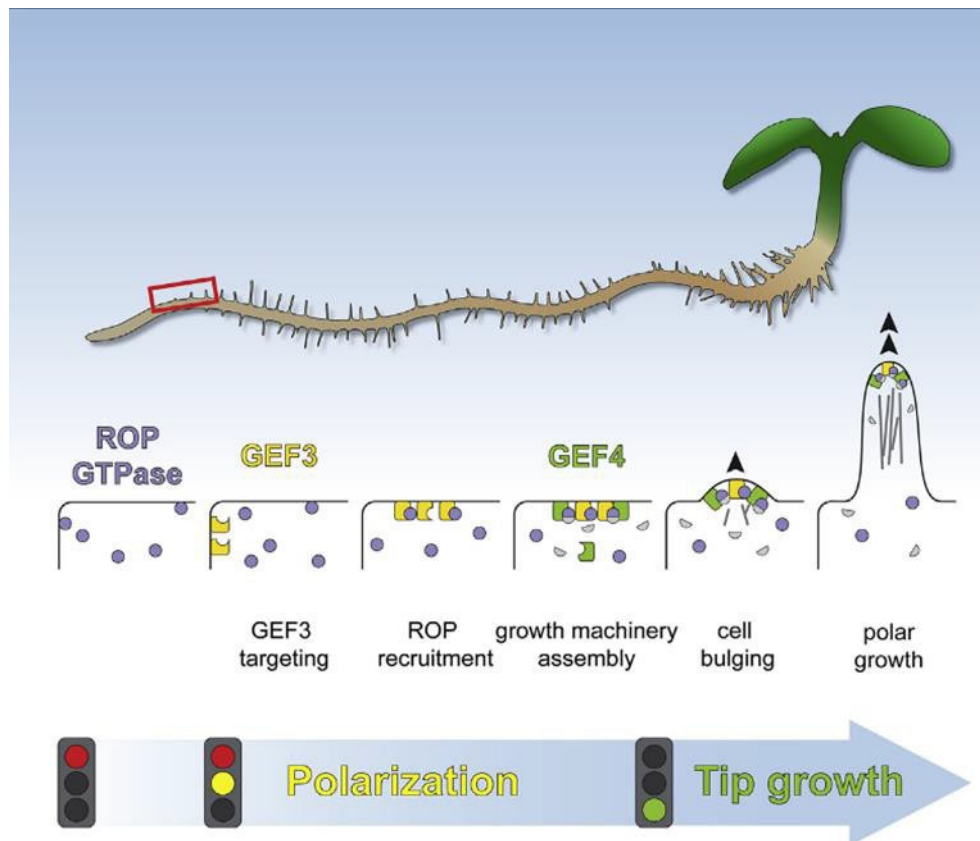
#### *Les domaines polaires de ROP*

##### Les poils racinaires

Les ROP sont particulièrement importantes dans les processus de croissances polarisées des cellules. Le développement du poil racinaire a été décrit en 3 phases : l'initiation, le renflement et la croissance (Denninger et al., 2019; Stanislas and Jaillais, 2019). L'initiation du poil racinaire se déroule seulement dans les cellules trichoblastiques de l'épiderme. L'initiation de celui-ci se déroule dans les RHID (Root Hair Initiation Domain) étant une zone de la membrane

spécialisée dans cette fonction pouvant recruter différents facteurs. Il existe une prédétermination de la position du RHID se situant proche de l'extrémité basale de la cellule trichoblastique. Bien que la nature exacte de l'information de polarisation reste mal comprise, cette prédétermination induit le recrutement précoce (avant la formation du poil) de facteurs tels que les ROP et les GEF. D'autres effecteurs en aval seront par la suite recrutés et seront responsables de la croissance polarisée de la cellule. Les domaines polaires de ROP2 ont été montrés comme essentiels pour la disposition du RHID dans la cellule. Tout d'abord, ROP2 est localisée à la membrane de manière non polaire via des interactions avec des phospholipides anioniques, puis ROP2 s'associe sous forme de nanodomains avant d'être polarisée (Fuchs et al., 2021). Des données dans Biorxiv montrent que les versions constitutivement actives et les versions dominantes négatives, auraient montré que l'état d'activation de ROP2 n'influerait pas pour son association en nanodomains mais influe la formation du domaine polaire RHID (Fuchs et al., 2021). La formation des nanodomains de ROP2 est GEF3 indépendante. À l'inverse, la polarisation des nanodomains de ROP2 dans le RHID est dépendante de GEF3 (Fuchs et al., 2021) (Figure 5). Le rôle de GEF3 semble suffisant pour la polarisation des nanodomains de ROP2, car l'expression ectopique de GEF3 dans les cellules de l'hypocotyle suffit à recruter ROP2 dans des domaines polaires. Ainsi, GEF3 semble bien un facteur essentiel responsable de la polarisation de ROP2 et de l'émergence du domaine RHID. Une fois le RHID initié GEF4 est recruté dans les domaines polaires de ROP2 ; GEF4 induisant le renflement de la cellule trichoblastique (Figure 5). Les GEF ne sont pas les seules responsables de cette polarisation. En effet les GAP jouent également un rôle. REN1 est une des GAP à domaine plekstrin homology (PH) (Kulich et al., 2020) qui se localise en dehors des domaines ROP2. Ainsi ROP2 serait inactivée par celle-ci en dehors des domaines RHID. La localisation des REN1 est elle-même sous le contrôle des ARO (Armadillo repeat1) qui sont en association avec des lipides anioniques de la membrane plasmique (Kulich et al., 2020). Mis à part le rôle des protéines régulatrices du cycle des GTPases, des éléments du TGN (Trans Golgi Network) comme les protéines YIP4a et YIP4b régulent l'adressage de ROP2 dans le RHID depuis les compartiments intracellulaires (Gendre et al., 2019). L'interaction avec le cytosquelette microtubulaire permet également le contrôle de la polarisation du RHID. Une interaction physique entre ROP2 et la protéine MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 18 (MAP18) a été décrite (Kang et al., 2017). Des études montrent que d'autres isoformes de ROP sont impliqués dans le développement du poil racinaire.

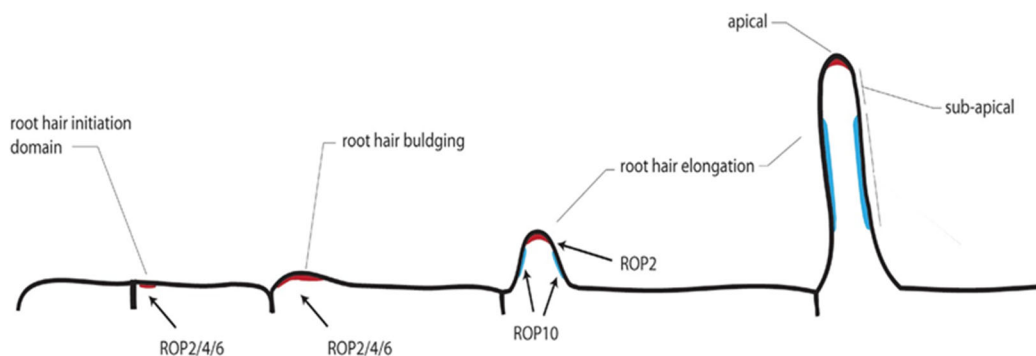




**Figure 5 : Domaines polarisés de ROP2 permettant l'initiation du poil racinaire**

GEF3 localisée à la membrane se polarise et permet le recrutement polarisé de ROP2, par la suite GEF4 sera recrutée permettant l'initiation du poil racinaire et de plus sa croissance polarisée (Denniger et al., 2019).

Les formes autoactives de ROP4 et ROP6 ont révélé des défauts de croissance des poils racinaires (Molendijk et al., 2001). Ces études montreraient une certaine redondance fonctionnelle entre ces ROP bien que ROP2 semble être la ROP majoritairement responsable de l'émergence et la croissance du poil racinaire. Une fois l'émergence du poil est effectuée sous le contrôle de ROP10 qui vient se localiser dans des domaines polaires sur le flanc du poil, assurant sa croissance (Figure 6). Les différentes zones du poil racinaire (pointe et flanc) ont un environnement lipidique différent. Ainsi, ROP2 qui est à la pointe se retrouve avec plutôt du PI(4,5)P2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) et ROP10 qui est sur les flancs avec du PI(3,5)P2 (phosphatidylinositol 3,5-biphosphate). De manière intéressante, ces deux ROP interagissent respectivement avec les kinases qui permettent la production de ces lipides. Il s'agit de PIP5K3 (phosphatidylinositol-4-phosphate5-kinase de type III) pour ROP2 et FAB1 (phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase) pour ROP10 (Hirano et al., 2018). Ces résultats suggèrent une boucle d'amplification entre la signalisation ROP et les PIP nécessaire à leur localisation.



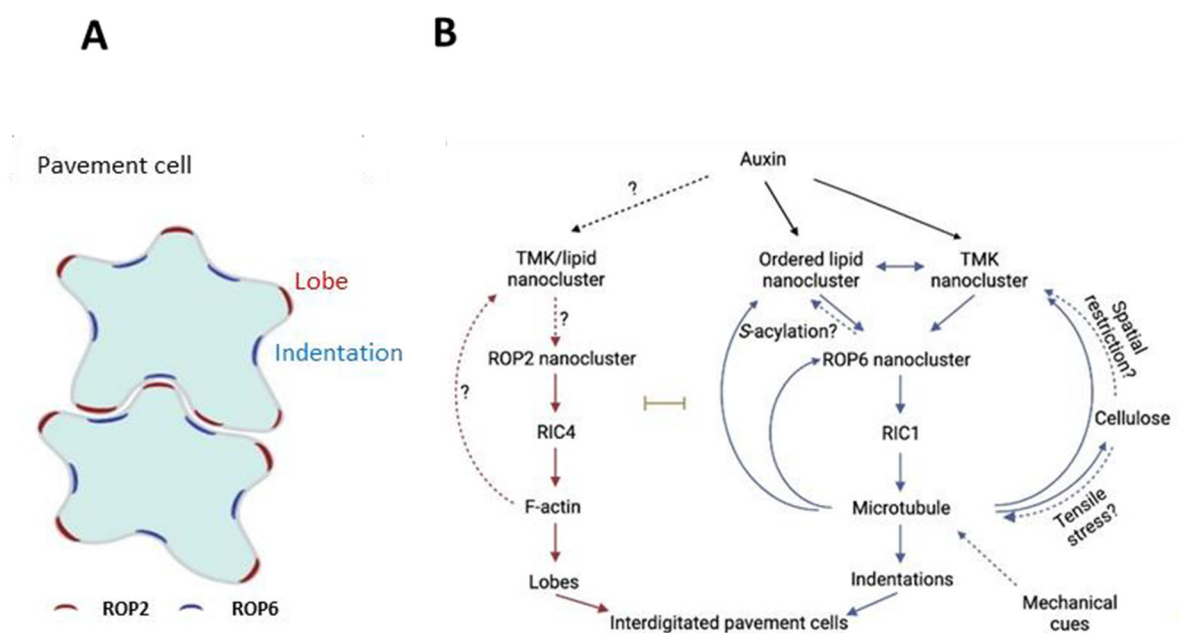
**Figure 6 : Implication des domaines de ROPs dans l'initiation et la croissance du poil racinaire**

ROP2/4/6 s'accumule au niveau du domaine d'initiation du poil racinaire (RHID). ROP2 (rouge) se polarise à l'apex alors que ROP10 (bleu) se polarise le long du poil (Smokvarska et al., 2021).

#### Pavement cell :

Les ROP sont également bien connues pour leurs rôles dans la croissance polaire des cellules de l'épiderme de la feuille. Leurs croissances forment un damier interdigité où la partie convexe correspond aux « lobes » et la partie concave aux « necks ». Contrairement à la redondance fonctionnelle observée entre ROP2/ROP6 dans l'initiation du RHID, ces deux ROP ont des rôles antagonistes dans les cellules de l'épiderme (Figure 7). En effet, ROP2 lorsqu'elle est active forme des domaines polarisée dans les « lobes » des cellules de l'épiderme. Dans ces domaines ROP2 interagit avec RIC4 (Rop-Interactive CRIB Motif-Containing Protein) qui contrôle l'assemblage des filaments d'actine. C'est la polymérisation de l'actine sous forme de filament qui permet la croissance des lobes. De manière simultanée, ROP2 inactive RIC1 aboutissant à la dépolymérisation des microtubules corticaux dans les lobes (Fu et al., 2005; Fu et al., 2009). *A contrario*, ROP6 forme également des domaines polaires mais dans les indentations. Ce processus est sous le contrôle conjoint de l'activation par GEF14 et l'inhibition de ROP2 par le biais de PHGAP1 et 2 (Zhang et al., 2022). Ces domaines sont responsables de l'organisation des microtubules corticaux dans les « necks ». La phytohormone auxine jouerait également un rôle (Figure 7). En effet, elle induirait la kinase TMK1 (TRANSMEMBRANE KINASE 1) qui en réponse activerait ROP2 et ROP6 (Xu et al., 2010; Pan et al., 2023). L'auxine

permettrait via la polarisation de PIN1 (Polar transport of Auxin 1) d'accroître de manière localisée les concentrations d'auxine extracellulaire et ainsi participe à la formation des « lobes ». Cet effet est probablement due à une boucle de rétroaction sur ROP2 (Xu et al., 2010; Nagawa et al., 2012; Xu et al., 2014). De plus, la formation des nanodomains de ROP6 sont sous le contrôle d'une boucle de rétroaction. L'auxine induit le clustering de TMK1 qui participe à la formation des nanodomains de ROP6 (Figure 7). Ensuite, ROP6 agit sur les microtubules via les protéines RIC qui elles-mêmes contrôlent le clustering de TMK (Pan et al., 2020). Le maintien de cette architecture cellulaire implique également des modifications de la paroi, en particulier la méthylation des pectines (Tang et al., 2022). L'état des pectines pourrait être perçus par récepteur kinase membranaire FERONIA (FER) qui une fois activé induirait la signalisation ROP6 dépendant pour contrôler les microtubules. Néanmoins, le lien entre la mécanique de la paroi la signalisation FERONIA et la réorganisation des microtubules restent fortement débattu dans la littérature (Lin et al., 2021; Malivert et al., 2021; Tang et al., 2022).

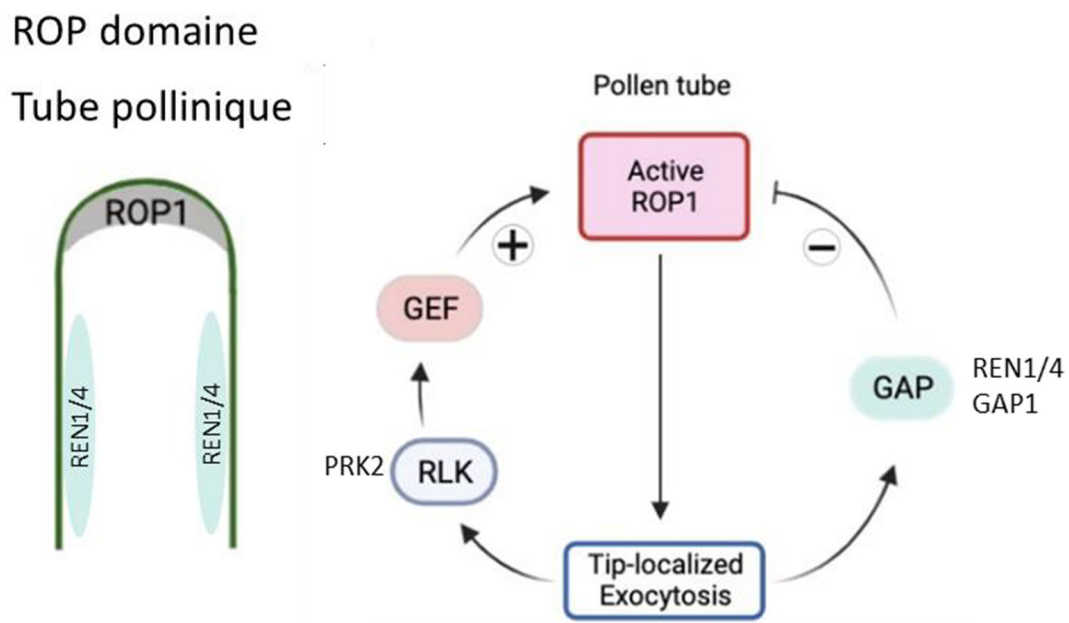


**Figure 7 : Domaine polaire de ROP2 et ROP6 dans l'établissement des cellule de l'épiderme des feuilles**

A) Répartition spatiale des domaines polaires de ROP2 et de ROP6 dans les lobes et les indentations des pavements cells. B) Représentation schématique du rôle de l'auxine dans les « pavement cell » et du fonctionnement antagonistes des domaines polaires de ROP2 et de ROP6. Les lignes en pointillée restent des spéculations (adapté de Pan et al., 2023).

## Le tube pollinique

La progression dirigée du tube pollinique se fait par une croissance apicale. Elle implique de nombreux facteurs dont la signalisation médiée par les ROP (Guo and Yang, 2020). ROP1 a été montrée comme s'accumulant à l'apex du tube pollinique. Alors que deux GAP, REN1, et REN4 sont localisés sur les flancs du tube contrôlant spatialement la localisation de ROP1 (Figure 8). REN4 contrôle en particulier la localisation polarisée de ROP1 via son endocytose médié par les vésicules à clathrine (Qin and Yang, 2011; Li et al., 2018a). Chez *Nicotiana Benthamiana*, une RHoGDI1 et une RopGAP1 ont été identifiées dans le contrôle de la polarisation de la GTPase à l'apex du tube pollinique. Le maintien de cette polarisation est permis par l'implication des régulateurs négatifs du cycle des GTPases, en effet Nt-RhoGAP1 et Nt-RhoGDI2 interagissent avec Nt-RAC5 permettant le maintien de la croissance polarisée du tube (Sun et al., 2015).



**Figure 8 : Représentation de la régulation de ROP1 responsable de la croissance polarisée du tube pollinique**

ROP1 est localisée à l'apex du tube pollinique, les GAP sont REN1 et REN4 permettant le contrôle de la localisation de ROP1 ainsi que ROPGAP1 (Adapté de Pan et al., 2023).

## *Les nanodomains de ROP*

Les ROP peuvent s'organiser en nanodomains sans nécessairement être polarisées dans les cellules. C'est le cas notamment de l'isoforme ROP6 qui a été décrit comme régulateur de la signalisation auxine et osmotique. Dans cette partie nous décrivons le rôle de ROP6 en se focalisant sur la signalisation osmotique qui constitue le modèle d'étude de ma thèse.

Une stimulation hyperosmotique engendre une accumulation de ROS (Reactive Oxygène Species) faisant office de messagers secondaires. Les ROS permettent donc d'induire les réponses cellulaires et physiologiques en aval. L'accumulation de ROS à la suite de ce signal est médiée par deux voies dépendantes de ROP6 (Martinière et al., 2019). Parmi ces voies on distingue une voie enzymatique et une voie non enzymatique. La voie non-enzymatique repose sur la réaction de Haber-Weiss catalysée par le fer et impliquant l'ascorbate apoplastique. Cette réaction aboutie à la production de superoxide dans l'apoplaste.

Afin que cette réaction se produise le fer doit être sous état réduit cependant cet état est instable. Par conséquent cette réaction nécessite donc la présence d'un agent réducteur. Celui-ci serait l'ascorbate, en effet en épuisant l'ascorbate apoplasmique via l'activité de AOX1 (ascorbate oxydase 1), on observe alors une réduction des ROS induit lors du signal osmotique. Cependant, les acteurs moléculaires sous-jacent restent inconnus à ce jour. C'est pourquoi mes travaux se sont centrés sur la seconde voie qui est enzymatique. Cette voie repose sur l'activité des NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxydases) RBOHD (Respiratory Burst Oxidase Homolog D) et RBOHF (Martinière et al., 2019). Ces enzymes de la membrane plasmique produisent du super oxide à partir du NADPH présent dans la cellule. Il a été montré que ces deux voies sont nécessaires à la production de ROS. En effet l'application d'un chélateur de Fer bathophénanthrolineisulfonique (BPDS) inhibant la voie fer/ascorbate dans un fond mutant *rbohdxrboh* induit une perte totale des ROS suite à une stimulation (Martinière et al., 2019).

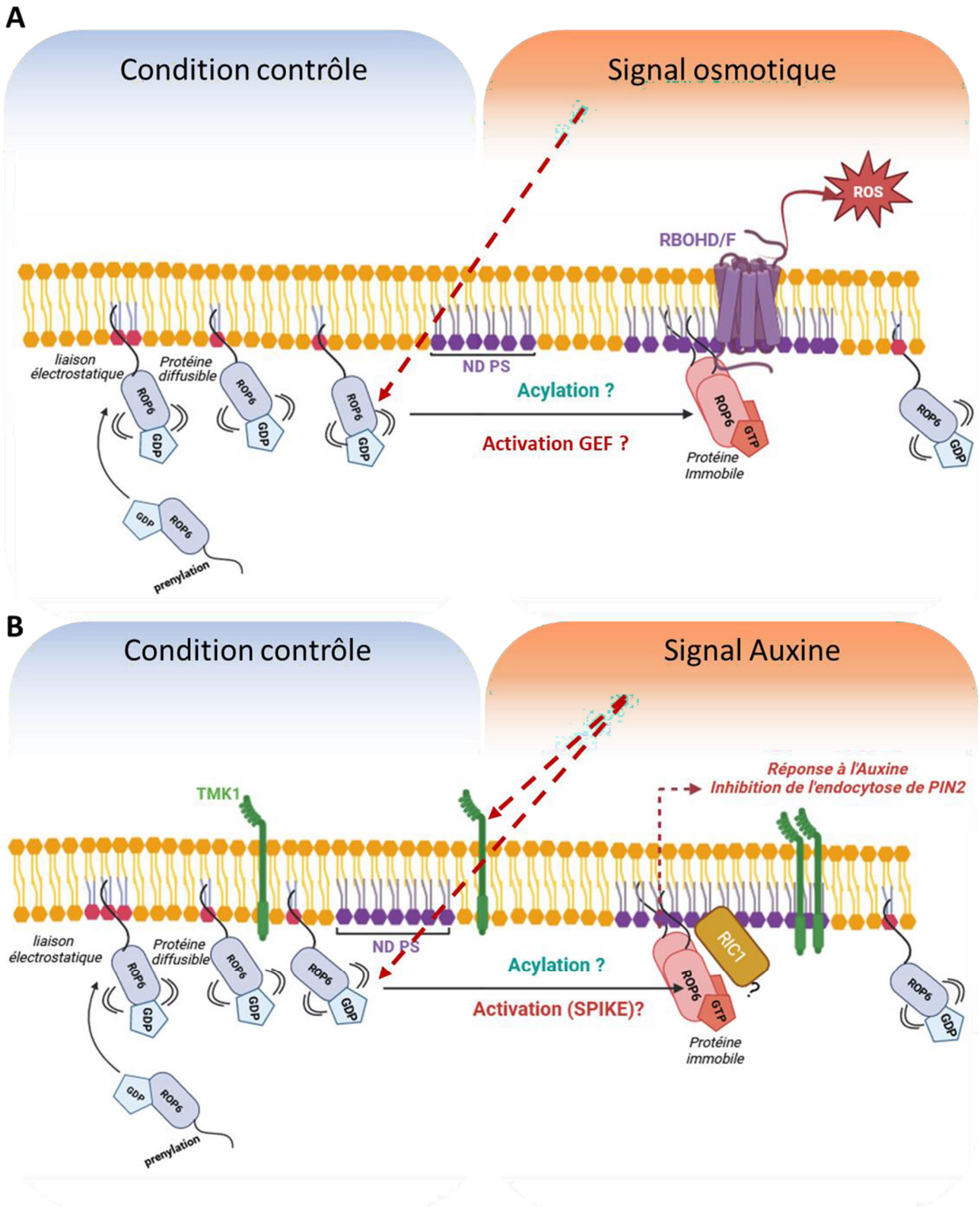
ROP6 forme des nanodomains dans la membrane dépendant de la stimulation osmotique. Ces nanodomains sont nécessaires et suffisant pour l'accumulation de ROS osmotique. En effet, au sein de ceux-ci, ROP6 et RBOHD interagissent, permettant l'accumulation de ROS et donc la transduction du signal (Figure 9A). La forme auto-active de ROP6 (ROP6CA) forme des

nanodomaines et accumule des ROS en absence de signal (Smokvarska et al., 2020). En parallèle la forme dominante négative révèle un défaut d'accumulation de ROS sous signal. L'activation de ROP6 comme sa clusterisation de ROP6 semblent être conditionnant à l'interaction avec RBOHD permettant l'induction de la production de ROS sous stimulation hyperosmotique.

Les clusterisations de ROP6 sous forme de nanodomaines est également nécessaire dans d'autre signalisation, c'est le cas de l'auxine (Platre et al., 2019). En effet à la suite d'un traitement auxine, ROP6 forme des nanodomaines mais contrairement à la signalisation osmotique n'induisent pas d'accumulation de ROS (Figure 9). En effet il a été montré que ROP6 ne colocalise pas avec RBOHD au sein de ses nanodomaines (Smokvarska et al., 2020). Par conséquent en fonction des signalisations les protéines effectrices composition des nanodomaines de ROP6 conditionnent l'induction d'une réponse spécifique.

De plus outre sa prénylation constitutive en C-terminal, ROP6 est S-acylée sur les cystéines 21 et 158 de manière transitoire (Sorek et al., 2010). Par des approches de sptPALM (single particule tracking), la mutation de ses sites d'acylations, révèlent une perte de la clusterisation de ROP6 sous stimulation hyperosmotique et par conséquent une perte d'accumulation des ROS (Smokvarska et al., 2020).

Le domaine hypervariable de ROP6 en C-terminal est également essentiel pour la signalisation auxine et osmotique. La phosphatidylsérine (PS) joue un rôle essentiel dans la stabilisation de ROP6 dans les nanodomaines lors de la signalisation auxine mais aussi osmotique (Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2023). Les domaines PS préexistent dans la membrane et pourrait donc être des plateformes servant au recrutement de ROP6. Ainsi, un défaut de PS affecte la dynamique de ROP6, mais aussi les réponses en aval telles que les réponses gravitropiques mais aussi l'endocytose induit par l'auxine (Platre et al., 2019). La localisation et l'organisation des PS dans la membrane est donc important pour la fonction de ROP6. Récemment, il a été montré que la signalisation FERONIA régule l'organisation et la localisation des PS. Cette protéine agirait comme un rhéostat qui modifie l'intensité de la signalisation GTPase (Smokvarska et al., 2023). Ainsi, ROP6 semble central pour deux voies de signalisation distincte : auxinique et osmotique.



**Figure 9 : Modèle de la regulation de la signalisation osmotique via les nanodomaines de ROP6**

A) Schéma représentant l'action de ROP6 dans la signalisation osmotique. ROP6 subit une prénylation constitutive dans sa région polybasique permettant son adressage à la membrane et interagirait avec les lipides de la membrane via des liaisons électrostatiques. En condition contrôlée la protéine diffuse dans la membrane. Lors d'un signal osmotique ROP6 est activée et serait acylée via ses résidus C21 et C158 permettant l'adressage dans les nanodomaines où la protéine est stabilisée par son interaction

avec les PS. ROP6 colocalise avec RBOHD/F induisant la production de ROS ((Smokvarska et al 2020) adapté de Smokvarska et al 2021). B) Schéma représentant l'action de ROP6 dans la signalisation auxine. De manière analogue ROP6 subit une prénylation constitutive dans sa région polybasique et interagit avec les lipides de la membrane via des liaisons électrostatiques. En condition contrôlée la protéine est diffuse dans la membrane. Lors d'un signal auxine le récepteur kinase TMK1 clusterise sous forme de nanodomaines (Pan et al., 2020). L'action exacte de TMK1 n'a pas été révélée. ROP6 serait activée par la GEF SPIKE1. La protéine est stabilisée par son interaction avec les PS dans les nanodomaines. ROP6 est nécessaire pour les réponses à l'auxine tel que l'endocytose de PIN2, réponse gravitropisme. Contrairement au modèle osmotique ROP6 ne colocalise pas avec RBOHD/F dans les nanodomaines. Une des protéines effectrices de ROP6 identifiée dans la signalisation auxine est RIC1 (ROP interactive CRIB motif) cependant sa clusterisation et son rôle exact restent encore méconnus (Platre et al., 2019 ; Smokvarska et al., 2020 ; Pan et al., 2020 ; adaptée de Smokvarska et al 2021).

### 3.4) Une analogie entre les nanodomaines des Rho de plante et les RAS animal ?

Parmi les RAS les H-RAS, K-RAS, N-RAS, sont les plus exprimées chez les mammifères (Abankwa et al., 2007). Ils coordonnent la signalisation cellulaire qui se déroule durant la migration cellulaire (Zhou and Hancock, 2018). Les Ras sont impliqués dans diverses signalisations où elles interagissent avec des protéines effectrices comme dans le modèle régulant la croissance cellulaire. Dans ce dernier cas, les RAS recrutent la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase), ce qui aboutit à une production de PIP3 recrutant elle-même la kinase Akt qui active la kinase TOR (Abankwa et al., 2010). Elles sont également impliquées dans la voie MAPK (mitogen activated protein kinase) où elles activent des protéines comme les RAF qui elles-mêmes activent des MAPK régulant par exemple la différenciation cellulaire. Les RAS ségrègent latéralement dans la membrane en fonction de leur état d'activation. Des nanodomaines spécifiques en fonction des isoformes ont été démontrés. Ils sont en partie contrôlés par la composition lipidique de la membrane (Prior et al., 2001; Prior et al., 2003). Les nanodomaines de H-Ras.GDP et N-Ras-GTP sont cholestérols dépendants alors que tous les autres nanodomaines de Ras ne le sont pas. Tout comme les ROPs il y a donc un lien étroit entre nanodomaines et lipides. Les lipides anioniques comme le PI(4,5)P2 et le PI(3,4)P2 semblent également être primordiaux dans la signalisation Ras. Les Ras s'organisent donc en nanodomaines de manière analogue au ROP en fonction de leur état d'activation, de leur environnement protéo-lipidique, et de leur lien avec le cytosquelette. Les Ras permettent un large panel d'intégration de signaux (Hancock, 2003).

Comme explicité précédemment les Ras ont des rôles dans la signalisation relativement similaire. Certaines Ras ont été rapportées comme des régulateurs de multiples voies de



signalisations. Une Ras chez la drosophile illustre le caractère « hub régulateur » (Prober and Edgar, 2002). RasV12 est impliquée dans deux voies distinctes et indépendantes : via la voie Raf/MAPK et la signalisation de dPI3K. La signalisation Raf/MAPK engendre une augmentation de la quantité de protéine dMyc dans le cas où RASv12 interagit avec le ligand du récepteur de EGF (Drosophila EGF (Epidermal Growth Factor) receptor). Cette signalisation encode pour des réponses en lien avec l'adhésion et l'identité cellulaire. En revanche Rasv12 est possiblement capable d'interagir avec un autre ligand, celui du récepteur insuline ce qui alors induit la signalisation via dPI3K. Ceci entraîne l'augmentation de la cycline E étant impliquée dans la phase de croissance G1/S soit induisant la croissance cellulaire (Prober and Edgar, 2002). Pour résumer une même Ras peut donc répondre à des signaux différents et engendrer des réponses différentes en interagissant avec différents effecteurs.

Ainsi, de manière analogue à ROP6 d'Arabidopsis, certains RAS agissent comme des hubs régulant de multiples signaux en aval. Une question reste donc entière. Est-ce que l'organisation en nanodomains des petites GTPases peut déterminer la spécificité des processus de signalisation ?

#### 4) Signalisation précoce et longue distance en réponse au signal osmotique

Dans cette partie, je vais détailler l'importance du signal osmotique et synthétiser l'état de l'art concernant les événements précoces de la signalisation osmotique.

## REVIEW

## Open



# Root osmotic sensing from local perception to systemic responses

Lucille Gorgues<sup>†</sup>, Xuelian Li<sup>†</sup>, Christophe Maurel, Alexandre Martinière\* and Philippe Nacry\*

## Abstract

Plants face a constantly changing environment, requiring fine tuning of their growth and development. Plants have therefore developed numerous mechanisms to cope with environmental stress conditions. One striking example is root response to water deficit. Upon drought (which causes osmotic stress to cells), plants can among other responses alter locally their root system architecture (hydropatterning) or orientate their root growth to optimize water uptake (hydrotropism). They can also modify their hydraulic properties, metabolism and development coordinately at the whole root and plant levels. Upstream of these developmental and physiological changes, plant roots must perceive and transduce signals for water availability. Here, we review current knowledge on plant osmotic perception and discuss how long distance signaling can play a role in signal integration, leading to the great phenotypic plasticity of roots and plant development.

**Keywords:** Drought, Water deficit perception, Local signaling, Long distance signaling, Local water deficit, Adaptive development

## Introduction

Like some prokaryotic and most fungal cells, plant cells are wall-encapsulated. Although it provides important advantages such as a robust exoskeleton and a protection of cells from adverse abiotic or biotic factors, the wall creates a direct restriction for cellular expansion. This important constraint can be overcome by intracellular turgor that in response to cell wall loosening allows growth. The cell turgor, that can be up to 10 bars in certain cell types, is actually built from the osmotic gradient between cell interior and the external media. This gradient triggers a flux of water into the cell that leads to a compensatory hydrostatic pressure, called turgor. Any change in the osmotic gradient by for instance an increase/decrease in water potential in the external

media or changes in the internal solute concentration, leads to a direct change in turgor that can modify cell volume and tissue rigidity. To allow localized expansion growth or prevent wilting, cells have therefore to maintain a constant dialog between cell wall mechanical properties, solute concentration and turgor.

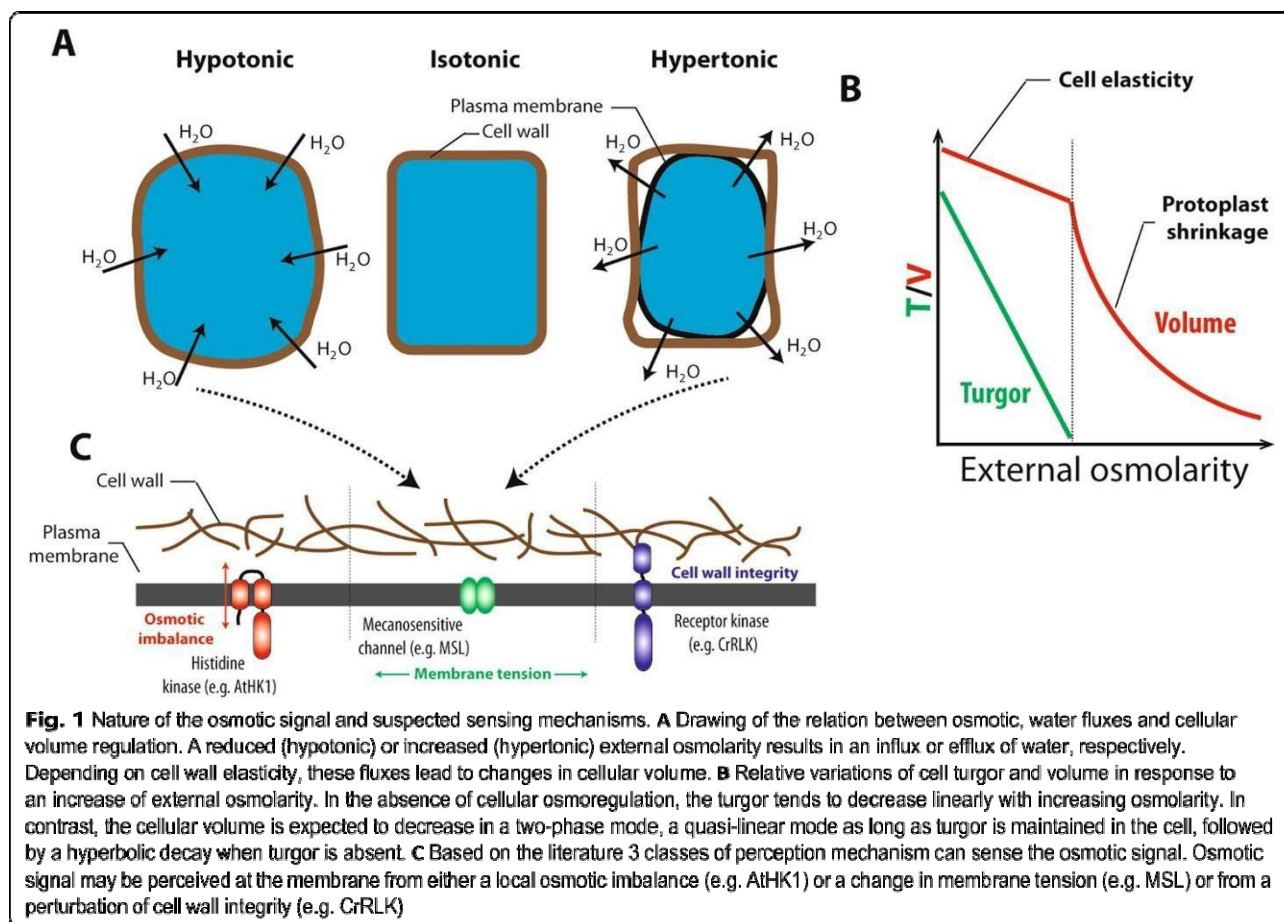
Whereas plant aerial parts are protected from air drying by specialized waxes deposited on their surface, the root system is in direct contact with its surrounding environment and therefore has to cope with dramatic changes in water potential. Soil is a complex porous medium with marked differences in its composition and structure e.g. air pockets and hydrated soil particles. Thus, root systems are continuously facing contrasted water availabilities during soil exploration. In addition to a local perception of water availability, followed by signal transduction and responses at cellular level, long-distance signals are produced. These so-called systemic signals coordinate responses at the multicellular scale, to

<sup>†</sup>Lucille Gorgues and Xuelian Li are co-first authors.

<sup>†</sup>Alexandre Martinière and Philippe Nacry are co-last and co-corresponding authors.

\*Correspondence: alexandre.martiniere@cnr.fr; philippe.nacry@inrae.fr

IPSiM, CNRS, INRAE, Institut Agro, Univ Montpellier, 34060 Montpellier, France



modulate integrative traits, such as root system architecture (RSA).

In this review, we will focus on recent advances in the field of plant osmotic perception and early signaling in roots. We will also underline how systemic signaling can integrate local signals to modulate RSA.

### Local perception and early signaling

Although being searched for many years, the exact nature of the signals that allow plants to perceive changes in water availability is not clearly defined yet. At the cellular level, mechanics e.g. cell wall/membrane tension, but also cell or subcellular volumes are directly impacted by changes in external osmolarity (Fig. 1A and B). Historically, comparison between different kingdoms has permitted the identification of some molecular players. Since osmotic perception is mandatory all along the plant life cycle, it is likely that many molecular mechanisms are actually superimposed in cells (Fig. 1C). New approaches, especially genetic screens, have recently allowed a striking expansion of knowledge on plant osmotic perception,

which is summarized and updated in the present paragraph.

### Molecular mechanisms of perception

#### *Histidine kinases (AtHK1)*

Historically, the first osmosensing pathway has been uncovered in unicellular organisms. In *Saccharomyces cerevisiae*, perception is made by a two component histidine kinase system, where recognition of the stimulus leads to kinase activation and phosphorylation of a histidine residue (Brewster and Gustin 1994). The Synthetic Lethal of N-end rule 1 (SLN1) changes its phosphorylation activity in response to osmotic signal and activates via several phosphorelays the High Osmolarity Glycerol (HOG1) MAP kinase (Ota and Varshavsky 1993; Maeda et al. 1995). In turn, HOG1 controls the expression of osmotic responsive genes including those involved in the biosynthesis of compatible osmolytes like glycerol.

Plants also show a conserved gene family of histidine kinases (HK) with members involved in hormonal signaling such as ethylene (Gamble et al. 2002) or cytokinins.

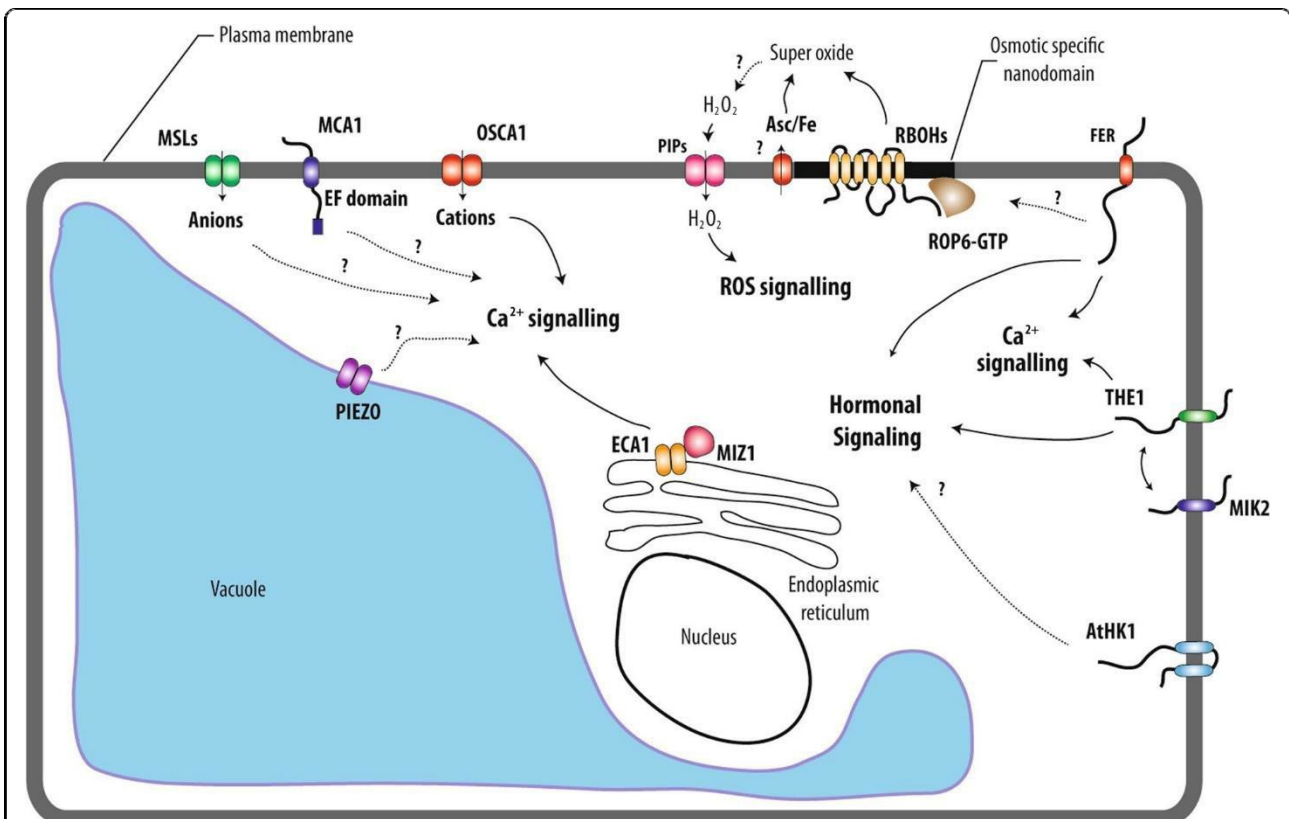
The Arabidopsis genome contains 11 genes coding

for Histidine kinase like protein (Hutchison and Kieber 2002). In addition to its role in hormone signaling, Arabidopsis AtHK1 was shown to act as an osmosensor by complementing yeast *sln1* mutation (Urao et al. 1999) (Figs. 1C and 2). Localized to the plasma membrane, AtHK1 is a positive regulator of salt stress, drought and ABA signaling (Tran et al. 2007; Wohlbach et al. 2008). For instance, overexpression AtHK1 in plants increases the drought tolerance and results in the induction of genes involved in drought signaling including proline and sucrose biosynthesis (Tran et al. 2007). However, the role of AtHK1 as a main plant osmosensor has been questioned. Indeed, in several loss-of-function alleles of *athk1*, no hyperosmotic signaling-related phenotypes

such as ABA, or osmolyte accumulation were found (Kumar et al. 2013).

#### **Mechanosensitive channels (MSL, OSCA1, Piezo, ...)**

Due to its molecular anchors with the wall and the absence of folding, the plant plasma membrane of turgid cells is potentially under tension, especially during cell expansion and osmotic volume adjustment. Changes in membrane tension due to an osmotic challenge can therefore be perceived by cells through membrane mechanosensitive channels (Fig. 1C). The first mechanosensors involved in osmoregulation were molecularly identified from *Escherichia coli* spheroplasts (Martinac et al. 1987; Levina 1999). Several studies have



**Fig. 2** Summary of currently known osmotic perception mechanisms in plants. Changes in membrane tension induced by osmolarity imbalance can be perceived by membrane mechanosensors such as OSCA1, MSLs, MCA1, PIEZO, ECA1/MIZ1. By transporting cations or anions, these sensors initiate cell calcium signaling by as yet unknown mechanisms. Receptor-like kinases belonging to the CrRLK family (e.g. FER, THE) perceive the cell wall status and their activation eventually leads to cell wall reinforcement. Whereas their exact role as osmotic sensors has yet to be established, these receptors definitely fine tune signaling of hormones such as ABA, auxin and jasmonate that are known to regulate plant development and physiological acclimation to osmotic stress. At the cell membrane, a partial integration of signals can be observed. For instance, LRR kinase MIK2, a receptor for phyto cytokines that controls plant immunity, genetically interacts with THE, pointing to a link between osmotic and pathogen signaling. By similarity to the yeast system, the AtHK1 two component histidine kinase may also participate in osmotic signaling by modulating ABA signaling. In addition to hormones and calcium signaling, Reactive Oxygen Species (ROS) are also participating in early cell responses to osmotic stimuli. Cellular accumulation of ROS is dependent on NADPH oxidases (RBOHD and F) and iron reduction processes. Upon cell stimulation, ROP6 forms nanodomains together with the superoxide producing enzyme RBOHD/F. As a consequence, superoxide can be dismutated to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by apoplastic SOD (Superoxide dismutase).  $H_2O_2$  transport through the cell membrane is in turn facilitated by aquaporins

crystal structure of these low-conductance mechanosensors. They highlighted 3 common transmembrane helices that would serve as sensors of the membrane tension (Bass et al. 2002; Steinbacher et al. 2007; Lai et al. 2013). In addition, two recent cryomicroscopy studies have shown that *E. coli* MscS channels (MscS) association with lipids is an important determinant for the stabilization of the closed conformation and therefore plays a key role in channel sensitivity to tension (Flegler et al. 2021; Zhang et al. 2021b). The gating of *E. coli* MscS channels is conditioned by a pocket containing lipids. The anisotropic forces of the membrane created by tension could free this pocket of lipids or/and change the number of lipid acyl chains in it, causing a structural rearrangement and leading to pore opening (Pliotas et al. 2015; Flegler et al. 2021).

In plants, members of the MscS-like (MSL) gene family represent the closest homologs of bacterial MscS (Sukharev et al. 1994). MSLs are non-selective anion channels whose activity is regulated by voltage or mechanical stimulation of the membrane (Haswell 2007). Ten MSL have been described in Arabidopsis (Haswell 2007). In a landmark study, MSL9 and 10 were shown to control mechanosensitive activity of anion channels in the plasma membrane of root protoplasts (Haswell et al. 2008) (Fig. 2). Because neither the double *mssl9/10* nor the

quintuple *mssl4/5/6/9/10* mutant showed alteration of their response under a variety of stimuli, e.g. osmotic, salt, mechanical or dehydration, the exact integrated function of these channels has remained enigmatic (Haswell et al. 2008). Whereas, MSL10 was demonstrated to be a true mechanosensitive channel after heterologous expression (Maksaev and Haswell 2012), its function has been recently uncovered using an elegant experimental strategy. By playing both with cell wall inhibitor that loose the cell wall and osmoticum to modulate cell turgor, Maksaev and co-authors show that MSL10 potentiate cell responses to swelling (Basu et al. 2020). Hypoosmotic shock induced several responses including cytoplasmic calcium increases, ROS accumulation and transcriptional regulation that are under the control of MSL10 (Basu et al. 2020). In addition, this channel determines the induction of programmed cell death (PCD) in response to a hypoosmotic challenge. This response is dependent on the phosphorylation of MSL10 N-terminus (Veley et al. 2014; Basu et al. 2020; Basu and Haswell 2020). In a recent preprint, MSL10 was found to localize and function at ER-plasma membrane contact sites (EPCSs) (Codjoe et al. 2022). In plants, EPCSs regulate lipid homeostasis between compartment and cell integrity (Schapire et al. 2008; Ruiz-Lopez et al. 2021). Those results suggest an interesting connection between mechanosensitive channel and regulation of cell volumes.

MSLs are also important for regulation of organelle volume within cells. MSL2 and MSL3 that localize to plastid membranes, modulate their division, shape and size (Lee et al. 2019; Wilson et al. 2016). Because *mssl2/3* plants develop a mass callus tissue at their shoot apical meristem, MSLs create a link between plastid osmoregulation and cell differentiation. MSLs were also associated with specific cell types like pollen tubes (Hamilton et al. 2015). MSL8 was shown to prevent cell bursting during pollen rehydration processes and membrane integrity during tip growth; highlighting again the role of MSLs during hypoosmotic choc. However, a recent preprint suggests that MSL8 effect on pollen tube hydration is not due to a simple tension-gated osmoregulator. MSL8 would rather regulate ions fluxes that are needed for cell wall modification during pollen hydration (Miller et al. 2022).

Other types of mechanosensitive channels have been identified in Arabidopsis. Mid1-Complementing Activity (MCA1) was cloned by complementing the lethal mutation of *mid1* yeast lacking the putative Ca<sup>2+</sup> permeable stretch-activated channel component (Nakagawa et al. 2007 PNAS). MCA1 and its Arabidopsis paralog, MCA2, exhibited a Ca<sup>2+</sup> permeable mechanosensitive channel activity in *Xenopus* (Furuichi et al. 2012 PSB). Interestingly, MCAs consist of single pass transmembrane proteins (Kamano et al. 2015). Their first 200 amino acids contain both the TM and the EF domains that are sufficient for channel activity under membrane stretching (Yoshimura et al. 2021). MCA loss of function mutants show root growth defects in media with high concentration of agar and a hypersensitivity to cold stress (Nakagawa et al. 2007; Mori et al. 2018) (Fig. 2). However, *mca1 mca2* showed no alteration in calcium influx after osmotic stimulation, questioning the role of the two channels in the osmosensing pathway (Stephan et al. 2016).

Members of the PIEZO gene family, from the Greek “πιεσι” which means pressure, are plasma membrane localized cation channels involved in mechanosensory processes and necessary for light touch perception, compressive force proprioception, among other processes. Their discovery was recognized by the 2021’s Nobel prize award. Arabidopsis genome encode for unique PIEZO homolog. at the AtPIEZO channel was first identified as a regulator of virus spreading and of root cap mechanotransduction (Mousavi et al. 2021; Zhang et al. 2019b). However, AtPIEZO1 seems to also act in tip growing cells. The two homologues encoded by the moss *Physcomitrella patens* genome are localized in the tonoplast and control cell growth and cytoplasmic calcium oscillation (Radin et al. 2021). Analysis of loss and gain of function mutants showed that moss PIEZOs act on the vacuole membrane through tubulation, internalization



or fission (Radin et al. 2021). AtPIEZO is also localized in the tonoplast and acts on vacuole morphology of pollen tube; showing that PIEZO function on tip growing cells is conserved among land plants (Radin et al. 2021). These observations shed light onto the role of the plant vacuole in mechanoperception and maybe osmosensing (Fig. 2).

In addition to searching in the plant genome for homologs of prokaryotic or eukaryotic mechanosensors, direct genetic screens have been realized to identify plant osmosensors. Calcium influx in the cytoplasm is probably one of the fastest cell responses to osmotic stimulation.

Following a calcium imaging screen, the gene REDUCED HYPEROSMOLALITY-INDUCED  $[Ca^{2+}]$  INCREASE 1/ (OSCA1.1) was therefore identified from an EMS mutagenized population. OSCA1.1 encodes for a hyperosmolality-gated calcium-permeable channel, which is responsible for calcium signaling, but also regulation of root growth, stomata closure and transpiration upon osmotic stimulation (Yuan et al. 2014) (Fig. 2). Interestingly, OSCA1 is not required for ABA or  $H_2O_2$  induced calcium cellular influxes suggesting a strong specificity of the channel for osmotic signaling. Arabidopsis Calcium permeable Stress-gated cation Channel 1 (AtCSC1/OSCA1.2), a close homolog of OSCA1, is also responsible for osmotic-dependent calcium influx when expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cells (Hou et al. 2014).

Atomic structure and cryo-microscopy analyses have shown that OSCA1.2 is composed of 11 transmembrane helices forming homodimers. This channel has a cytosolic domain with RNA recognition motifs and 2 alpha-helices anchoring the protein in membrane lipids (Jojoa-Cruz et al. 2018; Liu et al. 2018). The two additive helices are cytosolic and might serve as a lateral sensor for tension within the inner plasma membrane leaflet (Maity et al. 2019). Except for the OSCA4.1 isoform belonging to clade 4, the mechanosensitive channel activity seems to be conserved among the OSCA gene family when expressed in HEK cells or in proteoliposomes (Murthy et al. 2018). However, the isoforms present distinct ion conductances and sensitivities to pressure (Murthy et al. 2018). Knowledge on the role of OSCAs in plants has recently been expanding. For instance, OSCA1.3 behaves

as a  $Ca^{2+}$  permeable channel in yeast and contributes, with its close homologue OSCA1.7, to pattern-triggered immunity (PTI)-dependent stomatal closure (Thor et al. 2020). Thus, OSCA function in plants is not strictly restricted to mechano osmoperception.

#### **Cell wall sensing (CrRLKs, WAKs, ...)**

Since the cell wall is way stiffer than the membrane, most of the tensile stress induced by turgor is borne by the wall. Recently, knowledge of biological processes

that perceive the cell wall status has rapidly expanded. A number of transmembrane receptor like kinases (RLKs) such as *Catharanthus roseus* RLK1-Like kinases (CrRLK), Wall Associated Kinases (WAK), Lectin Receptor-Kinase (LRK), Proline-rich Extensin-like Receptor Kinases (PERKs), and formins have been shown to interact with the cell wall (Wolf et al. 2012). Some of these are known to act as sensors of the cell wall status. Historically, the *THESEUS* (THE) CrRLK was isolated from a genetic screen for suppression of the short hypocotyl and ectopic lignin phenotype of the cell wall synthase mutant

*cesa6<sup>prc1-1</sup>* (Hématy et al. 2007). Indeed, the retarded growth induced by inhibition of cellulose synthesis is not the direct result of structural changes in the cell wall linked to reduce cellulose content. It rather involves active inhibition of growth through receptor kinases like THE (Hématy et al. 2007). In addition to its role as a wall integrity sensor, THE acts on lateral root initiation through perception of its ligand, RALF34 (Gonneau et al. 2018). THE1 signaling is also needed to control ABA accumulation after osmotic stress (Bacete et al. 2022) (Fig. 2). These results illustrate the intricacy between wall integrity sensors, the maintenance of cell mechanics and ABA signaling as a typical osmotic signaling marker.

Interestingly, THE also controls some salt-induced related phenotypes, like root skewing. This response also needs MALE DISCOVERER 1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE 2 (MIK2). This LRR kinase was identified from a reverse genetic screen for impaired ectopic lignin deposition under treatment with isoxaben, an inhibitor of cellulose deposition (Van der Does et al. 2017). Allelic variation in *MIK2* has been associated with changes in rosette dry weight in response to mild salt (Julkowska et al. 2016) (Fig. 2). *MIK2* binds to SERINE RICH ENDOGENOUS PEPTIDE12 (SCOOP12), a phyto-cytokine that is secreted and regulates immunity in plants (Hou et al. 2021; Rhodes et al. 2021). These observations suggest an interaction between cell wall sensing pathways, including response to osmotic stimulation, and plant immune responses.

FERONIA (FER) is another CrRLK that participates in cell wall sensing. Loss-of-function studies have revealed that FER is involved in many processes such as cell elongation, root hair development, responses to hormones, nutrition and plant defense (Li et al. 2016). In addition, loss-of-function studies of FER have shown defects in responses to mechanical stimuli e.g. inability to penetrate hard layers of agar (Shih et al. 2014). FER has also a tight link to ABA signaling and loss of function plants show a resistant phenotype to osmotic stress and a hyper sensitivity to salt stress, although salt stress also results

in osmotic stress (Chen et al. 2016 PNAS) (Fig. 2). Feng and co-authors also highlighted the specific role of FER in response to salt stress (Feng et al. 2018). FER induces relatively late calcium influx in the cell that is needed to sustain cell wall reinforcement. It was proposed that FER would sense the impact of sodium ions on pectin filament organization, rather than directly sensing turgor or plasmolysis (Feng et al. 2018).

### Molecular mechanisms of early signaling

#### Calcium

Calcium is a secondary messenger that allows the transmission of many biotic and abiotic stimuli and converts them into cellular signals. Intracellular calcium homeostasis is modulated by channels, pumps and transporters. The calcium signal is transmitted by calcium-binding proteins that subsequently feed into signaling cascades (Dodd et al. 2010; Kudla et al. 2010). Fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  probes have been actively used to identify quantitative characteristics like amplitude or frequency of calcium responses; revealing the concept of calcium signatures for specific signals (Monshausen 2012). According to this, a pure osmotic stimulus induces intracellular calcium signals that are different from those induced by stimuli like cold or salt, that are only partially composed of an osmotic component (Tracy et al. 2008; Huang et al. 2017a). In addition,  $\text{Ca}^{2+}$  varies also in space within the cell, with the nucleus and cytoplasm responding differently to osmotic stimulation probably through independent molecular mechanisms (Huang et al. 2017a; Luo et al. 2020). Whereas OSCA1 appears as a crucial actor of osmotically driven calcium influx, the exact role of other mechanosensitive channels like MSLs or MCAs remains debated (Yuan et al. 2014; Stephan et al. 2016). Interestingly, intracellular compartments also play critical roles in controlling calcium signaling in response to osmotic signals. The  $\text{K}^{+}$  exchange antiporters (KEAs), which perform plastid localized potassium antiport, are needed to maintain plastid ion homeostasis. In corresponding loss of function plants, plastids were swollen and had impaired calcium influx after osmotic stimulation (Stephan et al. 2016). Nevertheless, the link between plastid ion homeostasis and calcium signaling remains to be explored. In addition, calcium signal decoding processes in response to osmotic signals remain largely uncharacterized.

At the root tissue level, imaging approaches have identified calcium movements according to water potential gradient (Shkolnik et al. 2018). The calcium flux propagates along the phloem until it reaches the root elongation zone to control hydrotropic responses, i.e. directed root growth towards higher soil water potentials (Shkolnik et al. 2018). Both the osmotic stress-induced

calcium increase and hydrotropic response need functional ECA1, an endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump, and MIZU-KUSSE1 (MIZ1) (Fig. 2). The latter gene was originally identified from a forward genetic screen based on hydrotropic response (Kobayashi et al. 2007). These data suggest that calcium participates as a secondary messenger at the cellular level but also at distances allowing hydrotropism.

#### ROS

In addition to calcium, reactive oxygen species (ROS) accumulate minutes after cell stimulation (Leshem and Levine 2007; Martinière et al. 2019). Superoxide, hydrogen peroxide, but also other ROS are generated from both cellular metabolism and through specific generator systems. Indeed, ROS not only represent stress-induced damaging components, but also serve as genuine cell secondary messengers (Devireddy et al. 2021; Fichman and Mittler 2020). Upon an osmotic signal, ROS was linked to root hydrotropic responses. Indeed, inhibition of peroxidases and Respiratory Burst Oxidase Homolog family (RBOHs), which are classical ROS consumer and producer respectively, induce altered root curvature when plants are grown on plate containing a water potential gradient (Krieger et al. 2016; Jiménez-Nopala et al. 2018). In fact, it was found that ROS accumulation in the elongation zone participate to root gravitropic response, maybe through regulation of autophagy and amyloplast degradation (Nakayama et al. 2012; Krieger et al. 2016). This agravitropic phenotype leads to a stronger hydrotropic response. Then, ROS function in tuning root tropic responses by promoting gravitropism and therefore negatively regulating hydrotropism response. Strikingly, the RBOHD and F can only partially account for the osmotically-induced ROS production. Indeed, upon signal, the cytoplasmic reducing power is transferred to the apoplasm, leading to ascorbate accumulation. Ascorbate is further used to reduce iron that reacts with di-oxygen to generate superoxide (Martinière et al. 2019). In cells, the ROS generated by RBOHs or the ascorbate/iron pair end up with different responses (Fig. 2). Whereas the two ROS generating pathways are needed for membrane internalization, RBOH-dependent ROS induces the internalization of specific cargo proteins such as the PIP2;1 aquaporin (Martinière et al. 2019). Interestingly, certain ROS species have the particularity of being able to travel through cell compartments. For instance, membrane transport of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) is facilitated by certain aquaporins localized at the PM (PIP1-4) (Tian et al. 2016), PIP2;1 (Rodrigues et al. 2017) or the tonoplast e.g. TIP1;1 and TIP1;2 (Bienert et al. 2007) (Fig. 2). Therefore,  $\text{H}_2\text{O}_2$  might itself regulate its own membrane permeability by acting on aquaporin cycling.

Recently, Rho of Plant6 (ROP6) was found to be necessary and sufficient to induce osmotically-induced ROS production (Smokvarska et al. 2020). Rho-GTPases (RAC/ROP) are involved in cell responses to various stimuli such as auxin, ABA or chitin elicitation (Feiguelman et al. 2018). ROPs are molecules that switch from an inactive to an active form by binding to GDP or GTP, respectively (Feiguelman et al. 2018). Models linking ROPs and NADPH oxidase have been described for root hair or pollen growth and immune response (Duan et al. 2010; Boisson-dernier et al. 2013). After osmotic stimulation, ROP6 is activated and recruited in PM domains of nanometric size, together with RBOHD and F (Fig. 2). Interestingly, the co-recruitment of RBOHDs within nanodomains seems to be specific for the osmotic signal. To convey auxin signaling, ROP6 has also to form nanodomains, which however are exempt of RBOHDs. As a result, no ROS accumulates in cells under auxin treatment (Platre et al. 2019; Smokvarska et al. 2020). These observations suggest that the ROP6 activation mechanism can itself control the specificity of the downstream response.

Osmotically-induced ROS are associated with numerous downstream cellular and physiological responses such as a decrease in root hydraulic conductivity or accumulation of compatible osmolytes like proline (Boursiac et al. 2008; Ben Rejeb et al. 2015). Detoxification mechanisms through specific enzymes like superoxide dismutases (SOD), ascorbate peroxidases (APX), catalases (CAT), glutathione peroxidases (GPX) and peroxiredoxins (PRX) (Mittler et al. 2004) are needed. For instance, AtGPX3/GPXL3 was linked to drought stress and ABA signaling. *Atgpx3/gpxl3* plants showed enhanced water losses under drought stress (Miao et al. 2006). In vitro phosphorylation assays showed that oxidized AtGPX3/GPXL3 acts on phosphatase activity of ABA INSENSITIVE2 (ABI2) (Miao et al. 2006). Consistently, AtGPX3/GPXL3 links ABA signaling, ROS and osmotic signaling. Because the AtGPX3/GPXL3 catalytic domain is facing the lumen of the secretory pathway, it remains muddled how AtGPX3/GPXL3 oxidation is mechanistically associated to ABI2 (Attacha et al. 2017).

### Systemic signaling and developmental responses

To cope with their complex and fluctuating environment, plants have to constantly sense the surrounding fluctuations and integrate all this local information into coordinated whole plant responses.

This is accomplished through a complex systemic communication network involving a wide spectrum of physical, chemical and molecular components. The following section will explore the molecular bases of long distance osmotic signaling in plants from 3 types of signals, which are hydraulic, electric and chemical in nature. We will focus

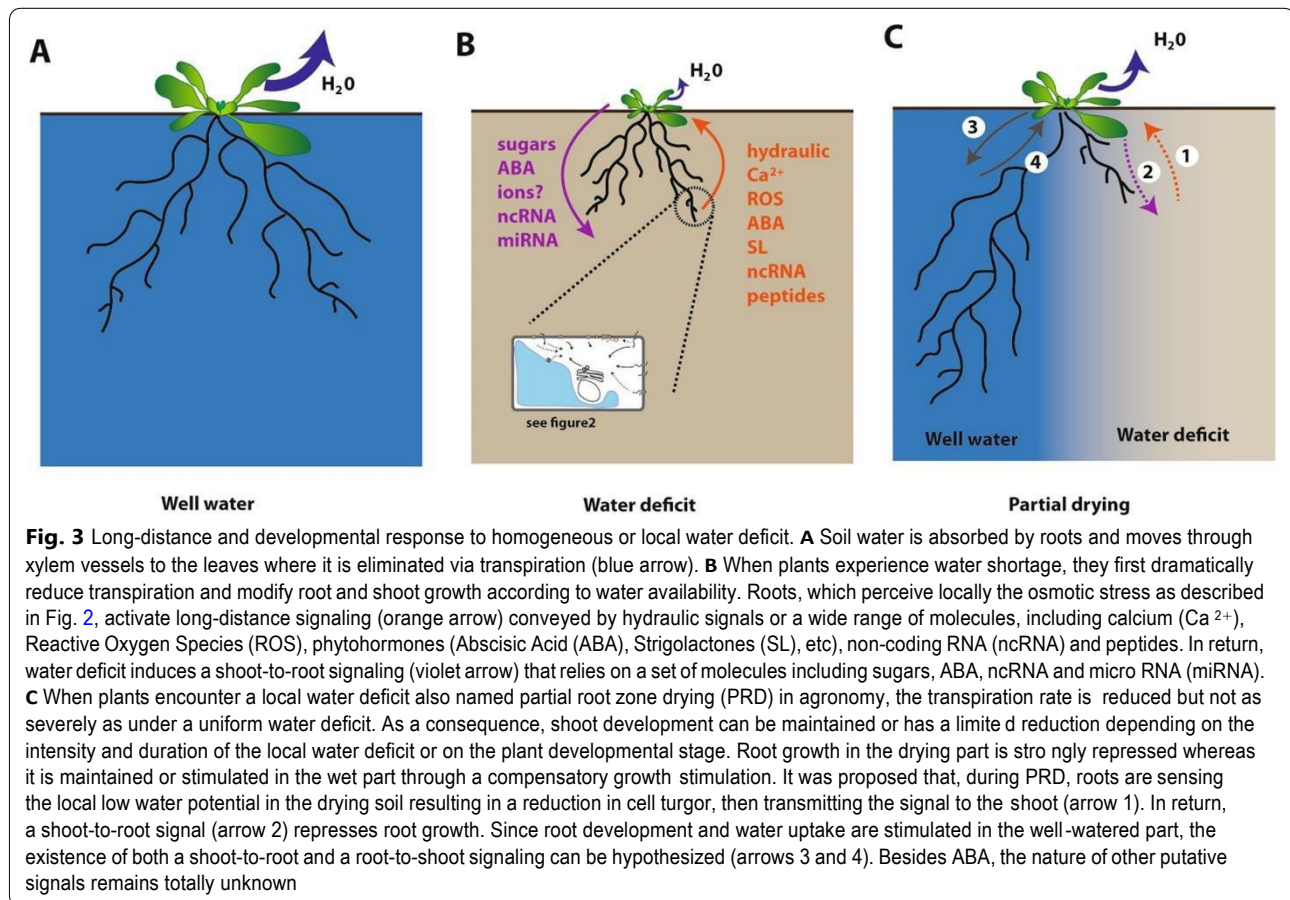
on inter organ signaling and more specifically on the root to shoot and shoot to root signals. Long distance communication has long been proposed to use the mass flow of sap within the vascular system. Accordingly, many molecules have been identified as traveling from root to shoots through the xylem vessels or from shoots to roots through phloem (reviewed in Ham and Lucas 2017; Winter and Kragler 2018).

### Molecular bases of long distance signaling

#### Hydraulic signal

Water absorbed by roots is axially transported along the xylem towards shoots down the plant water potential gradient. Leaf water potential, which is the lowest in the plant, induces a tension in the vessels. Thus, any physical damage or disturbance that breaks the integrity of the water column present in the xylem vessels can release this tension, thereby inducing a pressure change that will almost instantly be transmitted through the vasculature. This physical signaling named hydraulic signaling has been proposed several decades ago to be involved in the fast response to leaf wounding (Houwink 1935) (Fig. 3B). The pressure wave generated through this process may be involved in the propagation of chemicals from the wounded tissue or directly trigger mechanical systemic signals in sensitive tissues (Farmer et al. 2014; Evans and Morris 2017). However, wounding experiments suggest that the hydraulic signal is moving up to 10,000 times faster than the observed propagation of the  $Ca^{2+}$  in tissues, thereby challenging the idea of a chemical propagation (Evans and Morris 2017). Nevertheless, more recent work suggests that change in hydraulic pressure induced by wounding is abolished in *rbohD* (NADPH oxidase) and *glr3.3 glr3.6* (glutamate receptor-like protein) (Fichman and Mittler 2021). This suggests that hydraulic signal is not solely determined as a physical signal. In response to water deficit, the turgor pressure of leaf cells rapidly declines when roots experience water shortage. A drop in soil local water potential can also modify root turgor pressure and ultimately xylem tension. These changes can propagate from root to shoots as a so called hydraulic signal (Christmann et al. 2007; Christmann et al. 2013). Alterations in root turgor pressure were also found to induce local accumulation and signaling of the well characterized water stress hormone Abscisic Acid (ABA) both in root and shoots (Christmann et al. 2007) indicating that hydraulic signaling may somehow be correlated to ABA signaling. However, a rapid response of stomata to water deficit was also observed in the ABA biosynthesis mutant (*aba2*) or signaling mutant (*abi1*) indicating an ABA independent signal (Christmann et al. 2013). In addition, grass stomata have subsidiary cells coupling osmotic and turgor adjustment to fasten





stomatal movements (Franks and Farquhar 2007; Raisig et al. 2017). The action of hydraulic signals transmitted through the plant vasculature to the stomata thereby represents a rapid signaling mechanism well correlated to plant architecture and anatomy. However, whether the putative hydraulic signal is translated locally into chemical signals like ABA or acts locally through as yet unknown leaf structures remains an experimental challenge and a matter of vivid debate (Evans and Morris 2017; Farmer et al. 2020).

#### Electrical signal

Electrical signals have initially been identified in the folding of leaflets and petiole movements of *Mimosa pudica* in response to mechanical and other physical stimuli. These movements are driven by a turgor-powered motor and the rapid signaling involved appears linked to propagation of electrical signals that are moving through the sieve tube (recently reviewed by Johns et al. 2021). Plants maintain a  $-200$  mV electrical potential difference across their plasma membrane through the action of ion channels, pumps (including  $\text{H}^+$ -ATPases) and transporters. Transient depolarization and repolarization events

with set amplitude, velocity and duration or variation of potential can convey key information about the strength and distance of the stimulus that triggered such electrical signals, within and between plant organs. These signals rely on fluxes of ions including  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$  or  $\text{Ca}^{2+}$ , the latter being the most documented. Electrical signaling has been reported to be involved in the response to heat, cold, touch, salt, flooding, hypoxia, osmotic stress, and drought (reviewed by Wilkins et al. 2016; Kudla et al. 2018). To explain such wide range of responses, it was hypothesized that the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels controlling cell influx contain a stress-specific fingerprint that varies in amplitude, timing, and frequency and can be formed by the activation of different  $\text{Ca}^{2+}$  channels depending on the different stresses (Wang et al. 2019). In the case of drought,  $\text{Ca}^{2+}$  has been reported to move up in the transpiration stream and may couple  $\text{Ca}^{2+}$  supplied from the roots to stomatal response in the leaves (Han et al. 2003) (Fig. 3B). Storti et al. (2018) also measured  $\text{Ca}^{2+}$  waves propagation in response to osmotic stress in the non-vascular moss *Physcomitrella patens*. The lower propagation rate compared to the one measured in *Arabidopsis* confirms the cell-to-cell and vascular

dependent routes. Such mobile  $\text{Ca}^{2+}$  has recently been found to act through a plastid based receptor system in the guard cells that itself may further integrate these responses with other stimuli as observed during photoacclimation (Cutolo et al. 2019).

ROS accumulation and calcium production are closely interconnected and enhance each other during abiotic stress. For instance, superoxide produced by RBOH D activates calcium channels, which activate the vacuolar calcium channel TWO PORE CHANNEL1 (TPC1). This releases  $\text{Ca}^{2+}$  into the cytosol which in turn enhances the activation of RBOH protein D (Evans et al. 2016). This calcium/ROS feedback loop is likely instrumental for propagation of the ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  waves during salt stress and a proper acclimation response. However, until recently, it remained unknown how ROS are perceived by cells to trigger calcium waves. The Leucine-rich-repeated receptor kinase (HPCA1) was identified from a forward genetic screen for impaired ROS-induced  $\text{Ca}^{2+}$  waves (Wu et al. 2020). Via covalent modification of its extracellular cysteine residues, HPCA1 is autophosphorylated, activated calcium influx and is required for stomata closure after  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment. In a preprint, HPCA1 appear to be also necessary for propagation of ROS/Ca waves in response to high light signal (Fichman and Mittler 2020). Drought and high temperatures both induce calcium and ROS waves across the plasma membrane, but no in-depth mechanistic analysis on long distance propagation has been performed yet. The many different origins of ROS and corresponding  $\text{Ca}^{2+}$  waves suggest sophisticated signaling mechanisms. Thus, integrative studies are still needed to sort between the common and specific ROS-calcium signaling pathways that contribute to the specificity of plant responses to different stress conditions.

### **Sugars and long distance signaling**

Drought, high salinity or temperature dramatically modify the metabolic profiles of plants (Urano et al. 2010; Cramer et al. 2011). It has long been proposed that uncharged metabolites such as proline or glycine-betaine, accumulate to promote water retention in the plant tissues without interfering with normal metabolism (Verslues and Sharma 2010). They, in concert with other specialized/secondary metabolites, also act as free radical scavengers removing excess ROS and reestablishing a cellular redox balance (reviewed by Takahashi et al. 2020). Sucrose, glucose, and fructose also highly accumulate in roots upon exposure to drought suggesting they can replace other osmolytes as major compatible solutes (reviewed by Takahashi et al. 2020). More recently, sugars have emerged as key players during shoot to root communication in response to water stress (Fig. 3B). In Arabidopsis, phloem transport of sucrose is mainly achieved

through the activity of sugar transporters. Phloem loading of sucrose from photosynthetic leaf mesophyll cells is mediated first by the vasculature-localized sugar transporters SWEET11 and 12. They move sucrose from parenchyma cells into the apoplast where it is loaded into phloem companion cells by SUC2 (Chen et al. 2012). In the root, sucrose is unloaded either through an apoplastic pathway (via SUC/SWEET sugar transporters) or through a symplastic pathway (via the hydrostatic pressure) (Milne et al. 2018). Very recently Chen et al. (2022) showed that both SWEET11 and 12 are phosphorylated by drought or ABA activated SNF1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2) protein kinases, which enhance sucrose export to roots. This increased allocation is modulated by ABA signaling, promotes root development and increases foraging. The putative link between this sucrose dependent root growth stimulation and the SnRK1–target of rapamycin (TOR) energy signaling pathway remains to be elucidated. Indeed, sucrose accumulation may release the TOR1 dependent repression of transcription factors such as bZIP1, bZIP11 and bZIP53 or local auxin accumulation in primary root tip thereby promoting root growth (Hartmann et al. 2015; Weiste et al. 2017). Under drought stress, ABA activated SnRK2 can however phosphorylate TOR, thereby modulating the tradeoff between plant growth and drought response stress (Wang et al. 2018). A similar role for TOR can also be considered for primordia initiation through the regulation of WOX7, a sucrose dependent repressor of the cell cycle gene CYCD6 (Kong et al. 2016).

ABA also induces trehalose accumulation which in turns inhibits root growth (Wang et al. 2020). Finally, trehalose 6-phosphate (Tre6P) has also been demonstrated as a key regulator of source-sink relationships (Figuerola and Lunn 2016). In Arabidopsis, Tre6P is produced in the phloem and stomatal guard cells (Fichtner and Lunn 2021). Tre6P synthase (TPS), the enzyme that synthesizes Tre6P, plays a key role in the nexus between sucrose and Tre6P, operating in the phloem loading zone of leaves. Tre6P has a dual function as a signal molecule and homeostatic regulator of sucrose levels in plants in response to abiotic stresses such as drought. Most flowering plants contain barely detectable amounts of trehalose compared to sucrose. Despite the low amount of Tre6P, overexpression of TPS and TPP enzymes led to severe growth and developmental defects suggesting that changes in the level of Tre6P, the intermediate in the pathway, rather than in the level of trehalose itself, were responsible for the phenotypes. The concept that Tre6P functions primarily as a signal and regulator of sucrose levels in plants supports the existence of systemic signals for source-sink coordination (Fichtner et al. 2020; Fichtner and Lunn 2021). In growing sink organs, Tre6P would regulate the

utilization of sucrose for growth and the accumulation of storage reserves, in part via complex interactions with TOR (Figueroa and Lunn 2016).

Taken together, shoot-originated sucrose and its underlying signaling network involving ABA and other phytohormones, SnRK2, TOR and potentially Tre6P seems to be involved in the fine tuning of root development under drought. Yet, further exploration is needed to better characterize the complex interactions shaping these signaling networks.

### Hormones

Several hormones have been identified both in xylem and phloem sap and have been proposed to play a key role in the coordination of systemic stress response (Fig. 3B). Among these, ABA has been identified for long as a master regulator of plant responses to drought-, salt-, osmotic-, and freezing-based water limitations. ABA mediates drought stress response and resistance by regulating stomatal closure and stress responsive gene expression (Cutler et al. 2010). The involvement of ABA in drought responses has been extensively documented (recently reviewed by Kuromori et al. 2022) and will not be detailed here. In response to drought stress, ABA accumulates in all plant tissues but its accumulation is dramatically enhanced in leaves and more specifically in the vasculature of leaves as most of the ABA biosynthesis genes are expressed in this tissue (Kuromori et al. 2018). In addition, several ABA transporters are predominantly expressed in vascular tissues. Thus, long distance transport of ABA can occur through both xylem (Davies and Zhang 1991; Schachtman and Goodger 2008; Jiang and Hartung 2008) and phloem (Zhong et al. 1996), with reports of both root and shoot derived pools during water stress (Hartung et al. 2002; Manzi et al. 2015). Although the vasculature and apoplastic areas are described as the typical routes for systemic signaling, it is not completely understood how ABA movement from tissue to tissue is regulated. Recent studies have suggested that signaling peptides could be involved in the ABA dependent long distance signaling (see below).

Strigolactones (SL) form the most recently discovered class of phytohormones. ABA and strigolactones share a carotenoid precursor, from which strigolactone synthesis proceeds through a partially known series of enzymes to produce bioactive strigolactones (reviewed by Waters et al. 2017). Strigolactones have been shown to modulate several aspects of root and shoot development and interactions with rhizosphere organisms (Al-Babili and Bouwmeester 2015; Lanfranco et al. 2018). They also are thought to be involved in nutritional and abiotic stresses (Mostofa et al. 2018). Several dicot plants with defective strigolactone synthesis or signaling are hypersensitive to

drought, salt and osmotic stress while exogenous application of SL reinforce drought tolerance in many species (Cardinale et al. 2018). In *Arabidopsis*, *Lotus japonicus* and tomato, SL positively control stomatal movements. Indeed, mutants in SL biosynthesis exhibited reduced stomatal closure (Ha et al. 2014; Liu et al. 2015; Visentin et al. 2016) whereas enhanced closure and drought tolerance was observed in plants treated with exogenous SL or over producing SL (Lv et al. 2018; Visentin et al. 2016; Zhang et al. 2018). Using grafting experiments in tomato, Visentin et al. (2016) confirmed that drought results in reduced SL accumulation in roots and over accumulation in shoots. Their experiments demonstrated that under-accumulation of SL in roots is responsible for its over accumulation in shoots. Thus, SL was identified as a long distance signal for drought dependent stomatal closure. SL acts on stomatal closure both in an ABA dependent and an ABA independent manner. The ABA-dependent pathway relies, at least in part, on ABA synthesis, transport and/or sensitivity. Accordingly, SL depletion decreases sensitivity to exogenous ABA in several species (Lv et al. 2018; Visentin et al. 2016). On the other hand, treatment with the synthetic SL analogue GR24 increases sensitivity to ABA in tomatoes (Visentin et al. 2016). Recently, Visentin et al. (2020) identified SL as a molecular component linking drought to miR156 accumulation and integrated miR156 in a model that links SL and ABA in tomato.

Also, it should be noted that the above-described model may be dependent on drought stress intensity and may be restricted to dicot plants. In rice, for instance, most SL biosynthetic mutants produce more ABA than the wild-type and thus are more resistant to drought (Haider et al. 2018). Finally, the local and systemic effects of drought-dependent under accumulation of SL in roots remain poorly documented.

Besides ABA and SL, several other hormones that have been identified in xylem and phloem sap (reviewed by Koenig and Hoffmann-Benning 2020) have been proposed to participate in plant adaptive responses to water deficit. For example, Brassinosteroids and Auxin are involved in the regulation of root and shoot growth under drought (reviewed by Gupta et al. 2020). Cytokinins were reported to mitigate water deficit growth limitation and stabilize yield (Hai et al. 2020). Finally, methyl jasmonate, that is well known for mediating long distance signaling in response to wounding or biotic stresses induces stomatal closure similar to ABA (Huang et al. 2017b). Jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) was also associated with osmotic signals, since it accumulates in cells under hypo-osmotic condition and conversely is reduced under hyperosmotic stress (Mielke et al. 2021, Science advances). The involvement of multiple hormonal

pathways in different plant tissues emphasizes the complexity of plant hormonal responses to drought (reviewed by Hai et al. (2020); Sirko et al. (2021) and Kuromori et al. (2022)) and their role in long distance signaling of water deficit most often remains to be established.

### **Nucleic acids**

Nucleic acids, more specifically RNA species, are among the most well studied long distance signaling molecules. In their extensive recent review Gelaw and Sanan-Mishra (2021) collected a large panel of non coding RNA that are differentially expressed in response to drought suggesting a central role in signaling (Fig. 3B). Representatives of all types of RNA, such as mRNA, micro RNA (miRNA), small interfering RNA (siRNA), and other non-coding RNA (ncRNA) have been identified in the sap of many plant species including Arabidopsis, rice, barley, maize, pumpkin and many others (Kehr and Kragler 2018; Liu and Chen 2018; Guo et al. 2013; Westwood 2015). As systemic signals, mobile RNAs are regulatory elements by which plants respond to dynamic changes in the environment. Breakthrough studies on the regulatory mechanisms of long-distance RNA transport have been made in recent years. For detailed reviews of RNA trafficking see the publications of Ham and Lucas (2017); Kehr and Kragler (2018); Liu and Chen (2018) or Zhang et al. (2021a, b). While the existence of mRNAs and ncRNAs in the vascular system hints at their mobility and possible role, identification alone does not conclusively prove movement or physiological function. By using homo (intra species) and hetero (inter species) grafting, many studies in model plants, crops and woody plants have provided evidence for mobile mRNAs (Notaguchi et al. 2015, Thieme et al. 2015, Liu et al. (2020) and lncRNA (Zhang et al. 2009; Zhang et al. 2021a, b). Similar results were also reported for miRNAs (Pagliarani et al. 2017; Tolstyko et al. 2019). Data suggest that environmental conditions, including water deficit, may affect transcript mobility, independent of changes in gene expression (Thieme et al. 2015; Zhang et al. 2016; Tolstyko et al. 2019). In line with these results, Zhang et al. (2016) demonstrated that the transmissibility of mobile mRNAs is related to tRNA-like structural elements (TLs). TLs can modulate mRNA transport and are necessary for mediation of mRNA movement across the grafting junction. Recent studies by Yang et al. (2019) have shown that RNAs can contain 5-methylcytosine (M5C) and that this methylation can regulate long distance mRNA transport. Other studies have identified additional selective mechanisms including specific sequence motifs. For instance, untranslated regions or cis acting elements at 5' end appear to influence transcript stability for transport, impact delivery to

distal tissues and translation level (Banerjee et al. 2009; Li et al. 2009). Using a long stem hetero grafting system, Xia et al. (2018) showed that the abundance and the structure of mRNAs were degraded during the trafficking, suggesting putative modulation to stress response. Furthermore, using an elegant triple hetero grafting approach with a potato and a *Nicotiana benthamiana* scions grafted onto a tomato root stock, it was shown that mRNA transferred from the scion to the stock can be transported back to the scion after being transported again to shoots in a “shoot-root-shoot” cycling process (Xia et al. 2018; Wang et al. 2021). Taken together, the wide range of molecules, transport regulation and processing steps point to an extremely complex regulation network of long distance signaling.

### **Proteins and peptides**

Several proteomic studies have identified up to thousands of proteins and peptides both in the xylem and phloem sap (Rodriguez-Medina et al. 2011; Carella et al. 2016). Recent analyses have elucidated the molecular mechanisms involving the long distance regulatory protein Flowering Locus T (FT). This 20 kDa protein is phloem mobile from leaves to shoot apical meristem where it acts as a florigen signal inducing flowering transition (Putterill and Varkonyi-Gasic 2016). Besides this well documented example very little is known about protein signaling functions. Nevertheless, mobile peptides form an important class of molecules possibly involved in long distance signaling in response to abiotic stress. Over 7000 small open reading frames (ORF) can be expressed in response to a wide range of environments in Arabidopsis suggesting a multitude of functions (Hanada et al. 2007; Hanada et al. 2013; Ren et al. 2021) (Fig. 3B). A recent study has shown that the CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-related25 (CLE25) peptide is a mobile, long-distance signaling molecule originating from roots and sensed in leaves where its perception induces ABA biosynthesis and stomatal closure (Takahashi et al. 2018). CLE25 was found to be produced in root vasculature and moves from root to shoots through the vascular system. In leaves, it is recognized by the BARELY ANY MERISTEM1 (BAM1) and BAM3 receptors that induce NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE3 (NCED3) expression to enhance ABA accumulation in leaves. This, in turn, regulates stomatal aperture in response to dehydration stress thereby reducing water losses (Takahashi et al. 2018). Although the mechanisms involved in regulating CLE25 production, loading and unloading, and CLE25–BAM ABA production remain to be elucidated, these results identify the CLE25–BAM long-distance signaling system as a key component



of drought stress response. Interestingly, other CLE peptides (CLE 9/10) were found to be involved more locally in stomatal development and regulation (Qian et al. 2018). CLE9 has also a role in stomatal closure in response to drought in a ABA dependent manner (Zhang et al. 2018). While this peptide-dependent mechanism is definitely slower than hydraulic signaling, it may be an important component during mid-term and long-term dehydration stress responses. It may also be involved in the response to gradual soil drying as generally observed under natural conditions. One can also expect that the CLE-BAM long distance signaling mechanism plays a crucial role under heterogeneous water supply to the roots, when part of the root system experiences water deficit while other parts are well-watered. Interestingly, a similar mechanism has also been reported in response to nitrogen deficiency. Local root nitrate deficiency induces production of C-TERMINALLY ENCODED peptides (CEP) that are translocated to shoots where they are recognized by the CEP Receptor (CEPR). This in turn induces the local accumulation and transport to roots of the CEP DOWNSTREAM1 and 2 (CEPD1 and 2) polypeptides (Ohkubo et al. 2017). Thus, the CEP-CEPR-CEPD system mediates long-distance signaling from roots to shoots to roots in order to transmit the nitrogen deficit signal throughout the whole plant. Interestingly, a similar roots-to-shoots-to-roots signaling has also been documented during the control of nodule formation in the legume plant *Lotus Japonicus*. This systemic regulation that involves cytokinins connects nutritional status, development and hormonal signalization (reviewed by Okamoto et al. 2016; Ferguson et al. 2019). Similar mechanisms have not yet been reported in response to drought but several works identified CEPs which expression is induced by water deficit (Smith et al. 2020) suggesting they could also exist to adjust and coordinate development and water homeostasis.

#### Physiological and developmental response to soil water heterogeneity

Heterogeneity of water availability around plant roots is a widespread phenomenon, occurring both in natural and agricultural environments (Fig. 3C). At macro-scale, when rainfall or irrigation are limited, the upper soil layers typically dry faster as they are exposed to evaporation and water uptake by plant roots where their density is the highest. This results in an uneven vertical distribution of soil moisture with depth (Beff et al. 2013; Mohanty 2013; Zhang and Davies 1989). Water availability can also be horizontally heterogeneous, because of plant competition and local soil water retention (Ivanov et al. 2010). Due to the high heterogeneity in structure and composition of soil, water can also be heterogeneously distributed at

the local or micro scale. One of the most striking examples is the presence of macropores that locally induce an extreme water deficit (see extensive reviews by Beven and Germann 1982 and Jarvis 2007). Recent studies have identified the molecular mechanisms that allow roots to locally sense moisture gradients and direct their growth or formation of new lateral roots towards increased water availability. These local adaptations to water availability are referred to as hydrotropic response (Dietrich et al. 2017) and hydropatterning (Bao et al. 2014; Orosa-Puente et al. 2018), respectively. Similarly, Orman-Ligeza et al. (2018) described a process called xerobranching which accounts for the repression of lateral root formation when a root grows through a large air-filled soil macropore. In all cases, root tip growth and root branching are positioned towards regions of higher water availability. While many mechanistic details are being uncovered from laboratory experiments, it will be fascinating and critical to understand how these growth and development adjustments mutually interact and operate during growth of roots in real, drying soils and how they allow optimizing soil foraging and water uptake at the whole plant level.

As an illustration, irrigation strategies have been introduced in agriculture to deliberately create a heterogeneous distribution of soil water, both spatially and temporally. One of these techniques called partial root zone drying (PRD), aims at locally irrigating a limited part of the root system while the other part of the root system faces water deficit (Dbara et al. 2016; Fu et al. 2017; Puértolas et al. 2015; Stoll et al. 2000). In agricultural production, PRD usually requires a regular permutation of watered and unwatered sides, to ensure the survival of the entire root system, thus forming a cycle of root drying and wetting. This technique was found to improve water use efficiency (WUE) compared to irrigation at field capacity in many greenhouse and field trials (Iqbal et al. 2020). For several crops, such as cotton (Du et al. 2008; Tang et al. 2005), tomato (Kirda et al. 2004; Zegbe et al. 2006), hot pepper (Kang et al. 2001; Shao et al. 2008), grape (De la Hera et al. 2007), and pear (Kang et al. 2002), PRD improved WUE without significant effect on yield compared to fully irrigated plants. However, studies in other crops showed more contrasted results. In maize for instance, some studies showed improved WUE with no reduction or even increase of grain yield (Fu et al. 2017; Kang et al. 2000; Sepaskhah and Khajehabdollahi 2005; Sepaskhah and Parand 2006) whereas another showed a lowered grain yield (Hakeem et al. 2016).

It is proposed that, during PRD, the drying roots sense the locally low water potential resulting in a reduction in cell turgor and thereby inducing a systemic partial stomatal closure and reduced leaf expansion. Concomitantly, roots in wet parts of the soil absorb large amounts of soil water to maintain elevated water content in shoots, consequently increasing water use efficiency (Kang and Zhang 2004; Christmann et al. 2013). Alteration of leaf growth and development and changes in metabolism can hinder the use of carbon, energy, and allocation of the plant's photoassimilates, which are then preferentially reallocated to roots enhancing root expansion in their irrigated part (Taiz and Zeiger 2006). Yet, the nature of the local and systemic signals involved in responses of the whole root system remains unknown. At the functional and molecular level, temporal PRD study in a riparian *Melaleuca* species showed the root hydraulic conductance and aquaporin abundance to be rapidly increased in the wet side (within 24 hours) after local dehydration of the root system (McLean et al. 2011), suggesting a systemic compensation and regulation of water uptake during PRD.

Several investigations have been carried out using a split-root system to mimic PRD and explore the local and systemic signaling governing PRD. ABA is the most studied non-hydraulic signal that may regulate and coordinate the underlying developmental and functional responses. Early studies have shown that tomatoes under root-zone water deficit had a lower stomatal conductance and greater root hydraulic conductivity due to overproduction of ABA (Thompson et al. 2007). However, Liu et al. (2008) noted that PRD plants had a lower stomatal conductance and similar photosynthesis compared to fully irrigated plants. Yet, the xylem sap ABA concentration of PRD plants was not higher than fully irrigated plants in the first day of PRD, making ABA questionable as the root to shoot signal in the early stage of PRD.

The different effects of water heterogeneity within the root zone have also been explored in pot experiments (Puértolas et al. 2013; Puértolas et al. 2015). In a set of experiments using beans (Puértolas et al. 2013) or potatoes (Puértolas et al. 2015) grown in soil columns that received different irrigation treatments to induce distinct vertical soil moisture gradients, it was observed that root ABA concentration and root water potential were homogeneous within the different root parts. On the contrary, horizontal heterogeneous soil moisture induced much higher ABA accumulation in the roots (Puértolas et al. 2015). These results and others on barley (Martin-Vertedor and Dodd 2011) challenge a direct correlation between local water deficit and ABA signaling. Many molecules including sugar, proline and other metabolites

(Abdallah et al. 2019; Iqbal et al. 2019; Raza et al. 2017) or proteins (Sadak et al. 2019; Sadak et al. 2020) were found to be produced and over accumulate under PRD irrigation conditions (Fig. 3C). However, there is no direct evidence yet to prove a possible role in systemic signaling. Furthermore, the role during PRD of other putative signals such as small RNA, microRNA, ncRNA and peptides has not been explored yet (Fig. 3C).

### Conclusion and prospects

In recent years, much progress has been made in deciphering the mechanisms for sensing and signaling water deficit. The identification of several sensing molecules exemplify the central role of osmosensing in plant. But, how these molecules interconnect remains mostly unexplored. They might act in parallel pathway reflecting the diversity of osmotic signal that cells have to face. Alternatively, they could share some redundancy in the perception machinery or in triggering the downstream signaling. Unfortunately, our current knowledge remains too fragmented to assess the proper kinetic of events. Interestingly, most of the molecular actors described so far are localized to the plasma membrane, as it is suspected to be the ideal place for water sensing. Nevertheless, we realize that changes in cell volume or turgor could be perceived in subcellular compartments or structures deprived of membranes. For instance, liquid-liquid phase separation (LLPS) is a process where two liquids can be separated into non-miscible phases depending on concentration and which can be modulated by physico chemical alterations of the system (Cuevas-Velazquez and Dinneny 2018; Korkmazhan et al. 2021). LLPS can happen at many cell locations including contacts with a membrane but also in the cytoplasm or nucleoplasm, where it was originally discovered (Nucleolus, Cajal bodies, nuclear speckles). In animal cells, processing bodies (PBs) containing mRNA-decapping enzyme 1A (DCP1A) are examples of subcellular compartments that are deprived of membranes and rapidly phase separate under hyperosmotic stress while dissolving back upon isotonic rescue (Jalihal et al. 2020). These PBs sequester pre-mRNA cleavage factors from actively transcribing genome loci (Jalihal et al. 2020). This example provides a mechanical framework for gene regulation under hyper-osmotic stimulation. Similarly, the apoptosis signal-regulating kinase 3 (ASK3) is inhibited by phase separation under hyperosmotic stress (Watanabe et al. 2021). In plants, phase separation can be associated to many processes like regulation of flowering time, temperature sensing, and auxin or SA signaling, (Fang et al. 2019; Powers et al. 2019; Zavaliev et al. 2020; Jung et al. 2020). Regarding water sensing, FLOE1, a prion like structured

protein, undergoes phase separation in vitro and during seed imbibition (Dorone et al. 2021). The biophysical state of FLOE1 modulates its biological activity in suppressing seed germination under unfavorable environments. Moreover, it was found that natural variation in the coding sequence of FLOE1 is associated with adaptive germination strategies in natural populations (Dorone et al. 2021). These findings on significance of LLPS in biology open new avenues to re-investigate the molecular mechanisms of plant osmotic sensing.

Like for osmotic perception, a large and ever increasing number of molecules have been proposed to act in local and long distance signaling of water availability. Strikingly enough, most of these signaling molecules and their corresponding receptors are likely to possess more functions than those that were originally assigned, revealing a complex array of interactions and interplays. Moreover, these molecular mechanisms have been identified in a limited number of model plants cultivated under highly controlled and often artificial growth conditions. In contrast, responses at the whole plant level have been mostly investigated in crops or understudied species. This is particularly striking for PRD where researches were conducted in crops/trees grown in a wide range of stresses (localization intensity, duration). Thus, it is difficult to integrate all available information to build a systemic signal network for plant response to heterogeneous water distribution. Furthermore, many of the signal molecules and mechanisms identified under homogeneous water deficit condition have not been or very partially investigated under heterogeneous water distribution.

Accordingly, little is known about the nature, the temporality and the function of sensing and local and systemic responses to heterogeneous water availability. We believe that studying rapid and long term responses to local water deficit in model species and under controlled conditions should lead to breakthroughs in the identification of the molecules and of their interactions that trigger plant acclimation responses. Identifying the main actors that trigger, prime or coordinate plant responses to water availability will provide a first step toward improving the efficiency and coordination of these responses. In the long term, these studies will allow identifying novel breeding targets to enhance crop tolerance to drought and develop new varieties that are well adapted to water saving irrigation strategies.

#### Abbreviations

ABA: Abscisic Acid; ABI: Abscisic Acid Insensitive; APX: Ascorbate Peroxidases; ASK3: Apoptosis Signal-regulating Kinase 3; At: *Arabidopsis thaliana*; BAM1: Barely Any Meristem 1; bZIP: Basic region, leucine Zipper; Ca<sup>2+</sup>: Calcium; CAT: Catalases; CEP: C-terminally Encoded Peptides; CEPD: CEP Downstream; CHO: Chinese Hamster Ovary; Cl: Chloride; CLE25: CLAVATA3/

EMBRYO-SURROUNDINGREGION-related25; CrRLK: *Catharanthus roseus* RLK1-Like kinases; CSC1: Calcium-permeable Stress-gated cation Channel 1; CYCD: Cyclin D; DCP1A: mRNA-Decapping enzyme 1A; EF domains: Helix-loop-helix structural domain; EMS: Ethyl Methane Sulfonate; ECA1: Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump; E PCSs: ER-plasma membrane Contact Sites; FER: FERONIA; FLOE: "Sheet of floating ice"; FT: Flowering Locus T; GLR: Glutamate Receptor-like protein; GPX: Glutathione Peroxidases; H<sup>+</sup>: Hydrogen; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen peroxide; HEK: Human Embryonic Kidney; HK: Histidine Kinases; HOG1: High Osmolarity Glycerol 1; HPCA1: Hydrogen Peroxide sensor; K<sup>+</sup>: Potassium; KEAs: K<sup>+</sup> Exchange Antiporters; LLPS: Liquid-Liquid Phase Separation; lncRNA: Long non coding RNA; LRK: Lectin Receptor-Kinase; LRR: Leucine Repeat; M5C: 5-methylcytosine; MAP kinase: Mitogen-Activated Protein Kinases; MCA1: Mid1-Complementing Activity; MIK2: MALE DISCOVERER 1-INTERACTING RECEPTOR-LIKE KINASE 2; MIZ1: MIZU-KUSSEI1; mRNA: Messenger RNA; miRNA: Micro RNA; MscS: Mesenchymal stem cells; MSL: MscS-like; NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen; NCED3: NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXY-GENASE3; ncRNA: Non-coding RNA; ORF: Open Reading Frames; OSCA1: REDUCED HYPEROSMOLALITY-INDUCED [CA<sup>2+</sup>] INCREASE 1; PBs: Processing Bodies; PCD: Programmed Cell Death; PRD: Partial Root zone Drying; PERKs: Proline-rich Extensin-like Receptor Kinases; PIP: Plasma membrane Intrinsic Protein; PM: Plasma Membrane; PRX: Peroxiredoxins; PTI: Pattern-Triggered Immunity; RALF34: Rapid Alkalinization Factor; RBOHD and F: Respiratory Burst Oxidase Homolog D and F family; Rho: Ras-homologous family proteins; RLKs: Receptor Like Kinases; RNA: Ribonucleic acid; ROP6: Rho of Plant 6; ROS: Reactive Oxygen Species; RSA: Root System Architecture; SA: Salicylic Acid; SCOOP12: SERINERICHENDOGENOUS PEPTIDE12; siRNA: Small interfering RNA; SL: Strigolactone; SLN1: Synthetic Lethal of N-endrule 1; SnRK: SNF1-RELATED PROTEINKINASE; SOD: Superoxide Dismutases; THE: THESEUS; TIP: Tonoplast Intrinsic Protein; Tl: tRNA-Like structural elements; TOR: Target Of Rapamycin; TPC1: Two Pore Channel 1; TPS: Tre6P Synthase; Tre6P: Trehalose 6 Phosphate; TM: Trans Membrane; WAK: Wall Associated Kinases; WOX: Wuschel-like homeobox; WUE: Water Use Efficiency.

#### Acknowledgements

We acknowledge the aqua group members for fruitful discussions.

#### Authors' contributions

A.M and P.N conceived the overall organization of the manuscript. L.G, X.L. A.M and P.N. wrote the manuscript and designed the graphical arts. C.M. supervised and contributed to the final version of the manuscript. The author(s) read and approved the final manuscript.

#### Fundings

This work was supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE20-0008-01) and the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (Grant Agreement ERC-2017-ADG-788553).

#### Availability of data and materials

Not Applicable.

#### Declarations

#### Competing interests

C.M. is a member of the Editorial Board but was not involved in the journal's review of, or any decisions related to, this manuscript.

Received: 7 June 2022 Accepted: 28 July 2022

Published online: 05 September 2022

#### References

- Abdallah MMS, El-Bassiouny HMS, AbouSeeda MA (2019) Potential role of kaolin or potassium sulfate as anti-transpirant on improving physiological, biochemical aspects and yield of wheat plants under different watering regimes. *Bull Natl Res Cent* 43(1):134. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0177-8>



- Al-Babili S, Bouwmeester HJ (2015) Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annu Rev Plant Biol* 66:161–186. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114759>
- Attacha S, Solbach D, Bela K, Moseler A, Wagner S, Schwarzländer M, Aller I, Müller SJ, Meyer AJ (2017) Glutathione peroxidase-like enzymes cover five distinct cell compartments and membrane surfaces in *Arabidopsis thaliana*: subcellular localization of GPXLs in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 40(8):1281–1295. <https://doi.org/10.1111/pce.12919>
- Bacete L, Schulz J, Engelsdorf T, Bartosova Z, Vaahtera L, Yan G, Gerhold JM, Tichá T, Øvstebø C, Gigli-Bisceglia N, Johannessen-Starheim S, Marguerita J, Kollist H, Dehoux T, McAdam SAM, Hamann T (2022) THESEUS1 modulates cell wall stiffness and abscisic acid production in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(1):e2119258119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2119258119>
- Banerjee AK, Lin T, Hannapel DJ (2009) Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol* 151(4):1831–1843. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144428>
- Bao Y, Aggarwal P, Robbins NE, Sturrock CJ, Thompson MC, Tan HQ, Tham C, Duan L, Rodriguez PL, Vernoux T, Mooney SJ, Bennett MJ, Dinneny JR (2014) Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proc Natl Acad Sci* 111(25):9319–9324. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400966111>
- Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298(5598):1582–1587. <https://doi.org/10.1126/science.1077945>
- Basu D, Haswell ES (2020) The mechanosensitive Ion Channel MSL10 potentiates responses to cell swelling in *Arabidopsis* seedlings. *Curr Biol* 30(14):2716–2728.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.015>
- Basu D, Shoots JM, Haswell ES (2020) Interactions between the N- and C-termini of the mechanosensitive ion channel at MSL10 are consistent with a three-step mechanism for activation. *J Exp Bot* 71(14):4020–4032. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa192>
- Beff L, Günther T, Vandoorne B, Couvreur V, Javaux M (2013) Three-dimensional monitoring of soil water content in a maize field using electrical resistivity tomography. *Hydrol Earth Syst Sci* 17(2):595–609. <https://doi.org/10.5194/hess-17-595-2013>
- Ben Rejeb K, Lefebvre-De Vos D, Le Disquet I, Leprince A, Bordenave M, Maldiney R, Jdey A, Abdelly C, Savouré A (2015) Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 208(4):1138–1148. <https://doi.org/10.1111/nph.13550>
- Beven K, Germann P (1982) Macropores and water flow in soils. *Water Resour Res* 18(5):1311–1325. <https://doi.org/10.1029/WR018i005p01311>
- Bienert GP, Möller ALB, Kristiansen KA, Schulz A, Möller IM, Schjoerring JK, Jahn TP (2007) Specific Aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282(2):1183–1192. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603761200>
- Boisson-Dernier A, Lituiev DS, Nestorova A, Franck CM, Thirugnanarajah S, Grossniklaus U (2013) ANXR receptor-like kinases coordinate cell wall integrity with growth at the pollen tube tip via NADPH oxidases. *PLoS Biol* 11(11):e1001719. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001719>
- Boursiac Y, Boudet J, Postaire O, Luu D-T, Tournaire-Roux C, Maurel C (2008) Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization: Aquaporins and reactive oxygen species. *Plant J* 56(2):207–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03594.x>
- Brewster JL, Gustin MC (1994) Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a map kinase pathway. *Yeast* 10(4):425–439. <https://doi.org/10.1002/yea.320100402>
- Cardinale F, Korwin Krukowski P, Schubert A, Visentin I (2018) Strigolactones: mediators of osmotic stress responses with a potential for agrochemical manipulation of crop resilience. *J Exp Bot* 69(9):2291–2303. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx494>
- Carella P, Wilson DC, Kempthorne CJ, Cameron RK (2016) Vascular sap proteomics: providing insight into long-distance signaling during stress. *Front Plant Sci* 7:651. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00651>
- Chen J, Yu F, Liu Y, Du C, Li X, Zhu S, Wang X, Lan W, Rodriguez PL, Liu X, Li D, Chen L, Luan S (2016) FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(37). <https://doi.org/10.1073/pnas.1608449113>
- Chen L-Q, Qu X-Q, Hou B-H, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB (2012) Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335(6065):207–211. <https://doi.org/10.1126/science.1213351>
- Chen Q, Hu T, Li X, Song C-P, Zhu J-K, Chen L, Zhao Y (2022) Phosphorylation of SWEET sucrose transporters regulates plant root:shoot ratio under drought. *Nat Plants* 8(1):68–77. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-01040-7>
- Christmann A, Grill E, Huang J (2013) Hydraulic signals in long-distance signaling. *Curr Opin Plant Biol* 16(3):293–300. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.011>
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E (2007) A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* 52(1):167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03234.x>
- Codjoe JM, Richardson RA, Haswell ES (2022) Unbiased proteomic and forward genetic screens reveal that mechanosensitive ion channel MSL10 functions at ER-plasma membrane contact sites in *Arabidopsis thaliana*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.23.493056>
- Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinokaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* 11:163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>
- Cuevas-Velazquez CL, Dinneny JR (2018) Organization out of disorder: liquid-liquid phase separation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 45:68–74. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.005>
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* 61(1):651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Cutolo E, Parvin N, Ruge H, Pirayesh N, Roustan V, Weckwerth W, Teige M, Grieco M, Larosa V, Vothknecht UC (2019) The high light response in *Arabidopsis* requires the calcium sensor protein CAS, a target of STN7- and STN8-mediated phosphorylation. *Front Plant Sci* 10:974. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00974>
- Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42(1):55–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.000415>
- Dbara S, Haworth M, Emiliani G, Ben Mimoun M, Gómez-Cadenas A, Centritto M (2016) Partial root-zone drying of olive (*Olea europaea* var. ‘Chetoui’) induces reduced yield under field conditions. *PLoS One* 11(6):e0157089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157089>
- De la Hera ML, Romero P, Gómez-Plaza E, Martínez A (2007) Is partial root-zone drying an effective irrigation technique to improve water use efficiency and fruit quality in field-grown wine grapes under semiarid conditions? *Agric Water Manag* 87(3):261–274. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2006.08.001>
- Devireddy AR, Zandalinas SI, Fichman Y, Mittler R (2021) Integration of reactive oxygen species and hormone signaling during abiotic stress. *Plant J* 105(2):459–476. <https://doi.org/10.1111/tpj.15010>
- Dietrich D, Pang L, Kobayashi A, Fozard JA, Boudolf V, Bhosale R, Antoni R, Nguyen T, Hiratsuka S, Fujii N, Miyazawa Y, Bae T-W, Wells DM, Owen MR, Band LR, Dyson RJ, Jensen OE, King JR, Tracy SR, Sturrock CJ, Mooney SJ, Roberts JA, Bhalerao RP, Dinneny JR, Rodriguez PL, Nagatani A, Hosokawa Y, Baskin TI, Pridmore TP, De Veylder L, Takahashi H, Bennett MJ (2017) Root hydrotropism is controlled via a cortex-specific growth mechanism. *Nat Plants* 3(6):17057. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.57>
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61(1):593–620. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-070109-104628>
- Dorone Y, Boeynaems S, Flores E, Jin B, Hateley S, Bossi F, Lazarus E, Pennington JG, Michiels E, De Decker M, Vints K, Baatsen P, Bassel GW, Otegui MS, Holehouse AS, Exposito-Alonso M, Sukenik S, Gitler AD, Rhee SY (2021) A prion-like protein regulator of seed germination undergoes hydration-dependent phase separation. *Cell* 184(16):4284–4298.e27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.009>
- Du T, Kang S, Zhang J, Li F (2008) Water use and yield responses of cotton to alternate partial root-zone drip irrigation in the arid area of north-West China. *Irrig Sci* 26(2):147–159. <https://doi.org/10.1007/s00271-007-0081-0>



- Duan Q, Kita D, Li C, Cheung AY, Wu H-M (2010) FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(41):17821–17826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005366107>
- Evans MJ, Choi W-G, Gilroy S, Morris RJ (2016) A ROS-assisted calcium wave dependent on the AtRBOHD NADPH oxidase and TPC1 Cation Channel propagates the systemic response to salt stress. *Plant Physiol* 171(3):1771–1784. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00215>
- Evans MJ, Morris RJ (2017) Chemical agents transported by xylem mass flow propagate variation potentials. *Plant J* 91(6):1029–1037. <https://doi.org/10.1111/tpj.13624>
- Fang X, Wang L, Ishikawa R, Li Y, Fiedler M, Liu F, Calder G, Rowan B, Weigel D, Li P, Dean C (2019) Arabidopsis FLL2 promotes liquid–liquid phase separation of polyadenylation complexes. *Nature* 569(7755):265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1165-8>
- Farmer EE, Gao Y-Q, Lenzoni G, Wolfender J-L, Wu Q (2020) Wound- and mechanostimulated electrical signals control hormone responses. *New Phytol* 227(4):1037–1050. <https://doi.org/10.1111/nph.16646>
- Farmer EE, Gasperini D, Acosta IF (2014) The squeeze cell hypothesis for the activation of jasmonate synthesis in response to wounding. *New Phytol* 204(2):282–288. <https://doi.org/10.1111/nph.12897>
- Feiguelman G, Fu Y, Yalovsky S (2018) ROP GTPases structure-function and signaling pathways. *Plant Physiol* 176(1):57–79. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01415>
- Feng W, Kita D, Peaucelle A, Cartwright HN, Doan V, Duan Q, Liu M-C, Maman J, Steinhorst L, Schmitz-Thom I, Yvon R, Kudla J, Wu H-M, Cheung AY, Dinnyen JR (2018) The FERONIA receptor kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca<sup>2+</sup> signaling. *Curr Biol* 28(5):666–675.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.023>
- Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM (2019) Legume nodulation: the host controls the party. *Plant Cell Environ* 42(1):41–51. <https://doi.org/10.1111/pce.13348>
- Fichman Y, Mittler R (2021) Integration of electric, calcium, reactive oxygen species and hydraulic signals during rapid systemic signaling in plants. *Plant J*. 107(1):7–20. <https://doi.org/10.1111/tpj.15360>
- Fichtner F, Lunn JE (2021) The role of Trehalose 6-phosphate (Tre6P) in plant metabolism and development. *Annu Rev Plant Biol* 72:737–760. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095929>
- Fichtner F, Olas JJ, Feil R, Watanabe M, Krause U, Hoefgen R, Stitt M, Lunn JE (2020) Functional features of TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE1, an essential enzyme in Arabidopsis. *Plant Cell* 32(6):1949–1972. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00837>
- Figuerola CM, Lunn JE (2016) A tale of two sugars: Trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiol* 172(1):7–27. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00417>
- Flegler VJ, Rasmussen A, Borbil K, Boten L, Chen H-A, Deinlein H, Halang J, Hellmanzik K, Löffler J, Schmidt V, Makbul C, Kraft C, Hedrich R, Rasmussen T, Böttcher B (2021) Mechanosensitive channel gating by delipidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(33):e2107095118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2107095118>
- Franks PJ, Farquhar GD (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiol* 143(1):78–87. <https://doi.org/10.1104/pp.106.089367>
- Fu F, Li F, Kang S (2017) Alternate partial root-zone drip irrigation improves water- and nitrogen-use efficiencies of sweet-waxy maize with nitrogen fertigation. *Sci Rep* 7(1):17256. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17560-2>
- Furuichi T, Iida H, Sokabe M, Tatsumi H (2012) Expression of Arabidopsis MCA1 enhanced mechanosensitive channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Plant Signal Behav* 7(8):1022–1026. <https://doi.org/10.4161/psb.20783>
- Gamble RL, Qu X, Schaller GE (2002) Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiol* 128(4):1428–1438. <https://doi.org/10.1104/pp.010777>
- Gelaw TA, Sanan-Mishra N (2021) Non-coding RNAs in response to drought stress. *Int J Mol Sci* 22(22):12519. <https://doi.org/10.3390/ijms222212519>
- Gonneau M, Desprez T, Martin M, Doblas VG, Bacete L, Miart F, Sormani R, Hématy K, Renou J, Landrein B, Murphy E, Van De Cotte B, Vernhettes S, De Smet I, Höfte H (2018) Receptor kinase THESEUS1 is a rapid alkalization factor 34 receptor in Arabidopsis. *Curr Biol* 28(15):2452–2458.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.075>
- Guo S, Zhang J, Sun H, Salse J, Lucas WJ, Zhang H, Zheng Y, Mao L, Ren Y, Wang Z, Min J, Guo X, Murat F, Ham B-K, Zhang Z, Gao S, Huang M, Xu Y, Zhong S, Bombarely A, Mueller LA, Zhao H, He H, Zhang Y, Zhang Z, Huang S, Tan T, Pang E, Lin K, Hu Q, Kuang H, Ni P, Wang B, Liu J, Kou Q, Hou W, Zou X, Jiang J, Gong G, Klee K, Schoof H, Huang Y, Hu X, Dong S, Liang D, Wang J, Wu K, Xia Y, Zhao X, Zheng Z, Xing M, Liang X, Huang B, Lv T, Wang J, Yin Y, Yi H, Li R, Wu M, Levi A, Zhang X, Giovannoni JJ, Wang J, Li Y, Fei Z, Xu Y (2013) The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions. *Nat Genet* 45(1):51–58. <https://doi.org/10.1038/ng.2470>
- Gupta A, Rico-Medina A, Cano-Delgado AI (2020) The physiology of plant responses to drought. *Science* 368(6488):266–269. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>
- Ha CV, Leyva-Gonzalez MA, Osakabe Y, Tran UT, Nishiyama R, Watanabe Y, Tanaka M, Seki M, Yamaguchi S, Dong NV, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Herrera-Estrella L, Tran L-SP (2014) Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress. *Proc Natl Acad Sci* 111(2):851–856. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322135111>
- Hai NN, Chuong NN, Tu NHC, Kisiala A, Hoang XL, Thao NP (2020) Role and regulation of cytokinins in plant response to drought stress. *Plants (Basel)* 9(4):E422. <https://doi.org/10.3390/plants9040422>
- Haider I, Andreo-Jimenez B, Bruno M, Bimbo A, Flokova K, Abuaf H, Ntui VO, Guo X, Chamikhova T, Al-Babili S, Bouwmeester HJ, Ruyter-Spira C (2018) The interaction of strigolactones with abscisic acid during the drought response in rice. *J Exp Bot* 69(9):2403–2414. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery089>
- Hakeem A, Liu Y, Xie L, Samiullah HJ, Ata-Ul-Karim S, Rehmani MIA, Rehmani MIA (2016) Comparative effects of alternate partial root-zone drying and conventional deficit irrigation on growth and yield of field grown maize (*Zea mays* L.) hybrid. *J Environ Agric Sci* 6:23–31
- Ham B-K, Lucas WJ (2017) Phloem-Mobile RNAs as systemic signaling agents. *Annu Rev Plant Biol* 68(1):173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041139>
- Hamilton ES, Jensen GS, Moksaeve G, Katims A, Sherp AM, Haswell ES (2015) Mechanosensitive channel MSL8 regulates osmotic forces during pollen hydration and germination. *Science* 350(6259):438–441. <https://doi.org/10.1126/science.aac6014>
- Han S, Tang R, Anderson LK, Woerner TE, Pei Z-M (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in guard cells. *Nature* 425(6954):196–200. <https://doi.org/10.1038/nature01932>
- Hanada K, Higuchi-Takeuchi M, Okamoto M, Yoshizumi T, Shimizu M, Nakaminami K, Nishi R, Ohashi C, Iida K, Tanaka M, Horii Y, Kawashima M, Matsui K, Toyoda T, Shinozaki K, Seki M, Matsui M (2013) Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(6):2395–2400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213958110>
- Hanada K, Zhang X, Borevitz JO, Li W-H, Shiu S-H (2007) A large number of novel coding small open reading frames in the intergenic regions of the Arabidopsis thaliana genome are transcribed and/or under purifying selection. *Genome Res* 17(5):632–640. <https://doi.org/10.1101/gr.5836207>
- Hartmann L, Pedrotti L, Weiste C, Fekete A, Schierstaedt J, Gottler J, Kempa S, Kirschke M, Dietrich K, Mueller MJ, Vicente-Carbajosa J, Hanson J, Droge-Laser W (2015) Crosstalk between two bZIP signaling pathways orchestrates salt-induced metabolic reprogramming in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 27(8):2244–2260. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00163>
- Hartung W, Sauter A, Hose E (2002) Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* 53(366):27–32. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.366.27>
- Haswell ES (2007) MscS-Like proteins in plants. In: Current topics in membranes. Academic Press 58:329–359. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(06\)58013-5](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(06)58013-5)
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse J-M (2008) Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr Biol* 18(10):730–734. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.039>
- Hématy K, Sado P-E, Van Tuinen A, Rochange S, Desnos T, Balzergue S, Pelletier S, Renou J-P, Höfte H (2007) A receptor-like kinase mediates the

- response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr Biol* 17(11):922–931. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.018>
- Hou C, Tian W, Kleist T, He K, Garcia V, Bai F, Hao Y, Luan S, Li L (2014) DUF221 proteins are a family of osmosensitive calcium-permeable cation channels conserved across eukaryotes. *Cell Res* 24(5):632–635. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.14>
- Hou S, Liu D, Huang S, Luo D, Liu Z, Xiang Q, Wang P, Mu R, Han Z, Chen S, Chai J, Shan L, He P (2021) The *Arabidopsis* MIK2 receptor elicits immunity by sensing a conserved signature from phytochemicals and microbes. *Nat Commun* 12(1):5494. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25580-w>
- Houwink AL (1935) The conduction of excitation in *Mimosa pudica*. *Recl Trav Bot Neerl* 32:51–91
- Huang F, Luo J, Ning T, Cao W, Jin X, Zhao H, Wang Y, Han S (2017a) Cytosolic and nucleosolic calcium signaling in response to osmotic and salt stresses are independent of each other in roots of *Arabidopsis* seedlings. *Front Plant Sci* 8:1648. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01648>
- Huang H, Liu B, Liu L, Song S (2017b) Jasmonate action in plant growth and development. *J Exp Bot* 68(6):1349–1359. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw495>
- Hutchison CE, Kieber JJ (2002) Cytokinin Signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14(S1):S47–S59. <https://doi.org/10.1105/tpc.010444>
- Iqbal N, Hussain S, Raza MA, Yang C-Q, Safdar ME, Brestic M, Aziz A, Hayyat MS, Asghar MA, Wang XC, Zhang J, Yang W, Liu J (2019) Drought tolerance of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by improved photosynthetic characteristics and an efficient antioxidant enzyme activities under a Split-root system. *Front Physiol* 10:786. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00786>
- Iqbal R, Raza MAS, Toleikiene M, Ayaz M, Hashemi F, Habib-ur-Rahman M, Zahaer MS, Ahmad S, Riaz U, Ali M, Aslam MU, Haider I (2020) Partial root-zone drying (PRD), its effects and agricultural significance: a review. *Bull Natl Res Centre* 44(1):159. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00413-w>
- Ivanov VY, Fatichi S, Jenerette GD, Espeleta JF, Troch PA, Huxman TE (2010) Hysteresis of soil moisture spatial heterogeneity and the “homogenizing” effect of vegetation: SOIL MOISTURE SPATIAL HETEROGENEITY. *Water Resour Res* 46(9). <https://doi.org/10.1029/2009WR008611>
- Jalihal AP, Pitchaiya S, Xiao L, Bawa P, Jiang X, Bedi K, Parolia A, Cieslik M, Ljungman M, Chinnaiyan AM, Walter NG (2020) Multivalent proteins rapidly and reversibly phase-separate upon osmotic cell volume change. *Mol Cell* 79(6):978–990.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.08.004>
- Jarvis NJ (2007) A review of non-equilibrium water flow and solute transport in soil macropores: principles, controlling factors and consequences for water quality. *Eur J Soil Sci* 58(3):523–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2007.00915.x>
- Jiang F, Hartung W (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *J Exp Bot* 59(1):37–43. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern127>
- Jiménez-Nopala G, Salgado-Escobar AE, Cevallos-Porta D, Cárdenas L, Sepúlveda-Jiménez G, Cassab G, Porta H (2018) Autophagy mediates hydrotropic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Sci* 272:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.026>
- Johns S, Hagihara T, Toyota M, Gilroy S (2021) The fast and the furious: rapid long-range signaling in plants. *Plant Physiol* 185(3):694–706. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab098>
- Jojoa-Cruz S, Saotome K, Murthy SE, Tsui CCA, Sansom MS, Patapoutian A, Ward AB (2018) Cryo-EM structure of the mechanically activated ion channel OSCA1.2. *eLife* 7:e41845. <https://doi.org/10.7554/eLife.41845>
- Julkowska MM, Klei K, Fokkens L, Haring MA, Schranz ME, Testerink C (2016) Natural variation in rosette size under salt stress conditions corresponds to developmental differences between *Arabidopsis* accessions and allelic variation in the *LRR-KISS* gene. *EXBOT J* 67(8):2127–2138. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw015>
- Jung J-H, Barbosa AD, Hutin S, Kumita JR, Gao M, Derwort D, Silva CS, Lai X, Pierre E, Geng F, Kim S-B, Baek S, Zubieta C, Jaeger KE, Wigge PA (2020) A prion-like domain in ELF3 functions as a thermosensor in *Arabidopsis*. *Nature* 585(7824):256–260. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2644-7>
- Kamano S, Kume S, Iida K, Lei K-J, Nakano M, Nakayama Y, Iida H (2015) Transmembrane topologies of Ca<sup>2+</sup>-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 290(52):30901–30909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.692574>
- Kang S, Hu X, Goodwin I, Jerie P (2002) Soil water distribution, water use, and yield response to partial root zone drying under a shallow groundwater table condition in a pear orchard. *Sci Hortic* 92(3):277–291. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00300-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00300-4)
- Kang S, Liang Z, Pan Y, Shi P, Zhang J (2000) Alternate furrow irrigation for maize production in an arid area. *Agric Water Manag* 45(3):267–274. [https://doi.org/10.1016/S0378-3774\(00\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0378-3774(00)00072-X)
- Kang S, Zhang J (2004) Controlled alternate partial root-zone irrigation: its physiological consequences and impact on water use efficiency. *J Exp Bot* 55(407):2437–2446. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh249>
- Kang S, Zhang L, Hu X, Li Z, Jerie P (2001) An improved water use efficiency for hot pepper grown under controlled alternate drip irrigation on partial roots. *Sci Hortic* 89(4):257–267. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00245-4)
- Kehr J, Kragler F (2018) Long distance RNA movement. *New Phytol* 218(1):29–40. <https://doi.org/10.1111/nph.15025>
- Kirda C, Cetin M, Dasgan Y, Topcu S, Kaman H, Ekici B, Derici MR, Ozguven AI (2004) Yield response of greenhouse grown tomato to partial root drying and conventional deficit irrigation. *Agric Water Manag* 69(3):191–201. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2004.04.008>
- Kobayashi A, Takahashi A, Kakimoto Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani A, Takahashi H (2007) A gene essential for hydrotropism in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(11):4724–4729. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609929104>
- Koenig AM, Hoffmann-Benning S (2020) The interplay of phloem-mobile signals in plant development and stress response. *Biosci Rep* 40(10):BSR20193329. <https://doi.org/10.1042/BSR20193329>
- Kong D, Hao Y, Cui H (2016) The WUSCHEL related homeobox protein WOXY7 regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 9(2):261–270. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.006>
- Korkmazhan E, Tompa P, Dunn AR (2021) The role of ordered cooperative assembly in biomolecular condensates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22(10):647–648. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00408-z>
- Krieger G, Shkolnik D, Miller G, Fromm H (2016) Reactive oxygen species tune root tropic responses. *Plant Physiol* 172(2):1209–1220. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00660>
- Kudla J, Batistič O, Hashimoto K (2010) Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22(3):541–563. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072686>
- Kudla J, Becker D, Grill E, Hedrich R, Hippler M, Kummer U, Parniske M, Romeis T, Schumacher K (2018) Advances and current challenges in calcium signaling. *New Phytol* 218(2):414–431. <https://doi.org/10.1111/nph.14966>
- Kumar MN, Jane W-N, Verslues PE (2013) Role of the putative Osmosensor *Arabidopsis* histidine Kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. *Plant Physiol* 161(2):942–953. <https://doi.org/10.1104/pp.112.209791>
- Kuromori T, Fujita M, Takahashi F, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2022) Inter-tissue and inter-organ signaling in drought stress response and phenotyping of drought tolerance. *Plant J* 109(2):342–358. <https://doi.org/10.1111/tpj.15619>
- Kuromori T, Seo M, Shinozaki K (2018) ABA transport and plant water stress responses. *Trends Plant Sci* 23(6):513–522. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.001>
- Lai JY, Poon YS, Kaiser JT, Rees DC (2013) Open and shut: crystal structures of the dodecylmaltooside solubilized mechanosensitive channel of small conductance from *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori* at 4.4 Å and 4.1 Å resolutions: low resolution crystal structures of MscS. *Protein Sci* 22(4):502–509. <https://doi.org/10.1002/pro.2222>
- Lanfranco L, Fiorilli V, Venice F, Bonfante P (2018) Strigolactones cross the kingdoms: plants, fungi, and bacteria in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot* 69(9):2175–2188. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx432>
- Lee JS, Wilson ME, Richardson RA, Haswell ES (2019) Genetic and physical interactions between the organellar mechanosensitive ion channel homologs MSL 1, MSL 2, and MSL 3 reveal a role for inter-organellar communication in plant development. *Plant Direct* 3(3). <https://doi.org/10.1002/pld3.124>
- Leshem Y, Levine A (2007) Intracellular ROS: what does it do there? *Plant Signal Behav* 2(3):155–156. <https://doi.org/10.4161/psb.2.3.3685>
- Levina N (1999) Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification

- of genes required for MscS activity. *EMBO J* 18(7):1730–1737. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1730>
- Li C, Wu H-M, Cheung AY (2016) FERONIA and herpals: functions and mechanisms. *Plant Physiol* 171(4):2379–2392. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00667>
- Li C, Zhang K, Zeng X, Jackson S, Zhou Y, Hong Y (2009) A cis element within flowering locus T mRNA determines its mobility and facilitates trafficking of heterologous viral RNA. *J Virol* 83(8):3540–3548. <https://doi.org/10.1128/JVI.02346-08>
- Liu F, Song R, Zhang X, Shahnazari A, Andersen MN, Plauborg F, Jacobsen S-E, Jensen CR (2008) Measurement and modelling of ABA signalling in potato (*Solanum tuberosum* L.) during partial root-zone drying. *Environ Exp Bot* 63(1):385–391. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.11.015>
- Liu J, He H, Vitali M, Visentin I, Charnikhova T, Haider I, Schubert A, Ruyter-Spira C, Bouwmeester HJ, Lovisolo C, Cardinale F (2015) Osmotic stress represses strigolactone biosynthesis in *Lotus japonicus* roots: exploring the interaction between strigolactones and ABA under abiotic stress. *Planta* 241(6):1435–1451. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2266-8>
- Liu L, Chen X (2018) Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat Plants* 4(11):869–878. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0288-5>
- Liu W, Xiang C, Li X, Wang T, Lu X, Liu Z, Gao L, Zhang W (2020) Identification of long-distance transmissible mRNA between Scion and rootstock in cucurbit seedling heterografts. *IJMS* 21(15):5253. <https://doi.org/10.3390/ijms21155253>
- Liu X, Wang J, Sun L (2018) Structure of the hyperosmolality-gated calcium-permeable channel OSCA1.2. *Nat Commun* 9(1):5060. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07564-5>
- Luo J, Chen L, Huang F, Gao P, Zhao H, Wang Y, Han S (2020) Intraorganellar calcium imaging in Arabidopsis seedling roots using the GCaMP variants GCaMP6m and R-CEPIA1er. *J Plant Physiol* 246–247:153127. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153127>
- Lv S, Zhang Y, Li C, Liu Z, Yang N, Pan L, Wu J, Wang J, Yang J, Lv Y, Zhang Y, Jiang W, She X, Wang G (2018) Strigolactone-triggered stomatal closure requires hydrogen peroxide synthesis and nitric oxide production in an abscisic acid-independent manner. *New Phytol* 217(1):290–304. <https://doi.org/10.1111/nph.14813>
- Maeda T, Takekawa M, Saito H (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing Osmosensor. *Science* 269(5223):554–558. <https://doi.org/10.1126/science.7624781>
- Maity K, Heumann JM, McGrath AP, Kopcho NJ, Hsu P-K, Lee C-W, Mapes JH, Garza D, Krishnan S, Morgan GP, Hendargo KJ, Klose T, Rees SD, Medrano-Soto A, SaierMH, Piñeros M, Komives EA, SchroederJL, Chang G, Stowell MHB (2019) Cryo-EM structure of OSCA1.2 from *Oryza sativa* elucidates the mechanical basis of potential membrane hyperosmolality gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116(28):14309–14318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900774116>
- Maksaev G, Haswell ES (2012) MscS-Like 10 is a stretch-activated ion channel from Arabidopsis thaliana with a preference for anions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(46):19015–19020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213931109>
- Manzi M, Lado J, Rodrigo MJ, Zacarias L, Arbona V, Gomez-Cadenas A (2015) Root ABA accumulation in long-term water-stressed plants is sustained by hormone transport from aerial organs. *Plant Cell Physiol* 56(12):2457–2466. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv161>
- Martinac B, Buechner M, Delcour AH, Adler J, Kung C (1987) Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8):2297–2301. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2297>
- Martinière A, Fiche JB, Smokvarska M, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C (2019) Osmotic stress activates two reactive oxygen species pathways with distinct effects on protein Nanodomains and diffusion. *Plant Physiol* 179(4):1581–1593. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01065>
- Martin-Vertedor AI, Dodd IC (2011) Root-to-shoot signalling when soil moisture is heterogeneous: increasing the proportion of root biomass in drying soil inhibits leaf growth and increases leaf abscisic acid concentration: root distribution and non-hydraulic signalling. *Plant Cell Environ* 34(7):1164–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02315.x>
- McLean EH, Ludwig M, Grierson PF (2011) Root hydraulic conductance and aquaporin abundance respond rapidly to partial root-zone drying events in a riparian *Melaleuca* species. *New Phytol* 192(3):664–675. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03834.x>
- Miao Y, Lv D, Wang P, Wang X-C, Chen J, Miao C, Song C-P (2006) An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 18(10):2749–2766. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044230>
- Mielke S, Zimmer M, Meena MK, Dreos R, Stellmach H, Hause B, Voiniciuc C, Gasperini D (2021) Jasmonate biosynthesis arising from altered cell walls is prompted by turgor-driven mechanical compression. *Sci Adv* 7(7):eabf0356. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf0356>
- Miller K, Strychalski W, Nickaen M, Carlsson A, Haswell ES (2022) In vitro experiments and kinetic models of Arabidopsis pollen hydration mechanics show that MSL8 is not a simple tension-gated osmoregulator. *Curr Biol* 32(13):2921–2934
- Milne RJ, Grof CP, Patrick JW (2018) Mechanisms of phloem unloading: shaped by cellular pathways, their conductances and sink function. *Curr Opin Plant Biol* 43:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.11.003>
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9(10):490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mohanty BP (2013) Soil hydraulic property estimation using remote sensing: a review. *Vadose Zone J* 12(4):1–9. <https://doi.org/10.2136/vzj2013.06.0100>
- Monshausen GB (2012) Visualizing Ca<sup>2+</sup> signatures in plants. *Curr Opin Plant Biol* 15(6):677–682. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.09.014>
- Mori K, Renhu N, Naito M, Nakamura A, Shiba H, Yamamoto T, Suzuki T, Iida H, Miura K (2018) Ca<sup>2+</sup>-permeable mechanosensitive channels MCA1 and MCA2 mediate cold-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and cold tolerance in Arabidopsis. *Sci Rep* 8(1):550. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17483-y>
- Mostofa MG, Li W, Nguyen KH, Fujita M, Tran L-SP (2018) Strigolactones in plant adaptation to abiotic stresses: an emerging avenue of plant research. *Plant Cell Environ* 41(10):2227–2243. <https://doi.org/10.1111/pce.13364>
- Mousavi SAR, Dubin AE, Zeng W-Z, Coombs AM, Do K, Ghadiri DA, Keenan WT, Ge C, Zhao Y, Patapoutian A (2021) PIEZO ion channel is required for root mechanotransduction in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(20):e2102188118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102188118>
- Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, Ward AB, Patapoutian A (2018) OSCA/MEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *eLife* 7:e41844. <https://doi.org/10.7554/eLife.41844>
- Nakagawa Y, Katagiri T, Shinozaki K, Qi Z, Tatsumi H, Furuichi T, Kishigami A, Sokabe M, Kojima I, Sato S, Kato T, Tabata S, Iida H, Terashima A, Nakano M, Ikeda M, Yamanaka T, Iida H (2007) Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca<sup>2+</sup> influx and touch sensing in roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9):3639–3644. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607703104>
- Nakayama M, Kaneko Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani N, Wada S, Ishida H, Yoshimoto K, Shirasu K, Yamada K, Nishimura M, Takahashi H (2012) A possible involvement of autophagy in amyloplast degradation in columella cells during hydrotropic response of Arabidopsis roots. *Planta* 236:999–1012. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1655-5>
- Notaguchi M, Higashiyama T, Suzuki T (2015) Identification of mRNAs that move over long distances using an RNA-Seq analysis of Arabidopsis/*Nicotiana benthamiana* heterografts. *Plant Cell Physiol* 56(2):311–321. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu210>
- Ohkubo Y, Tanaka M, Tabata R, Ogawa-Ohnishi M, Matsubayashi Y (2017) Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nat Plants* 3:17029. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.29>
- Okamoto S, Tabata R, Matsubayashi Y (2016) Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 34:35–40. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.07.009>
- Orman-Ligeza B, Morris EC, Parizot B, Lavigne T, Babé A, Ligeza A, Klein S, Sturrock C, Xuan W, Novák O, Ljung K, Fernandez MA, Rodriguez PL, Dodd IC, De Smet I, Chaumont F, Batoko H, Périlleux C, Lynch JP, Bennett MJ, Beeckman T, Draye X (2018) The Xerobranching response represses lateral root formation when roots are not in contact with water. *Curr Biol* 28(19):3165–3173.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.074>
- Orosa-Puente B, Lefley N, von Wangenheim D, Banda J, Srivastava AK, Hill K, Truskina J, Bhosale R, Morris E, Srivastava M, Kumpers B, Goh T, Fukaki H, Vermeer JEM, Vernoux T, Dinneny JR, French AP, Bishop A, Sadanandom A, Bennett MJ (2018) Root branching toward water involves



- posttranslational modification of transcription factor ARF7. *Science* 362(6421):1407–1410. <https://doi.org/10.1126/science.aau3956>
- Ota IM, Varshavsky A (1993) A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262(5133):566–569. <https://doi.org/10.1126/science.8211183>
- Pagliarini C, Vitali M, Ferrero M, Vitulo N, Incarbone M, Lovisolo C, Valle G, Schubert A (2017) The accumulation of miRNAs differentially modulated by drought stress is affected by grafting in grapevine. *Plant Physiol* 173(4):2180–2195. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01119>
- Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marqués-Bueno M d M, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche J-B, Nollmann M, Miège C, Moreau P, Martinière A, Jaillais Y (2019) Developmental control of plant rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* 364(6435):57–62. <https://doi.org/10.1126/science.aav9959>
- Pliotas C, Dahl ACE, Rasmussen T, Mahendran KR, Smith TK, Marius P, Gault J, Banda T, Rasmussen A, Miller S, Robinson CV, Bayley H, Sansom MSP, Booth IR, Naismith JH (2015) The role of lipids in mechanosensation. *Nat Struct Mol Biol* 22(12):991–998. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3120>
- Powers SK, Holehouse AS, Korasick DA, Schreiber KH, Clark NM, Jing H, Emenecker R, Han S, Tycksen E, Hwang I, Sozzani R, Jez JM, Pappu RV, Strader LC (2019) Nucleo-cytoplasmic partitioning of ARF proteins controls auxin responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell* 76(1):177–190.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.044>
- Puértolas J, Alcobendas R, Alarcón JJ, Dodd IC (2013) Long-distance abscisic acid signalling under different vertical soil moisture gradients depends on bulk root water potential and average soil water content in the root zone. *Plant Cell Environ* 36(8):1465–1475. <https://doi.org/10.1111/pce.12076>
- Puértolas J, Conesa MR, Ballester C, Dodd IC (2015) Local root abscisic acid (ABA) accumulation depends on the spatial distribution of soil moisture in potato: implications for ABA signalling under heterogeneous soil drying. *J Exp Bot* 66(8):2325–2334. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru501>
- Putterill J, Varkonyi-Gasic E (2016) FT and florigen long-distance flowering control in plants. *Curr Opin Plant Biol* 33:77–82. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.008>
- Qian P, Song W, Yokoo T, Minobe A, Wang G, Ishida T, Sawa S, Chai J, Kakimoto T (2018) The CLE9/10 secretory peptide regulates stomatal and vascular development through distinct receptors. *Nat Plants* 4(12):1071–1081. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0317-4>
- Radin I, Richardson RA, Coomey JH, Weiner ER, Bascom CS, Li T, Bezanilla M, Haswell ES (2021) Plant PIEZO homologs modulate vacuole morphology during tip growth. *Science* 373(6554):586–590. <https://doi.org/10.1126/science.abe6310>
- Raissig MT, Matos JL, Anleu Gil MX, Kornfeld A, Bettadapur A, Abrash E, Allison HR, Badgley G, Vogel JP, Berry JA, Bergmann DC (2017) Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata. *Science* 355(6330):1215–1218. <https://doi.org/10.1126/science.aal3254>
- Raza MAS, Ahmad S, Saleem MF, Khan IH, Iqbal R, Zaheer MS, Haider I, Ali M (2017) Physiological and biochemical assisted screening of wheat varieties under partial rhizosphere drying. *Plant Physiol Biochem* 116:150–166. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.007>
- Ren Y, Song Y, Zhang L, Guo D, He J, Wang L, Song S, Xu W, Zhang C, Lers A, Ma C, Wang S (2021) Coding of non-coding RNA: insights into the regulatory functions of Pri- MicroRNA-encoded peptides in plants. *Front Plant Sci* 12:641351. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.641351>
- Rhodes J, Yang H, Moussu S, Boutrot F, Santiago J, Zipfel C (2021) Perception of a divergent family of phytoytokines by the *Arabidopsis* receptor kinase MIK2. *Nat Commun* 12(1):705. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20932-y>
- Rodrigues O, Reshetnyak G, Grondin A, Saijo Y, Leonhardt N, Maurel C, Verdoucq L (2017) Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(34):9200–9205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704754114>
- Rodriguez-Medina C, Atkins CA, Mann AJ, Jordan ME, Smith PM (2011) Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (*Lupinus albus* L.). *BMC Plant Biol*:11:36. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-36>
- Ruiz-Lopez N, Pérez-Sancho J, Del Valle AE, Haslam RP, Vanneste S, Catalá R, Perea-Resca C, Damme DV, García-Hernández S, Albert A, Vallarino J, Lin J, Friml J, Macho AP, Salinas J, Rosado A, Napier JA, Amorim-Silva V, Botella MA (2021) Synaptotagmins at the endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites maintain diacylglycerol homeostasis during abiotic stress. *The Plant Cell* 33(7):2431–2453. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab122>
- Sadak MS, El-Bassiouny HMS, Dawood MG (2019) Role of trehalose on anti-oxidant defense system and some osmolytes of quinoa plants under water deficit. *Bull Natl Res Centre* 43(1):5. <https://doi.org/10.1186/s42269-018-0039-9>
- Sadak MS, Abdalla AM, Abd Elhamid EM, Ezzo MI (2020) Role of melatonin in improving growth, yield quantity and quality of *Moringa oleifera* L. plant under drought stress. *Bull Natl Res Cent* 44(1):18. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-0275-7>
- Schachtman DP, Goodger JQD (2008) Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends Plant Sci* 13(6):281–287. <https://doi.org/10.1016/j.tplan.2008.04.003>
- Schapiro AL, Voigt B, Jasik J, Rosado A, Lopez-Cobollo R, Menzel D, Salinas J, Mancuso S, Valpuesta V, Baluska F, Botella MA (2008) Arabidopsis synaptotagmin 1 is required for the maintenance of plasma membrane integrity and cell viability. *The Plant Cell* 20(12):3374–88. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063859>
- Sepaskhah AR, Khajehabdollahi MH (2005) Alternate furrow irrigation with different irrigation intervals for maize (*Zea mays* L.). *Plant Prod Sci* 8(5):592–600. <https://doi.org/10.1626/pp.8.592>
- Sepaskhah AR, Parand A-R (2006) Effects of alternate furrow irrigation with supplemental every-furrow irrigation at different growth stages on the yield of maize (*Zea mays* L.). *Plant Prod Sci* 9(4):415–421. <https://doi.org/10.1626/pp.9.415>
- Shao G-C, Zhang Z-Y, Liu N, Yu S-E, Xing W-G (2008) Comparative effects of deficit irrigation (DI) and partial rootzone drying (PRD) on soil water distribution, water use, growth and yield in greenhouse grown hot pepper. *Sci Hortic* 119(1):11–16. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.001>
- Shih H-W, Miller ND, Dai C, Spalding EP, Monshausen GB (2014) The receptor-like kinase FERONIA is required for mechanical signal transduction in *Arabidopsis* seedlings. *Curr Biol* 24(16):1887–1892. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.064>
- Shkolnik D, Nuriel R, Bonza MC, Costa A, Fromm H (2018) MIZ1 regulates ECA1 to generate a slow, long-distance phloem-transmitted Ca<sup>2+</sup> signal essential for root water tracking in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(31):8031–8036. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804130115>
- Sirko A, Wawrzynska A, Brzywczy J, Sienko M (2021) Control of ABA signaling and crosstalk with other hormones by the selective degradation of pathway components. *Int J Mol Sci* 22(9):4638. <https://doi.org/10.3390/ijms22094638>
- Smith S, Zhu S, Joos L, Roberts I, Nikonorova N, Vu LD, Stes E, Cho H, Larrieu A, Xuan W, Goodall B, Cotte B v d, Waite JM, Rigal A, Harbourough SR, Persiau G, Vanneste S, Kirschner GK, Vandermarliere E, Martens L, Stahl Y, Audenaert D, Friml J, Felix G, Simon R, Bennett MJ, Bishopp A, Jaeger GD, Ljung K, Kepinski S, Robert S, Nemhauser J, Hwang I, Gevaert K, Beeckman T, Smet ID (2020) The CEP5 peptide promotes abiotic stress tolerance, as revealed by quantitative proteomics, and attenuates the AUX/IAA equilibrium in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* 19(8):1248–1262. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001826>
- Smokvarska M, Francis C, Platre MP, Fiche J-B, Alcon C, Dumont X, Nacry P, Bayle V, Nollmann M, Maurel C, Jaillais Y, Martinière A (2020) A plasma membrane Nanodomain ensures signal specificity during osmotic signaling in plants. *Curr Biol* 30(23):4654–4664.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.013>
- Steinbacher S, Bass R, Strop P, Rees DC (2007) Structures of the prokaryotic mechanosensitive channels MscL and MscS. In: *Current topics in membranes*. Academic Press, pp 1–24. [https://doi.org/10.1016/S1063-5823\(06\)58001-9](https://doi.org/10.1016/S1063-5823(06)58001-9)
- Stephan AB, Kunz H-H, Yang E, Schroeder JI (2016) Rapid hyperosmotic-induced Ca<sup>2+</sup> responses in *Arabidopsis thaliana* exhibit sensory potentiation and involvement of plastidial KEA transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.1519555113>
- Stoll M, Loveys B, Dry P (2000) Hormonal changes induced by partial rootzone drying of irrigated grapevine. *J Exp Bot* 51(350):1627–1634. <https://doi.org/10.1093/jxbbot/51.350.1627>

- Storti M, Costa A, Golin S, Zottini M, Morosinotto T, Alboresi A (2018) Systemic calcium wave propagation in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiol* 59(7):1377–1384. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy104>
- Sukharev SI, Martinac B, Blount P, Kung C (1994) Functional reconstitution as an assay for biochemical isolation of channel proteins: application to the molecular identification of a bacterial mechanosensitive channel. *Methods* 6(1):51–59. <https://doi.org/10.1006/meth.1994.1007>
- Taiz L, Zeiger E (2006) *Plant physiology and development*, 6th edn Takahashi F, Kuromori T, Urano K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2020) Drought stress responses and resistance in plants: from cellular responses to long-distance intercellular communication. *Front Plant Sci* 11:556972. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.556972>
- Takahashi F, Suzuki T, Osakabe Y, Betsuyaku S, Kondo Y, Dohmae N, Fukuda H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2018) A small peptide modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signalling. *Nature* 556(7700):235–238. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0009-2>
- Tang L-S, Li Y, Zhang J (2005) Physiological and yield responses of cotton under partial rootzone irrigation. *Field Crop Res* 94(2):214–223. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.005>
- Thieme CJ, Rojas-Triana M, Stecyk E, Schudoma C, Zhang W, Yang L, Minambres M, Walther D, Schulze WX, Paz-Ares J, Scheible W-R, Kragler F (2015) Endogenous Arabidopsis messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat Plants* 1(4):15025. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.25>
- Thompson AJ, Andrews J, Mulholland BJ, McKee JMT, Hilton HW, Horridge JS, Farquhar GD, Smeeton RC, Smillie IRA, Black CR, Taylor IB (2007) Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol* 143(4):1905–1917. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093559>
- Thor K, Jiang S, Michard E, George J, Scherzer S, Huang S, Dindas J, Derbyshire P, Leitão N, DeFalco TA, Köster P, Hunter K, Kimura S, Gronnier J, Stransfeld L, Kadota Y, Bücherl CA, Charpentier M, Wrzaczek M, MacLean D, Oldroyd GED, Menke FLH, Roelfsema MRG, Hedrich R, Feijó J, Zipfel C (2020) The calcium-permeable channel OSCA1.3 regulates plant stomatal immunity. *Nature* 585(7826):569–573. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2702-1>
- Tian S, Wang X, Li P, Wang H, Ji H, Xie J, Qiu Q, Shen D, Dong H (2016) Plant aquaporin AtPIP1;4 links Apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction to disease immunity pathways. *Plant Physiol* 171(3):1635–1650. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01237>
- Tolstyk E, Lezhov A, Solovyyev A (2019) Identification of miRNA precursors in the phloem of *Cucurbita maxima*. *PeerJ* 7:e8269. <https://doi.org/10.7717/peerj.8269>
- Tracy FE, Gilliam M, Dodd AN, Webb AAR, Tester M (2008) NaCl-induced changes in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in *Arabidopsis thaliana* are heterogeneous and modified by external ionic composition. *Plant Cell Environ* 31(8):1063–1073. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01817.x>
- Tran L-SP, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(51):20623–20628. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706547105>
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K (2010) “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 13(2):132–138. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.006>
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an Osmosensor. *Plant Cell* 11(9):1743–1754. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.9.1743>
- Van der Does D, Boutrot F, Engelsdorf T, Rhodes J, McKenna JF, Vernhettes S, Koevoets I, Tintor N, Veerabagu M, Miedes E, Segonzac C, Roux M, Breda AS, Hardtke CS, Molina A, Rep M, Testerink C, Mouille G, Höfte H, Hamann T, Zipfel C (2017) The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase MIK2/LRR-KISS connects cell wall integrity sensing, root growth and response to abiotic and biotic stresses. *PLoS Genet* 13(6):e1006832. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006832>
- Veley KM, Maksiav G, Frick EM, January E, Kloepper SC, Haswell ES (2014) *Arabidopsis* MSL10 has a regulated cell death signaling activity that is separable from its mechanosensitive Ion Channel activity. *Plant Cell* 26(7):3115–3131. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.128082>
- Verslues PE, Sharma S (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arabidopsis Book* 8:e0140. <https://doi.org/10.1199/tab.0140>
- Visentini I, Pagliarani C, Deva E, Caracci A, Tureckova V, Novak O, Lovisolo C, Schubert A, Cardinale F (2020) A novel strigolactone-miR156 module controls stomatal behaviour during drought recovery. *Plant Cell Environ* 43(7):1613–1624. <https://doi.org/10.1111/pce.13758>
- Visentini I, Vitali M, Ferrero M, Zhang Y, Ruyter-Spira C, Novák O, Strnad M, Lovisolo C, Schubert A, Cardinale F (2016) Low levels of strigolactones in roots as a component of the systemic signal of drought stress in tomato. *New Phytol* 212(4):954–963. <https://doi.org/10.1111/nph.14190>
- Wang C, Teng Y, Zhu S, Zhang L, Liu X (2019) NaCl and cold-induced stress activate difference Ca<sup>2+</sup> permeable channels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 87:217–225
- Wang P, Zhao Y, Li Z, Hsu C-C, Liu X, Fu L, Hou Y-J, Du Y, Xie S, Zhang C, Gao J, Cao M, Huang X, Zhu Y, Tang K, Wang X, Tao WA, Xiong Y, Zhu J-K (2018) Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Mol Cell* 69(1):100–112.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002>
- Wang T, Li X, Zhang X, Wang Q, Liu W, Lu X, Gao S, Liu Z, Liu M, Gao L, Zhang W (2021) RNA motifs and modification involve in RNA long-distance transport in plants. *Front Cell Dev Biol* 9:651278. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.651278>
- Wang W, Chen Q, Xu S, Liu W-C, Zhu X, Song C-P (2020) Trehalose-6-phosphate phosphatase E modulates ABA-controlled root growth and stomatal movement in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol* 62(10):1518–1534. <https://doi.org/10.1111/jipb.12925>
- Watanabe K, Morishita K, Zhou X, Shizaki S, Uchiyama Y, Koike M, Naguro I, Ichijo H (2021) Cells recognize osmotic stress through liquid–liquid phase separation lubricated with poly(ADP-ribose). *Nat Commun* 12(1):1353. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21614-5>
- Waters MT, Gutjahr C, Bennett T, Nelson DC (2017) Strigolactone signaling and evolution. *Annu Rev Plant Biol* 68:291–322. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-040925>
- Weiste C, Pedrotti L, Selvanayagam J, Muralidhara P, Fröschel C, Novák O, Ljung K, Hanson J, Dröge-Laser W (2017) The *Arabidopsis* bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated control of primary root growth. *PLoS Genet* 13(2):e1006607. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006607>
- Westwood JH (2015) RNA transport: delivering the message. *Nat Plants* 1(4):15038. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.38>
- Wilkins KA, Matthus E, Swarbreck SM, Davies JM (2016) Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Front Plant Sci* 7:1296. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01296>
- Wilson ME, Mixdorf M, Berg RH, Haswell ES (2016) Plastid osmotic stress influences cell differentiation at the plant shoot apex. *Development*:dev136234. <https://doi.org/10.1242/dev.136234>
- Winter N, Kragler F (2018) Conceptual and methodological considerations on mRNA and proteins as intercellular and long-distance signals. *Plant Cell Physiol* 59(9):1700–1713. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy140>
- Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20(4):1101–1117. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055871>
- Wolf S, Hématy K, Höfte H (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 63(1):381–407. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105449>
- Wu F, Chi Y, Jiang Z, Xu Y, Xie L, Huang F, Wan D, Ni J, Yuan F, Wu X, Zhang Y, Wang L, Ye R, Byeon B, Wang W, Zhang S, Sima M, Chen S, Zhu M, Pei J, Johnson DM, Zhu S, Cao X, Pei C, Zai Z, Liu Y, Liu T, Swift GB, Zhang W, Yu M, Hu Z, Siedow JN, Chen X, Pei ZM (2020) Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature* 578(7796):577–581. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2032-3>
- Xia C, Zheng Y, Huang J, Zhou X, Li R, Zha M, Wang S, Huang Z, Lan H, Turgeon R, Fei Z, Zhang C (2018) Elucidation of the mechanisms of long-distance mRNA movement in a *Nicotiana benthamiana*/tomato heterograft system. *Plant Physiol* 177(2):745–758. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01836>
- Yang L, Perrera V, Saplaoura E, Apelt F, Bahin M, Kramdi A, Olas J, Mueller-Roeber B, Sokolowska E, Zhang W, Li R, Pitzalis N, Heinlein M, Zhang S, Genovesio A, Colot V, Kragler F (2019) m5C methylation guides

- systemic transport of messenger RNA over graft junctions in plants. *Curr Biol* 29(15):2465–2476.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.042>
- Yoshimura K, Iida K, Iida H (2021) MCAs in *Arabidopsis* are  $\text{Ca}^{2+}$  permeable mechanosensitive channels inherently sensitive to membrane tension. *Nat Commun* 12(1):6074. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26363-z>
- Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Zhang J, Theprungsirikul L, Shrift T, Krichilsky B, Johnson DM, Swift GB, He Y, Siedow JN, Pei Z-M (2014) OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked  $\text{Ca}^{2+}$  increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*. *Nature* 514(7522):367–371. <https://doi.org/10.1038/nature13593>
- Zavaliev R, Mohan R, Chen T, Dong X (2020) Formation of NPR1 condensates promotes cell survival during the plant immune response. *Cell* 182(5):1093–1108.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.016>
- Zegbe JA, Behboudian MH, Clothier BE (2006) Responses of Petopride<sup>®</sup> processing tomato to partial rootzone drying at different phenological stages. *Irrig Sci* 24(3):203–210. <https://doi.org/10.1007/s00271-005-0018-4>
- Zhang G, Kong G, Li Y (2021a) Long-distance communication through systemic macromolecular signaling mediates stress defense responses in plants. *Physiol Plant* 173(4):1926–1934. <https://doi.org/10.1111/pp.13535>
- Zhang J, Davies WJ (1989) Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ* 12(1):73–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1989.tb01918.x>
- Zhang L, Shi X, Zhang Y, Wang J, Yang J, Ishida T, Jiang W, Han X, Kang J, Wang X, Pan L, Lv S, Cao B, Zhang Y, Wu J, Han H, Hu Z, Cui L, Sawa S, He J, Wang G (2019a) CLE9 peptide-induced stomatal closure is mediated by abscisic acid, hydrogen peroxide, and nitric oxide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 42(3):1033–1044. <https://doi.org/10.1111/pce.13475>
- Zhang S, Sun L, Kragler F (2009) The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol* 150(1):378–387. <https://doi.org/10.1104/pp.108.134767>
- Zhang Y, Daday C, Gu R-X, Cox CD, Martinac B, de Groot BL, Walz T (2021b) Visualization of the mechanosensitive ion channel MscS under membrane tension. *Nature* 590(7846):509–514. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03196-w>
- Zhang Y, Lv S, Wang G (2018) Strigolactones are common regulators in induction of stomatal closure in plants. *Plant Signal Behav* 13(3):e1444322. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1444322>
- Zhang Z, Tong X, Liu S-Y, Chai L-X, Zhu F-F, Zhang X-P, Zou J-Z, Wang X-B (2019b) Genetic analysis of a Piezo-like protein suppressing systemic movement of plant viruses in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 9(1):3187. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39436-3>
- Zhang Z, Zheng Y, Ham B-K, Chen J, Yoshida A, Kochian LV, Fei Z, Lucas WJ (2016) Vascular-mediated signalling involved in early phosphate stress response in plants. *Nat Plants* 2:16033. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.33>
- Zhong W, Hartung W, Komor E, Schobert C (1996) Phloem transport of abscisic acid in *Ricinus communis* L. seedlings. *Plant Cell Environ* 19(4):471–477. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00339.x>

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## 5) ROPGEF

Ainsi une partie de la signalisation osmotique dans la racine d'*Arabidopsis* passe par ROP6. En particulier, cette protéine est limitante pour l'accumulation des ROS induite par le signal osmotique. Or et comme expliqué précédemment, ROP6 est aussi impliquée dans la signalisation auxine dans les mêmes types cellulaires. On peut donc se demander comment ce régulateur unique ROP6 peut induire des réponses spécifiques. Il serait possible que certains des régulateurs de ROP6 soient activés spécifiquement par le signal osmotique. Comme les GEFs sont des activateurs directs de ROP6, ils sont des candidats potentiels.

### 5.1) Structure

Les RopGEF sont les GEF (guanine nucleotide exchange factor) des ROP. Pour plus de clarté, elles seront appelées simplement GEF dans la suite du manuscrit. Deux grandes classes de GEF existent chez les plantes, celle qui contiennent un domaine dock homology region 2 (DHR2) et les GEF qui ont un domaine PRONE. Cette dernière classe est spécifique des plantes. Elles peuvent activer les ROP mais pas les Rho animales (Berken et al., 2005). À l'inverse, la GEF Tiam1 qui active les Rac animales, active aussi les ROP dont ROP4 (Berken et al., 2005). Cela est sûrement dû à la forte conservation de séquence entre les ROP et les Rho (Berken et al., 2005).

Les GEF catalysent le switch moléculaire de la forme inactive liée au GDP à la forme active liée au GTP des petites GTPases. Le GTP étant très fortement lié (affinité de valeurs  $K_d$  entre  $10^{-11}$  et  $10^{-7}$  M) (Bourne et al., 1991), les GEF permettent sa dissociation du GDP afin de lier le GTP. Les mécanismes exacts de cette dissociation restent encore peu connus. Néanmoins, le domaine PRONE est suffisant pour cette activité. Le modèle de fonctionnement des GEF suppose que le domaine PRONE est auto-inhibé par la partie C-terminale des GEF. La levée de cette inhibition serait médiée par une phosphorylation du C-terminal, entraînant la libération du domaine PRONE. Il a été rapporté que dans le tube pollinique, des RLK membranaires phosphorylent le C-terminal et lèvent cette auto-inhibition (Berken et al., 2005; Gu et al., 2006; Zhang and McCormick, 2007; Chang et al., 2013). En effet la structure du domaine PRONE8 en complexe avec ROP4 a été résolue et a permis de localiser une phosphorylation qui

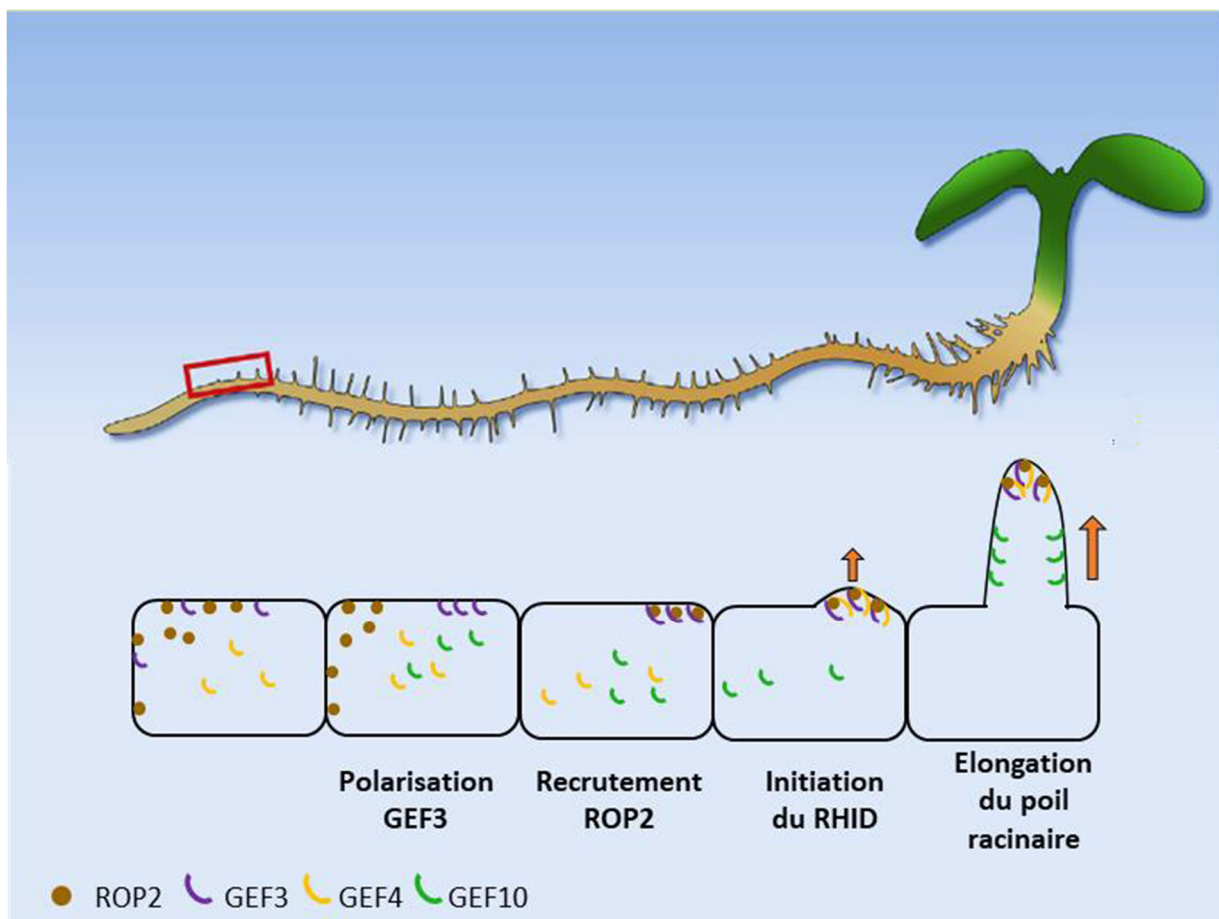
régulerait cette interaction (Thomas et al., 2007; Berken and Wittinghofer, 2008; Thomas and Berken, 2010).

SPIKE1(SPK1) représente le seul membre GEF contenant un domaine DRH2 (Qiu et al., 2002). Les mutants *spk1* ont un phénotype pléotropique allant d'une altération des cellules de l'épidermes foliaire, des trichomes, mais aussi de la forme des cotylédons (Qiu et al., 2002). SPIKE1 a été décrit également comme impliqué dans la dynamique et la distribution polaire de PIN2, via l'activation de ROP6 qui interagit avec RIC1 (Lin et al., 2012). Au niveau racinaire, *spk1* est altéré dans sa densité des racines latérales et est agravitropique (Lin et al., 2012). SPIKE1 a été aussi décrite comme responsable de la croissance anisotropique du pétale (Ren et al., 2016).

## 5.2) ROPGEF et signalisation

Tout comme les ROP, les GEF sont impliquées dans des mécanismes de développement en lien avec la croissance polaire. Par exemple, le quadruple mutant *gef 1-9-12-14* montre un défaut de croissance du tube pollinique (Chang et al., 2013). De même, lorsque GEF1, GEF8 ou GEF12 sont surexprimées cela induit une perte de polarité du tube (Yu et al., 2018b). Ainsi, la quantité de GEF semble un facteur important pour la croissance polaire des cellules. Les GEF jouent aussi un rôle dans la formation des domaines polaires de ROP. Dans les trichoblastes, comme explicité précédemment, ROPGEF3 participe à la disposition du RHID, au recrutement polarisé de ROP2 (Denninger et al., 2019). Par la suite ROPGEF4 sera recrutée afin de promouvoir le renflement du RHID quant à ROPGEF10 il permet l'élongation du poil (Huang et al., 2013) (Figure 10).





**Figure 10 : Spécificité du rôle des GEF dans le poil racinaire**

GEF3 permet la polarisation de ROP2 et la mise en place de l'initiation du RHID ; GEF4 permet l'initiation du renflement. GEF10 se répartit sur les flans du poil racinaire permettant sa croissance (adapté de Denniger et al., 2019).

Il a été montré également l'implication du cycle d'activation et d'inactivation dans la formation des domaines des ROP. Par exemple des preuves génétiques montrent que GEF4 et GEF7 et GAP3 et GAP4 permettent la régulation de la formation des nanodomains entraînant la coordination des microtubules afin de créer les puits de chargement du métaxylème (Nagashima et al., 2018).

Les ROPGEF sont impliquées également dans certaines voies hormonales. Par exemple GEF7 sous signal auxinique a été décrite comme contrôlant les facteurs de transcription PLT. Les PLT maintiennent les cellules souches dans le méristème racinaire (Chang et al., 2013). GEF1 et GEF4 seraient également des régulateurs de ROP11 lors de la fermeture stomatique induit par l'ABA (acide abscissique). De même, l'ABA entraîne la dégradation de GEF1, ce qui joue un

rôle sur l'inhibition de la croissance des racines latérales (Li and Liu, 2012). Selon ces auteurs, l'interaction entre PPC2 (Protein Phosphatase 2C) -ROPGEF1-ROP11 serait une voie antagoniste des récepteurs à ABA, PYL/RCAR (Pyrabactin Resistance 1/PYR1-like/Regulatory Component of ABA Receptor) (Li et al., 2016). Dans le contexte de la signalisation ABA, GEF1 a également été montré comme interagissant avec des CPK (Calcium-Dependent Protein Kinase) notamment CPK4. Sous signal ABA, la phosphatase PPC2 est inactivée et ne protège plus GEF1 de la dégradation de GEF1 sous signal ABA par CPK4. Ainsi, *gef1/4/10 triple mutant*, *and rop10*, *rop11*, *and rop10/11* ont un phénotype d'hyper sensibilité à l'ABA (Li et al., 2016).

## 6) Objectifs

La membrane représente une interface entre la cellule et son environnement, et de ce fait participe à la transduction des signaux biologiques. Les ROP ont été décrites comme des acteurs moléculaires essentiels dans la transduction de nombreux signaux. En réponse à ces stimulations, elles forment des plateformes membranaires, appelées nanodomains. Ces structures assurent le regroupement d'acteurs lipidiques et protéiques qui permettent d'encoder les signaux biologiques. Mais la nature exacte de ces acteurs et leurs rôles sur la signalisation cellulaire restent mal compris.

Dans ce travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'isoforme ROP6. Effectivement, au sein de la même cellule, cette protéine semble au cœur de voies signalétiques indépendantes.

Lors d'une stimulation osmotique, ROP6 colocalise dans des nanodomains avec les enzymes NADPH oxydase (RBOHD et RBOHF) qui induisant l'accumulation de ROS dans les cellules (Smokvarska et al., 2020). Ces nanodomains s'avèrent nécessaires et suffisant à la production de ROS induit par le signal osmotique. En réponse à la phytohormone auxine, ROP6 forme également des nanodomains, mais sans RBOHD. Ce résultat est cohérent avec l'absence d'accumulation de ROS en réponse à l'auxine. Ainsi, la composition des nanodomains serait donc un élément clé dans la signalisation et participerait à l'établissement d'une réponse spécifique.

Ainsi, comprendre comment le signal osmotique aboutit à une réponse spécifique tout en passant par l'activation d'un régulateur (ROP6) commun à plusieurs voies, constitue l'axe central de ce travail de thèse.

Dans ce travail de thèse, j'ai donc cherché à mieux caractériser le rôle des nanodomains de ROP6 dans la signalisation osmotique. Le premier axe de mon travail a consisté à explorer le rôle des protéines GEF dans la signalisation osmotique. En particulier, par une approche candidat, j'ai identifié un activateur spécifique de ROP6 sous signalisation osmotique : GEF14. Sa caractérisation moléculaire et son impact sur la dynamique de ROP6 seront décrits dans le chapitre 1 et rédigés sous forme d'un article scientifique dont je suis première auteure. Mon travail a aussi permis de révéler que GEF14 est spécifiquement exprimé dans les cellules trichoblastiques, contrairement à ROP6. Ce résultat laisserait à penser que la signalisation osmotique se passe préférentiellement dans ce type cellulaire. Ces aspects seront discutés dans la partie suivante. Pour finir, je présenterai des résultats illustrant que les GEF sont bien des acteurs déterminants pour activer de manière signal spécifique ROP6. Le chapitre 2, quant à lui, sera axé sur la compréhension de l'activation de GEF14. Pour cela deux voies ont été suivies : (i) l'étude de la phosphorylation de GEF14 et (ii) la caractérisation de l'interactome de GEF14. Enfin en perspective, je proposerai un nouveau modèle de la signalisation osmotique à la membrane plasmique et discuterai des stratégies à suivre pour identifier les activateur(s) de GEF14. En effet, cet acteur pourrait bien être l'un des senseurs nécessaires pour percevoir le signal osmotique chez les plantes.

## 2) Chapitre I : GEF14 un acteur clé de la signalisation osmotique

Dans ce chapitre, je présente mon travail concernant l'identification et la caractérisation de la protéine GEF14 comme un acteur agissant spécifiquement dans la voie de signalisation osmotique. Ce travail est rédigé sous forme d'un article scientifique. Cet article rassemble les données majeures de mon travail de thèse et j'en suis la première auteure. Il a pour objectif d'être soumis très prochainement. Les données présentées dans cet article soulèvent un certain nombre de questions que j'ai commencé à explorer durant ma thèse. J'ai choisi de présenter une partie de ces données expérimentales qui tentent de répondre à ces nouveaux questionnements.

Partie 1 : GEF14 is a specific activator of the plant osmotic signaling pathway by controlling ROP6 nanodomain formation.

**GEF14 is a specific activator of the plant osmotic signaling pathway by controlling ROP6 nanodomain formation.**

Gorgues Lucille<sup>1</sup>, Smokvarska Marija<sup>1-2</sup>, Mercier Caroline<sup>1</sup>, Dongois Armelle<sup>1</sup>, Fiche Jean-Bernard<sup>3</sup>, Nollmann Marcelo<sup>3</sup>, Martiniere Alexandre<sup>1</sup>

1- IPSiM Univ Montpellier, CNRS, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France.

2- UMR 5200 Membrane Biogenesis Laboratory, CNRS and University of Bordeaux, INRAE Bordeaux, Villenave d'Ornon, France.

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

## ABSTRACT

During growth and development, plants continually encounter and respond to a variety of environmental signals. This process involves complex signaling networks. Nevertheless, the mechanisms underlying the integration and specificity of signals in this context remain poorly understood.

Rho of Plant (ROP) signaling plays a central role in various processes, including polar cell growth and responses to different stimuli. ROP6 signaling, in particular, relies on dynamic membrane partitioning, forming stimuli-dependent membrane nanodomains. The effector composition of ROP6 nanodomains varies depending on the signal and may be involved in downstream signal specificity. In this work, we explore how ROP6 signaling is controlled by upstream regulators. By a reverse genetic screen, we found that Guanine nucleotide exchange factor 14 (GEF14) is required for osmotically induced ROS accumulation. This GEFs isoform acts specifically in response to osmotic stimulation, since it is not needed for other stimulus like flg22 or ABA. Using FRET sensors and super-resolution light imaging methods, we demonstrate that GEF14 can activate ROP6 and control its dynamics and clustering at the plasma membrane (PM) in a signal-specific manner. Furthermore, we find that GEF14 can be relocated from the cell cytoplasm to a discrete structure at the PM minutes after cell osmotic stimulation. Taken together, our results suggest that a single isoform can determine signal specific activation of ROP6 and controls its membrane organization.

## INTRODUCTION

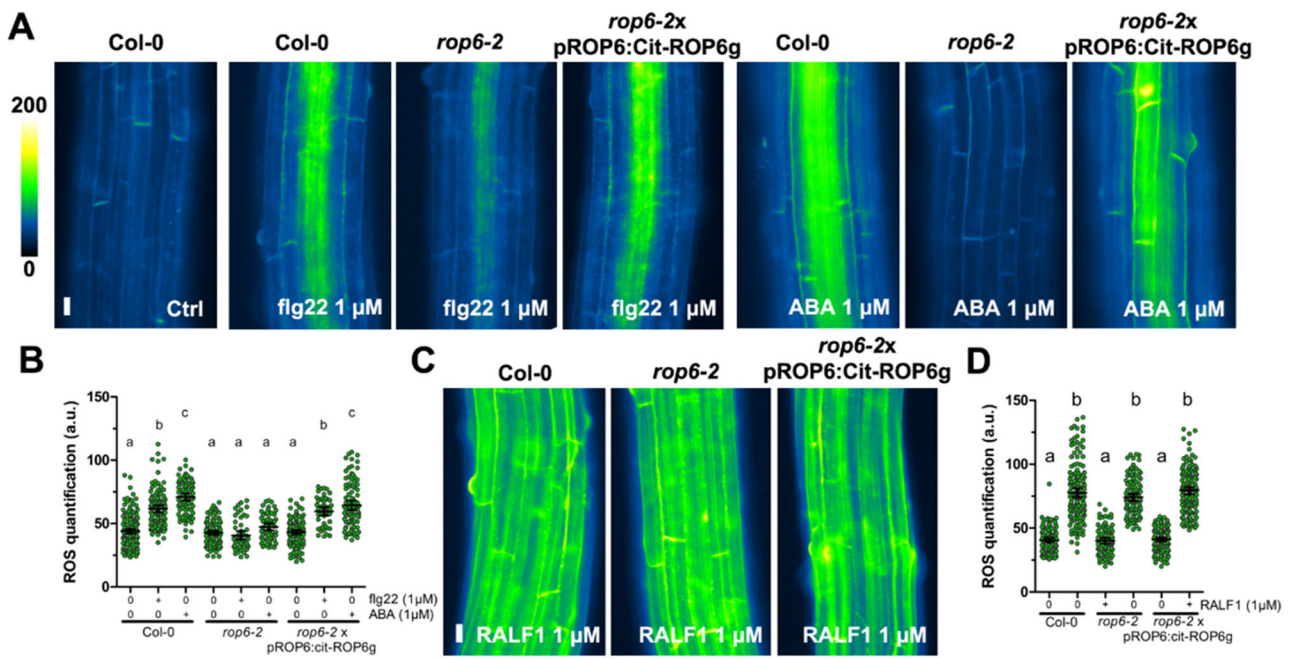
Cell signaling networks produce output decisions to generate developmental and physiological responses. They are generally composed of combinatorial connections of individual signaling pathways. In these structures, nodes or hubs play a critical role for network topology and determine their emergent properties such as ultrasensitivity, bistability, oscillatory behavior or robustness (Azeloglu and Iyengar, 2015). From a molecular point of view, biochemical information is transferred via coupled reactions, which are temporally and spatially controlled. How spatiotemporal parameters, especially within biological membranes, determine signaling network properties is an emerging question in biology.

Biological membranes are composed of a myriad of lipids and proteins. These compounds are not homogeneously distributed in membranes and are arranged in domains of varying size and composition. Paradoxically, membranes are also fluid structures, allowing the lateral mobility of their constituents through thermal agitation. This property of the membrane is essential for the dynamic distribution of its constituents and thus regulates signaling processes (Jaillais and Ott, 2020; Martinière and Zelazny, 2021).

In plants, the role of membrane dynamic partitioning is particularly important for Rho of Plant (ROP) signaling processes (Feiguelman et al., 2018; Smokvarska et al., 2021; Pan et al., 2023). Indeed, ROPs can form micrometer-sized domains that are necessary for polar cell growth. This is notably the case for the development of root hairs, pollen tubes or lobes in epidermal pavement cells (PVC) (Feiguelman et al., 2018). This propriety to form polar domain been in conserved in the moss *Marchentia polymorpha* (Rong et al., 2022). Interestingly, ROPs can also reorganize from a homogeneous distribution in the PM into nano- sized domains in response to external stimuli (Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2020). For example, ROP6 forms nanodomains in response to auxin, which are needed for cellular and tissue responses to this phytohormone (Platre et al., 2019; Pan et al., 2020). ROP6 nanodomain formation is also a key factor in triggering osmotic signalling pathways in plant cells (Smokvarska et al., 2020). Consequently, ROP6 nanodomain formation is involved in signal transmission from two different stimuli in the same cell types. While an osmotic signal induces ROP6 nanodomains containing PM RBOHD/F to catalyze ROS production, one of the earliest signaling responses to osmotic stimulation, we do not observe ROP6/RBOHD/F nanodomains nor ROS accumulation in response to the phytohormone auxin (Smokvarska et al., 2020). Thus, the effectors present in ROP6 nanodomains differ depending on the nature of the upstream stimulus. How such specificity is achieved remains at this stage an open question.

ROPs belong to the superclade of Ras/Rho GTPase and works as molecular switches due to their conformational change between active GTP-bound form and inactive GDP-bound form (Wittinghofer and Berken, 2008). The catalytic switch between its active and inactive form is mediated through GEFs that facilitate GDP release and GAP that enhance GTP hydrolysis (Wittinghofer and Berken, 2008). Because they are direct activators of ROP, GEFs were proposed to participate in the establishment of Rho GTPase signaling specificity (Marei and Malliri, 2017). Plants have two major types of GEFs: a plant specific family containing the catalytic domain PRONE and GEF containing the dock homology region 2 (DHR2) (Qiu et al., 2002; Berken et al., 2005; Gu et al., 2006; Basu et al., 2008). SPIK1 (SPK1) is the unique DHR2-type of GEF in Arabidopsis genome and was demonstrated to act on cytoskeleton regulation and needed for auxin-mediated ROP6 activation (Basu et al., 2008; Lin et al., 2012). Interestingly, ROP6 was also demonstrated to interact with several PRONE-containing GEFs. GEF14 was shown to immunoprecipitate with ROP6 and is needed to activate ROP6 in PVC. In addition, GEF4 and GEF10 show a protein-protein interaction with ROP6 by Bimolecular fluorescence complementation and yeast two hybrids (Huang et al., 2013). Those results suggest that several GEFs can interact and potentially regulate activation ROP6. But, does some of those isoform control signal specificity and how GEFs act on ROP6 membrane partitioning remain unexplored.

Described as needed for auxin and osmotic signaling in root cells, we extend the role of ROP6 for cell responses to other signals. Then, by reverse genetic we show that a single isoform of GEF is necessary to trigger plant osmotic signaling. Thus, ROP6 is acting as a signaling hub, controlling several independent signaling pathways, we found that GEF14 acts specifically in the osmotic signaling pathway. Furthermore, we demonstrate that GEF14 can activate ROP6 *in planta* and is controlling ROP6 dynamic and clustering specifically in response to the osmotic signal.



**Figure 1 : ROP6 is necessary to trigger ROS accumulation in response to certain stimuli.**

(A) Images of dihydroethidium (DHE) stained root cells of Col-0, *rop6-2* or *rop6-2x*pROP6:cit-ROP6g in presence or absence of flg22 or ABA. (B) DHE fluorescence quantification in control condition, after 30 min of 1  $\mu$ M flg22 or 60 min of 1  $\mu$ M ABA with the different genetic material. (C) Images of dihydroethidium (DHE) stained root cells of Col-0, *rop6-2* or *rop6-2x*pROP6:cit-ROP6g in control condition or in presence of RALF1 peptide. (D) DHE fluorescence quantification in control condition or after 15 min of 1  $\mu$ M of RALF1 treatment with the different genetic material. Error bars correspond to the 95% confidence interval. According to analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test, letters indicate significant differences among means ( $P < 0.01$ ).  $n > 26$  cells from three to four independent biological replicas. Scale bar, 10  $\mu$ m. a.u., arbitrary units.



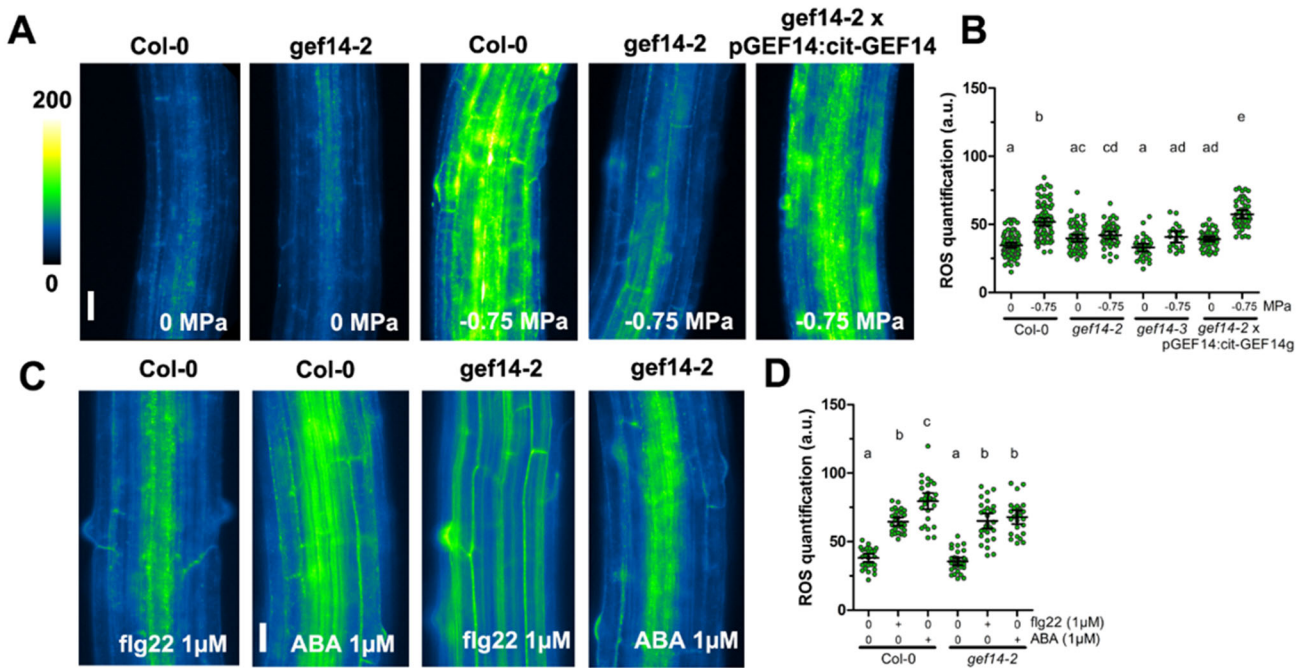
## RESULTS

ROP6 is necessary for short term cell signaling responses after treatment with different stimuli

Since, ROP6 mediate short term response to both auxin (Platre et al., 2019) and osmotic signals ((Smokvarska et al., 2020), FigS1A and B), we wonder if this pleiotropic role could be extended to other signals. Thus, wild type, *rop6-2* and *rop6-2xpROP6:cit-ROP6g* plants were exposed either to the bacterial peptide flg22 or the phytohormone ABA that are both known to induce ROS accumulation in Arabidopsis root cells (Yang et al., 2014; Poncini et al., 2017). DMSO was used as ABA solvent. This treatment shows no effect on ROS accumulation compare to control condition (FigS1 C). As expected, we found that both flg22 and ABA treatment are able to induce ROS accumulation in wild type plants (Fig1 A, B). Interestingly, this ROS accumulation was totally compromised in *rop6-2* and restored in the *rop6-2xpROP6:cit-ROP6g* line (Fig1 A, B). In addition, we tested the effect of the Rapid Alkanisation Factor 1 (RALF1) since it is also known to induce ROS accumulation in root tips (Yu et al., 2018a). Conversely to flg22 and ABA treatment, we found that ROS induced by RALF1 is not mediated through ROP6 (Fig1 C, D). Those results suggest that in root epidermal cells, ROP6 could mediate ROS signaling in response to some, but not all signals.

GEF14 acts specifically on osmotic signaling

Those results prompted us to determine how a single signal can mediate a specific response through ROP6. The GEF gene family is known to directly interact with ROPs protein and mediate their conformation changes from GDP (inactive) to GTP (active) bound form. Recently, GEF14 was shown to interact with ROP6 in Arabidopsis pavement cells (PCV) (Lin et al., 2021; Tang et al., 2021). Whereas the two knock-out alleles *gef14-2* and *gef14-3* show no osmotically induced ROS accumulation after 15 min of treatment, the line *gef14-2xpGEF14:cit-GEF14g* behave similarly to control plants (Fig2 A, B). These results show that GEF14 is necessary to trigger osmotic signaling in Arabidopsis root cells. Yet, ROP6 was also described to interact with other GEF isoforms, especially GEF4 and 10 (Huang et al., 2013). To determine if other GEFs are involved in osmotic signaling, a series of knock-out lines were tested. Neither GEF2, GEF3, GEF4, GEF10 nor GEF11 were needed to osmotically induced ROS accumulation (Fig S2 A). To rule out any potential redundancy effect, GEF multiple mutants were also tested. Again, only when *GEF14* was invalidated the osmotically induced ROS accumulation was lost (FigS2 B). Then, we wonder if GEF14 acts specifically on osmotic signaling. Therefore, wild type and *gef14-2* plants were incubated either with flg22 or ABA that both induce ROS accumulation in a ROP6 dependent manner (Fig1 B). Interestingly, *gef14-2* is still able to accumulate ROS after those treatments (Fig2 C, D). Taken together these results suggest that among the tested GEF isoforms, GEF14 is the unique GEF that is needed to sustain the osmotic signaling in root cells. In addition, we showed that GEF14 acts specifically in this signaling pathway.



**Figure 2 : GEF14 is specifically involved in osmotically induced ROS accumulation.**

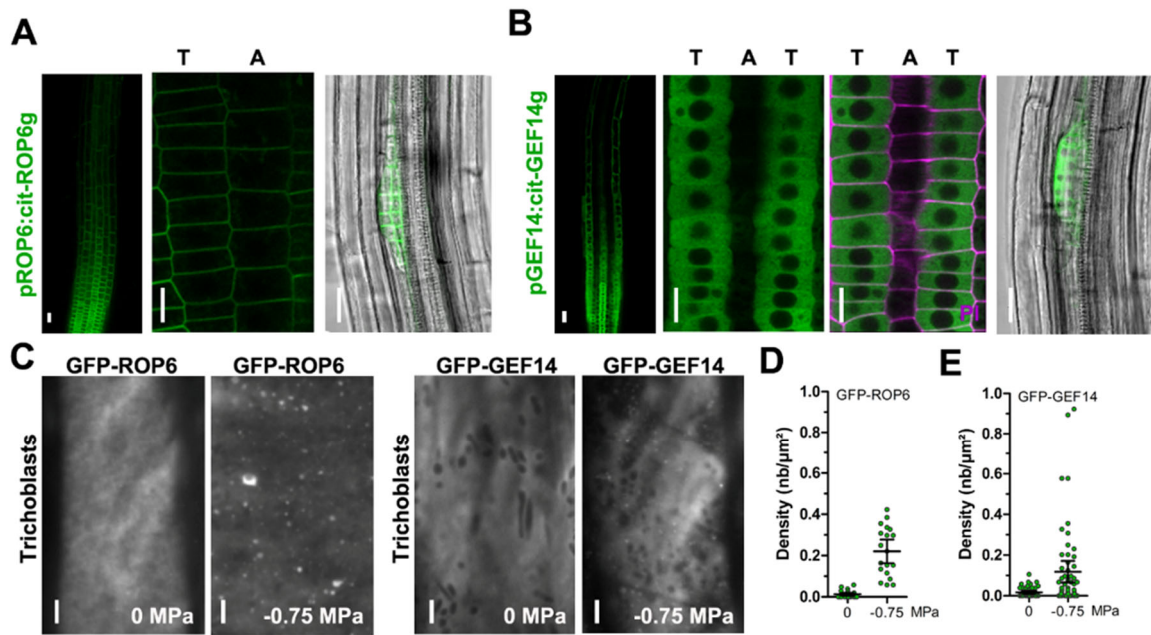
(A) Images of dihydroethidium (DHE) stained root cells of Col-0, *gef14-2*, *gef14-3* or *gef14-2*xpGEF14:cit-GEF14g in control condition (0 MPa) or after application -0.75 MPa solution. (B) DHE fluorescence quantification in control condition, after 15 min treatment with -0.75 MPa solution with the different genetic material. (C) Images of dihydroethidium (DHE) stained root cells of Col-0 or *gef14-2* in control condition after 30 min of 1 μM flg22 or 60 min of 1μM ABA and its respective DHE fluorescence quantification (D). Error bars correspond to the 95% confidence interval. According to analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test, letters indicate significant differences among means ( $P < 0.01$ ).  $n > 26$  cells from three to four independent biological replicas. Scale bar, 10 μm. a.u., arbitrary units.

GEF14 and ROP6 expression pattern overlap in root cells and GEF14 formed discrete foci at the PM after an osmotic stimulation

ROP6 and GEF14 are both needed to trigger osmotic signaling in root cells. If these two proteins are functionally linked, they should be expressed in similar cells. As previously described, the signal of *rop6-2xpROP6:cit-ROP6g* lines label the epidermal cell in the meristem and also in the elongation zone (Fig3 A). *gef14-2xpGEF14:cit-GEF14g* is also expressed in the meristematic and elongation zone, but restricted to trichoblast cells (Fig3 B). At a cellular level ROP6 appears to be mostly at the PM whereas GEF14 is accumulated in the cytoplasm (Fig2 A, B). Only a small portion of cit-GEF14 localized at the PM at the site of root hair initiation domain (RHID) and also during root hair emergence (FigS3 A, arrows). A similar pattern was observed with pROP6:cit-ROP6g line (FigS3 A). Because they likely colocalized in the RHID, we wonder if the osmotically-induced ROS accumulation described earlier may take rise at this location. Recently, GEF3 was shown to be essential to determine the RHID polarity in trichoblast cells and is subsequently important to relocalize GEF4 and ROP2 to trigger root hair emergence (Denninger et al., 2019). We wonder if a similar mechanism could drive GEF14 RHID localization. Interestingly in *gef3-1xpGEF14:cit-GEF14g*, cit-GEF14g fluorescent signal is lost at the RHID (FigS3 B). This shows that in *gef3-1*, GEF14 is not accumulated in RHID. Yet, osmotically-induced ROS accumulation is still happening in *gef3-1* (FigS2 A). This result suggests that osmotic signaling mediated by GEF14 is not happening at the RHID. Previously, we have shown that ROP6 is accumulated in nanodomains minutes after application of an osmotic signal (Smokvarska et al., 2020). The formation of those nanodomains are needed to trigger osmotic signaling. Then, we applied total internal reflection microscopy (TIRF) to lines expressing either GFP-ROP6 or GFP-GEF14. In trichoblast cells, a part of GFP-ROP6 appears in clusters after an osmotic signal (Fig3 C, D). Similarly, GFP-GEF14 signal in control condition is uniformly distributed in cells, but after cell osmotic stimulation, GFP-GEF14 also appears in discrete foci. Thus, cell stimulation induces a GFP-GEF14 relocalisation, maybe at the PM together with ROP6.

GEF14 is an activator of ROP6 in planta

Since ROP6 and GEF14 share a similar expression pattern and both form clusters after cell stimulation, we wonder if GEF14 could be an activator of ROP6. First of all, we take advantage of the phenotype induced by pROP6:cit-ROP6gCA expression (Smokvarska et al., 2020). Indeed, the point mutation G15V in ROP6 sequence, locks ROP6 in its GTP bound form (constitutively active, CA). Consequently, the level of ROS present in pROP6:cit-ROP6gCA expressing plants is higher than in wild type ((Smokvarska et al., 2020); Fig4 A). Interestingly, the level of ROS was comparable between pROP6:cit-ROP6gCA and *gef14-2xpROP6:cit-ROP6gCA*, whereas their level of fluorescent remain similar (Fig4 A, FigS4 A). This suggests that the loss of GEF14 function is not able to act on a constitutively active ROP6. Therefore, GEF14 may trigger ROP6 activation. To confirm this hypothesis, we develop a FRET-based sensor to record *in vivo* ROP6 activation state. The design was based on the iROP sensor



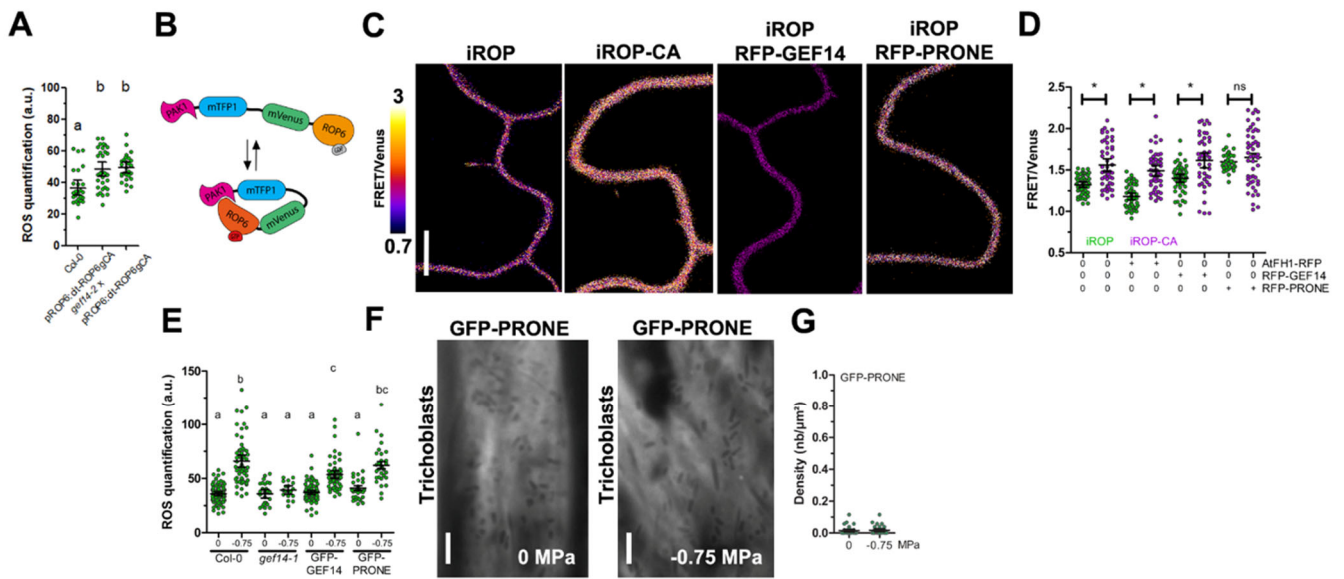
**Figure 3 : GEF14 is expressed in trichoblasts cells and forme cluster at the PM after osmotic stimulation.**

(A) Fluorescent signal for *rop6-2xpROP6: cit-ROP6g* expressing plants in root tip, in a zoom in region of the meristematic zone and in a lateral root primordia. (B) Fluorescent signal for *gef14-2xpGEF14: cit-GEF14g* expressing plants in root tip, in a zoom in region of the meristematic zone (counter stained with propidium iodine, PI) and in a lateral root primordia. (C) TIRF images of GFP-ROP6 or GFP-GEF14 expressing trichoblast cells in control condition or after treatment with a -0.75 MPa solution. (D-E) Quantification of cluster density in GFP-ROP6 or GFP-GEF14 expressing trichoblast cells in control condition or after treatment with a -0.75 MPa solution. Error bars correspond to the 95% confidence interval. According to analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test, letters indicate significant differences among means ( $P < 0.01$ ).  $n > 18$  cells from three independent biological replicas. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$  for A and B. Scale bar, 3  $\mu\text{m}$  for C. a.u., arbitrary units, T, trichoblast, A, atrichoblast.

previously described in Smokvarska et al., 2020. Only the fluorescent tags were changed (Fig4 B). Firstly, we express transiently in tobacco leaf epidermal cells, iROP and iROP-CA that is constitutively in a GTP-bound form (active). As expected, the FRET ratio is higher in iROP6-CA compared to iROP (Fig4 C, D). This difference in FRET ratio between iROP and iROP-CA is maintained when a membrane bound negative control is co-infiltrated (AtFH1-RFP) (Fig4 C, D). Similar results were found when *RFP-GEF14* is expressed in cells, suggesting that GEF14 is not able to activate iROP in tobacco epidermal cells (Fig4 C, D). Because GEF proteins were previously described to be inactive in resting state, we also cloned the PRONE of GEF14 in fusion with RFP (Chang et al., 2013). When co-expressed with iROP6 and iROP-CA, the FRET ratio is similar (Fig4 C, D). This result shows that PRONE domain of GEF14 is enough to induce ROP6 activation in tobacco leaf cells. Then, we tested if the amount of GEF14 in plant cells could be a limiting to trigger osmotic signaling. Then, plants overexpressing GFP-GEF14 and GFP-PRONE were generated. Interestingly, neither GFP-GEF14 nor GFP-PRONE show an enhancement of osmotically-induced ROS accumulation (Fig4 E). Those results suggest that GEF14 over accumulation is not enough to trigger osmotic signals. Because the PRONE of GEF14 induced iROP activation, we wonder why this construct is not generating higher ROS accumulation in Arabidopsis. When observed under TIRF microscopy, GFP-PRONE signal appeared homogeneously in cells in control, but also after an osmotic stimulation (Fig4 F, D). This differ to what was observed with the full-length GEF14 protein (Fig 4 C, E). This may explain why overexpression of *PRONE* is not generating constitutive high ROS accumulation in Arabidopsis root cells.

GEF14 controls ROP6 dynamic and clustering in response to osmotic, but not auxin signal.

We previously showed that ROP6 is form nanodomains, together with RBOHD during cell osmotic stimulation, leading to ROS accumulation (Smokvarska et al., 2020). GEF14 been an activator of ROP6, we tested if GEF14 can acts on ROP6 cellular localization. *gef14-2xGFP-ROP6* lines had a lower accumulation of GFP-ROP6 compare to control plants (Fig5 A). But, this amount is still higher than the endogenous ROP6 level (Fig5 A). At a cellular level, GEF14 has no effect on ROP6 PM localization (Fig5 B, C). Thus, we wonder if GEF14 may control ROP6 diffusion and clustering. To test this hypothesis and since the size of ROP6 nanodomain is below the light diffraction limits, we used single molecule localization microscopy technique (SMLM). Single particle tracking photoactivated localisation microscopy (sptPALM) allows to record diffusion and clustering of several tens of thousands of individual molecules in living cells (Fig 5 D; (Bayle et al., 2021)). As expected, ROP6 diffusion in trichoblast cells is bimodal and osmotic treatment increases the proportion of immobile ROP6 with a logD below -2 (Fig5 E, F). In *gef14-2xmEOS2-ROP6* trichoblast cells, the osmotic stimulation is not able to reduce mEOS2-ROP6 diffusion (Fig5 E, F). No impact was found in unstimulated cells. This result shows that GEF14 is needed to control ROP6 diffusion in response to osmotic stimulus. Because, our results showed that GEF14 function is restricted to the osmotic signal (Fig1), we wonder if ROP6 diffusion is also altered after cell stimulation with another signal. Auxin was shown to reduce ROP6 diffusion and induce ROP6 nanodomain formation that later determine auxin



**Figure 4 : GEF14 is an activator of ROP6.**

(A) DHE quantification of Col-0, pROP6: cit-ROP6gCA (ROP6g containing the constitutive active mutation G15V) and *gef14-2*xpROP6: cit-ROP6gCA. (B) Schematic view of iROP sensor. ROP6 GTP-bound form interacts with PAK1, allowing FRET between Venus and mCherry. In contrast, if ROP6 is inactive in its GDP-bound form the distance between the two fluorescent proteins increases, thereby diminishing FRET efficiency. (C) Ratio images ( $\text{channel}^{\text{FRET}}/\text{channel}^{\text{mVenus}}$ ) of iROP or iROP-CA where ROP6 contain the constitutive active mutation G15V expressed tobacco cells, with or without RFP-GEF14 or RFP-PRONE. (D) Quantification of ratio signal ( $\text{channel}^{\text{FRET}}/\text{channel}^{\text{mVenus}}$ ) obtained from iROP or iROP-CA expressing cells in combination with the negative control AtFH1-RFP, RFP-GEF14 or RFP-PRONE. (E) DHE quantification of Col-0, *gef14-2*, GFP-GEF14 or GFP-PRONE expressing arabidopsis root cells in control condition or after 15 min treatment with -0.75 MPa solution. (F) TIRF images of GFP-PRONE in control or after a 15 min treatment with -0.75 MPa solution and its respective cluster density quantification (G). Error bars correspond to the 95% confidence interval. (A and G) According to analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test, letters indicate significant differences among means ( $P < 0.01$ ).  $n > 16$  cells from three independent biological replicas. (D) \* corresponds to a significant difference with t-test ( $p\text{-value} > 0.05$ ),  $n > 15$  cells from three independent biological replicas. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . a.u., arbitrary units.

related cellular and tissue responses (Platre et al., 2019; Pan et al., 2020). As previously described, IAA (indole-3-acetic acid) treatment increases ROP6 immobile fraction, this effect been fully maintained in *gef14-2* line (Fig5 H, I). Altogether, those results demonstrated that GEF14 acts on ROP6 dynamic at the PM in a signal-dependent manner.

## DISCUSSION

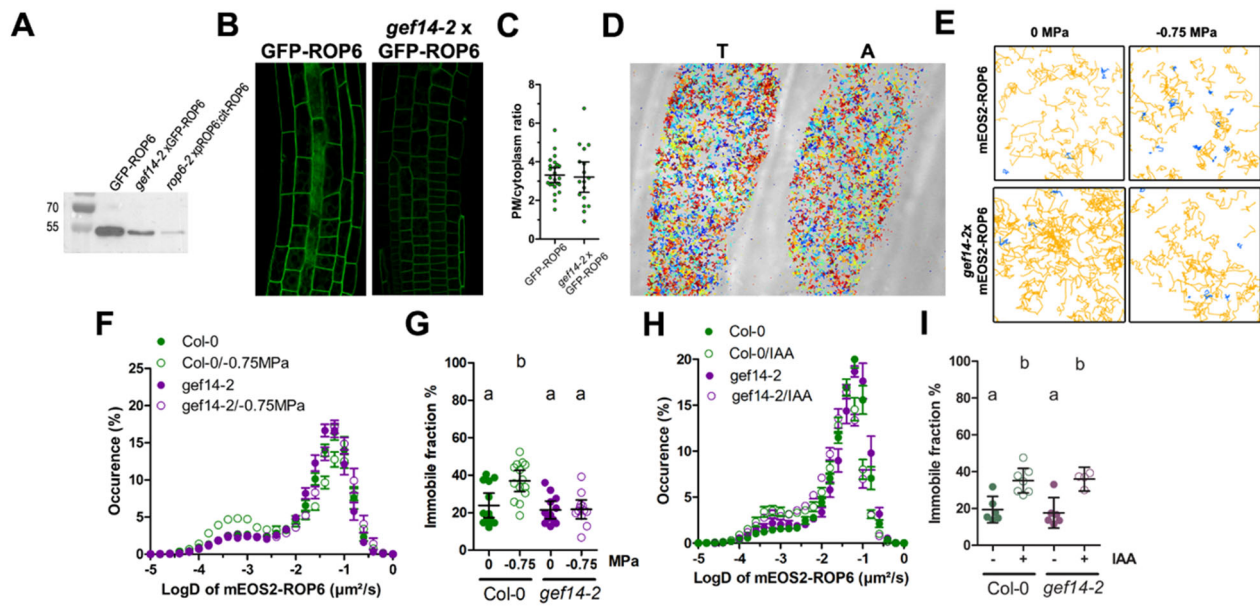
By combining genetic, FRET activation sensor and super resolution microscopy, we identified and characterized GEF14 as an osmotic-specific activator of ROP6 signaling pathway. Moreover, we found that GEF14 regulates in a signal-specific manner ROP6 dynamic and nanodomain formation within the PM.

Rho GTPases are classically seen as hub proteins, forming the neck of an hourglass shaped signaling network. It is especially the case of ROP6 in Arabidopsis root cells. Indeed, in addition to its role in osmotic and auxin signaling, we found that ROP6 is necessary for cell response to ABA and flg22, (Fig1, (Platre et al., 2019; Pan et al., 2020)). But, we also show that not all ROS-mediated signaling pathways need ROP6. For instance, RALF1 treatment induces ROS accumulation in root cells of wild type plants but also in *rop6-2* (Fig 1 D). RALF1 peptide is known to interact with *Catharanthus roseus* receptor kinases (CrRLKs), especially FERONIA and trigger secondary messengers like ROS, pH variation and calcium influx (Haruta et al., 2014b; Malivert and Hamant, 2023). Then, it is possible that RALF1-mediated ROS accumulation is still dependent on RBOHs, like it is for osmotic, ABA or flg22 signaling. But, does this response need another ROP isoform remains an open question at this stage.

Interestingly, GEF14 is not implicated in flg22 and ABA dependent ROS accumulation (Fig 2). Those results show that these other pathways are activating ROP6 by a GEF14-independent pathway. Whereas SPK1 is likely the GEF isoform involved in auxin dependent ROP6 activation in root cells, how ABA and flg22 activate ROP6 is known (Qiu et al., 2002; Basu et al., 2008). Triple and quadruple GEF mutants show an ABA hypersensitivity response in roots (Yu et al., 2012; Li et al., 2016; Li et al., 2018b). GEF1, 4, 10, 12 and 14, but not GEF7, form intracellular structure in cells under ABA, thus making ABI1 (ABA-INSENSITIVE 1) available for PYR/PYL receptors (Li et al., 2016). This suggests that GEF can act as a negative regulator of ABA transduction pathway. How this effect could be combined with our results on ABA dependent on root cells is unclear. It may constitute a negative feedback loop initiated later after the ROP6 mediated ROS accumulation. This putative negative interaction may also happen during an osmotic stimulation since ABA accumulates hours after cell osmotic stimulation and since GEF14 is also degraded by ABA.

We found that GEF14, known to regulate PVC growth, is needed to mediate some of the plant response to osmotic signals (Fig2; (Lin et al., 2021; Tang et al., 2021)). But it is not the case for 6 GEF isoforms that are also expressed in root cells (FigS2). This shows that the osmotic signals induce a pathway that acts specifically on GEF14. Our results obtained in transient expression





**Figure 5 : GEF14 acts on ROP6 dynamics in a osmotic-specific manner.**

(A) Western blot with antibody against GFP on plant extract from GFP-ROP6, *gef14-2x*GFP-ROP6 or *rop6-2xp*ROP6:cit-ROP6. (B) Fluorescent signal from GFP-ROP6 and *gef14-2x*GFP-ROP6 expressing root cells and its representative PM/cytoplasm ratio quantification (C). (D) Image reconstruction of around 6, 000 single mEOS2-ROP6 molecules in trichoblast (T) or atrichoblast (T) cells. Each color represents a single molecule tracked over time. (E) Close-up view of cell expressing either mEOS2-ROP6 or *gef14-2x*mEOS2-ROP6 expressing trichoblasts in control or after treatment with -0.75 MPa solution, where yellow trajectories have a high instantaneous diffusion (upper than  $0.01 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ) and blue trajectories a low instantaneous diffusion (below  $0.01 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ). (F) Bimodal distribution of mEOS2-ROP6 instantaneous diffusion coefficient in Col-0 (green) or *gef14-2* (purple) in control (close symbol) or after 15 min treatment with -0.75 MPa solution (open symbole). (G) Histogram represents the percentage of mEOS2-ROP6 molecules with an instantaneous diffusion bellow below  $0.01 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  in control (close symbol) or after 15 min treatment with -0.75 MPa solution (open symbole) in the two different genotype (green for Col-0 or purple for *gef14-2*). (H) Bimodal distribution of mEOS2-ROP6 instantaneous diffusion coefficient in Col-0 (green) or *gef14-2* (purple) in control (close symbol) or after 25 min treatment with 10  $\mu\text{M}$  IAA (open symbole). (I) Histogram represents the percentage of mEOS2-ROP6 molecules with an instantaneous diffusion bellow below  $0.01 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$  in control (close symbol) or after 25 min treatment with 10  $\mu\text{M}$  IAA (open symbole) in the two different genotype (green for Col-0 or purple for *gef14-2*). Error bars correspond to the 95% confidence interval. According to analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test, letters indicate significant differences among means ( $P < 0.01$ ). For panel C,  $n = 17$  cells from two independent biological replicas. For panel F-G,  $n=13$  from two independent biological replicas. For panel I,  $n>4$  from a single biological replica. a.u., arbitrary units.



suggest that full length GEF14 is inactive (Fig 4 C, D). This is in accordance with the fact that GEF1 was shown to be activated by phosphorylation to regulate ROP1 in pollen tube tip growth (Chang et al., 2013). Therefore, it is possible that a similar post translation regulation happens in the case of osmotic signaling in root cells. The nature of GEF14 activator being a kinase or a phosphatase in the context of osmotic signaling remains unknown at this stage. Nevertheless, in the context of ABA signaling, it was shown that GEF1 is activated by CPK4, and some CPKs were shown to be important to regulate root growth after osmotic related stimulation (Mehlmer et al., 2010; Li et al., 2015; Li et al., 2018). They might constitute interesting candidates for further investigations.

We found that GEF14, but not PRONE form stimuli dependent clusters at the PM, suggesting that either GEF14 C or N-ter sequences are important for PM targeting. Whereas the PRONE is sufficient to activate ROP6 in heterologous system, we found that its overexpression is not enough to trigger constitutive ROS in Arabidopsis roots, as expected. Together those result suggest, the localization of GEF14 in specific domain at the PM, may control latter signal processed. In a preprint, it was recently discovered that ROP2 activation was not sufficient to induce a proper ROP2 localization at the RHID (Fuchs et al., 2021). This suggest that in addition to its role in ROP activation, GEFs localization is of importance to convey information for proper signal transduction in cells.

GEF14 is able to control ROP6 dynamics and nanodomains formation in response to an osmotic signal (Fig 5 F, G). The role of GEF14 is restrained to this signal since our result shows that GEF14 is dispensable for auxin mediated ROP6 nanodomain formation (Fig 5 H, I). Thus, GEF can control signal specific ROP6 nanodomains formation. Because, the composition of ROP6 nanodomains vary depending of the upstream signal, we can therefore conclude that GEFs participate in the establishment of signal specificity in Arabidopsis root cells.

## MATERIAL and METHODS

### Growing condition and plant material

*Arabidopsis thaliana* accession Col-0 (N60000) was used as wild type in this study. The following lines were published before: *rop6-2*, *gef2-1*, *gef3-1*, *gef4-2*, *gef10-1*, *gef11-1*, *gef14-2*, *gef14-3*, *gef1/4/10*, *gef1/4/10/14*, *rop6-2xpROP6-cit-ROP6g*, *rop6-2xpROP6-cit-ROP6g-CA*, GFP-ROP6, mEOS2-ROP6 (Li et al., 2016; Denninger et al., 2019; Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2020). Plants were stratified for 2 days at 4°C and grown vertically on agar plates containing half-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1% (w/v) sucrose, 2.5mM MES-KOH pH6, 0.38% Agar typeE for 5 days at 22°C in a 16-h light/8-h dark cycle with 70% relative humidity and a light intensity of 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , prior to use. *Nicotiana tabacum* (SR1) used for transient expression were grown in soil at 22°C in a 8-h light/16-h dark cycle with 70% relative humidity and a light intensity of 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### Cloning and plant transformation

*GEF14* and *GEF14 PRONE* (from amino acids residues 127 to 500) sequence was PCR amplified from seedling cDNA and cloned in pENTR/DTOPO. pB7WGF2 and pB7WGR2 vector were used as destination vector for respectively GFP and RFP fusion. pGEF14:cit-GE14 was obtained from (Denninger et al., 2019). The unimolecular FRET sensor with intact C terminus was designed based on iROP biosensors (Smokvarska et al., 2021). The CRIB domain of hsPAK1 is known to interact with GTP bound form of ROP [60, 61]. We used it as a genetic probe for ROP6 GTP conformation. We ordered a synthetic gene coding for PAK1-mTFP-mVenus (iROP) and cloned it into *pDONR221*. Tripartite gateway cloning strategy were used to generate p35s:PAK1-mTFP-mVenus-ROP6g or p35s:PAK1-mTFP-mVenus-ROP6g-CA. The different binary were used either for transient expression in tobacco or to generate stable *Arabidopsis* plants by floral dip method in Col-0 or *gef14-2*. The following crosses were made in this study: *gef14-2xGFP-ROP6*, *gef14-2xpROP6-cit-ROP6g-CA* and *gef3-1xpGEF14:cit-GEF14*.

### Plant treatment

Plantlets were bathed in a liquid MS/2 medium (half-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1% (w/v) sucrose, 2.5mM MES-KOH pH6) for 30 min to allow recovery from transplanting. Then, plantlets were gently transferred for an additional 15 min with 5  $\mu\text{M}$  of ROS dye dehydroethidium (DHE) into MS/2 medium (0 MPa) or MS/2 medium plus 300 mM sorbitol (-0.75 MPa) for severe osmotic stress. When indicated, DHE co-treatment with flg22 (1  $\mu\text{M}$ , 30 min), RALF1 (1 $\mu\text{M}$ , 15 min) or ABA (1  $\mu\text{M}$ , 1 h) was applied. A similar process were followed for TIRF or sptPALM experiments.

### ROS measurement

Observations were performed on the root elongation zone using an Axiovert 200M inverted fluorescent microscope (20  $\times$  /0.5 objective; Zeiss), with 512/25-nm excitation and 600/50

emission filters for DHE staining. Exposure time was 500 ms. Images were acquired using a CCD camera (Cooled SNAP HQ; PhotoMetrics), controlled by imaging software (MetaFluor; Molecular Devices). To quantify the intensity of the fluorescence signal, the images were analyzed using ImageJ software. After subtraction of the background noise, an average mean gray value was calculated from epidermal and cortical cells.

#### Western blot

Tissues from 5 days old GFP-ROP6, *gef14-2xGFP-ROP6* or *rop6.2xmCit-ROP6g* plantlets were grinded with liquid nitrogen to a fine powder and resuspended in 300  $\mu$ l/100 mg powder of extraction buffer (125mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue and 4% DTT). Western blot analysis was performed with antibodies diluted in blocking solution (2% skim milk in 0.1% Tween-20 and TBS) at the following dilutions:  $\alpha$ -GFP with conjugated HRP 1:2000.

#### Confocal FRET measurement

Signal from *rop6.2xpROP6: cit-ROP6g*, *rop6.2xpROP6: cit-ROP6g-CA*, *gef14-2xppROP6: cit-ROP6gCA*, *gef14-2xpGEF14: cit-GEF14* and *gef14-2xGFP-ROP6* was imaged using Leica SP8 microscope with a 40  $\times$  /1.1 water objective and the 488-nm line of its argon laser was used for live-cell imaging. Fluorescence emission was collected from 500–540 nm for GFP and from 600–650 nm by sequential acquisition when sample where stained 10 min with 2  $\mu$ M of FM4-64. To detect FRET from the different iROP variants, images were taken with the 458-nm line of its argon laser and simultaneous detection between 464-500nm (mVenus detection) and 514-550nm (FRET channel). The ratio of FRET/Venus images was calculated with a Fiji software. Mean gray value of each cells present in the field of view was measured independently by drawing specific ROI.

#### TIRF microscopy

For cluster density analysis, Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy was done using an inverted Zeiss microscope and a 100x/1.45 oil immersion. Images were acquired with 50ms exposure time at 300 gain, with 475 nm excitation and 530/25 nm emission. Acquisitions were recorded for 5 s. Trichoblasts cells identified from root hair bulge in the differentiation zone. Then, cell files were followed until reaching the root elongation zone. Images were Z stacked by average intensity and object detection of GFP-ROP6, GFP-GEF14 and GFP-PRONE was made using machine learning-based segmentation with Elastik. Segmented images were imported in Fiji software to determine the number of clusters in a ROI of 100x100px with pixel size of 0.102nm.

#### sptPALM

Root cells were observed with a homemade total internal reflection fluorescence microscope equipped with an electron-multiplying charge-coupled device camera (Andor iXON XU\_897)

and a 100 × /1.45 oil immersion objective. The coverslips (Marienfeld 1.5H) were washed sequentially with 100% ethanol, acetone and water. Then, they were bathed with a 1M KOH solution and then ultra-sonicated for 30 min. After several wash-outs with MilliQ water, they were dried under Bunsen burner flame. The laser angle was adjusted so that the generation of the evanescent waves give a maximum signal-to-noise ratio. The activation of the photoconvertible tagged mEOS-ROP6 and gef14-2xmEOS2-ROP6 was done by a low-intensity illumination at 405 nm (OBIS LX 50mW; Coherent), and 561 nm (SAPPHIRE 100mW; Coherent) emission combined with a 600/50 (Chroma) emission filter was used for image acquisition. Seven-thousand images were recorded per region of interest at 30ms exposure time. Five to seven trichoblast cells/ treatment were analyzed out of two biological replicates.

#### Single-Particle Tracking

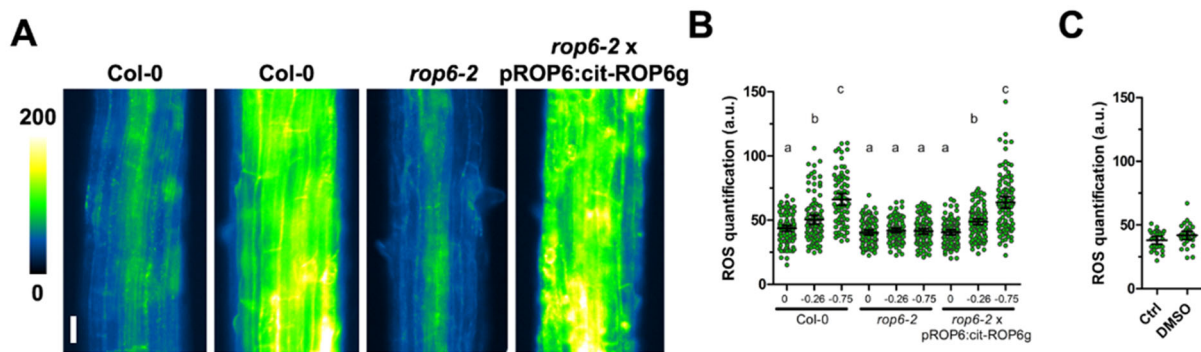
Individual single molecules were localized and tracked using the trackmate software (Tinevez et al., 2017). Dynamic properties of single emitters in root cells were then inferred from the tracks using a homemade analysis software, palm\_viewer written in MATLAB (The MathWorks) (Bayle et al., 2021). From each track, the MSD was computed. To reduce the statistical noise while keeping a sufficiently high number of trajectories per cell, tracks of at least seven steps (i.e., <sup>3</sup> 6 localizations) were used. Missing frames due to mEOS blinking were allowed up to a maximum of three consecutive frames. The instantaneous diffusion coefficient (D) was then calculated by fitting the MSD curve using the first four points.

#### Statistical Analysis

For each condition or treatment, 9–12 cells were analyzed from at least 5–7 different seedlings. All experiments were independently repeated 2–3 times. Data are expressed as mean ± 95% confidence interval. ANOVA followed by Tukey test was done, letters indicate significant differences among means (pvalue < 0.01). \* p value below 0.05 Student T-Test. Statistical analyses were performed in GraphPad Prism (GraphPad Software).

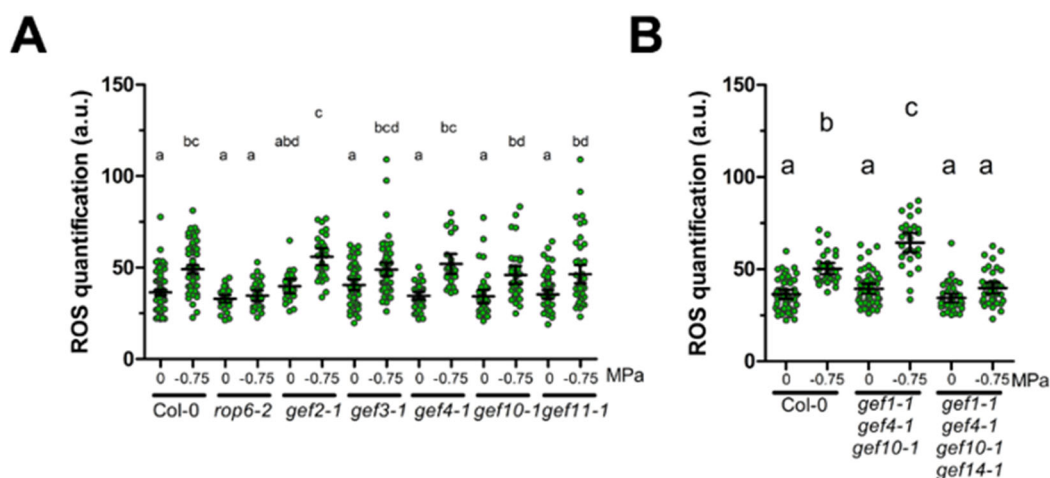
#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Guido Grossman for kindly providing us the following plant material *gef2-1*, *gef3-1*, *gef4-2*, *gef10-1*, *gef11-1* and the plasmid pGEF14:Cit-GEF14. We thank the Montpellier Ressources Imagerie (MRI) and the Histocytology and Plant Cell Imaging Platform for providing the microscope facility (PHIV). We acknowledge the MARS imaging facility, member of the national infrastructure France-BioImaging (FBI) supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). This work is supported by the Agence National de la Recherche (ANR) CelloOsmo ([ANR-19-CE20-0008-01](#)) and tremplin-ERC (PP22PR01-RA02-OPTOSEN-PP) from I-site MUSE.



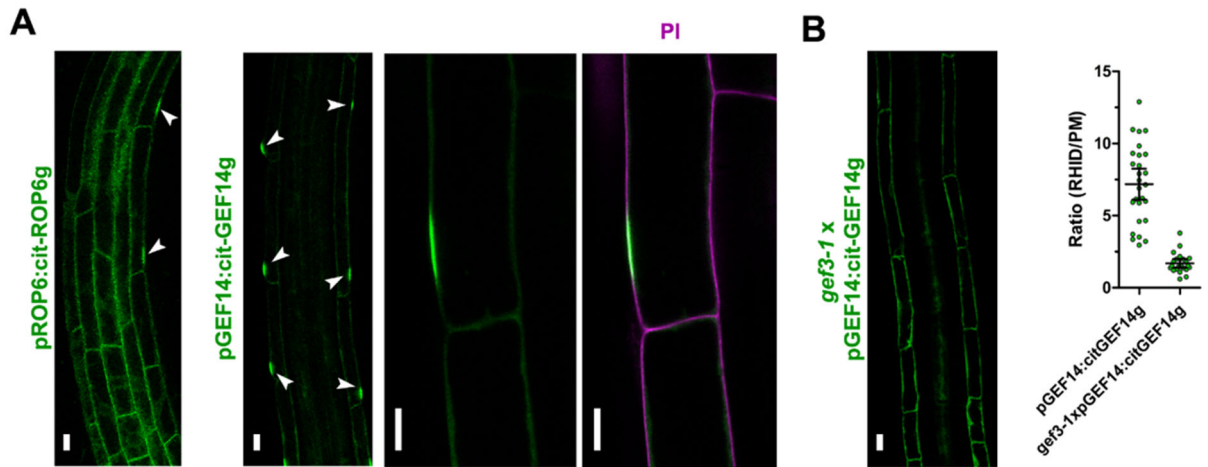
**Supp Figure 1 : ROP6 is needed for osmotically-induced ROS accumulation.**

(A) Images of dihydroethidium (DHE) stained root cells of Col-0, *rop6-2* or *rop6-2xpROP6:cit-ROP6g* in control condition (0 MPa) or after application -0.75 MPa solution. (B) DHE fluorescence quantification in control condition, after 15 min treatment with -0.75 MPa solution with the different genetic material. (C) DHE fluorescence quantification in control condition or with DMSO. Error bars correspond to the 95% confidence interval. According to analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test, letters indicate significant differences among means ( $P < 0.01$ ).  $n > 31$  cells from three to four independent biological replicas. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ . a.u., arbitrary units.



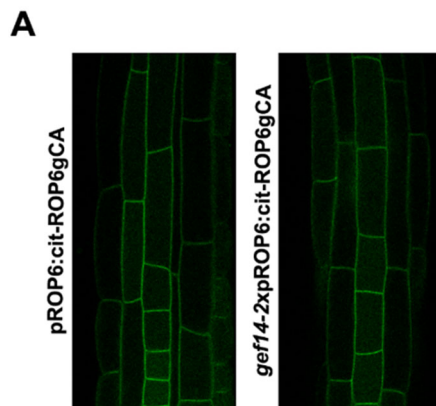
**Supp Figure 2 : Characterisation of osmotically-induced ROS accumulation in various *GEFs* knock-out lines.**

(A) DHE fluorescence quantification in control condition or after 15 min treatment with -0.75 MPa solution on different single *GEF* knock-out lines or triple and quadruple *GEF* mutants lines (B).



**Supp Figure 3 : GEF14 RHID localization is controlled by GEF3.**

(A) Fluorescent signal of rop6-2xpROP6: cit-ROP6g and gef14-2xpGEF14: cit-GEF14g in root tip (arrows show RHID). (B) close up view of gef14-2xpGEF14: cit-GEF14g signal with a propidium iodine counter staining. (C) Fluorescent signal of gef3-1xpGEF14: cit-GEF14g in root tip and its respective ratio (RHID/cytoplasm) quantification (E).



**Supp figure 4 : GEF14 do not interfere with ROP6-CA expression pattern.**

(A) Fluorescent signal of pROP6: cit-ROP6gCA and gef14-2xpROP6: cit-ROP6gCA in root tip.

## REFERENCES

### REFERENCES

- Azeloglu EU, Iyengar R** (2015) Signaling Networks: Information Flow, Computation, and Decision Making. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a005934
- Basu D, Le J, Zakharova T, Mallery EL, Szymanski DB** (2008) A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4044–4049
- Bayle V, Fiche J-B, Burny C, Platre MP, Nollmann M, Martinière A, Jaillais Y** (2021) Single-particle tracking photoactivated localization microscopy of membrane proteins in living plant tissues. *Nat Protoc* **16**: 1600–1628
- Berken A, Thomas C, Wittinghofer A** (2005) A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* **436**: 1176–1180
- Chang F, Gu Y, Ma H, Yang Z** (2013) AtPRK2 Promotes ROP1 Activation via RopGEFs in the Control of Polarized Pollen Tube Growth. *Mol Plant* **6**: 1187–1201
- Denninger P, Reichelt A, Schmidt VAF, Mehlhorn DG, Asseck LY, Stanley CE, Keinath NF, Evers J-F, Grefen C, Grossmann G** (2019) Distinct RopGEFs Successively Drive Polarization and Outgrowth of Root Hairs. *Curr Biol CB* **29**: 1854-1865.e5
- Feiguelman G, Fu Y, Yalovsky S** (2018) ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. *Plant Physiol* **176**: 57–79
- Fuchs VAF, Denninger P, Župunski M, Jaillais Y, Engel U, Grossmann G** (2021) Nanodomain-mediated lateral sorting drives polarization of the small GTPase ROP2 in the plasma membrane of root hair cells. 2021.09.10.459822
- Gu Y, Li S, Lord EM, Yang Z** (2006) Members of a Novel Class of Arabidopsis Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Control Rho GTPase-Dependent Polar Growth. *Plant Cell* **18**: 366–381
- Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff BB, Sussman MR** (2014) A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. *Science* **343**: 408–411
- Huang G-Q, Li E, Ge F-R, Li S, Wang Q, Zhang C-Q, Zhang Y** (2013) Arabidopsis RopGEF4 and RopGEF10 are important for FERONIA-mediated developmental but not environmental regulation of root hair growth. *New Phytol* **200**: 1089–1101
- Jaillais Y, Ott T** (2020) The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective1[OPEN]. *Plant Physiol* **182**: 1682–1696
- Li G, Boudsocq M, Hem S, Vialaret J, Rossignol M, Maurel C, Santoni V** (2015) The calcium-dependent protein kinase CPK7 acts on root hydraulic conductivity. *Plant Cell Environ* **38**: 1312–1320
- Li Z, Takahashi Y, Scavo A, Brandt B, Nguyen D, Rieu P, Schroeder JI** (2018) Abscisic acid-induced degradation of Arabidopsis guanine nucleotide exchange factor requires calcium-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E4522–E4531

- Li Z, Waadt R, Schroeder JI** (2016) Release of GTP Exchange Factor Mediated Down-Regulation of Abscisic Acid Signal Transduction through ABA-Induced Rapid Degradation of RopGEFs. *PLoS Biol* **14**: e1002461
- Lin D, Nagawa S, Chen J, Cao L, Chen X, Xu T, Li H, Dhonukshe P, Morita C, Friml J, et al** (2012) A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. *Curr Biol CB* **22**: 1319–1325
- Lin W, Tang W, Pan X, Huang A, Gao X, Anderson CT, Yang Z** (2021) Arabidopsis pavement cell morphogenesis requires FERONIA binding to pectin for activation of ROP GTPase signaling. *Curr Biol CB S0960-9822(21)01589-X*
- Malivert A, Hamant O** (2023) Why is FERONIA pleiotropic? *Nat Plants* **9**: 1018–1025
- Marei H, Malliri A** (2017) GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases* **8**: 90–99
- Martinière A, Zelazny E** (2021) Membrane nanodomains and transport functions in plant. *Plant Physiol* **187**: 1839–1855
- Mehlmer N, Wurzing B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Cszasz E, Pfister B, Bayer R, Teige M** (2010) The Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in Arabidopsis. *Plant J* **63**: 484–498
- Pan X, Fang L, Liu J, Senay-Aras B, Lin W, Zheng S, Zhang T, Guo J, Manor U, Van Norman J, et al** (2020) Auxin-induced signaling protein nanoclustering contributes to cell polarity formation. *Nat Commun* **11**: 3914
- Pan X, Pérez-Henríquez P, Van Norman JM, Yang Z** (2023) Membrane Nanodomains: Dynamic Nanobuilding Blocks of Polarized Cell Growth. *Plant Physiol* kiad288
- Platre MP, Bayle V, Armengot L, Bareille J, Marquès-Bueno MDM, Creff A, Maneta-Peyret L, Fiche J-B, Nollmann M, Miège C, et al** (2019) Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* **364**: 57–62
- Poncini L, I W, V DT, T V, T B, N G, Jp M, S L** (2017) In roots of Arabidopsis thaliana, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PloS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0185808
- Qiu J-L, Jilk R, Marks MD, Szymanski DB** (2002) The Arabidopsis SPIKE1 Gene Is Required for Normal Cell Shape Control and Tissue Development. *Plant Cell* **14**: 101–118
- Rong D, Zhao S, Tang W, Luo N, He H, Wang Z, Ma H, Huang Y, Yao X, Pan X, et al** (2022) ROP signaling regulates spatial pattern of cell division and specification of meristem notch. *Proc Natl Acad Sci* **119**: e2117803119
- Smokvarska M, Francis C, Platre MP, Fiche J-B, Alcon C, Dumont X, Nacry P, Bayle V, Nollmann M, Maurel C, et al** (2020) A Plasma Membrane Nanodomain Ensures Signal Specificity during Osmotic Signaling in Plants. *Curr Biol CB* **30**: 4654-4664.e4
- Smokvarska M, Jaillais Y, Martinière A** (2021) Function of membrane domains in rho-of-plant signaling. *Plant Physiol* **185**: 663–681



- Tang W, Lin W, Zhou X, Guo J, Dang X, Li B, Lin D, Yang Z** (2021) Mechano-transduction via the pectin-FERONIA complex activates ROP6 GTPase signaling in Arabidopsis pavement cell morphogenesis. *Curr Biol* CB S0960-9822(21)01590–6
- Tinevez J-Y, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, Bednarek SY, Shorte SL, Eliceiri KW** (2017) TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**: 80–90
- Wittinghofer A, Berken A** (2008) Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Biochem PPB*. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.12.008
- Yang L, Zhang J, He J, Qin Y, Hua D, Duan Y, Chen Z, Gong Z** (2014) ABA-mediated ROS in mitochondria regulate root meristem activity by controlling PLETHORA expression in Arabidopsis. *PLoS Genet* **10**: e1004791
- Yu F, Qian L, Nibau C, Duan Q, Kita D, Levasseur K, Li X, Lu C, Li H, Hou C, et al** (2012) FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in Arabidopsis by activating ABI2 phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 14693–14698
- Yu Y, Chakravorty D, Assmann SM** (2018) The G Protein  $\beta$ -Subunit, AGB1, Interacts with FERONIA in RALF1-Regulated Stomatal Movement1[OPEN]. *Plant Physiol* **176**: 2426–2440

## Partie 2 : Rôle des GEF dans les signalisations ROP6-dépendantes, impact sur l'organisation de RBOHD et importance de l'identité cellulaire

Le travail présenté dans Gorgues et al. *in prep* soulève un certain nombre de questions que j'ai commencé à explorer durant ma thèse. J'ai choisi de présenter une série de résultats préliminaires qui tente de répondre aux trois questions suivantes :

- Est-ce que GEF14 contrôle la clusterisation de l'effecteur RBOHD, qui est nécessaire à l'accumulation de ROS lors du signal osmotique ?
- Est-ce que les cellules atrichoblastiques répondent comme les cellules trichoblastiques au signal osmotique ?
- Est-ce que une ou des GEF pourraient être nécessaire pour induire la production de ROS induit par le flg22 ?

### **1) Est-ce que GEF14 contrôle également la clusterisation de RBOHD lors de la signalisation osmotique ?**

Comme expliqué dans la partie précédente, GEF14 est un régulateur spécifique du signal osmotique. Effectivement, sa présence est nécessaire pour l'accumulation de ROS dans les cellules racinaires lors de la signalisation osmotique. En revanche, elle n'est pas impliquée dans l'accumulation de ROS induit par un PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) comme la flg22 ou la phytohormone ABA. Au niveau moléculaire, GEF14 est nécessaire à la formation des nanodomains de ROP6 lors d'un signal osmotique mais ne l'est pas si les nanodomains de ROP6 sont induits par l'auxine.

Or de manière intéressante, sous signal osmotique, les protéines RBOHD/F co-clusterisent avec ROP6 permettant probablement l'accumulation de ROS sous cette condition (Smokvarska et al., 2020, modèle en introduction). Effectivement, les RBOHs sont des enzymes de la membrane plasmique qui produisent du super oxyde à partir du NADPH cytoplasmique.

Dans cette section, j'ai cherché à déterminer si GEF14 contrôlait, comme nous pourrions l'attendre, le phénomène de co-clusterisation entre ROP6 et RBOHD. Mais tout d'abord, j'ai souhaité contextualiser ce travail en rappelant les mécanismes moléculaires qui peuvent réguler les RBOH chez les plantes.

### *Propos introductifs*

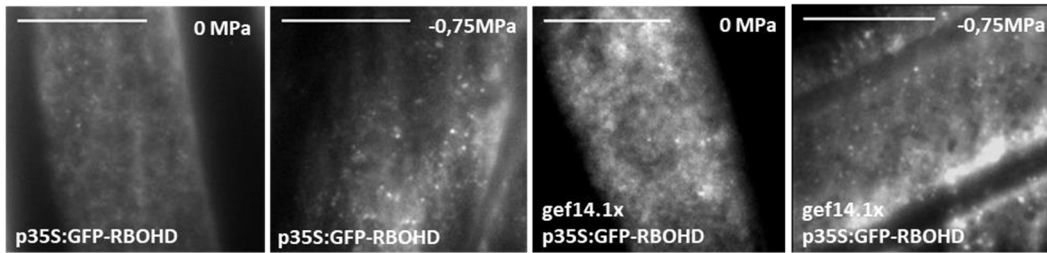
Chez *Arabidopsis*, on compte 10 membres de RBOH. Ces protéines catalysent la production de superoxyde dans l'apoplaste des cellules à partir du pouvoir réducteur NADPH du cytoplasme. La structure des RBOH est constituée par six domaines transmembranaires formant deux groupements hémiques qui sont conservés chez les NADPH Oxydases (NOX) des mammifères. Les RBOH ont en plus un domaine FAD (Flavin Adénine Dinucléotide) en C-ter qui permet l'association avec le NADPH (Zhang et al., 2004; Kobayashi et al., 2007; Lin et al., 2009). Le N-ter de la protéine comporte des zones régulatrices de son activité, tels que : 2 domaines de fixation du calcium de type EF-hand, un motif de fixation du PA, de multiples sites de phosphorylations ainsi qu'une liaison avec les petites GTPases (Oda et al., 2010; Li et al., 2019). Les RBOH sont directement régulées par le calcium. En effet des mutations des sites EF-hand entraînent une diminution des ROS (Ogasawara et al., 2008). En plus du calcium, la phosphorylation du N-Terminal des RBOH est nécessaire. Plusieurs types de kinases permettraient en effet la régulation de RBOH. Tout d'abord, CPK4, CPK5, CPK6 et CPK11, qui sont des kinases liant directement le calcium, interviennent dans la production de ROS dans le cadre de la signalisation PAMP (Boudsocq et al., 2010). La CPK5 a été caractérisée comme pouvant phosphoryler RbohD et réguler son activité (Dubiella et al., 2013). En plus des CPK, les positions S39, S339 et S343 du N-terminal de RBOHD sont phosphorylées par BIK1 lors de la signalisation flg22 (Kadota et al., 2014). De manière intéressante, cette phosphorylation est indépendante de la liaison au calcium des EF hand et des phosphorylations induites par les CPKs. Effectivement, les CPK phosphorylent également le N-terminal de RBOHD lors du signal flg22 mais sur d'autres positions (S133 et S163) (Li et al., 2014). Les RBOHs sont aussi régulés par des CIPK (CBL- Interacting Protein Kinase). Effectivement, en système hétérologue le Nter de RBOHF est phosphorylé par CIPK26 lorsqu'elle est en co-expression avec les CBL1 (Calcineurin B-Like Protein 1) et CBL9 (Drerup et al., 2013). La kinase OST1 (Open Stomata 1) appartenant aux SNRK et régulée par l'ABA phosphoryle alors les résidus Ser13 et Ser174 de RBOHF (Sirichandra et al., 2009).

Outre la phosphorylation et la liaison directe au calcium, les RBOH ont été montrées comme régulées par les petites GTPases de la famille des ROP. En particulier, l'expression de formes autoactives (CA) de ROP induisent une suraccumulation de ROS dans les cellules végétales (Duan et al., 2010; Yan et al., 2016; Smokvarska et al., 2020). De plus, il

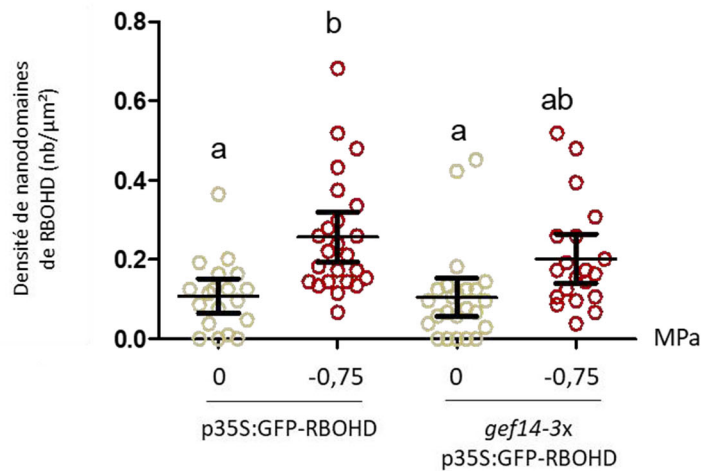
semble que la forme CA, et pas la forme dominante négative (DN) des ROP, puisse interagir avec les RBOH. C'est le cas en particulier entre ROP11 et RBOHF, mais aussi entre ROP6 et RBOHD/F (Li et al., 2016; Smokvarska et al., 2020). Ainsi, il pourrait exister un lien entre l'activation des ROP et leurs interactions avec les RBOH. L'interaction entre le N-terminal de OsRBOHB et OsRac1 a été cristallisée et les résidus importants ont été caractérisés (Wong et al., 2007; Oda et al., 2010; Kosami et al., 2014). Mais, il semble que pour avoir lieu cette interaction a aussi besoin d'être dans un certain environnement dans la membrane. Effectivement, dans un double mutant Fatty Acid Hydroxylase (FAH) qui a un défaut de 2-hydroxylation de ces sphingolipides, OsRAC1 et OsRBOHB ne semblent plus être fonctionnels (Nagano et al., 2016). Les auteurs suggèrent que l'absence d'2-hydroxylation modifie la membrane plasmique qui n'est plus capable de permettre l'interaction entre OsRAC1 et OsRBOHB, et par conséquent la production de ROS lors d'une stimulation par la chitine (Nagano et al., 2016).

Ainsi, la régulation des RBOH paraît comme très complexe et un grand nombre de régulateurs moléculaires semblent converger et modifier leurs séquences N-terminal. Comment les combinaisons de ces différentes régulations agissant sur l'activité de RBOH restent très mal connues ? Notons néanmoins, que la régulation par les ROP est le seul cas qui induit un changement de localisation des RBOH. L'identification de GEF14 comme activateur de ROP6 est une occasion unique de tester le lien potentiel entre l'activation des ROP, la relocalisation et l'activation de protéines effectrices ici les RBOH.

A



B

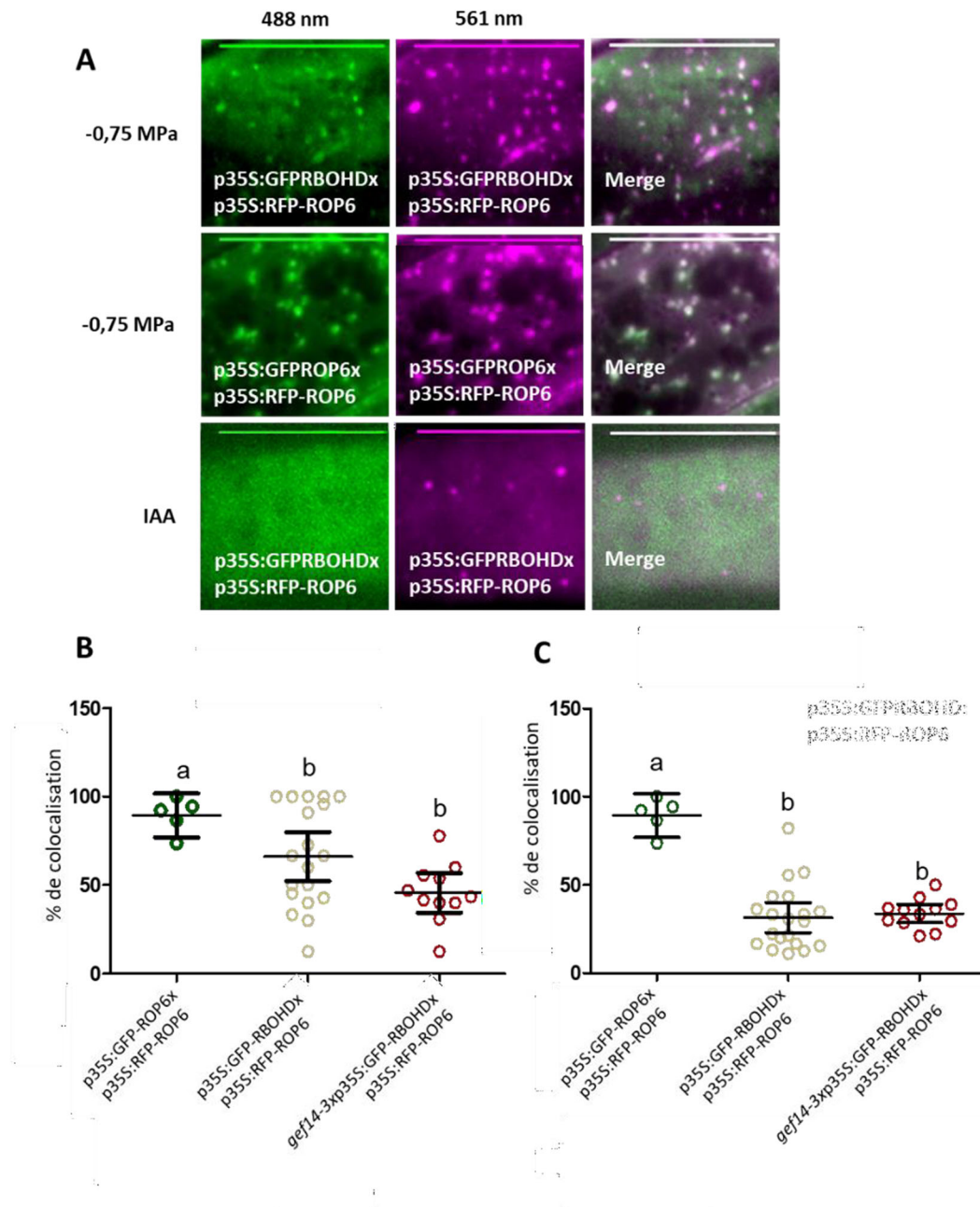


**Figure 11 : Effet de GEF14 sur les nanodomains de RBOHD dans les cellules trichoblastiques**

A) Photo issue de microscopie TIRF de cellules trichoblastiques de la lignée *p35S:GFP-RBOHD* et *gef14-3xp35S:GFP-RBOHD* lors d'une stimulation hyperosmotique (-0,75MPa). Barre d'échelle 10μm. B) Boxplot représentant la densité de cluster de la lignée *p35S:GFP-RBOHD* et *gef14-3xp35S:GFP-RBOHD* en condition contrôle (0MPa) et lors d'une stimulation hyperosmotique (-0,75MPa) dans les cellules trichoblastiques. Test statistique Anova Tuckey HSD. Issue de 3 répétitions biologiques indépendantes. Une ANOVA suivie d'un test Tuckey HSD a été réalisée. Les lettres indiquent les différences significatives entre les moyennes ( $P < 0.01$ ). Issue de 2 répétitions biologique indépendantes.

## Résultats

Nous nous intéresserons à l'impact de GEF14 sur la localisation de RBOHD. Pour cela, j'ai généré une lignée *gef14-3xGFP-RBOHD* qui a été observé par microscopie TIRF. Mes données sont en accord avec celles précédemment montrées par (Smokvarska et al., 2020). Effectivement, GFP-RBOHD forme des nanodomains en condition contrôle, mais leurs densités augmentent sous signal osmotique (Figure 11). Dans le fond mutant *gef14-3*, la densité des nanodomains de RBOHD n'est pas induite par le traitement osmotique. Cependant, la densité de domaines GFP-RBOHD sous signal osmotique est identique entre la lignée sauvage et la lignée mutante (Figure 11). Il est alors difficile de conclure clairement à un effet de GEF14 sur la densité de nanodomains de GFP-RBOHD. Ensuite, nous nous sommes demandés si les nanodomains de GFP-RBOHD sous signal osmotique sont toujours en association avec ROP6 en l'absence de GEF14. Pour ce faire, j'ai généré les lignées *p35S:GFP-RBOHDxp35S:RFP-ROP6*, *gef14-3xp35S:GFP-RBOHDxp35S:RFP-ROP6*, ainsi qu'une lignée *p35S:GFP-ROP6xp35S:RFP:ROP6* qui servira de contrôle positif de colocalisation. Comme attendu, le taux de colocalisation des nanodomains ROP6 marqués avec un tag RFP et GFP avoisine les 100% (Figure 12 B et C). Comme contrôle négatif, nous avons incubé la lignée *p35S:GFP-RBOHDxp35S:RFP-ROP6* avec de l'auxine (Figure 12 A). Effectivement, dans ces conditions les nanodomains de ROP6 ne sont pas en association avec GFP-RBOHD. Lors d'une stimulation osmotique, nous confirmons les données publiées par Smokvarska et al., 2020, RBOHD et ROP6 se retrouvent dans les mêmes clusters (Figure 12 A et B). Cependant, il est intéressant de noter que la majorité des nanodomains de GFP-RBOHD colocalise avec les nanodomains de RFP-ROP6, mais seulement la moitié des nanodomains de RFP-ROP6 colocalise avec ceux de GFP-RBOHD (Figure 12 C). En d'autres termes, ces observations supposent que tous les domaines de RFP-ROP6 n'accumulent pas nécessairement de GFP-RBOHD. La perte de fonction de *GEF14* entraîne une diminution de la colocalisation de ROP6 avec RBOHD, mais cet effet n'est pas statistiquement confirmé. Ce résultat est paradoxal à deux niveaux. Il suppose (i) que GEF14 n'a pas ou peu d'effet sur la formation des nanodomains de ROP6 détecté par microscopie TIRF et (ii) que GEF14 ne semble pas agir sur la colocalisation entre ROP6 et RBOHD. Néanmoins, il faudrait répéter cette expérimentation afin de valider ou invalider ces observations (figure 1A et figure 1B). J'ai choisi de discuter ce point spécifiquement à la fin du chapitre 1.



**Figure 12 : Colocalisation de RBOHD et ROP6**

A) Image de microscopie TIRF de cellules trichoblastiques des lignées : p35S:GFP-RBOHDxp35SxRFP-ROP6 et p35S:GFP-ROP6xp35SxRFP-ROP6 sous un traitement hyperosmotique (-0,75MPa) ou lors d'un traitement auxine (IAA 1 $\mu$ M) en illumination 488nm, 561nm et Merge (barre d'échelle 10 $\mu$ M). B) Graphique représentant le pourcentage de colocalisation des nanodomains de RBOHD avec ceux de ROP6 dans les cellules trichoblastiques des lignées p35S:GFP-RBOHDxp35S:RFP-ROP6, *gef14-3*xp35S:GFP-RBOHDxp35S:RFP-ROP6, p35S:GFP-ROP6xp35S:RFP-ROP6, lors d'un traitement hyperosmotique (-0,75 Mpa). Une ANOVA suivi d'un test Tuckey HSD a été réalisée. Issue de 2 répétitions biologiques indépendantes avec n > 5 cellules analysées. C) Graphique représentant le pourcentage de colocalisation des nanodomains de ROP6 avec ceux de RBOHD des lignées p35S:GFP-RBOHD:p35S:RFP-ROP6, *gef14.1*xp35S:GFP-RBOHD:p35S:RFP-ROP6. Une ANOVA suivi d'un test Tuckey HSD a été réalisée. Les lettres indiquent les différences significatives entre les moyennes (P<0.01). Issue de 2 répétitions biologiques indépendantes avec n > 5 cellules analysées.



## 2) Est-ce que les cellules atrichoblastiques réagissent au signal osmotique ?

Alors que ROP6 est présent dans les cellules atrichoblastiques et trichoblastiques, GEF14 est localisée uniquement dans ces dernières. Ainsi l'interaction entre ROP6 et GEF14 ne peut se produire que dans les trichoblastes. Logiquement les expérimentations présentées jusqu'à présent se sont concentrées sur ce dernier type cellulaire. Mais nous pouvons nous demander si la signalisation osmotique est bien absente des cellules atrichoblastiques. Pour cela, j'ai comparé la clusterisation de ROP6 dans les cellules atrichoblastiques et trichoblastiques en présence ou en absence de GEF14. Tout d'abord, j'ai choisi d'introduire quelques notions concernant le rôle des cellules atrichoblastes dans les mécanismes de signalisation.

### *Propos introductifs*

Dans la racine lorsque les cellules émergent de la zone méristématique, elles modulent leurs activités physiologiques et acquièrent une identité propre (Verbelen et al., 2006). Les couches de l'épiderme sont formées de files de cellules issues de 16 cellules initiales. On distingue deux types de files : les trichoblastes et les atrichoblastes (Dolan et al., 1993). La détermination de leurs identités est encodée par leurs positions dans la racine. Les cellules qui sont en position N, c'est-à-dire en contact seulement avec une cellule corticale, deviennent des atrichoblastiques. En revanche, les cellules qui sont en position H, c'est-à-dire en jonction de deux cellules corticales, deviennent des trichoblastes. Du fait de l'organisation du cortex, 8 files de cellules trichoblastes se forment dans une racine d'Arabidopsis. Ces files sont rarement voisines entre elles (Dolan et al., 1994). De plus des différences physiologiques sont notables entre les deux formes de cellules de l'épiderme. Les trichoblastes sont plus courtes avec un cytoplasme plus dense. Elles sont moins vacuolisées et ont un taux de division plus élevé (Dolan et al., 1994; Galway et al., 1994; Berger et al., 1998). En plus, des facteurs génétiques déterminent également l'identité de ces types cellulaires.

De manière intéressante, lors d'un stress salin, le destin de ces cellules épidermiques est impacté. En effet, des coupes transversales d'Arabidopsis de 6 jours révèlent que le nombre de cellules trichoblastiques reste inchangé, alors que le nombre de cellules atrichoblastiques change. Moins nombreuses, elles sont plus larges, sans changer l'épaisseur de la racine.

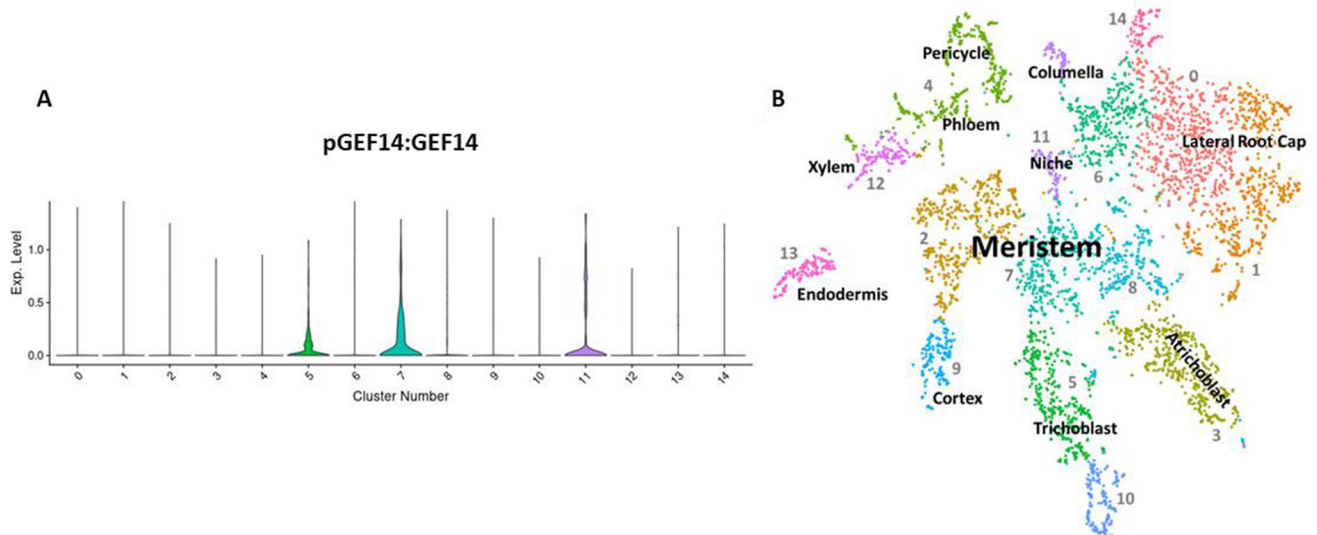
Certaines études transcriptionnelles rapportent une forte expression de GL2 (GLABRA 2) induisant une perte de la formation de poils racinaires de ces cellules, ayant pourtant conservés leurs positions. La réduction de poil racinaire sous stress salin serait donc due à ces mécanismes. Le défaut de poils racinaires pourrait être une adaptation limitant l'entrée des ions Na<sup>+</sup>. Dans d'autres signalisations, comme la carence en phosphore, le nombre de cellules trichoblastes et atrichoblastes diminue mais pas le nombre de cellules corticales. Ainsi, les cellules initiales du méristème sont recrutées pour augmenter le nombre de cellules corticales qui permet l'initiation des poils racinaires (Dolan et al., 1994; Masucci and Schiefelbein, 1994; Tanimoto et al., 1995; Ma et al., 2001). Par conséquent, ces éléments montrent que certains signaux au niveau de la racine impactent l'identité des cellules de l'épiderme.

Les trichoblastes et atrichoblastes impacteraient différenciellement la réponse gravitropique et la sensibilité à l'auxine. En effet lors d'une perte d'identité des cellules trichoblastiques chez les mutants *cpc* et *try*, une résistance à l'auxine exogène mais aussi une croissance hypergravitropique (flexion excessive) des racines ont été observées. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une abondance plus importante du transporteur d'efflux PIN2 dans les cellules (Baster et al., 2013). *A contrario* la perte d'identité atrichoblastique dans le mutant *wer* n'entraînerait pas de forts phénotypes de réponses à la gravité (Löfke et al., 2015).. Ces données ne représentent pas de preuves formelles mais encouragent à croire que les trichoblastes sont importants pour la réponse gravitropique (Löfke et al., 2015).

En ce qui concerne la signalisation osmotique, des données transcriptomiques d'orge a comparé un orge sauvage et un mutant atrichoblastique *rh1.1.a*. Un transcriptome de ces deux mutants est réalisé en condition contrôle ou en condition de stress hydrique. De manière intéressante la perte de l'identité des cellules trichoblastiques dans le mutant *rh1.1.a* entraîne une moins forte induction des gènes en lien avec la signalisation de l'ABA, une moins forte fermeture des stomates et un effet sur la biogénèse de la paroi (Kwasniewski et al., 2016). Ces résultats suggéraient que les trichoblastes seraient importants pour l'induction des réponses en lien avec le stress hydrique.

## Résultats

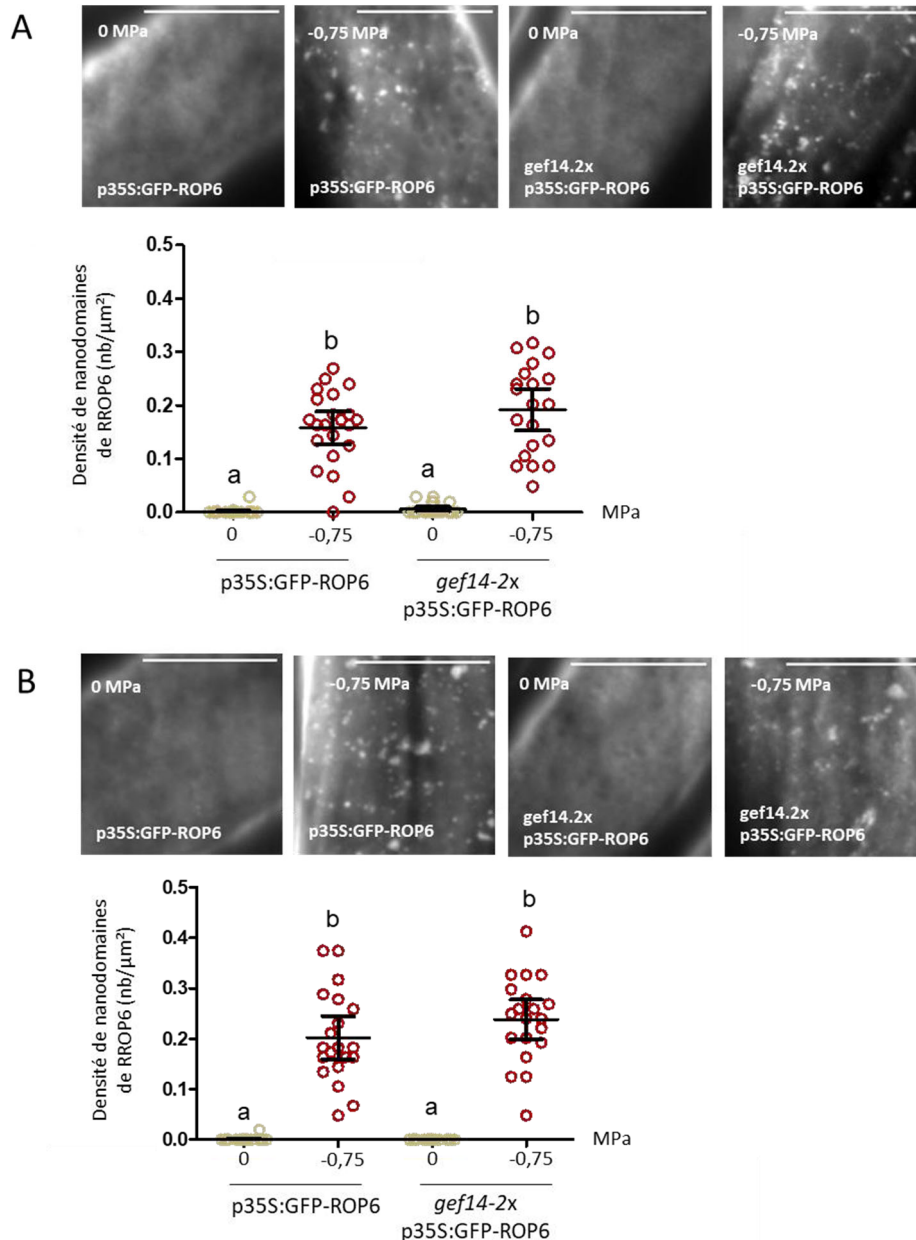
Tout d'abord, nous avons vérifié à partir des données de RNAseq en cellules uniques que GEF14 était bien majoritairement exprimées dans les cellules trichoblastiques (Denyer et al., 2019) (Figure 13).



**Figure 13 : localisation trichoblastique de GEF14**

A) Donnée d'expression de GEF14 (At1g31650) de single-cell dans les différents tissus racinaire (Denyer, Ma et al., 2019). B) Représentation du niveau d'expression en single-cell en fonction des différents tissus (Denyer, Ma et al., 2019): 0-1: coiffe des racines latérales ; 2: méristème ; 3: atrichoblaste ; 4: phloème et péricycle 5:trichoblaste ; 6: Columelle ; 7: méristème ; 8: méristème ; 9: cortex ; 10: Trichoblaste 11: Niche ; 12:Xylème ; 13:Endoderme.

Ensuite, nous avons testé si les cellules atrichoblastiques pouvaient répondre au signal osmotique de manière similaire aux cellules trichoblastiques, en utilisant la clusterisation de la protéine ROP6 comme lecture phénotypique. Ainsi, quel que soit le type cellulaire, ROP6 forme des nanodomains à la suite de l'application d'un traitement osmotique (Figure 14). De plus, la perte de fonction de GEF14 n'entraîne aucun changement sur le clustering de ROP6 (Figure 14). En plus de l'absence d'effet de GEF14, ces données soulèvent un paradoxe. En effet, la présence de nanodomains de ROP6 dans le mutant *gef14-2* pourrait paraître en opposition avec les données de diffusion présentées dans Gorgues et al., *in prep*. Je détaillerai certains aspects de discussion autour de ce point à la fin du chapitre I.



**Figure 14 : effet de GEF14 sur les nanodomains de ROP6 dans les cellules trichoblastiques et atrichoblastiques**

A) Photo issue de microscopie TIRF de cellules trichoblastiques de la lignée p35S:GFP-ROP6 et *gef14.2xp35S:GFP-ROP6* lors d'une stimulation hyperosmotique (-0,75MPa) (Scale bar 10 $\mu$ m) Boxplot représentant la densité de cluster de la lignée p35S:GFP-ROP6 et *gef14.2xp35S:GFP-ROP6* en condition contrôle (0MPa) et lors d'une stimulation hyperosmotique (-0,75MPa) dans les cellules trichoblastiques. Une ANOVA a été effectuée suivi d'un test tuckey HSD. Issue de 2 répétitions biologique indépendantes avec n> 10 cellules analysées. B) Photo issue de microscopie TIRF de cellules atrichoblastiques de la lignée p35S:GFP-ROP6 et *gef14.2xp35S:GFP-ROP6* lors d'une stimulation hyperosmotique (-0,75MPa) (Scale bar 10 $\mu$ m). Boxplot représentant la densité de cluster de la lignée p35S:GFP-ROP6 et *gef14.2xp35S:GFP-ROP6* en condition contrôle (0MPa) et lors d'une stimulation hyperosmotique (-0,75MPa) dans les cellules atrichoblastiques. Une ANOVA suivi d'un test Tuckey HSD a été réalisée. Les lettres indiquent les différences significatives entre les moyennes (P<0.01). Issue de 2 répétitions biologique indépendantes avec n> 10 cellules analysées.

### 3) Est-ce que d'autres GEF pourraient être impliquées dans l'accumulation de ROS induit par le peptide flg22 ?

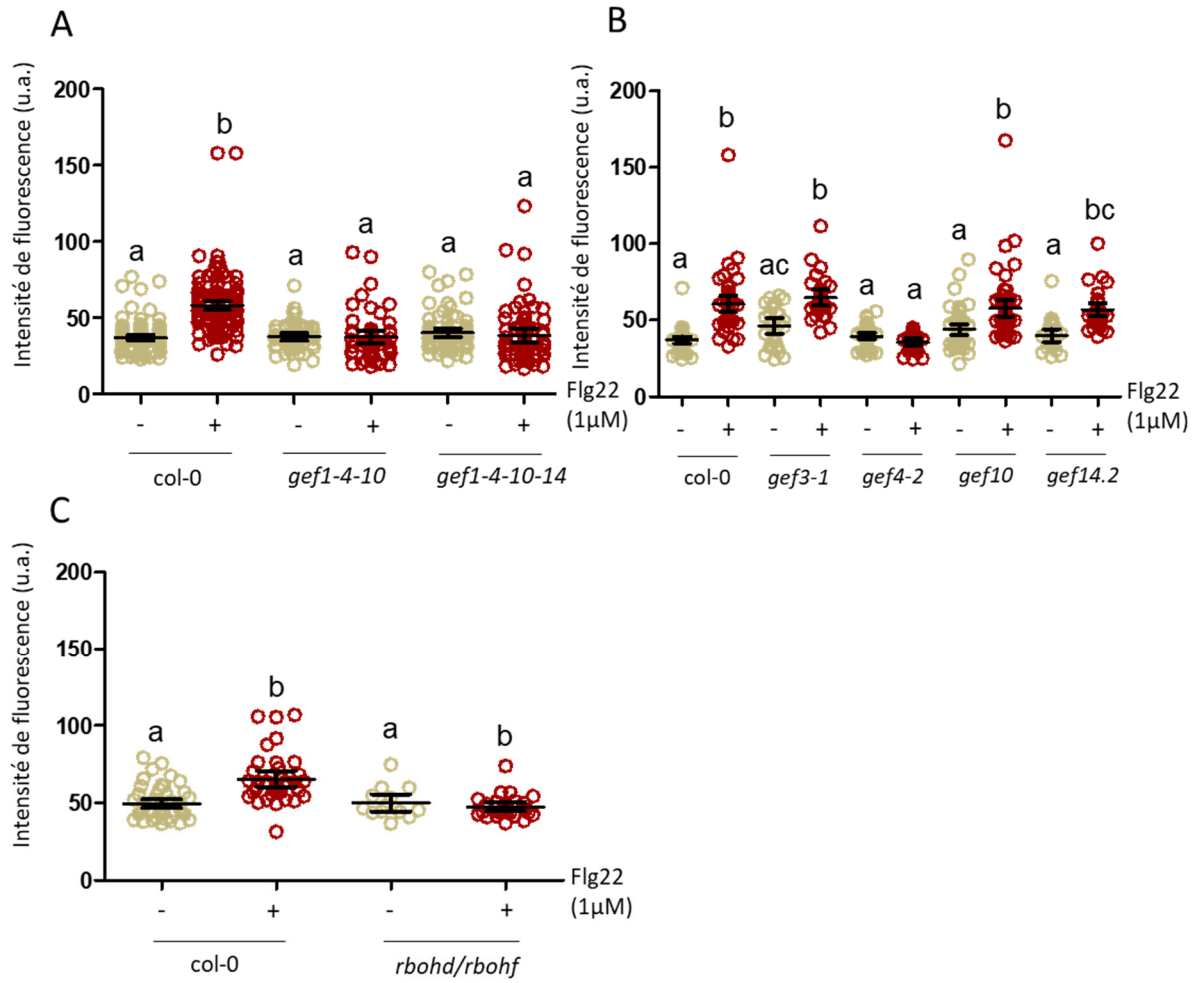
Nos observations suggèrent que les protéines GEF agiraient comme des activateurs signaux-spécifiques (Gorgues et al., in pep). Alors que GEF14 agit en amont de ROP6 lors de la signalisation osmotique ; SPK1, la GEF à DH domaine, a été montré comme agissant sur ROP6 lors du signal auxinique (Lin et al., 2012). Dans la partie suivante, j'ai cherché à tester si ce concept de GEF signal spécifique pouvait être étendu. Pour cela, j'ai choisi de me concentrer sur le signal induit par le peptide bactérien flg22 qui engendre la réponse immunitaire de type PTI (Pathogène Trigger Immunity). Effectivement, ROP6 est nécessaire pour l'accumulation des ROS après l'application de flg22 sur des racines. Tout d'abord, je souhaite rappeler l'état des connaissances concernant cette signalisation dans la racine qui est le tissu que j'étudie. Je rappellerai également le rôle des ROP dans l'immunité des plantes.

#### *Propos introductifs*

La signalisation à la suite de la perception du peptide flg22, étant un motif moléculaire associé aux microbes (MAMP), a été bien décrite dans les feuilles. Dans l'introduction générale, nous avons détaillé les mécanismes moléculaires de perception grâce au récepteur FLS2 et une partie de la signalisation en découlant, impliquant l'activation de RBOHD. Cependant, l'état des connaissances concernant cette voie dans les racines reste encore énigmatique. Néanmoins dans la racine, la coiffe racinaire et la zone de transition/élongation semblent bien répondre à l'application exogène du peptide flg22 (Miller et al., 2010; Jacobs et al., 2011). Effectivement, les marqueurs moléculaires spécifiques de la signalisation flg22 tels que pFRK1:NLS-3xmVENUS et pPER5:NLS-3xmVENUS sont bien induits dans ces zones (méristème et zone d'élongation)(Zhou et al., 2020). *A contrario*, les zones différenciées ne semblent pas répondre (Zhou et al., 2020). Ces résultats sont en adéquation avec le fait que le gène FLS2 n'est pas exprimé dans les zones différenciées de la racine. Par contre de manière intéressante, l'expression de FLS2 est induite lors d'une blessure des cellules racinaires, permettant ensuite une signalisation flg22/FLS2 (Zhou et al., 2020).

De leur côté, les petites GTPases ont été montrées comme des acteurs clés dans les interactions biotiques. En effet, OsRAC1 a été montré comme clé dans le déclenchement de la

réponse à *Magnaporthe oryzae* (Kawano et al., 2014b; Kawano et al., 2014). De même, les formes dominantes négatives de ROP6 ont montré une perte de sensibilité à *Golovinomyces orontii*, mais aussi une sensibilité à *B. graminis* f.sp. *hordei*. Cette réponse semble liée à la modulation de la voie de l'acide salicylique (Poraty-Gavra et al., 2013). Si le rôle des ROP6 n'est pas encore clairement élucidé, certains régulateurs des ROP comme les GAP (AtROPGAP1 et AtROPGAP4) ont été montrés comme interagissant avec ROP6 et limitant la sensibilité à l'oïdium (Engelhardt et al., 2020) (Zhang et al., 2022). Lors des interactions symbiotiques, LjROP6 agit sur la formation des nodules induits par *Mesorhizobium loti* (Ke et al., 2016). Ainsi, la forme autoactive de LjROP6 entraîne une formation plus importante de nodules. LjROP6 modulerait la signalisation de nodulation via la régulation de l'endocytose agissant sur les vésicules à clathrine (Ke et al., 2016). Ainsi, ROP6 semble donc être un acteur de la signalisation lors des interactions biotiques.



**Figure 15 : GEF4 spécifique de la signalisation flg22**

Quantification de la fluorescence du DHE dans des conditions de contrôle ou après un traitement de 30 minutes de flg22 (1 $\mu$ M) sur différentes lignées knock-out *GEF* simples ou sur des lignées mutantes *GEF* triples et quadruples (A et B) et le double mutant *rbohD/rbohF*. Une ANOVA suivie d'un test Tuckey HSD a été réalisée. Les lettres indiquent les différences significatives entre les moyennes (P<0.01). Issue de 3 répétitions biologiques indépendantes avec n> 10 cellules analysées.



## Résultats

Afin d'identifier la ou les GEF importantes pour induire la signalisation *flg22* dans la racine, j'ai utilisé la sonde DHE qui devient fluorescente lorsqu'elle est oxydée. Cette sonde a été à la base de mon travail présenté dans Gorgues et al., *in prep.*

Ainsi, j'ai quantifié l'accumulation de ROS induit par la *flg22* chez des différents mutants GEF disponibles. Comme attendu, l'incubation pendant 30 min des plantes contrôles avec 1µM de *flg22* induit bien une augmentation de la fluorescence DHE, traduisant une augmentation des ROS dans les cellules (Figure 15 A). Cependant, ni le mutant *gef1/4/10* ni le mutant *gef1/4/10/14* ne répond au traitement *flg22* (Figure 15 A). Afin de déterminer quel isoforme pouvait être important, j'ai ensuite testé des lignes simple mutant. De manière intéressante le mutant *gef4-1*, mais pas les mutants *gef1-1*, *gef10-1* et *gef14-2*, n'accumulent pas de ROS en réponse au signal *flg22* (Figure 15B). Il semble donc que GEF4 soit nécessaire à l'accumulation de ROS induit par la *flg22*. Ensuite, j'ai cherché à déterminer si les ROS induit par *flg22* était bien sous le contrôle des RBOH dans la racine. Nous avons donc quantifié les ROS produits à la suite d'un traitement avec le peptide *flg22* chez les mutants perte de fonction *RBOHD/F*. On observe que la réponse ROS est perdue (figure 15 C). Ainsi, les RBOH, effecteurs de ROP6, seraient communs aux voies osmotiques et à *flg22*. Alors que les activateurs GEF sembleraient spécifiques du signal en amont.

Bien que des contrôles importants restent à réaliser comme la génération d'une ligne *gef4-1xpGEF4 :cit-GEF4*, il semble bien que le concept de GEF spécifique à certains signaux puisse être étendu au-delà du signal osmotique et auxinique. Les implications de ces résultats seront commentées dans la discussion générale de mon manuscrit de thèse.

## Discussion

La majorité des résultats a été discutée dans la discussion du papier. Certaines idées et certains résultats présentés dans ce chapitre seront repris dans la discussion générale de ma thèse. Ici, je souhaite développer et commenter les observations suivantes. Les données de diffusion obtenues par sptPALM (dans Gorgues et al. *in prep*) montrent que GEF14 est nécessaire pour induire l'immobilité de ROP6 en réponse au stress osmotique. De manière étonnante, dans les parties 2 et 3 de ce chapitre (Figure 12 et 14), il semble que le clustering de ROP6 visualisé par microscopie TIRF a toujours lieu en absence de GEF14. Si l'on considère que les molécules immobiles correspondent à celles qui sont dans les clusters de ROP6 et observées par TIRF, ces observations pourraient alors paraître paradoxales.

Cependant, il faut garder en tête que les échelles de temps et espace entre la microscopie TIRF et sptPALM sont totalement différents. Dans la première, les observations sont contraintes spatialement par la limite de diffraction (environ 300 nm pour un signal issue d'une GFP). De même, les images correspondent à des temps d'intégration de l'ordre de la dizaine de secondes. Ainsi, en microscopie TIRF, un ensemble de molécules est observé pendant un temps relativement long. À l'inverse en sptPALM, les molécules sont résolues de manière individuelle avec une résolution d'environ 30 à 40 nm. Ces molécules sont typiquement suivies dans l'espace pour un temps inférieur 300 ms. Ainsi, même si une molécule diffuse dans l'espace à 1 $\mu$ m/s, elle explorera un espace qui sera trop petit pour être résoluble par microscopie TIRF. En d'autres termes, les observations de TIRF et de sptPALM sont difficilement comparables.

Ce type d'incohérence entre observations a déjà été montré dans des travaux concernant ROP6. Effectivement, lors d'un traitement à l'IAA, ROP6 forme des nanodomains observables en TIRF, ainsi qu'une augmentation de la fraction immobile de ROP6 (25% à 30%) quantifié par sptPALM (Platre et al., 2019). Dans un mutant *pss1-3* (mutant de synthèse des PS) et en présence d'auxine, l'immobilité de ROP6 n'est plus induite. Dans ce contexte, la signalisation auxine médiée par ROP6 est perdue. Par contre, des clusters de ROP6 sont toujours détectés par TIRF (Platre et al., 2019). Par des expériences de TIRF-FRAP, les auteurs ont montré que la diffusion de ROP6 dans les clusters était plus élevée dans le mutant *pss1-3* que dans un fond sauvage. Ainsi, les PS ne serviraient pas la formation des clusters de ROP6 mais à maintenir les

molécules de ROP6 dans ces clusters (Platre et al., 2019). Des observations similaires ont été faites dans un mutant FERONIA qui accumule moins de PS à la membrane plasmique (Smokvarska et al., 2023).

De plus, il a été aussi montré que la taille des nanodomains peut influencer sur la diffusion des protéines. L'étude des nanodomains de protéines RAS a montré que K-ras forme des nanodomains dans les cellules U2OS. K-Ras est immobile dans des nanodomains d'une taille de 70nm. Ces domaines s'intègrent dans des domaines plus grands de 200nm où la diffusion dans ces nanodomains est intermédiaire. Mais aussi dans le reste de la membrane où la protéine a une diffusion très rapide. Ceci suggère qu'en fonction de la nature des nanodomains la diffusion peut fluctuer.

Une hypothèse peut donc émerger de cette apparente contradiction entre nos observations. Dans un mutant GEF14, ROP6 ne serait pas correctement stabilisé et donc diffuserait au sein de domaines qui sont détectables par TIRF. Autrement dit GEF14 ne serait pas nécessaire pour la formation des domaines de ROP6 mais conditionnerait son immobilité. Pour confirmer ces hypothèses, il serait intéressant de tester la corrélation entre les nanodomains de ROP6 observés en microscopie TIRF et la fraction immobile en microscopie sptPALM, en testant une lignée p35s:GFP-ROP6xp35s :EOS-ROP6. Le rôle fonctionnel des nanodomains sera discuté par la suite, en discussion générale.

### 3) Chapitre II : Mécanisme d'activation de la protéine GEF14 lors du signal osmotique

#### 1) Introduction

Dans le chapitre 1, nous avons identifié la protéine GEF14 comme un acteur spécifique de la signalisation osmotique. Lors du signal, GEF14 agit sur la dynamique de ROP6 et ainsi pourrait contrôler la spécificité du signal osmotique. Mais nous avons aussi montré que GEF14 dans sa forme entière ne peut pas activer ROP6 en système hétérologue. Ainsi, cette protéine doit être activée à la suite de la stimulation osmotique. Dans ce chapitre, nous avons cherché à comprendre comment GEF14 pouvait être activée lors du signal osmotique.

#### 1.1) Phosphorylation des GEF

Parmi toutes les modifications post-traductionnelles, la phosphorylation des GEF semble être une modification majeure permettant leurs régulations. Chez l'animal, les phosphorylations peuvent avoir des effets sur la fonction des GEF via différents mécanismes. Par exemple, la phosphorylation peut agir sur la localisation subcellulaire des GEF. C'est le cas de la p115RhoGEF qui peut être phosphorylée dans son domaine plekstrin homology (PH) (Rosenfeldt et al., 2006; Siehler, 2009). Ce domaine est responsable de l'association de p115RhoGEF avec les lipides anioniques de la membrane, ce qui est nécessaire pour activer les Rho GTPases (Chikumi et al., 2002). La phosphorylation peut aussi agir sur la conformation des GEF. C'est le cas des RhoGEF PGR et LARG qui sont phosphorylées dans leur C-terminal permettant de réguler positivement l'activité de ces GEF (Chikumi et al., 2002). De manière intéressante, la phosphorylation peut être soit un acteur positif ou négatif de la fonction des GEF. La GEF-H1 est régulée positivement lorsque le résidu Thr-678 est phosphorylé mais une phosphorylation sur les résidus Ser-959 et Ser-885 entrainerait un effet négatif sur son activité.

Les GEF de plantes peuvent également être phosphorylées. Une kinase s'avère particulièrement intéressante pour cette fonction. Il s'agit de la kinase AtPRK2 qui interagit avec certaines GEFs. L'activité kinase de AtPRK2 semble nécessaire pour le contrôle de la croissance du tube pollinique car la surexpression du domaine PRONE de GEF1 complémente le phénotype de défaut de croissance induit par une version kinase inactive de AtPRK2 (Chang

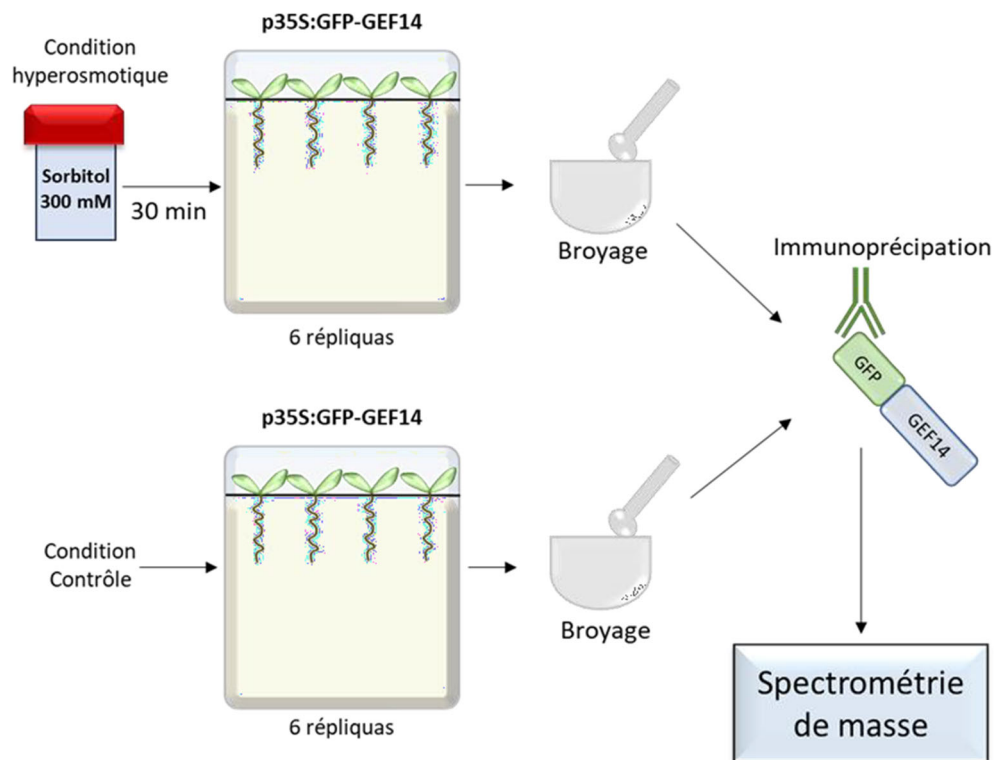
et al., 2013). De plus, AtPRK2 phosphoryle GEF1 in vitro et la surexpression du mutant *GEF1<sup>S460A/S480A</sup>* montre pas d'effets sur la croissance du tube pollinique (Chang et al., 2013). Ces résidus sont situés à la jonction entre le domaine PRONE et le C-ter de la protéine. Ils pourraient ainsi avoir un effet sur la structure de la protéine en libérant le C-ter du domaine catalytique PRONE, activant de ce fait la protéine. De même, le C-terminal de ROPGEF12 a été rapporté comme région inhibitrice (Zhang and McCormick, 2007; Chang et al., 2013). En effet, la mutation S510D, mimant une phosphorylation constitutive, permet de lever l'inhibition du C-terminal de GEF12. D'autres exemples existent dans le modèle riz. Lors de la signalisation chitine, OsCERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1), un récepteur à domaine lysine (LysM), permettrait la phosphorylation de OsGEF1 en particulier le résidu S549 (Akamatsu et al., 2013). De manière intéressante, ce résidu semble être capable de lever l'auto-inhibition de la protéine OsGEF1. Effectivement, une mutation S549D située dans le domaine C-ter de la protéine est suffisante pour activer OsRAC1 (Akamatsu et al., 2013). D'autres kinases comme FERONIA ont été décrites comme interagissant avec des GEF, c'est le cas GEF1/4/10 mais également GEF14 dans le cadre respectivement du développement du poil racinaire et des cellules de l'épiderme de la feuille (Duan et al., 2010; Li et al., 2018). Cependant, un rôle de la phosphorylation dans ces contextes n'a pas encore été établi.

Comme les exemples animaux précédemment cités, on observe également des phosphorylations induisant une régulation négative de l'activité des GEF de plantes. C'est le cas de la relocalisation et de la dégradation de GEF1 lors de la réponse à l'ABA (Li et al., 2016). Sous signal ABA, CPK4 serait activé et interagit avec GEF1 (Li et al., 2016; Li et al., 2018). Elle phosphoryle ensuite GEF1 dans son N-Terminal et le résidu S51 semble particulièrement important pour la stabilité de la protéine. À l'inverse, ABI1 une phosphatase de la classe des PP2C (Protein Phosphatase 2C), permet en l'absence d'ABA la stabilité de GEF1. Alors que l'activité de cette même phosphatase sur GEF1 serait inhibée en présence d'ABA (Chen et al., 2016).

Pour conclure, il semble que la phosphorylation est un mécanisme majeur de la régulation de l'activité des GEF. De plus, les régions N et C terminale des GEF à domaine PRONE sont des régions régulatrices de leurs activités et ainsi, probablement des cibles pour la phosphorylation.

## 1.2) Objectifs

Mon objectif est de mieux comprendre comment GEF14 est activé par le signal osmotique. Dans ce deuxième chapitre, j'ai cherché à identifier les modifications post-traductionnelles présentes sur la protéine GEF14 qui pourraient agir sur sa fonction. Je me suis centrée sur les événements de phosphorylation. Effectivement, il semble par la littérature qu'il s'agit d'une des voies majeures de modulation de l'activité des GEF. Pour cela j'ai conduit une expérience de phosphoprotéomique ciblée sur la protéine GEF14. Ensuite, j'ai analysé les données de spectrométrie de masse afin d'identifier de potentiel interactants de GEF14 en réponse au signal osmotique. Ce travail a été fait en collaboration avec Véronique Santoni, une chercheuse experte en protéomique et Valérie Rodfidal ingénieur de la plateforme de spectroscopie de masse de l'unité.



**Figure 16 : Design expérimental**

Des plantules de 7 jours exprimant p35S:GFP-GEF14 sont réparties en deux conditions : la condition hyperosmotique consistant à disposer dans les boîtes une solution de sorbitol à 300mM durant 30 minutes puis sont extraites de la boîte et broyées. La condition contrôle consiste à broyer directement les plantules. Par condition nous réaliserons 6 répliquas biologique. Pour chaque répliquas nous réalisons des Co immunoprécipitations à l'aide d'un anticorps anti-GFP de la protéine GFP-GEF14 puis nous réalisons de la spectrométrie de masse afin d'identifier les sites de phosphorylation.

## 2) Résultats

Nous nous intéressons donc à l'identification des sites de phosphorylation, potentiellement impliqués dans la régulation de GEF14. Afin de faciliter la compréhension des résultats, je vais détailler de manière succincte le design expérimental de cette étude. Nous avons choisi une approche de protéomique ciblée à partir de l'immunopurification de GEF14 taguée. Après des essais préliminaires, le signal obtenu à partir de la lignée pGEF14 :cit-GEF14 s'est avéré trop faible pour l'analyse en masse. Effectivement, *GEF14* a un profil d'expression très restreint dans la racine. Afin de palier à ce problème, la lignée p35S :GFP-GEF14 a été utilisée. Deux conditions ont été utilisées : soit contrôle, soit après l'application d'un signal osmotique pendant 30 minutes (sorbitol 300mM). Pour chaque condition nous avons réalisé 6 répliques biologiques (Figure 16). Le fait de croiser ces deux conditions a pour objectif d'identifier des potentielles phosphorylations régulées par le signal osmotique mais aussi d'analyser le protéome GFP-GEF14 dans les deux conditions. Cette comparaison pouvant révéler des interactants potentiels impliqués dans la régulation de GEF14 lors du signal osmotique.

**MMLMRRRLACCSREREISIDFDEHEQDKMITYYGLETICIINNQSYEEES  
GTSRGDGCLTDSLDDDAFSSCSSSKDASSSFSSKWLPMKNDEHSCDGL  
NLSGRSQHFDAKEKKKQGYGSSQHFDAKEKPGYVYCHLDVEAMKEK  
FSKLLLGEDVTGGCKGVQVALALSNAVTHLATSIFGELWKLEPLCEEKKQ  
KWRREMDWLLSPTNYMIELVPSKQNDANGRSLEIMTPKARADIHM  
NLPALQKLD SMLIETLDSMVNTEFWYSEIGSRAEGKNKSTSESKRWWL  
PSPQVPKPLSNGRKKLLDKGKVYQVFKATKAINENILLEMPVPIVI  
KEAIPKSGKNSLGDELYKMLAVESATVDEIFISLNLGTEHAALETVNKLES  
AMFAWKERITEQGSNGKSPVRASWSFAKDPLSEIGRNESLLNRAEAL  
RTQIKSKHPNLPHSFLDATKIQYDKDIGHAVLEAYSRTLANLAFRILSRM  
GEILKEDSLSNPNSPAPPSCFPSSRDPYRTPERPLLSSRVRHSLTDDMN  
KADGTETGLDFLFADAKASNSVNTTPSRSSRLWCLSKVPSDTSP\***

**Figure 17 : Représentation de la couverture de la séquence de GEF14**

Les peptides en gras de GEF14 sont les peptides identifiés par protéomique sur la lignée p35S:GFP-GEF14.



## 2.1) Identification des sites de phosphorylation

En considérant tous les échantillons confondus sans seuillage 16 427 séquences peptidiques ont été identifiées dont 253 séquences portant une phosphorylation, soit 1,5% des peptides. Pour tout le reste de l'analyse, l'intensité des signaux peptidiques a été normalisée et nous avons appliqué un seuillage sur les peptides. Il faut qu'il soit retrouvé dans au moins 4 répliques sur 6 pour être validé. Après application de ce seuillage, plus que 15 992 peptides sont présents. La couverture de séquence de la protéine GEF14 est assurée par 68 séquences dans la condition contrôle et 66 pour la condition osmotique (Sorbitol 300mM, 30 min) (Figure 17). Cette donnée est importante car elle montre que 83 % de la séquence de la protéine est couverte par l'analyse.



**Figure 18 : Position des sites de phosphorylation détectés sur la protéine Gef14**

Représentation schématique et séquence de AtGEF14. Le N-terminal est coloré en orange, le domaine catalytique PRONE est coloré en vert et le C-terminal est violet. Les sites de phosphorylation détectés sont notés en jaune.

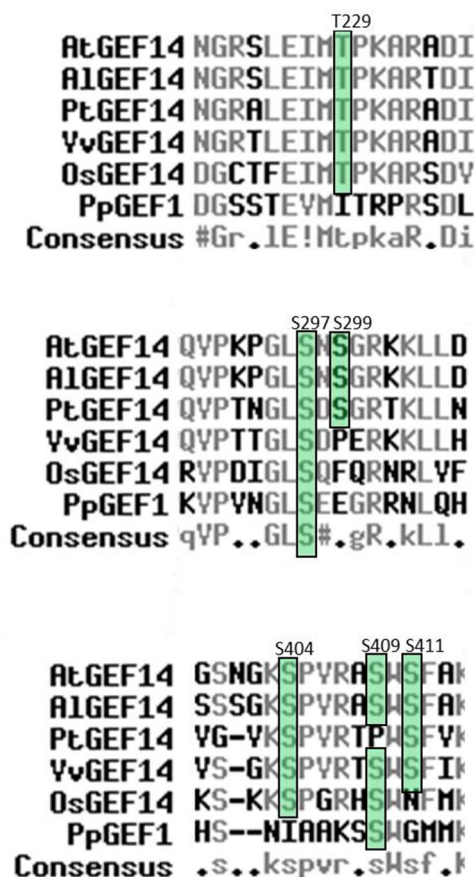
7 peptides de GEF14 ont été trouvés comme phosphorylés (tableau 1). 2 sérines et une thréonine ont été identifiées avec une forte probabilité. Dans le cas du peptide ASWSFAKDPLSEIGRNESLLNR et WWLPSPQVPKGLSNSGRK, les sérines S409 et S411 ainsi que S297 et S299 sont respectivement équiprobables. Ainsi, ces quatre positions sont phosphorylées dans nos échantillons. Donc, au total, 5 sérines et une thréonine sont phosphorylées. Tous les résidus se situent dans le domaine PRONE de GEF14 (Figure 18). Cependant la fréquence où nous retrouvons ces peptides dans nos répliques biologiques reste trop faible pour évaluer leurs variations en fonction du traitement. Seul le peptide ITEQGSNGKSPVR contenant le site S404 respecte les conditions du seuillage (présent dans 4 des 6 répliques). Il s'avère qu'il n'y est pas d'effet du traitement sur la phosphorylation de cette position (Tableau 1).

	Sites modifiés	Site Phospho	Probabilité du site Phospho	Welch test
ASWSFAKDPLSEIGR	NA	S411	81%	Néant
ASWSFAKDPLSEIGRNESLLNR	NA	S409	43%	Néant
ASWSFAKDPLSEIGRNESLLNR	NA	S411	47%	Néant
ITEQGSNGKSPVR	Déamidation N401	S404	96%	0,367896
SLEIMTPK	Oxidation M228	T229	100%	Néant
WWLPSPQVPKGLSNSGRK	Déamidation Q290 ; N298	S297	50%	Néant
WWLPSPQVPKGLSNSGRK	Déamidation Q290 ; N298	S299	50%	Néant

**Tableau 1 : Tableau des sites de phosphorylation de GEF14**

Les sites de phosphorylation détectés sont notés en orange, les modifications subit par le peptide sont notées en bleu. La probabilité d'existence de ce site est évaluée en pourcentage. Un test Welch est appliqué pour comparer la condition contrôle et sorbitol lorsque cela a été possible (valide que pour le peptide ITEQGSNGKSPVR).

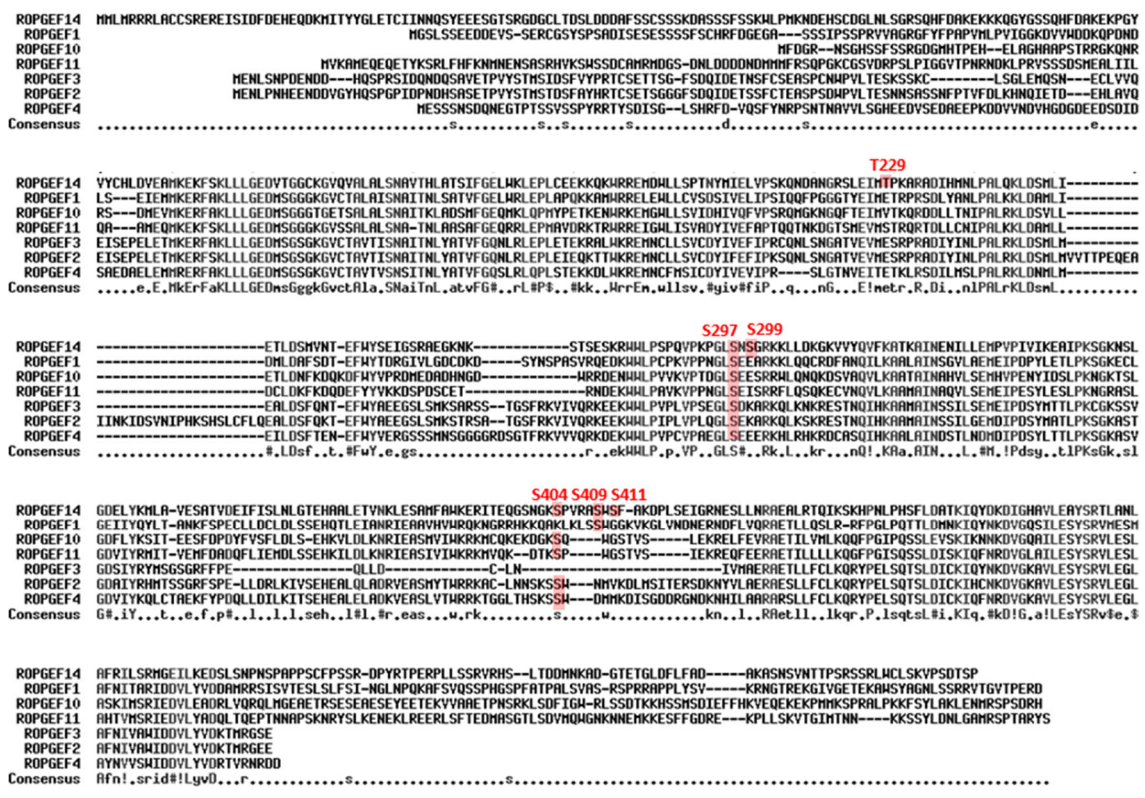
Sachant que le domaine PRONE des GEF est un domaine très conservé, nous nous sommes intéressés à la conservation de ces sites de phosphorylation que nous avons identifiés. Les séquences de l'orthologue de GEF14 chez *Arabidopsis lyrata* (Al), *Populus trichocarpa* (Pt), *Vitis vignifera* (Vv), *Oryza sativa* (Os), *Physcomitrium patens* (Pp) ont été comparées à celles d'*A.thaliana* (At) (Figure 19). On observe de manière générale une assez forte conservation de ces sites de phosphorylation. Par exemple, la sérine S297 est conservée chez tous les orthologues de GEF14 puis viennent les sites T229 et S404 qui sont présents chez tous les orthologues exceptés chez *physcomitrium patens* (Pp). Il est de même pour la sérine S409, elle est conservée chez tous les orthologues exceptée chez *Populus trichocarpa* (Pt). La sérine 411 semble moins bien conservée chez les orthologues de GEF14 absentes des espèces *Oryza sativa* (Os) et *Physcomitrium patens* (Pp). Le site le moins bien conservé est la sérine 299 absente de *Vitis vignifera* (Vv), *Oryza sativa* (Os) et *Physcomitrium patens* (Pp).



**Figure 19 : Conservation des sites de phosphorylation dans les orthologues de GEF14.**

Alignement réalisé avec mutalin des différentes GEF14 chez : *Arabidopsis thaliana* (At), *Arabidopsis lyrata* (Al), *Populus trichocarpa* (Pt), *Vitis vignifera* (Vv), *Oryza sativa* (Os), *physcomitrium patens* (Pp). En vert les sites de phosphorylation identifiés sur p35S:GFP-GEF14.

Sachant que nous avons identifié GEF14 comme spécifique de la signalisation osmotique, et n'ayant pas identifié de site de phosphorylation signal osmotique spécifique, il serait alors intéressant de connaître si les sites de phosphorylation identifiés existent également chez des GEF qui ne sont pas impliqués dans la signalisation osmotique. Pour cela, j'ai réalisé un alignement entre la séquence de GEF14 et de tous les GEF que j'ai trouvé comme non nécessaire à l'accumulation de ROS induit par le signal osmotique. On remarque que parmi les sites communs à plusieurs GEF, la sérine S297 est la plus conservée (Figure 20). Vient ensuite la sérine S404 conservée chez toutes les GEF alignées exceptée chez GEF3 et GEF1. Quant à la sérine S409, elle est seulement commune avec GEF1. *A contrario* certaines positions semblent plus spécifiques de GEF14 notamment T229, S299, et S411. Néanmoins, dans ces derniers cas des sérines sont présentes en amont ou en aval du site.



**Figure 20 : Conservation des sites de phosphorylation de AtGEF14 chez des GEF racinaires d'*Arabidopsis thaliana*.**

Alignement réalisé avec mutalin de GEF1, GEF2, GEF3, GEF4, GEF10, GEF11 d'*Arabidopsis thaliana*. En rouge les sites de phosphorylation identifiés de GEF14 dans ce chapitre.

## 2.2) Interactome de GEF14

Outre l'identification des sites de phosphorylation, cette approche protéomique permet de révéler les protéines co-purifiantes avec GFP-GEF14 lors de l'immunoprécipitation en fonction du traitement. La validation de la présence d'une protéine dans un échantillon est basée sur la reconnaissance d'au moins deux peptides dont un peptide spécifique de la protéine. La quantification du signal obtenu a été réalisée par label free quantification (LFQ).

Ainsi, pour tout réplica confondu nous avons identifié et quantifié 1 853 protéines pour la condition contrôle, et 1 843 pour la condition osmotique (sorbitol 300mM). Nous appliquons un seuillage de présence/absence, où une protéine est considérée présente lorsqu'elle est présente dans au moins 4 réplicat sur 6. Parmi toutes les protéines identifiées, 1 754 sont communes entre la condition contrôle et le sorbitol (Figure 21). En appliquant le seuillage présence/absence, 110 protéines sont retrouvées dans la condition osmotique et non en condition contrôle. Cependant il est important de noter qu'aucune protéine est strictement absente de la condition contrôle (soit dans zéro réplica). *A contrario* on retrouve 115 protéines spécifiques de la condition contrôle, mais seule une protéine est strictement absente du traitement sorbitol. Cette protéine est Lipid Transfer Protein 1 (LTP1) (AT2G38540), qui code pour lipide transférase non spécifique.

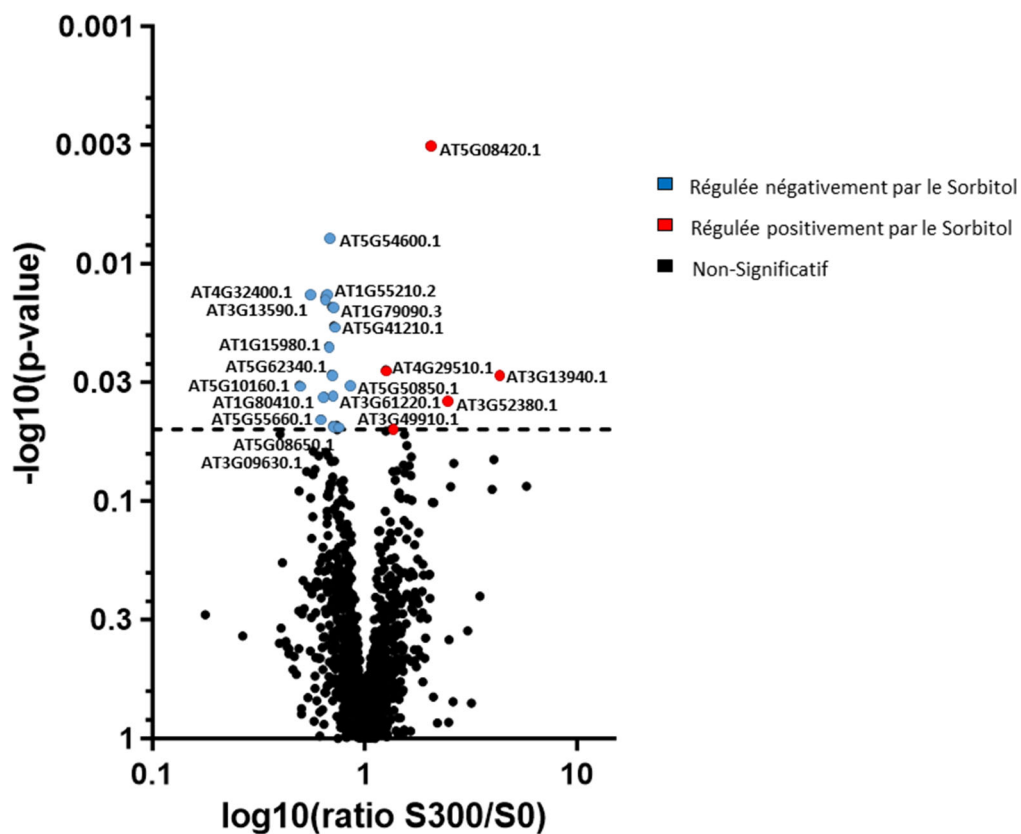


**Figure 21 : Diagramme de Venn représentant les nombres de protéines copurifiant avec GEF14 en condition sorbitol 300 mM et contrôle**

Ensemble de protéines copurifiant avec p35S:GFP-GEF14 présente dans au moins 4 réplicas en condition contrôle ou en condition sorbitol. L'identification de ces protéines est permise par Maxquant (normalisation Lfq).



Pour les 1 754 protéines communes à la condition contrôle et au traitement sorbitol, nous avons comparé leurs accumulations relatives. Ainsi, les variations d'abondances des protéines peuvent changer de manière assez importante entre les deux types d'échantillon avec des cas extrêmes proches de plus ou moins 10 fois. Vingt protéines passent le seuil de significativité de  $p\text{-value} < 0.05\%$  (Figure 22). Parmi ces 20 protéines, 5 sont régulées positivement et 15 régulées négativement (Tableau 2). Aucune de ces protéines codent pour des kinases ou des phosphatases. Néanmoins, deux kinases semblent régulées par le signal osmotique. Il s'agit de Calcium dependant protein kinase3 (CPK3 ; +42% en condition de traitement ;  $p\text{-value} = 0.057$ ) et Cystein-rich receptor like kinase 29 (CRK29 ; -23% en condition de traitement,  $p\text{-value} = 0.058$ ). De son côté la phosphatase avec la p-value la plus faible est PP2C induced by AVRRPM1 (PIA1 ; -33% en condition de traitement,  $p\text{-value} = 0.071$ ) dont l'accumulation diminue en présence de sorbitol.



**Figure 22 : Volcano plot montrant les données protéomiques.**

Ces points représentent la p-value à l'échelle ( $-\log_{10}$ ) d'un test Welch à 5% en fonction du ratio S300 sur la condition contrôle des intensités normalisées ( $\log_{10}$ ). La ligne horizontale en pointillé représente le seuil de significativité (p-value à 5%, test Welch). Les deux couleurs bleue ou rouge indiquent les protéines régulées négativement ou positivement par le Sorbitol.

Proteine ID	Nom de la Protéine	Fonction	S300/contrôle	Références
AT5G1016 0.1	No name	Thioesterase superfamily protein	0,49179343	NC
AT4G3240 0.1	SHS1 sodium hypersensitive	Transmembrane transport/ ABA insensible	0,55108545	(Inan et al., 2007)
AT5G5566 0.1	DEK domain-containing chromatin associated protein	Histone interaction	0,62090022	NC
AT1G8041 0.1; AT1G8041 0.2	AtNAA15	Développement embryonnaire/ dormance/ sécheresse	0,64386575	(Linster et al., 2015)
AT1G5521 0.2; AT1G5521 0.1	Disease resistance-responsive	Métabolisme carboné	0,64990884	(Matsuda et al., 2010)
AT3G1359 0.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	Réponse à l'acide jasmonique	0,65332028	(Wilson et al., 2005)
AT1G1598 0.1	NDH-DEPENDENT CYCLIC ELECTRON FLOW 1	Transport d'électron dans le photosystème	0,67595653	(Takabayashi et al., 2009)
AT5G5460 0.1; AT5G5460 0.2	PLASTID RIBOSOMAL PROTEIN L24	Traduction plastidiale	0,68379819	(Bakshi et al., 2023)
AT5G6234 0.1	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	Regulateur négatif des activités catalytiques	0,69874866	(Schwager et al., 2007)
AT1G7909 0.3;AT1G7 9090.2;AT 1G79090.1	ARABIDOPSIS HOMOLOG OF YEAST PAT1	Impliqué dans phosphorylation de MPK4 / réponse PAMP / maintien des cellules du meristème	0,69936566	(Yu et al., 2016) (Roux et al., 2015)
AT3G6122 0.1;AT3G6 1220.2;AT 3G61220.3	SDR gene family	NAD(P)+/Menthol dehydrogenase activity	0,70826653	(Bhandari et al., 2010)
AT5G0865 0.1;AT5G0 8650.2	CPLP/GTP-binding protein LepA homolog	Synthèse des protéines en condition critique dans le chloroplaste	0,7096586	(Bach-Pages et al., 2020)
AT5G4121 0.1	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE THETA 1	Glutathione transferase/métabolisme carboné	0,71504456	(Dixon et al., 2009)
AT3G4991 0.1	RIBOSOMAL PROTEIN UL24Z, UL24Z	traduction machinerie ribosomale	0,73611276	(Scarpin et al., 2023)
AT5G5085 0.1	MAB1	Developpement embryonnaire/ polarité cellulaire/identité cellulaire	0,85021293	(Juranic et al., 2012)
AT4G2951 0.1	ARABIDOPSIS THALIANA ARGININE METHYLTRANSFERASE 11	Has arginine N-methyltransferase activity/ RNA métabolisme	1,25533533	(Juranic et al., 2012)
AT3G0963 0.1; AT3G0963 0.2	ribosomal protein L4/L1	Negative regulation of xylem differentiation	1,33497674	(Scebba et al., 2007)
AT5G0842 0.1	RNA-binding KH domain-containing protein	Regulée postivement par l'ABA / regulation RACK1	2,03143083	(Guo et al., 2009)
AT3G5238 0.1	CHLOROPLAST RNA BINDING PROTEIN 33A	Activité plastidiale	2,46666684	(Teubner et al., 2016)
AT3G1394 0.1	Light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein (CAB-4)	Photosynthèse activité	4,31854868	(Asencio-Ibanez et al., 2008)

**Tableau 2 : Tableau des protéines significatives communes entre la condition contrôle et S300**

Ces protéines sont communes à la condition sorbitol et condition contrôle ont un rapport d'intensité normalisée s300/ST significatif (pvalue test Welch <0,05). Les protéines en rouge sont régulées positivement par le sorbitol et en bleu négativement. NC : non-communicué.

### 3) Discussion

#### 3.1) Design expérimental

Une remarque importante concerne notre manque de contrôle de l'effet traitement. Effectivement, nous ne n'avons pas de moyen de vérifier si notre traitement fonctionne correctement. Par exemple, la manipulation des échantillons avant congélation pourrait créer un stress, même en condition contrôle, et induire des réponses artéfactuelles. Ceci pourrait expliquer le manque de différence entre le traitement osmotique et la condition contrôle dans le protéome, ou encore dans la quantification des peptides phosphorylés. De plus, nous avons réalisé cette étude sur la plante entière avec une lignée de surexpression, par conséquent notre signal pourrait très bien être noyé. En effet dans le protéome de GEF14, on remarque de nombreuses protéines en lien avec les régulations photosynthétiques (Tableau 2).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que nous avons effectué cet interactome sans contrôle négatif d'interaction (interaction avec la GFP ou contaminant de la colonne de purification). Cependant, le fait d'utiliser deux conditions nous permet de voir les interactions qui varient en fonction du traitement, ce qui est peu probable pour des contaminants. Dans tous les cas, les résultats obtenus doivent être pris avec précautions et des validations par des approches orthogonales seront nécessaires.

#### 3.2) Identification et capacité de détection des sites de phosphorylation lors du signal osmotique

Nous avons identifié 6 sites de phosphorylation à partir de l'immunopurification de GFP-GEF14 en condition contrôle et après un traitement osmotique. Bien que la couverture de la séquence protéique (Figure 1) soit bonne aucune phosphorylation n'est dans les domaines C-ter ou N-ter de GEF14. Effectivement, les GEF sont régulées par la phosphorylation plutôt sur les parties C-ter ou N-terminal de la protéine. Néanmoins, un article mentionne également des phosphorylations dans le domaine PRONE lors d'essai de phosphorylation in vitro (Li et al., 2018).

Nous n'avons pas pu identifier de variation quantitative de phosphorylation en fonction du traitement. Pour avoir une idée de la régulation par le signal sur ces sites il aurait été intéressant alors d'augmenter le nombre de réplicas afin d'apporter des informations sur le lien entre les sites identifiés et leur régulation par le signal ; voir en identifier d'autres. En effet,



les protéines phosphorylées coexistent avec leur forme non phosphorylée mais reste bien souvent moins abondante. Il est donc important d'augmenter le nombre de phosphopeptides avant la spectrométrie de masse. Des techniques d'enrichissement permettent d'accroître l'identification des phosphopeptides, elles reposent sur la modification chimique en enrichissant en phosphate, la chromatographie d'affinité capturant les peptides et ayant des phosphates chargés négativement sur une matrice positivement chargée ; ou bien l'immunoprécipitation par des anticorps phospho-spécifiques. Nous avons fait le choix de ne pas enrichir dans cette étude mais ceci pourrait être une piste d'amélioration. Néanmoins, l'expression ectopique de *GEF14* dans d'autres tissus pourrait toujours entraîner des phosphorylations non liées à la signalisation osmotique.

### 3.3) Conservation des sites

Sachant que la phosphorylation des sites de GEF14 n'a pas montré de variation d'abondance en fonction du traitement, nous avons testé leurs conservations d'une part entre les différentes séquences GEF14 chez les plantes, et d'autre part entre différents isoformes de GEF chez *A.thaliana*. Cette étude de la conservation des sites de phosphorylation permettrait de déduire si certains sites étaient associés spécifiquement à GEF14. Effectivement, nos données montrent que GEF14 est nécessaire pour induire le signal osmotique ; et non GEF1, GEF2, GEF3, GEF4, GEF10 et GEF11. Ainsi T229, S299, et S411 sont présents que chez GEF14. Ces sites pourraient être impliqués dans la signalisation osmotique. Néanmoins, il a été noté que des sérines sont souvent à proximité de la position identifiée. L'étape suivante serait de réaliser différentes versions mutées de ces sites. Les versions de GEF14 contenant des sites mutés phospho dead ou phosphomimetic pourrait être testées avec les senseurs d'activation FRET i-ROP. Cela permettra de tester en système hétérologue l'impact de la phosphorylation de la GEF14 sur l'activation de ROP6. Ensuite, ces versions mutées pourraient être utilisées pour compléter une lignée *gef14* et nous pourrions tester l'accumulation de ROS.

### 3.4) Candidat potentiel de la régulation de GEF14

L'interactome de GEF14 issu de cette analyse nous révèle qu'une seule protéine est spécifique stricte de la condition contrôle. Cette protéine, AT2G38540, est présente en condition contrôle (plus de 4 répliquas sur 6) et absente stricte de la condition sorbitol (0 répliqua sur 6). Ce gène

code pour une lipide transférase, LIPID TRANSFER PROTEIN 1 (LPT1). Ces protéines permettent grâce à une cavité hydrophobe le transport de lipides. De manière intéressante, il a été montré que l'expression de LPT1 change en réponse au stress osmotique (Skiryecz et al., 2010).

Parmi les protéines co-purifiées dont la quantité varie en fonction du traitement (Figure 6), nous nous intéressons en premier lieu aux candidats qui sont exprimés dans le même type cellulaire que GEF14. C'est-à-dire les trichoblastes. L'évaluation de l'expression dans les trichoblastes a été réalisée à l'aide de la base de données single cell (Denyer et al., 2019).

C'est le cas de SHS1 (sodium hypersensitive proteine) (AT5G08420) qui code pour une RNA binding protein. Il semble être un candidat d'intérêt car il est impliqué dans de nombreux stress (Linster et al., 2015). Sa perte de fonction montre une hypersensibilité au stress salin, une perte de sensibilité à l'ABA, et une hypersensibilité au sucre (Inan et al., 2007). D'autres gènes comme DEK domain-containing chromatin associated protein (AT5G55660), AtNAA15 (AT1G80410), et PLASTID RIBOSOMAL PROTEIN L24 (AT5G54600) sont également fortement exprimées dans les trichoblastes. La Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein (AT5G62340) est quant à elle fortement exprimée dans la coiffe des racines latérales dans les trichoblastes et les atrichoblastes. De plus cette protéine serait impliquée dans la régulation de la pectine par conséquent pourrait être intéressante pour la signalisation osmotique dans la conservation de l'intégrité de la paroi comme le montre son interaction avec FERONIA (Smokvarska et al., 2023). La PAT1 (ARABIDOPSIS HOMOLOG OF YEAST PAT1) est

exprimée dans les trichoblastes ainsi que les atrichoblastes. Elle semble particulièrement intéressante comme candidat par son implication dans la signalisation PAMP. En effet cette protéine serait phosphorylée par MPK4 ; par la suite PAT1 modulerait l'expression des gènes de l'immunité (Roux et al., 2015).

D'autres gènes sont exprimés dans toute la racine comme la GLUTATHIONE S-TRANSFERASE THETA 1 (AT5G41210) et la RIBOSOMAL PROTEIN UL24Z, UL24Z (AT3G49910) (Miao et al., 2006). Mais l'expression de cette dernière est nettement plus élevée dans les trichoblastes et les atrichoblastes (Scarpin et al., 2023). Une autre protéine est exprimée de manière ubiquitaire dans les tissus de la racine. Il s'agit de MAB1 (AT5G50850). Chez le maïs, MAB1 a été montrée comme impliquée dans le développement des lignées germinale. De plus elle semble être impliquée dans la division asymétrique des cellules mais aussi elle serait impliquée

dans la polarité des cellules. De plus MAB1 pourrait interagir avec une sous unité des microtubules (Juranić et al., 2012).

Parmi les gènes régulés positivement par le signal osmotique, ARABIDOPSIS THALIANA ARGININE METHYLTRANSFERASE 11 (AT4G29510) est exprimée dans tous les tissus. La RNA-binding KH domain-containing protein (AT5G08420) est exprimée également dans tous les tissus, et a été cependant rapportée comme régulée positivement par l'ABA. Le gène AT3G52380 est très faiblement exprimé dans la racine, cependant l'expression relevée dans la racine est essentiellement trichoblastique et liée à la signalisation froide (Li et al., 2014b). La protéine AT3G13940 est fortement régulée positivement par le signal osmotique, de plus elle est essentiellement exprimée dans les cellules épidermiques (trichoblastes et atrichoblastes). Cependant peu d'information a été répertoriée sur cette protéine. Il semblerait qu'il s'agit d'une DNA binding/DNA-directed RNA polymérase impliquée dans la carence de fer et de cuivre (Garcia-Molina et al., 2020).

En revanche, aucun de ces gènes aurait un lien direct avec la régulation de l'activité de GEF14. Effectivement, avec un seuil de statistique de 0.05%, nous n'avons pas identifié de potentielles kinases ou phosphatases qui seraient des régulateurs de la phosphorylation de GEF14. Néanmoins, en explorant de manière moins stringente les données, trois candidats intéressants sont apparus : deux kinases et une phosphatase. La phosphatase PP2C induced by AVRRPM1 (PIA1 ; pvalue=0.071) fait partie de la famille des PP2C. Bien que non significative, sa quantité avec GFP-GEF14 diminue de 33% après un traitement sorbitol. Les PP2C sont connues pour agir sur SNRK2 lors de la signalisation ABA. Par ailleurs, cette phosphatase serait régulée négativement par le signal osmotique (Takahashi et al., 2020). De plus cette phosphatase a été répertoriée dans d'autre signalisation comme dans l'immunité contre *Pseudomonas syringae*.

D'autre part, 2 kinases sont aussi des candidats intéressants. Il s'agit de CPK3 (pvalue=0.057) et CRK29 (pvalue=0.058). Alors que CRK29 est moins présent en condition de traitement (26%), CPK3 semble s'accumuler avec GFP-GEF14 (41%). Les CRK (Cytsein riche receptor kinase) possèdent un domaine transmembranaire, un domaine kinase ainsi qu'un domaine extracellulaire riche cystein, sensible aux ROS. Chez *crk29*, une suraccumulation des ROS au niveau des feuilles a été observée en réponse aux pathogènes. Curieusement, et malgré cette augmentation de ROS, le mutant *crk29* est plus sensible à Pst DC3000 (Zhang et al., 2023)

(Bourdais et al., 2015). Sa localisation et son rôle dans la régulation des ROS la rendent particulièrement intéressante.

CPK3 (At4g23650) est exprimée dans tous les tissus racinaires. Cette kinase est régulée par le calcium et est associée à la membrane plasmique. De plus, elle a été montrée récemment dans un papier « pré-print », comme formant des nanodomains lors de son activation (Jolivet et al., 2023). De manière intéressante, CPK3 est liée à la réponse au stress salin, qui a une composante osmotique. En effet elle active les "Mitogen-Activated Protein Kinase" MAPK4 et MAPK6 (Mehlmer et al., 2010) permettant de transduire le signal. De plus, les plantes perte de fonction pour *CPK3* entraînent des phénotypes d'hypersensibilité au stress salin. Ainsi, CPK3 apparait comme une kinase très intéressante, agissant potentiellement sur GEF14.

Le rôle de ces différentes kinases et phosphatases sera implémenté dans le modèle de régulation que je propose à la fin de mon manuscrit de thèse.

#### 4) Discussion générale

L'objectif majeur de ma thèse était de comprendre comment le signal osmotique engendre une réponse spécifique alors que ROP6 semble commune à plusieurs voies de signalisation. Pour ce faire, j'ai cherché à comprendre comment ROP6 était activé lors de la signalisation osmotique.

Il existe deux voies ROP6-dépendantes permettant l'accumulation de ROS lors d'un signal osmotique. L'une impliquant l'acrobate et le fer, et l'autre enzymatique à travers l'activation des NADPH oxydases de la membrane plasmique ou des RBOH. Dans cette étude, je me suis concentrée sur les RBOH car elles sont les mieux comprises. L'étude de cette cascade de signalisation ROP6/RBOH implique de s'intéresser aux interactions physiques et fonctionnelles des différents acteurs impliqués mais aussi à mieux comprendre leurs organisations dans la membrane. Effectivement, il a été montré que ROP6 et RBOHD colocalisent dans des nanodomains, ce qui est corrélé avec une accumulation de ROS dans les cellules lors de la signalisation osmotique. Par conséquent, nous avons utilisé cette accumulation de ROS comme un marqueur de la signalisation osmotique pour identifier l'activateur de ROP6. De manière surprenante, parmi celles que j'ai testé, seule GEF14 est nécessaire à l'accumulation de ROS induit par le signal osmotique. GEF14 est aussi apparue comme un acteur agissant spécifiquement dans cette voie de signalisation. Elle ne semble pas nécessaire pour l'induction d'autre cascade de signalisation médiée par ROP6 (Gorgues et al., *in prep*). De manière plus fine, nous avons montré que GEF14 agit génétiquement en amont de ROP6 et que le domaine PRONE de GEF14 peut seul activer ROP6 en système hétérologue. Nous avons également étudié l'impact de GEF14 sur la localisation des acteurs ROP6 et RBOHD. Nous montrons que GEF14 semble être essentielle à l'immobilité de ROP6, et ce de manière spécifique au signal osmotique. De plus, nous avons montré que GEF14 est une protéine principalement présente dans les cellules trichoblastiques et que sa localisation change lors de l'application d'un traitement osmotique.

Dans une optique d'accroître nos connaissances sur les mécanismes de perception du signal osmotique, j'ai cherché à mieux comprendre comment GEF14 était activée. La phosphorylation a été montrée comme une modification post traductionnelle centrale dans l'activation des GEF. Par conséquent, nous avons cherché et identifié 5 sites de

phosphorylation de GEF14 et aussi étudié son interactome, révélant des kinases et une phosphatase comme des candidats d'intérêt.

### *Un rôle différentiel pour l'activation et le clustering de ROP6 dans l'accumulation de ROS lors du signal osmotique*

Le rôle d'activateur de GEF14 a déjà été discuté dans le chapitre 1. Nous discuterons ici du rôle fonctionnel de l'activation et du clustering de ROP6. L'expression d'une forme *ROP6-CA* (constitutive active) accumule constitutivement ROS, interagit avec RBOHD et forme des nanodomains en absence de signal biologique (Smokvarska et al., 2020). Ces observations supposent que l'activation des ROP permet leurs interactions avec les protéines effectrices. Par exemple il a été montré que ROP11-CA interagit avec RbohF dans le poil racinaire (Yan et al., 2016). Ainsi, notre hypothèse principale réside en ce que GEF14 contrôlerait l'activation de ROP6, conditionnant à la fois son clustering et son interaction avec les protéines effectrices telles que RBOHD. Mais paradoxalement, et en opposition avec les données de diffusion, on observe que la perte de fonction de GEF14 n'entraîne pas la perte des nanodomains de ROP6 observés par TIRF (figure 12 et 14). Par conséquent, nos résultats indiquent que l'activation n'est pas un élément nécessaire pour le clustering de ROP6, mais en revanche conditionne bien la production de ROS. De même, les formes dominantes négatives de ROP (*ROP-DN*) forment des nanodomains dans les membranes, c'est le cas de ROP2-DN dans le poil racinaire) (Fuchs et al., 2021), ou encore de ROP6 –DN (A.Martiniere, communication personnelle). Par conséquent ces données appuient l'hypothèse selon laquelle l'activation ne conditionne pas le clustering des ROP.

À la suite de ces résultats une hypothèse majeure émerge : ces nanodomains ne seraient pas fonctionnels. Par exemple, en l'absence de GEF14, ROP6 formerait bien des nanodomains lors du signal osmotique, mais ils ne colocaliseraient pas avec RBOHD. Par conséquent, il ne pourrait pas produire de ROS. Par la suite, j'ai testé l'impact de GEF14 sur le clustering de RBOHD. Nous avons confirmé que RBOHD forme des clusters en réponse au signal osmotique et que GEF14 limiterait un peu leurs densités dans la membrane (figure 12). De même, il semble que le nombre de clusters de RBOHD qui colocalisent avec ROP6 semble diminuer dans un fond *gef14-2*. Afin de valider cette hypothèse, il aurait été intéressant de mesurer

l'oxydation de ces nanodomains. En effet, l'équipe a développé récemment différentes lignées où ROP6 est fusionnée avec la sonde ratiométrique Hyper7 qui permet de mesurer la production  $H_2O_2$  (Ugalde et al., 2021). Ces lignées ont permis de montrer que les nanodomains de ROP6 sont plus oxydés que le reste de la membrane lors du signal osmotique. Cette information confirme que les ROS sont bien accumulés de manière discrète dans la membrane, là où ROP6 et RBOHD colocalisent. Ainsi, il serait possible de générer une lignée *gef14-2xp35S :HYPER7-ROP6* et de mesurer l'oxydation des nanodomains de ROP6 en absence de GEF14.

Nous pourrions également étudier l'interaction moléculaire entre ROP6 et RBOHD, en présence et en absence de GEF14. Effectivement, ce n'est pas parce que ROP6 et RBOHD colocalisent que les deux protéines interagissent nécessairement. Pour cela, soit une approche de FRET-FLIM *in planta* ou de Co-immunoprécipitation peut être réalisée. Dans ce dernier cas, j'ai déjà initié ces tests biochimiques qui sont encore au stade de l'optimisation.

Néanmoins, et comme montré dans Gorgues et al., *in prep*, les données de diffusion révèlent tout de même une anomalie dans la diffusion de ROP6 en l'absence de GEF14. Ainsi, la diffusion de ROP6 serait-elle sous le contrôle de l'activation de la GTPase ? Il est donc intéressant d'investiguer quels autres mécanismes peuvent régir la diffusion de ROP6 permettant ainsi l'activation de RBOHD.

#### *D'autres acteurs impliqués dans la diffusion de ROP6*

Rappelons que les lipides peuvent avoir des rôles cruciaux dans la signalisation membranaire. En effet ROP6 forme des nanodomains lors de la signalisation auxine. Ces nanodomains comme ceux induits par le signal osmotique sont PS-dépendants (Platre et al., 2019, Smokvrska et al., 2023). En effet, la région polybasique de ROP6 interagit avec des lipides anioniques dont les PS. En l'absence de PS, ROP6 n'est plus stabilisé dans les nanodomains, aboutissant à une perte de la signalisation en aval (Platre et al., 2019). De plus, la quantité et la localisation des PS à la membrane sont régulées dans la cellule. Effectivement, le récepteur kinase FERONIA module la localisation des PS à la membrane (Figure 23). Les PS seraient donc nécessaire à la correcte clusterisation de ROP6, et la signalisation FERONIA agirait ainsi comme un modulateur de la signalisation GTPase (Smokvrska et al., 2023).

Nos données de diffusion révèlent que l'action de GEF14 sur ROP6 modulerait son immobilité dans les nanodomains mais pas sa clusterisation. Par conséquent il serait intéressant de comprendre si l'action de GEF14 aurait un impact sur l'interaction ROP6-PS ou sur la co-localisation de ROP6 et des PS dans les nanodomains. Outre les lipides d'autres acteurs ont été rapportés comme essentiels au clustering.

Nous avons montré que l'activation de ROP6 et l'immobilisation de ROP6 sont essentielles pour induire la réponse d'accumulation de ROS osmotique (Figure 23). Comme explicité en introduction, les acylations ont été montrées comme déterminantes dans la formation des nanodomains de ROP6. En effet, des études montrent que le mutant ROP6-CA (ROP6-CA C21S/C158S) perd le phénotype d'accumulation de ROS constitutives présent chez ROP6-CA (Sorek et al., 2010). De même, la mutation de C21S et de C158S empêche l'immobilisation de ROP6 sous signal osmotique ainsi que la formation de nanodomains (Smokvarska et al., 2020). Une hypothèse de Sorek et al., 2010 serait que l'activation de ROP6 exposerait les deux cystéines C21 et C158 pour les S-acyl transferase (PAT). Ces enzymes ont pour fonction d'ajouter des groupements acyle sur les protéines. J'ai donc le matériel idéal pour tester cette hypothèse. Il serait intéressant de quantifier l'état d'acylation de ROP6 dans un fond *gef14*.

#### *Les mécanismes d'activation de GEF14 lors du signal osmotique*

Pour rappel, notre compréhension de la perception et de la signalisation précoce des plantes en réponse au signal osmotique reste assez partielle. Notre travail place GEF14 comme un acteur très en amont de cette signalisation. Comprendre comment GEF14 est activée, nous rapprocherait de l'identification du ou des mécanismes de perception du signal osmotique.

#### *Un changement de localisation de GEF14*

Nos données montrent que GEF14 passe lors du signal osmotique, d'une localisation cytoplasmique à des clusters potentiellement dans la membrane (Gorgues et al., *in prep*). De plus, des données préliminaires (non présentées) montrent que GEF14 ne forme pas de cluster en présence d'auxine. Par conséquent, ces clusters de GEF14 semblent se former



spécifiquement en réponse au signal osmotique. Bien évidemment, il serait intéressant de savoir si ces clusters de GEF14 colocalisent avec ceux de ROP6 ainsi que ceux de RBOHD. Ensuite, il serait intéressant de mieux comprendre comment GEF14 change de localisation. Pour cela, j'ai cloné durant ma thèse des constructions GEF14 délétées : GEF14 CDS, N-terminal-PRONE, PRONE et PRONE-C-terminal sous le contrôle de son promoteur. Ce matériel, une fois exprimé dans un fond *gef14*, permettrait de comprendre quel domaine est responsable de la localisation de GEF14 en cluster, mais aussi leurs rôles fonctionnels dans le processus de signalisation. De manière intéressante, parmi les 14 *GEF* présentes dans le génome d'*Arabidopsis*, *GEF14* est la seule codant pour deux sites d'acylation prédit. Il serait donc possible que GEF14 s'associe aux membranes via des acylations. Il serait possible d'étudier la formation des clusters de GEF14 en mutant ces sites, mais aussi de tester si GEF14 est bien acylée à la suite du signal osmotique.

#### *Un rôle de la phosphorylation dans l'activation de GEF14*

Dans l'optique de comprendre la perception du signal osmotique, il serait intéressant de comprendre comment GEF14 est régulée par le signal osmotique. Pour ce faire nous avons utilisé une approche protéomique pour identifier les sites de phosphorylation en condition contrôle ou en traitement sorbitol. J'ai déjà discuté du design expérimental dans le chapitre 2. Dans cette partie nous discuterons de l'intérêt des candidats mis en évidence. Nos résultats ont permis d'identifier 5 sites de phosphorylations, tous situés dans le domaine PRONE. Aucun site ne s'est montré régulé par le signal osmotique. Malheureusement ces résultats montrent une faiblesse statistique pour déterminer s'ils sont régulés ou non par le signal osmotique. Comme explicité précédemment, il serait intéressant d'accroître le nombre de réplicas. Néanmoins, à partir des données actuelles de phosphoprotéomique, des mutations pourraient être réalisées aux niveaux des résidus phosphorylés de GEF14. Les constructions générées pourraient ensuite être testées en co-expression avec des senseurs d'activation de ROP6, afin d'estimer leurs rôles dans l'activation de ROP6.

L'interactome montre que deux kinases co-purifie avec GFP-GEF14. Il s'agit de Calcium dependant protein kinase 3 qui interagit plus avec GEF14 suite au traitement osmotique (CPK3 ; pvalue=0.057) et de Cystein-rich receptor like kinase 29 (CRK29 ; pvalue=0.058), qui elle

interagit moins. J'ai aussi identifié une phosphatase. PP2C AVRRPM1 (PIA1 ; pvalue=0.071) qui semble moins interagir avec GEF14 en condition de stress. Ces candidats pourraient être des régulateurs de la phosphorylation de GEF14, si elle existe bien.

CPK3 est de loin le candidat le plus intéressant. En effet dans les cellules de l'épiderme foliaire, CPK3 a été montré comme phosphorylant GDI1 (Wu et al., 2013). Pour rappel, les GDI sont impliqués dans la séquestration des ROP dans le cytoplasme et sont donc des régulateurs négatifs. GDI1 interagit avec ROP2 et ROP6 (Wu et al., 2013). Il existe donc un lien entre GDI1 et les ROP. De plus, cette kinase est activée par le calcium, qui est un des messagers secondaires induits après l'application d'un signal osmotique. De manière intéressante, CPK3 est associé à la membrane grâce à des modifications lipidiques et a été montré comme formant des nanodomains stabilisés par REM1.2 suite à l'infection virale (Jolivet et al., 2023). CPK3 est donc un candidat particulièrement intéressant. Afin de valider son rôle, plusieurs pistes pourraient être suivies. Mais, le plus direct serait de déterminer si un mutant *cpk3* est capable d'accumuler des ROS à la suite du signal osmotique. Ensuite, il s'agirait de comprendre comment cette kinase agit sur GEF14, nous extrapolons son rôle dans la Figure 23. Nous pourrions étudier le comportement de CPK3 face à un signal osmotique en microscopie TIRF, afin de savoir si CPK3 forme des nanodomains osmotiques dépendants.

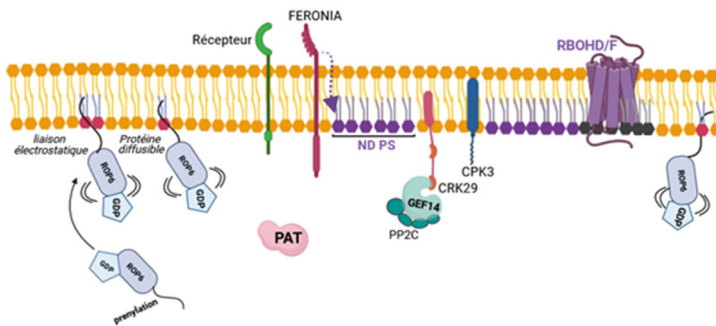
CRK29 est un récepteur kinase riche en cystéine. Cette famille de gènes a été montrée comme impliquée dans les stress abiotiques, la croissance et le développement. Elles sont des régulateurs des influx de Ca<sup>2+</sup> et de la production de ROS. Ainsi, CRK2 phosphoryle le C-terminal de RBOHD lors d'une application de flg22, régulant ainsi sa fonction (Kimura et al., 2020). Cependant, CRK29 ne semble pas être l'isoforme la mieux caractérisée. Par conséquent, il serait intéressant de mesurer les ROS induit par le signal osmotique dans un mutant perte de fonction.

Quant à PP2C PIA1 dont l'interaction avec GEF14 diminue sous signal osmotique (Figure 23), elle semble être une phosphatase d'intérêt. En effet, cette phosphatase appartient au clade F des PP2C. Elle est un régulateur négatif de la signalisation ABA et son expression est activée par l'ABA (Huang et al., 2023). En condition de stress hydrique, PIA1 agit sur la signalisation ABA de manière négative impactant la survie de plante qui la surexprime (Huang et al., 2023). PIA1 est donc lié à la signalisation osmotique et à l'ABA. Au même titre que CPK3 et CRK29, il serait intéressant d'étudier son rôle dans notre modèle de signalisation, bien qu'il est difficile

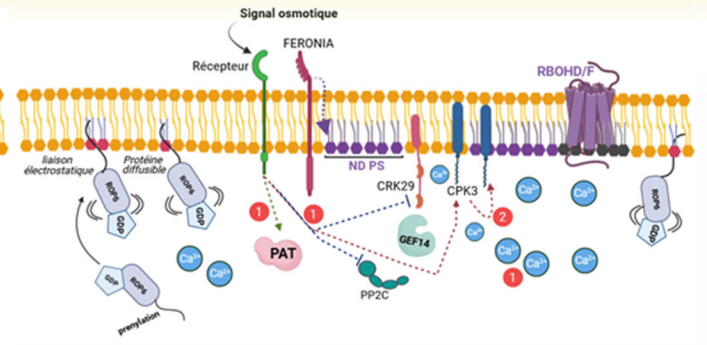
d'imaginer à l'heure actuelle si elle sera un régulateur positif ou négatif dans cette signalisation.

Ainsi, à la suite de cette approche de protéomique, nous avons identifié des sites de phosphorylation et des candidats d'intérêt ouvrant de nouvelles pistes afin de mieux comprendre la signalisation osmotique chez les plantes.

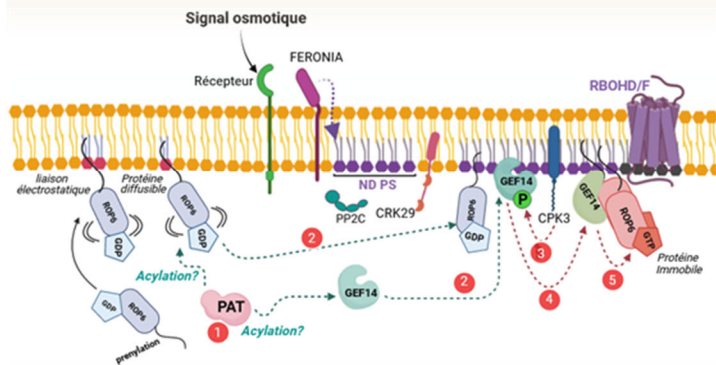
## Condition contrôle



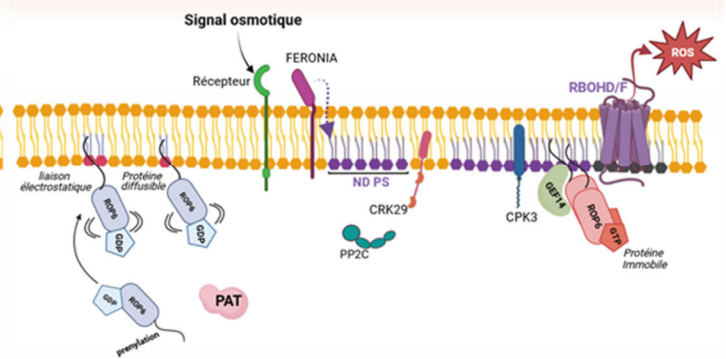
## Perception du signal osmotique



## Activation et clusterisation



## Induction de la réponse



**Figure 23 : Modèle hypothétique de l'accumulation de ROS lors d'un signal osmotique.**

En condition contrôle les protéines sont diffuses dans la membrane. Les flèches en pointillés représentent des liens hypothétiques. CRK29 et PP2C interagiraient avec GEF14. FERNIA contrôle la localisation des PS dans la membrane formant des domaines préexistants. Lors de la perception d'un signal osmotique (zone jaune) un récepteur non identifié interagirait avec la kinase CPK3 et régulerait négativement PP2C et CRK29 entraînant la perte d'interaction avec GEF14 (1). Une PAT serait induite suite à la perception du signal (1), lors de la signalisation une vague calcique est induite (1). Suite à la perception une PAT acylerait GEF14 et ROP6 (1) afin d'assurer leur localisation dans les nanodomains (2). La chronologie des évènements noté 1 reste encore floue. Puis CPK3 phosphorylerait GEF14 entraînant son activation (3 et 4), qui elle-même activerait ROP6 (5). Les mécanismes d'acylation et d'activation pourrait se produire en synergie et serait nécessaire à la clusterisation et l'induction de la réponse (zone orange). CPK3, GEF14 active et ROP6 active colocaliseraient avec RBOHD dans les nanodomains de PS où ROP6 et RBOHD interagiraient afin d'induire la réponse via l'accumulation des ROS (zone rouge) (Biorender).

### *Extension du modèle activateur spécifique*

Rappelons qu'en plus de la signalisation osmotique, ROP6 est impliquée dans diverses signalisations comme ABA, flg22 et auxine. Il est intéressant de noter que les études d'interaction entre GEF et ROP montrent qu'une ROP peut interagir avec de multiples GEFs. Ce phénomène est sûrement dû à la conservation très forte du domaine PRONE entre les différentes GEF. Néanmoins, les GEF pourraient donc remplir des rôles très spécifiques car elle pourrait être activée de manière spécifique en fonction du signal en amont, et ce à travers les modifications post traductionnelles de leurs domaines régulateurs C et N-terminal. Afin de tester cette hypothèse, j'ai cherché à savoir si le modèle d'un unique activateur de ROP6 dans la signalisation osmotique peut s'étendre aux autres signaux ROP6 dépendants. Effectivement, ce modèle permet de comprendre comment la spécificité de la signalisation peut-être conservée. Ce modèle est déjà partiellement soutenu par nos connaissances de la signalisation auxine. SPIKE1 a été rapporté en amont de ROP6 et comme contrôlant la distribution de PIN2 lors de la réponse gravitropique (Lin et al., 2012). Ainsi, et bien que non testé, SPIKE1 pourrait être la GEF spécifique du signal auxinique. J'ai identifié, en utilisant l'accumulation de ROS sous signal flg22, GEF4. Elle semble être l'unique GEF impliquée dans la signalisation flg22 parmi les mutants *gef 2-1*, *gef3-1*, *gef4-2*, *gef10*, *gef11* et *gef14*. De manière intéressante nous avons mis en évidence que RBOHD/F serait responsable de l'accumulation de ROS dans la racine pour la signalisation flg22. Cependant afin d'affiner ces données il faudrait tester les simples mutants *rbohd* et *rboh*. Bien que cette signalisation reste énigmatique et bien moins décrite que dans les feuilles. Il serait intéressant de confirmer ces données via d'autre lecture phénotypique. Nous avons initié des croisements dans les mutants *rop6.2* et *gef4-1* avec des marqueurs transcriptionnels de flg22 pPER5 :NLS3xVenus et pFRK1 :NLS3xVenus. De plus, j'ai initié des lignées de GEF4 complétée et des lignées pour étudier l'impact de GEF4 sur ROP6 d'un point de vue activation et clustering (*gef4-2xGFP-ROP6* ; *gef4-2xGFP-ROP6CA* ; *gef4-2xEOS-ROP6*). Il a été déjà rapporté que GEF4 peut être adressée à la membrane et formée des domaines polaires dans les racines (Feiguelman et al., 2018). Sachant que RBOHD/RBOHF sont impliquées, il serait intéressant d'étudier l'impact de GEF4 sur le complexe ROP6 RBOHD/F lors du signal flg22. Ensuite, il serait très intéressant de créer des GEF chimériques entre GEF14 et GEF4 afin de comprendre quel domaine de la GEF serait responsable de la spécificité de la réponse. De plus, la signalisation de flg22 a été largement caractérisée dans les feuilles il serait d'autant plus intéressant de comprendre si FLS2 serait impliqué dans la racine.

### *Vers un rôle spécifique des trichoblastes dans la signalisation osmotique ?*

Nos résultats montrent que GEF14 est localisée dans les trichoblastes de la racine. Ainsi, il serait imaginable que la signalisation que nous décrivons ne se passe que dans ce type cellulaire. Pour tester cette hypothèse, j'ai généré des constructions pour compléter le mutant *rop6.2* en exprimant ROP6 soit dans les trichoblastes en utilisant le promoteur de GEF14, soit dans les atrichoblastes en utilisant le promoteur GLABRA2 (GL2). Une fois les lignées générées, elles permettront l'étude de l'accumulation de ROS lors de la signalisation osmotique. Si notre hypothèse est validée, il serait intéressant de comprendre les conséquences de cette signalisation type cellulaire spécifique. Comme explicité (chapitre 1 partie 3), des données de la littérature suggèrent que les trichoblastes sont importants dans la signalisation nutritive, auxinique, ainsi que gravitropique. Par ailleurs, il est possible que la réponse de clusterisation de ROP6 dans les atrichoblastes soit médiée par les cellules trichoblastiques. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des constructions pour activer la signalisation ROP6 de manière type-cellulaire spécifiques (pGEF14 :scarlet-ROP6CA et pGL2 :scarlet-ROP6CA). Ces constructions seront transformées dans une lignée p35s:GFP- ROP6. Il sera alors possible de tester si le clustering de ROP6 peut être activé d'un type cellulaire à l'autre. De plus, il sera possible d'utiliser la sonde Hyper7 pour valider la production de ROS dans un type cellulaire spécifique. Enfin, il sera possible de transformer un mutant *rop6* pour voir si l'activation constitutive de ROP6 dans un type cellulaire agit sur la morphologie de la racine. Effectivement, il est probable que la communication entre les trichoblastes et les atrichoblastes soit importante pour coordonner leurs croissances respectives.

Un effet différentiel de croissance entre les deux types de cellules pourrait avoir des incidences au niveau de la morphologie de l'organe. Effectivement, la production de ROS effectuée par le pathway ROP6/RBOH semble avoir un effet négatif sur la croissance (Smokvarsaka et al., 2020). Si cet effet n'a lieu que dans les trichoblastes, il pourrait induire alors une torsion de la racine. De manière intéressante, la torsion de la racine a été décrite dans les réponses de compaction des sols induits souvent par le stress hydrique, mais aussi de tropisme, ce qui pourrait être en lien avec la signalisation osmotique (Silverberg et al., 2012; Potocka and Szymanowska-Pułka, 2018).

Ainsi, ces études permettraient de replacer la signalisation GEF14/ROP6/RBOH dans un contexte tissulaire voir développemental, et nous permettraient de comprendre comme elle régule la réponse des plantes à la suite d'un signal osmotique.

## 5) Matériel et Méthodes

Cette section présente le matériel et les méthodes correspondant aux expériences n'étant pas incluses dans Gorgues et al., In prep

### *Matériel végétal*

Les lignées suivantes *gef2-1*, *gef3-1*, *gef4-2*, *gef10-1*, *gef11-1*, *gef14-2*, *gef14-3*, *gef1-4-10*, *gef1-4-10-14*, p35s :GFP-ROP6, p35s : RFP-ROP6, *rbohdf*, *gef14-3xp35S* :GFP-RBOHD ont été générées lors de travaux précédents ( Torres et al., 2001, Li et al., 2016; Denninger et al., 2019; Platre et al., 2019; Smokvarska et al., 2020) (tableau 3). J'ai généré par floral depping des lignées 2 couleurs pour étudier la colocalisation p35S : GFP-RBOHDxp35S : RFP-ROP6, p35S : GFP-ROP6xp35S : RFP-ROP6, ainsi que *gef14-3xp35S* : GFP-RBOHDxp35S : RFP-ROP6

### *Conditions de culture in vitro*

Les graines sont stérilisées durant 10 minutes à l'aide d'une solution contenant 3.4 g/L de BayroChlore et 0.02% (v/v) TWEEN 20, puis rincées 3 fois avec de l'eau stérile avant d'être déposées sur le milieu de culture. Les graines ont ensuite été stratifiées à 4°C pendant 2 jours à l'obscurité afin de lever la dormance en étant exposées à une.

Les plantes ont été cultivées verticalement sur des boites de pétrie carrée (12cmx12cm) contenant du milieu Murashige et Skoog (MS)/2 gélosé (0, 8% Agar type E), 1% (p/v) saccharose, tamponné avec 2,5mM MES-KOH pH6 (ajusté avec KOH 1N)

Les plantes ont été cultivées dans un cycle de jours longs (16 h de lumière/8 h d'obscurité) à 22°C avec 70% d'humidité relative et une intensité lumineuse de 200  $\mu\text{mol}^{-\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}}$ . Les expériences ont été réalisées sur des plantules de 5 à 7 jours pour les approches d'imagerie ou de biochimie respectivement.



### *Clonage des gènes et transformation des plantes*

Les séquences GEF14 et GEF14 PRONE (des acides aminés 127 à 500) ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADNc de la plantule et clonées dans le vecteur pENTR/DTOPO. Les vecteurs pB7WGF2 et pB7WGR2 ont été utilisés comme vecteurs de destination pour la fusion de la GFP et de la RFP, respectivement (tableau 4).

Les lignées transgéniques stables d'Arabidopsis ont été obtenues *via* la technique de 'floral dipping' grâce à la souche GV3101 *Agrobacterium tumefaciens* (Clough and Bent, 1998).

### *Application d'un stress Osmotique ou du peptide bactérien flg22 pour les approches d'imagerie et de biochimie*

La détermination de la densité de nanodomains de ROP6 a été réalisée par imagerie TIRF sur des plantules de 5 jours cultivées dans les conditions décrites ci-dessus. L'application des différents stimuli (stress osmotique ou traitement Flg22) a été réalisée par incubation dans un milieu de culture liquide MS/2 supplémenté avec 1% (p/v) de saccharose, 2,5mM MES-KOH et ajusté à pH6. Le traitement Flg22 a été réalisé à 1  $\mu$ M pendant 30 minutes. Le stress osmotique de -0.75MPa a été appliqué par l'ajout de 300 mM de Sorbitol dans le milieu de culture. Avant l'application du traitement, une incubation de 30 minutes a été réalisée dans le milieu liquide pour permettre la récupération après un éventuel stress mécanique dû à la manipulation.

Pour les approches biochimiques vouées à déterminer la phosphorylation de GEF14, des plantules de 7 jours de p35S :GFP-GEF14 ont été soumises à deux conditions : une condition contrôle et une condition de stress osmotique sévère (-0.75 MPa). Pour appliquer le stress osmotique, les plantules ont été immergées durant 30 minutes dans 50 ml de Sorbitol à 300mM directement dans les boites de pétrie carrée (12cmx12cm) ayant servies à la culture. Les plantules ont été extraites délicatement puis le milieu de culture liquide a été retiré rapidement à l'aide de papier absorbant. Les plantes ont ensuite été pesées et congelées dans l'azote liquide avant conservation à -80°C. Pour la condition contrôle, les plantes ont été extraites délicatement, pesées et congelées dans l'azote liquide avant conservation à -80°C. Six réplicas biologiques ont été réalisés par condition.

### *Détermination de la production de ROS à la suite d'un traitement Flg22*

La mesure des ROS à la suite d'un traitement flg22 est réalisée sur des plantules de 5 jours. Le traitement a été réalisé de la même façon que pour la détermination de la densité des nanodomains de ROP6 décrite ci-dessus, avec une durée d'incubation de 30 minutes. 5  $\mu$ M de la sonde ROS dehydroéthidium (DHE) ont été rajoutés dans 1 ml de milieu de culture liquide en présence ou absence (contrôle) de 1 $\mu$ M de flg22 pendant 30 min.

### *Microscopie TIRF*

Les expériences de TIRF pour mesurer la densité de clusters ont été décrites dans Gorgues et al., *in prep* Chapitre 1).

Pour les tests de colocalisation la microscopie TIRF a été réalisée sur un microscope inversé Nikon (Eclipse) équipé du système azimutal-TIRFiLas2 (Roper Scientific) possédant un objectif à immersion huile 100x/1,49. Cent images sont acquises avec un temps d'exposition de 100 ms en utilisant une double bande QUAD en utilisant le laser 488nm avec des filtres d'émission 425/20 et un laser 561nm avec 600/25. Les films obtenus ont été compilés en Z selon l'intensité moyenne. Une segmentation d'image a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel ilastik (basé sur de l'apprentissage automatique) (Berg et al., 2019) afin de détecter les clusters sur les différents canaux.

La colocalisation a été évaluée par la mesure des coordonnées des centroïdes des nanodomains obtenus à l'aide du logiciel ImageJ. Un seuillage a été établie pour considérer la distance maximale de colocalisation de 300nm.

### *Co-Immunoprécipitation et spectrométrie de masse*

La préparation des échantillons pour ces approches a été réalisée à partir d'1 à 1,5g de matière fraîche. Les échantillons ont été broyés dans de l'azote liquide, puis les autres étapes ont été réalisées dans la glace. Les tissus broyés ont été re-suspendus dans un tampon de solubilisation, 1/3 poids volume. Le tampon de solubilisation avait la composition suivante : 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5% NP40, 0,5mM sodium deoxicolate, cocktail phosphatase 2 et 3 (dilué au 10), inhibiteur de protéases tablette Roch, 50mM  $\beta$ -Glycerophosphate. Les broyats ont ensuite été centrifugés à 3800 g pendant 10 min à 4°C.

Le surnageant a été prélevé et une nouvelle centrifugation réalisée à 3800 g pendant 5 min à 4°C. La solubilisation des protéines membranaires a été réalisée à partir de ce nouveau surnageant en agitant les échantillons sur roue à 4°C durant 1h. Une fois la solubilisation effectuée une ultracentrifugation a été réalisée à 100 000 g pendant 1h à 4°C. Le surnageant contenant les protéines solubilisées a été prélevé. 50µl de celui-ci ont été conservés afin de réaliser les inputs servant de contrôle lors du western blot. Référence des réactifs détaillée en tableau 3.

#### *Immunopurification (IP)*

L'immunopurification a été réalisée avec le kit µMACS™. Pour chaque IP obtenue, 50 µL de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-GFP (µMACS™ Anti-GFP) ont été ajoutés aux protéines solubilisées, puis placés sous agitation sur roue à 4°C pendant 1 h. Les colonnes (µ Columns) sont équilibrées avec le tampon de solubilisation, puis le mélange billes/protéines est placé à percoler sur les colonnes installées sur un aimant. Les billes sont ensuite rincées 4 fois avec 500 µL de tampon de solubilisation. L'élution a été réalisée avec 50µl de tampon d'élution (µMACS™) préalablement chauffé à 95°C. Les IP ont par la suite été conservées à -80°C avant leur utilisation.

La suite des expérimentations a été réalisée par la plateforme MSPP, ci-dessus le matériel et méthode fournis par la plateforme.

#### *Préparations des échantillons pour la spectrométrie de masse réalisée par la plateforme MSPP*

Les fractions IP ont été chauffées à 65°C durant 10 minutes puis chargées dans un gel d'acrylamide 10%. Des bandes de gel contenant les protéines ont été coupées manuellement et transférées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Les bandes ont d'abord été lavées avec 500 µl d'eau, puis avec 500 µl de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM. Le désencollage a été effectué deux fois en présence de 500 µl d'acétonitrile (ACN) à 50 % dans 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Les bandes de gel ont ensuite été déshydratées deux fois par 500 µl d'acétonitrile à 100%, et finalement séchées à température ambiante. Après le désencollage une réduction des ponts disulfures a été réalisée avec 300 µl de 10 mM DTT à 56°C pendant 45 min, puis le surnageant a été éliminé.

Les cystéines ont été alkylées avec 300 µl de 55 mM iodoacétamide pendant 30 min au vortex dans l'obscurité. Les bandes de gel ont été lavées deux fois avec 500 µl d'ACN 50 % dans 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, puis déshydratées avec 500 µl d'ACN 100 %, et enfin séchées à température ambiante. Quarante-cinq microlitres d'une solution de trypsine (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Madison, USA), à une concentration de 0,0125 µg/µl dans 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, ont été ajoutés à chaque région du gel et ont été maintenus pendant 10 minutes sur la glace. 150 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM ont été ajoutés et les échantillons ont été conservés encore 10 minutes à température ambiante. Une digestion des protéines a été réalisée pendant une nuit à 37°C puis les peptides ont été extraits par addition de 200 µl d'acide formique (FA) 2 %. Les digestions ont d'abord été vortexées pendant 10 minutes et les surnageants ont été transférés dans un insert en verre de 500µl. Les bandes de gel ont été extraites par l'addition de 100µL de 80 % ACN et FA 2 %, puis par l'addition de 100µL de 100 % ACN et FA 2 %. Après évaporation du solvant dans une centrifugeuse sous vide, les peptides ont été remis en suspension dans 10 µl de 2% FA puis purifiés avec une micropointe C18 (Zip-Tip-U C18 Millipore Corporation Billerica MA, USA). Les peptides ont finalement été élués avec une solution contenant 2% FA (v/v) et 80% ACN (v/v) et séchés dans une centrifugeuse sous vide jusqu'à évaporation totale. Les peptides ont été remis en suspension dans 8 µl de 2% FA avant l'analyse LC-MS/MS.

#### *Analyse par spectrométrie de masse avec l'Exploris 240 de ThermoFisher Scientific*

Les expériences LC-MS/MS ont été réalisées à l'aide du système nano Ultimate 3000 RSLC (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) interfacé en ligne avec une source d'ions nano easy et un spectromètre de masse Exploris 240 Orbitrap (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Les échantillons ont été analysés en acquisition dépendante des données (DDA). 6,5 µl de la solution finale contenant les peptides ont d'abord été chargés sur une pré-colonne (Thermo Scientific PepMap 100 C18, particules de 5 µm, pores de 100 Å, diamètre intérieur de 300 µm x longueur de 5 mm) de l'échantillonneur automatique Ultimate 3000 avec 0,05 % de TFA dans de l'eau à un débit de 10 µl/min.

Les peptides ont été séparés par une colonne en phase inverse (Thermo Scientific PepMap C18, taille des particules de 2 µm, taille des pores de 100 Å, diamètre intérieur de 75 µm, longueur de 50 cm) / à un débit de 300 nl/min.

Après une période de chargement de 3 minutes, la vanne de la colonne a été commutée pour permettre l'élution des peptides de la pré-colonne sur la colonne analytique. Le tampon de chargement (solvant A) était composé de 0,1 % de FA dans l'eau et le tampon d'élution (solvant B) était composé de 0,1 % de FA dans 80 % d'acétonitrile. Le gradient linéaire utilisé était de 2-25% de solvant B en 103 min, puis de 25-40% de solvant B de 103 à 123 min, enfin de 40-90% de solvant B de 123 à 125 min. Le temps d'exécution total était de 150 minutes, y compris une étape de lavage organique élevé et une étape de rééquilibrage.

Les peptides ont été transférés dans la phase gazeuse avec une ionisation par électrospray d'ions positifs à 1,9 kV.

En DDA, les 15 premiers précurseurs ont été acquis entre 350 et 1200 m/z avec une fenêtre de sélection de 2 Th (Thomson), une exclusion dynamique de 20 s, une énergie de collision normalisée (NCE) de 30 et des résolutions de 120 000 pour MS et 15 000 pour MS2.

Les spectres ont été enregistrés avec le logiciel Xcalibur (4.5) (Thermo Fisher Scientific).

### *Identification des peptides*

Les données de spectrométrie de masse ont été traitées à l'aide du logiciel Proteome Discoverer (version 1.4.0.288, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Allemagne) et le moteur de recherche utilisé localement était Mascot (version 2.4, Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). Les données de spectrométrie de masse ont été recherchées dans la base de données Araport12 ajoutée à la séquence GEF14 (48233 séquences). Les paramètres suivants ont été utilisés : la trypsine comme enzyme, deux coupures manquées autorisées, la carbamidométhylation de la cystéine comme modification fixe, et comme modifications variables : l'acétylation N-terminale de la cystéine : acétylation N-terminale de la protéine, désamidation de l'asparagine et de la glutamine, oxydation de la méthionine, et phosphorylation de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine. La tolérance de masse a été fixée à 10 ppm pour les balayages complets et à 0,02 Da pour les ions de fragments. Les protéines ont été validées lorsqu'elles contenaient au moins deux peptides avec une valeur p <0,05 et un taux de fausse découverte <1%. Pour l'analyse des phosphopeptides, la validation est effectuée sur la valeur p <0,05.

### *Identification et quantification*

Les fichiers .raw ont été analysés avec MaxQuant version 2.0.3.0 en utilisant les paramètres par défaut. La longueur minimale des peptides a été fixée à 6. Le critère "Trypsine/P" (qui signifie que les peptides de l'extrémité C-terminale de "K/R" ne sont pas suivis de "P" : "K/R" suivi de "P" ne peut pas être un site de clivage) a été choisi comme enzyme de digestion. La carbamidométhylation de la cystéine a été choisie comme modification fixe et comme modification variable : acétylation N-terminale de la protéine ; désamidation de l'asparagine et de la glutamine ; oxydation de la méthionine ; et phosphorylations de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine. Jusqu'à deux clivages manqués ont été autorisés. La tolérance de masse pour le précurseur était de 20 et 4,5 ppm pour la première et la principale recherche respectivement, et de 20 ppm pour les ions fragments.

Les fichiers obtenus ont été comparés à la base de données Araport 11 et à la base de données de contaminants Maxquant. Les protéines identifiées ont été filtrées selon les critères suivants :

Au moins un peptide de trypsine différent avec au moins un peptide unique, une valeur E inférieure à 0,01 et une valeur E de protéine inférieure à 0,01 étaient nécessaires. En utilisant les critères ci-dessus, le taux de fausses séquences peptidiques et de fausses identifications de protéines était inférieur à 1 %. Les protéines ont été quantifiées par une méthode sans marquage avec le logiciel MaxQuant en utilisant les intensités des peptides uniques et des peptides rasoirs (Cox et al., 2014). Les analyses statistiques test Welch ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio.

Ressources réactifs	sources	Identifier
gef2-1	(Denninger et al., 2019)	SALK 130229
gef3-1	(Denninger et al., 2019)	SALK 079879C
gef4-2	(Denninger et al., 2019) {Chen et al., 2016}	SALK 107520
gef10-1	(Denninger et al., 2019) (Chen et al., 2016)	SALK 009456
gef11-1	(Denninger et al., 2019) {Chang et al., 2013}	SALK 126725C
gef14-2	(Denninger et al., 2019)	SALK 046067
gef14-3	{Li et al., 2016}	CS820474
gef1-4-10	(Li et al., 2016)	CS69175
gef1-4-10-14	(Li et al., 2016)	CS69176
rbohdxrboh		
p35S: GFP-ROP6	(Smokvarska et al., 2020)	na
p35S: RFP-ROP6	(Smokvarska et al., 2020)	na
p35S: GFP-RBOHD	(Smokvarska et al., 2020)	na
p35S: GFP-ROP6: p35S: RFP-ROP6	cette étude	na
p35S: GFP-ROP6: p35S: GFP-RBOHD	cette étude	
gef14-3xp35S: GFP-RBOHD :p35S: RFP-ROP6	cette étude	
DHE	Sigma Aldrich	0700810mg
D-Sorbitol	Sigma Aldrich	S18761kg
flg22	Proteogenix	18-3294
Murashige and Skoog	Sigma Aldrich	M55191L
Sucrase	Sigma Aldrich	S53901kg
MES	Euromedex	EU0033
NaCl	Sigma Aldrich	57653-1kg
KOH	Sigma Aldrich	P59581kg
Na deoxycholate	Fluka biochemica	3097025 g
NP40	Sigma Aldrich	18896-100ML
Tris	Sigma Aldrich	252859-500 g
EDTA	Sigma Aldrich	60-00-4
-Glycerophosphate	Sigma Aldrich	154804-51-0
Cocktail phosphatase 2	Sigma Aldrich	P5726-5ML
Cocktail phosphatase 3	Sigma Aldrich	200-664-3
μMACS™ Anti-GFP Starting Kit	μMACS™ Anti-GFP Starting Kit	130-091-288
Protéase inhibiteur	Sigma Aldrich	11-836170001
Fiji-1mageJ	<a href="https://fiji.sc">https://fiji.sc</a>	N/A
Ilastik	<a href="https://www.ilastik.org/">https://www.ilastik.org/</a>	N/A
MetaMorph	Nikon	N/A

**Tableau 3 : Ressources et réactifs utilisés**

	Promoteur	N-terminal Tag	ORF/CDS	C-terminal Tag	Plante selection	Bacterial selection marker	Binary vector
p35S:GFP-RBOHD	35S-Promoter	GFP with linker	RBOHD / CDS	/	Basta	Spect	pB7WGF2
p35S:RFP-ROP6	35S-Promoter	RFP with linker	ROP6 / CDS	/	Basta	Spect	pB7WGR2
<b>Amorces</b>	Sequence						
F-RBOHD	cttgcgccgccccctcaaatgagacgagg						
R-RBOHD	gcaaggcgcgccacccttctagaagttctcttgtgg						
R-ROP6	agcggccgcccagtgctcaaggtttatc						
F-ROP6	tggcgcgccctcagagtatagaacaacc						

#### Tableau 4 : Ressources Clonage

Tableau récapitulatif des différents vecteurs utilisés pour la génération de lignée par transformation via la technique de trempage floral (source Smokvarska et al., 2020).



## 6) Références

- Abankwa D, Gorfe AA, Hancock JF** (2007) Ras nanoclusters: Molecular structure and assembly. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 599–607
- Abankwa D, Gorfe AA, Inder K, Hancock JF** (2010) Ras membrane orientation and nanodomain localization generate isoform diversity. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 1130–1135
- Akamatsu A, Wong HL, Fujiwara M, Okuda J, Nishide K, Uno K, Imai K, Umemura K, Kawasaki T, Kawano Y, et al** (2013) An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 Module Is an Essential Early Component of Chitin-Induced Rice Immunity. *Cell Host Microbe* **13**: 465–476
- Azeloglu EU, Iyengar R** (2015) Signaling Networks: Information Flow, Computation, and Decision Making. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**: a005934
- Bagatolli LA, Gratton E** (2000) Two Photon Fluorescence Microscopy of Coexisting Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles of Binary Phospholipid Mixtures. *Biophys J* **78**: 290–305
- Bahammou D, Recorbet G, Cassim AM, Robert F, Balliau T, Delft PV, Haddad Y, Mounier A, Mongrand S, Fouillen L, et al** (2023) Revealing the lipidome and proteome of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane. 2023.05.14.540643
- Baster P, Robert S, Kleine-Vehn J, Vanneste S, Kania U, Grunewald W, De Rybel B, Beeckman T, Friml J** (2013) SCFTIR1/AFB-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. *EMBO J* **32**: 260–274
- Basu D, Le J, Zakharova T, Mallery EL, Szymanski DB** (2008) A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4044–4049
- Bayle V, Fiche J-B, Burny C, Platre MP, Nollmann M, Martinière A, Jaillais Y** (2021) Single-particle tracking photoactivated localization microscopy of membrane proteins in living plant tissues. *Nat Protoc* **16**: 1600–1628
- Berg S, Kutra D, Kroeger T, Straehle CN, Kausler BX, Haubold C, Schiegg M, Ales J, Beier T, Rudy M, et al** (2019) ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nat Methods* **16**: 1226–1232
- Berger F, Hung C-Y, Dolan L, Schiefelbein J** (1998) Control of Cell Division in the Root Epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* **194**: 235–245
- Berken A, Thomas C, Wittinghofer A** (2005) A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature* **436**: 1176–1180
- Berken A, Wittinghofer A** (2008) Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Biochem* **46**: 380–393

- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, Lee H, Shan L, He P, Bush J, Cheng S-H, Sheen J** (2010) Differential innate immune signalling via Ca<sup>2+</sup> sensor protein kinases. *Nature* **464**: 418–422
- Bourdais G, Burdiak P, Gauthier A, Nitsch L, Salojärvi J, Rayapuram C, Idänheimo N, Hunter K, Kimura S, Merilo E, et al** (2015) Large-Scale Phenomics Identifies Primary and Fine-Tuning Roles for CRKs in Responses Related to Oxidative Stress. *PLOS Genet* **11**: e1005373
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F** (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117–127
- Boutté Y, Grebe M** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 705–713
- Bücherl CA, Jarsch IK, Schudoma C, Segonzac C, Mbengue M, Robatzek S, MacLean D, Ott T, Zipfel C** (2017) Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *eLife* **6**: e25114
- Buré C, Cacas J-L, Mongrand S, Schmitter J-M** (2014) Characterization of glycosyl inositol phosphoryl ceramides from plants and fungi by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **406**: 995–1010
- Cacas J-L, Buré C, Furt F, Maalouf J-P, Badoc A, Cluzet S, Schmitter J-M, Antajan E, Mongrand S** (2013) Biochemical survey of the polar head of plant glycosylinositolphosphoceramides unravels broad diversity. *Phytochemistry* **96**: 191–200
- Cacas J-L, Buré C, Grosjean K, Gerbeau-Pissot P, Lherminier J, Rombouts Y, Maes E, Bossard C, Gronnier J, Furt F, et al** (2016) Revisiting Plant Plasma Membrane Lipids in Tobacco: A Focus on Sphingolipids. *Plant Physiol* **170**: 367–384
- Cacas J-L, Furt F, Le Guédard M, Schmitter J-M, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule J-J, Simon-Plas F, Mongrand S** (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res* **51**: 272–299
- Chang F, Gu Y, Ma H, Yang Z** (2013) AtPRK2 Promotes ROP1 Activation via RopGEFs in the Control of Polarized Pollen Tube Growth. *Mol Plant* **6**: 1187–1201
- Chen J, Yu F, Liu Y, Du C, Li X, Zhu S, Wang X, Lan W, Rodriguez PL, Liu X, et al** (2016) FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E5519–E5527

- Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS** (2002) Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **277**: 12463–12473
- Chinchilla D, Shan L, He P, De Vries S, Kemmerling B** (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* **14**: 535–541
- Clarke PR, Zhang C** (2008) Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 464–477
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* -mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M** (2014) Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ \*. *Mol Cell Proteomics* **13**: 2513–2526
- Cui Y, Li X, Yu M, Li R, Fan L, Zhu Y, Lin J** (2018) Sterols regulate endocytic pathways during flg22-induced defense responses in *Arabidopsis*. *Development* **145**: dev165688
- Daleke DL** (2007) Phospholipid Flippases \*. *J Biol Chem* **282**: 821–825
- Denninger P, Reichelt A, Schmidt VAF, Mehlhorn DG, Asseck LY, Stanley CE, Keinath NF, Evers J-F, Grefen C, Grossmann G** (2019) Distinct RopGEFs Successively Drive Polarization and Outgrowth of Root Hairs. *Curr Biol CB* **29**: 1854-1865.e5
- Denyer T, Ma X, Klesen S, Scacchi E, Nieselt K, Timmermans MCP** (2019) Spatiotemporal Developmental Trajectories in the *Arabidopsis* Root Revealed Using High-Throughput Single-Cell RNA Sequencing. *Dev Cell* **48**: 840-852.e5
- Dolan L, Duckett CM, Grierson C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poethig S, Roberts K** (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465–2474
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84
- Drerup MM, Schlücking K, Hashimoto K, Manishankar P, Steinhorst L, Kuchitsu K, Kudla J** (2013) The Calcineurin B-Like Calcium Sensors CBL1 and CBL9 Together with Their Interacting Protein Kinase CIPK26 Regulate the *Arabidopsis* NADPH Oxidase RBOHF. *Mol Plant* **6**: 559–569

- Duan Q, Kita D, Li C, Cheung AY, Wu H-M** (2010) FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 17821–17826
- Dubiella U, Seybold H, Durian G, Komander E, Lassig R, Witte C-P, Schulze WX, Romeis T** (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 8744–8749
- Eliáš M, Klimeš V** (2012) Rho GTPases: Deciphering the Evolutionary History of a Complex Protein Family. *In* F Rivero, ed, *Rho GTPases Methods Protoc*. Springer, New York, NY, pp 13–34
- Elliott L, Kirchhelle C** (2020) The importance of being edgy: cell geometric edges as an emerging polar domain in plant cells. *J Microsc* **278**: 123–131
- Engelhardt S, Trutzenberg A, Hückelhoven R** (2020) Regulation and Functions of ROP GTPases in Plant–Microbe Interactions. *Cells* **9**: 2016
- Feiguelman G, Fu Y, Yalovsky S** (2018) ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. *Plant Physiol* **176**: 57–79
- Feraru E, Feraru MI, Kleine-Vehn J, Martinière A, Mouille G, Vanneste S, Vernhettes S, Runions J, Friml J** (2011) PIN Polarity Maintenance by the Cell Wall in Arabidopsis. *Curr Biol* **21**: 338–343
- Ferrer A, Altabella T, Arró M, Boronat A** (2017) Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Prog Lipid Res* **67**: 27–37
- Fu Y, Gu Y, Zheng Z, Wasteneys G, Yang Z** (2005) Arabidopsis Interdigitating Cell Growth Requires Two Antagonistic Pathways with Opposing Action on Cell Morphogenesis. *Cell* **120**: 687–700
- Fu Y, Xu T, Zhu L, Wen M, Yang Z** (2009) A ROP GTPase Signaling Pathway Controls Cortical Microtubule Ordering and Cell Expansion in Arabidopsis. *Curr Biol* **19**: 1827–1832
- Fuchs VAF, Denninger P, Župunski M, Jaillais Y, Engel U, Grossmann G** (2021) Nanodomain-mediated lateral sorting drives polarization of the small GTPase ROP2 in the plasma membrane of root hair cells. 2021.09.10.459822
- Furt F, Simon-Plas F, Mongrand S** (2011) Lipids of the Plant Plasma Membrane. *In* AS Murphy, B Schulz, W Peer, eds, *Plant Plasma Membr*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 3–30

- Galway ME, Masucci JD, Lloyd AM, Walbot V, Davis RW, Schiefelbein JW** (1994) The TTG Gene Is Required to Specify Epidermal Cell Fate and Cell Patterning in the Arabidopsis Root. *Dev Biol* **166**: 740–754
- Garcia-Molina A, Marino G, Lehmann M, Leister D** (2020) Systems biology of responses to simultaneous copper and iron deficiency in Arabidopsis. *Plant J* **103**: 2119–2138
- Gendre D, Baral A, Dang X, Esnay N, Boutté Y, Stanislas T, Vain T, Claverol S, Gustavsson A, Lin D, et al** (2019) Rho-of-plant-activated root hair formation requires *Arabidopsis YIP4a/b* gene function. *Development* dev.168559
- Gillingham AK, Munro S** (2007) The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 579–611
- Gorelova V, Sprakel J, Weijers D** (2021) Plant cell polarity as the nexus of tissue mechanics and morphogenesis. *Nat Plants* **7**: 1548–1559
- Gronnier J, Franck CM, Stegmann M, DeFalco TA, Abarca A, von Arx M, Dünser K, Lin W, Yang Z, Kleine-Vehn J, et al** (2022) Regulation of immune receptor kinase plasma membrane nanoscale organization by a plant peptide hormone and its receptors. *eLife* **11**: e74162
- Gronnier J, Germain V, Gouguet P, Cacas J-L, Mongrand S** (2016) GIPC: Glycosyl Inositol Phospho Ceramides, the major sphingolipids on earth. *Plant Signal Behav* **11**: e1152438
- Grosjean K, Der C, Robert F, Thomas D, Mongrand S, Simon-Plas F, Gerbeau-Pissot P** (2018) Interactions between lipids and proteins are critical for organization of plasma membrane-ordered domains in tobacco BY-2 cells. *J Exp Bot* **69**: 3545–3557
- Gu Y, Li S, Lord EM, Yang Z** (2006) Members of a Novel Class of Arabidopsis Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Control Rho GTPase-Dependent Polar Growth. *Plant Cell* **18**: 366–381
- Guo J, Yang Z** (2020) Exocytosis and endocytosis: coordinating and fine-tuning the polar tip growth domain in pollen tubes. *J Exp Bot* **71**: 2428–2438
- Hancock JP, Paterson H, Marshallt J** A Polybasic Domain or Palmitoylation Is Required in Addition to the CAAX Motif to Localize ~21”s to the Plasma Membrane.
- Haruta M, Sabat G, Stecker K, Minkoff BB, Sussman MR** (2014) A Peptide Hormone and Its Receptor Protein Kinase Regulate Plant Cell Expansion. *Science* **343**: 408–411

- Hirano T, Konno H, Takeda S, Dolan L, Kato M, Aoyama T, Higaki T, Takigawa-Imamura H, Sato MH** (2018) PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> mediates root hair shank hardening in Arabidopsis. *Nat Plants* **4**: 888–897
- Huang G, Li E, Ge F, Li S, Wang Q, Zhang C, Zhang Y** (2013) Arabidopsis Rop GEF 4 and Rop GEF 10 are important for FERONIA -mediated developmental but not environmental regulation of root hair growth. *New Phytol* **200**: 1089–1101
- Huang Y, Yang R, Luo H, Yuan Y, Diao Z, Li J, Gong S, Yu G, Yao H, Zhang H, et al** (2023) Arabidopsis Protein Phosphatase PIA1 Impairs Plant Drought Tolerance by Serving as a Common Negative Regulator in ABA Signaling Pathway. *Plants* **12**: 2716
- Hurst CH, Turnbull D, Xhelilaj K, Myles S, Pflughaupt RL, Kopischke M, Davies P, Jones S, Robatzek S, Zipfel C, et al** (2023) S-acylation stabilizes ligand-induced receptor kinase complex formation during plant pattern-triggered immune signaling. *Curr Biol* **33**: 1588-1596.e6
- Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y** (2006) Lipid Asymmetry of the Eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. *Biol Pharm Bull* **29**: 1542–1546
- Jacobs S, Zechmann B, Molitor A, Trujillo M, Petutschnig E, Lipka V, Kogel K-H, Schäfer P** (2011) Broad-Spectrum Suppression of Innate Immunity Is Required for Colonization of Arabidopsis Roots by the Fungus *Piriformospora indica*. *Plant Physiol* **156**: 726–740
- Jaillais Y, Ott T** (2020) The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective<sup>1</sup> [OPEN]. *Plant Physiol* **182**: 1682–1696
- Jiang Z, Zhou X, Tao M, Yuan F, Liu L, Wu F, Wu X, Xiang Y, Niu Y, Liu F, et al** (2019) Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* **572**: 341–346
- Jolivet M-D, Deroubaix A-F, Boudsocq M, Abel NB, Rocher M, Robbe T, Wattelet-Boyer V, Huard J, Lefebvre D, Lu Y-J, et al** (2023) Interdependence of a kinase and its cognate substrate plasma membrane nanoscale dynamics underlies Arabidopsis response to viral infection. 2023.07.31.551174

- Jouhet J, Maréchal E, Block MA** (2007) Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog Lipid Res* **46**: 37–55
- Juranić M, Srilunchang K, Krohn NG, Leljak-Levanić D, Sprunck S, Dresselhaus T** (2012) Germline-Specific MATH-BTB Substrate Adaptor MAB1 Regulates Spindle Length and Nuclei Identity in Maize. *Plant Cell* **24**: 4974–4991
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, et al** (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell* **54**: 43–55
- Kalab P, Weis K, Heald R** (2002) Visualization of a Ran-GTP Gradient in Interphase and Mitotic Xenopus Egg Extracts. *Science* **295**: 2452–2456
- Kang E, Zheng M, Zhang Y, Yuan M, Yalovsky S, Zhu L, Fu Y** (2017) The Microtubule-Associated Protein MAP18 Affects ROP2 GTPase Activity during Root Hair Growth. *Plant Physiol* **174**: 202–222
- Kawano Y, Fujiwara T, Yao A, Housen Y, Hayashi K, Shimamoto K** (2014) Palmitoylation-dependent Membrane Localization of the Rice Resistance Protein Pit Is Critical for the Activation of the Small GTPase OsRac1 \*. *J Biol Chem* **289**: 19079–19088
- Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T, Shimamoto K** (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 230–235
- Ke D, Li X, Han Y, Cheng L, Yuan H, Wang L** (2016) ROP6 is involved in root hair deformation induced by Nod factors in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol Biochem* **108**: 488–498
- Kimura S, Hunter K, Vaahtera L, Tran HC, Citterico M, Vaattovaara A, Rokka A, Stolze SC, Harzen A, Meißner L, et al** (2020) CRK2 and C-terminal Phosphorylation of NADPH Oxidase RBOHD Regulate Reactive Oxygen Species Production in *Arabidopsis*[OPEN]. *Plant Cell* **32**: 1063–1080
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* **7**: 540
- Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, Yokota N, Fujiwara M, Shimamoto K, Doke N, Yoshioka H** (2007) Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase. *Plant Cell* **19**: 1065–1080
- Koller T, Bent AF** (2014) FLS2-BAK1 Extracellular Domain Interaction Sites Required for Defense Signaling Activation. *PLOS ONE* **9**: e111185

- Kosami K, Ohki I, Nagano M, Furuita K, Sugiki T, Kawano Y, Kawasaki T, Fujiwara T, Nakagawa A, Shimamoto K, et al** (2014) The Crystal Structure of the Plant Small GTPase OsRac1 Reveals Its Mode of Binding to NADPH Oxidase \*. *J Biol Chem* **289**: 28569–28578
- Kulich I, Vogler F, Bleckmann A, Cyprys P, Lindemeier M, Fuchs I, Krassini L, Schubert T, Steinbrenner J, Beynon J, et al** (2020) ARMADILLO REPEAT ONLY proteins confine Rho GTPase signalling to polar growth sites. *Nat Plants* **6**: 1275–1288
- Kusumi A, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS, Suzuki KGN** (2012) Dynamic Organizing Principles of the Plasma Membrane that Regulate Signal Transduction: Commemorating the Fortieth Anniversary of Singer and Nicolson's Fluid-Mosaic Model. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 215–250
- Kwasniewski M, Daszkowska-Golec A, Janiak A, Chwialkowska K, Nowakowska U, Sablok G, Szarejko I** (2016) Transcriptome analysis reveals the role of the root hairs as environmental sensors to maintain plant functions under water-deficiency conditions. *J Exp Bot* **67**: 1079–1094
- Lavy M, Yalovsky S** (2006) Association of Arabidopsis type-II ROPs with the plasma membrane requires a conserved C-terminal sequence motif and a proximal polybasic domain. *Plant J* **46**: 934–947
- Lemmon MA** (2008) Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 99–111
- Li G, Boudsocq M, Hem S, Vialaret J, Rossignol M, Maurel C, Santoni V** (2015) The calcium-dependent protein kinase CPK7 acts on root hydraulic conductivity. *Plant Cell Environ* **38**: 1312–1320
- Li H, Luo N, Wang W, Liu Z, Chen J, Zhao L, Tan L, Wang C, Qin Y, Li C, et al** (2018a) The REN4 rheostat dynamically coordinates the apical and lateral domains of Arabidopsis pollen tubes. *Nat Commun* **9**: 2573
- Li L, Li M, Yu L, Zhou Z, Liang X, Liu Z, Cai G, Gao L, Zhang X, Wang Y, et al** (2014) The FLS2-Associated Kinase BIK1 Directly Phosphorylates the NADPH Oxidase RbohD to Control Plant Immunity. *Cell Host Microbe* **15**: 329–338
- Li W, Song T, Wallrad L, Kudla J, Wang X, Zhang W** (2019) Tissue-specific accumulation of pH-sensing phosphatidic acid determines plant stress tolerance. *Nat Plants* **5**: 1012–1021
- Li X, Wang X, Yang Y, Li R, He Q, Fang X, Luu D-T, Maurel C, Lin J** (2011) Single-Molecule Analysis of PIP<sub>2</sub>;1 Dynamics and Partitioning Reveals Multiple Modes of Arabidopsis Plasma Membrane Aquaporin Regulation. *Plant Cell* **23**: 3780–3797



- Li Z, Liu D** (2012) ROPGEF1 and ROPGEF4 are functional regulators of ROP11 GTPase in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *FEBS Lett* **586**: 1253–1258
- Li Z, Takahashi Y, Scavo A, Brandt B, Nguyen D, Rieu P, Schroeder JI** (2018) Abscisic acid-induced degradation of Arabidopsis guanine nucleotide exchange factor requires calcium-dependent protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**: E4522–E4531
- Li Z, Waadt R, Schroeder JI** (2016) Release of GTP Exchange Factor Mediated Down-Regulation of Abscisic Acid Signal Transduction through ABA-Induced Rapid Degradation of RopGEFs. *PLOS Biol* **14**: e1002461
- Lin D, Nagawa S, Chen J, Cao L, Chen X, Xu T, Li H, Dhonukshe P, Morita C, Friml J, et al** (2012) A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in Arabidopsis roots. *Curr Biol CB* **22**: 1319–1325
- Lin F, Ding H, Wang J, Zhang H, Zhang A, Zhang Y, Tan M, Dong W, Jiang M** (2009) Positive feedback regulation of maize NADPH oxidase by mitogen-activated protein kinase cascade in abscisic acid signalling. *J Exp Bot* **60**: 3221–3238
- Lin W, Tang W, Pan X, Huang A, Gao X, Anderson CT, Yang Z** (2021) Arabidopsis pavement cell morphogenesis requires FERONIA binding to pectin for activation of ROP GTPase signaling. *Curr Biol*. doi: 10.1016/j.cub.2021.11.030
- Linster E, Stephan I, Bienvenut WV, Maple-Grødem J, Myklebust LM, Huber M, Reichelt M, Sticht C, Geir Møller S, Meinnel T, et al** (2015) Downregulation of N-terminal

- acetylation triggers ABA-mediated drought responses in Arabidopsis. *Nat Commun* **6**: 7640
- Löfke C, Scheuring D, Dünser K, Schöller M, Luschnig C, Kleine-Vehn J** (2015) Tricho- and atrichoblast cell files show distinct PIN2 auxin efflux carrier exploitations and are jointly required for defined auxin-dependent root organ growth. *J Exp Bot* **66**: 5103–5112
- Lorent JH, Levental KR, Ganesan L, Rivera-Longworth G, Sezgin E, Doktorova M, Lyman E, Levental I** (2020) Plasma membranes are asymmetric in lipid unsaturation, packing and protein shape. *Nat Chem Biol* **16**: 644–652
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP** (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **24**: 459–467
- Malivert A, Erguvan Ö, Chevallier A, Dehem A, Friaud R, Liu M, Martin M, Peyraud T, Hamant O, Verger S** (2021) FERONIA and microtubules independently contribute to mechanical integrity in the Arabidopsis shoot. *PLOS Biol* **19**: e3001454
- Malivert A, Hamant O** (2023) Why is FERONIA pleiotropic? *Nat Plants* **9**: 1018–1025
- Mamode Cassim A, Navon Y, Gao Y, Decossas M, Fouillen L, Grélard A, Nagano M, Lambert O, Bahammou D, Van Delft P, et al** (2021) Biophysical analysis of the plant-specific GIPC sphingolipids reveals multiple modes of membrane regulation. *J Biol Chem* **296**: 100602
- Marei H, Malliri A** (2017) GEFs: Dual regulation of Rac1 signaling. *Small GTPases* **8**: 90–99
- Marmagne A, Rouet M-A, Ferro M, Rolland N, Alcon C, Joyard J, Garin J, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G** (2004) Identification of New Intrinsic Proteins in Arabidopsis Plasma Membrane Proteome \*. *Mol Cell Proteomics* **3**: 675–691
- Martinière A, Fiche JB, Smokvarska M, Mari S, Alcon C, Dumont X, Hematy K, Jaillais Y, Nollmann M, Maurel C** (2019) Osmotic Stress Activates Two Reactive Oxygen Species Pathways with Distinct Effects on Protein Nanodomains and Diffusion. *Plant Physiol* **179**: 1581–1593
- Martinière A, Gayral P, Hawes C, Runions J** (2011) Building bridges: formin1 of Arabidopsis forms a connection between the cell wall and the actin cytoskeleton: AtFH1 links the cell wall and actin cytoskeleton. *Plant J* **66**: 354–365
- Martinière A, Lavagi I, Nageswaran G, Rolfe DJ, Maneta-Peyret L, Luu D-T, Botchway SW, Webb SED, Mongrand S, Maurel C, et al** (2012) Cell wall constrains lateral diffusion of plant plasma-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 12805–12810
- Martinière A, Zelazny E** (2021) Membrane nanodomains and transport functions in plant. *Plant Physiol* **187**: 1839–1855

- Masucci JD, Schiefelbein JW** (1994) The *rhd6* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiol* **106**: 1335–1346
- McKenna JF, Rolfe DJ, Webb SED, Tolmie AF, Botchway SW, Martin-Fernandez ML, Hawes C, Runions J** (2019) The cell wall regulates dynamics and size of plasma-membrane nanodomains in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci* **116**: 12857–12862
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 112–124
- Mehlmer N, Wurzing B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R, Teige M** (2010) The Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *Plant J* **63**: 484–498
- Miao Y, Lv D, Wang P, Wang X-C, Chen J, Miao C, Song C-P** (2006) An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* **18**: 2749–2766
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* **33**: 453–467
- Molendijk AJ, Bischoff F, Rajendrakumar CSV, Friml J, Braun M, Gilroy S, Palme K** (2001) *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J* **20**: 2779–2788
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde J-P, Hartmann M-A, Bonneu M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule J-J** (2004) Lipid Rafts in Higher Plant Cells: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TRITON X-100-INSOLUBLE MICRODOMAINS FROM TOBACCO PLASMA MEMBRANE \*. *J Biol Chem* **279**: 36277–36286
- Nagano M, Ishikawa T, Fujiwara M, Fukao Y, Kawano Y, Kawai-Yamada M, Shimamoto K** (2016) Plasma Membrane Microdomains Are Essential for Rac1-RbohB/H-Mediated Immunity in Rice. *Plant Cell* **28**: 1966–1983
- Nagashima Y, Tsugawa S, Mochizuki A, Sasaki T, Fukuda H, Oda Y** (2018) A Rho-based reaction-diffusion system governs cell wall patterning in metaxylem vessels. *Sci Rep* **8**: 11542
- Nagawa S, Xu T, Lin D, Dhonukshe P, Zhang X, Friml J, Scheres B, Fu Y, Yang Z** (2012) ROP GTPase-Dependent Actin Microfilaments Promote PIN1 Polarization by Localized Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis. *PLOS Biol* **10**: e1001299
- Nicolson GL** Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure. *Discoveries* **1**: e3

- Oda T, Hashimoto H, Kuwabara N, Akashi S, Hayashi K, Kojima C, Wong HL, Kawasaki T, Shimamoto K, Sato M, et al** (2010) Structure of the N-terminal Regulatory Domain of a Plant NADPH Oxidase and Its Functional Implications \*. *J Biol Chem* **285**: 1435–1445
- Ogasawara Y, Kaya H, Hiraoka G, Yumoto F, Kimura S, Kadota Y, Hishinuma H, Senzaki E, Yamagoe S, Nagata K, et al** (2008) Synergistic Activation of the Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca<sup>2+</sup> and Phosphorylation \*. *J Biol Chem* **283**: 8885–8892
- Ott T** (2017) Membrane nanodomains and microdomains in plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* **40**: 82–88
- Pan X, Fang L, Liu J, Senay-Aras B, Lin W, Zheng S, Zhang T, Guo J, Manor U, Van Norman J, et al** (2020) Auxin-induced signaling protein nanoclustering contributes to cell polarity formation. *Nat Commun* **11**: 3914
- Pan X, Pérez-Henríquez P, Van Norman JM, Yang Z** (2023) Membrane nanodomains: Dynamic nanobuilding blocks of polarized cell growth. *Plant Physiol* kiad288
- 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** (2019) Developmental control of plant Rho GTPase nano-organization by the lipid phosphatidylserine. *Science* **364**: 57–62
- Platre MP, Jaillais Y** (2017) Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes. *Plant Signal Behav* **12**: e1282022
- Pomorski T, Hrafnadóttir S, Devaux PF, Meer G van** (2001) Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Semin Cell Dev Biol* **12**: 139–148
- Poncini L, I W, V DT, T V, T B, N G, Jp M, S L** (2017) In roots of *Arabidopsis thaliana*, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signalling than flg22 or the chitin heptamer. *PloS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0185808

- Pontier SM, Schweisguth F** (2012) Glycosphingolipids in signaling and development: From liposomes to model organisms. *Dev Dyn* **241**: 92–106
- Poraty-Gavra L, Zimmermann P, Haigis S, Bednarek P, Hazak O, Stelmakh OR, Sadot E, Schulze-Lefert P, Gruissem W, Yalovsky S** (2013) The Arabidopsis Rho of Plants GTPase AtROP6 Functions in Developmental and Pathogen Response Pathways. *Plant Physiol* **161**: 1172–1188
- Potocka I, Szymanowska-Pułka J** (2018) Morphological responses of plant roots to mechanical stress. *Ann Bot* **122**: 711–723
- Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF** (2001) GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* **3**: 368–375
- Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF** (2003) Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J Cell Biol* **160**: 165–170
- Prober DA, Edgar BA** (2002) Interactions between Ras1, dMyc, and dPI3K signaling in the developing *Drosophila* wing. *Genes Dev* **16**: 2286–2299
- Qin Y, Yang Z** (2011) Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 816–824
- Qiu J-L, Jilk R, Marks MD, Szymanski DB** (2002) The Arabidopsis SPIKE1 Gene Is Required for Normal Cell Shape Control and Tissue Development. *Plant Cell* **14**: 101–118
- Ramstedt B, Slotte JP** (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett* **531**: 33–37
- Ren H, Dang X, Yang Y, Huang D, Liu M, Gao X, Lin D** (2016) SPIKE1 Activates ROP GTPase to Modulate Petal Growth and Shape. *Plant Physiol* **172**: 358–371
- Robatzek S, Chinchilla D, Boller T** (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**: 537–542
- Rong D, Zhao S, Tang W, Luo N, He H, Wang Z, Ma H, Huang Y, Yao X, Pan X, et al** (2022) ROP signaling regulates spatial pattern of cell division and specification of meristem notch. *Proc Natl Acad Sci* **119**: e2117803119
- Rosenfeldt H, Castellone MD, Randazzo PA, Gutkind Js** (2006) Rac inhibits thrombin-induced Rho activation: evidence of a Pak-dependent GTPase crosstalk. *J Mol Signal* **1**: 8
- Roux ME, Rasmussen MW, Palma K, Lolle S, Regué ÀM, Bethke G, Glazebrook J, Zhang W, Sieburth L, Larsen MR, et al** (2015) The mRNA decay factor PAT1 functions in a pathway including MAP kinase 4 and immune receptor SUMM2. *EMBO J* **34**: 593–608

- Scarpin MR, Busche M, Martinez RE, Harper LC, Reiser L, Szakonyi D, Merchante C, Lan T, Xiong W, Mo B, et al** (2023) An updated nomenclature for plant ribosomal protein genes. *Plant Cell* **35**: 640–643
- Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge U-I, Kunze R** (2003) ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiol* **131**: 16–26
- Schwessinger B, Roux M, Kadota Y, Ntoukakis V, Sklenar J, Jones A, Zipfel C** (2011) Phosphorylation-Dependent Differential Regulation of Plant Growth, Cell Death, and Innate Immunity by the Regulatory Receptor-Like Kinase BAK1. *PLOS Genet* **7**: e1002046
- Sharom FJ, Lehto MT** (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* **80**: 535–549
- Shevchenko A, Simons K** (2010) Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 593–598
- Siehler S** (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* **158**: 41–49
- Silverberg JL, Noar RD, Packer MS, Harrison MJ, Henley CL, Cohen I, Gerbode SJ** (2012) 3D imaging and mechanical modeling of helical buckling in *Medicago truncatula* plant roots. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 16794–16799
- Silvius JR, l'Heureux F** (2002) Fluorometric Evaluation of the Affinities of Isoprenylated Peptides for Lipid Bilayers. *ACS Publ.* doi: 10.1021/bi00176a034
- Simons K, Sampaio JL** (2011) Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a004697
- Sirichandra C, Gu D, Hu H-C, Davanture M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, et al** (2009) Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* **583**: 2982–2986
- Skirycz A, De Bodt S, Obata T, De Clercq I, Claeys H, De Rycke R, Andriankaja M, Van Aken O, Van Breusegem F, Fernie AR, et al** (2010) Developmental Stage Specificity and the Role of Mitochondrial Metabolism in the Response of Arabidopsis Leaves to Prolonged Mild Osmotic Stress. *Plant Physiol* **152**: 226–244
- Smith H** (1990) Signal perception, differential expression within multigene families and the molecular basis of phenotypic plasticity. *Plant Cell Environ* **13**: 585–594
- Smokvarska M, Bayle V, Maneta-Peyret L, Fouillen L, Poitout A, Dongois A, Fiche J-B, Gronnier J, Garcia J, Höfte H, et al** (2023) The receptor kinase FERONIA regulates phosphatidylserine localization at the cell surface to modulate ROP signaling. *Sci Adv* **9**: eadd4791

- Smokvarska M, Francis C, Platre MP, Fiche J-B, Alcon C, Dumont X, Nacry P, Bayle V, Nollmann M, Maurel C, et al** (2020) A Plasma Membrane Nanodomain Ensures Signal Specificity during Osmotic Signaling in Plants. *Curr Biol* **30**: 4654-4664.e4
- Smokvarska M, Jaillais Y, Martinière A** (2021) Function of membrane domains in rho-of-plant signaling. *Plant Physiol* **185**: 663–681
- Sorek N, Gutman O, Bar E, Abu-Abied M, Feng X, Running MP, Lewinsohn E, Ori N, Sadot E, Henis YI, et al** (2011) Differential Effects of Prenylation and S-Acylation on Type I and II ROPS Membrane Interaction and Function. *Plant Physiol* **155**: 706–720
- Sperling P, Heinz E** (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1632**: 1–15
- Stanislas T, Jaillais Y** (2019) Plant Cell Biology: How to Give Root Hairs Enough ROPs? *Curr Biol* **29**: R405–R407
- Sun J, Eklund DM, Montes-Rodriguez A, Kost B** (2015) In vivo Rac/Rop localization as well as interaction with RhoGAP and RhoGDI in tobacco pollen tubes: analysis by low-level expression of fluorescent fusion proteins and bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **84**: 83–98
- Sun Y, Han Z, Tang J, Hu Z, Chai C, Zhou B, Chai J** (2013) Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell Res* **23**: 1326–1329
- Takahashi Y, Zhang J, Hsu P-K, Ceciliato PHO, Zhang L, Dubeaux G, Munemasa S, Ge C, Zhao Y, Hauser F, et al** (2020) MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response. *Nat Commun* **11**: 12
- Talbott CM, Vorobyov I, Borchman D, Taylor KG, DuPré DB, Yappert MC** (2000) Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1467**: 326–337

- Tang W, Lin W, Zhou X, Guo J, Dang X, Li B, Lin D, Yang Z** (2022) Mechano-transduction via the pectin-FERONIA complex activates ROP6 GTPase signaling in Arabidopsis pavement cell morphogenesis. *Curr Biol* **32**: 508-517.e3
- Tang W, Lin W, Zhou X, Guo J, Dang X, Li B, Lin D, Yang Z** (2021) Mechano-transduction via the pectin-FERONIA complex activates ROP6 GTPase signaling in Arabidopsis pavement cell morphogenesis. *Curr Biol CB S0960-9822(21)01590-6*
- Tanimoto M, Roberts K, Dolan L** (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **8**: 943-948
- Thomas C, Berken A** (2010) Structure and Function of ROPs and their GEFs. *In* S Yalovsky, F Baluška, A Jones, eds, *Integr. G Proteins Signal. Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 49-69
- Thomas C, Fricke I, Scrima A, Berken A, Wittinghofer A** (2007) Structural Evidence for a Common Intermediate in Small G Protein-GEF Reactions. *Mol Cell* **25**: 141-149
- Tinevez J-Y, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, Bednarek SY, Shorte SL, Eliceiri KW** (2017) TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods* **115**: 80-90
- Tjellström H, Hellgren LI, Wieslander Å, Sandelius AS** (2010) Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J* **24**: 1128-1138
- Ugalde JM, Schlößer M, Dongois A, Martinière A, Meyer AJ** (2021) The latest HyPe(r) in plant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensing. *Plant Physiol* **187**: 480-484
- Verbelen J-P, Cnodder TD, Le J, Vissenberg K, Baluška F** (2006) The Root Apex of Arabidopsis thaliana Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. *Plant Signal Behav* **1**: 296-304
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E** (2003) Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol* **131**: 1191-1208
- Voxeur A, Fry SC** (2014) Glycosylinositol phosphorylceramides from Rosa cell cultures are boron-bridged in the plasma membrane and form complexes with rhamnogalacturonan II. *Plant J* **79**: 139-149
- Wan Z-Y, Chai S, Ge F-R, Feng Q-N, Zhang Y, Li S** (2017) Arabidopsis PROTEIN S-ACYL TRANSFERASE4 mediates root hair growth. *Plant J* **90**: 249-260
- Wang Q, Zhao Y, Luo W, Li R, He Q, Fang X, Michele RD, Ast C, von Wirén N, Lin J** (2013) Single-particle analysis reveals shutoff control of the Arabidopsis ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 13204-13209
- Watson RR, Preedy VR** (2003) *Nutrition and Heart Disease: Causation and Prevention*. CRC Press



- Wittinghofer A, Berken A** (2008) Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Biochem PPB*. doi: 10.1016/j.plaphy.2007.12.008
- Wong HL, Pinontoan R, Hayashi K, Tabata R, Yaeno T, Hasegawa K, Kojima C, Yoshioka H, Iba K, Kawasaki T, et al** (2007) Regulation of Rice NADPH Oxidase by Binding of Rac GTPase to Its N-Terminal Extension. *Plant Cell* **19**: 4022–4034
- Wu H, Hazak O, Cheung AY, Yalovsky S** (2011) RAC/ROP GTPases and Auxin Signaling. *Plant Cell* **23**: 1208–1218
- Wu Y, Zhao S, Tian H, He Y, Xiong W, Guo L, Wu Y** (2013) CPK3-phosphorylated RhoGDI1 is essential in the development of Arabidopsis seedlings and leaf epidermal cells. *J Exp Bot* **64**: 3327–3338
- Xu T, Dai N, Chen J, Nagawa S, Cao M, Li H, Zhou Z, Chen X, De Rycke R, Rakusová H, et al** (2014) Cell Surface ABP1-TMK Auxin-Sensing Complex Activates ROP GTPase Signaling. *Science* **343**: 1025–1028
- Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen J-G, Wu M-J, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones AM, Yang Z** (2010) Cell Surface- and Rho GTPase-Based Auxin Signaling Controls Cellular Interdigitation in Arabidopsis. *Cell* **143**: 99–110
- Yan M, Jing W, Xu N, Shen L, Zhang Q, Zhang W, Yan M, Jing W, Xu N, Shen L, et al** (2016) Arabidopsis thaliana constitutively active ROP11 interacts with the NADPH oxidase respiratory burst oxidase homologue F to regulate reactive oxygen species production in root hairs. *Funct Plant Biol* **43**: 221–231
- Yang L, Zhang J, He J, Qin Y, Hua D, Duan Y, Chen Z, Gong Z** (2014) ABA-mediated ROS in mitochondria regulate root meristem activity by controlling PLETHORA expression in Arabidopsis. *PLoS Genet* **10**: e1004791
- Yu F, Qian L, Nibau C, Duan Q, Kita D, Levasseur K, Li X, Lu C, Li H, Hou C, et al** (2012) FERONIA receptor kinase pathway suppresses abscisic acid signaling in Arabidopsis by activating ABI2 phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 14693–14698
- Yu Y, Chakravorty D, Assmann SM** (2018a) The G Protein  $\beta$ -Subunit, AGB1, Interacts with FERONIA in RALF1-Regulated Stomatal Movement1[OPEN]. *Plant Physiol* **176**: 2426–2440
- Yu Y, Song J, Tian X, Zhang H, Li L, Zhu H** (2018b) Arabidopsis PRK6 interacts specifically with AtRopGEF8/12 and induces depolarized growth of pollen tubes when overexpressed. *Sci China Life Sci* **61**: 100–112
- Zhang C, Lauster T, Tang W, Houbaert A, Zhu S, Eeckhout D, De Smet I, De Jaeger G, Jacobs TB, Xu T, et al** (2022) ROPGAP-dependent interaction between brassinosteroid and ROP2-GTPase signaling controls pavement cell shape in Arabidopsis. *Curr Biol* **32**: 518-531.e6

- Zhang W, Qin C, Zhao J, Wang X** (2004) Phospholipase D $\alpha$ 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 9508–9513
- Zhang Y, McCormick S** (2007) A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 18830–18835
- Zhang Y, Tian H, Chen D, Zhang H, Sun M, Chen S, Qin Z, Ding Z, Dai S** (2023) Cysteine-rich receptor-like protein kinases: emerging regulators of plant stress responses. *Trends Plant Sci* **28**: 776–794
- Zhou F, Emonet A, Déneraud Tendon V, Marhavy P, Wu D, Lahaye T, Geldner N** (2020) Coincidence of Damage and Microbial Patterns Controls Localized Immune Responses in Roots. *Cell* **180**: 440-453.e18
- Zhou Y, Hancock JF** (2018) Deciphering lipid codes: K-Ras as a paradigm. *Traffic Cph Den* **19**: 157–165
- Zimmerberg J, Kozlov MM** (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 9–19
- (2017) Corrected and Republished from: Activation Status-Coupled Transient S-Acylation Determines Membrane Partitioning of a Plant Rho-Related GTPase. *Mol Cell Biol* **37**: e00333-17
- (2010) An S-Acylation Switch of Conserved G Domain Cysteines Is Required for Polarity Signaling by ROP GTPases. *Curr Biol* **20**: 914–920