

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PRÉDICTIONS STRUCTURALES GUIDÉES PAR ALPHAFOLD DES INTERACTIONS DU
CRYPTOCHROME CRY1 AVEC DES PROTÉINES DE LA VOIE DES GIBBÉRELLINES ET DE LA
RÉPONSE AU STRESS THERMIQUE CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA.

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

SOULEÏMEN JMII

JUIN 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques Avertissement

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de recherche, Laurent Cappadocia, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire naissant en septembre 2019. J'ai eu le « bonheur malicieux » d'être le tout premier étudiant du laboratoire, ce qui n'a pas été une mince affaire. Je tiens à souligner à quel point je suis reconnaissant pour l'autonomie qu'il m'a accordée afin d'explorer les projets librement et sa patience tout au long de ces années.

Ensuite, un grand merci à toutes les rencontres que j'ai faites à l'UQAM, professeur.e.s, technicien.ne.s, étudiant.e.s, des centaines de visages et d'échanges qui ont compté et nourri mon parcours. Merci à mes collègues et ami.e.s de bureaux et du quatrième l'étage, j'ai tellement ri avec vous.

Je voudrais aussi adresser un immense merci à mes ami.e.s, ceux qui sont présents depuis le début de ce voyage en septembre 2017, et ceux qui viennent d'arriver lors d'une rencontre sur une place de stationnement en 2024. Vous avez largement contribué à tenir le coup durant ce marathon.

Un énorme merci à Étienne, du fond du cœur, merci pour ton écoute, ta patience, tes encouragements et ta présence extraordinaire. Tu as partagé les émotions par lesquelles je suis passé, et je ne pourrais jamais assez te remercier.

Enfin, un grand merci à ma famille, mes parents et ma sœur, votre soutien depuis le tout début n'a pas de prix. Vos encouragements depuis mon premier jour d'école à aujourd'hui est un cadeau inestimable. On est bien drôles tous les quatres.

DÉDICACE

À ma mère, Brigitte Bayeul
Et à mon père, Brahim Jmii

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
DÉDICACE.....	iv
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xviii
RÉSUMÉ.....	xix
ABSTRACT	xxi
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
1.1 Enjeux du XXI ^e siècle reliés à l'alimentation.....	2
1.1.1 Pression démographique	2
1.1.2 Dérèglement climatique	2
1.1.3 Conséquences moléculaires du stress de haute température	3
1.1.4 Un compromis entre croissance et résistance.....	3
1.2 Découverte des mécanismes hormonaux contrôlant la croissance	4
1.2.1 L'exemple du riz fou.....	4
1.2.2 Une déficience en synthèse de GA induit un phénotype nain.....	5
1.3 Base génétique de l'identification des protéines DELLA	5
1.3.1 Les cultivars emblématiques de la Révolution Verte.....	5
1.3.2 Identification fonctionnelle des répresseurs constitutifs de la croissance.....	7
1.3.3 Rôle physiologique des protéines DELLA	8
1.4 Structure et fonction des protéines DELLA	8
1.4.1 Le domaine DELLA.....	8
1.4.2 Le domaine GRAS	10
1.4.3 Modulation de la croissance lors d'un stress thermique	11
1.5 Perception du signal hormonal	11
1.5.1 Ingénierie de mutants insensibles à la gibbérelline.....	11
1.5.2 Redondance et spécificité des GID1 d'Arabidopsis.....	13
1.5.3 Structure des récepteurs GID1	13
1.6 Reconnaissance du complexe DELLA/GID1(GA)	14
1.6.1 Contribution de la protéine SLY1	14

1.6.2	SLY1 : un adaptateur devenu spécifique	15
1.6.3	L'hélice $\alpha 7$ de SLY1	16
1.6.4	Rôle structural du motif F-box de la protéine SLY1.....	17
1.6.5	Accessibilité au motif F-box par ASK1	19
1.6.6	Dégradation du complexe DELLA/GID1(GA).....	20
1.7	Perception de la lumière bleue par les cryptochromes	21
1.7.1	Les cryptochromes	21
1.7.2	D'un monomère inactif au tétramère actif	22
1.7.3	Les protéines BIC inhibent la photo-activation des cryptochromes	22
1.7.4	La queue C-terminale des cryptochromes.....	24
1.7.5	Position de la queue C-terminale par rapport au domaine PHR	25
1.7.6	Des partenaires protéiques des cryptochromes	26
1.8	Réponse au stress de haute température par les protéines HsF	27
1.8.1	Rôle principal des HsFA1 dans la réponse de choc thermique.....	27
1.8.2	Structure des facteurs de choc thermique.....	28
1.8.3	L'interaction CRY1-HsFA1 augmente la réponse de choc thermique	28
1.9	Hypothèses et objectifs.....	29
1.10	Approches expérimentales.....	30
1.10.1	Prédiction de modèles structuraux par AlphaFold.....	30
1.10.1.1	Fonctionnement général	30
1.10.1.2	Prédiction d'erreur d'alignement.....	31
1.10.1.3	Prédiction du score de confiance locale	31
1.10.2	Tests d'interactions protéines-protéines.....	31
1.10.2.1	Tests de double hybride chez la levure	32
1.10.2.2	Tests de complémentation bimoléculaire de fluorescence.....	32
CHAPITRE 2 ARTICLE 1 - STRUCTURE-GUIDED OPTIMIZATION OF SLY1 EXPRESSION AND PURIFICATION IN E. COLI		34
2.1	Résumé	35
2.2	Abstract.....	36
2.3	Introduction.....	37
2.4	Results and Discussion	38
2.4.1	Structural determinants of SLY1 hydrophobicity	38
2.4.2	Expression challenges highlight the capacity of ASK1 and SLY1 to form oligomers...39	
2.4.3	Structural basis and possible consequences of oligomerization	40
2.4.4	Soluble expression of ASK1/SLY1 through association with a maltose binding protein	41
2.5	Materials and methods.....	42
2.5.1	Sequences alignment and hydrophobicity analyses	42
2.5.2	Structural prediction of SLY1 complexes.....	42
2.5.3	Molecular cloning	42
2.5.4	Heterologous protein expression in E. coli	43

2.5.5 Plant material and growth conditions.....	43
2.5.6 Bimolecular complementation by fluorescence assay	44
2.6 Figures	46
2.7 Supplementary materials	51

CHAPITRE 3 ARTICLE 2 - STRUCTURAL MODULATION OF CRY1'S HEAD TO TOE
ACTIVITY INTERFACE BY W352 AND R442

72	72
3.1 Résumé	73
3.2 Abstract.....	74
3.3 Introduction.....	75
3.4 Methods	76
3.4.1 Sequence alignments of Arabidopsis and orthologues CRY1	76
3.4.2 Structural prediction of the CRY1 tetramer	76
3.4.3 Molecular cloning and mutagenesis.....	77
3.4.4 Yeast 2-hybrid assay and β -galactosidase quantification.....	77
3.5 Results.....	78
3.5.1 Tetrameric assembly of the CRY1 PHR domain	78
3.5.2 W352 et R442 modulate CRY1 PHR Head-to-Toe oligomerization.....	78
3.5.3 Alternative positioning of orthologues CTT of CRY1 on the PHR domain.....	79
3.5.4 The CTT of CRY1 hides Head-to-Toe interacting surface for HsFA1d.....	80
3.6 Discussion.....	80
3.7 Conclusion.....	82
3.8 Figures	84
3.9 Supplementary materials	88

CHAPITRE 4 ARTICLE 3 - THE CRY1-HSF PREDICTED INTERACTION INTERFACE
SERVES AS A MOLECULAR PLATFORM FOR BIOENGINEERING OR SELECTING
MODULATING MUTANTS

95	95
4.1 Résumé	96
4.2 Abstract.....	97
4.3 Introduction.....	98
4.4 Materials and methods.....	99
4.4.1 Sequence alignments of Arabidopsis HsFs and plant homologues of HsFA3	99
4.4.2 Structural prediction of the CRY1-HsFA3 complex.....	99
4.4.3 Molecular cloning, mutagenesis and proteins stability	99
4.4.4 Yeast 2-hybrid assay and β -galactosidase quantification.....	100
4.4.5 Plant material and growth conditions.....	101
4.4.6 Bimolecular complementation by fluorescence assay	101
4.5 Results.....	102

4.5.1	Similarities in HsFs Class A and C structure allow interaction with CRY1	102
4.5.2	Structural analysis of the predicted CRY1-HsFA1d interaction	103
4.5.3	Sequence and structure variation modulate CRY1 interaction	104
4.5.4	CRY1 PHR domain interact with HsFA3 HR-A region	105
4.5.5	Compensatory interactions at the CRY1-HsF interface	106
4.5.6	Development of HsFs mutants with increased interaction to CRY1	107
4.6	Discussion	108
4.7	Conclusion	110
4.8	Figures	111
4.9	Supplementary materials	119
	CHAPITRE 5 DISCUSSION	147
	CONCLUSION	167
	ANNEXE A PROTOCOLE POUR L'ANALYSE LC-MS/MS D'UNE PROTÉINE EXTRAITE SUR GEL SDS-PAGE	169
	ANNEXE B PURIFICATION D'EXCLUSION DE TAILLE DE ASK1-SLY1 DÉNATURÉE	170
	ANNEXE C PURIFICATION D'EXCLUSION DE TAILLE DE RGL1	173
	ANNEXE D PRÉDICTION PAR ALPHAFOLD D'INTÉRACTION ENTRE RGL1 ET LES HSF	174
	ANNEXE E ALIGNEMENT DE SÉQUENCES DE PROTÉINES GRAS	170
	APPENDICE A REVUE PUBLIÉE EN TANT QUE PREMIER AUTEUR	175
	APPENDICE B CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLES I	176
	APPENDICE C CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLES II	177
	APPENDICE D PARTICIPATION À DES PROJETS DE RECHERCHES I	178
	APPENDICE E PARTICIPATION À DES PROJETS DE RECHERCHES II	179
	APPENDICE F PARTICIPATION À DES PROJETS DE RECHERCHES III	181
	BIBLIOGRAPHIE	182

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une déficience en synthèse de gibbérellines.	4
Figure 1.2 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de séquence des protéines DELLA chez les céréales et Arabidopsis.	6
Figure 1.3 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des protéines DELLA chez Arabidopsis.	7
Figure 1.4 Organisation structurale du domaine DELLA	9
Figure 1.5 Organisation et structures dimériques des protéines GRAS.	10
Figure 1.6 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des protéines GID1 chez le riz et Arabidopsis.	12
Figure 1.7 Organisation et structure de GID1 en complexent avec RGA.	14
Figure 1.8 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des protéines SLY1 chez Arabidopsis.	15
Figure 1.9 Visualisation des déterminants structuraux de la protéine SLY1 et impact phénotypique de la mutation H104Y.	16
Figure 1.10 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de l'hélice $\alpha 7$ chez AtSLY1 et OsGID2.	17
Figure 1.11 Rôle structural de ASK1 dans l'intégration du signal hormonal.	18
Figure 1.12 Compétitions pour la surface d'interaction impliquée dans la dimérisation et la reconnaissance du motif F-box.	19
Figure 1.13 Schémas de la machinerie SCFSLY1 lors de l'ubiquitination du complexe GID1(GA)-DELLA.	20
Figure 1.14 CRY1 comme garde-fou de la voie des gibbérellines après activation par la lumière.	21
Figure 1.15 Rôle des cryptochromes dans la perception de la lumière afin de moduler l'élongation de l'hypocotyle chez Arabidopsis.	23
Figure 1.16 Inhibition de l'activité des cryptochrome par les protéines BIC chez Arabidopsis.	24
Figure 1.17 Position relative de la queue C-terminale sur le domaine PHR du cryptochrome.	26
Figure 1.18 Comparaison des phénotypes de croissance liés aux KO des gènes HSFA1 chez Arabidopsis.	27
Figure 1.19 Cartographie de la structure canonique des facteurs de choc thermique d'Arabidopsis.	28

Figure 1.20 Schéma simplifié du rôle de la lumière bleue dans la modulation transcriptionnelle des gènes de tolérance au stress de haute température.	29
Figure 2.1 Hydrophobicity profiles and structural organization of SLY1.	47
Figure 2.2 Structural model of SLY1 and functional interaction with DELLA.	49
Figure 2.3 The MBP tag improves solubility of ASK1/SLY1 complexes.	50
Figure 2.S1 AlphaFold-predicted structures of SLY1 from different crops species.	51
Figure 2.S2 AlphaFold-predicted structures of SLY1 and ASK1.	52
Figure 2.S3 AlphaFold-predicted structures of SLY1.	53
Figure 2.S4 Structure of ASK1.	54
Figure 2.S5 Purification of co-expressed ASK1/SLY1 by gel filtration chromatography.	55
Figure 2.S6 Purification of co-expressed ASK1-SLY1 by gel filtration chromatography.	56
Figure 2.S7 Mass spectroscopy analysis of the ASK1-SLY1 fusion.	57
Figure 2.S8 Schematic model of potential oligomeric superstructures formed by fused ASK1-SLY1.	58
Figure 2.S9 Alignment of SKPA1 structures.	59
Figure 2.S10 Predicted dimerization of AtASK1.	60
Figure 2.S11 Dimerization of SKPA1 from Dictyostelium discoideum.	61
Figure 2.S12 Structural consequence of SLY1 binding to ASK1 or DELLA.	62
Figure 2.S13 Predicted dimeric structures of MpSLY1.	63
Figure 2.S14 AlphaFold-predicted structures of AtSLY1 dimers.	64
Figure 2.S15 Structural comparison of SLY11-151-RGL1WT and SLY11-120-RGL1WT complexes generated by AlphaFold.	65
Figure 3.1 Comparative structure and confidence of monomeric and tetrameric CRY1 and CRY2.	84
Figure 3.2 Structural interfaces and functional validation of CRY1 oligomerization.	85
Figure 3.3 Divergence in CRY1 orthologues CTTs sequences.	86
Figure 3.4 Structural overlap between CRY1-HsFA1d interaction, CRY1 oligomerization and CTT position on the Head-to-Toe interface.	87

Figure 3.S1 Sequences alignment of CRY1 and CRY2 from <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
Figure 3.S2 Sequences alignment of CRY1 from orthologues species.	89
Figure 3.S3 Comparative positioning of BIC2 on the PHR domain of CRY1.	90
Figure 4.1 CRY1 interacts with multiple HsFs.....	112
Figure 4.2 Four contact zones between HsFA1d and CRY1 are predicted by AlphaFold.	113
Figure 4.3 Structural plasticity in CRY1-HsFs interaction.	114
Figure 4.4 Probing of the CRY1-HsFs interface.....	115
Figure 4.5 Contribution of candidate residues identified by the CRY1-HsFA3 homology model inspired by AlphaFold prediction.....	117
Figure 4.6 New HsFs gain of function mutants inspired by HsFA3 natural variability.	118
Figure 4.S1 Predicted three-dimensional structures of CRY1 and 21 heat shock proteins from <i>Arabidopsis thaliana</i>	119
Figure 4.S2 Predicted aligned error plot (PAE) of CRY1 and 21 monomeric heat shock proteins.....	120
Figure 4.S3 pLDDT values of 21 heat shock proteins from <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
Figure 4.S4 Sequence alignment of Heat shock proteins of <i>Arabidopsis thaliana</i>	125
Figure 4.S5 Predicted aligned error plot (PAE) of 21 homo-trimeric heat shock proteins from <i>Arabidopsis thaliana</i>	126
Figure 4.S6 Predicted three-dimensional structures of 21 homo-trimeric heat shock proteins from <i>Arabidopsis thaliana</i>	127
Figure 4.S7 Structural alignments of CRY1-HsFA1s predicted by AlphaFold.....	128
Figure 4.S8 Predicted aligned error plot (PAE) of 21 CRY1-HsFs interaction from <i>Arabidopsis thaliana</i>	129
Figure 4.S9 The CRY1 PHR domain interacts with the HsFA1d HR-A region.....	130
Figure 4.S10 CRY1 PHR domain interacts with HsFA3.....	131
Figure 4.S11 Bimolecular fluorescence complementation assay controls used in this study.	132
Figure 4.S12 Sequence alignment of Heat shock proteins from common crops.	133
Figure 4.S13 Sequence alignment of Heat shock proteins of <i>Oryza sativa</i> against <i>Arabidopsis thaliana</i> HsFA1d.	137
Figure 5.1 Organisation structurale du complexe SCFSLY1/DELLA/GID1(GA).....	149

Figure 5.2 Analyse de l'interaction entre ASK1-SLY1 et RGL1 par résonance des plasmons de surface.	150
Figure 5.3 Positionnement alternatif de la queue C-terminale de CRY1 sur le domaine PHR.	153
Figure 5.4 Alignement comparatif des séquences des queues C-terminales de cryptochromes.	154
Figure 5.5 Proximité de l'hélices α 22 de CRY1 avec BIC2.	155
Figure 5.6 Modèles de régulation de W352 et R442 du domaine PHR par la queue d'AtCRY1.	156
Figure 5.7 Mise en évidence d'une interaction entre RGL1 et les facteurs de choc thermique par test de double hybride chez la levure.	158
Figure 5.8 Base structurale de l'interaction entre CRY1 et RGL1.	161
Figure 5.9 Base structurale de l'interaction entre CRY1 et GID1.	162
Figure 5.10 Modèles de dimérisation de RGL1 générés par AlphaFold.	163
Figure 5.11 Mise en évidence de la dimérisation des protéines RGL1 par test de double hybride chez la levure.	164
Figure 5.12 Analogie entre les l'hélice α 7 de SLY1 et l'hélice α 1 de DELLA.	165
Figure A.1 Alignement comparatif des séquences primaires des protéines de la famille GRAS et des protéines DELLA.	171
Figure A.2 Purification de la protéine de fusion ASK1-SLY1 par chromatographie d'exclusion de taille.	172
Figure A.3 Purification et isolement de Trx::RGL1 par chromatographie d'exclusion de taille.	173
Figure A.4 Modélisation par AlphaFold de l'interaction entre RGL1 et les protéines HsF d' <i>Arabidopsis thaliana</i> en état monomérique ou trimérique.	174

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.S1 Accession numbers for ASK1, SLY1s and DELLA used in structural modelization by AlphaFold prediction.....	66
Table 2.S2 Information on the SLY1s proteins used in alignment and Web Logo 3 visualizer.....	67
Table 2.S3 Primers used in this study.	71
Table 3.S1 Protein annotation summary on different CRY1 and HsFA1d used in structural predictions, yeast-two-hybrid assays.	91
Table 3.S2 Primers used in this study.	92
Table 3.S3 Summuray of AlphaFold v3 predicted interface contacts in CRY1 tetramer context.	93
Table 4.S1 Accession numbers for CRY1 and the Heat Shock Factor proteins used in structural predictions.	138
Table 4.S2 Protein annotation summary of <i>Oryza sativa</i> Heat shock Factor proteins used in alignments.	139
Table 4.S3 Information on the Heat shock proteins factor 3 used in alignments.	140
Table 4.S4 Primers used in this study.	143
Table 4.S5 Stability Change ($\Delta\Delta G$) according to mCSM prediction.	146

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

aa	Acides aminés « Amino acids »
ABA	Acide abscissique
ABRC	« Arabidopsis biological resource center »
AD	Domaine d'activation « Activation domain »
ADN	Acide désoxyribonucléique « Deoxyribonucleic acid »
AHA	Motif aromatique-hydrophobique-acidique
APX	Ascorbate peroxydase
ARN	Acide ribonucléique « Ribonucleic acid »
ASK1-SLY1	ASK1 fusionnée à SLY1
ASK1/SLY1	ASK1 complexée à SLY1
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Bb	<i>Beauveria bassiana</i>
BD	Domaine de liaison (à l'ADN) en double hybride chez la levure
BIC	« Blue-light inhibitor of cryptochromes »
BiFC	Complémentation bimoléculaire de fluorescence
BLAST	« Basic Local Alignment Search Tool »
Bn	<i>Brassica napus</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
C-terminal	Extrémité carboxy-terminale d'une protéine
c-YFP	Fragment C-terminal de la YFP
CAT	Catalase
cDNA/ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire « Complementary DNA »
Chip-Seq	Séquençage après immunoprécipitation de la chromatine
CPRG	Chlorophénol red- β -D-galactopyranoside
CRY1*	CRY1 excitée
Cryo-EM	Microscopie électronique en cryogénie « Cryogenic electron microscopy »
CTT	Queue C-terminale des cryptochromes « CTT »
CUL1	« Cullin 1 »
D-E-L-L-A	Motif DELLA
DBD	Domaine de liaison à l'ADN « DNA binding domain »
Dd	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DELLA/GID1(GA)	Complexe DELLA/GID1 en présence de gibbérelline

Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
E1	Enzyme 1 d'activation
E2	Enzyme 2 de conjugaison
E3	Enzyme 3 de liaison
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Résonance paramagnétique électronique
F	Phénylalanine
F-box	Motif ou domaine F-box
FAD	Flavine adénine dinucléotide « Flavin adenine dinucleotide »
FAD*	Flavine adénine dinucléotide excitée
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
Fw	Amorce sens « Forward oligo »
GA	Gibbérelline « Gibberellin »
GAI	« GA insensitive protein »
GAL4	« GAL4 transcription factor »
GFP	Protéine fluorescente verte « Green fluorescent protein »
GGF	Motif tripeptidique Gly-Gly-Phe de SLY1
GID1	« Gibberellin insensitive dwarf 1 »
GID1(GA)	Protéine GID1 liée à la GA
GID2	Protéine orthologue de SLY1 chez le riz
Gm	<i>Glycine max</i>
GRAS	GAI-RGA-SCR
Gs	<i>Gibberella subglutinans</i>
HA	« Activation helix »
H-H	Interface « Head-to-head » de CRY1
H-T	Interface « Head-to-toe » de CRY1
HR-A	Motifs de répétitions heptadiques de type A
HR-A/B	Motifs de répétitions heptadiques de type A/B
HR-B	Motifs de répétitions heptadiques de type B
Hs	<i>Homo sapiens</i>
HSE	« Heat shock element »
HSP	« Heat shock protein »
IDD	« Indeterminate-domain protein »
IDR	Région intrinsèquement désordonnée « Intrinsically disordered region »

IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JA	Acide jasmonique
kb	Kilobase
KD	« Knock down »
KO	« Knock out »
LB	« Lysogeny Broth »
LHR	« Leucine heptad repeat »
LLPS	Séparation de phase liquide-liquide « Liquid-liquid phase separation »
LSL	Motif tripeptidique Leu-Ser-Leu de SLY1
MBP	Protéine de liaison au maltose « Maltose binding protein »
mCherry	Protéine fluorescente mCherry
MCS	Site de clonage multiple « Multiple cloning site »
mCSM	« Mutation Cutoff Scanning Matrix »
Mm	<i>Mus musculus</i>
Mp	<i>Marchantia polymorpha</i>
MPT	Modification post-traductionnelle « Post-translational modification »
MSA	Alignement multiple de séquences
N-terminal	Extrémité amino-terminale d'une protéine
n-YFP	Fragment N-terminal de la YFP
NCBI	« National center for biotechnology information »
ND	Non détecté « Not detected »
NiNTA	Résine nickel-nitrilotriacétique
NMR	Résonance magnétique nucléaire « Nuclear magnetic resonance »
OD	Domaine d'oligomérisation « Oligomerization domain »
Os	<i>Oryza sativa</i>
PAE	Erreur d'alignement prédite « Predicted aligned error »
pb	Paire de bases « Base pair »
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PDB	Banque de données des protéines « Protein data bank »
PER2	« Period circadian regulator 2 »
PHR	Région d'homologie aux photolyases « Photolyase homology region »
PIF4	« Phytochrome-interacting factor 4 »
pLDDT	Score de confiance local prédit « Predicted local distance difference test »
RBX1	« Ring-box protein 1 »

RGA	« Repressor of <i>ga</i> ₁₋₃ »
RGL	« Repressor of <i>ga</i> ₁₋₃ -like »
ROS	Espèces réactives de l'oxygène « Reactive oxygen species »
RT-PCR	PCR après transcription inverse « Reverse Transcription PCR »
Rv	Amorce antisens « reverse oligo »
s.b.	Sous-unité « Subunit »
SB	« Super Broth »
SCF	Complexe protéique SKP1 - CULLIN - F-box
SD-LW	Milieu Synthétique –Leu –Trp « Synthetic dropout »
SDS PAGE	Électrophorèse sur gel SDS-PAGE
SKP1	« S-phase kinase-associated protein 1 »
SLiM	Motif linéaire court
SLY	« Sleepy »
SNE	« Sneazy »
SOD	Superoxyde dismutase
SPR	Résonance des plasmons de surface « Surface plasmon resonance »
T-V-H-Y-N-P	Motif TVHYNP
TAD	Domaine de transactivation « Transactivation domain »
TEV	Protéase du virus de la mosaïque du tabac « Tobacco etch virus »
TSS	Site d'initiation de la transcription « Transcription start site »
Ub	Ubiquitine « Ubiquitin »
Ub*	Ubiquitine chargée
UV	Ultraviolet « ultraviolet »
WT	Sauvage « wild type »
Y187	Souche de levure 187
Y2H	Double hybride chez la levure « yeast-two-hybrid »
YFP	« Yellow fluorescent protein »
Zm	<i>Zea mays</i>

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
≈	Approximativement
3'	Extrémité 3' d'un acide nucléique
5'	Extrémité 5' d'un acide nucléique
Å	Ångström
g	Gramme
h	Heure
ka	Constante d'association
kcal.mol ⁻¹	Kilocalorie par mole
KD	Affinité
kd	Constante de dissociation
kDa	Kilodalton
L	Litre
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mol	Mole
ms	Milliseconde
n	Taille de l'échantillon
nm	nanomètre
OD	Densité optique
pH	Potentiel hydrogène
RU	Unité de réponse
s	Seconde
W	Watt
xg	Force centrifuge
Δ	Délétion
ΔΔG	Variation de l'énergie libre de Gibbs
μL	Microlitre
μmol	Micromole

RÉSUMÉ

Le secteur de l'agriculture et la sécurité alimentaire sont fortement menacés par l'augmentation démographique et les changements climatiques. Historiquement, l'amélioration des rendements agricoles issue de la Révolution Verte s'est appuyée sur la manipulation de la voie des gibbérellines, notamment par la sélection de variétés semi-naines à croissance contrôlée. Si ces stratégies ont permis des gains majeurs de productivité, elles ont également mis en évidence les limites d'une optimisation centrée sur la croissance en conditions optimales, dans un contexte marqué par l'intensification des stress abiotiques. En tant qu'organismes sédentaires, les plantes ne peuvent échapper aux variations environnementales défavorables et dépendent de mécanismes fins d'intégration de signaux hormonaux et environnementaux pour maintenir leur homéostasie. Cette thèse s'inscrit dans une approche visant à décrypter, à l'échelle moléculaire, les mécanismes de régulation reliant la voie des gibbérellines, la perception de la lumière bleue et la réponse au stress thermique. En combinant des prédictions structurales générées par AlphaFold, des analyses comparatives de séquences et des validations expérimentales par double hybride chez la levure et complémentation bimoléculaire de fluorescence, nous avons proposé et testé plusieurs modèles impliquant les protéines DELLA, SLY1, les cryptochromes CRY et les facteurs de choc thermique (HsF). Nous avons tout d'abord développé et validé une stratégie de production recombinante du complexe ASK1-SLY1, régulateur central de la dégradation des protéines DELLA par ubiquitination. Les modèles structuraux prédits ont permis d'identifier des déterminants moléculaires influençant la solubilité et la stabilité de ce complexe, guidant l'optimisation de sa purification et ouvrant la voie à des analyses biochimiques et thermodynamiques *in vitro*. Par ailleurs, nos analyses structurales ont conduit à la proposition d'un nouveau modèle d'auto-inhibition de l'activité des protéines DELLA, reposant sur des interactions intramoléculaires susceptibles de moduler l'accessibilité de surfaces d'interaction critiques, offrant ainsi un cadre inédit pour comprendre la régulation de leur activité. Nous avons également montré que le photorécepteur CRY1 peut former des oligomères *via* des interfaces conservées analogues à celles décrites pour CRY2. L'identification et la validation fonctionnelle de ces interfaces ont permis de mettre en évidence des résidus clés contrôlant la dynamique d'oligomérisation de CRY1 et l'accessibilité de surfaces d'interaction impliquées dans le recrutement des facteurs de choc thermique, en particulier HsFA1d. Enfin, nous avons démontré que CRY1 interagit directement avec plusieurs protéines HsF *via* une interface structurale conservée, reliant ainsi la perception de la lumière bleue à la régulation transcriptionnelle des réponses au stress thermique. L'identification de déterminants moléculaires modulant ces interactions a permis de suggérer des mutations offrant des perspectives concrètes pour l'amélioration de la tolérance au stress des cultures agricoles. Dans son ensemble, cette thèse illustre comment la combinaison de prédictions structurales et de validations expérimentales permet de construire des modèles intégrés reliant des voies de signalisation jusqu'alors

étudiées séparément. Ces travaux fournissent un cadre d'ingénierie moléculaire pour repenser l'amélioration des plantes.

Mots clés : Prédiction de structures, AlphaFold, voie des gibbérellines, SLY1, DELLA, cryptochromes, CRY1, Facteurs de choc thermique

ABSTRACT

The agricultural sector and global food security are increasingly challenged by population growth and climate change. Historically, improvements in agricultural yields driven by the Green Revolution relied on the manipulation of the gibberellin signaling pathway, notably through the selection of semi-dwarf varieties with controlled growth. While these strategies enabled major productivity gains, they also highlighted the limitations of growth-centered optimization under optimal conditions, particularly in a context marked by the intensification of abiotic stresses. As sessile organisms, plants cannot escape unfavorable environmental fluctuations and therefore rely on finely tuned mechanisms integrating hormonal and environmental signals to maintain homeostasis. This thesis adopts an approach aimed at deciphering, at the molecular scale, the regulatory mechanisms linking the gibberellin pathway, blue-light perception, and the response to heat stress. By combining structural predictions generated by AlphaFold, comparative sequence analyses, and experimental validation using yeast-two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation assays, we proposed and tested several models involving DELLA proteins, SLY1, cryptochromes, and Heat Shock Factors proteins. We first developed and validated a recombinant production strategy for the ASK1-SLY1 complex, a central regulator of DELLA protein degradation through ubiquitination. Predicted structural models enabled the identification of molecular determinants influencing the solubility and stability of this complex, guiding the optimization of its purification and paving the way for *in vitro* biochemical and thermodynamic analyses. In parallel, our structural analyses led to the proposal of a novel model of DELLA protein auto-inhibition mechanism, based on intramolecular interactions likely to modulate the accessibility of critical interaction surfaces, thus providing a new framework to understand the regulation of their activity. We also showed that the photoreceptor CRY1 can form oligomers through conserved interfaces analogous to those described for CRY2. The identification and functional validation of these interfaces revealed key residues controlling CRY1 oligomerization dynamics and the accessibility of interaction surfaces involved in the recruitment of heat shock factors proteins, particularly HsFA1d. Finally, we demonstrated that CRY1 directly interacts with several HsFs proteins through a conserved structural interface, thereby linking blue-light perception to the transcriptional regulation of heat stress responses. The identification of molecular determinants modulating these interactions allowed us to propose mutations offering molecular perspectives for improving stress tolerance in agricultural crops. Overall, this thesis illustrates how the combination of structural predictions and experimental validation enables the construction of integrated models connecting signaling pathways that were previously studied independently. These findings provide a molecular engineering framework to rethink plant improvement strategies.

Keywords: structural predictions, AlphaFold, gibberellin pathway, SLY1, DELLA, cryptochromes, CRY1, heat shock factors

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La Révolution Verte, amorcée au milieu du XX^e siècle, a profondément transformé l'agriculture mondiale en répondant à l'urgence alimentaire d'une population en forte croissance (Evenson et Gollin, 2003; FAO, 1996; Lam, 2011). Elle repose sur l'introduction de variétés végétales à haut rendement, principalement chez les céréales, comme le blé, le riz et le maïs, combinée à une optimisation des pratiques agronomiques, telles que la fertilisation, l'irrigation et la mécanisation des récoltes (FAO, 1996). Ces stratégies ont permis une augmentation spectaculaire des rendements, en ciblant prioritairement la croissance végétative et la productivité par unité de surface (FAO, 1996). Le levier central de cette révolution provient de la manipulation de la voie d'une famille d'hormones végétales : les gibbérellines (Hedden, 2003; Peng *et al.*, 1999). L'introduction de variétés semi-naines, notamment *via* des mutations affectant les régulateurs de cette voie, a ensuite permis de comprendre les déterminants moléculaires protéiques à la base de la croissance (Asano *et al.*, 2009; Cassani *et al.*, 2009; Fujioka *et al.*, 1988; Van De Velde *et al.*, 2021). Les mutations sélectionnées chez les céréales ont réduit l'élongation excessive des tiges évitant la verse des plantes, ce qui facilite les récoltes au moyen de moissonneuses-batteuses tout en maintenant, ou en augmentant, la redistribution des ressources vers les organes consommés (Asano *et al.*, 2009; Cassani *et al.*, 2009; Fujioka *et al.*, 1988; Van De Velde *et al.*, 2021). Cependant, ces succès se sont accompagnés d'une érosion génétique des cultures, fondée sur un nombre restreint de génotypes sélectionnés pour des conditions environnementales dites optimales (Khoury *et al.*, 2022). Aujourd'hui, les rendements tendent à plafonner dans de nombreuses régions du monde, tandis que les cultures issues de la Révolution Verte présentent une vulnérabilité accrue aux stress abiotiques, en particulier la chaleur et la sécheresse (Allen *et al.*, 2018; Mirzabaev *et al.*, 2023; Yamanoshita, 2022). Leur faible diversité et plasticité génétique face aux fluctuations climatiques remet en question la durabilité de la production agricole (Khoury *et al.*, 2022). Les gains de productivité ne suffisent plus s'ils ne s'accompagnent pas d'une robustesse physiologique (Cost, 2025; Kumar *et al.*, 2025). Il est donc primordial de repenser l'agronomie d'aujourd'hui pour assurer une sécurité alimentaire mondiale pérenne (Cost, 2025; Kumar *et al.*, 2025).

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Enjeux du XXI^e siècle reliés à l'alimentation

1.1.1 Pression démographique

Dans les années 60, la Révolution Verte a joué un rôle déterminant dans la mise en place d'une sécurité de l'approvisionnement alimentaire à l'échelle mondiale. Entre 1981 et 2000, l'introduction de variétés à haut rendement agronomique a entraîné une augmentation rapide de 40% de la production alimentaire mondiale par rapport à un scénario sans amélioration variétale, permettant de stabiliser l'accès à l'alimentation (Evenson et Gollin, 2003; FAO, 1996). En 2023, cela représente une augmentation de 250% des cultures céréalières depuis 1961 (Ritchie, 2025). Ces changements ont contribué à renforcer la sécurité alimentaire et l'accès aux ressources nutritionnelles, menant à un décalage entre natalité et mortalité; le moteur principal de la croissance démographique (Lam, 2011; von Der Goltz *et al.*, 2020). Les projections estiment que la population mondiale pourrait atteindre 10 milliards d'individus d'ici 2050 (United Nations, 2022), soit trois fois plus qu'en 1960. Une telle croissance devra s'accompagner d'une augmentation de 50% de la production alimentaire, selon la « Food and Agriculture Organization of the United Nations », pour que tout le monde puisse avoir un accès à l'alimentation (FAO, 2017).

1.1.2 Dérèglement climatique

L'augmentation rapide de la population mondiale, combinée à l'industrialisation et à l'intensification des activités humaines, a profondément modifié les équilibres environnementaux (Fletcher *et al.*, 2024). L'accroissement des besoins alimentaires, énergétiques et industriels s'est accompagné d'une exploitation accrue des ressources naturelles et d'une augmentation des émissions de gaz à effet de serre, contribuant directement aux perturbations climatiques à l'échelle planétaire (Fletcher *et al.*, 2024; Tal, 2025). La température globale de la planète augmente de 0,2 °C par décennie, avec une augmentation record de +1,6 °C en 2024 par rapport à la période préindustrielle. Cette augmentation de la température globale menace les pays les plus vulnérables économiquement, qui constituent en grande partie les régions agricoles essentielles à l'approvisionnement mondial (Allen *et al.*, 2018; Mirzabaev *et al.*, 2023; Yamanoshita, 2022). Les cultures agricoles sont de plus en plus exposées à des épisodes imprévisibles de chaleur extrême, caractérisés par une augmentation de la fréquence, de l'intensité et de la durée des vagues de chaleur (Abatzoglou et Williams, 2016; Seneviratne *et al.*, 2021). Ces stress thermiques peuvent induire une désynchronisation des cycles développementaux des plantes, affectant des processus clés, tels que la

fertilité et donc le rendement (Cost, 2025; Resentini *et al.*, 2023). Il ne s'agit plus uniquement de maximiser la performance des cultures dans des conditions optimales, mais d'optimiser leur performance sous contrainte environnementale. Cette transition impose d'intégrer pleinement la plasticité physiologique et moléculaire des plantes comme critère central de sélection variétale (Cost, 2025; Kumar *et al.*, 2025).

1.1.3 Conséquences moléculaires du stress de haute température

Le stress de haute température altère profondément la physiologie des plantes, affectant leurs croissances et leurs développements (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2025). La température perturbe l'homéostasie protéique conduisant à la dénaturation et l'agrégation des macromolécules, ce qui surcharge les systèmes de chaperonnes et de dégradation des protéines. Le stress modifie également la fluidité des membranes, altérant la perméabilité et la fonctionnalité des complexes protéiques, notamment dans les chloroplastes et les mitochondries (Kumar *et al.*, 2025). En effet, le métabolisme énergétique est particulièrement sensible à la chaleur, la photosynthèse est rapidement inhibée, en raison d'une altération du photosystème II et du transport d'électrons, ce qui favorise l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables de dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines et aux acides nucléiques (Medina *et al.*, 2021). À l'échelle de la plante, le stress thermique induit une reprogrammation hormonale de l'acide abscissique (ABA), gibbérellique (GA) ou jasmonique (JA) (Ahammed *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2025), se traduisant par une inhibition de la croissance végétative et une forte sensibilité des phases reproductives (Cost, 2025; Resentini *et al.*, 2023). En réponse, les plantes activent des mécanismes adaptatifs, notamment *via* des facteurs de transcriptions afin d'atteindre un compromis entre croissance et résistance.

1.1.4 Un compromis entre croissance et résistance

La capacité d'une plante à ajuster finement et au besoin la balance entre croissance et réponse au stress influence sa performance et sa survie dans des environnements fluctuants (Claeys et Inzé, 2013; He *et al.*, 2022). Les plantes ont réussi à mettre en place des mécanismes moléculaires naturels qui régulent finement cet équilibre dans un environnement en constant changement (Bechtold et Field, 2018; Claeys et Inzé, 2013; He *et al.*, 2022). Certaines variétés sont naturellement dotées d'une variabilité génétique qui confère un atout physiologique afin d'optimiser la réponse moléculaire adaptative (Engels et Thormann, 2020; Heywood *et al.*, 2007). La faible variabilité génétique des cultures actuelles, sélectionnées pour des conditions environnementales dites optimales et stables, menace la pérennité de l'agronomie dans ce contexte de réchauffement climatique et de pression démographique (Khoury *et al.*, 2022). Face à l'augmentation de la fréquence des épisodes de stress, la croissance apparaît comme un processus coûteux pour les plantes. Se replonger dans les fondements qui ont permis de comprendre comment les plantes

modulent cette croissance devient nécessaire pour repenser l'agronomie de demain. Historiquement cette question avait déjà émergé à travers l'étude de phénotypes de croissance exacerbée dont l'exemple pionnier est la maladie du riz fou.

1.2 Découverte des mécanismes hormonaux contrôlant la croissance

1.2.1 L'exemple du riz fou

La maladie du *bakanae*, ou maladie du riz fou, est décrite pour la première fois au Japon à la fin du XIX^e siècle. Les plants infectés présentent des anomalies phénotypiques létales, caractérisées par un allongement excessif des parties aériennes, une chlorose et une stérilité sévère (Ito et Klmura, 1931). L'agent responsable de cette maladie est rapidement identifié comme le champignon phytopathogène, *Gibberella fujikuroi* (Ito et Klmura, 1931; Sawada, 1912). Ce champignon est capable de produire des composés responsables de cette croissance aberrante (Sawada, 1912). L'analyse des filtrats de culture du champignon a permis dans les années 30 de conduire à l'isolement des molécules bioactives majoritaires : les gibbérélines. Ces composés sont de puissants stimulants de la croissance végétale. Cette découverte ouvre la voie à l'exploitation agronomique inverse : réduire l'effet de cette hormone pour contrôler la croissance (Hedden et Sponsel, 2015; Phinney, 1983). Chez le riz, l'identification de l'allèle semi-nain « semi-dwarf » (*sd1*) devient le premier mutant qui modifiera l'agronomie. Ce mutant correspond à une délétion de 383 pb qui affecte le cadre de lecture de la GA-20 oxydase (Ashikari *et al.*, 2002). Cette mutation « knock-out » (KO) inhibe la synthèse de GA bioactives, ce qui se traduit par une réduction de l'espace séparant les entre-nœuds et mène à un phénotype semi-nain résistant à la verse (Figure 1.1A) (Tomita, 2024).

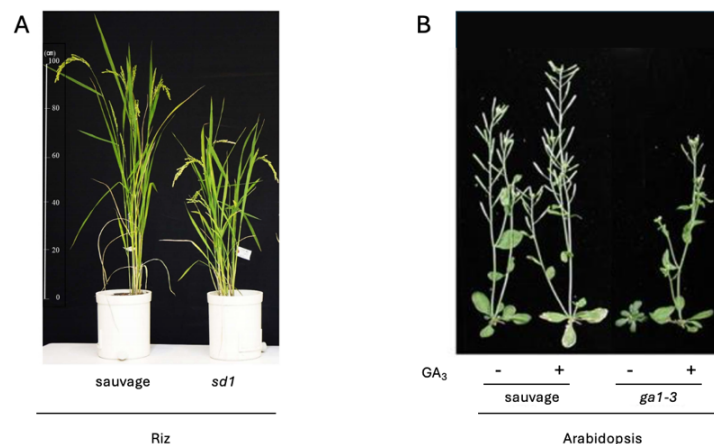


Figure 1.1 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une déficience en synthèse de gibbérélines.

(A) Comparaison de la variété sauvage et semi-naine *sd1* chez *Oryza sativa* (Figure extraite de Tomita, 2024). (B) Comparaison de la variété sauvage et semi-naine *gal-3* chez *Arabidopsis thaliana*, cultivée avec ou sans application exogène de gibbérélines GA₃ (Figure extraite de Dill *et al.*, 2001).

1.2.2 Une déficience en synthèse de GA induit un phénotype nain

Chez le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*, des mutations similaires ont été développées en laboratoire et constituent une avancée majeure dans la compréhension des déterminants à la base de la croissance des végétaux (Figure 1.1B). L'allèle *gal-3* mène à un phénotype nain sévère qui se manifeste par une réduction de l'élongation des parties aériennes, une compaction de la rosette, une absence de montaison, une stérilité et une germination réduite (Dill *et al.*, 2001; Koornneef et Van der Veen, 1980). L'allèle *gal-3* correspond à une substitution nucléotidique ponctuelle sur le gène *GAI*, codant pour une ent-copalyl diphosphatase synthase, enzyme clé des étapes précoces de la biosynthèse des gibbérellines. Cette mutation réduit l'activité catalytique de l'enzyme et les niveaux de GA produits (Dill *et al.*, 2001; Sun et Kamiya, 1994). Au niveau intracellulaire, ce phénotype s'accompagne d'une accumulation des protéines REPRESSOR OF GA₁₋₃ PROTEIN (RGA) ce qui semble ralentir la croissance normale des végétaux (Silverstone *et al.*, 2001). Néanmoins, ce phénotype est complètement réversible par l'application de GA exogènes, confirmant l'absence d'altération des mécanismes de perception du signal hormonal et le rôle de l'hormone elle-même dans l'amorçage du développement végétal (Dill *et al.*, 2001; Koornneef et Van der Veen, 1980).

1.3 Base génétique de l'identification des protéines DELLA

1.3.1 Les cultivars emblématiques de la Révolution Verte

La sélection de variétés naturelles naines du blé a mené à la sélection des allèles *Rht-B1b* et *Rht-D1b*, deux allèles présentant des altérations génomiques qui conduisent à l'apparition d'un phénotype nain résistant au vent et à la verse. Ces allèles correspondent à une réinitialisation de la traduction sur un nouveau codon de départ en aval des séquences codantes des gènes *REDUCED HEIGHT* désormais tronquées de leur extrémité N-terminale (Pearce *et al.*, 2011; Van De Velde *et al.*, 2021) (Figure 1.2A). Des approches de mutagenèses chimiques induites expérimentalement ont permis l'identification d'allèles responsables de phénotypes analogues chez le riz (Figure 1.2B) (Asano *et al.*, 2009). Les allèles *slr1-d1*, *slr1-d2* et *slr1-d3*, sont trois allèles présentant respectivement les mutations ponctuelles M106K, V49M, L99F (Figure 1.2A), suffisantes pour impacter le phénotype (Asano *et al.*, 2009) (Figure 1.2B). De la même manière, des mutations induites expérimentalement par rayon X chez le maïs ont mené à l'identification des allèles *d8-1* et *d8-2023* (Figure 1.2A), responsables également de l'apparition d'un phénotype nain. Ces deux mutations correspondent à la délétion respective de 5 et 17 résidus de l'extrémité N-terminale de la séquence du gène *DWARF8* (Figure 1.2B) (Cassani *et al.*, 2009; Fujioka *et al.*, 1988). L'étude de ces phénotypes similaires chez les céréales s'est prolongée chez le modèle végétal *Arabidopsis thaliana*. Les allèles *rga-Δ17* et *gai-1* mènent à nouveau à l'apparition de phénotypes nains (Figure 1.2B) analogues à ceux observés chez les céréales utilisées pour augmenter les rendements. Ces phénotypes sont dus à une

délétion de 17 acides aminés (aa) englobant un motif Asp-Glu-Leu-Leu-Ala (D-E-L-L-A) hautement conservé chez les protéines TaRHT1, OsSLR1, ZmD8, AtRGA et AtGAI (Figure 1.2A) (Dill *et al.*, 2001). En somme, ces altérations ont permis de révéler le rôle central de ces gènes dans la régulation de la croissance (Dill *et al.*, 2001).

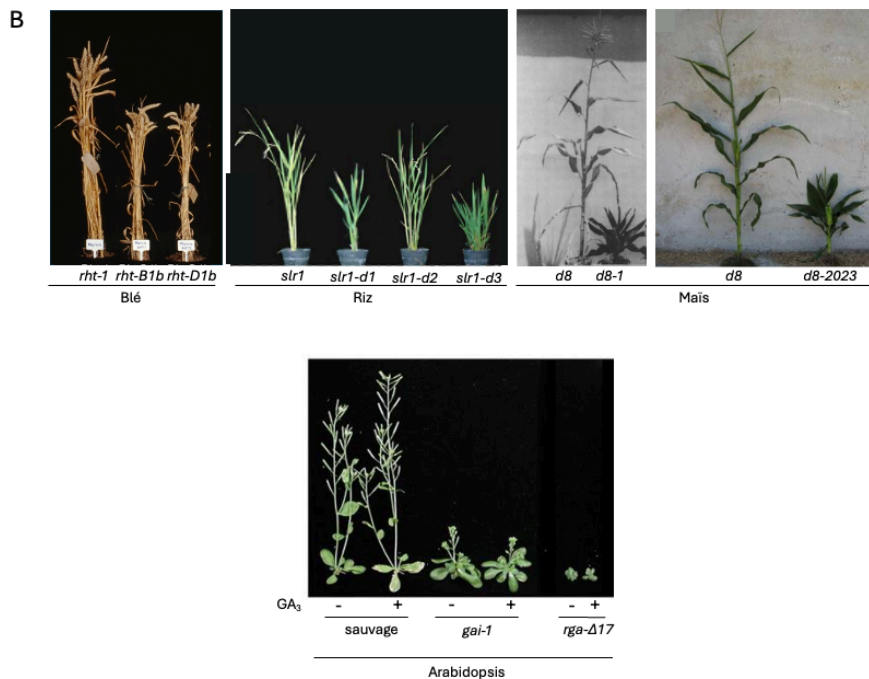
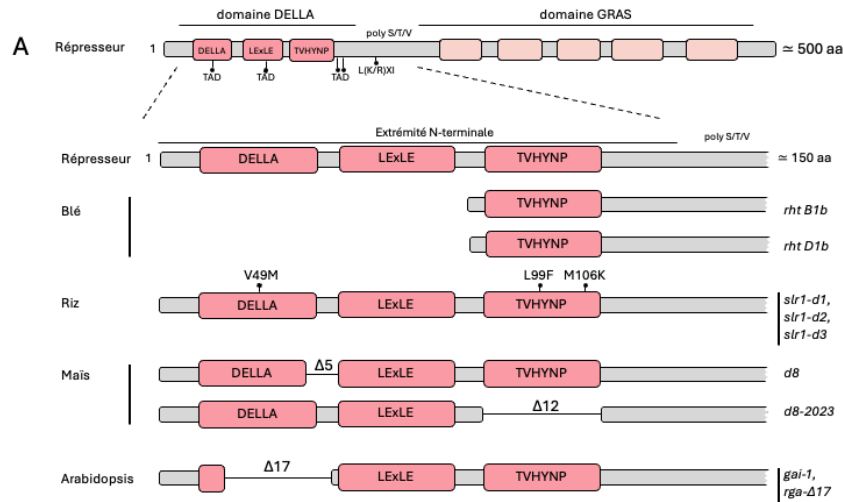


Figure 1.2 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de séquence des protéines DELLA chez les céréales et Arabidopsis.

(A) Cartographie des altérations au niveau de l'extrémité N-terminale des protéines DELLA. Les motifs DELLA, LEXLE et TVHYNP sont représentés par des rectangles (colorés en saumon) sans considération d'échelle. Les mutations ponctuelles sont représentées par des sphères noires. (B) Phénotypes de croissance associés aux altérations chez le blé (Figure extraite de Van De Velde *et al.*, 2021), le riz (Figure extraite de Asano *et al.* 2009), le maïs (Figures extraites de Cassani *et al.*, 2009; Fujioka *et al.*, 1988) et Arabidopsis cultivée avec ou sans application exogène de gibbérellines GA₃ (Figure extraite de Dill *et al.*, 2001).

1.3.2 Identification fonctionnelle des répresseurs constitutifs de la croissance

Les altérations provenant de la délétion au sein des allèles *rga-Δ17* et *gai-1* conduisent à un phénotype nain insensible à la gibbérelline exogène. Au niveau intracellulaire, les formes altérées des protéines RGA et GAI s'accumulent, cela perturbe la signalisation hormonale et entraîne une inhibition de la croissance. La région délétée est donc critique afin de percevoir le signal hormonal et mener à leur dégradation. Un double KO par destruction du cadre de lecture des gènes *RGA* (*rga-24*) et *GAI* (*gai-t6*) conduit à l'inverse à un phénotype de croissance fortement exacerbée, confirmant le rôle répresseur de la région C-terminale de ces protéines. En revanche, lorsque chaque KO est combiné individuellement à l'allèle *gal-3*, les plants présentent à nouveau un phénotype semi-nain, ce qui suggère une redondance fonctionnelle entre les gènes *RGA* et *GAI*. Le triple mutant *gal-3 rga-24 gai-t6* sauve quant à lui le phénotype (Figure 1.3) (Dill *et al.*, 2001). Ainsi, dans un contexte de déficience de la synthèse de GA (*gal-3*) et par application de GA exogène, l'analyse des phénotypes de différents KO a permis d'identifier cinq gènes codants pour cinq protéines de ces répresseurs de la croissance chez *Arabidopsis thaliana* (Park *et al.*, 2013; Tyler *et al.*, 2004). Les GA ne stimulent donc pas directement la croissance, mais lèvent une répression provenant des protéines RGA et GAI (Dill *et al.*, 2001; Silverstone *et al.*, 2001). En conclusion, ces observations soulignent une organisation fonctionnelle bipartite de la protéine, une région N-terminale essentielle à la perception du signal hormonal et une région C-terminale qui porte la fonction de répression de croissance (Dill *et al.*, 2001; Silverstone *et al.*, 2001).



Figure 1.3 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des protéines DELLA chez *Arabidopsis*.

Phénotypes provenant de combinaisons de mutations multiples, sur les gènes de la voie des gibbérellines (Figure extraite de Dill *et al.*, 2001). Les allèles *rga-24* et *gai-t6* correspondent respectivement à des knock-out des gènes *RGA* et *GAI*. L'allèle *gal-3* correspond à un « knock-down » du gène responsable des étapes précoces de la biosynthèse de la gibbérelline.

1.3.3 Rôle physiologique des protéines DELLA

Les études phylogénétiques ont permis d'identifier ce groupe de répresseurs de croissance comme faisant partie d'une petite famille de régulateurs transcriptionnels nucléaires appelée DELLA, faisant référence au motif fonctionnel éponyme D-E-L-L-A qu'elles contiennent dans leurs extrémités N-terminale. Ces protéines dérivent d'une famille de protéines plus large (les protéines GRAS) avec qui elles partagent un domaine éponyme en C-terminal (Jaiswal *et al.*, 2022; Thomas et Sun, 2004). Les DELLA ont émergé chez l'ancêtre commun à toutes les plantes terrestres avant la divergence entre monocotylédones, et dicotylédones (Phokas et Coates, 2021). Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve cinq protéines DELLA, chacune impliquée dans une fonction spécifique du développement végétal, néanmoins, elles partagent également une certaine redondance fonctionnelle (Cao *et al.*, 2005; Dill *et al.*, 2001; King *et al.*, 2001) (1) GA-INSENSITIVE PROTEIN (GAI) impliquée dans l'élongation de la tige, le développement des organes reproducteurs et la photo-morphogenèse (Stavang *et al.*, 2009). (2) REPRESSOR OF GA₁₋₃ PROTEIN (RGA), impliquée dans l'inhibition de l'élongation cellulaire, de la transition de l'état végétatif à l'état floral, et de l'expression des gènes de biosynthèse de la gibbéréline (Cao *et al.*, 2005; Stavang *et al.*, 2009). (3) RGA-LIKE 1 PROTEIN (RGL1) impliquée dans l'élongation de la tige, le contrôle du développement floral, le développement du pollen et joue un rôle dans l'intégration des signaux de stress (Cao *et al.*, 2005; Stavang *et al.*, 2009). (4) RGA-LIKE 2 PROTEIN (RGL2), impliquée dans l'élongation de la tige et la germination (Lee *et al.*, 2002; Stavang *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2004). (5) RGA-LIKE 3 PROTEIN (RGL3), fortement induite en cas de stress de chaleur, de sécheresse et salinité, elle module négativement la croissance, mais joue aussi un rôle transactivateur en mettant en place des stratégies de survie (Achard *et al.*, 2008; Piskurewicz et Lopez-Molina, 2009; Wild *et al.*, 2012). Ces rôles de régulateurs de la croissance proviennent des motifs structuraux hautement conservés dans la région C-terminale des protéines GRAS (Figure 1.4A) (Hirano *et al.*, 2017; Pysh *et al.*, 1999).

1.4 Structure et fonction des protéines DELLA

1.4.1 Le domaine DELLA

La particularité des protéines DELLA provient de l'acquisition d'un domaine DELLA éponyme intrinsèquement désordonné en N-terminal de la séquence et spécifique à cette sous-famille des protéines GRAS (Figure 1.4A) (Jaiswal *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2010b; Thomas et Sun, 2004). On y retrouve de courts motifs linéaires (SLiM) conservés qui jouent le rôle d'éléments structuraux fonctionnels (Hernández-García *et al.*, 2024; Wang et Lin, 2025), dont les domaines de transactivation (TAD) répétés qui régulent l'expression génique (Hernández-García *et al.*, 2024; Hussain *et al.*, 2005). La structure élucidée du domaine DELLA par cristallographie (PDB 2ZSH) montre que ce domaine se structure en trois hélices α

lorsque la protéine DELLA rencontre son partenaire d'interaction : le récepteur hormonal $GID1(GA)$ (Murase *et al.*, 2008) (Figure 1.4B). Une fois structurées, ces trois hélices exposent respectivement des motifs hydrophobes conservés essentiels, à l'interaction avec $GID1$: le motif éponyme DeLLaWLxYxV, le motif MAxVAxxLExLExW et le motif TVhynPxxLxxWxxxM (Murase *et al.*, 2008). Dans ces motifs, les lettres majuscules désignent des résidus directement impliqués dans des interactions, tandis que les lettres minuscules correspondent à des résidus non engagés. La nature désordonnée du domaine non lié et la nature hydrophobe des interactions que DELLA réalise avec son partenaire constituent un défi pour son isolation *in vitro* (Murase *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010b). Le domaine DELLA est relié au domaine GRAS par une région également désordonnée riche en résidus sérine, thréonine et valine (poly S/T/V), qui est le lieu de modifications post-traductionnelles (MPT) (Figure 1.4A) (Hussain *et al.*, 2005; Jaiswal *et al.*, 2022; Thomas et Sun, 2004). La substitution en résidus acides des sérines et thréonines conservées dans cette région mime des phosphorylations. Ces MPT influencent la stabilité des protéines DELLA en conférant une résistance à la dégradation médiée par les GA (Hussain *et al.*, 2005). De plus, un motif L(K/R)XI fortement conservé a également été identifié dans cette région ; les analyses prédictives suggèrent qu'il est impliqué dans la voie des gibbérellines et potentiellement dans l'interaction avec d'autres partenaires de cette voie, bien que sa fonction précise n'ait pas encore été démontrée (Sun *et al.*, 2010b) (Figure 1.4A).

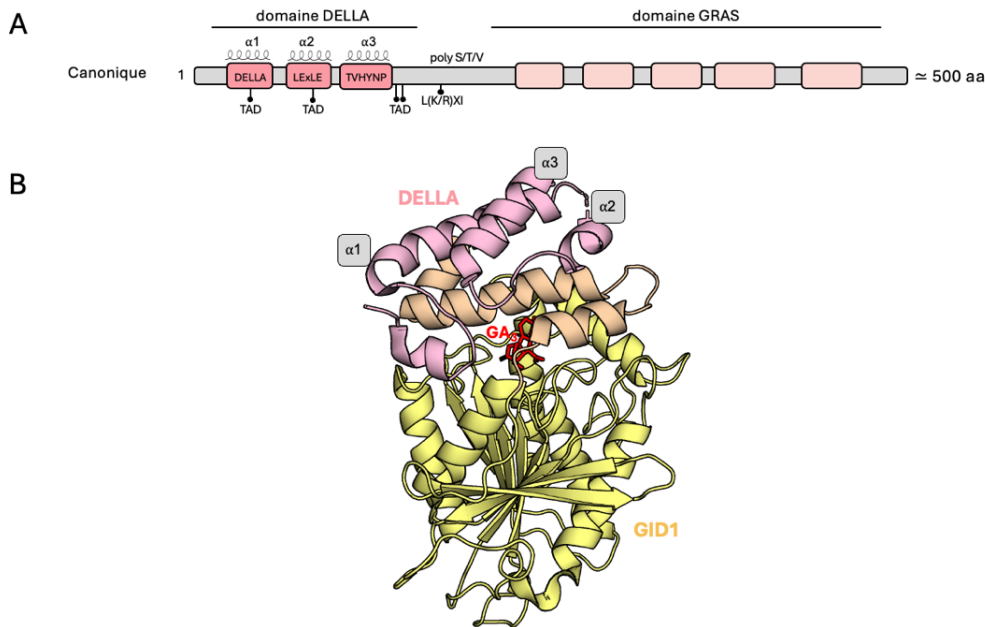


Figure 1.4 Organisation structurale du domaine DELLA.

(A) Cartographie schématique des protéines DELLA canoniques. Les motifs DELLA, LExLE et TVHYNP du domaine DELLA sont représentés par des rectangles colorés en saumon. Les trois hélices α élucidées du domaine DELLA sont représentées schématiquement au-dessus des motifs qu'elles contiennent. Les motifs fonctionnels supplémentaires sont représentés par des sphères noires. Les motifs conservés du domaine GRAS sont suggérés par des rectangles colorés en rose. (B) Structure élucidée par cristallographie du complexe $GAI^{DELLA} - GID1A(GA)$ (PDB 2ZSH).

1.4.2 Le domaine GRAS

Les protéines DELLA possèdent aussi un domaine GRAS qu'elles partagent avec tous les membres de cette famille de régulateurs transcriptionnels (Figure 1.5A). Ce domaine est formé de deux régions structurales : une coiffe hélicoïdale en N-terminal, et une région α/β en C-terminal (Hirano *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016; Pysh *et al.*, 1999) (Figure 1.5B et 1.5C). Le domaine GRAS comporte cinq motifs conservés : les « Leucine Heptad Repeat » 1 et 2 (LHR1 et LHR2), ainsi que trois motifs consensus, Val-His-Iso-Iso-Asp (V-H-I-I-D), Pro-Phe-Tyr-Arg-Glu (P-F-Y-R-E) et Ser-Asp-Trp (S-A-W) qui sont décrits comme essentiels pour la fonction de séquestration des facteurs de transcription (Hirano *et al.*, 2017; Pysh *et al.*, 1999). Alors que les protéines DELLA sont actives sous forme de monomère, la structure élucidée par cristallographie du complexe SHORT-ROOT-SCARECROW (PDB 5B3H) montre la formation d'hétérodimères de protéines GRAS (Figure 1.5B) *via* la coiffe hélicoïdale en N-terminal (Hirano *et al.*, 2017). Fait intéressant, la structure élucidée par cristallographie de la protéine GRAS du riz SCARECROW-LIKE 7 (PDB 5HYZ), montre la formation d'homodimères fonctionnels actifs du domaine GRAS (Figure 1.5C) *via* la région α/β en C-terminal dessinant ensemble une surface basique capable *in vitro* de réaliser des interactions électrostatiques avec l'ADN. Ces données suggèrent une potentielle fonction transcriptionnelle sans domaine de liaison à l'ADN canonique (Li *et al.*, 2016).

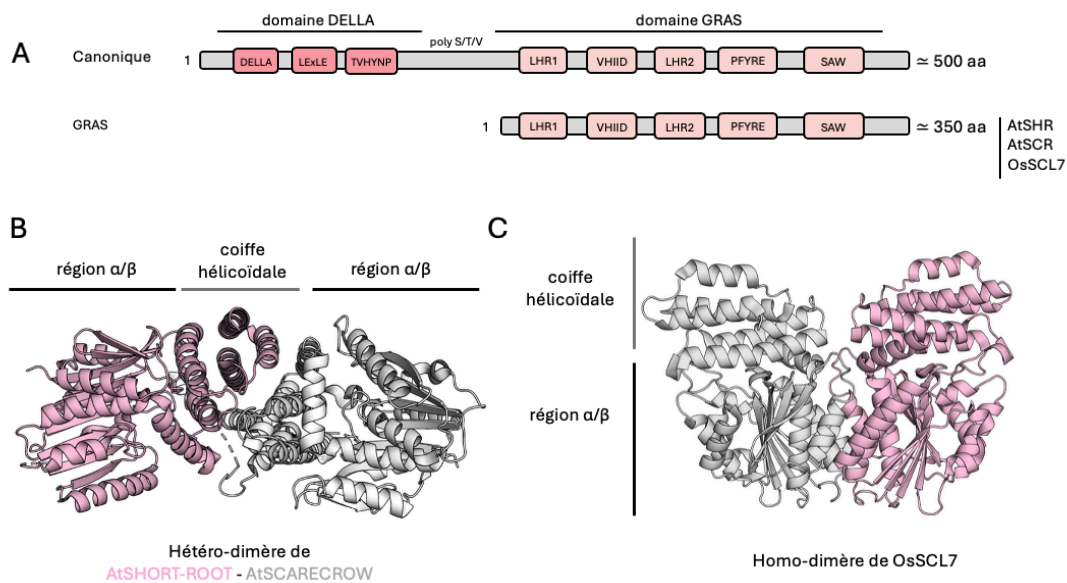


Figure 1.5 Organisation et structures dimériques des protéines GRAS.

(A) Cartographie schématique des protéines GRAS (structure canonique des protéines DELLA, AtSHORT-ROOT en rose (AtSHR), AtSCARECROW en gris (AtSCR) et OsSCL7). Les motifs DELLA, LEXLE et TVHYNP du domaine DELLA sont représentés par des rectangles colorés en saumon. Les motifs conservés LHR1, VHIID, LHR2, PFYRE et SAW des protéines GRAS sont représentés par des rectangles colorés en rose. (B) Structure tridimensionnelle de l'hétérodimère AtSHORT-ROOT - AtSCARECROW (PDB 5B3H) *via* la coiffe hélicoïdale en N-terminal. (C) Structure tridimensionnelle de l'homodimère de OsSCL7 (PDB 5HYZ) *via* la région α/β en C-terminal.

1.4.3 Modulation de la croissance lors d'un stress thermique

Chez *Arabidopsis thaliana*, une élévation modérée de la température (entre 27 °C et 30 °C), déclenche la thermomorphogenèse, une réponse adaptative pendant laquelle la plante favorise la croissance par la voie des gibbérellines. Cela conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de GA et à la dégradation progressive des répresseurs DELLA. La perte de répression permet la libération des facteurs de transcription, tels que le PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4), qui orchestre des ajustements morphologiques favorisant la dissipation de la chaleur, notamment par l'allongement des tiges, et l'augmentation de l'angle foliaire ce qui permet à la plante de maintenir son homéostasie thermique par la croissance (Casal et Balasubramanian, 2019; Kumar *et al.*, 2025). Lorsque la température dépasse cette plage modérée ou que les épisodes de chaleur se prolongent, la dynamique hormonale s'inverse, la concentration en GA diminue progressivement et la concentration de d'autres hormones, comme l'ABA (hormone clé qui favorise l'acclimatation de la plante en condition de stress) augmentent. La plante bascule vers une stratégie de tolérance au stress, caractérisée par l'activation massive des HEAT SHOCK PROTEINS (HSP). Dans ce contexte, les protéines DELLA s'accumulent à nouveau et inhibent l'activité de PIF4 par séquestration, conduisant à un ralentissement marqué de la croissance. La plante sacrifie alors son expansion morphologique au profit de la protection cellulaire et de la survie à court terme (Casal et Balasubramanian, 2019; Kumar *et al.*, 2025).

1.5 Perception du signal hormonal

1.5.1 Ingénierie de mutants insensibles à la gibbérelline

La compréhension du mécanisme à la base de la perception moléculaire du signal hormonal s'est faite par l'ingénierie de mutants. En plus des protéines DELLA, le gène *GID1 GA-INSENSITIVE DWARF1* a été identifié chez le riz par le criblage de mutants nains insensibles aux GA. Ces mutants présentent une croissance réduite et une insensibilité à l'ajout de GA exogènes (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). L'allèle KO *gid1-1* mène à un phénotype nain, sauvé par la surexpression de SmGID1a et SmGID1b provenant de *Selaginella moellendorffii*, qui restaure un phénotype sauvage (Figure 1.6A) (Hirano *et al.*, 2007; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). Le phénotype nain équivalent provenant du KO *gid1-3* est lui aussi sauvé, mais cette fois-ci par le KO du gène DELLA *slr1-1*. Ces doubles mutants montrent l'importance de la protéine GID1 dans la croissance, mais surtout son rôle intime avec la protéine DELLA (Figure 1.6B) (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). L'expression hétérologue et la purification de AtGID1, réalisées à des fins de mesure de l'affinité entre les gibbérellines et GID1 par résonance des plasmons de surface, ont permis de confirmer le rôle de cette protéine en tant que récepteur protéique de l'hormone avec un ratio d'interaction 1:1 (Sheerin *et al.*, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana* 3 GID1, GID1a, b et c, ont été identifiées. Les allèles *gid1a*, *gid1b* ou *gid1c* délétés individuellement ne conduisent à aucune modification phénotypique majeure (Figure

1.6C). Par contre, le triple *KO gid1a gid1b gid1c* conduit quant à lui à un phénotype encore plus sévère que l'allèle *gal-3* déficient en GA (Figure 1.6C), ce qui laisse entrevoir une activité résiduelle des GID1, même en absence de GA (Figure 1.7C) (Griffiths *et al.*, 2006). Des expériences de double hybride chez la levure couplées à une mesure de l'expression du gène rapporteur de la β - galactosidase ont confirmé la nécessité du couple (récepteur + hormone) afin de recruter la protéine RGL1 (Sheerin *et al.*, 2011). Néanmoins, les délétions Δ DELLVVLGYKVRSSDMA et Δ NLSDET VHYNPSDLSGWV respectivement similaires aux altérations présentes chez les allèles *rga17* d'Arabidopsis et *d8-2023* du maïs, sont suffisantes pour abolir l'interaction, ce qui est confirmé par le phénotype *rgl1-17* chez *Arabidopsis thaliana* (Cassani *et al.*, 2009; Dill *et al.*, 2001; Wen et Chang, 2002).

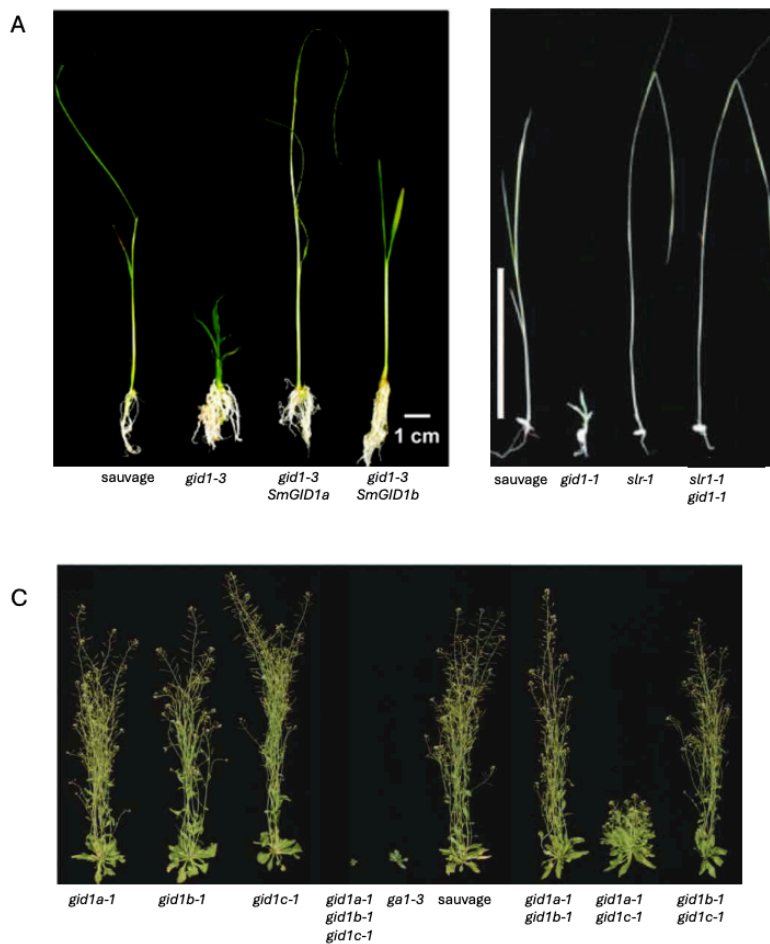


Figure 1.6 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des protéines GID1 chez le riz et Arabidopsis.

(A) Phénotypes de surexpression des protéines GID1a et GID1b provenant de l'espèce *Selaginella moellendorffii* chez un mutant *KO gid1-3* du riz (Figure extraite de Hirano *et al.*, 2007). (B) Phénotypes provenant de mutations multiples *KO gid1-1* et *slr1-1* (Figure extraite de Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). (C) Phénotypes provenant de mutations multiples *KO* des gènes *GID1* chez *Arabidopsis thaliana* (Figure extraite de Griffiths *et al.*, 2006).

1.5.2 Redondance et spécificité des GID1 d'Arabidopsis

Malgré la redondance des GID1, les trois formes ne sont pas exprimées de la même manière dans tous les tissus (Nakajima *et al.*, 2006; Yano *et al.*, 2015). Des expériences de triple hybride chez la levure et de microbalance à quartz couplées à l'analyse des phénotypes des KO simple, double et triple des gènes *GIDI* ont permis de montrer que chaque protéine GID1 ne possède pas la même affinité pour les cinq protéines DELLA (Griffiths *et al.*, 2006; Hirano *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009). GID1a est plus exprimée dans les tiges, elle possède une forte affinité pour les trois RGL et gouverne leur dégradation. GID1a répond rapidement au signal hormonal pour ajuster le niveau de DELLA intracellulaire. GID1b, quant à elle, possède une forte affinité pour RGA et GAI mais sa vitesse de dissociation avec la gibbérelline est lente. Elle est donc moins adaptée aux variations rapides de conditions (Hirano *et al.*, 2007). Cette différence provient de la présence d'une mutation dans la jonction qui relie le couvercle au corps de GID1 (Figure 1.8), ce qui confère une forme du récepteur pratiquement fermée et donc une forme constitutivement active (Nelson et Steber, 2016; Suzuki *et al.*, 2009). GID1c est considérée quant à elle comme un soutien généraliste à la voie des gibbérellines sans partenaire préférentiel (Hirano *et al.*, 2007).

1.5.3 Structure des récepteurs GID1

Les récepteurs GID1 partagent une structure commune formée d'une région désordonnée en N-terminal, ainsi que d'un corps protéique α/β bien replié en C-terminal, hérité et dérivé d'une carboxyle-estérase (Figure 1.7A). Cette estérase modifiée a perdu son activité catalytique, et dessine une poche de liaison pour les GA (Shimada *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2018). L'hormone se fixe au fond de la poche et forme des ponts hydrogènes avec des molécules d'eau piégées dans la cavité (Murase *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2018). La fixation de la GA dans la poche force le repliement de la région N-terminale en trois hélices α , formant un couvercle qui emprisonne physiquement l'hormone dans le corps protéique (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025; Murase *et al.*, 2008) (Figure 1.7B). Une fois structurées, ces hélices révèlent une nouvelle surface d'interaction. Ensemble, le complexe GID1(GA) interagit avec les motifs hydrophobes du domaine DELLA identifiés précédemment dans la section 1.4.1 (Murase *et al.*, 2008) (Figure 1.7C). La structure élucidée par cryo-EM du complexe RGA/GID1(GA) montre que le domaine DELLA joue alors le rôle de pont moléculaire et facilite l'arrimage du domaine GRAS sur le récepteur hormonal. Le domaine GRAS ne joue plus un simple rôle de plateforme modulateur de la transcription, mais joue également un rôle actif dans la perception du signal hormonal *via* une interaction physique au récepteur GID1 (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025) (Figure 1.7C). Une modélisation par AlphaFold v3 a d'ailleurs permis de montrer que GID1 et les facteurs de transcription INDETERMINATE-DOMAIN PROTEIN (IDD) compétitionnent pour interagir pour la même surface du domaine GRAS. Ces données laissent entrevoir une mécanistique

moléculaire par laquelle GID1 supprime l'activité répressive des protéines DELLA (Yoshida et Matsuoka, 2025).

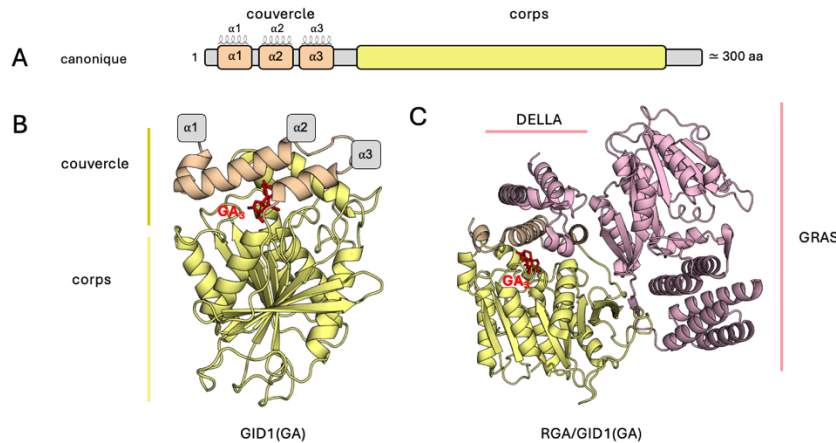


Figure 1.7 Organisation et structure de GID1 en complexe avec RGA.

(A) Cartographie schématique des protéines GID1. Les trois hélices α élucidées du couvercle de GID1 sont représentées schématiquement. (B) Structure élucidée de GID1a emprisonnant une molécule de gibbérelline dans la cavité du corps protéique α/β . Les trois hélices α en N-terminal, s'ordonnent pour former un couvercle afin de piéger la gibbérelline. (C) Structure élucidée de GID1a(GA)/RGA (PDB 9O4K). Contribution physique du domaine DELLA ainsi que du domaine GRAS, respectivement dans la reconnaissance du couvercle et du corps de GID1.

1.6 Reconnaissance du complexe DELLA/GID1(GA)

1.6.1 Contribution de la protéine SLY1

Dégrader les protéines DELLA à la suite de la perception du signal hormonal nécessite de les identifier par une machinerie de protéolyse. Le phénotype nain sévère associé à la double mutation nulle *rga-24* et *gai-16* chez *Arabidopsis thaliana* est sauvé par le KO du gène *SLEEPY1* (*SLY1*) (Figure 1.8A), témoignant de la contribution de la protéine SLY1 en amont de la reconnaissance du complexe DELLA/GID1(GA) pour sa dégradation (Fu *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2003). D'une part, l'allèle *sly1-10* conduit à l'apparition d'un phénotype nain sévère et à une accumulation intracellulaire des protéines DELLA (McGinnis *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2003). Ce phénotype est dû à une troncation de 23 pb en C-terminal associée à une insertion de 8 kb menant à l'absence d'expression de la protéine SLY1 (McGinnis *et al.*, 2003). Le mutant KO est également sauvé par la surexpression de SLY1, ou partiellement sauvé par la surexpression de SLEEPY2 / SNEEZY1 (SNE1) (Figure 1.8B), témoignant de la redondance fonctionnelle entre les protéines SLY1 et SNE1 (Fu *et al.*, 2004). D'autre part, le mutant *sly1-2* mène également à un phénotype semi-nain (Figure 1.8C) associé à un décalage du cadre de lecture à la suite d'une délétion de deux paires de bases au niveau du 112^e résidu de SLY1 (Figure 1.8D), produisant une protéine chimérique, conservant un N-terminal sauvage, mais une région C-terminale alternative et non fonctionnelle ne permettant plus le recrutement des DELLA (McGinnis *et al.*, 2003). Ce phénotype est sauvé à son tour par le KO additionnel *rga-24* (Figure

1.8C). La région C-terminale constitue ainsi le déterminant critique de la reconnaissance des répresseurs (Fu *et al.*, 2004; McGinnis *et al.*, 2003). Des expériences de triple hybrides chez la levure couplées à une mesure de l'expression du gène rapporteur de la β -galactosidase ont confirmé que AtSLY1 et son orthologue chez le riz OsGID2 présentent une affinité pour DELLA (respectivement AtRGL1 et OsSLR1), uniquement en présence du récepteur GID1 et de la GA (Hirano *et al.*, 2010; Sheerin *et al.*, 2011).

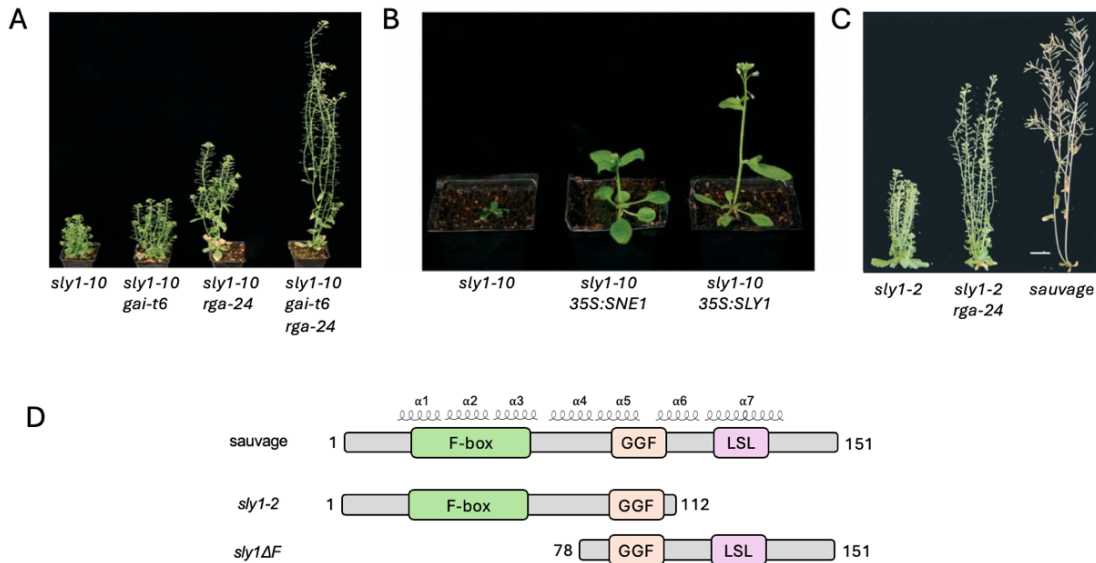


Figure 1.8 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des protéines SLY1 chez Arabidopsis.

(A) Phénotype semi-nain provenant de l'allèle *KO sly1-10* sauvé par les *KO* additionnels *gai-t6* et/ou *rga-24* (Figure extraite de Fu *et al.*, 2004) (B) Phénotypes associés à la surexpression des protéines SNE1 et SLY1 chez les *KO sly1-10* (Figure extraite de Fu *et al.*, 2004). (C) Phénotypes semi-nain causés par l'allèle *KD sly1-2* sauvés par le *KO* additionnel *rga-24* (Figure extraite de McGinnis *et al.*, 2003). (D) Cartographie des altérations des protéines SLY1. Les motifs F-box, GGF et LSL de SLY1 sont représentés par des rectangles colorés respectivement en vert, orange et rose. Les sept hélices α prédites de la protéine sont représentées schématiquement au-dessus de la séquence en respectant leurs positions par rapport aux motifs.

1.6.2 SLY1 : un adaptateur devenu spécifique

La protéine SLY1 est apparue très tôt dans l'évolution des végétaux terrestres chez l'ancêtre commun aux plantes hépatiques. Une modélisation par AlphaFold v2 a permis de prédire la structure tridimensionnelle de SLY1, formée de sept hélices α (Figure 1.9A) (Ji *et al.*, 2023). La forme ancestrale de SLY1 provenant de *Marchantia polymorpha* possède une forte flexibilité de sa dernière hélice $\alpha 7$ due à la présence d'une tyrosine qui confère une latitude conformationnelle de l'hélice afin de contacter un large spectre de partenaires GRAS (Ji *et al.*, 2023). La spécialisation fonctionnelle de SLY1 pour DELLA chez les plantes vasculaires, a permis de mettre en place une régulation encore plus fine de la voie des gibbérellines.

L'introduction d'une mutation ponctuelle équivalente H104Y chez *Arabidopsis thaliana* (Figure 1.9B), mimant la forme ancestrale de MpSLY1 et déstabilise la compaction structurale de AtSLY1 (Ji *et al.*, 2023). La mutation introduit un résidu fortement polaire au sein d'un environnement hydrophobe, ce qui conduit à un phénotype gain de fonction. L'allèle *sly1H104Y* est capable de sauver le phénotype des mutants *gai-1* contournant l'insensibilité à la gibbérelline (Figure 1.9B) (Ji *et al.*, 2023)

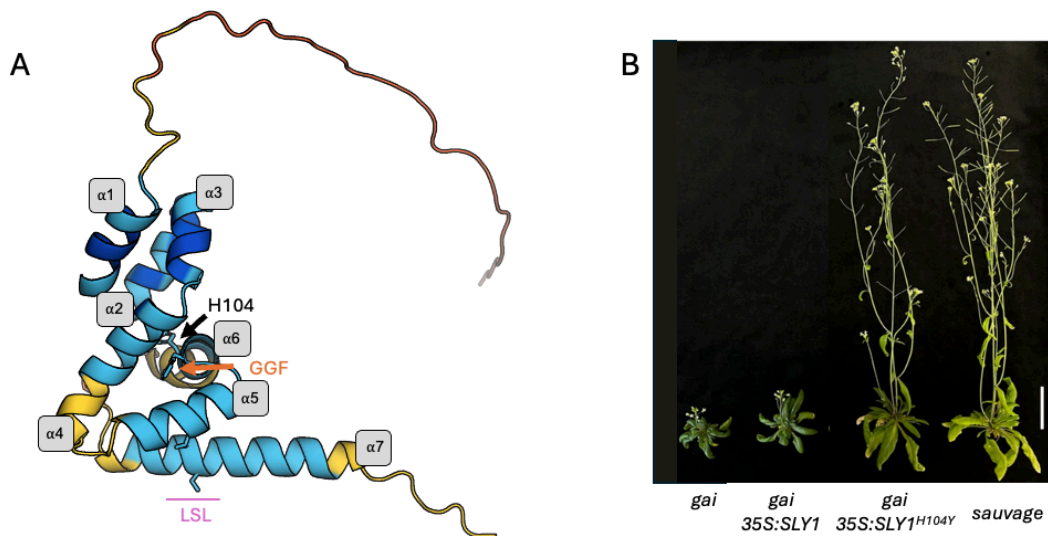


Figure 1.9 Visualisation des déterminants structuraux de la protéine SLY1 et impact phénotypique de la mutation H104Y.

(A) Prédiction par AlphaFold de la structure tridimensionnelle de la protéine SLY1 d'*Arabidopsis thaliana*. Cette prédiction illustre une structure principalement composée d'hélices α . Les motifs fonctionnels hautement conservés GGF (orange) et LSL (rose), ainsi que la position du résidu H104, substitué en tyrosine chez *Marchantia polymorpha* sont représentés en bâtonnets. (B) Sauvetage du phénotype insensible à la gibbérelline *gai-1*, par la surexpression du gain de fonction H104Y chez *Arabidopsis* (Figure extraite de Ji *et al.*, 2023).

1.6.3 L'hélice $\alpha 7$ de SLY1

Un criblage par substitution en alanine des résidus de OsGID2, réalisé en double hybride chez la levure, a permis de décortiquer la contribution de chaque acide aminé de SLY1 dans l'interaction avec OsSLR1 et OsGID1 (Hirano *et al.*, 2010). Les deux motifs hautement conservés, GGF et LSL, semblent contribuer majoritairement à cette interaction. Leur délétion mène à l'apparition d'un phénotype nain sévère dû à l'incapacité de contacter les DELLA afin de mener à leur dégradation (Figure 1.10A et 1.10B) (Gomi *et al.*, 2004). À l'inverse, le mutant *sly1-d / garu2* est un mutant gain de fonction, il correspond à une substitution ponctuelle E138K située à proximité du motif LSL (Figure 1.10A) (Fu *et al.*, 2004). Le phénotype nain des mutants *rga-117* et *gai-1* (insensible à la GA) sont sauvés par l'allèle *sly1-d* qui contourne également le besoin d'un signal hormonal pour mener à la dégradation des DELLA (Figure

1.10B) (Dill *et al.*, 2001). Fait intéressant et inattendu, des tests de triple hybride chez la levure révèlent une augmentation significative de l'affinité de SLY1^{E138K} pour RGL1^{Δ17} (analogue aux mutants *gai-1* ou *rga-Δ17*) en absence de la protéine GID1 et de l'hormone (Sheerin *et al.*, 2011). Cette observation suggère que la région intrinsèquement désordonnée des protéines DELLA pourrait masquer le sillon du domaine GRAS requis pour le recrutement de l'hélice $\alpha 7$ de SLY1, et que la délétion au sein de ce domaine lève cette contrainte structurale (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025; Sheerin *et al.*, 2011).

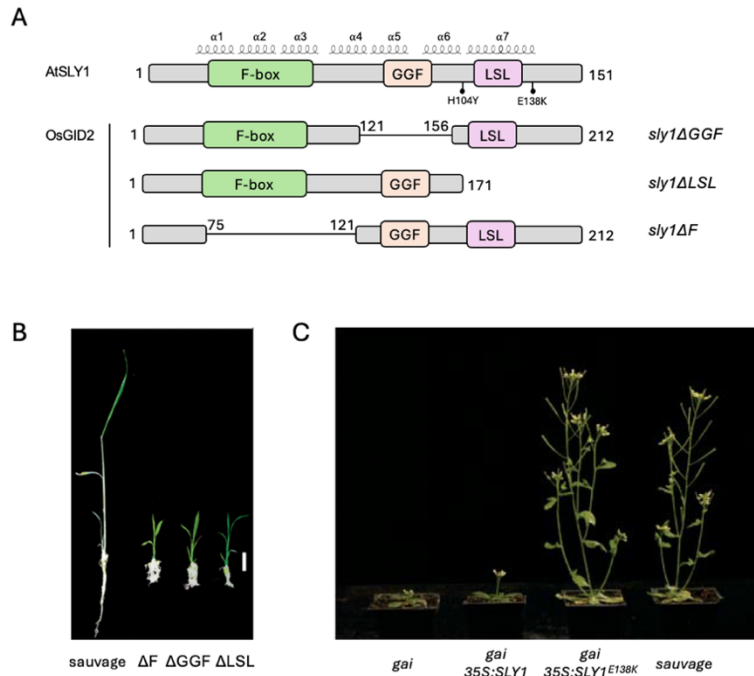


Figure 1.10 Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de l'hélice $\alpha 7$ chez AtSLY1 et OsGID2.

(A) Cartographie des altérations des protéines AtSLY1 et OsGID2. Les motifs F-box, GGF et LSL de GID2 sont représentés par des rectangles colorés respectivement en vert, orange et rose. Les sept hélices α prédites de la protéine sont représentées schématiquement au-dessus de la séquence en respectant leurs positions par rapport aux motifs. Les substitutions H104Y et E138K sont représentées par des sphères noires. (B) Phénotypes de croissance associés aux délétions de séquences chez le riz (Figure extraite de Gomi *et al.*, 2004). (C) Sauvetage du phénotype insensible à la gibbérelline *gai-1*, par la surexpression du gain de fonction E138K chez *Arabidopsis* (Figure extraite de Fu *et al.*, 2004)

1.6.4 Rôle structural du motif F-box de la protéine SLY1

Compte tenu de la petite taille de SLY1 et de l'implication de la région C-terminale dans la reconnaissance de DELLA, le reste de la protéine est organisé autour d'un petit motif fonctionnel conservé : le motif F-box. Chez *Arabidopsis thaliana*, on retrouve jusqu'à 700 protéines F-box, chacune impliquée dans des voies de protéolyse bien distinctes. Des expériences de double hybride chez la levure couplées à une mesure de l'expression du gène rapporteur de la β -galactosidase ont montré que la délétion de la région N-terminale

de AtSLY1 chez le mutant *sly1ΔF*, (délété du motif F-box) conserve sa capacité à interagir avec les protéines DELLA, mais perd sa capacité à interagir avec la machinerie de protéolyse *via* la protéine ASK1 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 1) (Gomi *et al.*, 2004). La structure du motif F-box est formée de trois hélices α compactes hautement conservées qui a été élucidée par résonance magnétique nucléaire chez la protéine humaine SKP2 (Kim *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2002). Cette organisation structurale est confirmée dans la structure récemment élucidée du complexe ASK1/SLY1/RGA/GID1a(GA) (Figure 1.11), dans laquelle le motif F-box de SLY1 est engagé dans une interaction directe avec la protéine ASK1 *via* des contacts hydrophobes (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025; Kim *et al.*, 2020). Les déterminants moléculaires hydrophobes limitent l'isolation de la protéine dans un système d'expression hétérologue. La coexpression de SLY1 avec ses deux partenaires obligatoires ASK1 et DELLA s'est révélée nécessaire pour l'élucidation de la structure (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025; Kim *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2017). ASK1 constitue le maillon supplémentaire qui permet à la machinerie de protéolyse de percevoir le signal hormonal (Santner et Estelle, 2010; Zheng *et al.*, 2002).

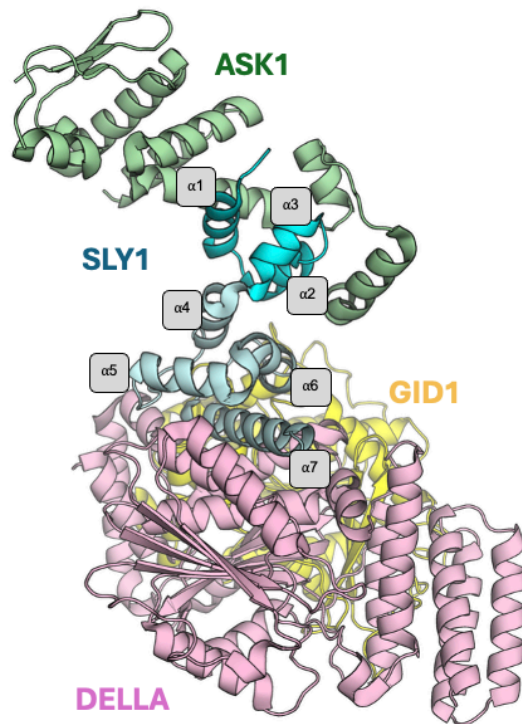


Figure 1.11 Rôle structural de ASK1 dans la reconnaissance du motif F-box de SLY1.

Contribution de ASK1 à la régulation de la croissance par la voie des gibbérellines. Structure tridimensionnelle du complexe ASK1/SLY1/RGA/GID1a(GA) élucidée par cryo-EM (PDB 9O4K). ASK1 est représenté en vert, SLY1 en bleu, RGA en rose et GID1 en jaune. Le motif F-box de SLY1 est représenté en cyan pour insister sur son rôle de pont moléculaire entre ASK1 et la protéine DELLA afin d'intégrer la réponse hormonale.

1.6.5 Accessibilité au motif F-box par ASK1

Les protéines ASK possèdent une architecture typique des protéines S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1 (SKP1), comprenant un domaine N-terminal compact majoritairement α -hélicial, suivi d'un domaine C-terminal désordonné qui constitue la plateforme d'interaction et de stabilisation du motif F-box (Kim *et al.*, 2020). Chez *Arabidopsis thaliana*, ASK1 appartient à une famille de 21 protéines fonctionnelles semi-redondantes (Fu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2020). Des tests de double hybride chez la levure ont montré que SLY1 et SNE1 interagissent avec six d'entre elles (ASK1, ASK2, ASK3, ASK4, ASK11 et ASK13), ASK1 étant la protéine exprimée de manière constitutive dans la majorité des tissus (Fu *et al.*, 2004). Les données fonctionnelles suggèrent que les protéines ASK présentent une forte tendance à la dimérisation *in vitro*, masquant la surface d'interaction au motif F-box (Kim *et al.*, 2020), menant à l'hypothèse selon laquelle cette dimérisation pourrait être un héritage potentiel d'un système d'autorégulation *in vivo* de la protéine (Kim *et al.*, 2020).

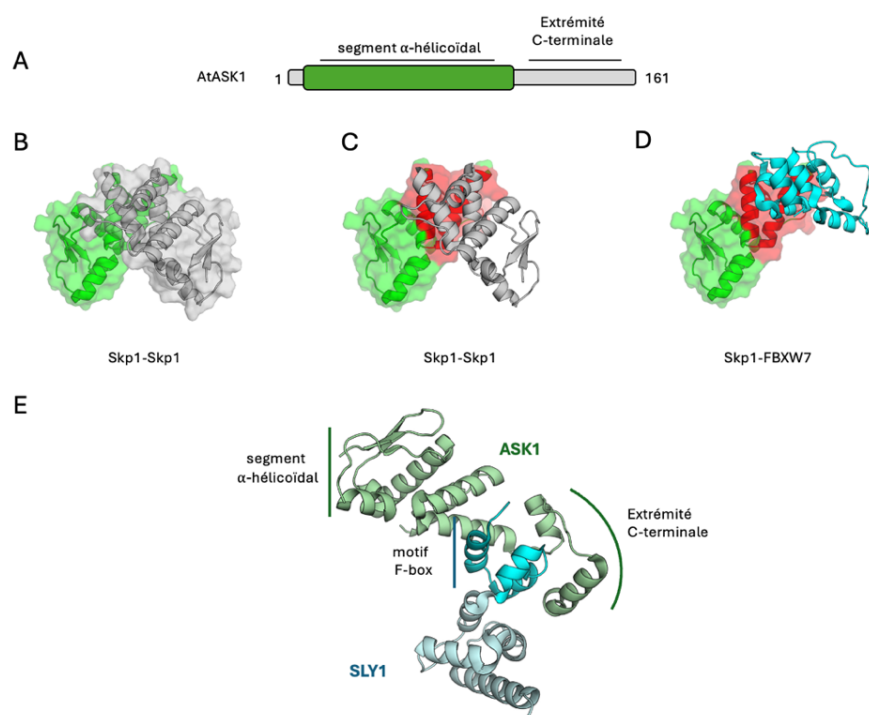


Figure 1.12 Compétitions pour la surface d'ASK1 impliquée dans la dimérisation et la reconnaissance du motif F-box.

(A) Cartographie de la protéine ASK1 d'*Arabidopsis thaliana*. (B-C) Mise en évidence de la surface de dimérisation de la protéine Skp1 de *Dictyostelium discoideum* (PDB 6V88). (D) Mise en évidence de la surface impliquée dans l'interaction avec le motif F-box illustré par le complexe SKP1-FBXW7 chez *Homo sapiens* (PDB 5V4B). (E) Structure tridimensionnelle du complexe AtASK1-AtSLY1 (PDB 9O4K). La protéine pleine longueur s'organise en un segment alpha hélicoïdal en N-terminal et une extrémité C-terminale désordonnée qui s'ordonne pour stabiliser le motif F-box de SLY1 (en cyan).

1.6.6 Dégradation du complexe DELLA/GID1(GA)

La dégradation des protéines DELLA dans la voie des gibbérellines est médiée par une modification post-traductionnelle : l'ubiquitination (Dill *et al.*, 2004; Wang et Deng, 2011). Ce mécanisme ajoute de manière covalente une petite protéine d'ubiquitine sur une lysine cible du substrat à dégrader. Le mécanisme fait intervenir trois protéines, une enzyme d'activation (E1) qui charge l'ubiquitine et la transfère à une enzyme de conjugaison (E2) qui, elle-même, relaie l'ubiquitine chargée au substrat *via* une enzyme de ligation (E3) qui positionne la E2 face au substrat pour orienter la modification sur la lysine cible (Wang et Deng, 2011). La E3 est en réalité une machinerie, formée de quatre sous-unités: la protéine SKP1 / ASK1, la protéine CULLIN1 (CUL1), une protéine à motif F-box SLEEPY1 (SLY1) et la protéine RBX1 (Figure 1.13). Ensemble, elles forment le complexe SCF^{SLY1} (Kim *et al.*, 2020; Magori et Citovsky, 2011; Santner et Estelle, 2010; Zheng *et al.*, 2002). CUL1 joue le rôle de colonne vertébrale qui fixe ASK1, l'adaptateur qui reconnaît exclusivement les motifs F-box dont celui de SLY1 (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025; Kim *et al.*, 2020; Santner et Estelle, 2010; Zheng *et al.*, 2002). SLY1 est capable de recruter le complexe DELLA/GID1(GA) au niveau du domaine GRAS (Figures 1.11 et 1.13). De l'autre côté de la colonne vertébrale, CUL1 recrute la E2 ainsi que l'ubiquitine activée. Ce complexe favorise une configuration spatiale qui présente la lysine cible de DELLA à la E2 chargée (Santner et Estelle, 2010; Zheng *et al.*, 2002).

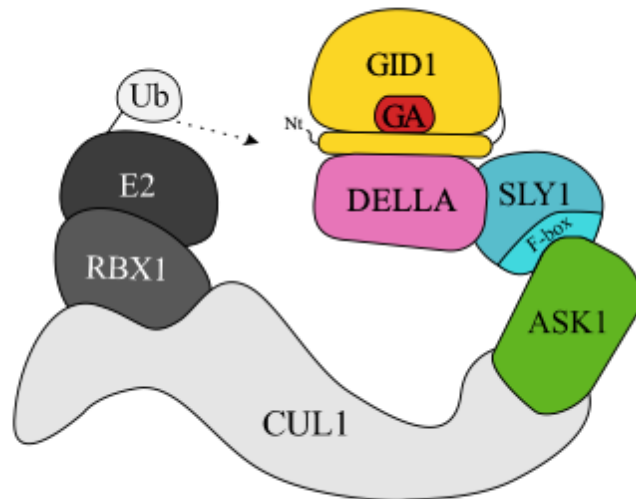


Figure 1.13 Schéma de la machinerie SCF^{SLY1} lors de l'ubiquitination du complexe DELLA/GID1(GA). Représentation des différents composants protéiques du complexe SCF^{SLY1} impliqués dans la reconnaissance et l'ubiquitination du complexe DELLA/GID1(GA).

Cependant, le compromis entre croissance et adaptation habituellement imposé par la voie des gibbérellines peut être contourné grâce à l'intervention du cryptochrome CRY1. Cette protéine joue le rôle de garde-fou de la signalisation des gibbérellines en séquestrant simultanément GID1 et DELLA. CRY1 empêche leur interaction, modulant ainsi la réponse hormonale en donnant la priorité à la réponse au stress : la thermomorphogénèse. (Xu *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2021) (Figure 1.14).

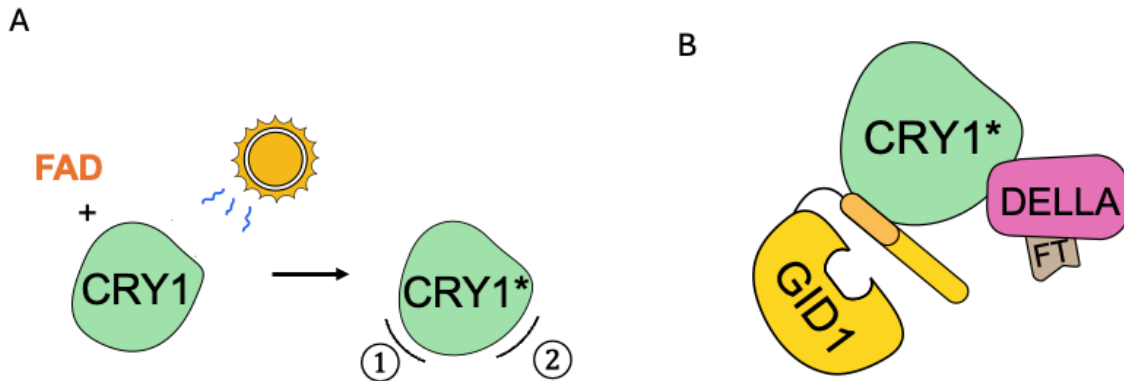


Figure 1.14 CRY1 comme garde-fou de la voie des gibbérellines après activation par la lumière bleue.

(A) Activation de la protéine CRY1 par la lumière bleue. Cette activation provoque un changement allostérique de CRY1 qui expose de nouvelles surfaces d'interactions. (B) CRY1 activée est en mesure de séquestrer les protéines GID1 et DELLA pour bloquer la croissance.

1.7 Perception de la lumière bleue par les cryptochromes

1.7.1 Les cryptochromes

Les mutants KO des gènes des cryptochromes ont constitué le point de départ pour établir le lien étroit entre perception de la lumière et thermomorphogénèse. En particulier, le double mutant KO *cry1 cry2* présente un phénotype d'allongement marqué de l'hypocotyle insensible à la lumière (Figure 1.15A) (Wang *et al.*, 2014). Les plantes ont sélectionné un système de perception de la lumière, qui inhibe la croissance. Ce mécanisme repose sur des récepteurs de la lumière bleue : les cryptochromes (CRY) (Gao *et al.*, 2023). Ils dérivent d'une photolyase ancestrale, capable de réparer les lésions causées à l'ADN par les rayons UV (Cashmore *et al.*, 1999; Lin et Shalitin, 2003). Les spermatophytes possèdent deux types de cryptochromes, CRY2, apparu chez les embryophytes et CRY1, apparu chez les angiospermes par duplication de gène. Ces cryptochromes ne catalysent plus la réparation de l'ADN, mais interviennent plutôt dans la régulation de l'expression des gènes *via* un stimulus provenant de la lumière bleue. Ce stimulus influence la croissance, le développement, l'horloge circadienne et la réponse aux stress abiotiques (Lin et Shalitin, 2003).

1.7.2 D'un monomère inactif au tétramère actif

Les cryptochromes sont formés de deux éléments structuraux : un domaine homologue à la région des photolyases (PHR) hautement conservé en N-terminal et une queue C-terminale (CTT) intrinsèquement désordonnée (IDR) dont la longueur varie considérablement entre protéines analogues et orthologues (Figure 1.15B) (Brautigam *et al.*, 2004; Parico et Partch, 2020; Shao *et al.*, 2020). Le domaine PHR lui-même est subdivisé en deux régions : une région α/β en N-terminal et une région hélicoïdale en C-terminal. Cette deuxième partie est capable de fixer dans une petite cavité interne, un chromophore : la Flavine-Adénine-Dinucléotide (FAD) (Figure 1.15C) (Brautigam *et al.*, 2004). À l'obscurité les cryptochromes existent sous forme de monomères, l'absorption de photons par le FAD induit sa photo-réduction (Ma *et al.*, 2020) déclenchant une cascade de transferts d'électrons le long d'une chaîne de tryptophanes hautement conservés au sein du domaine PHR (Goett-Zink et Kottke, 2021; Palayam *et al.*, 2021). Chez CRY2, ce relais redox fait intervenir les tryptophanes Trp397, Trp374, Trp321 et aboutit au changement de l'environnement du Trp voisin Trp349, lequel adopte une conformation photo-activée, marquant l'entrée de la protéine dans son état fonctionnel actif par homo-oligomérisation en réponse à la lumière bleue (Goett-Zink et Kottke, 2021; Shao *et al.*, 2020). La structure élucidée par cryo-EM a permis de visualiser la manière dont le domaine PHR de CRY2 forme des oligomères *via* deux surfaces distinctes : l'interface « Head-to-Head » (H-H) et « Head-to-Toe » (H-T) (Figure 1.15D) (Ma *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2020). Cette conformation est reproduite dans les structures cryo-EM des mutants CRY2^{W374}, résidu qui fait directement partie de la triade catalytique sous-jacente à l'excitation du FAD. Cette substitution entraîne à l'inverse une augmentation de la formation des dimers H-T sans photo-activation de la protéine (Shao *et al.*, 2020). Cette mutation mime un état photo-activé de la protéine (Shao *et al.*, 2020). De plus, les substitutions en alanine W339A et W349A chez CRY2 déstabilisent individuellement l'oligomérisation en agissant sur la surface H-T (Shao *et al.*, 2020).

1.7.3 Les protéines BIC inhibent la photo-activation des cryptochromes

Les protéines BLUE-LIGHT INHIBITOR OF CRYPTOCHROMES (BIC) sont responsables physiologiquement de la régulation de l'assemblage des cryptochromes. Le double mutant *bic1 bic2* mène à un phénotype nain sévère d'hypersensibilité à la lumière bleue (Figure 1.16A). Le double KO *cry1 cry2* affiche quant à lui un phénotype élancé pour lequel l'inhibition de l'élongation de l'hypocotyle est levée. Le quadruple mutant *bic1 bic2 cry1 cry2* témoigne du rôle inhibiteur des protéines BIC sur l'activité des protéines CRY (Figure 1.16A) (Wang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). En effet, les protéines BIC ont été identifiées comme étant capables d'inhiber négativement l'assemblage tétramérique de CRY2 selon des données par spectrométrie de masse native (Just *et al.*, 2025). Cette inhibition peut avoir lieu à l'obscurité ou à la lumière avec une plus grande affinité pour l'état photo-activé. La structure cristalline élucidée du

complexe CRY2^{PHR}- BIC2 (PDB 6K8K), montre que la région 33-97 aa de BIC2 se replie de manière transversale autour du domaine PHR du cryptochrome (1-506 aa), le long du sillon séparant les sous-domaines α/β et hélicoïdale (Just *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2020; Palayam *et al.*, 2021). Les protéines BIC2 forment des hétérodimères en stœchiométrie 1:1 et bloquent physiquement la photo-oligomérisation (Figure 1.16B) (Ma *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016). D’ailleurs, l’interface de liaisons sur laquelle BIC2 se fixe, chevauche directement l’interface H-T du tétramère de CRY2 (Shao *et al.*, 2020).

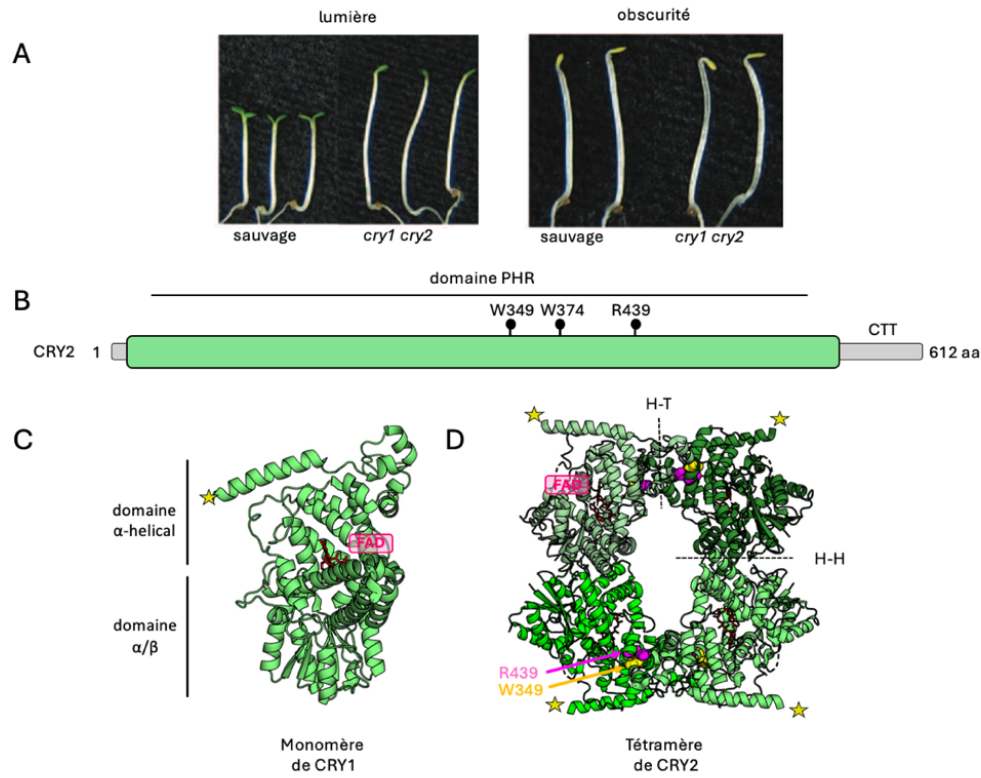


Figure 1.15 Rôle des cryptochromes dans la perception de la lumière afin de moduler l’élargissement de l’hypocotyle chez *Arabidopsis*.

(A) Comparaison des phénotypes de croissance liés à une altération de la séquence des gènes *CRY* chez *Arabidopsis thaliana* (Figure extraite de Wang *et al.*, 2014). (C-D) CRY1 et CRY2 sont représentés en vert. La molécule de FAD est représentée en rouge. La dernière hélice α (α 21) du domaine PHR est indiquée par une étoile jaune. (B) Cartographie schématique de la protéine CRY2. Le domaine PHR est représenté par un rectangle coloré en vert. Les résidus W349, W374 et R439 sont représentés par des sphères noires. (C) Structure tridimensionnelle du domaine PHR de la protéine CRY1 d’*Arabidopsis thaliana* (PDB 1U3C) (D) Structure tridimensionnelle du tétramère de CRY2 d’*Arabidopsis thaliana* (PDB 6M79). Les résidus W349 et R439 impliqués dans la formation des dimères H-T sont respectivement représentés sous forme de sphères jaunes et magenta.

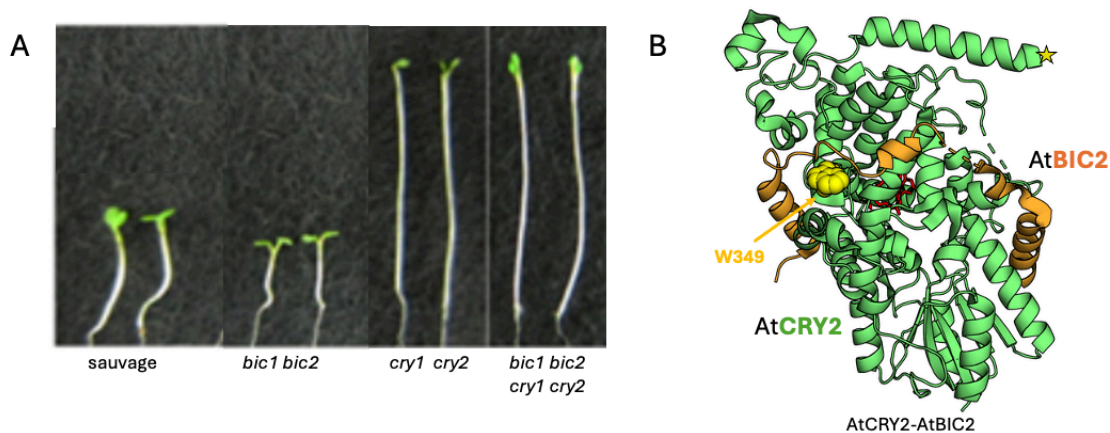


Figure 1.16 Inhibition de l'activité des cryptochromes par les protéines BIC chez Arabidopsis.

(A) Comparaison des phénotypes de croissance liés à un *KO* des gènes *BIC* et *CRY* chez *Arabidopsis thaliana* (Figure extraite de Wang *et al.*, 2017). (B) Structure tridimensionnelle du complexe AtCRY2-AtBIC2 (PDB 6K8K). CRY2 est représenté en vert et BIC2 est représenté en orange. La dernière hélice α (α 21) du domaine PHR est indiquée par une étoile jaune. Le résidu W349 impliqué dans la formation des dimères H-T est camouflé par BIC2 et représenté sous forme de sphères jaunes.

1.7.4 La queue C-terminale des cryptochromes

La particularité des protéines CRY1 végétales est la présence d'une longue queue désordonnée en C-terminale du domaine PHR. L'analyse de mutants de délétion dans cette région a mis en évidence la présence de motifs fonctionnels et non structurés (Goett-Zink et Kottke, 2021; Kumar *et al.*, 2022), par exemple, la délétion du motif VP empêche CRY1 d'inhiber l'activité protéolytique de la E3 ligase COP1 en réponse à la lumière. Chez de tels mutants, plusieurs fonctions physiologiques sont perdues, mais la photo-oligomérisation du domaine PHR est maintenue (Han *et al.*, 2020; Hoecker, 2017; Podolec et Ulm, 2018). Contrairement au paradigme structure-fonction, la nature désordonnée des IDR n'est pas une contrainte, cela permet de diversifier les surfaces d'interactions moléculaires et offre une diversité de fonctions par la flexibilité conformationnelle. Bien que la queue C-terminale des CRY végétales présentent une grande diversité de séquences, dont de nombreux SLiM conservés qui jouent le rôle d'éléments structuraux fonctionnels (Due Tankmar *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2018; O'Shea *et al.*, 2017; Scheer *et al.*, 2021). Parmi ces SLiM reconnaissables, on retrouve : (1) le motif DQXVP, (2) des séquences polyacides (glutamate et aspartate) et (3) le motif STAES (Wang et Lin, 2025). Les SLiM sont également la cible de modification post-traductionnelle élargissant davantage le spectre d'interaction potentielle (Ivarsson et Jemth, 2019; Kumar *et al.*, 2022). Plus de 80 SLiM différents ont été identifiés à travers 18 espèces végétales. CRY1 et CRY2 partagent ainsi des SLiM communs, mais possèdent également des SLiM qui leur sont spécifiques (Kumar *et al.*, 2022).

1.7.5 Position de la queue C-terminale par rapport au domaine PHR

Chez *Drosophila melanogaster*, la CTT est plus courte que celle des végétaux. La structure par cryo-EM a permis de découvrir que cette CTT s'organise en une 22^e hélice α qui s'arrime à la poche de fixation du FAD (Figure 1.17A), un comportement analogue à la manière dont CRY1 interagit aux photo-lésions de l'ADN (Parico et Partch, 2020; Zoltowski *et al.*, 2011). Cette disposition du CTT sur la poche du FAD verrouille le cryptochrome dans un état inactif (Zoltowski *et al.*, 2011). L'absorption des photons par le FAD entraîne la réduction du chromophore et mène à un changement conformationnel de la molécule. Cette modification affaiblit l'affinité de la CTT pour la poche, conférant un état actif. Ce mécanisme entre la CTT et le PHR est réversible et conservé dans l'évolution des plantes, insectes et mammifères (Parico et Partch, 2020). La nature désordonnée des longues CTT des végétaux rend difficile leur isolation *in vitro* via un système d'expression hétérologue et par conséquent, l'élucidation de leur structure tridimensionnelle ne peut aboutir par des méthodes classiques de biologie structurale. Les approches spectroscopiques multiéchelles (UV-visible, FTIR, *in cellulo*) convergent pour établir que la photo-activation du FAD mène à la dissociation de la région α/β en N-terminal, le feuillet β , semble être le site d'ancrage de la CTT à l'obscurité (Goett-Zink *et al.*, 2021). De plus, des expériences de smFRET ont permis d'enregistrer un déplacement de 15 Å de la CTT par rapport au domaine PHR chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Li *et al.*, 2022). Ce déplacement favorise la formation de dimer H-H et permet l'interaction avec les facteurs de transcriptions MOC15 sur la surface H-T (Li *et al.*, 2022). La structure élucidée du complexe MmCRY1-HsPER2 (PDB 6OF7) montre la manière dont PER2 interagit tout autour de la dernière hélice du domaine PHR (Parico *et al.*, 2020; Schmalen *et al.*, 2014). Les données de polarisation de fluorescence illustrent une compétition directe de la protéine PER2 et de la CTT pour cette surface du domaine PHR. Le positionnement de la CTT sur le domaine PHR devient critique pour l'interaction avec des partenaires (Parico *et al.*, 2020) (Figure 1.17B).

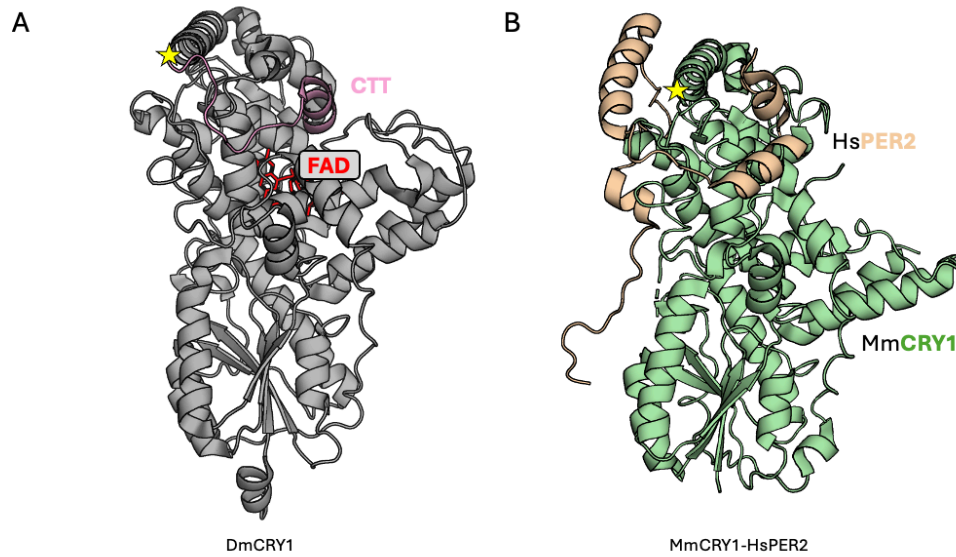


Figure 1.17 Position relative de la queue C-terminale sur le domaine PHR du cryptochrome.

(A-B) Le domaine PHR est représenté en gris ou vert. La molécule de FAD est représentée en rouge. La dernière hélice α (α 21) du domaine PHR est indiquée par une étoile jaune. (A) Structure tridimensionnelle du monomère de CRY1 de *Drosophila melanogaster* (PDB 4K03), la première hélice de la CTT (α 22) est représentée en rose, amarrée à la poche catalytique. (B) Structure tridimensionnelle du complexe MmCRY1-HsPER2 (PDB 6OF7). PER2 est représenté en beige et occupe le pourtour de la dernière hélice α (α 21) du domaine PHR.

1.7.6 Des partenaires protéiques des cryptochromes

Les cryptochromes agissent en se complexant avec des protéines pour moduler des modifications de l'expression génique induites par la lumière bleue ainsi que la croissance et le développement végétal (Yang *et al.*, 2017). À ce jour, on distingue deux groupes de protéines interagissant avec les CRY, différenciés selon leur dépendance à la lumière bleue (Wang et Lin, 2025). Premièrement, les protéines qui interagissent de manière indépendante de la lumière bleue : leur affinité pour CRY ne varie pas en fonction de l'état de photo-activation et leur découverte est intimement liée à la séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Ce processus est induit et réversible par l'état de photo-activation des cryptochromes. Ce sont des microgouttelettes concentrées en macromolécules formant des micro-environnements dont les propriétés et la promiscuité permettent d'augmenter la fréquence d'interactions. Les CTT des cryptochromes joueraient un rôle dans le maintien de ces condensats formant des photo-corps nucléaires observables dans un contexte de protéine fusion GFP-CRY2 (Liu *et al.*, 2024; Lyon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Wang et Lin, 2025). Deuxièmement, les protéines qui interagissent de manière dépendante de la lumière bleue : elles présentent une affinité modulée pour les cryptochromes photoexcités (tétramères) plutôt que ceux à l'état fondamental (monomère) (Wang et Lin, 2025). À ce jour, 28% des interactions dépendantes de la lumière bleue sont

connues pour co-condenser dans les photo-corps. Parmi elles, on retrouve les protéines régulatrices de l'activité des CRY : les kinases, les inhibiteurs BIC et les E3 ubiquitine ligase (Chen *et al.*, 2021; Just *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2020; Shalitin *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2017), mais également un large éventail de protéines telles que DELLA, GID1 discutées précédemment (Xu *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2021), mais aussi les HEAT SHOCK FACTOR PROTEINS (HSF), modulant le développement et les mécanismes de tolérance au stress de haute température (Gao *et al.*, 2023; Wang et Lin, 2025).

1.8 Réponse au stress de haute température par les protéines HsF

1.8.1 Rôle principal des HsFA1 dans la réponse de choc thermique

Les analyses génétiques basées sur des mutants KO ont permis d'identifier la hiérarchie du réseau des HsF (Guo *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2011a). Les HsFA1 sont les premières HsF activées à la suite d'un stimulus coordonnant l'activation de d'autres HsF en aval (Guo *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2011a). Les allèles *hsfa1a*, *hsfa1b*, *hsfa1e* et *hsfa1d* considérés individuellement conduisent à de modestes défaillances de thermotolérance en raison de la forte redondance fonctionnelle au sein de cette sous-famille (Liu *et al.*, 2011; Yoshida *et al.*, 2011a). En revanche, le quadruple mutant *hsfa1a/b/d/e* montre un phénotype sévère incapable de survivre à un stress thermique inscrivant les protéines HsFA1 comme indispensables à l'initiation de la réponse thermique (Figure 1.18) (Gao *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2011). Ce mutant n'induit pratiquement plus l'expression des gènes marqueurs de la réponse au choc thermique telles que les chaperonnes HSP101 ce qui démontre que les HsFA1 constituent le cœur transcriptionnel indispensable à la thermo-tolérance (Gao *et al.*, 2023; Ohama *et al.*, 2017). La réintroduction spécifique de HsFA1d chez le quadruple mutant *hsfa1a/b/d/e* suffit à restaurer la thermo-tolérance induite par la lumière et la chaleur, indiquant que HsFA1d est non seulement nécessaire, mais également suffisant pour piloter cette réponse (Gao *et al.*, 2023). Enfin, HsFA1d est capable également d'induire l'expression de HsFA3, associé principalement à l'acquisition d'une mémoire de résistance à la chaleur (Friedrich *et al.*, 2021; Guo *et al.*, 2016; Yoshida *et al.*, 2011a).

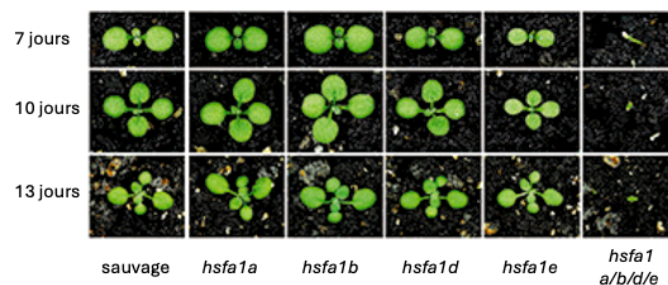


Figure 1.18 Comparaison des phénotypes de croissance liés aux KO des gènes HsFA1 chez Arabidopsis. (Figure extraite de Liu *et al.*, 2011)

1.8.2 Structure des facteurs de choc thermique

Les facteurs de choc thermique constituent une famille de facteurs de transcriptions hautement conservés à travers les espèces. Chez *Arabidopsis thaliana* on retrouve 21 HsF regroupées en 3 classes : les classes A, B et C (Fragkostefanakis *et al.*, 2025; Nover *et al.*, 2001). Elles partagent une structure commune formée de trois domaines (Figure 1.19): (1) Un domaine de liaison à l'ADN (DBD) à l'extrémité N-terminale. Le DBD permet aux facteurs de transcription de reconnaître des signatures spécifiques dans l'ADN génomique : les éléments de choc thermique (HSE) (Fragkostefanakis *et al.*, 2025). (2) Un domaine central qui permet l'homo- ou l'hétéro-oligomérisation (OD), on y retrouve des répétitions de sept acides aminés « heptads repeats » (HR), qui s'organisent en segments conservés HR-A et HR-B formant la région HR-A/B (Nover *et al.*, 2001). Les membres de la A et C, possèdent respectivement une insertion de ≈ 15 et ≈ 7 aa au sein du domaine HR-A/B qui influence la flexibilité et la stabilité de l'oligomérisation. Cette insertion est absente chez les membres de la classe B (Fragkostefanakis *et al.*, 2025; Nover *et al.*, 2001). Le DBD et le OD sont séparés par une région flexible impliquée dans la reconnaissance de différentes géométries des HSE sur la chromatine (Feng *et al.*, 2021). (3) Un domaine d'activation (AD) à l'extrémité C-terminale où l'on retrouve des motifs de régulation de l'expression génique. Les membres de la classe A possèdent des motifs d'activation conservés et structurés en hélice α (HA) qui permettent grâce à l'ancrage au niveau du HSE, le recrutement de la machinerie de transcription du gène cible à exprimer (Fragkostefanakis *et al.*, 2025; Nover *et al.*, 2001).

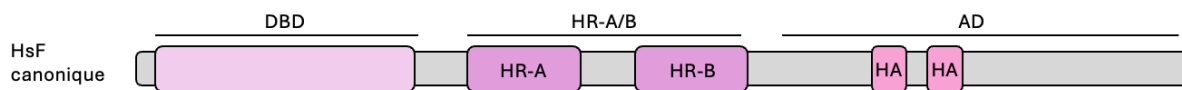


Figure 1.19 Cartographie de la structure canonique des facteurs de choc thermique d'Arabidopsis.

Les domaines et régions sont représentés par des rectangles colorés en rose.

1.8.3 L'interaction CRY1-HsFA1 augmente la réponse de choc thermique

Les mutants KO des gènes *CRY* empêchent l'accumulation nucléaire de HsFA1d sous lumière bleue et entraînent une perte massive des sites de fixation à la chromatine de HsFA1d mesurée par séquençage après immunoprécipitation de la chromatine (ChiP-Seq) (Gao *et al.*, 2023). Des essais de double hybride chez la levure et de « split-luciférase » *in planta* ont mis en évidence une interaction physique directe entre le domaine PHR de CRY1 et CRY2 avec la région N-terminale de HsFA1d (acides aminés 1-220), comprenant le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'oligomérisation (Gao *et al.*, 2023). Cette interaction n'est pas restreinte à HsFA1d, mais s'étend à l'ensemble de la sous-famille HsFA1 (A1a, A1b, A1d et A1e) soulignant un mécanisme conservé de couplage entre perception de la lumière bleue et réponse

au stress thermique (Gao *et al.*, 2023). L'association CRY-HsFA1 s'initie dans le cytosol et favorise la translocation nucléaire du complexe en réponse à la lumière bleue *via* un mécanisme dépendant des importines (Gao *et al.*, 2023). Des analyses CHIP-seq révèlent ensuite une co-occupation de CRY1 et HsFA1d sur des HSE (Figure 1.20), notamment au niveau de gènes clés de la réponse au stress thermique (HsFB1, HsFB2b), de la réponse à la lumière (CRY1) mais également de gènes impliqués dans la régulation de la croissance, tels que RGA, établissant ainsi un lien direct entre signalisation lumineuse, thermo-tolérance et modulation de la voie des gibbérellines (Gao *et al.*, 2023). CRY1 stabilise HsFA1d sur les HSE présents sur la chromatine afin de réguler l'expression des gènes impliqués dans la mise en place d'une tolérance au stress de haute température.

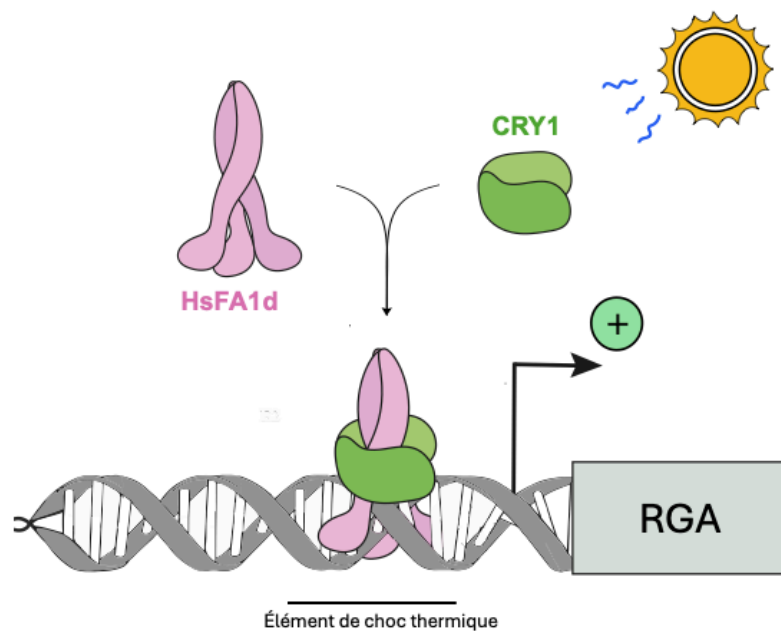


Figure 1.20 Schéma simplifié du rôle de la lumière bleue dans la modulation transcriptionnelle des gènes de tolérance au stress de haute température.

1.9 Hypothèses et objectifs

Pour répondre aux enjeux de sécurité alimentaire, il est important de repenser l'agronomie de demain en se basant sur les déterminants moléculaires à la base des interactions protéines-protéines qui régissent la croissance végétale (interface SLY1-DELLA) ainsi que la réponse au stress de haute température (interface CRY1-HsF), afin d'identifier ou créer par édition de gènes des mutants utilisables en agronomie capables de renforcer leur tolérance. Les protéines de la voie des gibbérellines : DELLA, GID1 et SLY1, de la réponse à la lumière : CRY1 et CRY2, ainsi que les facteurs de choc thermique HSF sont fortement exprimés et interviennent rapidement en réponse au stress de haute température. Ces voies ne sont pas

isolées les unes des autres dans la cellule, il est tentant de penser qu'elles s'interceptent pour conférer ensemble une thermo-tolérance accrue. L'objectif principal de cette thèse est d'exploiter AlphaFold comme outil générateur d'hypothèses structurales, afin de prédire des modèles tridimensionnels de complexes protéiques en interactions provenant des trois voies de signalisation. Ces modèles permettront de découvrir de nouvelles interactions entre ces voies et d'élucider la nature des interfaces qui les gouvernent pour concevoir des mutants capables de moduler ces interactions protéiques. Tout d'abord, dans cette thèse nous analyserons les déterminants structuraux de SLY1 qui d'une part lui permettent d'interagir avec ses partenaires ASK1 et DELLA et d'autre part semblent compliquer son expression dans un système hétérologue bactérien ce qui limite les études quantitatives sur cette interface. Nous proposerons ainsi une stratégie permettant l'expression et la purification chez *E.coli* d'un complexe soluble de ASK1-SLY1 tout en gardant la surface d'interaction avec DELLA libre (Chapitre 2). Ensuite, nous proposerons un modèle de positionnement de la queue C-terminale de CRY1 sur le domaine PHR en évaluant le rôle des mutations ponctuelles W352A et R442A sur l'oligomérisation de CRY1 et sur l'accessibilité des interfaces d'interactions pour la protéine HsFA1d (Chapitre 3). Enfin, nous présenterons la diversité et la complexité des interactions CRY1-HsF dont on détaillera l'interface d'interaction, ce qui nous permettra d'identifier et évaluer des mutants inspirés de variations naturelles (Chapitre 4).

1.10 Approches expérimentales

1.10.1 Prédiction de modèles structuraux par AlphaFold

Les mutants sont des outils clés pour élucider le rôle des protéines et la contribution fonctionnelle de résidus spécifiques mais les approches classiques présentent des limites. En particulier, les mutants de délétion altèrent souvent l'architecture globale des protéines, compliquant l'interprétation des phénotypes observés. À l'inverse, les mutants de substitution permettent de tester finement des hypothèses structurales sans perturber la stabilité conformationnelle. Dans un contexte où l'obtention des structures expérimentales reste longue, les approches prédictives en biologie structurale accélèrent la production et la validation d'hypothèses. Ces modèles constituent un guide visuel, qui facilite la conception et l'orientation des expérimentations biochimiques.

1.10.1.1 Fonctionnement général

AlphaFold est un programme d'intelligence artificielle développé par DeepMind, qui est capable de prédire la structure tridimensionnelle des protéines et les interactions protéines-protéines à partir de leur séquence primaire (EMBL, 2025). AlphaFold utilise deux grandes sources d'informations : (1) les alignements de séquences multiples (MSA) et (2) les structures élucidées expérimentalement présentes dans la banque de

donnée de protéines (PDB). AlphaFold collecte un grand nombre de séquences homologues de la protéine à prédire. Le MSA résultant informe sur la position des résidus dans la séquence. Cette comparaison informe sur des phénomènes de conservation et/ou de coévolution. AlphaFold tire ainsi des inférences sur leurs relations et donc de leur positionnement relatif dans l'espace. Les structures de la PDB sont aussi utilisées comme structures de références pour modéliser la structure. AlphaFold combine ainsi les informations du MSA et de la PDB et raffine pour l'obtention d'une structure tridimensionnelle finale (EMBL, 2025; Jumper *et al.*, 2021)

1.10.1.2 Prédiction d'erreur d'alignement

AlphaFold fournit une matrice de l'erreur attendue (PAE) en Ångström décrivant l'incertitude relative de la position d'un résidu x par rapport à un résidu y au sein d'une structure prédite. Un PAE < 5 Å témoigne donc d'une relation fiable entre x et y, un PAE > 15-20 Å témoigne d'une forte incertitude dans la position relative entre ces deux résidus. Cette information tridimensionnelle est retranscrite en 2D sous forme d'une matrice et informe sur le degré de confiance quant au bon agencement des structures secondaires et tertiaires entre elles (EMBL, 2025).

1.10.1.3 Prédiction du score de confiance locale

AlphaFold attribue un score par résidu allant de 0 à 100 qui mesure le score de confiance local prédit (pLDDT). Il prend en compte la stabilité locale de la géométrie prédite et la cohérence avec les informations provenant du MSA. Ainsi un pLDDT supérieur à 90 correspond à un très haut niveau de confiance (les atomes sont bien positionnés, et la géométrie est fiable). Un pLDDT compris entre 70 et 90, correspond à un haut niveau de confiance, (les domaines sont correctement structurés, petites incertitudes locales persistantes). Un pLDDT compris entre 50 et 70 correspond à un niveau de confiance faible (attribué aux régions flexibles, les régions désordonnées ou les boucles). Enfin, un pLDDT inférieur à 50 correspond à un très faible niveau de confiance (attribué aux régions intrinsèquement désordonnées, les extrémités N et C-terminale libres) (EMBL, 2025).

1.10.2 Tests d'interactions protéines-protéines

L'étude des interactions protéines-protéines est essentielle pour comprendre l'organisation fonctionnelle des réseaux cellulaires. Parmi les approches expérimentales les plus utilisées, le système du double hybride chez la levure « Yeast Two-Hybrid » (Y2H) et la complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) permettent de détecter des interactions physiques *in vivo*. Ces méthodes reposent sur des principes différents

mais sont complémentaires, offrant à la fois des approches pour valider des interactions protéiques prédites ou suspectées.

1.10.2.1 Tests de double hybride chez la levure

Le système du double hybride chez la levure est une méthode génétique permettant de détecter des interactions protéines-protéines dans un contexte cellulaire. Il repose sur la reconstitution d'un facteur de transcription eucaryote, (GAL4), séparé en deux domaines : un domaine de liaison à l'ADN (BD), et un domaine d'activation transcriptionnelle (AD) (Fields et al. 1989). Dans ce système, la protéine appât « bait » est fusionnée au domaine BD, tandis que la protéine proie « prey » est fusionnée au domaine AD. Cette approche repose sur l'expression hétérologue des protéines de fusion dans *Saccharomyces cerevisiae* par le biais de vecteurs d'expression sur des milieux dépourvus de nutriments essentiels (tryptophane et leucine). La présence de croissance sur de tels milieux sélectifs permet de sélectionner les colonies qui ont intégré les constructions (Fields et al. 1989). Suite à leurs expressions, si les deux protéines interagissent physiquement, les domaines BD et AD se retrouvent à proximité, ce qui permet la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel. Celui-ci active alors l'expression de gènes rapporteurs (ex. HIS3 ou lacZ), permettant la sélection et/ou la détection de l'interaction (Fields et al. 1989; Chien et al 1991). Cette méthode est particulièrement robuste lorsqu'elle est utilisée pour comparer des protéines présentant des mutations ponctuelles, car celles-ci conservent généralement une structure globale similaire, contrairement à des constructions tronquées pouvant affecter le repliement ou l'expression. L'intensité du signal peut être qualitative (croissance sur milieu sélectif) ou semi-quantitative (dosage d'activité de la β -galactosidase) (Brückner et al. 2009). Toutefois, cette méthode présente des limites, notamment des faux positifs liés à des protéines endogènes de l'hôte, des interactions indirectes ou des auto-activations, ainsi que des faux négatifs dus à de l'encombrement stérique, l'implication obligatoire de d'autres partenaires, lorsque les protéines ne sont pas correctement exprimées, repliées ou localisées dans le noyau. Des contrôles négatifs (BD ou AD seuls) et positifs sont essentiels afin de valider la spécificité des interactions observées et d'écarter les phénomènes d'auto-activation (Network et al. 2008).

1.10.2.2 Tests de complémentation bimoléculaire de fluorescence

La complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) est une approche basée sur la reconstitution d'une protéine fluorescente à partir de deux fragments initialement non fluorescents. La protéine fluorescente, souvent dérivée de la GFP, est scindée en deux moitiés : un fragment N-terminal (nYFP) et un fragment C-terminal (cYFP), chacun étant fusionné à une protéine d'intérêt distincte. Lorsque ces deux protéines interagissent, les fragments nYFP et cYFP se retrouvent à proximité, ce qui permet la reconstitution de la structure tridimensionnelle du fluorophore, la maturation du chromophore et l'émission

d'un signal fluorescent détectable (Kerppola et al. 2008; Miller et al. 2015). Dans les systèmes végétaux, ces constructions sont fréquemment introduites de manière transitoire par agroinfiltration, une méthode reposant sur l'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* pour transférer les gènes d'intérêt dans les cellules foliaires, notamment chez *Nicotiana benthamiana*. Cette approche permet une expression rapide et efficace des protéines fusionnées in planta (Ohad et al. 2010). Le BiFC permet ainsi non seulement de mettre en évidence une interaction physique entre deux protéines, mais également d'en déterminer la localisation au sein de la cellule vivante (Ohad et al. 2010). Le signal BiFC est généralement visualisé par microscopie confocale. Toutefois, cette méthode présente des limites : un signal positif indique une interaction entre les protéines étudiées, tandis que l'absence de fluorescence peut résulter soit d'une absence d'interaction, soit de limitations techniques telles qu'un mauvais repliement des fragments fluorescents, une expression insuffisante ou une stœchiométrie inadéquate. De plus, la reconstitution du signal peut dépendre de la présence de cofacteurs ou d'autres macromolécules obligatoires nécessaires à l'interaction, incluant des protéines endogènes de l'hôte susceptibles de faciliter ou, au contraire, d'entraver l'interaction observée (Kerppola et al. 2008; Ohad et al. 2010; Miller et al. 2015).

CHAPITRE 2

STRUCTURE-GUIDED OPTIMIZATION OF SLY1 EXPRESSION AND PURIFICATION IN E. COLI

SOULEÏMEN JMII^{1,2,3}, WILLIAM BOUARD⁵, MATHILDE ROCHAS^{1,4}, FRANÇOIS DRAGON^{1,4} et
LAURENT CAPPADOCIA^{1,2,3}

¹Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, QC, Canada

²Centre Sève, Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

³PROTEO, Quebec Network for Research on Protein, Function, Engineering and Applications, Montréal, QC, Canada

⁴Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, QC, Canada

⁵Université Paris-Saclay, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Université Evry, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), Gif sur Yvette, France

Manuscrit publié dans le journal *Protein Sciences*

doi.org/10.1002/pro.70592

Contributions : Souleïmen Jmii a conçu le projet, optimisé les méthodes, collecté et analysé les données, écrit le manuscrit original, préparé les figures et édité le manuscrit. William Bouard et Mathilde Rochas ont aidé à l'optimisation des méthodes, collecté des données, et édité le manuscrit. François Dragon a fourni un accès au matériel expérimental et édité le manuscrit. Laurent Cappadocia a supervisé, conçu le projet acquis les fonds de recherche, donné accès aux ressources et édité le manuscrit.

2.1 Résumé

Le complexe de protéolyse SCF^{Sly1} est un régulateur clé de la signalisation des gibbérellines, qui mène à la reconnaissance et la dégradation des protéines DELLA par ubiquitination ciblée. Pour permettre des études biochimiques quantitatives et structurales détaillées de ce complexe, une production recombinante efficace de Sly1 et de son adaptateur Ask1 est essentielle. Dans cette étude, nous avons optimisé la co-expression et la purification du complexe Ask1-Sly1 chez *E. coli*, en nous concentrant sur les déterminants moléculaires influençant la solubilité, la stabilité et les interactions protéiques. Des analyses d'hydrophobicité et des modélisations structurales par AlphaFold d'Ask1 et de Sly1 ont permis d'identifier des surfaces hydrophobes marquées, en particulier autour de l'hélice $\alpha 7$ de Sly1, impliquée dans la liaison aux protéines DELLA et susceptible de favoriser l'agrégation lors de la purification. Sur la base de ces observations, nous avons adopté une stratégie de co-expression avec un tag MBP fusionné à l'extrémité N-terminale de l'un des partenaires, ce qui a significativement amélioré la solubilité et permis l'isolement du complexe Ask1/Sly1 intact. Dans l'ensemble, ce travail présente un protocole optimisé pour la production recombinante du complexe Ask1/Sly1 et fournit une justification structurale permettant de surmonter les principaux défis liés à son expression et à sa purification.

Mots clés: prédiction structurale, protéines de plantes, expression et purification de protéines, voie de signalisation des gibberellines, interactions protéines-protéines, E3 ligases de plantes, Sly1, Ask1

2.2 Abstract

The SCF^{SLY1} ubiquitin ligase complex is a key regulator of gibberellin signaling, mediating the degradation of DELLA proteins through targeted ubiquitination. To enable detailed biochemical and structural studies of this complex, efficient recombinant production of SLY1 and its adaptor ASK1 is essential. In this study, we optimized the co-expression and purification of the ASK1-SLY1 complex in *E. coli*, focusing on molecular determinants that influence solubility, stability, and protein interaction. Hydrophobicity analyses and AlphaFold structural modeling of ASK1 and SLY1 identified prominent hydrophobic surfaces, particularly around helix $\alpha 7$ of SLY1, which are involved in DELLA binding and potentially driving aggregation during purification. Based on these insights, we adopted a co-expression strategy with an MBP tag fused at the N-terminal end of one partner, which significantly enhanced solubility and enabled successful isolation of the intact ASK1-SLY1 complex. Overall, this work presents an optimized protocol for recombinant production of the ASK1-SLY1 complex and provides structural rationale for overcoming key challenges in its expression and purification.

Keywords: structure prediction, plant proteins, protein expression and purification, gibberellin signaling, protein-protein interactions, plant E3 ligases, SLY1, ASK1

2.3 Introduction

DELLA proteins are central repressors of plant growth, coordinating biological processes such as seed germination, stem and root elongation, flowering, and fruit development. DELLA degradation is mediated by ubiquitination, a post-translational modification in which ubiquitin proteins are attached covalently to DELLA proteins. This triggers their degradation by the 26S proteasome and forces the release of growth modulating factors (Fukazawa *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2014; Tyler *et al.*, 2004; Ubeda-Tomás *et al.*, 2008). The ubiquitination process relies on an ubiquitin E3 ligase, which selectively recognizes and recruits substrates for degradation (Hua et Vierstra, 2011). In plants, the SCF^{SKP1-CUL1-F-box} complex represents a major class of ubiquitin E3 ligases, composed of four core components: the scaffold protein CULLIN1, the RING-finger protein RBX that recruits an E2 ubiquitin-conjugating enzyme, the adaptor protein Arabidopsis SKP1-like (SKP1/ASK1), and an F-box domain protein that confers substrate specificity (Zheng *et al.*, 2002). In *Arabidopsis thaliana*, nearly 700 F-box proteins have been identified, involved in a wide range of biological processes, particularly hormonal signaling (Gagne *et al.*, 2002). SLEEPY1 (SLY1) and its paralog SNEEZY 1 (SNE1) form the SLY1 subfamily of F-box proteins which target DELLA for degradation (Ariizumi *et al.*, 2011). Knockout of *AtSLY1* leads to dwarfism through DELLA proteins accumulation, thereby sequestering growth factors and preventing growth stimulation (Ariizumi *et al.*, 2011; Nelson et Steber, 2017). The cryogenic electron microscopy (cryo-EM) structure of the GID1/RGA/SLY1/ASK1 complex indicates that hydrophobic interactions mediated by both the N-terminal F-box domain (aa 29-75) and the C-terminal α -helix (aa 123-142) of SLY1 are involved in its interaction with ASK1 and DELLA, respectively (Dahal *et al.*, 2025; Hirano *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2025). Reconstruction of the ancestral form of SLY1 from *Marchantia polymorpha* (Ji *et al.*, 2023) further suggested an increase in both the rigidity and hydrophobicity of the last α -helix (α -helix 7) of SLY1 during evolution. This helix contains the GGF and LSL motifs essential for DELLA recognition (Gomi *et al.*, 2004) and the shift refined the ancestral broad promiscuity of SLY1 into highly specific recognition of DELLA members, favoring tighter regulation of the gibberellin's hormonal pathway (Ji *et al.*, 2023). These interfaces are essential for ASK1 binding and DELLA substrate recognition, however their hydrophobicity complicates protein expression and purification because individual proteins have a high tendency to aggregate (Islam *et al.*, 2025). Thus, it remains challenging to express SLY1 without partners or solubility tags both in prokaryotic or eukaryotic systems (Li *et al.*, 2017; Yoshida *et al.*, 2011b), consequently limiting studies of the SLY1 - DELLA interaction. Here, we examined the properties of the SLY1 structure to understand the challenges of purification and propose an efficient method to cost-efficiently express and purify soluble SLY1 in complex with ASK1 in a bacterial system.

2.4 Results and Discussion

2.4.1 Structural determinants of SLY1 hydrophobicity

The reported difficulties in expressing SLY1 (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2017) prompted us to investigate the structural features and critical hydrophobic residues / surfaces of SLY1. Kyte-Doolittle hydrophobicity profiles of AtASK1 (Figure 2.1A) indicate that it is predominantly hydrophilic (mean KD: -0.331), with three hydrophobic peaks at V55 (+1.40), L101 (+2.01), and N106 (+1.24). Residues L101 and N106 are in a region hereafter called “peak 100,” that interacts with the F-box domain of SLY1 (Figure 2.1A). In contrast, despite being predominantly hydrophilic (mean KD: -0.603), SLY1 exhibits a hydrophilic N-terminal F-box domain (aa 1-81) while its C-terminal region (aa 82-151) contains hydrophobic peaks at V94 (+1.77), V95 (+2.11), and S130 (+1.5) (Figure 2.1B). These peaks lie near the GGF and LSL motifs, characterised as essential for DELLA interactions (Gomi *et al.*, 2004). For the remainder of the present study, V94 and V95 together form the “GGF peak” while S130 forms the “LSL peak”. To determine the localization of these peaks in the three-dimensional structures, AlphaFold v2 models were generated for AtSLY1 (Figure 2.1C and 2.1D), AtSNE1, and crop orthologs (Figure 2.S1). High pLDDT scores indicate strong confidence level. These proteins share together a common organisation, composed of seven α -helices: α 1 (35-45), α 2 (46-58), α 3 (59-68), α 4 (69-79), α 5 (85-98), α 6 (99-115), and α 7 (121-141), with disordered extremities (aa 1-34 and 142-151) (Figure 1D). Helices α 1- α 3 form the conserved F-box domain mediating ASK1 interaction, with pLDDT values >90%. Helix α 4 contacts the F-box domain, while α 5 and α 6, separated by the GGF motif, pack against α 4 through hydrophobic interactions, stabilizing α 7, which contributes to DELLA recognition via the LSL motif (Figure 2.1D). These models are structurally similar to the cryo-EM structure of AtSLY1, highlighting the robustness of the AlphaFold predictions. We used AlphaFold predicted structures of SLY1 and ASK1 to map the hydrophobicity peaks identified through Kyte and Doolittle analyses on each protein surface (Figure 2.S2 and 2.S3). Although the overall surface of the AtSLY1 F-box domain is predominantly hydrophobic (Figure 2.S2A), additional hydrophobic patches are observed notably along α -helix 7, and these are conserved in SLY1 ortholog (Figure 2.S3). ASK1 contacts helices α 1-3 of SLY1 via the exposed C-terminal “peak 100” (Figure 2.S4). Even in complex with ASK1, ~90% of the SLY1 surface remains exposed to the solvent (Figure 2.1E and 2.1F), leaving substantial hydrophobic regions accessible

and potentially compromising stability. Notably, the GGF and LSL peaks form an extended hydrophobic surface that interacts with DELLA (Figure 2.1E and 2.1F). Sequence alignment of SLY1 orthologues highlight the high conservation of these hydrophobic regions across SLY1 proteins of major cultivated plants (Figure 2.1G and 2.1H).

2.4.2 Expression challenges highlight the capacity of ASK1 and SLY1 to form oligomers

Given the known difficulties in expressing and purifying F-box domain proteins (Li et al., 2017), we developed strategies for heterologous expression of SLY1 in *E. coli*. Previous insect cell studies highlighted the importance of co-expressing the F-box protein with ASK1 to stabilize the domain (Li et al., 2017). However, the use of eukaryotic expression systems substantially increases experimental cost and complexity and introduces the risk of unwanted post-translational modifications that could confound downstream analyses. As a first strategy developed in our laboratory and others (Correddu *et al.*, 2019; Ganjave *et al.*, 2025; LaVallie *et al.*, 1993), SLY1 was co-expressed with ASK1 in a bacterial system using the pRSF_Trx-ASK1/SLY1 construct (Figure 2.S5A). In this construct, ASK1 is fused to an N-terminal Thioredoxin (Trx) tag to enhance solubility and proper folding of the protein complex, while reducing aggregation of recombinant proteins expressed in *E. coli* (Costa *et al.*, 2014; LaVallie *et al.*, 1993; LaVallie *et al.*, 2000). A TEV protease cleavage site located downstream allowing the release of the native ASK1/SLY1 complex from the His-Trx tag. The Trx-ASK1/SLY1 fusion protein expressed well in *E. coli* (Figure 2.S5C) and, after affinity chromatography, the soluble complex was purified by size-exclusion chromatography (Figure 2.S5B). SDS-PAGE analyses revealed that both ASK1 and SLY1 started eluting at the void volume, suggesting either aggregation or formation of high molecular weight complexes (fractions 4-9), whereas excess ASK1 eluted at fractions 12-14 (Figure 2.S5C). We also designed a construct in which both proteins are fused and separated by a glycine-serine linker (Figure S6A). This 34 kDa construct was fused to a removable 11 kDa His-Trx cassette to enhance solubility of the complex. The fusion protein was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography and gel filtration (Figure 2.S6B). SDS-PAGE analysis of the elution profile on a gel filtration column showed that the fusion protein eluted at an apparent molecular weight exceeding 100 kDa, substantially larger than the expected molecular mass of 44 kDa, suggesting higher-order oligomerization (Figure 2.S6C). TEV protease treatment yielded two populations on SDS-PAGE: a non-cleaved species at 44 kDa and a cleaved species migrating at

the expected 34 kDa (Figure 2.S7A) with mass spectrometry confirming that the 44-kDa species corresponds to the non-cleaved His-Trx-ASK1-SLY1 protein fusion (Figure 2.S7B). The incomplete cleavage likely reflects limited accessibility of the TEV site, potentially due to aggregation or oligomer formation. Expression and purification of the ASK1-SLY1 fusion protein highlight its propensity for oligomerization (Figure 2.S8). Although no dimer of AtASK1 or AtSLY1 has been reported, the ortholog DdSKPA1 forms stable dimers at high concentrations *in vitro*, as demonstrated by analytical ultracentrifugation and NMR experiments (Kim et al., 2020). Sequence and structural alignments between DdSKPA1 and AtASK1 reveal strong similarity and residue conservation (Figure 2.S9). Collectively, the high-molecular-weight elution peak and partial cleavage are consistent with the formation of soluble oligomers.

2.4.3 Structural basis and possible consequences of oligomerization

AlphaFold predictions reveal the possible formation of ASK1 dimers (Figure 2.S10), in agreement with previous NMR structural analyses showing that dimerization could occur through the hydrophobic peak 100 on helix $\alpha 5$ of DdSKPA1 (Figure 2.S11). Such dimerization may represent a regulatory mechanism for SCF activity, whereby burial of the peak 100 hydrophobic surface partially masks ASK1 interaction sites and limits association with the F-box domain (Kim et al., 2020). An ancestral version of SLY1 from *Marchantia polymorpha* exhibits a more flexible C-terminus capable of adopting multiple orientations, allowing interactions with various DELLA and GRAS proteins (Ji *et al.*, 2023). In AlphaFold predictions of SLY1 without partners, individual α -helices displayed pLDDT values exceeding 70%, whereas modeling in the presence of DELLA increased confidence in predicted secondary structures to over 90% (Figure 2.S12). Comparison of predicted AtSLY1 with the experimentally determined AtSLY1 structure in complex with AtASK1 and AtRGA (PDB 9O4K) revealed structural compaction, likely reflecting increased rigidity of helix $\alpha 7$. Indeed, this helix is more flexible and partially detached in the absence of DELLA (Figure 2.S12). AlphaFold predictions of MpSLY1 dimers reveal a dimeric organization centered on helix $\alpha 5$, with hydrophobic surfaces buried at the interface to stabilize the interaction (Figure 2.S13). Structural modeling of AtSLY1 dimers in complex with ASK1 highlights a possible interface between two SLY1 monomers (Figure 2.2A and 2.2B and 2.S14) and the potential role of helix $\alpha 5$ in dimer formation. The $\alpha 5$ helix of each monomer contains the hydrophobic GGF surface capable of forming interactions with L90, L97, V94, and V95. To assess whether loss of helix $\alpha 7$ abolishes

DELLA binding, we performed bimolecular fluorescence complementation experiments in *Nicotiana benthamiana* leaves. Truncated SLY1 (1-120), lacking helix $\alpha 7$ and exposing $\alpha 5$ at the C-terminus, remains functional and interacts with DELLA in the nucleus (Figure 2.2C and 2.2D). The AlphaFold model of a DELLA-SLY1¹⁻¹²⁰ complex indicated that helix $\alpha 5$ can occupy the same position as helix $\alpha 7$ in the hydrophobic groove of DELLA, suggesting that exposure of helix $\alpha 5$ compensates for the lack of helix $\alpha 7$ (Figure 2.2E and 2.2F). This phenotype has been associated with dwarfism (Gomi *et al.*, 2004), which may arise from altered spatial organization of the SCF^{SLY1} complex, potentially affecting substrate positioning relative to the E2-ubiquitin conjugating enzyme (Figure 2.2G and 2.S15). In the bryophyte *Marchantia polymorpha*, where gibberellin-mediated regulation is absent (Hernández-García *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2023), SLY1 homologs are thought to operate in a deferent regulatory context. These observations suggest that $\alpha 5$ -centered dimerization may represent an ancestral autoregulatory mechanism. Such an arrangement would shield the DELLA-interacting surface, providing a potential dimerization-based mechanism for modulating growth through reduced DELLA degradation. Dimerization centered around helix $\alpha 5$ may represent a molecular remnant of an ancestral autoregulatory system.

2.4.4 Soluble expression of ASK1/SLY1 through association with a maltose binding protein

To compensate for the hydrophobic nature of the SLY1 C-terminus, we co-expressed ASK1 to stabilize the N-terminal region and fused a maltose binding protein (MBP) tag of the construct to further enhance the solubility of the complex. The rationale behind the choice of MBP rests on its well documented ability to enhance protein solubility by promoting proper folding and suppressing aggregation (Costa *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2010a). This property is particularly relevant for SLY1, whose exposed hydrophobic regions and flexible helices are predicted to promote oligomerization and aggregation when expressed alone. We therefore designed two new constructs, pRSF-MBP: ASK1/SLY1 (Figure 2.3A-C) and pRSF-MBP: SLY1/ASK1 (Figure 2.3D-F), where the solubility-enhancing MBP tag was fused to the N-terminus of ASK1 or SLY1, placed just upstream of its complementary partner in the same vector. The constructs were expressed in *E. coli*. After a first affinity chromatography step, the soluble complexes were purified by size-exclusion chromatography. As indicated by SDS-PAGE analysis of elution fractions of the gel filtration column, this strategy significantly improved the solubility of SLY1 with both constructs. Indeed, the presence of both ASK1 and SLY1 is clearly observed, co-eluting together in a single soluble

fraction (Figure 2.3C and 2.3F). These results suggest that SLY1/ASK1 co-expression, combined with the use of a MBP tag on either partner, allows efficient expression of soluble SLY1 in a bacterial system. Overall, our results demonstrate that the interplay between hydrophobic surface exposure, helix flexibility, and potential dimerization interfaces fundamentally governs SLY1 instability *in vitro*, explaining its strict dependence on partners and solubility tags for successful heterologous expression and purification.

2.5 Materials and methods

2.5.1 Sequences alignment and hydrophobicity analyses

ASK1 and SLY1 protein sequences from *Arabidopsis thaliana* and other major crops were obtained from UniProtKB, and accession numbers are listed in Supplemental Table 1. Additional SLY1 sequences, including non-crop plants, were obtained from HMMER v3.4 (Finn *et al.*, 2011) (Supplemental Table 2). Sequences were aligned using NCBI BLAST (Altschul et Lipman, 1990) and visualized with WebLogo 3 (Crooks *et al.*, 2004). Hydrophobicity profiles of AtASK1, AtSLY1, AtDELLAs, and crop SLY1 proteins were analyzed using ProtScale (ExpPASy) with the Kyte & Doolittle algorithm (Gasteiger *et al.*, 2005) and a sliding 9-residue window.

2.5.2 Structural prediction of SLY1 complexes

The structure of isolated AtSLY1, AtSNE1, SLY1s, and AtSLY1 dimer, and complexes composed of AtSLY1/AtASK1 and AtSLY1/AtDELLAs were obtained through the structure prediction using AlphaFold v2.0 or 3.0, as indicated. The visualization software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2 Schrödinger, LLC.) was used to analyze the structures, perform structural alignments, and to generate figures.

2.5.3 Molecular cloning

To facilitate purification and functional studies, all constructs possess an N-terminal hexa-histidine tag (His-tag) with either a thioredoxin (Trx) or a maltose-binding protein (MBP), as well as a tobacco etch virus (TEV) protease recognition site (ENLYFQGS) to facilitate the separation between the tags and the target proteins. ASK1¹⁻¹⁶⁰ and SLY1¹⁻¹⁵¹ full-length sequences were obtained by polymerase chain reaction (PCR) amplification from an *Arabidopsis* cDNA library. The corresponding ASK1 and SLY1 sequences were then cloned by GIBSON assembly into either

BamHI (MCS1) or NdeI (MCS2) sites of homemade pRSF-Trx or pRSF-MBP Duet vectors using oligonucleotides listed in Supplemental Table 3, generating the following constructs: pRSF_MBP-SLY1¹⁻¹⁵¹, pRSF_Trx-ASK1¹⁻¹⁶⁰-SLY1¹⁻¹⁵¹, pRSF_MBP-ASK1¹⁻¹⁶⁰-SLY1¹⁻¹⁵¹, and pRSF_MBP-SLY1¹⁻¹⁵¹-ASK1¹⁻¹⁶⁰. Full-length ASK1 and SLY1 were also cloned as linear fusion proteins into the BamHI site of homemade pRSF-Trx vector to generate pRSF_Trx-ASK1-SLY1^{Fus} where both proteins are part of a single polypeptide separated by a GS linker. The integrity of all constructs was confirmed by Sanger sequencing (G enome Qu ebec) or Nanopore sequencing (Plasmidsaurus). Constructs were transformed into *E. coli* strain BL21(DE3) CodonPlus RIL prior to protein expression.

2.5.4 Heterologous protein expression in *E. coli*

Transformed *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus pRIL were grown overnight at 37  C in LB medium (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract and 10 g/L NaCl) containing the appropriate antibiotics (34  g/mL chloramphenicol, 50  g/mL kanamycin). Precultures were diluted with chilled Super Broth medium (32 g/L of tryptone, 20 g/L of yeast extract and 5 g/L of NaCl) containing antibiotics and 300  M isopropyl- -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Protein expression was performed at 18  C for 24 h. Cells were pelleted by centrifugation at 10 000 xg for 40 min and resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0, 5 mM  -mercaptoethanol and 0.5 mg/mL of lysozyme). Cells were lysed by sonication (Branson Sonifier 450) for 3 cycles of 2 min, at power of 200 W and a 1:1 duty cycle, then centrifugated at 48 500 g for 30 min. The supernatant was applied to a Ni-NTA resin (QIAGEN). Proteins were eluted with (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole pH 8.0, 5 mM  -mercaptoethanol. All proteins were purified by gel-filtration chromatography (Superdex 200 pg 10/300, Cytiva) in gel filtration buffer composed of 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM  -mercaptoethanol. Fractions were analyzed by SDS-PAGE (15% polyacrylamide gels).

2.5.5 Plant material and growth conditions

Nicotiana benthamiana (PI 555478 USDA) were grown in a mixture of black earth, perlite and peat moss (2:1:1, v:v:v) in E15 Conviron growth cabinet at 22  C and 70% relative humidity, under a photon flux density of 100  mol m⁻²s⁻¹ (fluorescent and incandescent lighting) with a 16 h/8 h

(day/night) photoperiod. Plants were watered with 20:20:20 N:P:K at a concentration of 0.5 g/L, and infiltration was performed on 5-week-old leaves.

2.5.6 Bimolecular complementation by fluorescence assay

To assess SLY1-RGL1 interactions, we amplified the coding sequences of SLY1 and RGL1 and inserted these sequences between the XbaI and NcoI restriction sites of a modified pAVA321 vector (Von Arnim *et al.*, 1998) encoding 35S:nYFP¹⁻¹⁵⁶ or pAVA 35S:cYFP¹⁵⁵⁻²⁴⁰ vectors (Jmii *et al.*). RGL1^{WT}, SLY1¹⁻¹⁵¹, SLY1¹⁻¹²⁰ sequences were cloned into pAVA modified vectors using Gibson assembly using XbaI site, to generate pAVA 35S:RGL1^{WT}-nYFP, pAVA 35S:SLY1^{WT}-cYFP and pAVA 35S:SLY1¹⁻¹²⁰-cYFP. The resulting cassettes were excised and inserted in pPZP vector in the SmaI and KpnI sites to generate pPZP 2X35S:RGL1^{WT}-nYFP, pPZP 2X35S:SLY1^{WT}-cYFP and pPZP 2X35S:SLY1¹⁻¹²⁰-cYFP. We used pPZP 2X35S:ECOIL-cYFP, pPZP 2X35S:RCOIL-nYFP as positive control (Doh *et al.*, 2018), whereas pPZP 2X35S:mCherry signal served as a marker for transient protein expression and localization of agro-infiltrated tissue in *Nicotiana benthamiana* leaves. All pPZP plasmids mentioned previously were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 to generate individual strains. Agroinfiltrations of *Nicotiana benthamiana* leaves were performed as described (Bouard *et al.*, 2024). Two days after infiltration, fluorescence excitation/emission wavelengths of 488 nm/525 nm for eYFP and 561 nm /595 nm for mCherry were used on a Nikon A1+ confocal laser scanning microscope. Images were analyzed using Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012).

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contributions

SJ and LC designed the experiments. SJ, WB, MR collected data. SJ prepared all the Figures and Tables. SJ drafted the manuscript. SJ, WB, FD and LC edited the manuscript and approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the Natural Science and Engineering Research Council Discovery grants 2019-06807 to LC and 2019-07257 to FD. SJ is supported in part by a scholarship from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologie.

2.6 Figures

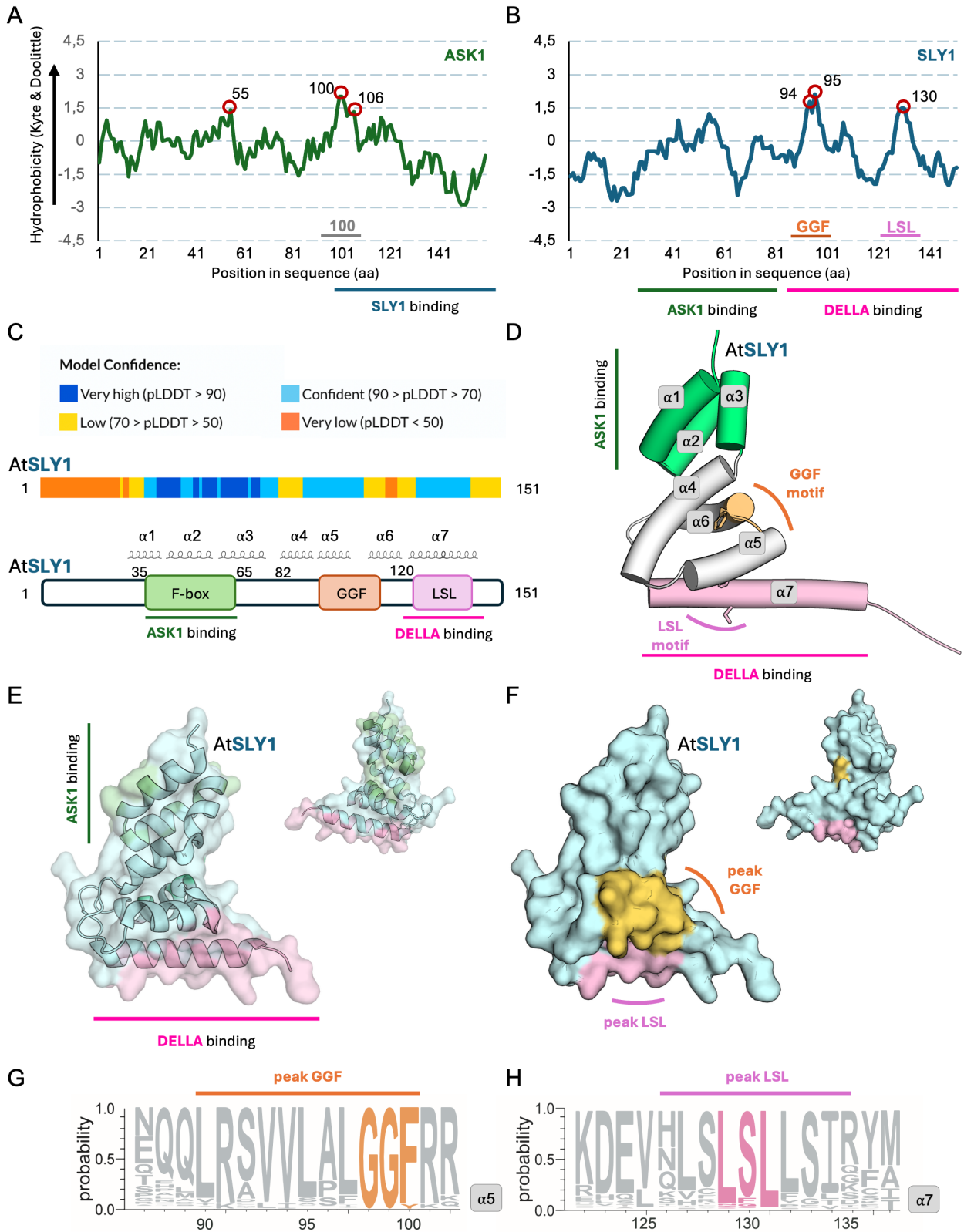
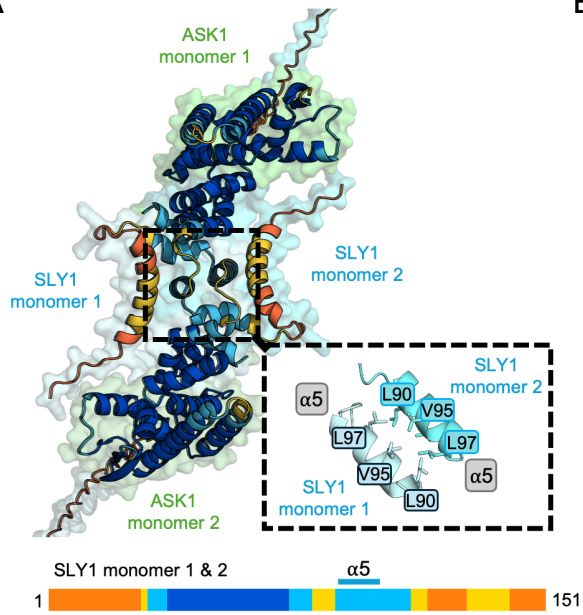


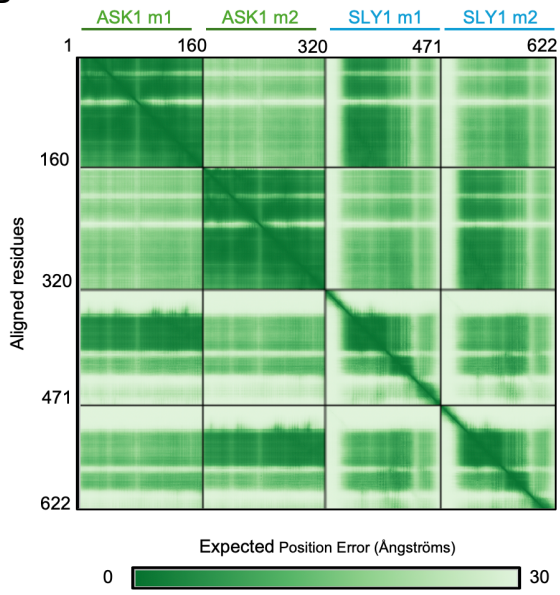
Figure 2.1 Hydrophobicity profiles and structural organization of SLY1.

(A-B) Hydrophobicity profile of (A) ASK1 or (B) SLY1. In both cases, hydrophobicity scores were plotted along the amino acid sequence. Residues with scores above 0 are considered hydrophobic; those below 0 are hydrophilic. Major hydrophobic peaks are highlighted by red circles. The hydrophobic peaks are shown at the bottom of the plot. Regions involved in protein-protein interactions are indicated below each graph. (C) *Top*: AtSLY1 is represented by rectangles, colored according to their per-residue pLDDT values. *Bottom*: Schematic representation of AtSLY1. Motifs are illustrated by boxes. Predicted AlphaFold helices are represented on top of the schematic representation. (D) Canonical structure of SLY1 from plants. The α -helices are represented as cylinders, the N-terminus region that contacts ASK1 is colored in green. The C-terminus region that contacts DELLA is colored in pale blue. The position of the GGF and LSL motifs their lateral chains are depicted as sticks. Residues at the N and C-terminus are predicted to be disordered and were omitted for clarity. (E-F) The three-dimensional structure of AtSLY1 is represented in cartoon and surface representations. (E) Interaction surfaces are depicted in color: green for the region interacting with ASK1, pink for interaction with DELLA, and blue for the rest of the structure. (F) The position of the two major hydrophobic peaks identified by the Kyte-Doolittle hydrophobicity plots are highlighted on the same structure: surface with the GGF motif colored in orange and the LSL motif colored in magenta, indicating potential interaction interfaces. (G-H) Web logos highlighting conserved motifs in SLY1 orthologues. (G) Web logo centered on the AtSLY1 GGF motif (orange), (H) on the LSL motif (magenta). Hydrophobic peaks identified using Kyte-Doolittle hydrophobicity plots are highlighted respectively in orange on helix α 5 and pink on helix α 7.

A



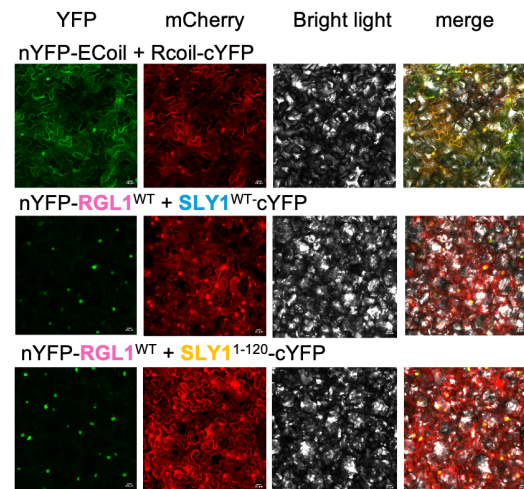
B



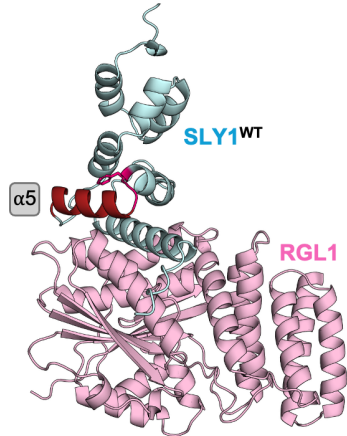
C



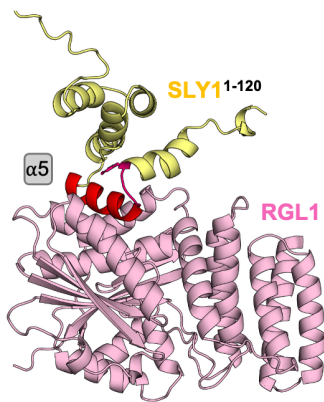
D



E



F



G

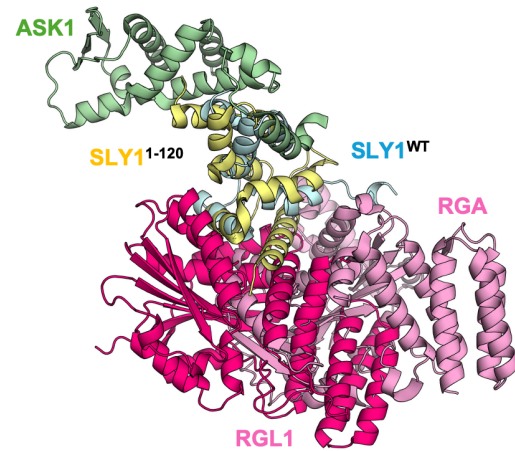


Figure 2.2 Structural model of SLY1 and functional interaction with DELLA.

(A) Predicted structure of an AtASK1-AtSLY1 complex dimer. (B) Predicted aligned error plot (PAE) for the structure presented in (A). (C) Schematic representation of SLY1¹⁻¹⁵¹ and truncated SLY1¹⁻¹²⁰, where helices are illustrated by boxes. (D) Bimolecular fluorescence complementation assay between SLY1 and RGL1 in *Nicotiana benthamiana* leaves. In this assay nYFP-RGL1^{WT} was co-expressed with SLY1¹⁻¹⁵¹-cYFP or SLY1¹⁻¹²⁰-cYFP. Co-expression of nYFP-ECoil and RCoil-cYFP was used as positive control. (E-F) AlphaFold predicted structure comparison of RGL1 in complex with SLY1¹⁻¹⁵¹ (E) or SLY1¹⁻¹²⁰ (F). (G) Alignment of AlphaFold predicted structure of SLY1¹⁻¹²⁰/RGL1 and cryo-EM structure of ASK1-SLY1-RGA-GID1A complex (PDB: 9O4K).

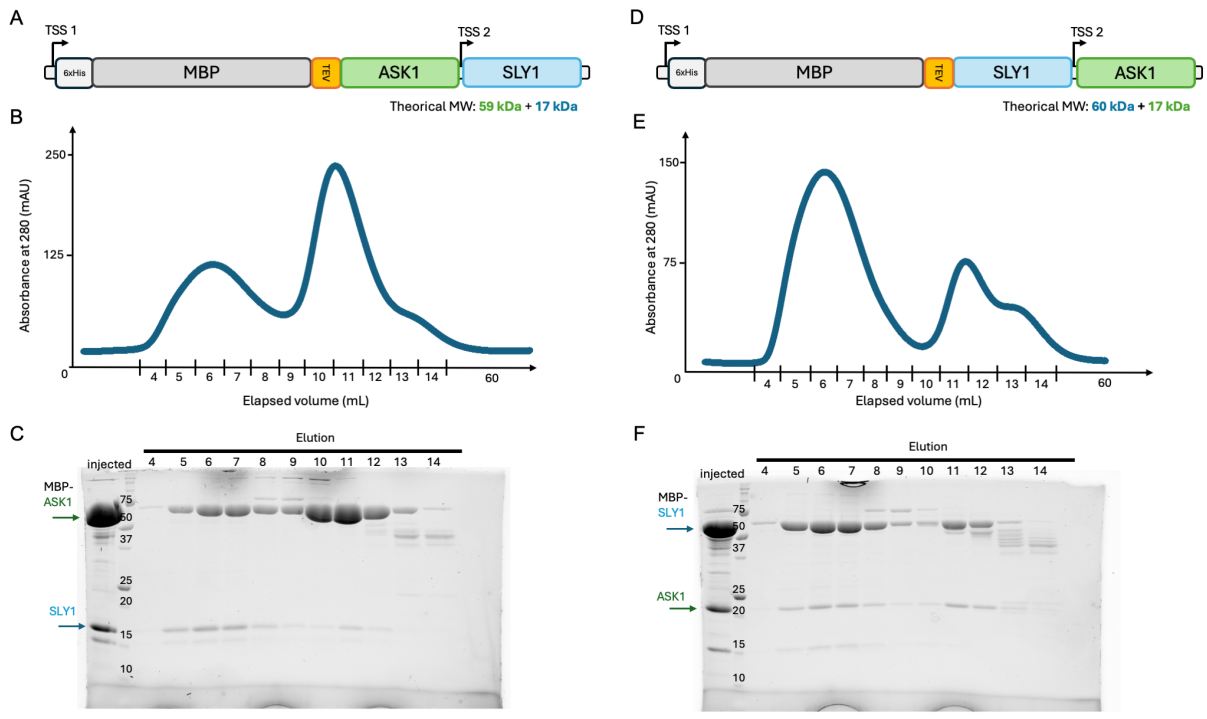


Figure 2.3 The MBP tag improves solubility of ASK1/SLY1 complexes.

Schematic representation of the strategy used for co-expressing MBP-ASK1 and SLY1 in *E. coli*. Transcription start sites (TSS) are represented in front of the expressed proteins. Motifs and proteins are depicted by colored rectangles: 6xHis tag for purification in pale grey, solubilizing maltose-binding protein (MBP) tag in grey, tobacco each virus cleavage motif in orange, ASK1 in green and SLY1 in blue. (B) Gel-filtration chromatogram of co-expressed MBP-SLY1/ASK1. (C) SDS-PAGE analysis of gel-filtration fractions shown in (B). (D) Schematic representation of the strategy used for co-expressing MBP-SLY1 and ASK1 in *E. coli*. Transcription start sites (TSS) are represented in front of the expressed proteins. Motifs and proteins are depicted by colored rectangles: 6xHis tag for purification in pale grey, solubilizing maltose-binding protein (MBP) tag in grey, tobacco each virus cleavage motif in orange, SLY1 in blue and ASK1 in green. (E) Gel-filtration chromatogram of co-expressed MBP-ASK1/SLY1. (F) SDS-PAGE analysis of gel-filtration fractions shown in (E). In C and F, a band at ~75 kDa corresponds to the endogenous *E. coli* HSP70 chaperone DnaK. The presence of this protein is also consistent with the exposure of hydrophobic residues.

2.7 Supplementary materials

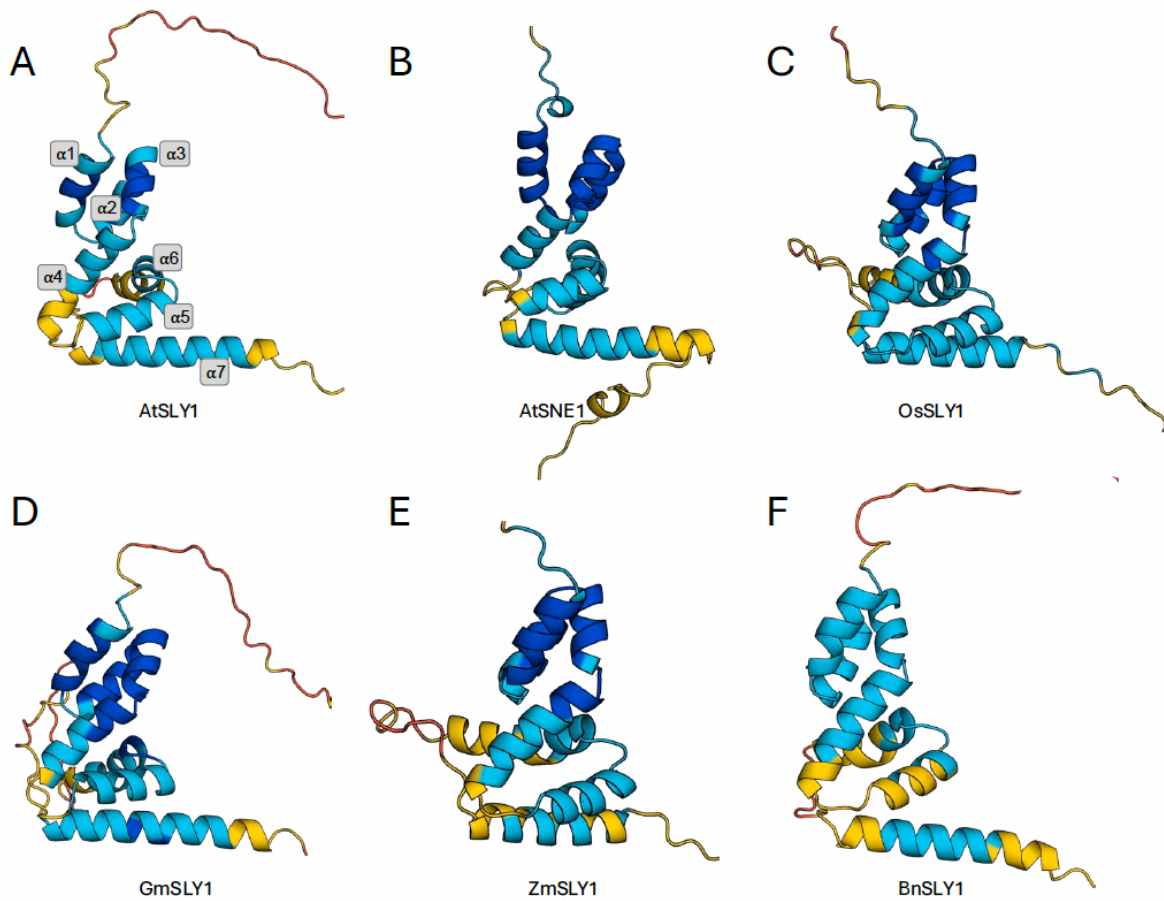


Figure 2.S1 AlphaFold-predicted structures of SLY1 from different crops species.

Three-dimensional structures of SLY1 proteins were generated by AlphaFold v.2 and depicted in cartoon representation. The N- and C-terminal regions, predicted with low confidence, were truncated for clarity in the structural representations. The figure highlights the seven α -helices forming the core of the structure. (A) AtSLY1. (B) AtSNE1. (C) OsSLY1 from rice. (D) GmSLY1 from soybean. (E) ZmSLY1 from maize. (F) BnSLY1 from canola. Proteins are colored according to their per-residue pLDDT values.

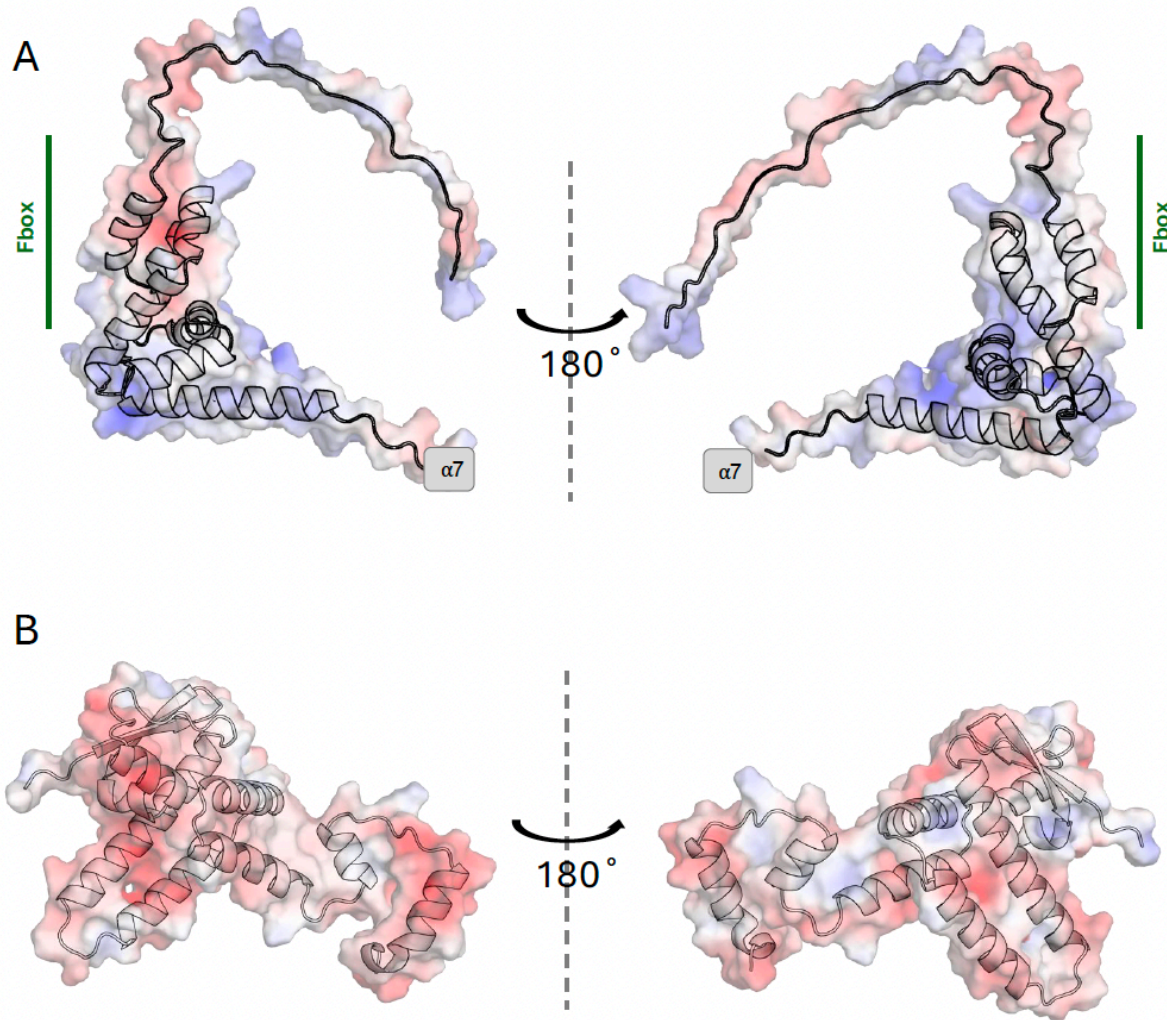


Figure 2.S2 AlphaFold-predicted structures of SLY1 and ASK1.

(A) SLY1 and (B) ASK1 are depicted in surface representation. Electrostatic surface potentials were calculated using APBS and mapped onto the molecular surface. Blue indicates positive electrostatic potential, red indicates negative electrostatic potential, and white indicates near-neutral potential.

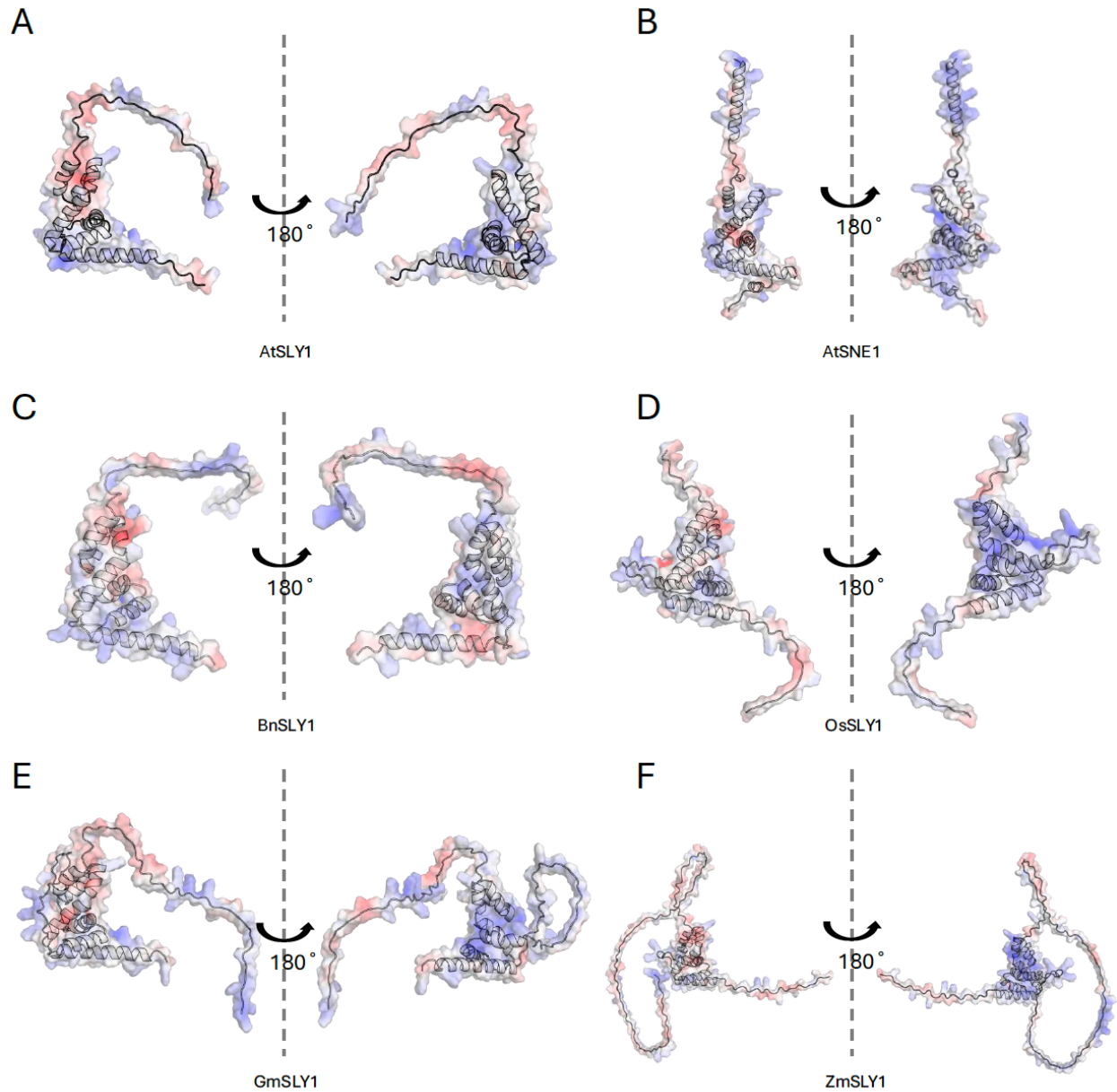


Figure 2.S3 AlphaFold-predicted structures of SLY1.

SLY1 proteins are depicted in surface representation. Electrostatic surface potentials were calculated using APBS and mapped onto the molecular surface. Blue indicates positive electrostatic potential, red indicates negative electrostatic potential, and white indicates near-neutral potential. (A) AtSLY1 (B) AtSNE1 (C) BnSLY1 from *Brassica napus* (canola) (D) OsSLY1 from *Oryza sativa* (rice). (E) GmSLY1 from *Glycine max* (soybean). (F) ZmSLY1 from *Zea mays* (maize).

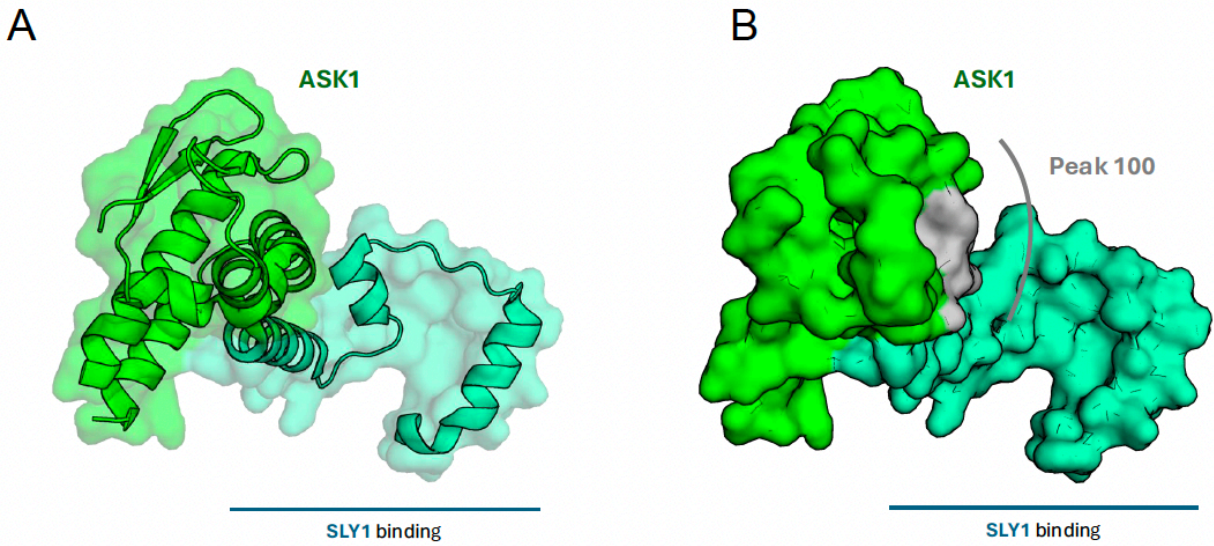


Figure 2.S4 Structure of ASK1.

The three-dimensional structure of AtASK1 from cryo-EM structure (PDB: 9O4K) is shown in cartoon and surface representations. (A) The interaction surfaces for SLY1 are depicted in teal. (B) The "Peak 100" hydrophobic peak identified by the Kyte-Doolittle hydrophobicity scale is highlighted on the structure (grey) and corresponds to α -helix 5 of ASK1.

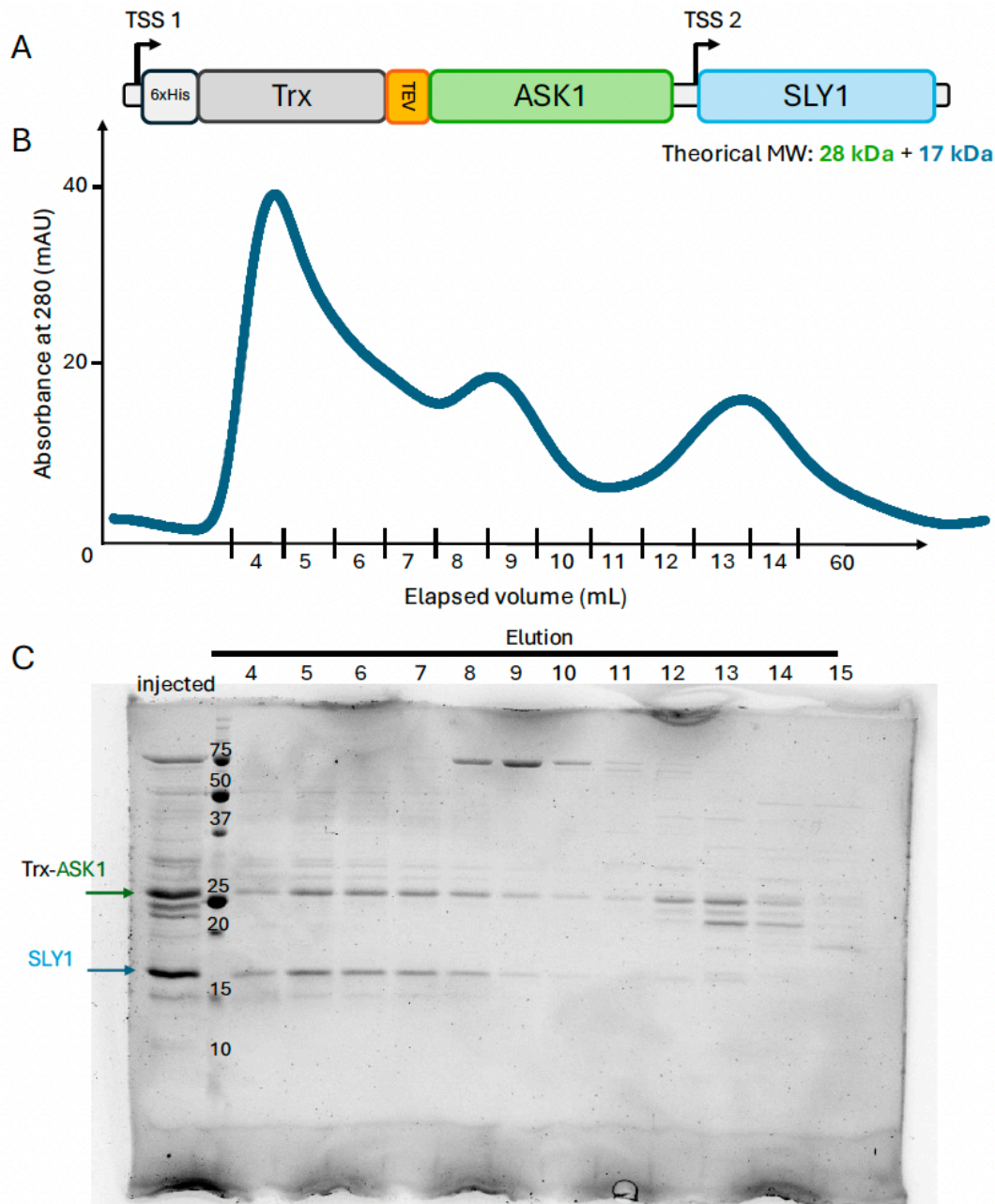


Figure 2.S5 Purification of co-expressed ASK1/SLY1 by gel filtration chromatography.

(A) Schematic representation of the strategy used for co-expressing ASK1 and SLY1 in *E. coli*. Transcription starts sites (TSS) are represented in front of the expressed proteins. Motifs and proteins are depicted by colored rectangles: 6xHistidine tag for purification in pale grey, thioredoxin solubilizing tag (Trx) in grey, tobacco each virus cleavage motif (ENLYFQGS) in yellow, ASK1 (green) and SLY1 (blue). (B) Chromatogram from gel filtration chromatography of the co-expressed ASK1/SLY1. (C) SDS PAGE corresponding to the gel filtration chromatography of the co-expressed ASK1-SLY1. A band at ~75 kDa corresponds to 6th endogenous *E. coli* HSP70 chaperone, which we frequently observe as a co-purifying contaminant under our purification conditions.

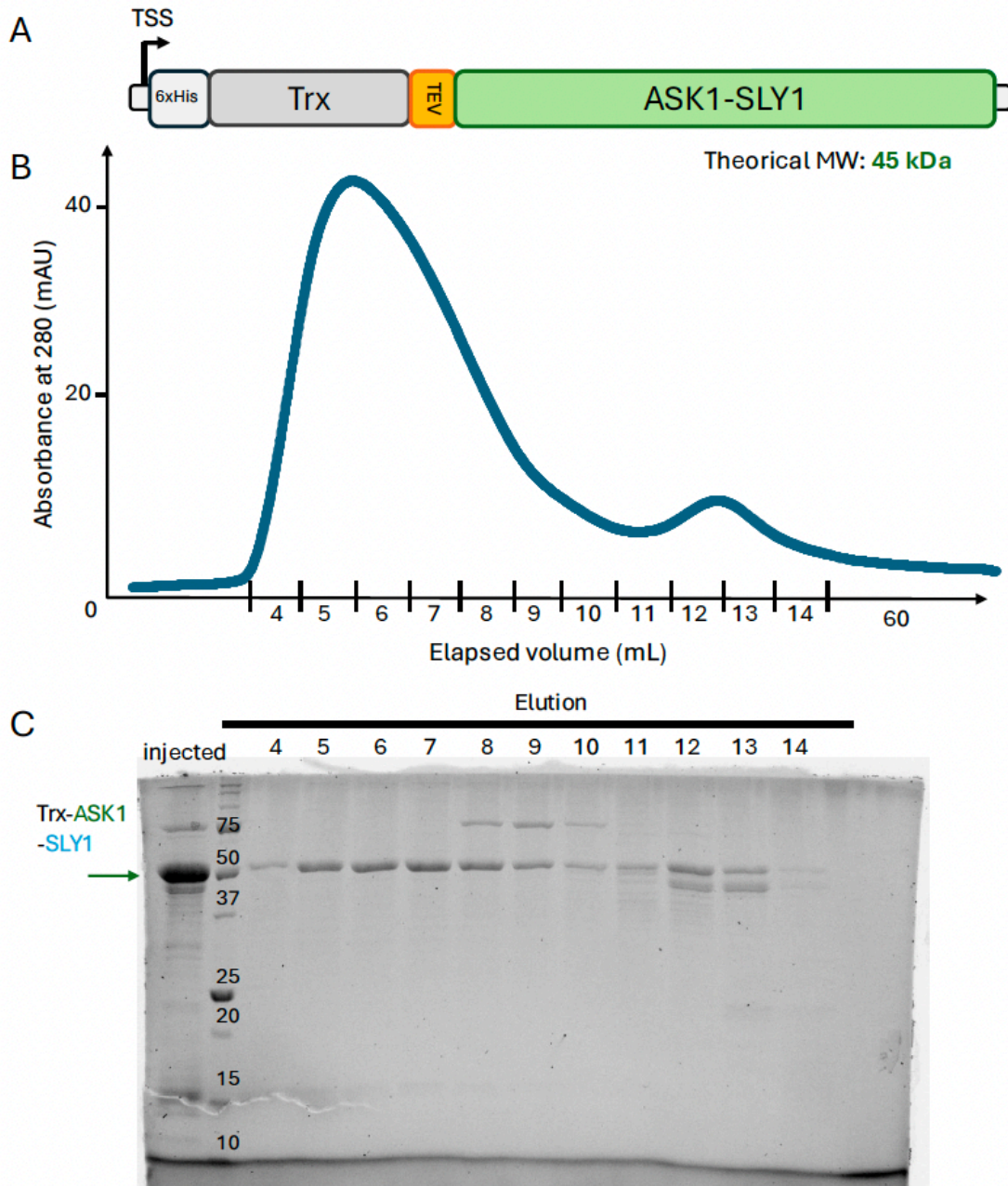


Figure 2.S6 Purification of co-expressed ASK1-SLY1 by gel filtration chromatography.

(A) Schematic representation of the strategy used for co-expressing ASK1 and SLY1 in *E.coli*. Transcription start site (ATG) are represented in front of the expressed protein. Motifs and proteins are depicted by colored rectangles: 6xHistidine tag for purification in pale grey, thioredoxin solubilizing tag (Trx) in grey, tobacco each virus cleavage motif (ENLYFQGS) in yellow, and the linear fused proteins ASK1-SLY1 in green. (B) Chromatogram from gel filtration chromatography of the linear fusion of ASK1-SLY1. (C) SDS-PAGE corresponding to the gel filtration chromatography of linear fusion of ASK1-SLY1. A band at ~75 kDa corresponds to the endogenous *E. coli* HSP70 chaperone, which we frequently observe as a co-purifying contaminant under our purification conditions.

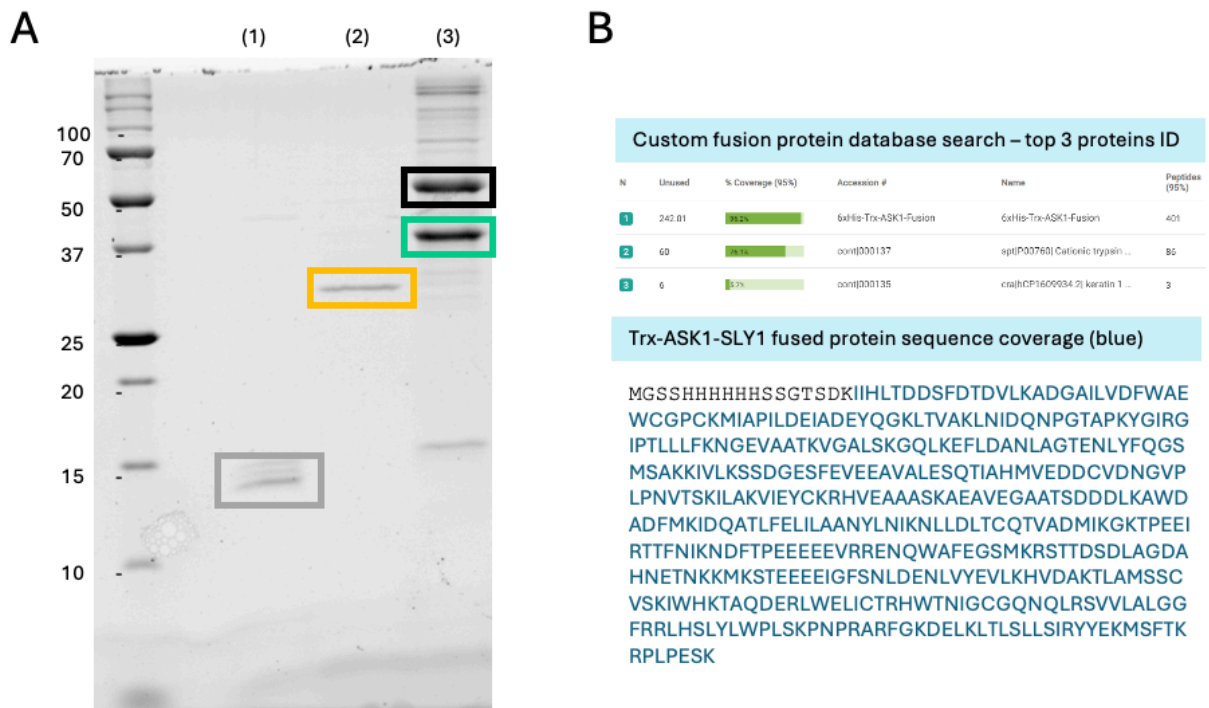


Figure 2.S7 Mass spectroscopy analysis of the ASK1-SLY1 fusion.

(A) SDS-PAGE analysis of samples obtained by gel-filtration purification of TEV-cleaved linear fusion of ASK1-SLY1. From left to right: (1) Thioredoxin solubility tag (Trx) shaded grey box, (2) Tobacco etch virus protease control (TEV) shaded yellow box, and a sample of the Trx::ASK1-SLY1 fusion protein cleaved by TEV. Black square: Purified linear fusion Trx::ASK1-SLY1 identified by LC-MS/MS. Green square: ASK1-SLY1 generated after TEV cleavage. (B) Non cleaved protein from black square was analyzed by LC-MS/MS confirming the amino acid sequence and identity of the protein of the linear fusion of ASK1-SLY1 according to the proteocol (Annexe A).

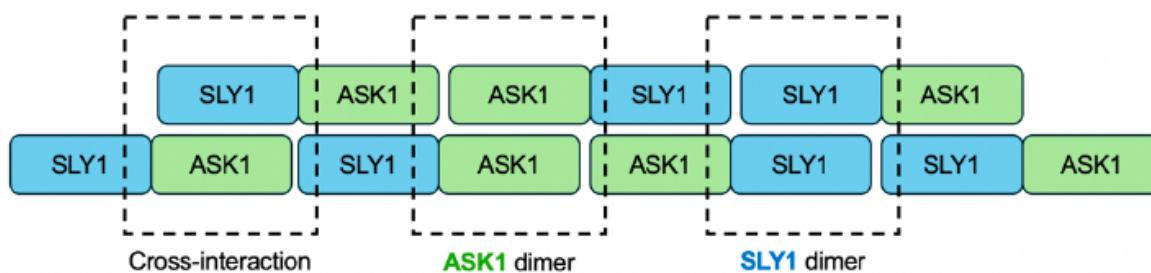


Figure 2.S8 Schematic model of potential oligomeric superstructures formed by fused ASK1-SLY1.

Three distinct interaction interfaces are depicted: (1) Cross-interaction between ASK1 and SLY1. (2) ASK1 homodimer. (3) SLY1 homodimer. Proposed oligomeric architectures are based on structural and biochemical evidence.

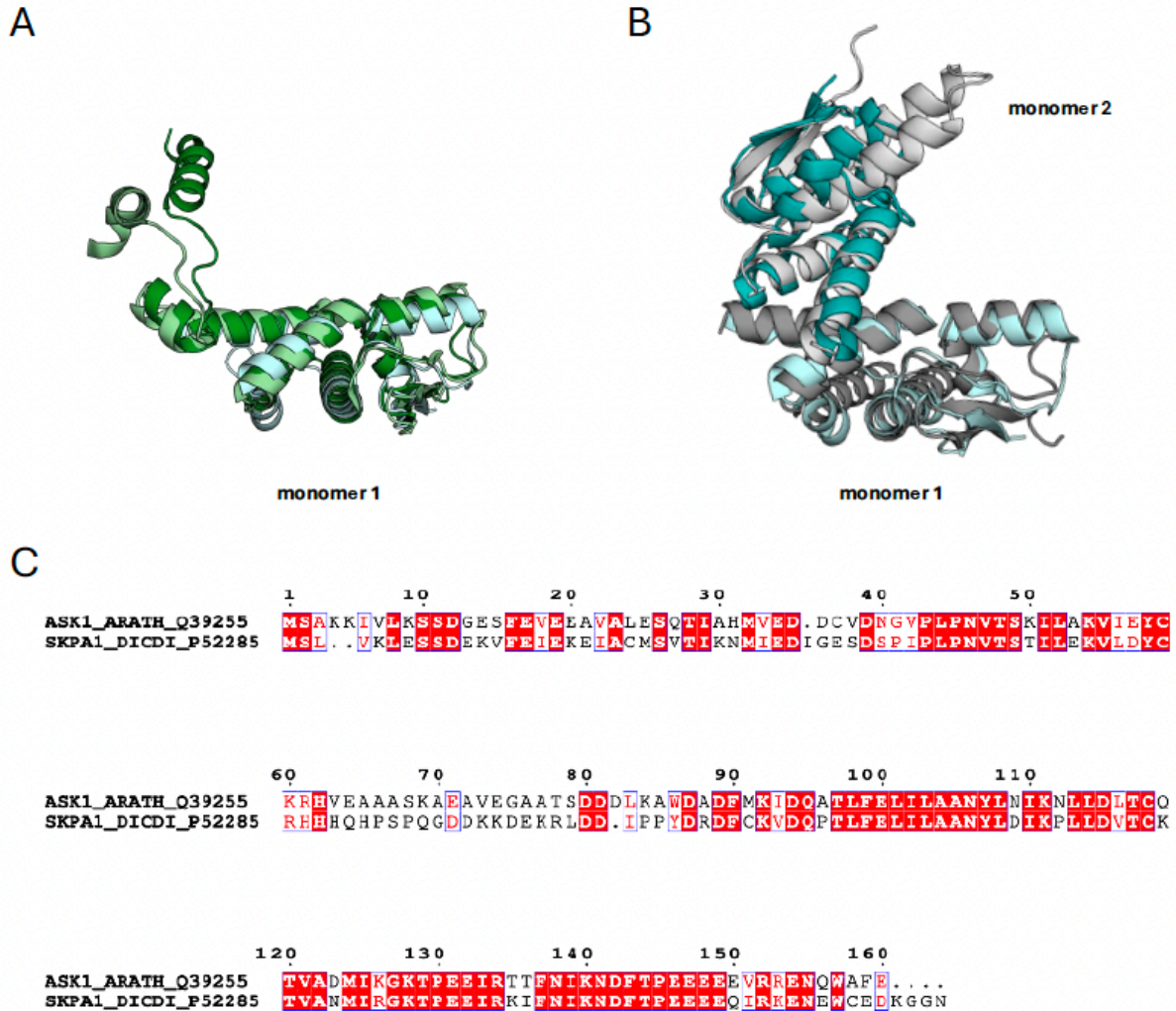


Figure 2.S9 Alignment of SKPA1 structures.

(A) Alignment of three-dimensional structures of monomeric SKPA1 from *Dictyostelium discoideum*, solved by NMR (light blue, PDB: 6V88), predicted by AlphaFold (forest green), and solved by cryo-EM (light green, PDB: 9O4K). (B) Alignment of dimeric structures: the NMR structure of DdASKP1 (turquoise, residues 1-116) and the AlphaFold prediction of AtASK1 (gray, residues 1-127). (C) Sequence alignment of DdSKP1 and AtASK1.

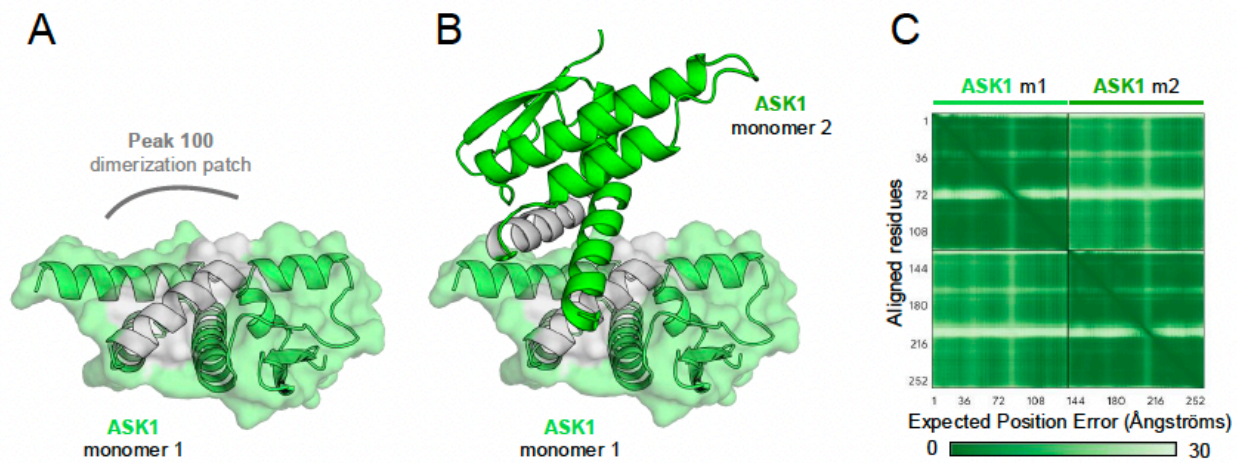


Figure 2.S10 Predicted dimerization of AtASK1.

Predicted three-dimensional structure of AtASK1. The protein is shown in light green on cartoon and surface representations, and the hydrophobic patch predicted by the Kyte-Doolittle scale is colored in grey on helix $\alpha 5$ and labeled "dimerization patch". (B) Predicted three-dimensional structure of an AtASK1 dimer complex. Monomer 2 is shown in dark green, and the hydrophobic patch is highlighted in grey on the second $\alpha 5$ helix. (C) The predicted aligned error (PAE) diagram obtained with AlphaFold v3 suggests an interaction between two monomers of AtASK1.

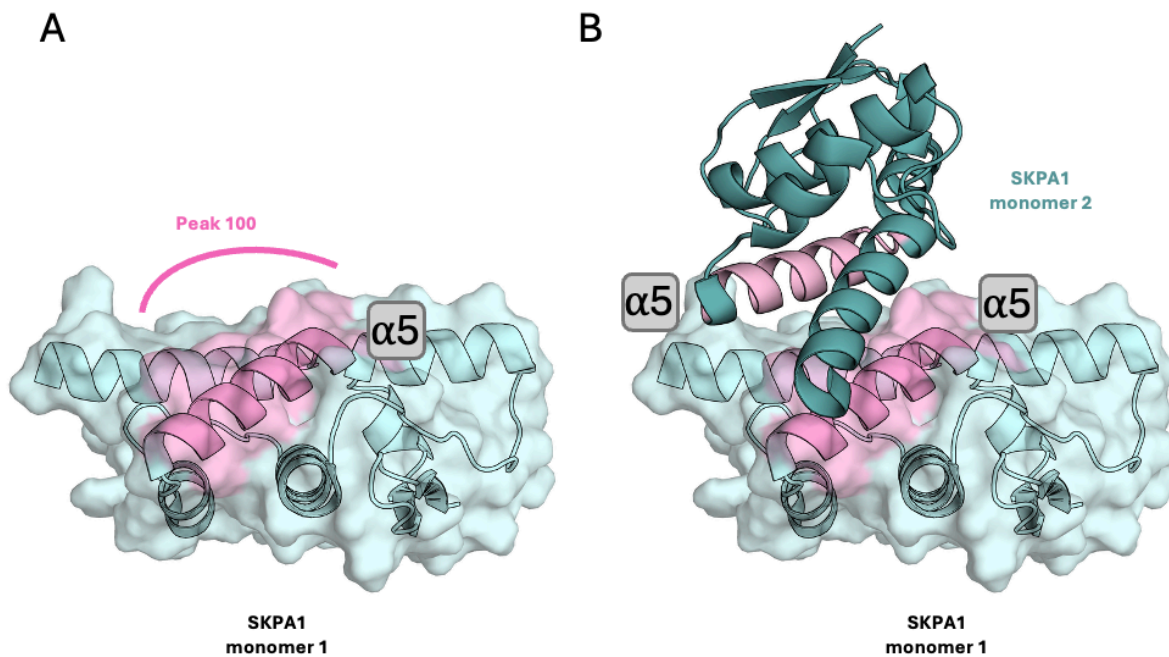


Figure 2.S11 Dimerization of SKPA1 from *Dictyostelium discoideum*.

(A) NMR structure of a monomeric SKPA1 (PDB: 6V88). The protein is shown in light green, cartoon, and surface representation, while the hydrophobic patch predicted by the Kyte-Doolittle scale is depicted in mauve on helix $\alpha 5$ and labeled as "dimerization patch" corresponding to the putative dimerization surface. (B) NMR structure of the DdSKPA1 dimer. The monomer is shown in teal, and the hydrophobic patch is highlighted in mauve on the second $\alpha 5$ helix.

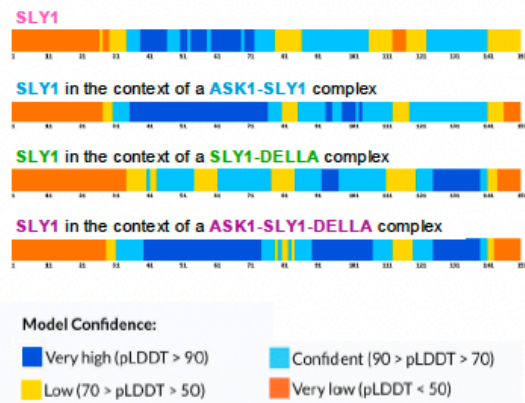
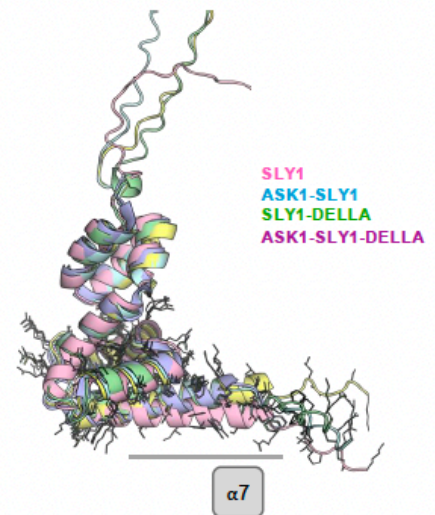
A**B**

Figure 2.S12 Structural consequence of SLY1 binding to ASK1 or DELLA.

(A) pLDDT diagrams for SLY1 modeled alone or in complex with ASK1 or DELLA. SLY1 proteins are represented by rectangles, colored according to their per-residue pLDDT values. **(B)** Structural alignment of AlphaFold-predicted structures of SLY1 in apo or complexed forms along with the cryo-EM structure depicted in yellow (PDB: 9O4K).

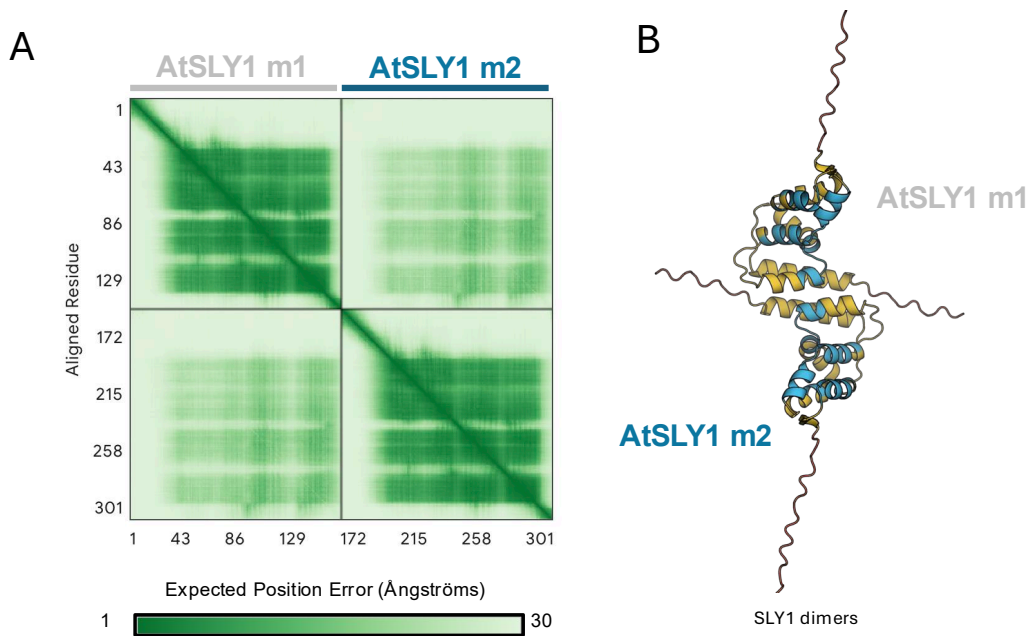


Figure 2.S14 AlphaFold-predicted structures of AtSLY1 dimers.

(A) Predicted aligned error plot (PAE) obtained by AlphaFold v3 suggests (B) an interaction between 2 monomers of AtSLY1.

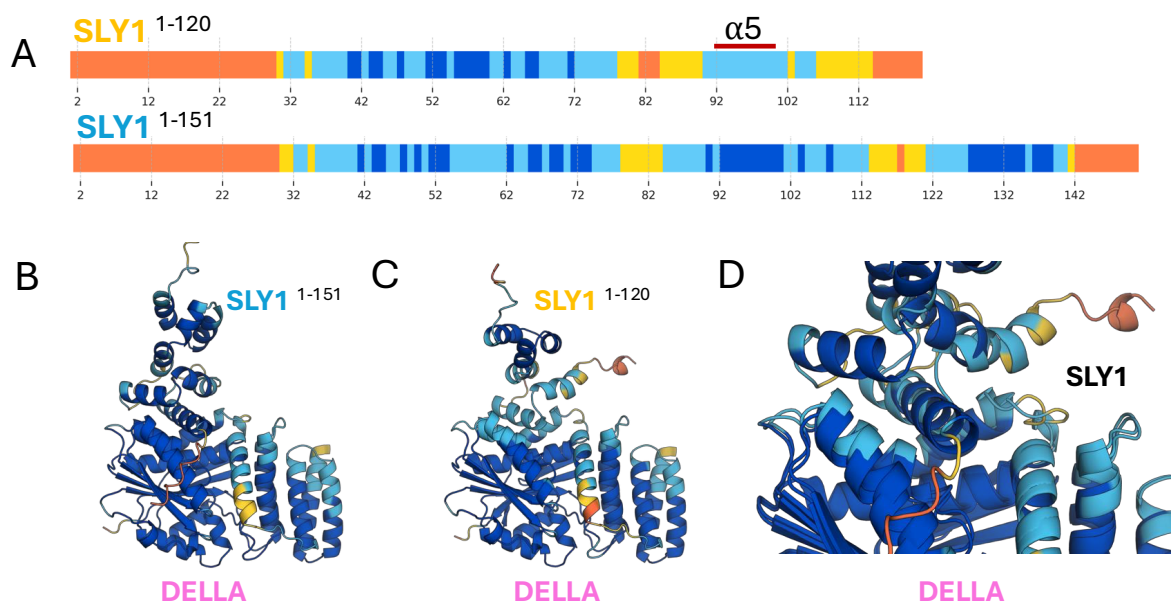


Figure 2.S15 Structural comparison of SLY11-151-RGL1WT and SLY11-120-RGL1WT complexes generated by AlphaFold.

(A) AtSLY11-151 and SLY1¹⁻¹²⁰ are represented by rectangles, colored according to their per-residue pLDDT values. (B) AtSLY1¹⁻¹⁵¹ / AtRGL1^{WT}. (C) AtSLY1¹⁻¹²⁰ / RGL1^{WT}. AlphaFold predicted interaction structure between SLY1, and DELLA are colored according to their per-residue pLDDT values. (D) Close up view on the alignment of SLY1¹⁻¹⁵¹ and SLY1¹⁻¹²⁰ interacted with DELLA.

Table 2.S1 Accession numbers for ASK1, SLY1s and DELLA used in structural modelization by AlphaFold prediction.

Protein	Accession Numbers	Species
ASK1	Q39255	<i>Arabidopsis thaliana</i>
SKPA1	P52285	<i>Dictyostelium discoideum</i>
SLY1	Q9STX3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
SNE1	Q9LUB6	<i>Arabidopsis thaliana</i>
SLY1	Q7XAK4	<i>Oryza sativa</i>
SLY1	C6T4T3	<i>Glycine max</i>
SLY1	B6SQT1	<i>Zea mays</i>
SLY1	C9E6H5	<i>Brassica napus</i>
SLY1	A0AAF6AM93	<i>Marchantia polymorpha</i>
RGL1	Q9C8Y3	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Table 2.S2 Information on the SLY1s proteins used in alignment and Web Logo 3 visualizer.

Group	Accession numbers	Species
Monocotyledon	A0A173FEH1	<i>Triticum aestivum</i> (Wheat)
	A0A173FEF5	<i>Triticum uratu</i> (Red wild einkorn)
	M8BUC9	<i>Aegilops tauschii</i> (Tausch's goatgrass)
	G9DRB7	<i>Aegilops tauschii</i> (Tausch's goatgrass)
	A1E0V2	<i>Triticum aestivum</i> (Wheat)
	A0A173FEG6	<i>Aegilops speltoides</i> (Goatgrass)
	A0A173FEG3	<i>Aegilops speltoides</i> (Goatgrass)
	A0A173FEG0	<i>Aegilops speltoides</i> (Goatgrass)
	A0A077RVB5	<i>Triticum aestivum</i> (Wheat)
	Q7XAK4	<i>Oryza sativa</i> (Rice)
	A0A1E5VQI7	<i>Dichanthelium oligosanthes</i> (Heller's rosette grass)
	A0A3L6RT60	<i>Panicum miliaceum</i> (Proso millet)
	A0A3L6QCI5	<i>Panicum miliaceum</i> (Proso millet)
	A0A3L6F411	<i>Zea mays</i> (maize)
	A0A1D6Q3S6	<i>Zea mays</i> (maize)
	A0A1D6HBI7	<i>Zea mays</i> (maize)
	B6TE19	<i>Zea mays</i> (maize)
	B6SQT1	<i>Zea mays</i> (maize)
	A0A3L6EHJ5	<i>Zea mays</i> (maize)
	A0A6P5G1J6	<i>Ananas comosus</i> (Pineapple)
	A0A199VGS2	<i>Ananas comosus</i> (Pineapple)
	A0A0K9Q1M7	<i>Zostera marina</i> (Eelgrass)
	A0A1D1YRK2	<i>Anthurium amnicola</i>
	A0A7S8BD78	<i>Dioscorea oppositifolia</i>
	A0A833R9F2	<i>Carex littledalei</i>
	A0A2I0VV95	<i>Dendrobium catenatum</i>
	A0A2I0B6Z9	<i>Apostasia shenzhenica</i>
	A0A8N4IFA1	<i>Elaeis guineensis</i> (Oil palm)
	A0A8K0IPA2	<i>Cocos nucifera</i> (Coconut pal)
	A0A8B9ABQ4	<i>Phoenix dactylifera</i> (Date palm)
	A0A8B8ZVV4	<i>Phoenix dactylifera</i> (Date palm)
	A0A8B7CTK0	<i>Phoenix dactylifera</i> (Date palm)
	A0A8K0HV02	<i>Cocos nucifera</i> (Coconut pal)
A0A6I9SG59	<i>Elaeis guineensis</i> (Oil palm)	
A0A2G3CPT9	<i>Capsicum chinense</i> (Bonnet pepper)	

Dicotyledon	A0A2G2ZRI1	<i>Capsicum annuum (Capsicum pepper)</i>
	A0A1U8GL44	<i>Capsicum annuum (Capsicum pepper)</i>
	M0ZUR4	<i>Solanum tuberosum (Potato)</i>
	A0A0V0HM53	<i>Solanum chacoense (Chaco potato)</i>
	A0A1S3YPN4	<i>Nicotiana tabacum (Common tobacco)</i>
	A0A314L954	<i>Nicotiana attenuata (Coyote tobacco)</i>
	A0A1U7YAE5	<i>Nicotiana glauca (Wood tobacco)</i>
	A0A1S3XAJ3	<i>Nicotiana tabacum (Common tobacco)</i>
	A0A4P8PQL7	<i>Ambrosia artemisiifolia (Common ragweed)</i>
	A0A2J6MA23	<i>Lactuca sativa (Garden lettuce)</i>
	A0A2J6JWF4	<i>Lactuca sativa (Garden lettuce)</i>
	A0A2J6LLB8	<i>Lactuca sativa (Garden lettuce)</i>
	A0A4D9BD28	<i>Salvia splendens (Scarlet sage)</i>
	A0A830CSD8	<i>Phytolacca esculenta (Panicum)</i>
	A0A6I9SJI5	<i>Sesamum indicum (Oriental sesame)</i>
	A0A6P6UR59	<i>Coffea arabica (Arabian coffee)</i>
	A0A6P6UHP0	<i>Coffea arabica (Arabian coffee)</i>
	A0A5B7CAW2	<i>Davidia involucrata (Dove tree)</i>
	A0A5B7B9B3	<i>Davidia involucrata (Dove tree)</i>
	V5QMV7	<i>Actinidia chinensis (Kiwi)</i>
	V5QN53	<i>Actinidia chinensis (Kiwi)</i>
	V5QMU5	<i>Actinidia chinensis (Kiwi)</i>
	A0A443NHN2	<i>Cinnamomum micranthum (Cinnamon)</i>
	A0A3S3NK76	<i>Cinnamomum micranthum (Cinnamon)</i>
	A0A7J6UZG5	<i>Thalictrum thalictroides (Rue anemone)</i>
	A0A2I4HRQ3	<i>Juglans regia (English walnut)</i>
	A0A438KPL7	<i>Vitis vinifera (Grape)</i>
	A0A438FB85	<i>Vitis vinifera (Grape)</i>
	A0A5B7BTV6	<i>Davidia involucrata (Dove tree)</i>
	A0A1U8B555	<i>Nelumbo nucifera (Sacred lotus)</i>
A0A1U7Z310	<i>Nelumbo nucifera (Sacred lotus)</i>	
A0A6A3BWN4	<i>Hibiscus syriacus (Rose of sharon)</i>	
A0A6A2YEQ6	<i>Hibiscus syriacus (Rose of sharon)</i>	
A0A6A2YTG4	<i>Hibiscus syriacus (Rose of sharon)</i>	
A0A5B6UAQ4	<i>Gossypium australe</i>	
A0A6P5ZID4	<i>Durio zibethinus (Durian)</i>	
A0A6A3AZH1	<i>Hibiscus syriacus (Rose of sharon)</i>	
A0A6P6B6V2	<i>Durio zibethinus (Durian)</i>	

A0A6P6ANS9	<i>Durio zibethinus (Durian)</i>
A0A6J1A9M2	<i>Herrania umbratica</i>
A0A6A3C918	<i>Hibiscus syriacus (Rose of sharon)</i>
A0A6A2YVQ8	<i>Hibiscus syriacus (Rose of sharon)</i>
A0A6P4Q3F3	<i>Gossypium arboreum (Tree cotton)</i>
A0A1U8LX06	<i>Gossypium hirsutum (Upland cotton)</i>
A0A445H3J4	<i>Glycine soja (Wild soybean)</i>
A0A151RPG5	<i>Cajanus cajan (Pigeon pea)</i>
A0A8B8JMZ3	<i>Abrus precatorius (Indian licorice)</i>
A0A445GB21	<i>Glycine soja (Wild soybean)</i>
A0A371EBW0	<i>Mucuna pruriens (Velvet bean)</i>
A0A6P5MP73	<i>Arachis duranensis (Wild peanut)</i>
A0A6P5M835	<i>Arachis duranensis (Wild peanut)</i>
A0A8B8LH59	<i>Abrus precatorius (Indian licorice)</i>
I3T3Z8	<i>Medicago truncatula (Barrel medic)</i>
A0A2K3N8I9	<i>Trifolium pratense (Red clover)</i>
A0A1S3E851	<i>Cicer arietinum (Chickpea)</i>
A0A1S2YAR6	<i>Cicer arietinum (Chickpea)</i>
A0A151TTV7	<i>Cajanus cajan (Pigeon pea)</i>
C6T4T3	<i>Glycine max (Glycine hispida)</i>
A0A445KVV5	<i>Glycine soja (Wild soybean)</i>
A0A445K4I9	<i>Glycine soja (Wild soybean)</i>
A0A0B2SK03	<i>Glycine soja (Wild soybean)</i>
A0A1S3U231	<i>Vigna radiata (Mung bean)</i>
A0A1S3TR62	<i>Vigna radiata (Mung bean)</i>
A0A4D6NU42	<i>Vigna unguiculata (Cowpea)</i>
A0A087GMU5	<i>Arbis alpina (Alpine rock-cress)</i>
A0A178V5B2	<i>Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)</i>
Q9STX3	<i>Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)</i>
C9E6H5	<i>Brassica napus (Rape)</i>
A0A6J0KZF6	<i>Raphanus sativus (Radish)</i>
A0A1J3HXE9	<i>Noccaea caerulescens (Alpine penny-cree)</i>
A0A1J3FMS9	<i>Noccaea caerulescens (Alpine penny-cree)</i>
A0A1J3ICY0	<i>Noccaea caerulescens (Alpine penny-cree)</i>
A0A1J3EDA8	<i>Noccaea caerulescens (Alpine penny-cree)</i>
A0A5A7V5E1	<i>Cucumis melo</i>
A0A6J1K7I7	<i>Cucurbita maxima (Pumkin)</i>
A0A6J1HCI1	<i>Cucurbita moschata (Winter crookneck squash)</i>

A0A6P8EB04	<i>Punica granatum (Pomegranate)</i>
A0A8B8PT89	<i>Rhodamnia argentea</i>
A0A8B8PTA1	<i>Rhodamnia argentea</i>
A0A8B8PT96	<i>Rhodamnia argentea</i>
A0A510C4J4	<i>Paeonia suffruticosa (Tree peony)</i>
A0A7J7CPU3	<i>Tripterygium wilfordii (Thunder god vine)</i>
B9R752	<i>Ricinus communis (Castor bean)</i>
A0A4U5N8R1	<i>Populus alba (White poplar)</i>
A0A6J1J293	<i>Cucurbita maxima (Pumkin)</i>
A0A6J1FMD6	<i>Cucurbita moschata (Winter crookneck squash)</i>
A0A6J1DCV3	<i>Momordica charantia (Bitter gourd)</i>
A0A1S3BV18	<i>Cucumis melo (Muskmelon)</i>
A0A6J1ILD7	<i>Cucurbita maxima (Pumkin)</i>
A0A6J1FA22	<i>Cucurbita moschata (Winter crookneck squash)</i>
A0A6P4AGW5	<i>Ziziphus jujuba (Chinese jujube)</i>
W9RGE7	<i>Morus notabilis</i>
A0A2I4EKK0	<i>Juglans regia (English walnut)</i>
A0A6A1W5B6	<i>Morella rubra</i>
A0A2I4HW98	<i>Juglans regia (English walnut)</i>
A0A314XNJ7	<i>Prunus yedoensis</i>
A0A7L9CSQ6	<i>Prunus salicina</i>
A0A7L9CS34	<i>Prunus salicina</i>
A0A6P5T1S6	<i>Prunus avoium (Cherry)</i>
A0A314XHR6	<i>Prunus yedoensis</i>

Table 2.S3 Primers used in this study.

Primer for point mutations 5'-3'		
pRSFduet Trx ASK1-SLY1		
ASK1	Fw	CTTGTATTTCCAGGGATCCATGTCTGCGAAGAAGATTGTGTTGAAGAG
	Rv	GCGCCGAGCTCGAATTCGGATCCTCATTCAAAGCCCATTGGTTCTCTCTG
SLY1	Fw	AGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATG AAGCGCAGTACTACCGACTC
	Rv	CGAGATCTGCCATATGTTATTTGGATTCTGGAAGAGGTCTCTTAGTGA
pRSF Trx ASK1 SLY1 (fused)		
ASK1	Fw	CTTGTATTTCCAGGGATCCATGTCTGCGAAGAAGATTGTGTTGAAGAG
	Rv	CGGTAGTACTGCGCTTCATGGATCCTCAAAGCCCATTGG
SLY1	Fw	CCAATGGGCTTTTGAAGGATCCATGAAGCGCAGTACTACCG
	Rv	CGAGATCTGCCATATGTTATTTGGATTCTGGAAGAGGTCTCTTAGTGA
pRSFduet MBP ASK1-SLY1		
ASK1	Fw	CTTGTATTTCCAGGGATCCATGTCTGCGAAGAAGATTGTGTTGAAGAG
	Rv	GCGCCGAGCTCGAATTCGGATCCTCATTCAAAGCCCATTGGTTCTCTCTG
SLY1	Fw	AGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATG AAGCGCAGTACTACCGACTC
	Rv	CGAGATCTGCCATATGTTATTTGGATTCTGGAAGAGGTCTCTTAGTGA
pRSFduet MBP SLY1-ASK1		
SLY1	Fw	GGTACCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGATCCATGAAGCGCAGTACTACCG
	Rv	GCGCCGAGCTCGAATTCGGATCCTCATTGGATTCTGGAAGAGGTCT
ASK1	Fw	AGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGTCTGCGAAGAAGATTGTGTG
	Rv	CCGATATCCAATTGAGATCTGCCATATGTCATTCAAAGCCCATTGGTTC
pAVA SLY1-cYFP		
SLY1 (1-151)	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGAAGCGCAGTACTACCGACTC
	Rv	GCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCGCTTTGGATTCTGGAAGAGG
SLY1 (1-120)	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGAAGCGCAGTACTACCGACTC
	Rv	GCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCACCGAACCTAGCACGC
pAVA RGL1-nYFP		
RGL1	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGAAGAGAGAGCACAACCACC
	Rv	TTGCTCACCATGCCGCCGCCGCTTCCACACGATTGATTTCG

CHAPITRE 3

STRUCTURAL MODULATION OF CRY1'S HEAD TO TOE ACTIVITY INTERFACE BY W352 AND R442

SOULEÏMEN JMII^{1,2,3}, et LAURENT CAPPADOCIA^{1,2,3}

¹Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, QC, Canada

²Centre Sève, Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

³PROTEO, Quebec Network for Research on Protein, Function, Engineering and Applications, Montréal, QC, Canada

Manuscrit en cours d'écriture.

Contributions : Souleïmen Jmii a conçu le projet, collecté et analysé les données, écrit le manuscrit original, préparé les figures et édité le manuscrit. Laurent Cappadocia a supervisé, conçu le projet, acquis les fonds, donné accès aux ressources et édité le manuscrit.

3.1 Résumé

Les cryptochromes sont des photorécepteurs de la lumière bleue jouant un rôle central dans la régulation de la croissance, du développement et des réponses au stress chez les plantes. Parmi eux, CRY1 est classiquement considéré comme une protéine de signalisation monomérique, malgré sa proximité structurale et fonctionnelle avec CRY2, dont l'oligomérisation induite par la lumière est bien documentée. À l'aide de prédictions structurales et d'analyses d'interfaces, nous montrons que le domaine PHR de CRY1 est capable de former des oligomères *via* des interfaces (H-H) et (H-T) conservées, analogues à celles décrites pour CRY2. Nous identifions les résidus W352 et R442 comme des déterminants clés de la dynamique d'oligomérisation de CRY1. Des mutations en ces positions modifient l'accessibilité de l'interface H-T, entraînant des changements dans la formation des oligomères et augmentant l'interaction entre CRY1 et le facteur de choc thermique HsFA1d. Ce travail propose un modèle mécanistique reliant la régulation de CRY1 à son rôle dans la régulation transcriptionnelle dépendante de la lumière et les réponses au stress chez les plantes.

Mots clés: Arabidopsis, CRY1, queue C-terminale, CTT, mutants

3.2 Abstract

Cryptochromes are blue-light photoreceptors that play a central role in the regulation of plant growth, development, and stress responses. Among them, CRY1 is considered as a monomeric signaling protein, despite its close structural and functional relationship with CRY2, whose light-induced oligomerization is well documented. Using structural predictions and interface analyses, we demonstrate that the PHR domain of CRY1 is capable of forming oligomers through conserved head-to-head (H-H) and head-to-tail (H-T) interfaces, analogous to those described for CRY2. We identify residues W352 and R442 as key determinants of CRY1 oligomerization dynamics. Mutations at these positions alter the accessibility of the H-T interface, leading to changes in oligomer formation and increasing the interaction between CRY1 and the heat-shock factor HsFA1d. This work provides a new mechanistic model linking CRY1 regulation to its role in light-dependent transcriptional regulation and stress responses in plants.

Keys words : Arabidopsis, CRY1, CTT, mutants

3.3 Introduction

Cryptochromes (CRYs) are evolutionarily conserved blue light receptors involved in various developmental mechanisms (DeOliveira et Crane, 2024; Lu *et al.*, 2025), and play roles in responses to high-temperature stress (Gao *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2025). Plants possess two types of cryptochromes: CRY1 and CRY2, localized in the nucleus (Yang *et al.*, 2000). Cryptochromes are derived from photolyases and consist of two fundamental units: a highly conserved N-terminal domain termed the Photolyase Homology Region (PHR), and an intrinsically disordered region (IDR) termed the C-terminal tail (CTT), with significant variations in length and sequence among species (Brautigam *et al.*, 2004). The PHR domain itself is subdivided into two subregions: an N-terminal α/β region and an α -helical region (Brautigam *et al.*, 2004; Palayam *et al.*, 2021). The PHR domain binds a chromophore, a flavin adenine dinucleotide (FAD). FAD is essential for light detection through light-dependent reduction (Brautigam *et al.*, 2004). Excitation of FAD induces a conformational change in the molecule, this triggers an allosteric change in the CTT and the PHR domain (Goett-Zink *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Thöing *et al.*, 2015), exposing new surfaces for interaction with partner proteins such as HsFs proteins (Jmii *et al.*, 2025), GID1 and DELLA (Xu *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2021). The CTT also participates in the regulation of cryptochromes by recruiting interaction partners (Parico *et al.*, 2020) or modulating the oligomeric state of CRYs in *Drosophila* (Richter et Fingerhut, 2020). In the dark, CRYs exist in monomeric forms. Upon excitation by blue light, CRYs adopt a photoactive conformation as either dimers or tetramers, depending on two distinct interfaces: Head-to-Head (H-H) and Head-to-Toe (H-T) (Palayam *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2020). This oligomeric state is modulated in a sequential manner *in vivo* by BLUE-LIGHT INHIBITOR OF CRYPTOCHROMES (BIC) BICs (Just *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2020) and *in vitro* by alanine substitutions within the PHR domain of CRY2. Mutations W349A and R439A destabilize oligomers by acting at the H-T interface (Shao *et al.*, 2020). Furthermore, W349A has also been shown to cause a loss of affinity for the inhibitor BIC2 (Ma *et al.*, 2020). Another residue, W374, is part of a catalytic triad enabling photoactivation of the protein; substitution of this residue with alanine stabilizes dimer formation at the H-T interface without requiring photoactivation (Shao *et al.*, 2020). In *Drosophila melanogaster*, a stretch of hydrophobic residues located on the CTT specifically binds to the FAD-binding site, forming an $\alpha 22$, a behavior analogous to how photolyase bind to a photolesion on DNA acting as a substrate-mimic element and inhibit CRY1 activity in the dark (Czarna *et al.*, 2013). In the absence of light, this interaction stabilizes a "docked" conformation that maintains CRY1 in an auto-inhibited state, thereby preventing the PHR domain from interacting with its circadian targets, such as the TIMELESS protein or the E3 ligase JETLAG (Parico et Partch, 2020). Light exposure triggers FAD reduction, leading to uncoiling of the CTT and release of the PHR domain, which can then regulate the degradation of TIMELESS (Czarna *et al.*, 2013). Instead of secondary structure, plant CRY CTTs display high sequence diversity harboring short linear motifs (SLiMs) that act as

functional structural elements and targets of post-translational modifications, thereby expanding proteins-proteins interactions potential (Due Tankmar *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2022; Kumar *et al.*, 2018; O'Shea *et al.*, 2017; Scheer *et al.*, 2021). In CRY1, after blue light illumination, the CTT shifts by 15 Å relative to the PHR domain, favoring H-H dimer formation and promoting interaction with the transcriptional factor MOC15 at the H-T interface (Czarna *et al.*, 2013; Goett-Zink *et al.*, 2021). These interactions between the CTT and the PHR domain are reversible and are considered fundamental for and evolutionarily conserved functional elements in plants, insects, and mammals (Parico *et al.*, 2020). We propose that homologous mutations of W349A and R439A from CRY2 in CRY1 may influence the tetrameric assembly of the PHR domain. By analyzing structural alignments based on available structure of CRY1 in complex with regulatory partners, as well as AlphaFold structure predictions of CRY1 in different orthologs species, we propose a model for the positioning of the CTT along the PHR domain. This model was validated *in vitro* using yeast-two-hybrid assays. This technique also allowed us to assess the interaction between CRY1 and the heat shock factor HsFA1d.

3.4 Methods

3.4.1 Sequence alignments of Arabidopsis and orthologues CRY1

CRY1 and CRY2 sequences from *Arabidopsis thaliana* and orthologues CRY1 sequences from *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, were obtained from UniProtKB, (accession numbers are listed in Table 3.S1). Sequences were aligned using NCBI BLAST (Altschul et Lipman, 1990) and alignment were visualized using Esript v.3 (Robert et Gouet, 2014).

3.4.2 Structural prediction of the CRY1 tetramer

The structure of CRY1 from *Arabidopsis thaliana* as a tetramer was predicted using AlphaFold v3 and compared to the CRY2 tetrameric structure (PDB 6M79) obtained by cryogenic electron microscopy (cryo-EM). The crystal structure of AtCRY1 PHR domain (PDB 1U3C) was compared to CRY1 crystal structure of *Mus musculus* (PDB 6OF7), *Drosophila melanogaster* (PDB 4K03). The crystal structure of AtCRY1 PHR domain (PDB 1U3C) was also compared to the cryo-EM structure of the AtCRY2-AtBIC2 (6K8K) complexes. The structure of Arabidopsis AtCRY1-AtHsFA1d complex was predicted using AlphaFold v.3 (using accession number listed in Table 3.S2). All structural alignments were performed by the visualization software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2 Schrödinger, LLC.).

3.4.3 Molecular cloning and mutagenesis

Plasmids coding for AtCRY1 (#G12079) and HsFA1d (#PADLOX-TF-13-E02) were obtained from the Arabidopsis biological resource center (ABRC). Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the full-length CRY1 sequence (residues 1-682), the CRY1 PHR domain (residues 1-508 aa), and the full-length HsFA1d sequence, which were subsequently cloned into yeast expression vectors using GIBSON assembly. Site-directed mutagenesis was performed using Gibson assembly with specific oligonucleotides (Table 3.S4) to introduce substitutions and truncation, generating CRY1 and HsFA1d mutants. All plasmids were confirmed by Sanger sequencing (Genome Québec) or Nanopore sequencing (Plasmidsaurus).

3.4.4 Yeast 2-hybrid assay and β -galactosidase quantification

Proteins coding sequences were cloned by GIBSON assembly into pGADT7 and pGBKT7 yeast plasmids. As described in Jmii et al. 2025, empty GAL4 bait and prey vector were used as negative controls. Multiple combinations of prey (AD) and bait (BD) were tested using the following set of plasmids: (AD) CRY1^{WT}, CRY1^{W352A}, CRY1^{R442A}, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR W352A}, CRY1^{PHR R442A}; (BD): CRY1^{WT}, CRY1^{W352A}, CRY1^{R442A}, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR W352A}, CRY1^{PHR R442A}, HsFA1d^{WT}. Bait and prey constructs were co-transformed into yeast strain Y187 (TaKaRa) and selected on synthetic lacking leucine and tryptophan dropout medium (SD/-LW) for 3 to 5 days at 30°C. Four random colonies from each transformation were re-selected on (SD/-LW) for 3 days at 30°C. At least three colonies for each transformation pair were selected and resuspended to grow overnight in liquid SD/-LW. Cultures were diluted until 0.05 of optical density (OD)₆₀₀ in liquid rich YPD and grown further until the optical density reached a 0.5 - 0.8 range. The culture was then pelleted and resuspended in 300 μ L of lysis buffer containing 100 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.150 mM of NaCl, 5 mM of L-aspartate, 1% (w/v) BSA and 0.05 % (v/v) Tween-20 in 100 ml solution, pH adjusted to 7.25 - 7.30). Cells were disrupted by repetitively freezing the culture in liquid nitrogen, followed by rapid thawing in a 37 °C water bath. 700 μ L of reaction buffer (2.23 mM chlorophenol red β -D-galactopyranoside (CPRG) Sigma Aldrich, as substrate in buffer 1) was then added to start the reaction. The reaction was stopped when the color of the sample turned orange/red by adding 0.5 ml of 3 mM ZnCl₂. Cell debris were removed by spinning and the OD₅₇₈ of the supernatant was measured using Thermo Scientific NanoDrop. β -galactosidase activity (Miller units) was calculated using the following equation:

$$activity = \frac{1000 \times OD\ 578}{t \times V \times OD\ 600}$$

Where activity is the β -galactosidase unit; t is the elapsed time (in minutes) of incubation; V is 0.1 x concentration factor (in this case V = 0.5). An interaction was deemed ‘not detected’ (ND) if the OD₅₇₈ was <0.01 after 3 h of color development.

3.5 Results

3.5.1 Tetrameric assembly of the CRY1 PHR domain

Given the previous observations that CRY2 forms oligomers (Ma *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2020) and the redundancy in CRY1 and CRY2 functions (Lin, 2000) we aimed to investigate the oligomeric behavior of CRY1. Sequence alignments (Figure 3.S1) and structural analyses (Figure 3.1A) of AtCRY1 and AtCRY2 clearly illustrate the strong similarity between the PHR domains of these two cryptochromes, both at the sequence and structure levels. Structural comparison of monomeric CRY1 (PDB 1U3C) and CRY2 (PDB: 6M79) reveals perfect alignment between the PHR domains of both proteins (Figure 3.1A). The major difference between CRY1 and CRY2 is the presence of a long CTT in CRY1, that is predicted to be disordered by AlphaFold, as evidenced by low Predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) scores for the region 509-681 aa (Figure 3.1B). The Predicted Alignment Error (PAE) values are consistent with a tetrameric arrangement of the CRY1 PHR domain (1-508 aa) (Figure 3.1C). Comparative structural alignment analysis of predicted tetrameric forms of CRY1 and tetrameric CRY2 reveals similarities in the PHR domains arrangement of both proteins. This alignment further highlights two surfaces involved in dimer formation: the Head-to-Head (H-H) interface, which involves both α/β regions, and the Head-to-Toe (H-T) interface, which involves helix α_{10} (Figure 3.1D). These analyses suggest that the PHR domain of CRY1 can form tetramers structurally analogous to those formed by CRY2. The H-T interface has previously been investigated in the context of CRY2 homologs to elucidate the mechanisms underlying monomer formation (Shao *et al.*, 2020). In a targeted mutagenesis study conducted using the resolved tetrameric structure of CRY2, residues W349 and R439 were identified as capable of forming salt bridges that stabilize H-T dimers (Kai *et al.*, 2020). Sequence alignment (Figure 3.S1) and structural comparison between monomeric CRY1 and CRY2 (Figure 3.1A) allowed us to map the equivalent residues between the two proteins. This analysis identifies W352, W377, and R442 in CRY1 as homologous to W349, W374, and R439 in CRY2 (Figure 3.1B) and suggests a role for those residues in the stabilization of CRY1 tetramers.

3.5.2 W352 et R442 modulate CRY1 PHR Head-to-Toe oligomerization

We focused on the H-T interface which has been identified as the light-activated conformation of CRY1 (Hao *et al.*, 2023; Palayam *et al.*, 2021) and as a protein-protein interaction surface following

photoactivation, for partners such as CIB1 (Shao *et al.*, 2020); BIC2 (Ma *et al.*, 2020); (Hao *et al.*, 2023); ROC15 (Li *et al.*, 2022), or HsFs (Jmii *et al.*, 2025). This H-T interface has previously been studied to understand the monomer-oligomer equilibrium in the homolog CRY2 (Shao *et al.*, 2020), with additional residues identified from the AlphaFold predicted CRY1 tetramer, listed in Table 3.S3. Our CRY1 tetramer model suggests that W352 and R442 may form a salt bridge contributing to monomer stabilization (Figure 3.2C). These residues are homologous to W349 and R439 in AtCRY2 (Palayam *et al.*, 2021; Shao *et al.*, 2020). For the remainder of the study, we use a truncated version of CRY1 (residues 1-508), lacking the CTT domain, to mimic CRY2 and assess whether its oligomerization behavior is conserved. We aimed to understand the contribution of residues W352 and R442 to oligomer formation *via* the H-T interface through alanine substitutions in yeast two-hybrid assays. W352A and R442A significantly impair monomer interactions in a Y2H system, as assessed by a decrease in β -galactosidase activity, reducing affinity by 6 and 1.6 fold, respectively, compared to wild-type (WT) (Figure 3.2D). In contrast, W377A increases oligomerization by three times compared to WT (Figure 3.2D), which is consistent with the observation that the W377A mutation leads to a constitutively photoactive CRY1 more prone to form H-T dimers (Kai *et al.*, 2020). Nevertheless, homo-oligomerization assays of full-length CRY1 or the PHR domain alone, performed *via* yeast-two-hybrid assay, show values of 350 and 100 Miller Units (MU), respectively. These results suggest that full-length conformation of CRY1 promotes a more efficient and stable dimerization than the isolated PHR domain alone or that CTT could contribute to the stabilization of oligomers, perhaps by interacting with adjacent PHR monomers (Figure 3.2E).

3.5.3 Alternative positioning of orthologues CTT of CRY1 on the PHR domain

Considering the Yeast-two-hybrid assay results from the previous section, which suggest a mechanism where the CTT of each CRY1 monomer may interact with another monomer, and considering the data showing a displacement of the CRY1 CTT relative to its PHR domain after illumination (Goett-Zink *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022), we sought to understand how the CTT of AtCRY1 is capable of positioning with its PHR domain. First, the intrinsically disordered nature of this region prevents AlphaFold from reliably predicting the structure. We selected orthologous CRY1 sequences from three different species, whose structures have been resolved by cryo-EM and that share structural homology with the PHR domains (*Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, and *Arabidopsis thaliana*). A comparative analysis of the CTT (Figure 3.3A) reveals significant variations in length. In contrast to mice and flies, which possess a shortened CTT, *Arabidopsis* possesses a long CTT of 173 amino acids (Figure 3.S2). Previous study of the *Drosophila melanogaster* cryo-EM structure (PDB 4K03) showed that the CTT is organized as α 22 helix and bound over the FAD-binding (Czarna *et al.*, 2013), and, based on the high structural homology of the PHR domains, it is tempting to speculate that a similar mechanism is likely to occur in *Arabidopsis* (Figure 3.3B).

This intrinsically disordered region, while lacking rigid secondary structure, contains short linear motifs as regulatory modules that maintain protein activity and provide the necessary regulatory dynamics (Parico *et al.*, 2020; Wang et Lin, 2025). Primary sequence alignments of CRYs reveal partial conservation of helix $\alpha 22$ residues from *Drosophila* in *Arabidopsis* CTT (Figure 3.3B). Together, these data may suggest that small motifs may be sufficient to enforcing an orientation of the CTT on the PHR domain. However, the CTT appears to interact with the PHR domain camouflaging the interaction interfaces required for different protein-protein interactions (Goett-Zink *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

3.5.4 The CTT of CRY1 hides Head-to-Toe interacting surface for HsFA1d

Given previous cryo-EM observations of AtCRY2 in complex with its activity inhibitor, AtBIC2 by masking CRY1^{W352} on the H-T surface (Ma *et al.*, 2020) as well as the masking H-T interface by PHR oligomerization (Ma *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2020), we investigated if CRY1 CTT mask the H-T interface activity by camouflaging W352. To this end, we tested the effects of W352A and R442A mutations on the interaction between CRY1 and HsFA1d. The structural constraints imposed by PHR oligomerization of CRY1 and the the CTT folding over the H-T interface occupy the same interaction surface with HsFs (Figure 3.4A). Yeast two-hybrid experiments show that the affinity of the CRY1 PHR domain for HsFA1d varies depending on the mutation tested. For PHR W352A, we observed no significant change compared to wild-type PHR. However, the R442A mutation significantly increases the affinity of CRY1 PHR for HsFA1d by 1.5 fold compared to WT (Figure 3. 4B). The modest increase observed for PHR W352A is likely offset by reduced affinity caused by the loss of W352 interactions with HsFA1d, similar to the observed affinity decrease in isothermal titration calorimetry measure based binding to CIB1 (Shao *et al.*, 2020). This is consistent with the model in which both W352A and R442A contribute to disrupting the H-T dimer. Nevertheless, when the same experiments were performed using full-length CRY1, mutations W352A and R442A led to increases in affinity for HsFA1d by 4 and 2-fold, respectively, compared to wild-type (Figure 3.4B). We suggest the CTT may constitutively folds over the H-T interface of the PHR. The W352A and R442A mutations are suggested to weaken this interaction, potentially allowing the CCT to adopt a more relaxed conformation that could expose the H-T interface. This alanine substitution may also reduce H-T dimerization and could increase the availability of this interface for HsFA1d binding.

3.6 Discussion

Our results are consistent with a possible role of residues W352 and R442 in the regulation of CRY1 activity. These residues, located at the H-T interface within the PHR domain, may participate in interactions that could influence the equilibrium between monomeric and oligomeric forms of CRY1, as previously described for PHR dynamics in CRY2 (Ma *et al.*, 2020; Shao *et al.*, 2020). Their substitution to alanine

residues destabilizes H-T dimers, confirming their involvement in intermolecular interactions that support light-induced oligomerization. This observation is consistent with structural data presented for CRY2 (Shao *et al.*, 2020), in which homologous residues W349 and R439 stabilize the active tetrameric conformation. Thus, the oligomerization mechanism between PHR domains appears to be conserved between the two cryptochromes and the equilibrium influenced by the binding of BICs inhibitors (Just *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2020). However, a distinctive feature of CRY1 lies in the presence of a long C-terminal intrinsically disordered tail, shorter in CRY2 and in most CRY1s orthologs. Comparative sequence analysis indicates that the sequence diversity of the CTT, and the presence of diverse short linear motifs (SLiMs), supports diversity in the CTT behaviors around the PHR domain. The CTT may alternatively conceal or expose interaction interfaces, such as those mediating H-T dimer formation and other protein-protein interactions e.g., HsFs (Jmii *et al.*, 2025); MOC15; (Li *et al.*, 2022); GID1 and DELLA (Xu *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2021); *etc.* This model is further supported by the observed activity of the CTT of CRY1 under blue light exposure (Goett-Zink *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022), and further strengthened by structural analyses of the complex AtCRY2-AtBIC2 (Ma *et al.*, 2020), and AtCRY2-AtCIB1 (Kai Shao, 2020). In the AtCRY2-BIC2 complex (Ma *et al.*, 2020), BIC2 interacts transversely across the PHR domain, specifically near residues W392 and R439, homologous to CRY1 W352 and R442 suggesting a potential pathway for CTT occupancy. Structural analysis reveals a strong proximity between the CTT positioned on the FAD binding pocket of *Drosophila melanogaster* and the AtBIC2 binding site (Figure 3.S3). It is tempting to speculate that the space occupied by BIC2 is occupied by AtCRY1's CTT. The CTT could thus function as an "intramolecular cap," masking interaction interfaces in the dark, and then extending upon light exposure to facilitate binding with partners such as HsFA1d. Our Y2H data support this hypothesis, W352A and R442A significantly increase CRY1's affinity for HsFA1d. This effect is particularly pronounced on full-length protein. These mutations may destabilize the position of the CTT on the PHR domain, significantly increasing CRY1's affinity for HsFA1d. This release of the CTT exposes the H-T surface, which is less capable of forming dimers through this region, thereby making the interaction interface accessible (Shao *et al.*, 2020). Notably, the CTT of *Arabidopsis thaliana* is enriched in small charged and/or aromatic amino acids patches (Figure 3.3A). It is reasonable to speculate that these residues form π -cation or π -stacking interactions with the aromatic ring of W352. This CTT, lacking defined secondary structure, also serves as a site for post-translational modifications (Gao *et al.*, 2013; Parico *et al.*, 2020), which could broaden the regulatory scope of the CTT in interaction with the PHR domain. Directed mutagenesis targeting the charged patches or PTM sites in the CTT could provide similar evidence of relaxing and would enable quantification of interaction dynamics with partners such as HsFA1d without relying on the compensatory negative effects of W352 loss.

3.7 Conclusion

Overall, these findings present a unified view of CRY1 function, a light-dependent protein whose activity hinges on the plasticity of its CTT, capable of masking or exposing oligomerization and protein interaction interfaces. This mechanism of regulation through structural disorder confers a unique versatility to CRY1 among cryptochromes and may explain its central role in photoreceptor signaling and downstream transcriptional coordination.

Conflicts of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author contributions

SJ and LC designed the experiments. SJ collected data. SJ prepared all the figures and tables. SJ and LC drafted and edited the manuscript. SJ and LC reviewed the manuscript approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the Natural Science and Engineering Research Council Discovery grants 2019-06807 to LC. SJ is supported in part by a scholarship from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologie.

Acknowledgments

We thank Laxiga Sinnathurai for her extensive work on HsFs proteins during her master's thesis, and Marina Goliassse for her help with histograms figures aesthetics. We thank the members of François Dragon Lab, for their time and valuable assistance with the yeast-two-hybrids experiments.

3.8 Figures

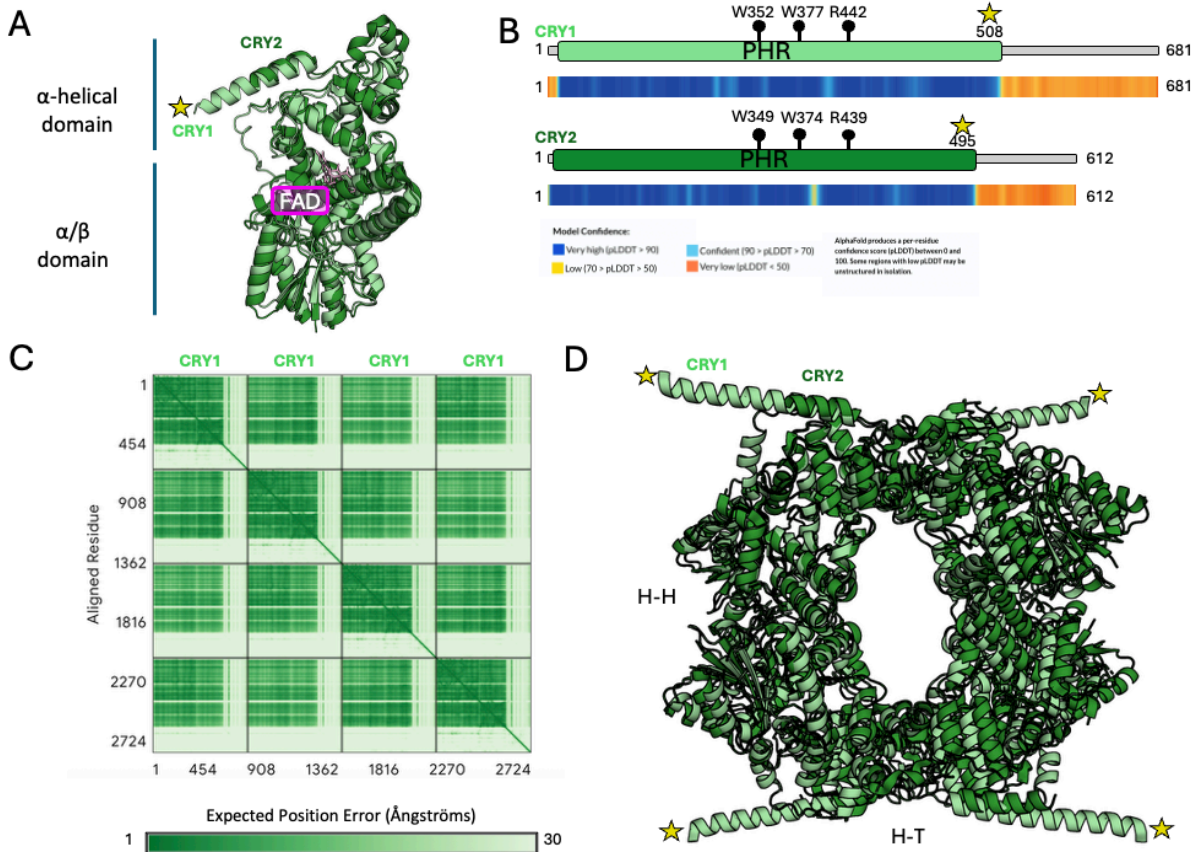


Figure 3.1 Comparative structure and confidence of monomeric and tetrameric CRY1 and CRY2.

(A) Structural alignment of the monomeric cryo-EM structures of *Arabidopsis thaliana* CRY1 (1U3C in pale green) and CRY2 (PDB 6M79 in green forest) highlighting their structural conservation within the PHR domain. FAD is represented in pink. CRY1 residues (509-681 aa) are predicted to be disordered and omitted for clarity. (B) Schematic representation of CRY1 and CRY2. PHR domains is illustrated by boxes. Final PHR α 21 is preceding the disordered tail of AtCRY1 and indicated by a yellow star. Key amino acid residues W352, W377 and R442 from CRY1 and their CRY2 homologues W349, W374 and R439 are indicated by black spheres. Below each CRY1 schematic representation, proteins are represented by rectangles, colored according to their per-residue Predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) values. (C) The predicted aligned error plot obtained by AlphaFold for the CRY1 tetramer suggests an interaction between 4 monomers of CRY1 (1-508 aa). (D) Structural representation of a tetrameric CRY1 (1-508 aa) predicted by AlphaFold v3, aligned on the CRY2 structure elucidated by cryo-EM CRY2 (PDB : 6M79). Final PHR α -helix 21 is preceding the disordered tail of AtCRY1 and indicated by a yellow star. CRY1 residues (509-681 aa) are predicted to be disordered and omitted for clarity. Interacting interface between monomer are indicated as H-H for a Head-to-Head CRY1 interaction, or H-T for a Head-to-Toe CRY1 interaction.

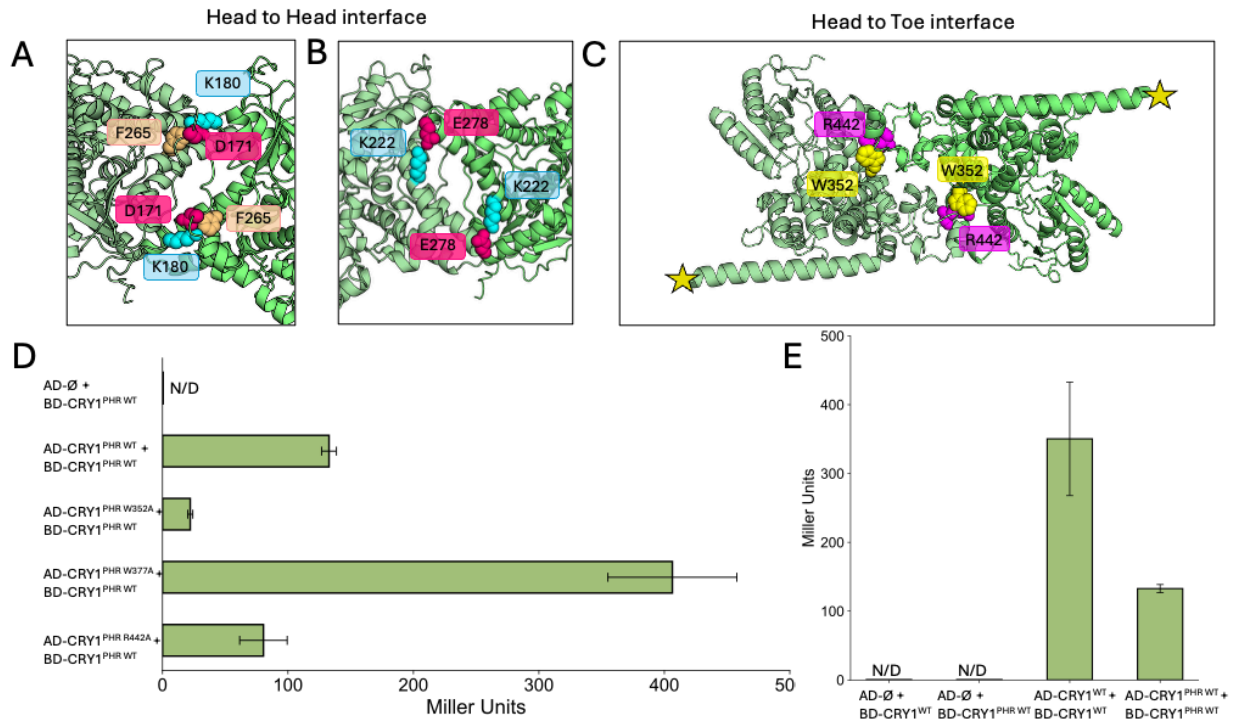


Figure 3.2 Structural interfaces and functional validation of CRY1 oligomerization.

A-C) Predicted structure of the *Arabidopsis thaliana* CRY1 tetramer generated by AlphaFold highlighting intermonomer contact interfaces. (A-B) Close-up view of the Head-to-Head (H-H) interface. The structure of AtCRY1 PHR domain is represented in cartoon and surface representation in pale green. (A) The lysine residues Lysine 180 from each monomer (blue) interact with Phenylalanine 265 (beige) and Aspartate 171 (pink) of the adjacent monomer, according to the predicted model. (B) Additional interactions at the H-H interface involve Lysine 222 (blue) from one monomer and Glutamate 278 (pink) from the adjacent monomer, contributing to dimer stability in the predicted model. (C) Close-up view of the Head-to-tail (H-T) interface. The Tryptophane W352 (yellow) of each monomer interacts with the arginine R442 (magenta) of the adjacent monomer in the predicted model. Final PHR α -helix 21 is preceding the disordered tail of AtCRY1 and indicated by a yellow star. (D) Yeast-two-hybrid assay testing the effect of W352A, W377A and R442A mutations affecting the stability of the H-T interface ($n=3$, mean \pm SD). (E) Yeast-two-hybrid assay comparing full-length CRY1 and the isolated PHR domain potential for assess oligomerization ($n=3$, mean \pm SD).

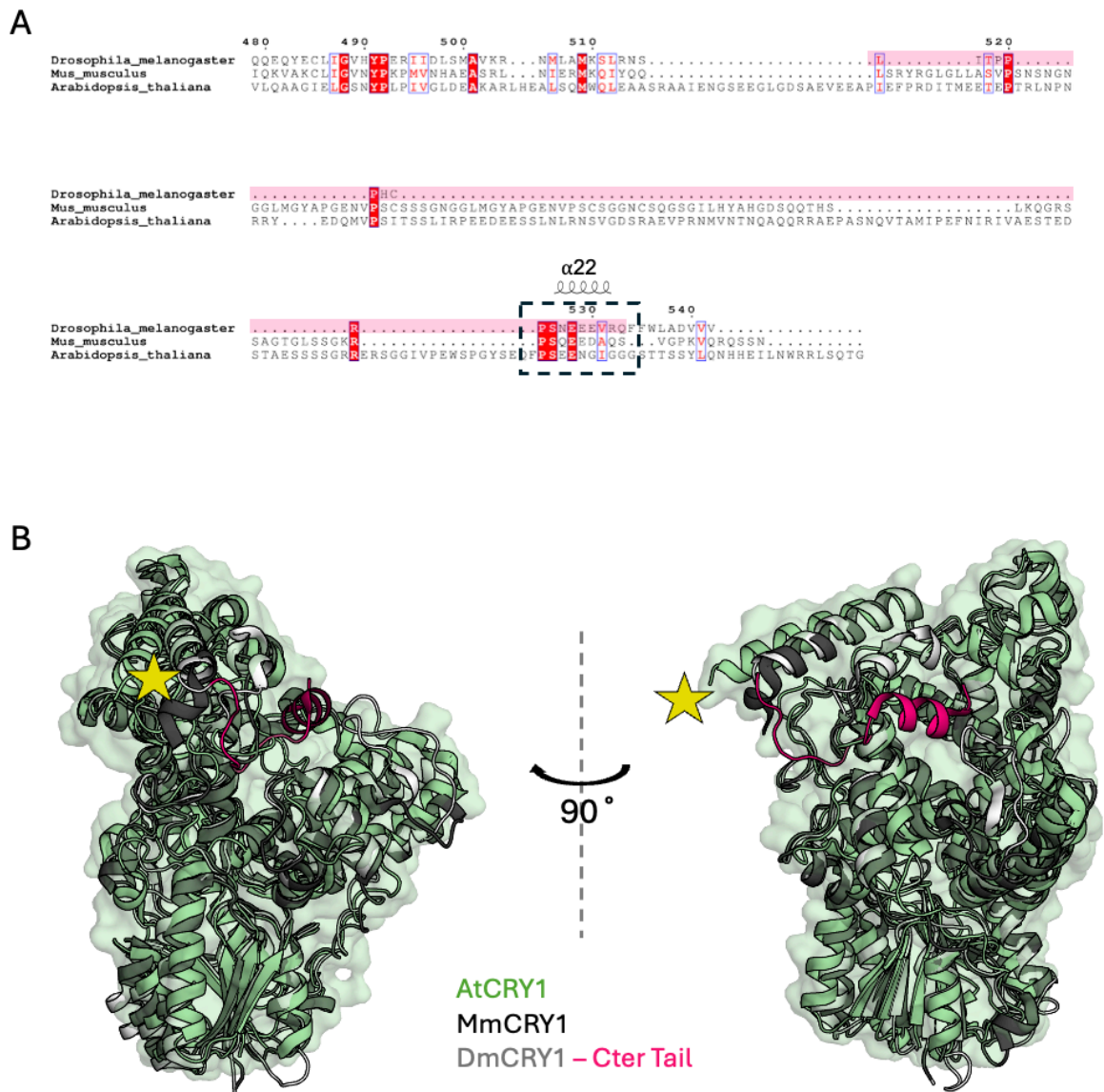


Figure 3.3 Divergence in CRY1 orthologues CTTs sequences.

(A) Alignment of *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* and *Arabidopsis thaliana* CTT sequences. CTT residues derived from fly structure (elucidated by cryo-EM PDB 4K03) are respectively highlighted in pink. The semi-conserved molecular determinants of the α helix 22 are outlined with a dashed line. (B) Structure alignment of PHR domain of CRY1 from orthologues species. Structural alignment of CRY1 orthologs, *Drosophila melanogaster* (grey, PDB 4K03), *Mus musculus* (Black, PDB 7D0M) and *Arabidopsis thaliana* (green, PDB 1U3C) CRY1 structures were aligned, based on their conserved PHR domain. α -helix 22 from fly tail (PDB 4K03) is represented in hot pink.

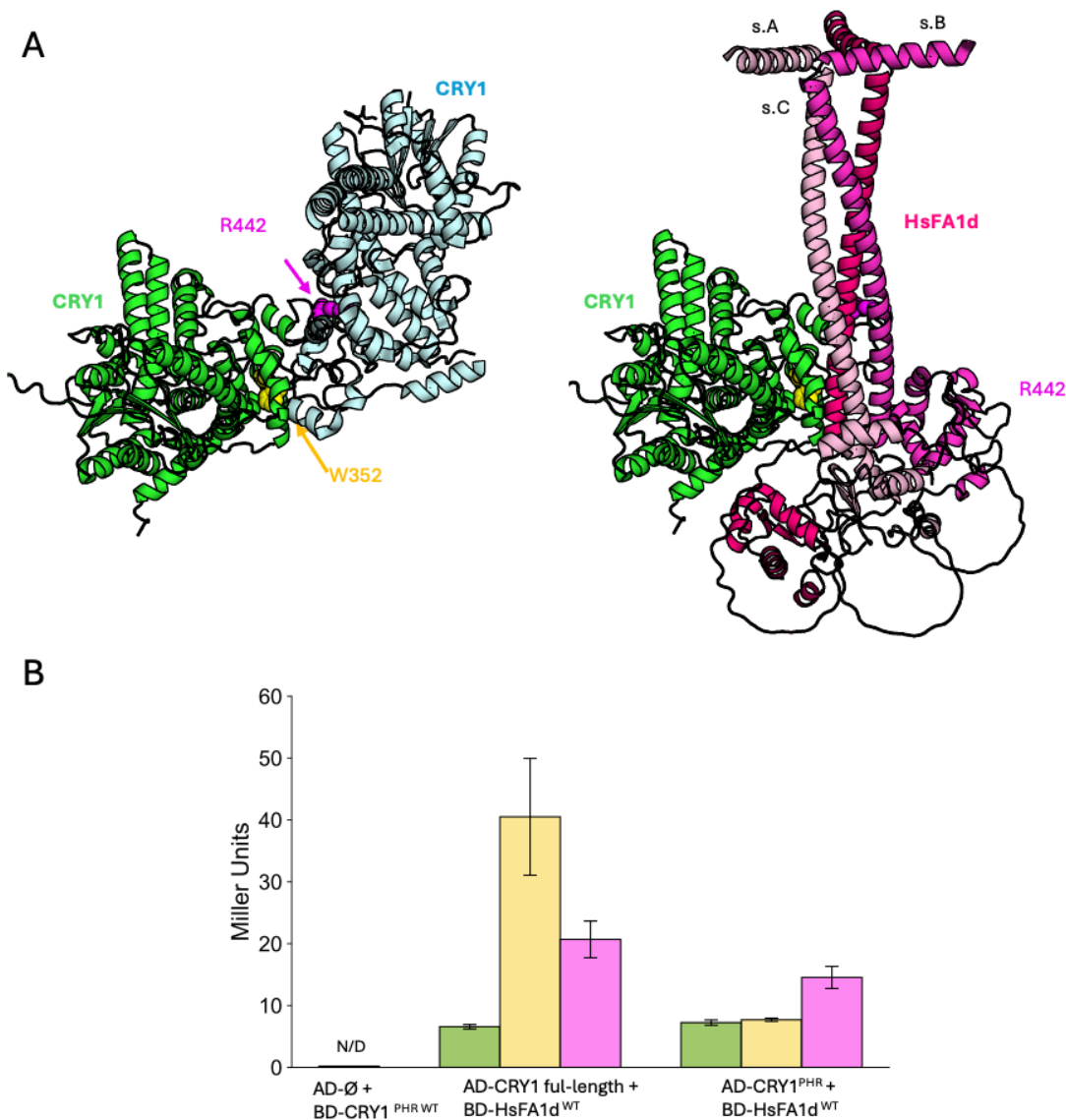


Figure 3.4 Structural overlap between CRY1-HsFA1d interaction, CRY1 oligomerization and CTT position on the Head-to-Toe interface.

(A) Structural comparison of two predicted AlphaFold complexes: CRY1 PHR dimer and CRY1-HsFA1d complex from *Arabidopsis thaliana*. Left: H-T dimer of CRY1 complex. Right: CRY1-HsFA1d complex. PHR domain of CRY1 is colored in green or blue. A trimer of HsFA1d with each subunit (s.) is colored in shades of pink. W352 and R442 are represented by spheres respectively colored in yellow and magenta. The structure of CRY1 and HsFA1d are represented in cartoon, and CRY1 is also in surface representation. The HsFA1d trimer sterically clashes with the H-T dimer, suggesting that both structures engage the same interaction surface. (B) Yeast-to-hybrid assay assessing the effect of point mutations W352A and R442A on the CRY1-HsFA1d interaction, comparing full-length CRY1 and truncated PHR domain ($n=3$, mean \pm SD). Histogram colors indicate the different constructs tested: Wild-type (green) W352A (yellow), R442A (magenta).

3.9 Supplementary materials

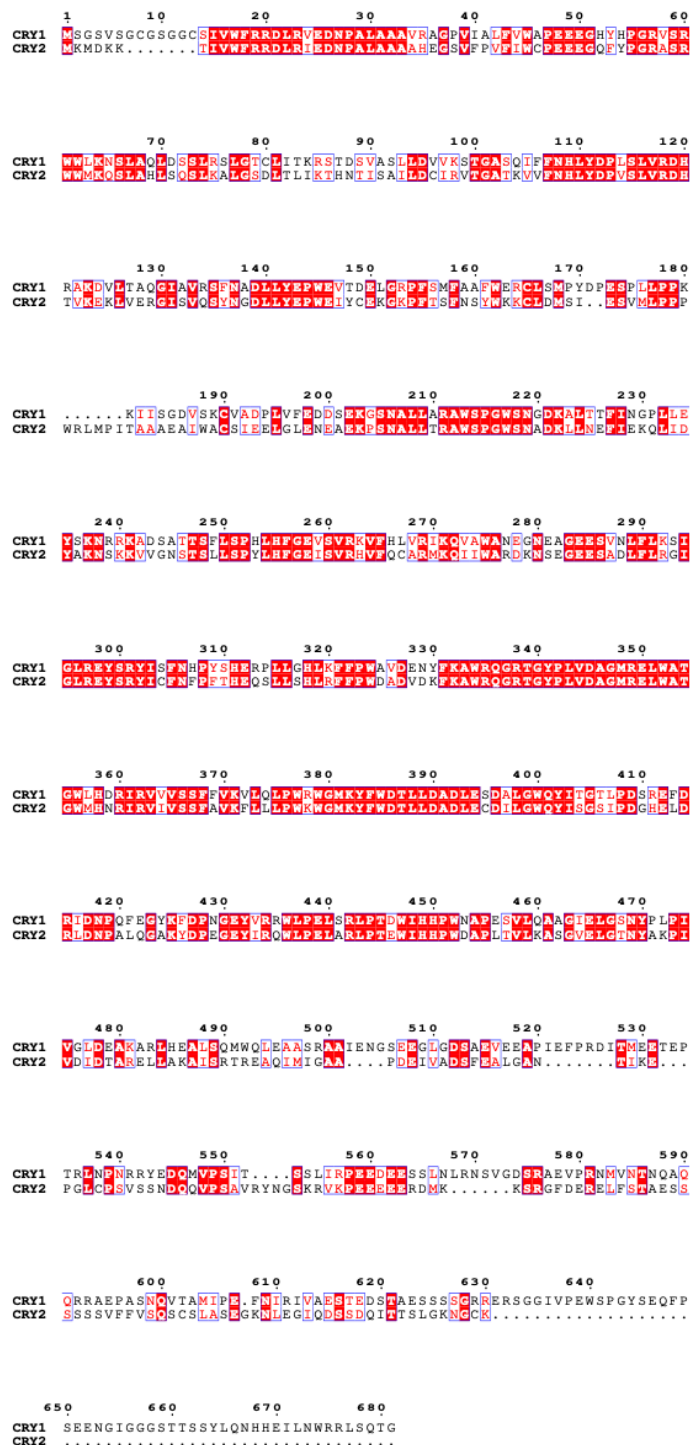


Figure 3.S1 Sequences alignment of CRY1 and CRY2 from *Arabidopsis thaliana*.
 Multiple sequence alignment of CRY1 and CRY2 proteins from *Arabidopsis thaliana* HsFA3.



Figure 3.S2 Sequences alignment of CRY1 from Arabidopsis, Mouse and Drosophila.

Multiple sequence alignment of CRY1 proteins from *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*. CTT residues derived from Fungai structures (predicted by AlphaFold) or fly structure (elucidated by cryo-EM PDB 4K03) are respectively highlighted in blue and pink.

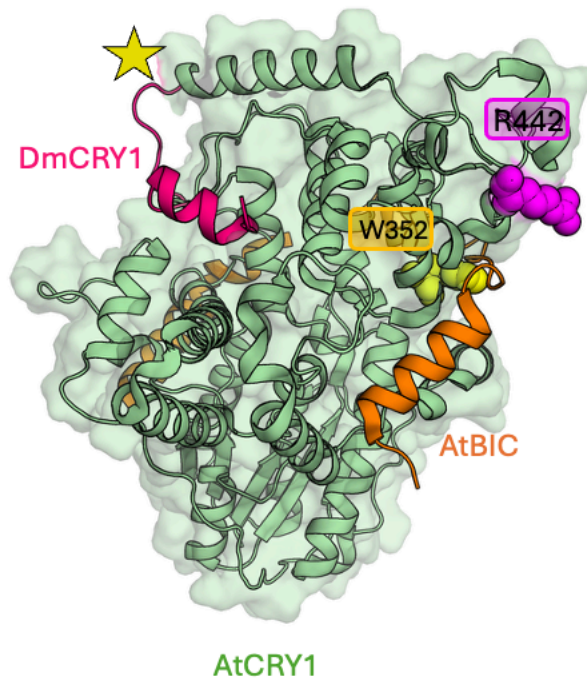


Figure 3.S3 Comparative positioning of BIC2 on the PHR domain of CRY1.

The structure of AtCRY1 PHR domain is represented in cartoon and surface representation in pale green. The residues R442 and W352 of AtCRY1, previously implicated in CRY PHR oligomerization, are respectively represented as spheres in magenta and yellow. Final PHR α -helix 21 is preceding the disordered tail of AtCRY1 and indicated by a yellow star. α -helix 22 from DmCRY1 CTT (PDB 4K03) is represented in hot pink.

Table 3.S1 Protein annotation summary on different CRY1 and HsFA1d used in structural predictions, yeast two-hybrid assays.

Name	Species	Accession Numbers	Length aa	Structure PDB
CRY1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q43125	681	1U3C
	<i>Mus musculus</i>	P97784	608	6OF7
	<i>Drosophila melanogaster</i>	O77059	542	4K03
CRY2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q96524	612	6M79
HsFA1d	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LQM7	485	AlphaFold

Table 3.S2 Primers used in this study.

Primer for point mutations 5'-3'		
CRY1 PHR W352A	Fw	GTTAGCTGCTACTGGTTGG
	Rv	GTAGCAGCTAACTCTTCATC
CRY1 PHR R442A	Fw	CGGGAGTGCAGAGAGTTTCAGGAAGCCATCGC
	Rv	CTCTCTGCACTCCCGACAGACTGGATAACATC
CRY1 PHR W377A	Fw	CAATTACCAGCCAGATGGGGGATGAAGTATTTCC
	Rv	CCATCTGGCTGGTAATTGAAGCACTTTAACAAG
Primer for pRSF vectors 5'-3'		
CRY1 (1-681)	Fw	GGAATTCCATATGTCTGGTTCTGTATCTGGTTG
	Rv	GGAATTCTTACCCGTTTGTGAAAGCC
CRY1 PHR (1-508)	Fw	GGAATTCCATATGTCTGGTTCTGTATCTGGTTG
	Rv	GGAATTCTTATCCTTCTTCGGATCCG
HsFA1d (1-485)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGATCCATGGATGTGAGCAAAGTAA CCACA
	Rv	GTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCAAGGATTTGCCTTGAGAGATC
Primer for Yeast-two-hybrid * 5'-3'		
pGADT7	Fw	CCAGATTACGCTCATATAGGTACCGAAAACCTTGTATTTCC
	Rv	GTATCTACGATTCATCTGCAGCTCGAGTGCGGCC
pGBKT7	Fw	CTCAGAGGAGGACCTGCATGGTACCGAAAACCTTGTATTTCC
	Rv	GCTGCAGGTCGACGGAACCCCTCGAGTGCGGCCG

* All yeast two-hybrid constructs were amplified from the pRSF vector and cloned into Y2H vectors.

Table 3.S3 Summary of AlphaFold v3 predicted interface contacts in CRY1 tetramer context.

Interface Head-to-Head	
Targeted Residue	Structurally neighbouring residues
E25	I270
S72	E278
S73	N277
D171	K180
S174	S174,P175,L176
P175	S174
L176	S174
L177	F265,H266,R269,I270
P178	V273
K180	D171, F265, R269
W217	V273
K222	E278
F265	L177, K180
H266	P175, L177
R269	L177, K180
I270	E25, L176
V273	P178, W217
N277	S72, S73
E278	K222

Interface Head-to-Toe	
Targeted Residue	Structurally neighbouring residues
R57	R442, A461
S201	A461
E202	A461
G204	P444
S205	R442, P444, A461, A462
N206	R442
L208	R434,S441, R442,L443
R211	N429, E431, R444
K331	E465, S468
Q336	E465, S468, N469
R338	S468, N469
R349	E439
W352	R442, A461, A462, G463
A353	S441, R442
N429	R211
E431	R211
R434	L298, R211
W436	P438
P438	W436
E439	R349
S441	L208,A353
R442	R57, S205, N206 ,L208, W352, A353
L443	L208
P444	G204, S205
A461	R57, S201, E202, S205, W352
A462	S205, W352
G463	W352
E465	K332, Q336
S468	K332, Q336,R338
N469	Q336,R338

CHAPITRE 4

THE CRY1-HSF PREDICTED INTERACTION INTERFACE SERVES AS A MOLECULAR PLATFORM FOR BIOENGINEERING OR SELECTING MODULATING MUTANTS

SOULEÏMEN JMII^{1,2,3}, WILLIAM BOUARD⁴, GABRIEL MARCOTTE^{1,2,3}, JULIEN PLAMONDON^{1,2,3} et LAURENT CAPPADOCIA^{1,2,3}

¹Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, QC, Canada

²Centre Sève, Department of Biology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

³PROTEO, Quebec Network for Research on Protein, Function, Engineering and Applications, Montréal, QC, Canada

⁴Université Paris-Saclay, Centre national de la recherche scientifique (CNRS), Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), Université Evry, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), Gif sur Yvette, France

Manuscrit publié dans le journal *Frontiers in Plant Sciences*

<https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1712571>

Contributions : Souleïmen Jmii a conçu le projet, optimisé les méthodes, collecté et analysé les données, écrit le manuscrit original, préparé les figures et édité le manuscrit. William Bouard, Gabriel Marcotte et Julien Plamondon ont aidé à l'optimisation des méthodes, collecté des données, et édité le manuscrit. Laurent Cappadocia a supervisé, conçu le projet, acquis les fonds de recherche, donné accès aux ressources et édité le manuscrit.

4.1 Résumé

Le stress de haute température impose un coût énergétique à la croissance des plantes et affecte négativement la productivité agricole. Ce stress déclenche rapidement l'activation des facteurs de choc thermique (HsF), une famille de facteurs de transcriptions impliqués dans le maintien de la protéostasie. Le cryptochrome CRY1 peut interagir physiquement avec les protéines HsFA1d, facilitant leur translocation nucléaire et la régulation de gènes contribuant à la tolérance au stress. Dans cet article, nous avons combiné des prédictions structurales avec des validations expérimentales à l'aide d'essais de double hybride chez la levure et de complémentation bimoléculaire de fluorescence. Nos résultats confirment que le domaine PHR de CRY1 interagit largement avec plusieurs protéines HsF *via* la région HR-A de l'interface HR-A/B du domaine d'oligomérisation conservé. Cette interaction repose en partie sur des ponts salins impliquant les extrémités N- et C-terminales de la région HR-A, ainsi que sur une interface conservée centrée autour du résidu W352 de CRY1. HsFA3 présente la plus forte affinité pour CRY1 dans les essais de double hybride chez la levure, notamment grâce à un résidu glutamate interagissant avec R211 et R435 de CRY1. La mutation des positions équivalentes chez HsFA1e ou HsFC1 en glutamate augmente également leur interaction avec CRY1. Cette analyse a permis d'identifier des mutations pouvant être utilisées dans des approches de sélection ou de bio-ingénierie visant à améliorer la tolérance au stress thermique.

Keywords: Arabidopsis, bioengineering, prediction of structure, protein-protein interactions, CRY1, HsF, mutants

4.2 Abstract

High-temperature stress imposes an energetic cost on plant growth and negatively impacts agricultural productivity. This stress rapidly triggers the activation of Heat shock Factor (HsF) proteins, a family of transcription factors that maintain proteostasis. The cryptochrome CRY1 can physically interact with HsFA1d proteins facilitating nucleus translocation and the regulation of genes that contributes to stress tolerance. In this article, we combined structural predictions with experimental testing using yeast-two-hybrid and bimolecular fluorescence complementation assays. Our results confirm that CRY1 PHR domain interacts extensively with multiple HsF proteins through their HR-A region of the conserved oligomerization HR-A/B domain interface. This interaction partially relies on salt bridges provided by the N- and C-terminus of HR-A region and a conserved interface centered around W352 of CRY1. HsFA3 shows the strongest affinity to CRY1 in yeast-two-hybrid assays notably thanks to a glutamate residue that interacts with R211 and R435 of CRY1. Mutating equivalent residue positions within HsFA1e or HsFC1 to a glutamate increased their interaction to CRY1. This analysis allowed the identification of mutant candidate that could be used in selection or bioengineering endeavors to improve thermal stress tolerance.

Keywords: Arabidopsis, bioengineering, structure prediction, protein-protein interactions, CRY1, HsF, mutants

4.3 Introduction

High-temperature stress limits plant growth and directly suppresses agricultural productivity (Yu *et al.*, 2024). In response to a high temperature stress, plants activate a conserved Heat Shock Response (HSR), characterized by light-induced thermotolerance (Dündar *et al.*, 2025). The initiation of the HSR is tightly linked to environmental temperature sensing, a process in part mediated by blue-light photoreceptors, cryptochromes 1 and 2 (CRY1 and CRY2). CRY1-mediated signaling enhances the expression of Heat shock Factors (HsFs), a diverse family of 21 transcriptional regulators organized into three distinct classes (15 activating Class A; 5 repressive Class B and 1 regulatory Class C) that maintain proteostasis under stress (Gao *et al.*, 2023; Nover *et al.*, 2001). HsFs proteins form homo and heterotrimers, reinforcing transcriptional network complexity and enabling efficient signal amplification (Friedrich *et al.*, 2021; Yoshida *et al.*, 2011a). Following heat stress, a hierarchical activation cascade occurs between HsFs proteins, from HsFA1d to Heat Shock Elements (HSE) on the chromatin, and drive the expression of specific heat stress tolerance genes (Ohama *et al.*, 2016). CRY1 and CRY2 interact physically with HsFA1s subfamily members, promoting nuclear translocation via recruitment of the importin $\alpha 1$ (IMP $\alpha 1$) nuclear import receptor (Gao *et al.*, 2023). CRY1 and CRY2 possess an N-terminal photolyase homology region (PHR), which binds the flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor upon for light detection. This domain allows the formation of stable oligomers and masking certain interacting surfaces, including tryptophan 352 which participate to dimerization (Shao *et al.*, 2020). The CRY1 PHR domain interacts physically with a HsFA1d fragment composed of residues 1-220 aa that lacks the C-terminal transactivation or repression domain but otherwise comprises an N-terminal DNA-binding domain (DBD) that recognize HSE on the chromatin, a disordered linker, and the HR-A/B domain formed of two Heptad Repeat, HR-A and HR-B regions that mediate oligomerization (Gao *et al.*, 2023; Nover *et al.*, 2001). As for the CRY1 protein, it possesses a C-terminal regulatory region, which is intrinsically disordered and essential for photoactivation triggering monomerization, enabling interaction with downstream partners and facilitating signal transduction (Shao *et al.*, 2020). Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) shows that CRY1 and HsFA1d co-occupy a broad set of genomic loci, with RNA-seq identifying 42 co-regulated genes, predominantly encoding HSPs and stress-responsive factors. These genes remain transcriptionally silent in *cry1* and *hsfa1a/b/d/e* quadruple mutants, even under light or heat stress, indicating a critical regulatory role for CRY1 in HsFA1-mediated transcription. ChIP-qPCR confirms reduced expression of key HSR genes (e.g., *HSFB1*, *HSFB2b*) in the absence of CRY1, supporting its function as a stabilizing factor in the transcriptional complex. Loss-of-function mutants *cry1-304* and *cry1-349*, which lack functional CRY1, fail to induce HSP expression upon light exposure and are unable to acquire light-induced thermotolerance, underscoring the essential role of CRY1. In contrast, the *cry2-1* mutant exhibit partial reduction in thermotolerance, suggesting a compensatory or overlapping function for CRY2. Meanwhile, HsFA1d

induces the expression of HsFA3 and its overexpression confers heat stress and drought stress tolerance characterized by reduced wilting, lower levels of reactive oxygen species (ROS), and enhanced accumulation of proline, alongside elevated activity of ROS-scavenging enzymes: CAT, APX, SOD (Li *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2024; Song *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2020). Overall, the CRY1-HsFA1s complex thus represents a key early sensor-effector module in the heat stress response. Given the high sequence conservation among HsFs, their functional redundancy, and the important role of HsFA3 in thermotolerance we propose that CRY1 may serve as a scaffold for the stabilization and assembly of multi-protein transcriptional complexes. Guided by AlphaFold predictions and structural homology modeling, we performed a detailed analysis of the interaction interface between CRY1 and HsFs members using yeast-two-hybrid (Y2H) and bimolecular complementation fluorescence assays (BiFC). The identification of key interacting residues provides a foundation for the rational design of gain-of-function mutants inspired by natural sequence variation.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Sequence alignments of Arabidopsis HsFs and plant homologues of HsFA3

The 21 HsFs proteins sequences from *Arabidopsis thaliana* and the 25 HsFs proteins sequences from *Oryza sativa* were obtained from UniProtKB, accession numbers are listed respectively in Table 4.S1 and Table 4.S2 Plant's HsFA3 proteins amino acid sequences were obtained from HMMER v34 (Finn *et al.*, 2011) and their accession numbers are listed in Table 4.S3 Sequences were aligned using NCBI BLAST (Altschul et Lipman, 1990) and alignment were visualized using Esript software v.3 (Robert et Gouet, 2014) or Web Logo 3 (Crooks *et al.*, 2004)

4.4.2 Structural prediction of the CRY1-HsFA3 complex

The structure of CRY1-HsFA3 was predicted by homology modeling using SWISS model (Waterhouse *et al.*, 2018) and the AlphaFold prediction of CRY1-HsFA1d as a template. The structure of Arabidopsis CRY1 and HsFA1s complexes were obtained through AlphaFold v.3 (using accession number listed in Table 4.S3). The visualization software PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.2 Schrödinger, LLC.) was used to analyze the structure.

4.4.3 Molecular cloning, mutagenesis and proteins stability

Vectors coding for AtCRY1 (#G12079) and HsFs proteins: HsFA1a (#DKLAT4G17750), HsFA1b (amplified on Arabidopsis cDNA), HsFA1d (#PADLOX-TF-13-E02), HsFA1e (#U85727, HsFA3 (#PADLOX-TF-11-A02), HsFA4C (#G67044), HsFA6a (#PADLOX-TF-08-F01), HsFA6b (#G10337),

HsFA7a (#U23517), HsFA9 (#U18576), HsFB2b (#U16604), HsFB3 (#U86661), HsFC1 (#U14335) were obtained from the Arabidopsis biological resource center (ABRC). Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the full-length CRY1 sequence (residues 1-682), the CRY1 PHR domain (residues 1-508 aa), and the full-length HsFs sequences, which were subsequently cloned into yeast and plant expression vectors using GIBSON assembly. Site-directed mutagenesis was performed using Gibson assembly with specific oligonucleotides (Table 4.S4) to introduce substitutions or deletions, generating CRY1 and HsFA3 mutants. All plasmids were confirmed by Sanger sequencing (Genome Québec) or Nanopore sequencing (Plasmidsaurus). Stability of point mutants was evaluated using mCSM (Pires *et al.*, 2014), which estimates the thermodynamic impact of single amino acid substitutions on the protein structural stability .

4.4.4 Yeast 2-hybrid assay and β -galactosidase quantification

Sequences were cloned by GIBSON assembly into pGADT7 and pGBKT7 yeast plasmids. Empty GAL4 bait and prey vector were used as negative controls. Multiple combinations of prey (AD) and bait (BD) were tested using the following set of plasmids: (AD) CRY1^{WT}, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR W352A}, CRY1^{PHR K332A}, CRY1^{PHR K332E}, CRY1^{PHR R335A}, CRY1^{PHR R335E}, CRY1^{PHR K332E R335E}, CRY1^{PHR R211A}, CRY1^{PHR R211E}, CRY1^{PHR R435A}, CRY1^{PHR R435E}, CRY1^{PHR R211E R435E}; (BD): HsFA1a^{WT}, HsFA1b^{WT}, HsFA1d^{WT}, HsFA1e^{WT}, HsFA1e^{R126E}, HsFA3^{WT}, HsFA4C^{WT}, HsFA6a^{WT}, HsFA6b^{WT}, HsFA7^{WT}, HsFA9^{WT}, HsFB2b^{WT}, HsFB2b^{K249E}, HsFB3^{WT}, HsFC1^{WT}, HsFC1^{R129E}, HsFA3^{E173A}, HsFA3^{E173R}, HsFA3^{K174A}, HsFA3^{K177A}, HsFA3^{E178A}, HsFA3^{K174A K177A}, HsFA3^{K174A K177A E178A}. Bait and prey constructs were co-transformed into yeast strain Y187 (TaKaRa) and selected on synthetic lacking leucine and tryptophan dropout medium (SD/-LW) for 3 to 5 days at 30°C. Four random colonies from each transformation were re-selected on (SD/-LW) for 3 days at 30°C. At least three colonies for each transformation pair were selected and resuspended to grow overnight in liquid SD/-LW. Cultures were diluted until 0.05 of optical density (OD)₆₀₀ in liquid rich YPD and grown further until the optical density reached a 0.5 - 0.8 range. The culture was then pelleted and resuspended in 300 μ L of lysis buffer containing 100 mM of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.150 mM of NaCl, 5 mM of L-aspartate, 1% (w/v) BSA and 0.05 % (v/v) Tween-20 in 100 ml solution, pH adjusted to 7.25 -7.30). Cells were disrupted by repetitively freezing the culture in liquid nitrogen, followed by rapid thawing in a 37 °C water bath. 700 μ L of reaction buffer (2.23 mM chlorophenol red β -D-galactopyranoside (CPRG) Sigma Aldrich, *as substrate* in buffer 1) was then added to start the reaction. The reaction was stopped when the color of the sample turned orange/red by adding 0.5 ml of 3 mM ZnCl₂. Cell debris were removed by spinning and the OD₅₇₈ of the supernatant was measured using Thermo Scientific NanoDrop. β -galactosidase activity (Miller units) was calculated using the following equation:

$$activity = \frac{1000 \times OD\ 578}{t \times V \times OD\ 600}$$

activity is the β -galactosidase unit; t is the elapsed time (in minutes) of incubation; V is 0.1 x concentration factor (in this case V = 0.5). An interaction was deemed ‘not detected’ (ND) if the OD₅₇₈ was <0.01 after 3 h of color development.

4.4.5 Plant material and growth conditions

Nicotiana benthamiana (PI 555478 USDA) was grown in a mixture of black earth, perlite and peat moss (2:1:1, v:v:v) in E15 Conviron growth cabinet at 22 °C and 70% relative humidity, under a photon flux density of 100 μ mol m⁻² s⁻¹ (fluorescent and incandescent lighting) and a 16h/8h (day/night) photoperiod. Plants were watered with 20:20:20 N:P:K at a concentration of 0.5g.L⁻¹, and infiltration was performed on 5-weeks-old leaves.

4.4.6 Bimolecular complementation by fluorescence assay

To assess CRY1 interaction with HsFs proteins, we amplified CRY1 and HsFs coding sequences and inserted these sequences between the XbaI and NcoI restriction enzyme of a modified pAVA321 vector (Von Arnim *et al.*, 1998) generating 35S:nYFP (1-156) or pAVA 35S:cYFP (155-240) vectors. This generates pAVA 35S:CRY1-nYFP and pAVA 35S:HsFs-cYFP where eYFP N-terminus or C-terminus are respectively separated from CRY1 and HsFs by a 4xGlycine linker. CRY1^{WT}, CRY1^{PHR}, HsFA1d^{WT}, HsFA1d ^{Δ (160-220)}, HsFA1e^{WT}, HsFA1e^{R126E}, HsFA3^{WT}, HsFA3 ^{Δ (168-228)}, HsFB2b^{WT}, HsFB2b^{K249E}, HsFC1^{WT}, HsFC1^{R129E} sequences were cloned into pAVA modified vectors using GIBSON assembly to generate pAVA 35S:CRY1^{WT}-nYFP, pAVA 35S:CRY1^{PHR}-nYFP, pAVA 35S:HsFA3^{WT}-cYFP and pAVA 35S:HsFA3 ^{Δ (168-228)}-cYFP using the 5' XbaI site. The resulting cassettes were excised and inserted in pPZP vector in the SmaI and KpnI sites to generate pPZP 2X35S:CRY1^{WT}-nYFP, pPZP 2X35S:CRY1^{PHR}-nYFP, pPZP 2X35S:HsFA1e^{WT}-cYFP, pPZP 2X35S:HsFA1e^{R126E}-cYFP, pPZP 2X35S:HsFA3d^{WT}-cYFP and pPZP 2X35S:HsFA3 ^{Δ (168-228)}-cYFP, pPZP 2X35S:HsFB2b^{WT}-cYFP, pPZP 2X35S:HsFB2b^{K249E}-cYFP, pPZP 2X35S:HsFC1^{WT}-cYFP, pPZP 2X35S:HsFC1^{R129E}-cYFP. We used pPZP 2X35S:ECOIL-cYFP and pPZP 2X35S:RCOIL-nYFP as a positive control (Doh *et al.*, 2018), whereas pPZP 2X35S:mCherry signal serves as a marker for transient expression and tissue localization in agro-infiltrated leaves. It also serves as an internal control to normalize fluorescence between the different tested combinations. All pPZP plasmids mentioned previously were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 to generate individual strains. Agroinfiltration of *Nicotiana benthamiana* leaves were performed as described (Boourd *et al.*, 2024). Two days after infiltration, fluorescence excitation/emission wavelengths of 488 nm/525 nm

for eYFP and 561 nm /595 nm for mCherry were used on a Nikon A1+ confocal laser scanning microscope. Images were analyzed using Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012).

4.5 Results

4.5.1 Similarities in HsFs Class A and C structure allow interaction with CRY1

Given the previously observed interaction between CRY1 and HsFA1d, as well as the diverse roles of HsF proteins in mediating thermotolerance (Gao *et al.*, 2023), we investigated whether all members of the *Arabidopsis thaliana* HsF family interact with CRY1 focusing first on identifying the structural differences and similarities between HsFs proteins. Comparative analysis of the structures predicted using AlphaFold of all 21 HsF proteins revealed two conserved α -helical domains present across the family: the N-terminal DNA-binding domain (DBD) and the HR-A/B oligomerization domain (Figure 4.S1). The Predicted Alignment Error plot (PAE) and the Predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) values indicate a high level of confidence in the monomeric models around these domains (Figure 4.S2 and 4.S3). Sequence conservation among *Arabidopsis* HsF family members further highlights the high conservation in the DBD and partial conservation in the HR-A/B domain, a region that mediates trimerization (Figure 4.S4). Class A differ markedly from classes B and C by their physiological functions of transcriptional activation. Class A members notably contain activations motifs in their C-terminal region (Figure 4.S4) which are lacking in class B and class C proteins (Nover *et al.*, 2001). AlphaFold predictions for individual HsF proteins revealed significant structural divergence among HsFs proteins. Class B members differ from class A and C HsF proteins in protein length, the presence of a long intrinsically disordered region linker between the DBD and the HR-A/B domain (Figure 4.S1 - 4.S3), and variable insertions/deletions around the HR-A/B domain (Figure 4.S4). PAE and pLDDT values from AlphaFold predictions for HsFs homotrimers highlight the boundaries of the HR-A/B alpha helix involved in HsFs trimerization (Figure 4.S5 and 4.S6). As mentioned before, this trimerization is required for the activity of HsF proteins (Ohama *et al.*, 2016), and for their interaction with CRY1 (Gao *et al.*, 2023). *In silico* prediction of CRY1-HsF complexes showed similar, stable interactions notably characterized by low PAE values between residues of CRY1 and HsF, only for the HsFA1s subfamily members composed of HsFA1a, HsFA1b, HsFA1d, and HsFA1e (Figure 4.1A, 4.1B and 4.S7). All other 17 HsF proteins failed to produce stable interaction predictions (Figure 4.S8). Structural models of the CRY1-HsFA1s complexes reveals a rigid CRY1 PHR domain that engages in specific contacts with the structured HR-A region of the HR-A/B domain composed of residues 160-190 (Figure 4.1A, 4.S7), while the CTT of CRY1 remains disordered. Importantly, while the PHR domain alone is sufficient to interact with HsFA1d in Y2H assays (Figure 4.S9A and 4.S9B), this interaction is abolished in the absence of the HR-A/B helix (160-220 aa), as deletion of this domain results in a complete loss of

binding in BiFC assays (Figure 4.S9B), consistent with the important role of the HR-A/B region to stabilize a functional CRY1-HsFA1d complex (Gao *et al.*, 2023). Based on these findings, we performed subsequent experiments using a truncated CRY1 PHR domain (residues 1-508). Y2H assays were conducted with a subset of HsF proteins spanning all three classes. Strikingly, interaction with CRY1 was detected with six different HsFs : HsFA1d (7 Miller units (MU)), HsFA3 (250 MU), HsFA6a (<0.5 MU), HsFA6b (45 MU), HsFA7a (25 MU), and HsFC1 (<0.5 MU). In contrast, no interaction was observed with HsFA1a, HsFA1b, HsFA1e, HsFA4c, HsFA9, HsFB2b, and HsFB3 (Figure 4.1C). Multiple sequence alignment of the 21 HsF proteins revealed the conservation of the HR-A sequence among the family, with short insertions or deletions along the HR-A/B domain. In class B, some of the insertions are positioned adjacent to the CRY1-binding interface and may sterically hinder or disrupt interaction with the CRY1 PHR domain (Figure 4.S4). To further validate these findings, BiFC assays were performed with representative HsF proteins from classes A (HsFA1e), B (HsFB2b) for which no interaction was detected in Y2H and C (HsFC1), the only member of class. These results suggest that HsFA1e and HsFC1 form stable interactions with CRY1 in the nucleus, while HsFB2b exhibits no detectable interaction (Figure 4.1D). This may also suggest that activator HsFs of class A are preferred partners for interacting with CRY1, along with HsFC1. This last protein is considered as an activator like members of class A, however it lacks the activation motifs and thus cannot initiate transcription on its own (Jacob *et al.*, 2017). In contrast, repressive Class B members do not appear to interact with CRY1.

4.5.2 Structural analysis of the predicted CRY1-HsFA1d interaction

HsFA1d constitutes the only members of the HsF proteins family for which interaction with CRY1 was consistently detected in both Y2H and BiFC assays (Figure 4.1B and 4.S9) and supported by *in silico* structural modeling (Figure 4.1A). We therefore utilized the AlphaFold-predicted structure of the CRY1-HsFA1d complex as a structural framework to identify and characterize the molecular determinants of the interaction. The model reveals that the CRY1 PHR domain binds extensively to the HR-A helical region of HsFA1d, which mediates trimerization. Specifically, CRY1 engages with the entire length of the HR-A region of subunit A, while contacting only the C-terminal HR-A of subunit B (Figure 4.2A). Key interaction residues include eight conserved residues in the HsFA1d HR-A region: E166, R167, R170, D171, V174, Q177, E178, and R181, and five residues in the CRY1 PHR domain: R211, K332, R335, W352, and R435 involved in electrostatic and hydrophobic contacts. At the N-terminal face of the HsFA1d helix, the model predicts that E166 forms a salt bridge with CRY1^{K332} and participates in hydrogen bonding interactions with both K332 and Q336 of CRY1 (Figure 4.2B). On the opposite face, HsFA1d^{R170} (subunit A) appears in proximity to CRY1^{R335}. This configuration may be due to a local modeling discrepancy, yet HsFA1d^{E166} also forms a salt bridge with CRY1^{R335}, suggesting a finely tuned electrostatic balance that stabilizes the

interaction interface. CRY1^{W352} engages in π -cation interactions with both R167 and R170 of HsFA1d (subunit A), and D171 forms a hydrogen bond with the indole ring of W352 (Figure 4.2C). Further along the helix, Q177 (subunit A) extends toward CRY1^{W436}, forming a hydrogen bond, and its amide group may interact electrostatically with CRY1^{R349} *via* a dipole-charge interaction (Figure 4.2D). Nearby, E178 (subunit A) forms a salt bridge with R183 (subunit B), potentially contributing to the stabilization of the trimeric quaternary structure (Figure 4.2D). At the C-terminal end of the helical trimer, R181 (subunit A) and R183 (subunit B) project toward R435 and R211 of CRY1, forming a cluster of four arginine residues in proximity. This cluster may be stabilized to stacking interaction between HsFA1d R181 and CRY1 R435 (Figure 4.2E). Notably, these interactions are highly conserved among HsFA1s proteins and semi-conserved across class A members (Figure 4.S4), which may explain both the functional specificity and the observed variation in binding affinity among HsF proteins.

4.5.3 Sequence and structure variation modulate CRY1 interaction

BiFC and Y2H assays revealed that CRY1 interacts not only with HsFA1d but also with several other HsFAs proteins and HsFC1, indicating a broader interaction profile across the HsF family. To investigate whether sequence variation within the HR-A region modulates this interaction, we performed a sequence alignment of class A and C HsF proteins trimmed for the region corresponding to HsFA1d 160-220 aa. This sequence alignment highlights the high conservation of residues involved in both oligomerization and CRY1 PHR domain binding (Figure 4.3A). Among these, residues D171, V174, E178, and R181 of HsFA1d are consistently conserved across class A proteins and are implicated in both trimer stabilization and CRY1 binding. We hypothesized that specific amino acid substitutions in the HR-A region could modulate binding affinity to CRY1, potentially acting as gain- or loss-of-function variants in homotrimer HsF-CRY1 complexes. Among eight key residues previously identified above in the HsFA1d-CRY1 interface, we focused on those exhibiting variable conservation and thus functional potential. Towards the N-terminal part of HR-A, HsFA1d^{R167} is notably replaced by glutamate in HsFA6a. This substitution is predicted to disrupt the interaction between R167 and CRY1 W352, which appears critical for stabilizing the interaction interface (Figure 4.3B). In the C-terminal region, Q177 is semi-conserved and replaced by a methionine in HsFA6b and HsFA7a. In HsFA3, both Q177 and R181 are substituted by glutamate residues (E184 and E188, respectively), possibly introducing negatively charged residues into an otherwise mostly electropositive region (Figure 4.3A, 4.3C, 4.3D). In the HsFA1d structural model, Q177 is positioned near R349 and W436 of CRY1. Substitution with methionine may enhance hydrophobic contacts with CRY1 W436, potentially promoting a more stable interaction through Van der Waals forces. In contrast, the substitution of Q177 with a glutamate in HsFA3 allows the formation of a salt bridge with CRY1^{R349}, which may alter the electrostatic environment and modulate binding (Figure 4.3C). Most notably, in HsFA3, the

natural substitution of R181 with glutamate E188 introduces a negative charge in a region typically occupied by a positively charged residue. This change enables the formation of a salt bridge between HsFA3^{E188} (subunit A) and CRY1^{R435}, as well as hydrogen bonds between HsFA3^{E188} (subunit A) and HsFA3^{Q190} (subunit B), suggesting a potential for enhanced or reconfigured interactions due to the new electrostatic complementarity (Figure 4.3D). This finding suggests that specific charge reversals may generate novel interactions, potentially leading to altered binding affinity.

4.5.4 CRY1 PHR domain interact with HsFA3 HR-A region

To validate the predicted interaction interface between CRY1 and members of the HsF family, we selected HsFA3 as a model protein, as it exhibits the highest binding activity in Y2H assays providing a strong functional basis for probing residue-level contributions. Since AlphaFold failed to predict an interaction between CRY1 and HsFA3 although HsFA3 and HsFA1d share high sequence and structure similarity on HR-A region, we generated a homology model using the Swiss-model and the CRY1-HsFA1d complex as a template (Figure 4.4A). The interaction between CRY1 and HsFA3 is supported in part by our Y2H assay (Figure 4.1C and 4.S10). BiFC assays further confirmed that the CRY1-HsFA3 interaction occurs within some distinct nuclei of infiltrated mesophyll cells (Figure 4.S10 and 4.S11), but their distribution differs from that observed for the other HsFs tested, and resembles that seen during photobody formation (Yang *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2009). Consistent with a model where the HR-A/B region of HsFA3 interacts with CRY1, deletion of 168-228 aa of HsFA3^{Δ(168-228)} abolished interaction with CRY1 (Figure 4.4B). To further validate the homology model, we investigated the contribution of specific residues identified in the previous section to the CRY1-HsFA3 interaction. First, we focused our analysis on the N- and C-terminal ends of the HR-A region, because each extremity features at least one salt bridge, allowing charge swaps to validate the model. Substituting HsFA3^{E173} with arginine significantly reduced the interaction to CRY1 compared to the wild type (WT). Swapping the charges K332 or R335 of CRY1 to glutamate alone did not restore WT interaction levels. However, a triple charge-swap restored the interaction to WT levels (Figure 4.4C). Similarly, in the C-terminal end of the helix, substituting HsFA3 E188 with arginine reduced the interaction by approximately one-third. Individual charge reversals of CRY1 R211 or R435 to glutamate were insufficient to restore the WT level yet combining these modifications with HsFA3^{E188R} restored activity to WT levels (Figure 4.4D). Computational analysis using mCSM (Pires *et al.*, 2014) predicted minimal changes in stability for the point mutants, with $\Delta\Delta G$ values indicating little difference compared to the wild-type protein (see Table 4.S5).

4.5.5 Compensatory interactions at the CRY1-HsF interface

The CRY1-HsFA3 homology model generated using CRY1-HsFA1d as a template, combined with the HsFs sequence alignment, enabled the identification of several candidate residues in HsFA3 for alanine substitution (Figure 4.3A, 4.4C): E173, K174, K177, E178, A181, E184, E185, and E188. All these residues are located within the HR-A region of HsFA3. In the N-terminal region of the HsFA3 helix, a E173A substitution leads to a 29% decrease of the interaction with CRY1 compared to the WT (Figure 4.5A and 4.5B). Analysis of the model suggests that substituting CRY1^{K332} to an alanine could disrupts both the salt bridge and hydrogen bonds with HsFA3^{E173}, and it experimentally results in a 56% reduction relative to WT. This difference may be partially offset by HsFA3^{K177}, which could shift to a more favorable position to form a new hydrogen bond with the amide group of Q336. R335A may disrupt a salt bridge with HsFA3^{K177}, and this effectively results in Y2H assays in a 41% decrease in Miller units (Figure 4.5A and 4.5B). This highlights a synergistic contribution of CRY1 K332 and R335, stabilizing the local conformation of E173, thereby enhancing overall interface stability. In the central region of the helix, W352A reduces the interaction by 51% compared to WT. Based on the model, this substitution could disturb π -cation interactions with HsFA3 K174 and K177. Individual substitution of each lysine to alanine residues yields to similar values to CRY1^{W352A}, with decreases of 64% and 62% observed by Y2H, respectively. Interestingly, HsFA3^{E178A} enhances the interaction, doubling Miller unit levels relative to the WT. This mutation is predicted to disrupt a π -anion interaction with CRY1^{W352}, which may provide conformational rigidity. The conformational freedom resulting from the E178A mutation may facilitate W352 movements. The importance of both lysine residues is supported by the fact that the complete inactivity of the HsFA3^{K174A K177A} double mutant in the Y2H assay (values under the detection limit). HsFA3^{K177} is also located near CRY1 R335 and Y383. However, a triple substitution HsFA3^{K174A K177A E178A} partially restores the interaction, potentially through the formation of new hydrophobic contacts with W352 (Figure 4.5C and 4.5D). In the C-terminal region of the HsFA3 helix, the E188A mutation leads to a 61% decrease in interaction relative to the WT. The CRY1^{R211A} substitution increases Miller units by 27%, possibly due to a conformation that stabilizes the salt bridge formed between CRY1^{R435} and HsFA3^{E188}. Hydrophobic interaction can also be formed by CRY1^{R211A} with the nearby HsFA3^{Q190} of subunit B. HsFA3^{E188} of subunit A and HsFA3^{Q190} of subunit B are predicted to form hydrogen bonds that stabilizes the trimer by linking monomers together. The CRY1^{R435A} substitution causes a 12% reduction of the reporter gene activity compared to WT, which could be due to disruption of the salt bridge between HsFA3^{E188} and CRY1^{R435}, although the surrounding environment remains otherwise unchanged (Figure 4.5E and 4.5F). Overall, these results suggest that three regions of interaction contribute to efficient CRY1-HsFA3 interaction. Alanine mutations thus revealed select cooperations between residues as well as

compensatory interactions. With the notable exception of CRY1 R335A which stands close to the strongly destabilizing threshold, all mutations tested in this section are predicted to be either nondestabilizing or moderately destabilizing according to the stability change value $\Delta\Delta G$ (Pires et al., 2014) reported in the Table 4.S5.

4.5.6 Development of HsFs mutants with increased interaction to CRY1

To validate the predicted interaction interface of the CRY1-HsFA3 complex, we performed charge-swap mutagenesis at key salt-bridge residues in the N- and C-terminal domains, focusing on HsFA3 E173 and E188 residues predicted to stabilize the interaction interface based on AlphaFold modeling and sequence conservation (Figure 4.4). Mutation of either E173 or E188 to a positively charged residue significantly impaired binding affinity in Y2H assays, confirming the functional importance of these negatively charged residues in stabilizing the complex (Figure 4.4). Sequence alignment analysis across HsFs-type proteins revealed semi-conservation of E173 and E188 in *Arabidopsis thaliana* HsFA3, with a high degree of conservation in dicotyledons, with 90% and 70% prevalence, respectively (Figure 4.6A). Notably, these positions are frequently substituted with positively charged residues (histidine, lysine, or arginine) in monocotyledonous species, suggesting a potential evolutionary shift of HsFA3 in interaction mechanisms (80% prevalence, Figure 4.6B). Based on these findings, the contribution of a negative charge at this position was evaluated in terms of its impact on the CRY1-HsFs interaction specificity. We tested whether introducing charge swap mutation to certain HsF proteins could increase their interaction with CRY1. Precisely, HsFA3 mimicking mutations were used to assess interaction competence in candidates from classes A, B, and C proteins previously found to barely interact - or not - with CRY1 in Y2H assays. Y2H assays revealed a strong gain-of-function effect in HsFA1e^{R126E} and HsFC1^{R129E}, with interaction levels increasing by approximately 40-fold and 10-fold, respectively, compared to the WT control (Figure 4.6C). In contrast, no significant reporter activity was observed in HsFB2b^{K249E}, suggesting that the mutation at this site does not rescue interaction and may reflect a class-specific structural or regulatory constraint. Alternatively, the enhanced interaction could remain undetectable within the experimental sensitivity. These results were corroborated by BiFC, which confirmed the formation of HsF-CRY1 complexes in HsFA1e^{R126E} and HsFC1^{R129E}, as evidenced by robust fluorescence signal *in planta* (Figure 4.6D). Overall, these results indicate that introducing a negative charge at HsFA3 position 188 in other HsF members triggers an increase in the interaction with CRY1. Importantly, mCSM calculations suggest that these point mutations are unlikely to significantly affect protein stability (Table 4.S5).

4.6 Discussion

Our results suggest that CRY1 is engaged in a broad network of interactions across the HR-A region of HsF proteins, revealing a previously underappreciated complexity in the regulation of light-dependent heat responses. Beyond the previously identified interaction between CRY1 and HsFA1s subfamily (Gao *et al.*, 2023), we observed that CRY1 interacts with multiple other HsFs proteins across both Class A and C. As described by (Gao *et al.*, 2023), the CRY1 PHR domain (1-490 aa) interacts with HsFA1d (1-220 aa). They highlight a possible contribution from the disordered CTT of CRY1. Our data expand on these findings by revealing a unique interface between the PHR domain of CRY1 and the HR-A region of the HR-A/B domain of HsF proteins. The semi-conservation of residues along the HR-A region appears to modulate interaction with CRY1. In particular, a subtle amino acid changes within the HR-A domain appears to strongly influence the strength and nature of the CRY1 interaction, providing a plausible molecular basis for HsF proteins-specific functional diversification. HR-A and HR-B confer an oligomeric structure that properly positions the DBD domains to bind to HSEs. The flexibility of the linker between the DBD and the HR-A/B domain enables adaptation to variable HSE geometries (Feng *et al.*, 2021), and plays a critical role in heat response activation, as well as in transcriptional positioning and efficiency (Sorger et Nelson, 1989). Interaction with CRY1 enhances HsFA1d's affinity for HSEs and increases the number of genes targeted by the HsFA1d-CRY1 complex (Gao *et al.*, 2023). Thus, CRY1 may contribute to DBD positioning by modulating the organization of disordered linker, enabling contact with new HSEs in response to stress. The insertion upstream of HR-A in class B HsFs (Figure 4.S4) could disrupt this mechanism. Our data indicate that HsFA3 exhibits stronger interaction affinity compared to members of the class A subfamily (Figure 4.1B). Based on these properties, HsFA3 was selected as a model system for probing residue-level contributions. Our results reveal that HsFs are stabilized by two key salt bridges formed by HsFA3^{E173} and HsFA3^{E188} interacting respectively with positive patches composed of (K332, R335) and (R211, R433), creating an electrostatic complementarity that enhances overall interface stability with CRY1. At the heart of this interaction, tryptophan CRY1^{W352} participates in charged interactions with K174, K177, and E178 of HsFA3, underscoring the importance of interactions among this interacting surface. Structural studies reveal that CRY1 forms oligomers that implicate a conserved π -cation interaction between CRY1^{W352} and CRY1^{R442} (Shao *et al.*, 2020). Dimerization may thus results in the masking of the HsF binding interface by a CRY1 protein whereas photoactivation, by triggering monomerization, may facilitate interaction with proteins partner (Shao *et al.*, 2020). CRY1-HsFA3 interactions are strongly dependent on the conservation of AtHsFA3 residues at position corresponding to E173, K174, K177 and E188 which are preserved in dicotyledonous HsFA3s, whereas they are frequently substituted in monocotyledonous. This evolutionary divergence suggests functional adaptation: in particular, the negative

charge at the C-terminus of HsFA3 present primarily in dicots may play a key role in stabilizing the interface. In *Arabidopsis*, HsFA3 stands out as the only member of the HsF family to possess a negative charge in its C-terminal region, a remarkable evolutionary feature that may play a key role in stabilizing the interaction with CRY1 and in fine-tuning the stress response. This structural peculiarity fits into a broader context of functional diversification observed in dicots, which exhibit a greater variety of HsF proteins and have evolved for specialized roles in various physiological processes (Xu *et al.*, 2020). The *in vivo* CRY1-HsFA3 interaction, demonstrated by BiFC, suggest that CRY1-HsFA3 interaction mainly occurs in the nucleus as puncta, a signal distribution not observed as homogenic as seen in other HsFs such as AtHsFA1s (Gao *et al.*, 2023) and resembles features previously associated with nuclear bodies. This specificity suggests that the CRY1-HsFA3 pathway may be specialized in coordinating nuclear regulatory responses. Previous studies (Yang *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2009) have shown that similar structures correspond to photo bodies formed upon CRY1 accumulation, either awaiting degradation by the proteasome or functioning as transient stress structures that positively influence gene expression. AtHsFA3 forms heterotrimers with seven other HsFAs proteins, leading to enhanced transcription and promoting heat response sensitivity and specificity (Friedrich *et al.*, 2021). Our analysis was restricted to HsFs homotrimers, where some possible new interactions by arginine stacking from R181 (subunit A) and R183 (subunit B) observed on HsFA1d homotrimers predicted structure (Figure 2E and 3D) could be replaced by strong electrostatic interaction formed by HsFA3^{E188} (subunit A) and HsFA1d^{R183} (subunit B), reenforcing HsFs trimerization and CRY1 interaction in HsFA1d-HsFA3 hetero-trimer context. Furthermore, position 188 represents a prime target for developing rational gain-of-function mutants in monocotyledons such as *Oryza sativa* (Figure S12 and S13), or in other HsF members of *Arabidopsis* (e.g. HsFA1e), to regulate specific stress responses. The results from the HsFA1e^{R162E} and HsFC1^{R129E} mutants for which mutation at position 188 strongly increase interaction with CRY1 highlighted the potential of this residue. In contrast, the lack of response in the HsFB2b^{K249E} (Figure 4.6C) mutant may suggest a specific structural or functional barrier among members of the B subfamily. Alternatively, it may reflect distinct roles in stress response regulation, or a limitation of the reporter system used in our studies. Finally, while experimental confirmation of mutant protein stability would be valuable, mCSM predictions (Pires *et al.*, 2014) indicate that most mutations tested have minimal or moderate destabilizing effects on protein stability, with R335A lying just beyond the threshold for strong destabilization. These results (Table 4.S5) overall suggests that those mutants are more likely to affect interaction rather than stability. Although our study hinted at the importance of specific interactions, understanding the complete functional consequences of these interactions will require future validation in plants.

4.7 Conclusion

In this study the CRY1-HsFA3 interaction relies on a precise network of electrostatic interactions, strongly conserved in dicots but less in monocots. This functional divergence may reflect evolutionary adaptations to different environments, where the thermal stress response is differentially orchestrated. The identification of key residues for the interaction between CRY1 and HsFs opens the way to the design or selection of functional variants with potential applications in plant biotechnology, particularly in developing plants with enhanced thermal stress tolerance.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

SJ and LC designed the experiments. SJ, WB, GM and JP collected data. SJ prepared all the figures and tables. SJ and LC drafted and edited the manuscript. All the authors reviewed the manuscript approved the submitted version.

Funding

This research was funded by the Natural Science and Engineering Research Council Discovery grants 2019-06807 to L.C. SJ is supported in part by a scholarship from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologie.

Acknowledgments

We thank Laxiga Sinnathurai for her extensive work on HsFs proteins during her master's thesis, and Marina Goliassé for her help with histograms figures aesthetics. We thank the members of François Dragon Lab, for their time and valuable assistance with the yeast-two-hybrids experiments.

4.8 Figures

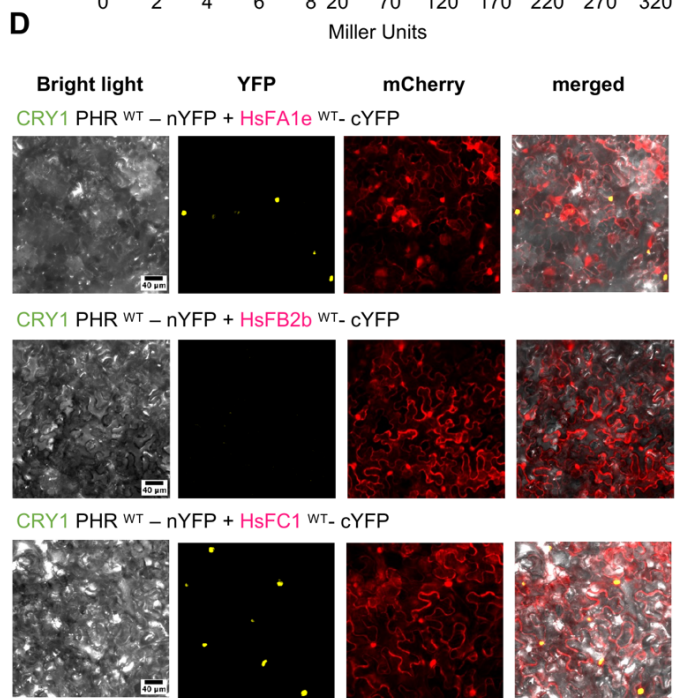
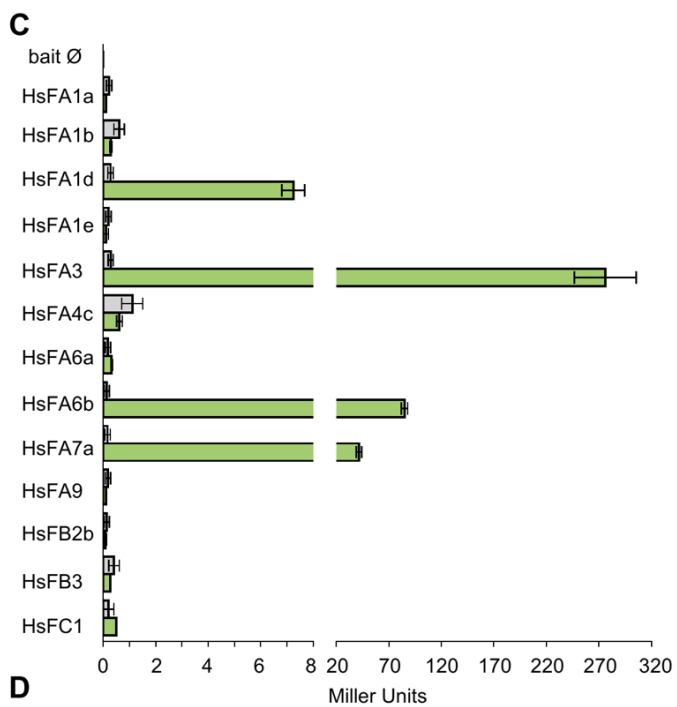
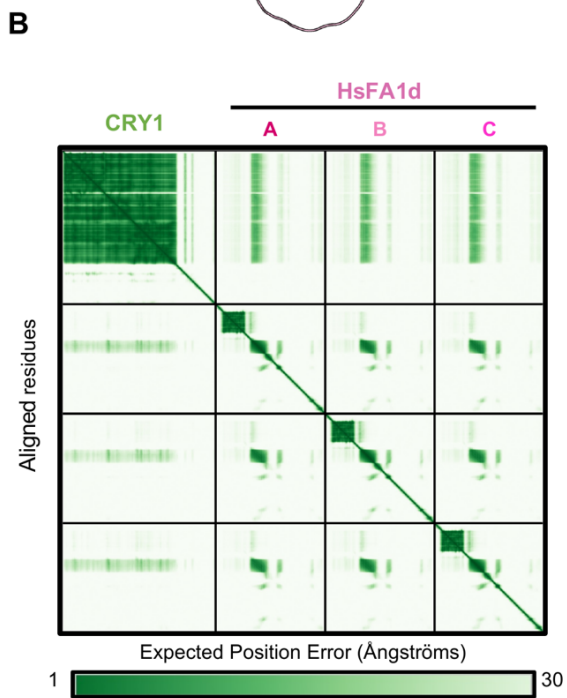
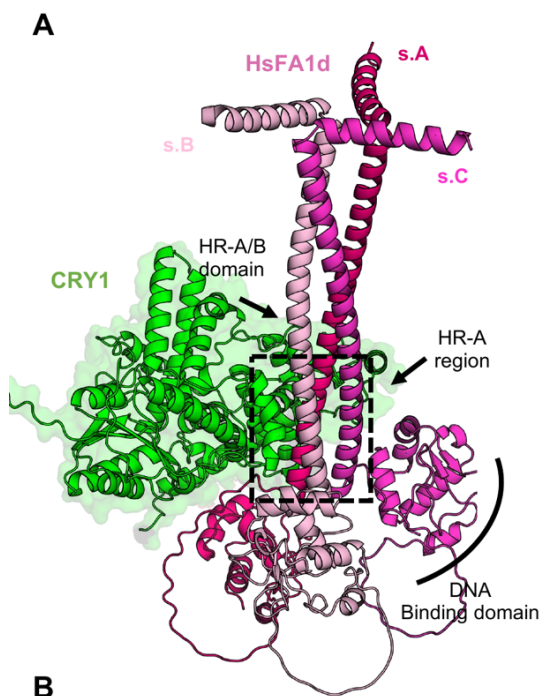


Figure 4.1 CRY1 interacts with multiple HsFs. (A) Structural interaction of CRY1-HsFA1d predicted by AlphaFold v3

Monomeric CRY1 is represented in green and the HsFA1d trimer in pink with each subunit (s.) of HsFA1d is represented by a different tone (subunit A: magenta; subunit B: purple; and subunit C: pale pink). CRY1 residues (509-681 aa) and HsFA1d residues (1-50 aa and 242-485 aa) are predicted to be disordered and omitted for clarity. (B) The predicted aligned error plot obtained by AlphaFold for the CRY1-HsFA1d model suggests an interaction between 3 monomers of HsFA1d (1-190 aa) and a monomeric CRY1 (1-508 aa). (C) Yeast 2-hybrid assay for CRY1-HsF interactions. Whereas 21 sequences were used *in silico* for monomeric structure prediction or interaction modeling with CRY1, only 13 of them, covering all classes, were tested *in vitro* in yeast two-hybrid assays. Precisely, interaction was assessed between pGADT7 (AD), CRY1^{WT}, and pGBKT7 (BD), HsFA1a, HsFA1b, HsFA1d, HsFA1e, HsFA3, HsFA4C, HsFA6a, HsFA6b, HsFA7, HsFA9, HsFB2b, HsFB3, HsFC1. Bars show mean \pm Standard deviation (n=3). For each HsF bait combination, empty prey negative controls are colored in grey. (D) Bimolecular fluorescence complementation assay between CRY1 and a selected subset of HsFs in *N. benthamiana* mesophyll. This assay shows interaction between CRY1^{PHR^{WT}}-nYFP and HsFA1e^{WT}-cYFP, HsFB2b^{WT}-cYFP or HsFC1^{WT}-cYFP. Controls for bimolecular fluorescence complementation assay are presented in Figure 4.S11.

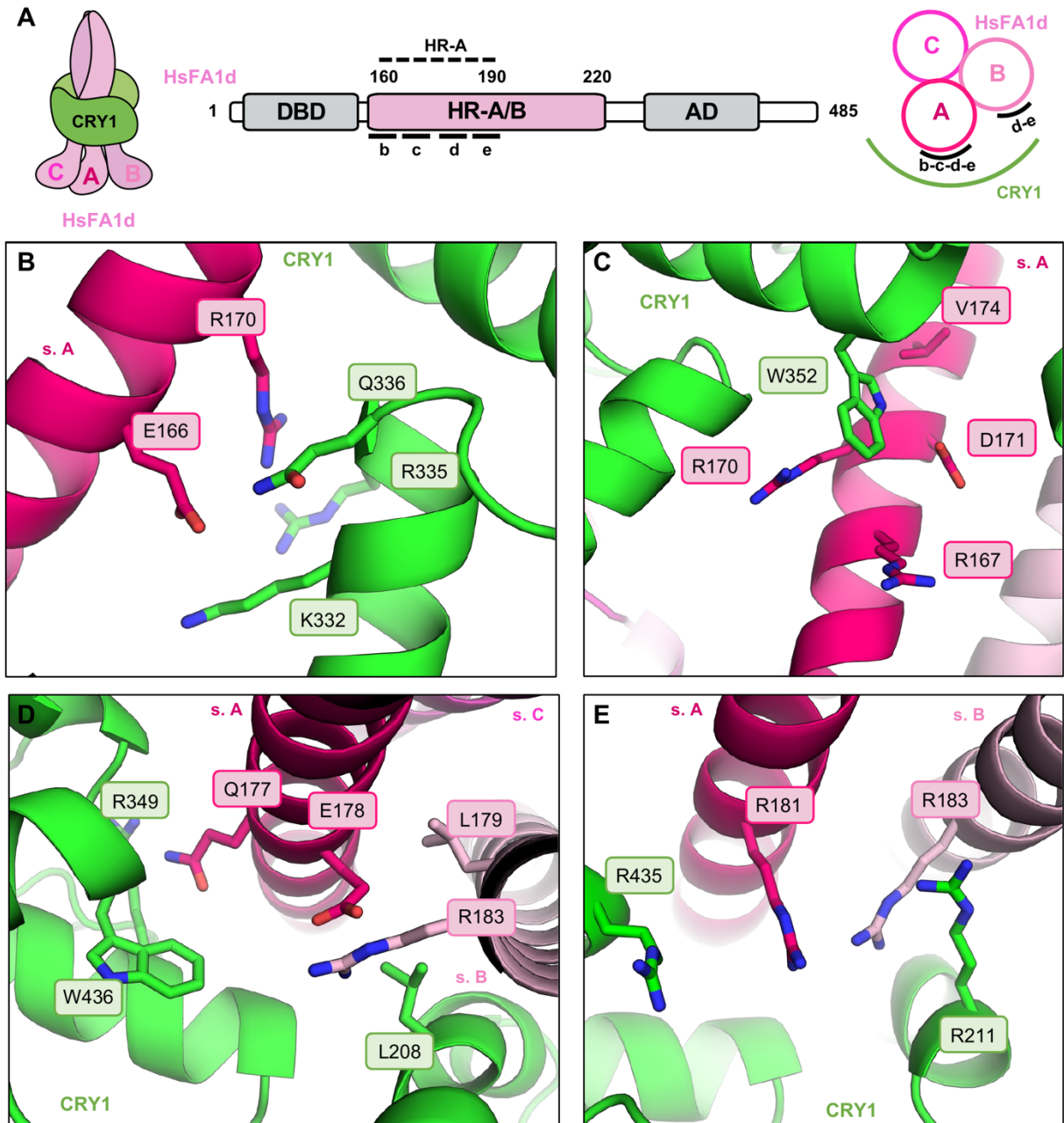


Figure 4.2 Four contact zones between HsFA1d and CRY1 are predicted by AlphaFold.

(A) Left: Schematic representation of the CRY1-HsFA1d interacting model. Middle: Primary structure of Arabidopsis HsFA1d where domains are illustrated by boxes. Right: Transversal view of the schematic model. Contacts with CRY1 are localized along the HR-A region of HR-A/B domain and indicated by the corresponding letter of the following structure figures. CRY1 is shown in light green, and each subunit (sb) of the HsFA1d trimer is labeled with a distinct letter. (B-D) Close-up views highlighting the interaction regions with select contacts: (B) The N-terminal region of the helix. (C) The central region of the helix. (D) The C-terminal region. (E) the extremity of the C-terminal region of HsFA1d helix.

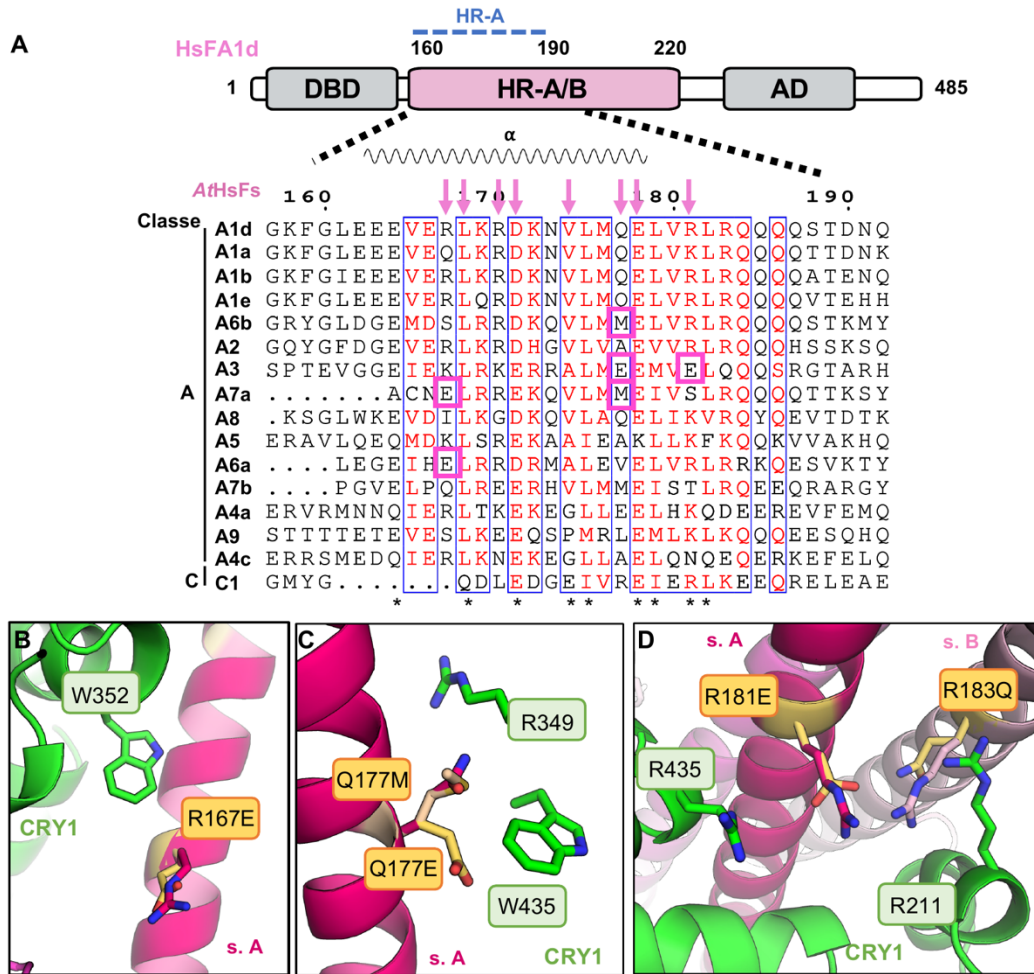


Figure 4.3 Structural plasticity in CRY1-HsFs interaction.

(A) Sequence alignment of the HR-A/B helix for Class A and C HsFs of Arabidopsis. Top: Schematic representation of HsFA1d, where domains are illustrated by boxes. Bottom: Multiple sequence alignment for the HR-A/B helix (160-220 aa). Key HsFA1d amino acid residues predicted by AlphaFold to interact with CRY1 are indicated by pink arrows on the top of the alignment. Residues involved in protein oligomerization are indicated with an asterisk on the bottom of the alignment. (B-D) The model is based on the AlphaFold prediction of CRY1-HsFA1d, CRY1 residues are represented in green and HsFA1d residues from the helix in pink. (B) Close-up on HsFA1d R167. Arginine was manually mutated to glutamate in Pymol to mimic HsFA6a. (C) Close-up on HsFA1d Q177, substituted on the model by a methionine and/or a glutamate to mimic HsFA6b, HsFA7a or HsFA3. (D) Close-up on HsFA1d R181, arginine was manually mutated to glutamate to mimic HsFA3 E188.

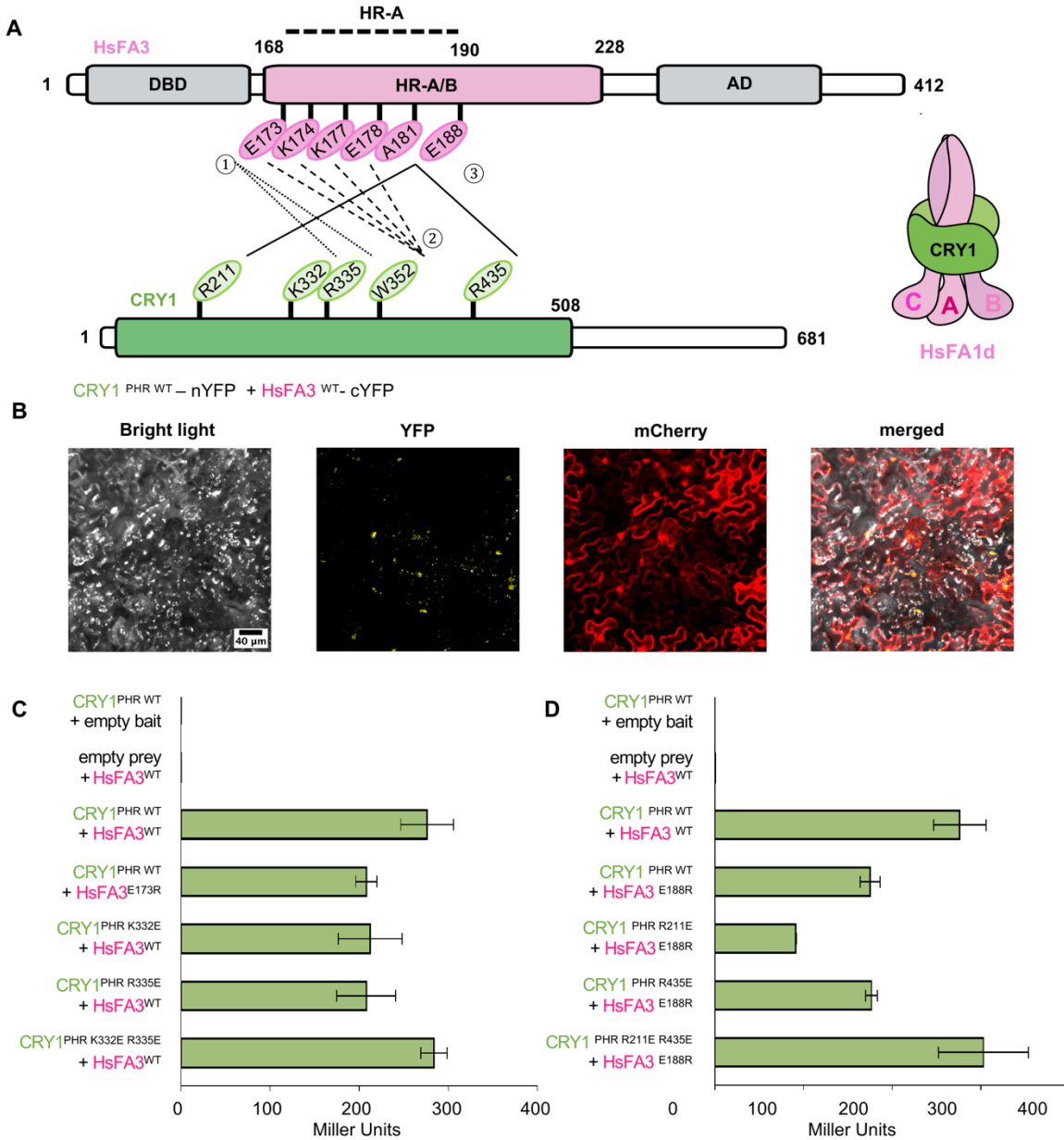


Figure 4.4 Probing of the CRY1-HsFs interface.

(A) Schematic representation of HsFA3 and CRY1 of *Arabidopsis thaliana*. Domains are illustrated by boxes and key amino acid residues are indicated by ovals. Contacts between residues are represented in N-terminal of the helix by dotted line (1). In the middle of the helix by dashed lines (2). In C-terminal of the helix by continuous lines (3). (B) Bimolecular fluorescence complementation assay of CRY1-HsFA3 in *N. benthamiana* mesophyll. This assay show interaction between CRY1^{PHR WT}-nYFP and HsFA3^{WT}-cYFP or HsFA3^{Δ(168-228)}-cYFP. (C) Yeast 2-hybrid CRY1-HsFA3 mutants in N-terminal of the helix. This assay shows interaction between pGADT7 (AD): empty prey, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR K332E}, CRY1^{PHR R335E}, CRY1^{PHR K332E R335E} and pGBKT7 (BD): empty bait, HsFA3^{WT}, HsFA3^{E173K} (n=3). (D) Yeast-two-hybrid CRY1-HsFA3 mutants in C-terminal of the helix. This assay shows interaction between pGADT7 (AD): empty prey, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR R211E}, CRY1^{PHR R435E}, CRY1^{PHR R211E R435E} and pGBKT7 (BD), empty bait, HsFA3^{WT}, HsFA3^{E188K}. Bars show mean ± Standard deviation (n=3).

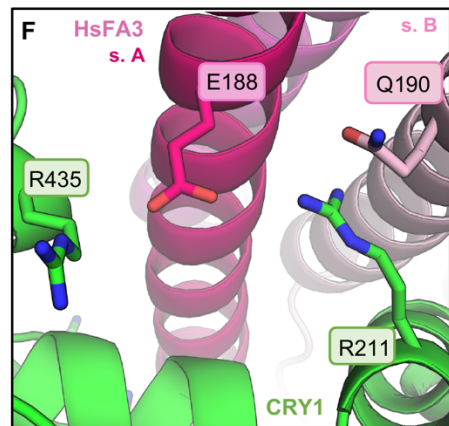
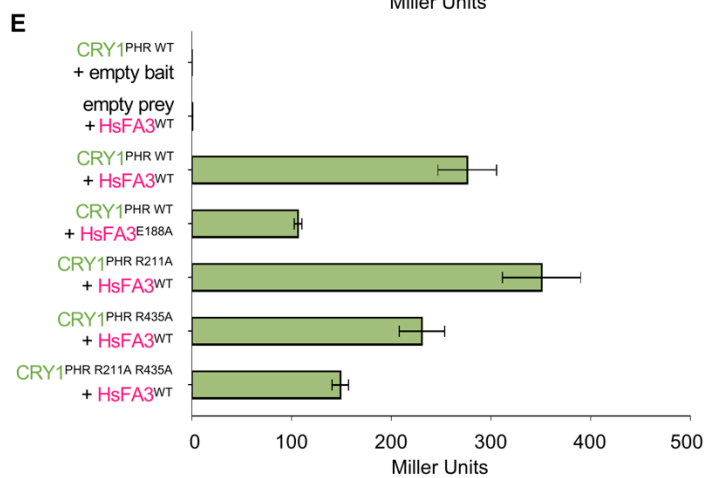
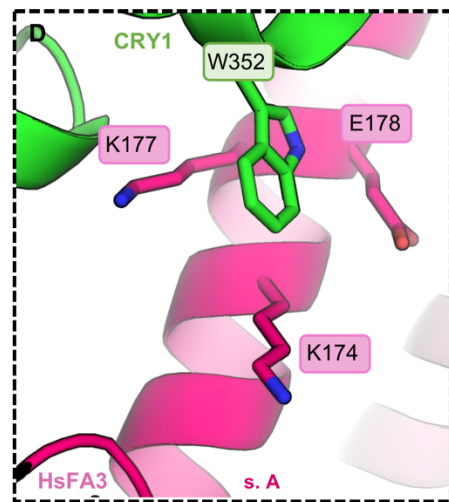
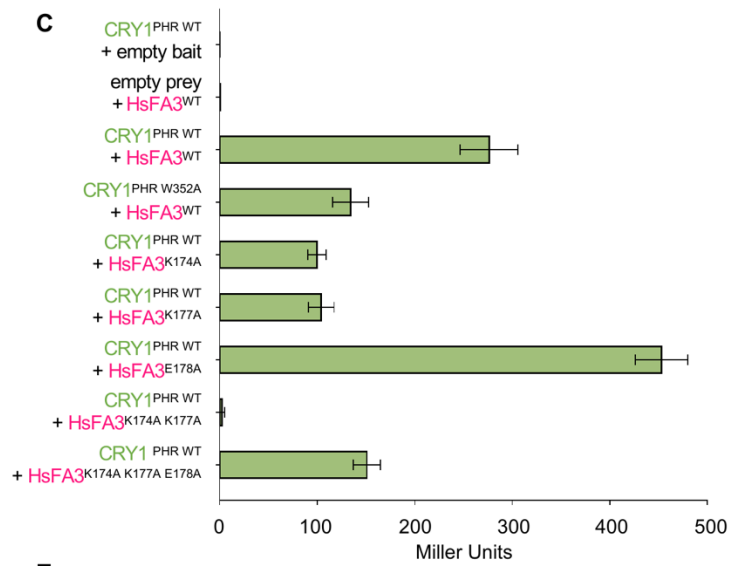
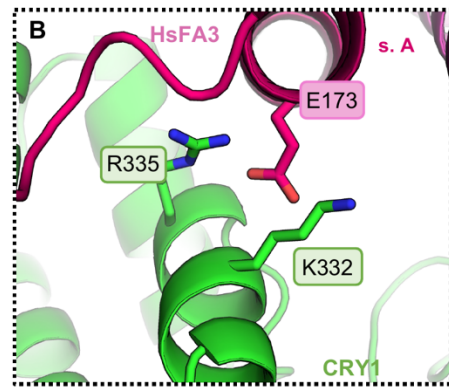
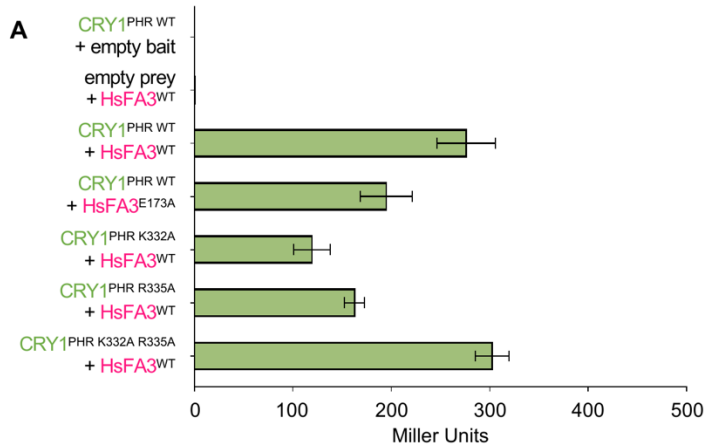


Figure 4.5 Contribution of candidate residues identified by the CRY1-HsFA3 homology model inspired by AlphaFold prediction.

(A, C, E) Yeast-two-hybrid probing of CRY1-HsFA3 mutants. Bars show mean \pm Standard deviation (n=3) and (B, D, F) the corresponding structural representation. (A) This assay shows interaction between pGADT7 (AD): empty prey, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR K332A}, CRY1^{PHR R335A} and pGBKT7 (BD): empty bait, HsFA3^{WT}, HsFA3^{E173A}. (B) This assay shows interaction between pGADT7 (AD): empty prey, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR W352A} and pGBKT7 (BD): empty bait, HsFA3^{WT}, HsFA3^{K174A}, HsFA3^{K177A}, HsFA3^{E178A}, HsFA3^{K174A K177A}, HsFA3^{K174A K177A E178A}. (C) Structural interaction of CRY1^{W352} and HsFA3^{K174A K177A E178A} is shown below. (D) Detailed view of the HsFA3 N-terminal helix: E173 is stabilized through interactions with CRY1^{K332} and^{R335}. (E) This assay shows interaction between pGADT7 (AD): empty prey, CRY1^{PHR WT}, CRY1^{PHR R211A}, CRY1^{PHR R435A} and pGBKT7 (BD): empty bait, HsFA3^{WT}, HsFA3^{E188A}. (F) Detailed view of the HsFA3 C-terminal helix: residues E188 is stabilized through interactions with CRY1^{R211} and CRY1^{R435}.

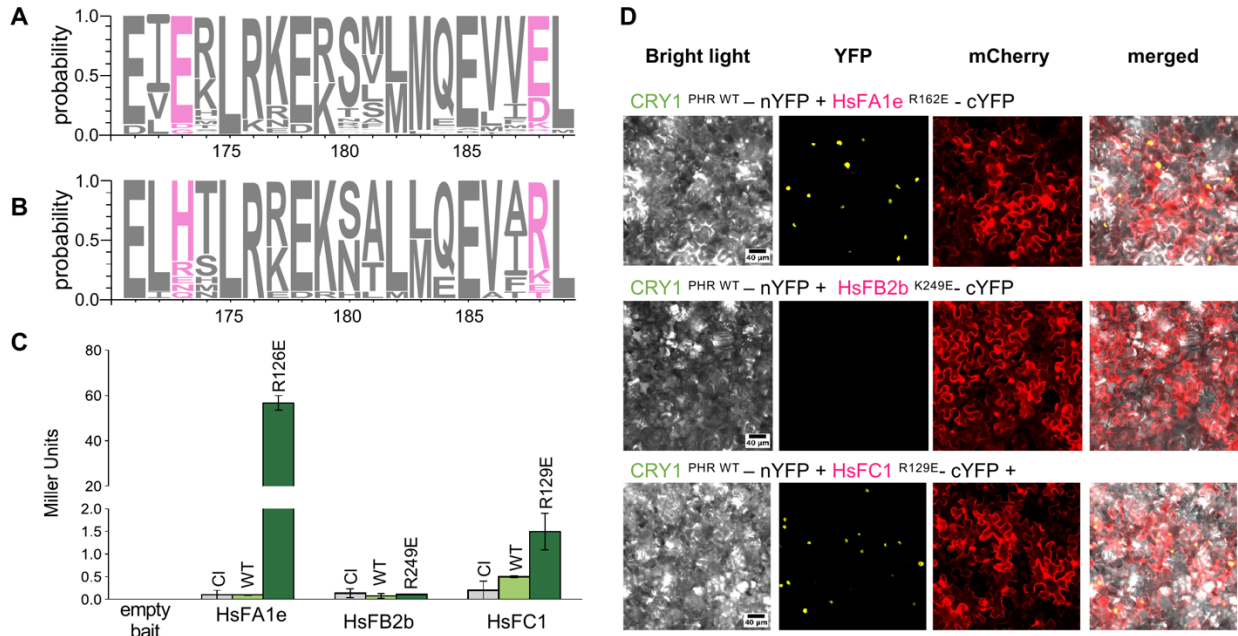


Figure 4.6 New HsFs gain of function mutants inspired by HsFA3 natural variability.

(A) Sequence logo of monocotyledon's HsFA3. (B) Sequence logo of dicotyledon's HsFA3. Sequences are centered on the HR-A region of AtHsFA3. Letter size indicates probability of amino acid at a given position. Amino acids corresponding to position 173 and 188 for Arabidopsis HsFA3 are indicated in pink. (C) Yeast-two-hybrid CRY1-HsFs gain of function. This assay shows interaction between pGADT7 (AD): empty prey, CRY1^{PHR WT} and pGBKT7 (BD): empty bait, HsFA1e^{WT}, HsFA1e^{R126E}, HsFB2b^{WT}, HsFB2b^{K249E}, HsFC1^{WT}, HsFC1^{R129E}. Bars show mean \pm Standard deviation (n=3). For each HsF bait combination, empty prey negative controls are colored in grey. Wild-type is colored in light green while mutations are colored in dark green. Mutation is colored in dark green. (D) Bimolecular fluorescence complementation assay of CRY1-HsFs in *N. benthamiana* mesophyll. This assay shows interaction between CRY1^{PHR WT}-nYFP and HsFA1e^{R126E}-cYFP, HsFB2b^{K249E}-cYFP HsFC1^{R129E}-cYFP.

4.9 Supplementary materials

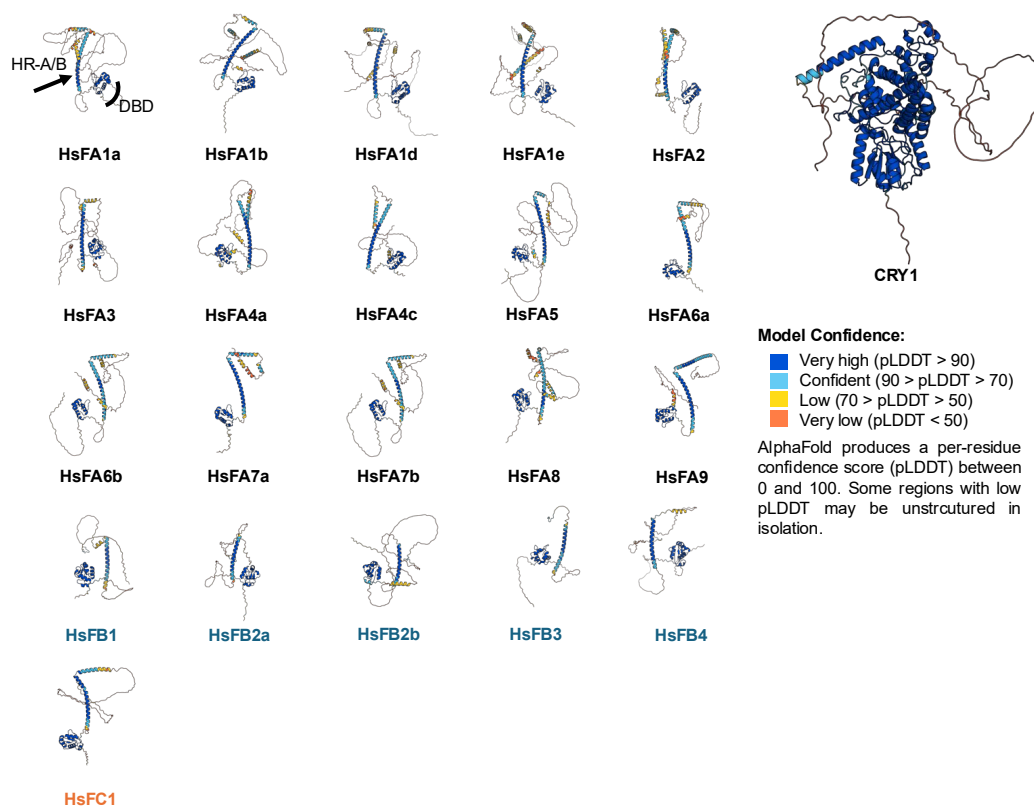


Figure 4.S1 Predicted three-dimensional structures of CRY1 and 21 heat shock proteins from *Arabidopsis thaliana*.

Proteins were modeled as monomers. The prediction reveal secondary structural elements, a rigid DNA binding domain and the alpha helix HR-A/B allowing oligomerization. The level of confidence for proteins is represented by their pLDDT values as determined by AlphaFold : very high above 90 (blue), confident between 70 and 90 (pale blue), low between 50 and 70 (yellow) and very low below 50 (orange).

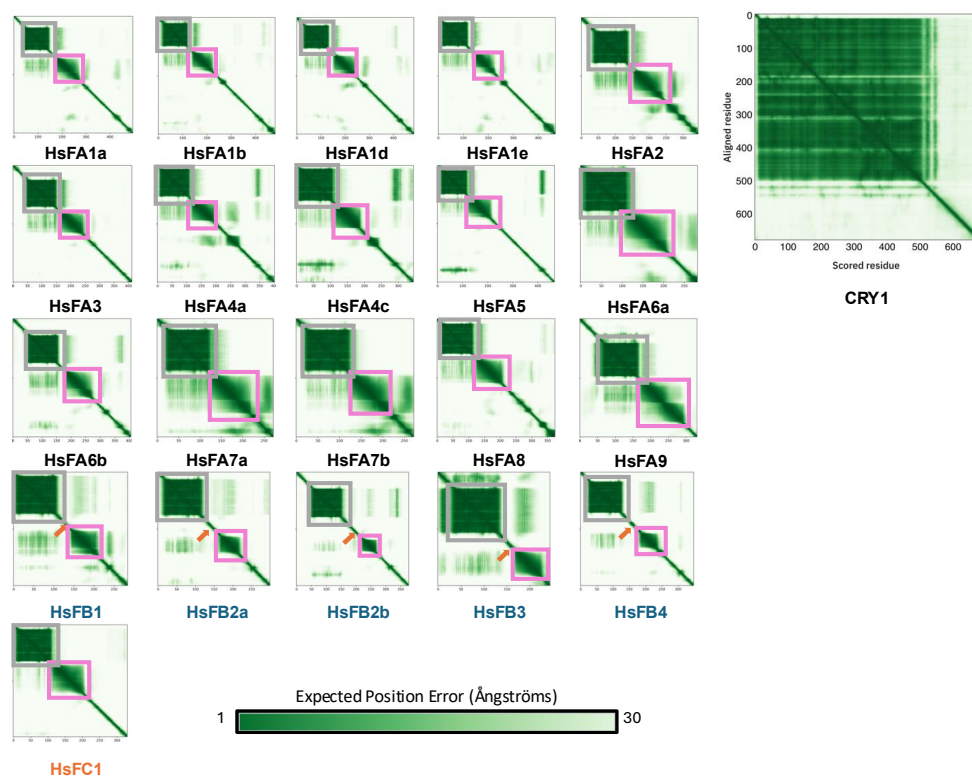


Figure 4.S2 Predicted aligned error plot (PAE) of CRY1 and 21 monomeric heat shock proteins.

The PAE diagrams were obtained using AlphaFold v3 and allow identification of protein domains and structured regions. The DNA-binding domains and the oligomerization domains are boxed in grey, and pink, respectively. An orange arrow points to the long-disordered region between the two domains in the HsF proteins of class B.

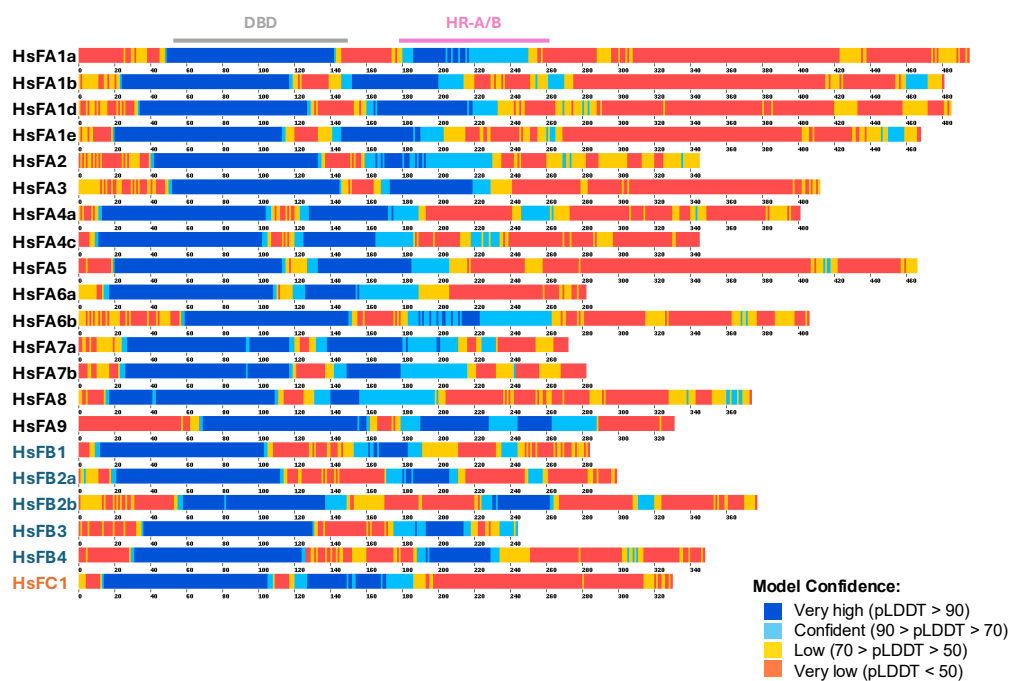


Figure 4.S3 pLDDT values of 21 heat shock proteins from *Arabidopsis thaliana*. Proteins are represented by rectangles, colored according to their per-residue pLDDT values.

```

1          10
HFA1D .....MDVSKV.....TTSDDGGDSMETK...
HFA1A .....MFVNFKYFSFFIRTKMD.GVT.....GGGTNIGEAVTAP...
HFA1B .....M.....ESVPESV.....
HFA1E .....M.....GTVCESV.....
HFA6B .....MDPSFRFIKEEFPAGFSDSPSPSSSSSYLYSSSMAEAAIND...
HSFA2 .....ME.ELKVEEMEEETVFTTGSVA..ASSVSGSSSS...
HSFA3 .....MSPKKDAVSKPTPIISVVPVSRSDIPGSLYVDTDMGFSGS...
HFA7A .....MMNPFLEPGCDPP...
HSFA8 .....MV.....KSTDGGGGSS...
HSFA5 .....MNGALGN.....SSASVSGGE...
HFA6A .....MDYNL.....
HFA7B .....MDPSSSSRRASM...
HFA4A .....MD.....ENNHGV...
HSFC1 .....
HSFA9 MTAIPNVVDIESSSSSLCQETATETVTVERGSSDSSSKPDDVLLIKEEDDAVNLS..L
HFA4C .....MD.....ENNGG...
HSFB4 .....M.....AMMVENSYGGYG...GGGGE...
HSFB1 .....M.....
HSFB3 .....MEDAGEHLRCNDNVNDEERL
HFB2B .....MPGEQTGETPTVAGVGGGGAGCSAGNSGGSSGCGAGGGG...
HFB2A .....MNSP...

```

DNA Binding domain

```

20          30          40          50          60          70
HFA1D PS..PQPQAAILSS.NAPP PFLSKTYD MVDHNTDSIVSWS .ANNNSFIVWKPP EFARD
HFA1A PP..RNPHPATLLNAN.SLPP PFLSKTYD MVEDPATDAIVSWS .PTNNSFIVWDPP EFARD
HFA1B PS..PNSNTPSIPPPV.NSVP PFLSKTYD MVDPLTNEVVSWS .SGNNSFVVSAP EFARD
HFA1E AT..AKSSTAVM...S.SIP PFLSKTYD MVDPLTDDVVSWS .SGNNSFVVSAP EFARD
HFA6B PTTLSYPQPLEGLHE.SGPP PFLTKTYD LVEDSRTNHVVVWS .KSNNSFIVWDPQAF SVT
HSFA2 .....PRMEGLNE.TGPP PFLTKTYE MVEDPATDTVVSWS .NGRNSFVVDWSHKF STT
HSFA3 PL...PMPLDILQG.NPIP PFLSKTFD LVDLDPVLSWG .LTGASFVVDPL EFARI
HFA7A PP...PQMEGLHE.NAPP PFLTKTFE MVDPTDTHVSWN .RGGTFVVDLHLS FTI
HSFA8 .....S.SVVA PFLRKYCYD MVDSDTDSIVSWS .PSADNSFVLDLDTV FSQ
HSFA5 GA.....GGPA PFLVKTYE MVDSDTQIVSWS .ANNNSFIVWNHAE FSRRL
HFA6A .....PIPLEGLKE.TPPTA FLTKTYNIVEDSSTNNIVSWS .RDNSFIVWEPET FALI
HFA7B PP...PVPMEGLQE.AGPS PFLTKTFE MVDPTNTHVSWN .RGGISFVVDPHFS SAT
HFA4A SS.....SSLP PFLTKTYE MVDSSDSIVSWS .QSNKSFIVWNP EFARD
HSFC1 .....MEDDNSNNNNN.NVIA PFLVKTYE MVDPSDWDLITWG .FAHNSFIVVDPL DF SQR
HSFA9 GFW.....KLHEI GLITP PFLRKTFE IVDDKVTDPVVSWS .PTRKSFIVWDSY EFARD
HFA4C .....S.SLPP PFLTKTYE MVDSSDSVVAWS .ENNSFIVKNP EFARD
HSFB4 RIQ.LM.VEGQG...KAVPA PFLTKTYE MVDPATDHVVSWG .DDDTTFVVRP EFARD
HSFB1 .....TAVTAAQR.SVPA PFLSKTYE MVDHSTDDVVSWN .EETAFVVKTA EFARD
HSFB3 PLE.FMIGNSTSTAELQPPP PFLVKTYE MVDPTDGVISWN .EYGTGFVVP EFARD
HFB2B GSG.GG.GGGGDSQR.SIPT PFLTKTYE MVDVYDELISWN .EDGTFVVRP EFARD
HFB2A PVD.AM.ITGESSQR.SIPT PFLTKTFE LVEDSISIDVVISWN .EDGSSFIVWNPT DF AKD

```

DNA Binding domain

```

80          90          100          110          120          130
HFA1D LLPKNFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVD PDRWEFANE GFLRGQKHL LQ.S. ITRRK PAHGQG
HFA1A LLPKYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVD PDRWEFANE GFLRGQKHL LKK. ISRRK SVQGHG
HFA1B LLPKYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVD PDRWEFANE GFLRGKQL LKS. IVRRK PSHVQ.
HFA1E FLPKYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVD PDRWEFANE GFLRGQKQL LKS. IVRRK PAQVQ.
HFA6B LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVN PDRWEFANE GFLRGKHL LKN. ITRRK .....
HSFA2 LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKID PDRWEFANE GFLAGQKHL LKN. IKRRK .....
HSFA3 ILPRNFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKID DKWEFANE AFLRGKHL LKN. ITRRR SPQSN.
HFA7A LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKIEA ERWEFANE EFLGQRQL LKN. IKRRNPF....
HSFA8 LLPKYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKID ERWEFANE AFLRGKHL LKN. ITRRRKPNV...
HSFA5 CLPRCFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKID ERWEFANE FLKGERHL LKN. IKRRK .....
HFA6A LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKIEA ERWEFANE GFLMQRDL LKS. IKRRK .....
HFA7B LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKAD PEQWEFANE DFRGQPHLMKN. ITRRRKPVHSH.
HFA4A LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVD PDRWEFANE HFLRGQKHL LNN. IARRKHAR...
HSFC1 LLPKYFKHNFFSSFV RQLNSYGFRRKVD SDRWEFANE GFGGKHL LKN. IKRRSKNTKCC
HFA4C LLPRYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVD PEKWEFANE DFRGRPYLMKN. ITRRRKTSQMP.
HSFB4 LLPNYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKIV PDRWEFANE FFRKGEKHL LCE. ITRRRKTSQMP.
HSFB1 LLPYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKTV PDKWEFANE YFRGGEDLLTD. ITRRRK .....
HSFB3 LLPTLFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVT ITRWEFANE FRKGRQLMSN. ITRRRK .....
HFB2B LLPKYFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVV PDRWEFANE DFRKGEKHL LRD. IQRRK ISQPAM
HFB2A LLPKHFKHNFFSSFV RQLNTYGFRRKVV PDRWEFANE DFRKGEKHL LRE. IQRRK ITTTHQ

```

```

140          150
HFA1D QGHQRSQ... HSNQNSVSVACVE...
HFA1A SSSSNPQSQQLSQGGSSMAALSSSVCVE...
HFA1B ...QNQQ... QTQVQSSVVGACVE...
HFA1E ...P.PQ... QPQVQHSVVGACVE...
HFA6B TSNNNSNQMQQ.PQSSEQQSLDNFCIE...
HFA2  NMGLQNVNQQ.GSGMS...CVE...
HFA3  QTCCSSTSQS...Q...
HFA7A TPSSSP...SHD...
HFA8  .QSSEQSKH.ESTSTTYAQE...
HFA5  .SHPPASS...TD...
HFA6A TSSQTQ...TQS...
HFA7B TSSSSPPLN.YSQSQPEAHD...
HFA4A .SLPNLQAQL...NPLTD...
HSFC1 ...
HFA9  NKEASTTITE...
HFA4C .SLVNLQAQ...NPLTE...
HSFB4 QQHSPPFMSHH.HAPPQIPFSGGSFFP.LPPPRVITPEEDH...YWCDDSPPSRPRVPIQQ
HSFB1 SVIAS.TAGK.CVVVGSPPSESNSGG...GDDHGS...SSTSSPGS...S
HSFB3 SQHWSHNKSN.HQVVPITTMVNQEGH...QRIGIDHHH...EDQQSSAT...S
HFB2B AAAAAAAAAA.VAASAVTVAAVPVVAHVSPSPNSGEE...QVISSNSPAAAAAIGGV
HFB2A TVVAPSSSEQR.NQTM...VVSPSPNSGEDNNNNQVMSS...SPSSWYCHQTKT

```

HR-A HR-A/B domain

```

160          170          180          190          200
HFA1D VGKFGLE...EVEERLKRDKNVLMQELVRLRQQQOSTDNQTQTMTVQRILQGM
HFA1A VGKFGLE...EVEQLKRDKNVLMQELVRLRQQQQTDDNKLOVLLVKHLQVM
HFA1B VGKFGLE...EVEERLKRDKNVLMQELVRLRQQQQTATENQLQNVGQKVQVM
HFA1E VGKFGLE...EVEERLQRDKNVLMQELVRLRQQQVTEHHLQNVGQKVHVM
HFA6B VGRYGLD...GEMDSLRRDKQVLMMELVRLRQQQSTKMYLTLIEEKLKKT
HFA2  VGQYGF...EVEERLKRDKHGVLVAEVRLRQQQHSSKSQVAAMEQRLLVT
HFA3  GSPTEVG...GEIERLKRERRALMEEMVLRQQSRGTARHVDTVNQRLLKAA
HFA7A ...ACNELRREKQVLMMEIVSLRQQQQTTKSYIKAMEQRIEET
HFA8  .KSGLW...KEVDILKGDQVLAQELIKVRQYQEVTTDKMLHLLEDVQGM
HFA5  QERAVLQ...EQMDKLSREKAAIEAKLLKFKQQKVVAKHQFEEMTEHVDDM
HFA6A ...LE...GEIHELRRDRMALLEVELVRLRQKQESVKTYLHLMEEKLKVT
HFA7B ...PG...VELPQLREERHVLMMELISTLRQEEQRARGVQAMEQRINGA
HFA4A SERVRMN...NQIERLTKKEGGLLEELHKQDEEREVFEMVKELEKRLQHM
HSFC1 .GMYG...QDLEDGELVREIERLKEEQRELEAETQRNRRRIEAT
HFA9  .SERRSME...TEVESLKEEQSPMREMLKLKQQQEESQHQMTVTVQEKIHGV
HFA4C IDTAAQ...VTALSEDNERLRRSNTVLMSELAHMKKLY...NDIIFYVQNH...
HSFB1 KNPGSVE...NMVADLSGENEERLKRNNNLSSELAAKKQR...DELVTFLTGHLKVR
HSFB3 SS...FVYTALEDENKCLKNEENELLSCELGKTKKCC...KQLMELVERYRGED
HFB2B VGGSLQRTTSCETAPELVEENERLKRDNERLRKEMTKLGLY...ANIYTLMANFTPGQ
HFB2A TGNAGL...SVELLEENERLRSQNIQLNRRLTQMKISIC...DNITYSLMSNYVGSQ

```

HR-B

```

210          220          230          240          250
HFA1D ENRQQQ LMSFLAKAV QSPHF LSQFLQQNQNESNRRISDTSKRR.RFKRDGIV...RN
HFA1A EQRQQQ IMSFLAKAV QNPTEF LSQFIQKQT...DSNMHVTEANKKR.RLREDSTAATESNS
HFA1B EQRQQQ MMSFLAKAV QSPGFLNQFLVQQNN...NDGNRQIPGSGNKKR.RLPVDEQE...NR
HFA1E EQRQQQ MMSFLAKAV QSPGFLNQFSQQSN...EANQHISESNKKR.RLPVEDQM...NS
HFA6B ESKQKQ MMSFLARAM QNPDFIQQL.VEQK...EKRRKEI.EEAISKRRQRPIDQ
HFA2  EKRQQQ MMTFLAKAL NNPVNFVQQFAVMSK...EKKSIF.GLDVGRKRR...
HFA3  EQRQKQ LLSFLAKLF QNRGFLERLKNFKGK...EKGALGLEKARK.KFKHHQPPQDSPT
HFA7A ERKQRQ MMSFLARAM QSPSFLHQ...LKQ...RDKKIKE...
HFA8  EESQEE MLSFLVMVM KNPSSLVQL.LQPK...EKNTW...RKAGEGAKIVEE
HFA5  ENRQKK LLNPLETATRNPTEFVKNFGKVEQ...LDISAYNKKR.RLPEVE...QSKPPS
HFA6A EVKQEM MNNFLKIKI KKPSSLQSL...RKRNLQ.GIKNREQKQEVISS
HFA7B EKKQRH MMSFLRRRAVENPSLLQOI...FEQK...RDREAA...
HFA4A EKRQKT MVSFVSOVL EKPGLALNLSPCVPE...TNER.KR.RFPRIEFPDPEML
HSFC1 EKRPEQ MMAFLYKVV EDPDLP LPRMLEKER.TKQQQVSDKKKRR...VTMSTVKS
HSFA9 DTEQQH MLSFFAKLA KDQRFV ERLVKKRKMKIQRELEAAEFVKLLKLLQDQETQKNLLDV
HFA4C EQHQKS IVAYVSOVL GKPGLSLNL...E...NHERRR.RF...
HSFB4 .KPVAPS...NNSSYLSSFQKQQQ...QPPTLDYNTATVNATNLNLSNPPPT
HSFB1 PEQIDKMIK...GGKFKPVESDEESEC.EG...CD
HSFB3 EDATD...ESDDEED...
HFB2B EDCAHLPE...G...KPLDLLPERQE.MS...EAIMASEIE
HFB2A PTDERSYSPG...GSSSQPMEFPLPAKR...FSEME

```



```

                420      430      440      450
HFA1D DSD.....IDPVDYGLLERLLM.SSPV...PDNMDSTPVDN...ETEQQ...
HFA1A DPE..IDELMS.....NFEFLEEYMP.ESPVFG....DATTLENNNNNNNNNN
HFA1B EGEGKMNELLEGVPKLPGIQDPFWEQFFSVELPAIADTDDILSGSVENNDLVLEQEP...
HFA1E .....NELL.....PEVQDSFWEQFIG.ESPVIGETDELISGSVEN.ELILEQLELQS
HFA6B .....GYHKENNEIYEGGFWEDLLN.....E
HSFA2 .....MMRDGNLEAALDVKVEDLV.....
HSFA3 .....
HFA7A .....LVVERELD...DGFWEELL.....
HSFA8 ELD.KSYMLKLISEEMKPDDEFEGQLT.....
HSFA5 RQEIAVGGSQANAAPPARVNDVFWEQFLT.ERPGSS...DNEEASSTYRGNPYEEQEEK.
HFA6A .....GQGEDEIEMDSEGIWKGFV.....
HFA7B .....GVERELD...DGFWEELL.....
HFA4A .....PPVAGANDGFWQQFFS.ENPGST...EQREVQLERKD...DKDKAGV
HSFC1 .....
HSFA9 .....
HFA4C .....APKTGVNDDFWEQCLT.ENPGST...EQQEVQSERRDVGNDNNGNKI
HSFB4 .....
HSFB1 .....
HSFB3 .....
HFB2B .....
HFB2A .....

                460      470      480
HFA1D ...NGWDKT.KHMDNLTQQMGLLSPETLDSLQNP
HFA1A NNNNNNTNGRHMDKLIIEELGLLTSETEH.....
HFA1B ...NEWTRNEQQMKYLTEQMGLLSSEAQRK.....
HFA1E TLSNVWSKN.QQMNHLTEQMGLLSDALRK.....
HFA6B GQNFDFEGDQENVVLIQQLGYLGSSSHTN.....
HSFA2 GSPLDW..DSQDLHDMVDQMGLGSEP.....
HSFA3 .....
HFA7A .....SDESLASTS.....
HSFA8 .....PERSRNLEILTEQMELLASNE.....
HSFA5 RNGSMMLRNNTKNIEQLTL.....
HFA6A ...L...SEEEMCDLVEHFI.....
HFA7B ...MNNENSDEEEANVKQD.....
HFA4A RTEKC.WWNSRNVNAITEQLGHLTSSERS.....
HSFC1 .....
HSFA9 .....GNQRTYWWNSGNVNNITEKAS.....
HSFB4 .....
HSFB1 .....
HSFB3 .....
HFB2B .....
HFB2A .....

```

Figure 4.S4 Sequence alignment of Heat shock proteins of *Arabidopsis thaliana*.

Multiple sequence alignment was constructed using full length sequences using BLAST. The alignment was depicted using Esript v.3. The AHA motif is highlighted in light pink. DNA binding domain (grey), HR-A region (blue), HR-B region (orange) and HR-A/B domain (pink) are indicated on the top of the alignment by continuous lines.

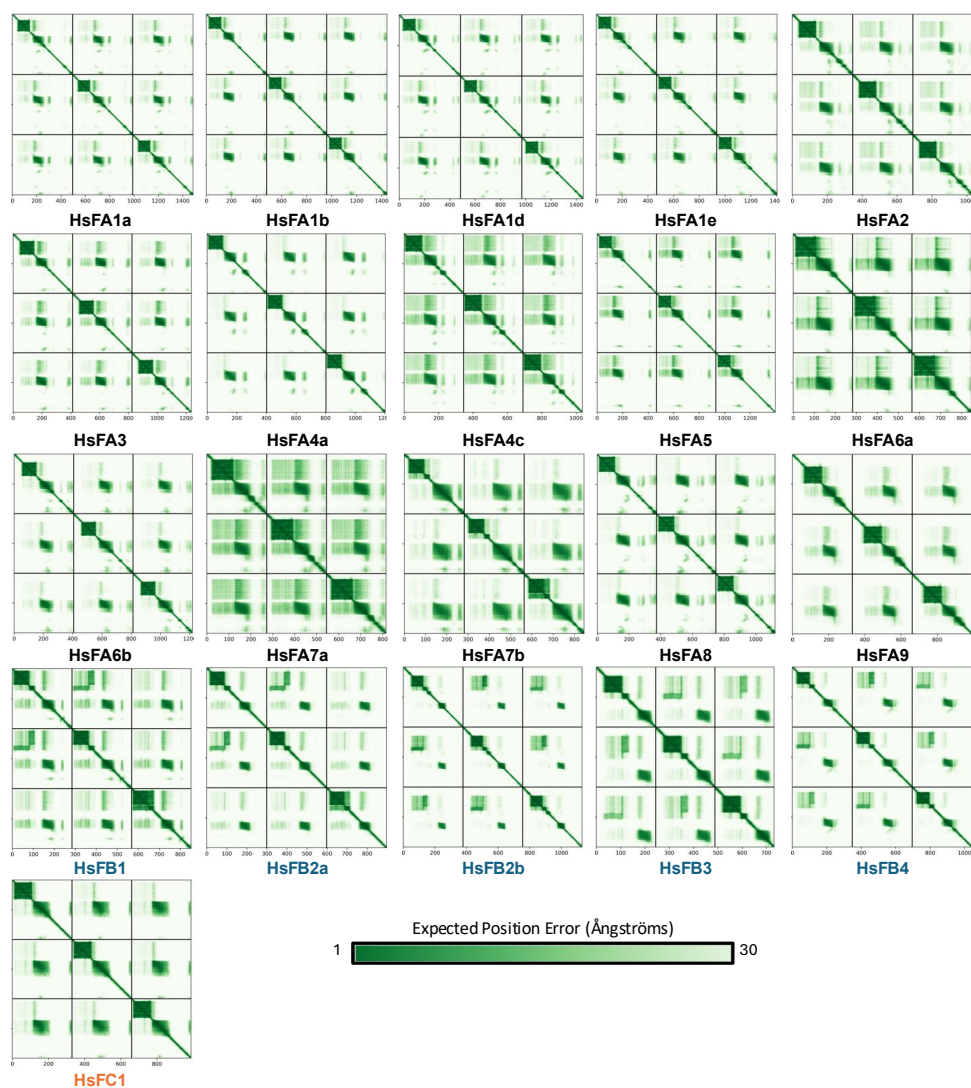


Figure 4.S5 Predicted aligned error plot (PAE) of 21 homo-trimeric heat shock proteins from *Arabidopsis thaliana*.

The PAE diagram obtained by AlphaFold, highlights confidence in specific protein-protein interactions.

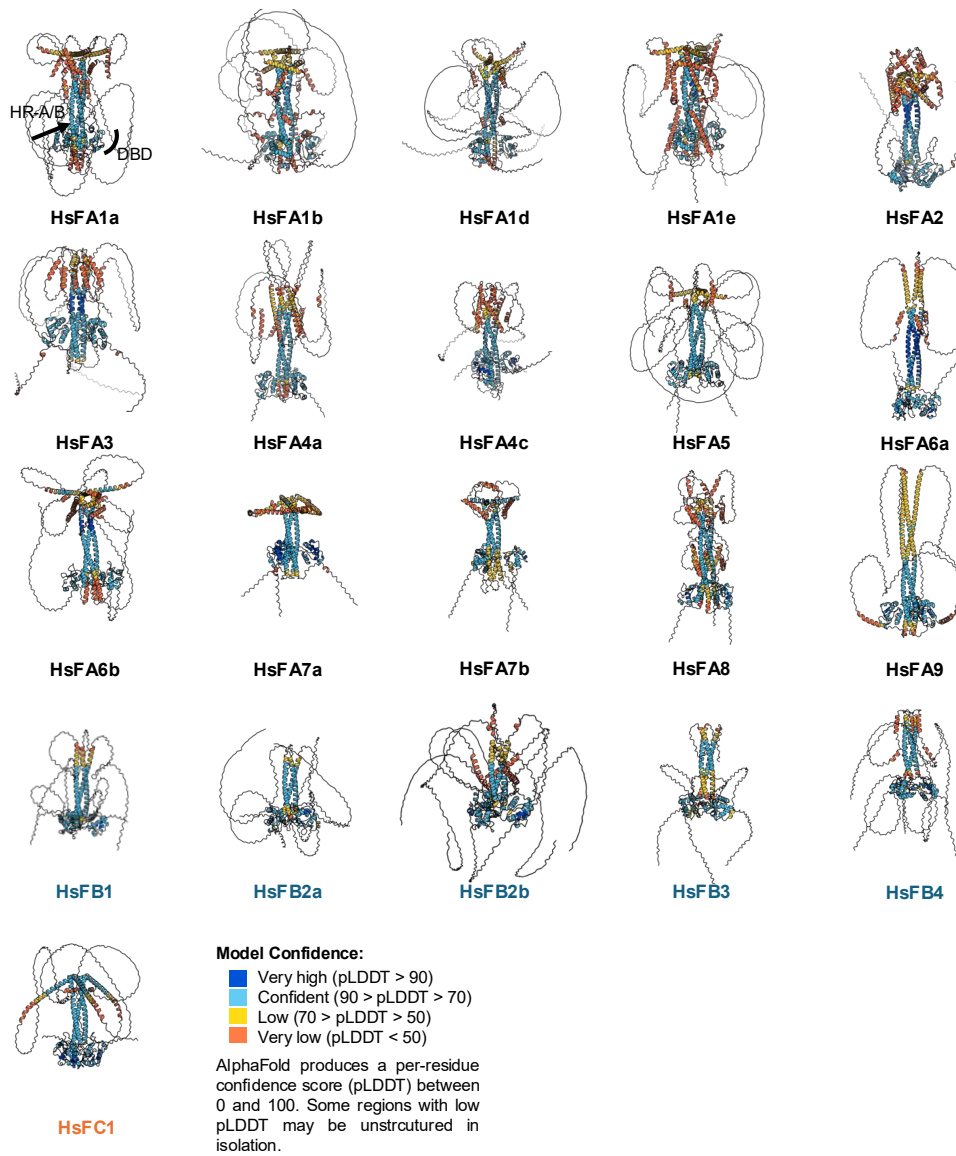


Figure 4.S6 Predicted three-dimensional structures of 21 homo-trimeric heat shock proteins from *Arabidopsis thaliana*.

Proteins are represented as homo-trimers. The level of confidence for proteins is represented by their pLDDT values as determined by AlphaFold: very high above 90 (blue), confident between 70 and 90 (pale blue), low between 50 and 70 (yellow) and very low below 50 (orange).

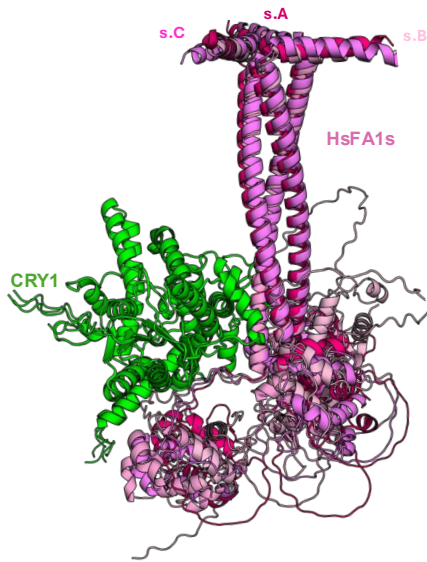


Figure 4.S7 Structural alignments of CRY1-HsFA1s predicted by AlphaFold.

Monomeric CRY1 is represented in pale green and the HsFA1s trimer in pink. HsFA1s are colored in pink tone. HsFA1a (purple), HsFA1b (light pink), HsFA1e (hot pink), HsFA1d (pink). Disordered predicted residues are omitted for clarity.

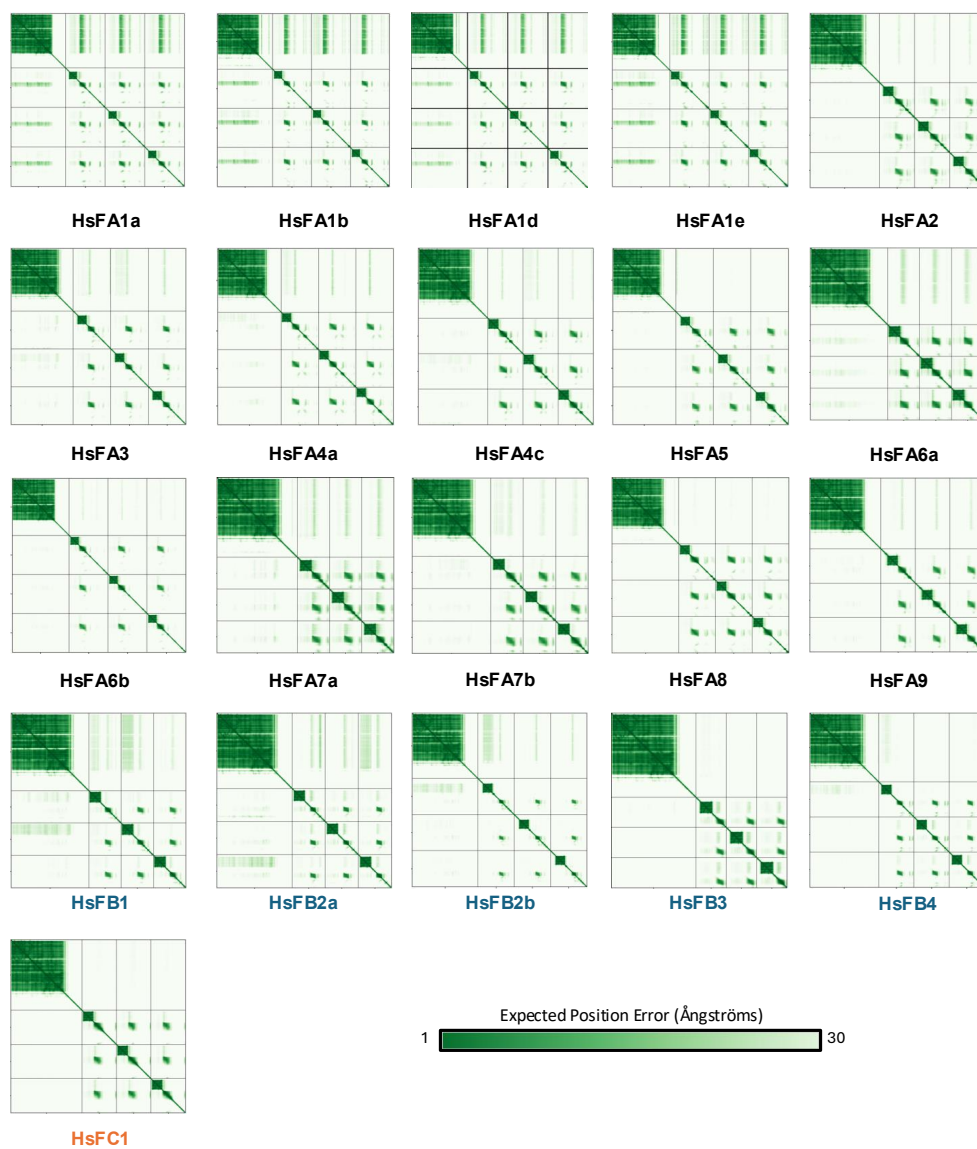


Figure 4.S8 Predicted aligned error plot (PAE) of 21 CRY1-HsFs interaction from *Arabidopsis thaliana*. The PAE diagram obtained by AlphaFold, highlights confidence specific protein-protein interactions.

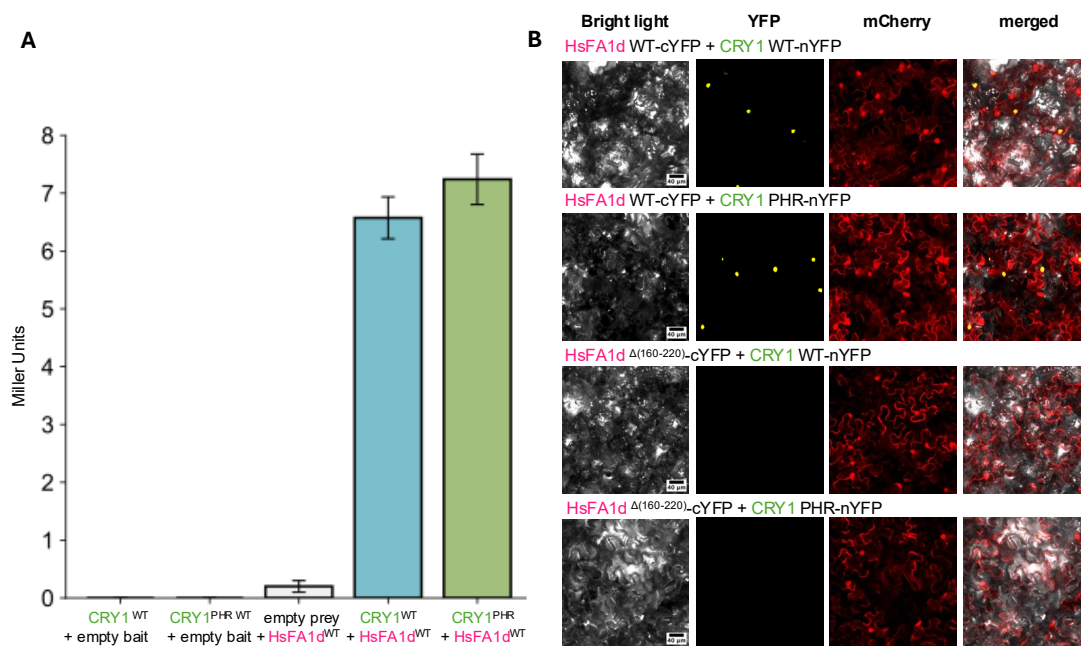


Figure 4.S9 The CRY1 PHR domain interacts with the HsFA1d HR-A region.

(A) Yeast 2-hybrid CRY1-HsFA1d mutants. This assay shows interaction between pGADT7 (AD), empty prey, CRY1^{WT}, CRY1^{WT} PHR and pGBKT7 (BD), empty bait, HsFA1d^{WT}. Bars show mean ± Standard deviation (n=3). (B) Bimolecular fluorescence complementation assay between CRY1 and HsFA1d in *N. benthamiana* mesophyll. This assay shows interaction between CRY1^{WT}-nYFP, CRY1^{PHR}^{WT}-nYFP and HsFA1d^{WT} - cYFP or HsFA1d^{Δ(160-220)}-cYFP .

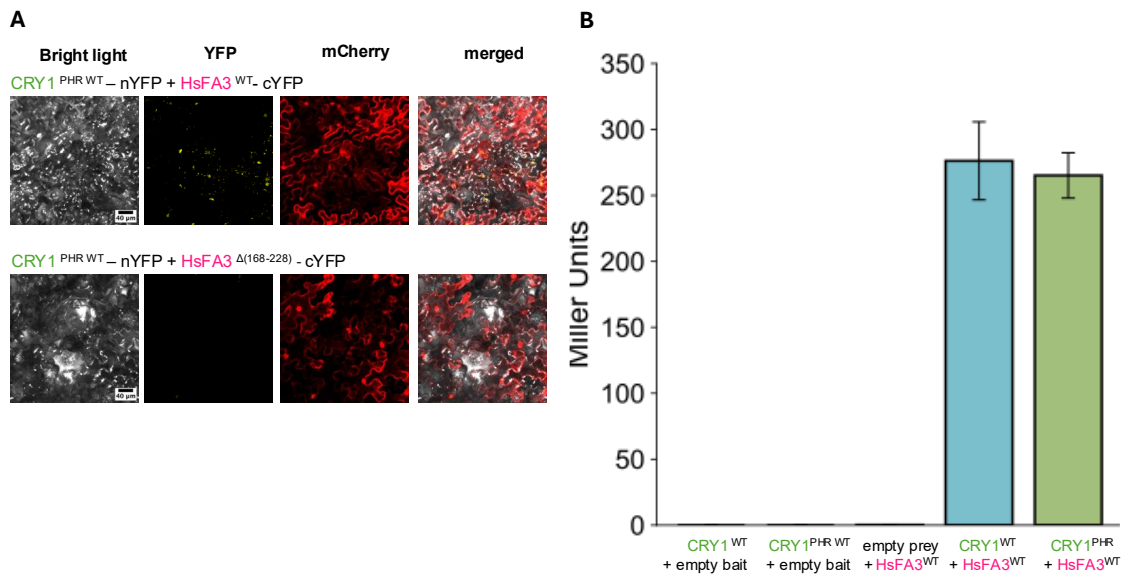


Figure 4.S10 CRY1 PHR domain interacts with HsFA3.

Yeast 2-hybrid CRY1-HsFA3. This assay shows interaction between pGADT7 (AD), empty prey, CRY1^{WT}, CRY1^{PHR WT} and pGBKT7 (BD), empty bait, HsFA3^{WT}. Bars show mean ± Standard deviation (n=3).

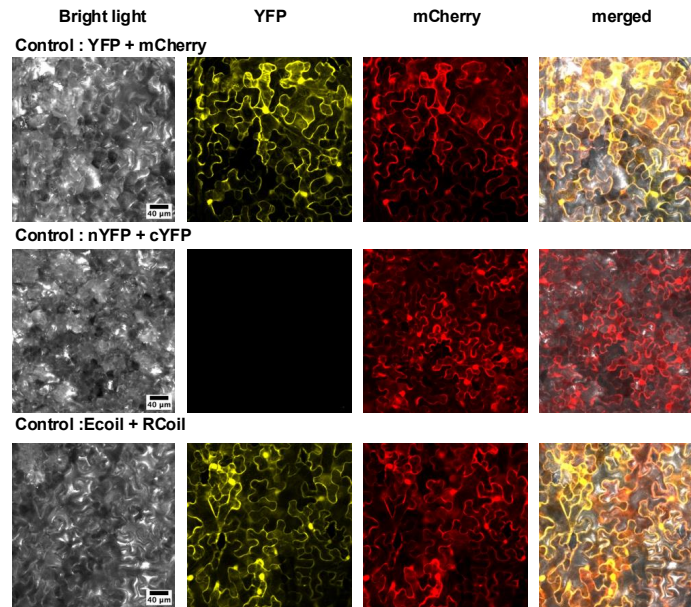


Figure 4.S11 Bimolecular fluorescence complementation assay controls used in this study.

The full-length YFP and mCherry were used as positive constitutive controls. Empty vectors nYFP and cYFP were used as negative auto complementation controls. Ecoil and Rcoil are known to interact, the proteins were fused to nYFP and cYFP respectively and used as positive controls to validate the YFP split.

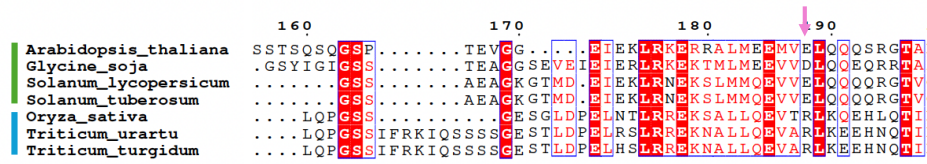


Figure 4.S12 Sequence alignment of Heat shock proteins from common crops.

Multiple sequence alignment of HsFA3 proteins from common crops species compared to *Arabidopsis thaliana* HsFA3. The alignment focuses on the HR-A region. The position of E188 in Arabidopsis HsFA3 is indicated with a pink arrow. Dicotyledonous sequences are grouped and highlighted in green, whereas monocotyledonous sequences are shown in blue.

```

1 10 20
HFA1D_ARATH .....MDVSKVTT.....SDGGG.DSMETKFPSP.P
HFA1D_ORYSJ .....MEAAVAAA.....AAAAG...AVITAVA.P
HFA2B_ORYSJ M.DDFMNLNPKVEESHGD.....GGG
HFA2E_ORYSJ M.NYRVVNVVKVESGPST.....G.
HFA2D_ORYSJ M.EKMMPGMVKEEWPSS.....PEE
HFA2C_ORYSJ M.DPAAAGIVKEEMLESQ.....QQQ
HFA2A_ORYSJ M.NPLRV.IVKEEELDFA.....AAA
HFA9_ORYSJ MGSKKRSPQHAAAAPPA.....VGGGG.GG...EVS.G
HFA3_ORYSJ M.DHNTDPPPTTMVDAAA.....ALLLEPKLEGVD.....
HFA5_ORYSJ M.....EVAAGA.....RGGG.....
HFA4B_ORYSJ M.....E.....
HFA6A_ORYSJ M.DYSTVKQEEVEVVLD.....GEE
HFA6B_ORYSJ M.LKPQTPRARAAHFNSHMASSSSSSSLCRLLPRTTRRFSGGGEGGMAAAPVKRE
HFA4D_ORYSJ M.....E.SSNL.....GGG.....
HFC1A_ORYSJ .....MDGLHTEIALG
HFC1B_ORYSJ .....MMG..GECKVH
HFC2A_ORYSJ .....MTTT.....
HFC2B_ORYSJ .....MA.....
HFB2A_ORYSJ .....MA...SPAA.....
HFB4B_ORYSJ .....MAFLVERCG..EMVSMEMGPHG
HFB4D_ORYSJ RSTTTAAAVTA.....AP...APFLSKTYQLVDDPST
HFB2B_ORYSJ .....MA...DQTAA.AVVV.....
HFB2C_ORYSJ .....MA...EQGAG.EADA.....
HFB1_ORYSJ .....MA...AARA.AAVGKQOQK..G
HFB4C_ORYSJ .....MERC.G...SWSD...
HFB4A_ORYSJ .....ME.....WEESEAA

```

```

30 40 50
HFA1D_ARATH QPAAILSSN.....AP.....P...FFLSKTYDMVDDHNT
HFA1D_ORYSJ PPGAAYNSGV...ATAP.....P...FFLMTYEMVDDPAT
HFA2B_ORYSJ LEVVAGEDAAVAAGVA.....PRPMEGLHDAGP...PFFLTKTYDMVDDAGT
HFA2E_ORYSJ .....VANGQP.....PRPMDGLADGGP...PFFLTKTYDMVDDTTT
HFA2D_ORYSJ .....GEA.....PRPMEGLHEVGP...PFFLTKTYDLVADPAT
HFA2C_ORYSJ RQ...EDG...GAA...PRPMEGLHEVGP...PFFLTKTYDLVADPAT
HFA2A_ORYSJ AAAAAAGEGSPSSWAVGVM.....DLPRPMEGLGEAGP...PFFLCKTYEVVDDPAT
HFA9_ORYSJ DGGASTANGP...VVVK.....PSEVAPFFLTKTYDMVDDPAT
HFA3_ORYSJ .....DDGGGEPLQPAPFVSPDLQMLQPPRPLEALLQ.GP...QLPFFLSKTYDLVCEPEL
HFA5_ORYSJ ...AGGGGG.....GP...APFLTKTYEMVDDPAT
HFA4B_ORYSJ ...GGGGG.....SL...PFFLSKTYEMVDDPAT
HFA6A_ORYSJ EAAAAAAPVPLPAAAGVG.....AAV...AFVVKTYEMVDDPAT
HFA6B_ORYSJ VKPEAGEGWGGDLGVVP.....PPPRPMEGLGEAGP...AFVVKTYEMVDDPAT
HFA4D_ORYSJ ...GGGGG.....GP...PFFLTKTYEMVDDPAT
HFC1A_ORYSJ LIGCCGGDQG...QTA.....P...FVAKTYQMVDDPAT
HFC1B_ORYSJ QLQAAGDGGP...GAVA.....P...FVAKTFHMSVDDPAT
HFC2A_ORYSJ ..TAEGGGG...VA.....P...FVAKTYRMVDDPAT
HFC2B_ORYSJ ...AAAGGG...AA.....P...FVWKTYSMVDDPAT
HFB2A_ORYSJ .....G.....T...PFFLTKTYAMVDDPAT
HFB4B_ORYSJ GGG.AAAGKP.....V...PFFLTKTYQLVDDPAT
HFB4D_ORYSJ DDVVSWGDE...ATFVWRPPEFARDLLPNYFKHNFPSFVRLNTYGRKIVADRW
HFB2B_ORYSJ ...GGGAATMGEPPPPAPAAEAAGVGVGQQRTP...P...PFFLTKTYQLVDDPAT
HFB2C_ORYSJ ...GGG.....EPPPAAVMTAAEALAGQ..RSLP...PFFLTKTYQLVDDPAT
HFB1_ORYSJ GGGGGGGGGG.....P...APFLTKTNOMVEESAT
HFB4C_ORYSJ CEAAAAAQA.....V...P...PFFLTKTYQLVDDPAT
HFB4A_ORYSJ RQAAAAASASV.....V...P...PFFLTKTYQLVDDPAT

```

DNA Binding domain

```

60 70 80 90 100
HFA1D_ARATH DSIVSW...ANN...NSFIVVKPEPEFARDLLPKNFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA1D_ORYSJ DAVVSWG...PGN...NSFVVMNTPPEFARDLLPKYFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA2B_ORYSJ DAAVWS...ATS...NSFVVMDFHAFATVLLPRFFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA2E_ORYSJ DAVVWS...ATN...NSFVVMDFHLFGNVLLPRYFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA2D_ORYSJ DGVVSWG...RAG...SSFVVMDFHVFAAVFLPRFFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA2C_ORYSJ DGVVWS...RAG...NSFVVMDFHVFADLLPRLLFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA2A_ORYSJ DTVISWG...FAG...NSFVVMDFANAAVLLPRYFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA9_ORYSJ DNVISWA...EGG...NSFVVMDFSHAFERD.LHRFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVADRW
HFA3_ORYSJ DGVISWG...HAG...NSFVVMDFSAFARDVLPFFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVADRW
HFA5_ORYSJ DAVVWS...DASD...ASFVVMDFHPEAARLLPAYFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA4B_ORYSJ DAVVGMT...PAG...TSFVVMDFHPCERDLLPKYFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA6A_ORYSJ DAVVSWG...GAAR...NSFVVMDFHAAAGLLPLHFKHANFFSFFVRLNTYGRKIVSADRW
HFA6B_ORYSJ DAVVSWG...PGSG...ASFVVMDFHALAAGVLPFRFFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFA4D_ORYSJ NHVVSWG...PGG...ASFVVMDFLFSRDLLPKYFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFC1A_ORYSJ DALVRWG...RDN...NSFVVMDFPAAFSQLLLPCFKHGNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFC1B_ORYSJ NAVVRWG...GAG...NTFLVLDPAAFSDFLLPSYFKHRNFASFVRLNTYGRKIVDDRW
HFC2A_ORYSJ DGVIWAG...RDS...NSFVVMDFPAFASQTLPAHFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFC2B_ORYSJ DGVIWAG...KGN...NSFVVMDFPVFSQTLPAHFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFB2A_ORYSJ DEVISWNSG...TAEVVMDFPAEFARDLLPKHFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVADRW
HFB4B_ORYSJ DHIVSWGEDD...TFVVMDFPPEFARDLLPNYFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVADRW
HFB4D_ORYSJ EFANEFFRKGAKHLLSEIHRKSSSCSQPQ...PPPP...P.....MHQDY
HFB2B_ORYSJ DDVISWNSDGG...STFVVMDFPAEFARDLLPKYFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFB2C_ORYSJ DDVISWNEG...STFVVMDFPAEFARDLLPKYFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFB1_ORYSJ DEVISWGKEG...RSFVVMDFPVEFARDLLPKHFKCNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFB4C_ORYSJ DHIVSWGDD...RVSTFVVMDFPPEFARDLLPNYFKHNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW
HFB4A_ORYSJ DHVVSWGDDGGESA...SSFVVMDFPPEFARDLLPNYFKHSNFFSFFVRLNTYGRKIVDDRW

```

	110	120	130	
HFA1D_ARATH	EFANE	GFLRGQKHLL	QSTTRR	PA...H...GQ
HFA1D_ORYSJ	EFANE	GFLRGQKHLL	KTNRR	PT...H...GN
HFA2B_ORYSJ	EFANE	NFLRGQRHLL	KNIKRR	PPS...H...H
HFA2E_ORYSJ	EFANE	GFLRGQKHLL	KSIKRR	PPN...S...S
HFA2D_ORYSJ	EFANE	GFLRGQRHLL	KMKRR	PLS...Y...Y
HFA2C_ORYSJ	EFANE	GFLRGQRHLL	KTIKRR	PPS...N...N
HFA2A_ORYSJ	EFANE	GFLRGKKE	LKTIKRR	PPP...S...S
HFA9_ORYSJ	EWANE	GFLMGQKHLL	KTIKRR	KS...S...QE
HFA3_ORYSJ	EFAHE	DFLRHSKHL	LKKIVRR	SSP...T...T
HFA5_ORYSJ	EFANE	FLKQKHLL	KNIHRR	PTH...S...S
HFA4B_ORYSJ	EFANE	DFLKQRHLL	KNIHRR	KPF...S...S
HFA6A_ORYSJ	EFANE	DFLGGQRHLL	LANIRRR	RGA...G...G
HFA6B_ORYSJ	EFANE	AFLAGQKHLL	KNIKRR	VSK...P...P
HFA4D_ORYSJ	EFANE	DFLIRGHT	HLLKNIHRR	KPVH...S...S
HFC1A_ORYSJ	EFAHE	SFLRGQTHLL	PRVRR	KRR...GE...GG
HFC1B_ORYSJ	EFAHE	SFLRGQAQLL	PRVRR	KK...G...GA
HFC2A_ORYSJ	EFAHV	SFLRGQTHLL	RRIVRR	SS...S...S
HFC2B_ORYSJ	EFAHV	SFLRGQTHLL	RRIVRR	SSAAAGGGG...GG
HFB2A_ORYSJ	EFAH	SFLRGEKHL	LGGIQRR	KS...GT...GGAGAAPAGG
HFB4B_ORYSJ	EFANE	FFRKGAKHL	LAEIHR	RRKSS...QP...PFP...PHQP...YHHH
HFB4D_ORYSJ	EFANE	FFRKGAL	PLSFLS	PTTPSPVGA...FQEE...YCSSP
HFB2B_ORYSJ	EFAH	SFLRGER	RLLCEIHR	RRKVT...PPAPAA...TTAAVAAA
HFB2C_ORYSJ	EFAH	SFLRGER	KLLCDIHR	RRKVVA...PPSPGM...ATAAAVAVASGA
HFB1_ORYSJ	EFAH	SFLRGER	QGLLSGIHR	RRKAT...T...PQSSKCGSG
HFB4C_ORYSJ	EFANE	FFRKGEL	QLLTIHR	RRKTSAS...PSPP...FAPRH...AAGAFRRHG
HFB4A_ORYSJ	EFANE	FFRKGEL	QLLCEIHR	RRKSAAATW...PAPRH...AAGAFRRHG

	140	150
HFA1D_ARATHGGG	HQRSQHSNGQNSS...VSACVEV
HFA1D_ORYSJNQV	QQQLPA...AP...VPACVEV
HFA2B_ORYSJTASNQQ...SLGPLYEV
HFA2E_ORYSJSPSQQ...SLGSFLEV
HFA2D_ORYSJLPGSQQ...ALGTCLV
HFA2C_ORYSJAPPSQQ...QSLTSCLEV
HFA2A_ORYSJSPP	SSSSSSSSSQHQ...QPAACLEV
HFA9_ORYSJSPE	TQAPV...KTAP...GTENIEI
HFA3_ORYSJQQS	QLPGSS
HFA5_ORYSJHS	...HPP...GALPDN
HFA4B_ORYSJHSS	SHSQGA...GPLTDN
HFA6A_ORYSJTG	STTPRA...VNC
HFA6B_ORYSJLV	DSQLRNK...ASVVF
HFA4D_ORYSJHSL	QIN...GLAES
HFC1A_ORYSJGGG	GGASCSFGGGAGEH...QVAAAAASV
HFC1B_ORYSJAP	GCRELCE
HFC2A_ORYSJGGG	AKRKEEAGCG
HFC2B_ORYSJGGG	KRRDASADGG
HFB2A_ORYSJI	PTAFIS...TSGG...FAVSS...SP
HFB4B_ORYSJH	LNPFSLPPP...PAYHHHLIQEPA...TTAHTV
HFB4D_ORYSJ	ADY	AGGGD...AALSEDNRLRRNSLLSE...LAHMRKLYNDI
HFB2B_ORYSJI	PMALPVTTRDGSPLVSGEEQVSSSSP...EPPLVLPQAP
HFB2C_ORYSJ	VT...VAA	...APIPALPVT...RAGSPAHSSEEQVLSNSGSEHRQASGGSGAP
HFB1_ORYSJV	NVAFPPP...LPPLPEP...SATSSGND...RSSSSASP
HFB4C_ORYSJ	FV	GDDVVAAG...IGMP...PQHWREP...LPVA...TRLLALGGPA...PS...PSSA
HFB4A_ORYSJD	GML...HGRLGALVTTERRHWFESAALPVAPSSRLSLQGPV...IA...PARR

HR-A

HR-A/B domain

	160	170	180	190	200	210
HFA1D_ARATH	GKFG	.LEEVE	...R	LKDKNV	LMQELVR	LRQQQSTDNQLQTMVQR
HFA1D_ORYSJ	GKFG	.MEEIE	...M	LKDKNV	LMQELVR	LRQQQSTDDHQLQTLGKRL
HFA2B_ORYSJ	GHFG	.YDAEID	...R	LKDKQL	LMAEVVK	LRQEQQTKANKAMEDR
HFA2E_ORYSJ	GHFG	.YEGEID	...Q	LKDKHL	LMAEVVK	LRQEQQTKSGLQAMEQR
HFA2D_ORYSJ	GHFG	.LDEID	...R	LKDKNLL	LMAEVVK	LRHQQSTKANRAMEER
HFA2C_ORYSJ	GHFG	.FEEID	...R	LKDKNLL	LMAEVVK	LRQEQQTKDHVKAMEDR
HFA2A_ORYSJ	GHFG	.RDGVVN	...R	LQRDKSV	LMAEVVK	LRQEQQTRAQMAEER
HFA9_ORYSJ	GKYG	.GLEKEVE	...T	LKDKKAL	LMQQLVD	LRHYQNTSLEVNLIER
HFA3_ORYSJ	GESG	.LDPELN	...T	LRRKESAL	LQEVTR	LKQEHQTIEQMSLNR
HFA5_ORYSJ	ERAI	.FEDEIE	...R	LRSREKSN	LQADLWKS	KQQSGTMNQIEDLRR
HFA4B_ORYSJ	ERKD	.YEEIE	...R	LKSDNAL	LSELQNN	TLKLNMEKRMQALEEK
HFA6A_ORYSJ	GGGG	.GEGEVE	...R	LRRDKAAL	LARELAR	LRQQQEARAQLDMERR
HFA6B_ORYSJ	QPE	.APGEVV	...S	LKRDRAL	LRAEVIM	LKQYNACKSQLIAMEEM
HFA4D_ORYSJ	ERRE	.LEBEIN	...R	LKYEKSL	LVALQ	RQNNQQYVINWQMAEGR
HFC1A_ORYSJ	GMS	.GEDAAE	...D	LAKKAA	LFEVQR	LRHEQTAIGELARMSQR
HFC1B_ORYSJ	...E	GEVVRT	...I	...I	HEAVQR	LRBEORGMEEELQAMDQR
HFC2A_ORYSJ	...G	GGAAAAG	...D	...D	DESAV	VALVARLRREORETEGRVAAWRR
HFC2B_ORYSJ	...G	GG	...D	...D	EMTMV	ATEVVR
HFB2A_ORYSJ	PRGA	.AAGVSGAVAE	...L	EEENAR	LREENAR	LARE...LARARRCDVG
HFB4B_ORYSJ	GD	.GEGGDFL	...A	ALSEN	NRLRRRNSL	LLE...LAHMKKLYNDI
HFB4D_ORYSJ	IY	FLQNHV	...G	...G	...G	...EP...EP
HFB2B_ORYSJ	SG	SGSGGVAS	...G	VDENER	LRENAQLARE	...LSQMRKLCNNI
HFB2C_ORYSJ	GGGG	.GGSASG	...G	MDENER	LRENAQLARE	...LGHMKKLCNNI
HFB1_ORYSJ	PR	...AD	ITS	ENEQL	RKNQIT	LME...LARARRHCEEI
HFB4C_ORYSJ	EAGG	.AGRAATA	...A	VMENER	LRSNTAL	LQE...LAHMRKLYNDI
HFB4A_ORYSJ	AAT	.PEEAA	...L	MQENHR	LRLGNAL	LVE...LAHMRKLYSDI


```

                                350      360      370      380
HFA1D_ARATH  . . . . . NVSAAS . . EATENCIPSPDDLTL . . PDFTHMLPENNSEKPPES
HFA1_ORYSJ   E . . . . . VPNMSAVP . . SVPKAVAPGPTDINILEFPDLQDVAENVDIPGGG
HFA2B_ORYSJ  L . . . . . NEG . . LVG . . EENDNPVV . . . . . E . . . . . DMNV
HFA2E_ORYSJ  L . . . . . HEG . . GLD . . EDTRNPAI . . . . . DMNL
HFA2D_ORYSJ  L . . . . . NE . . GAR . . DDAGIPGM . . . . . ERRRPRVYDA
HFA2C_ORYSJ  L . . . . . VEDFTGKE . . EQSELDG . . . . . KIDGIDE
HFA2A_ORYSJ  L . . . . . SLG . . LE . . EKQREDGVAGGVQESNS . GGADVDNDEEDDDDDVDV
HFA9_ORYSJ   . . . . . GATC . . SANSQVVPSPAVATPMD . . . . . MQTSNVADTLGS
HFA3_ORYSJ   L . . . . . EIPPASGP . . RGDPDTIGRSKGNVLS . PGLDATSSEA . . DCLGS
HFA5_ORYSJ   T . . . . . LASC . . SM . . DVKSQLNANGT . TID . NPTEAATATMEKDDTIDR
HFA4B_ORYSJ  . . . . . SR . . DVAE2STSC . . . . . AE . SP . PIPQMHSRVDTRAK
HFA6A_ORYSJ  L . . . . . GEEQ . AE . . IDIEVDQLVASASAAAD . TASEAEFPWEEGEEVQE
HFA6B_ORYSJ  D . . . . . ALPETGME . . QEEKAGIGSFDVEEFVG . RPCGW . . . . . VDDCPY
HFA4D_ORYSJ  . . . . . ST . . ELTESPGF . . . . . VQ . SP . ELPMAEIREDIHVTR
HFC1A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC1B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC2A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC2B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB2A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB4B_ORYSJ  . . . . . LFAASCR . . . . . GEGDVKPFMLFGVAI . GGKRSREENGEDDEEEEE
HFA4D_ORYSJ  . . . . . LVEL . GPSTTERRRCAASPSGDND . . DDA . . . . . VRLFVGRLLDDH . . . . . GK
HFB2B_ORYSJ  . . . . . PAVLDLMPSCPGAASAAAP . VSDNEEGMMSAKLFGVSI . GRKRM . . . . . HDG .
HFB2C_ORYSJ  LPPAIDLMPSCPALATAAAAAGLAIDGEPDPSARLFGVSI . GLKRTRDDAAAAADBDG .
HFB1_ORYSJ   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB4C_ORYSJ  A . . . . . RKKPAANVLNNS . . . . . MQEDMRAAAGGV . . . . . GGQRTVQEHAREEKCVKL
HFB4A_ORYSJ  A . . . . . GGKAPASEVRGAS . . . . . GRSATSSSSLTVAEDQP .

                                390      400      410      420      430
HFA1D_ARATH  FMEPNLGGSSPLLDPLDIDSLDFDID . . . . . FPMDS . . . . . IDPVYGLLERLLMSSP
HFA1_ORYSJ   FEMPGPEGVFLSPEEG . . . . . DDSVPIETD . E . . . . . ILYNDTQKLPALIDSFWEQFLVASP
HFA2B_ORYSJ  LSEKMGYLNSNGPTA . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2E_ORYSJ  LSQKMGYLNSSTKS . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2D_ORYSJ  LAQKLGYLNSSTQK . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2C_ORYSJ  LAQQLGYLSSSTPK . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2A_ORYSJ  LVQSIYHLSFK . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA9_ORYSJ   SEEP . . . . . FADNSTLHEWD . DNDMQLLFDN . . . . . LDPILPPFENDGQMGPP
HFA3_ORYSJ   FSDNMGLSDSMLQT . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA5_ORYSJ   . . . . . SFDDNQKKSADSR . . . . . TADATP . RADARVASEAPAAPAAVNDKFWEQFLTRP
HFA4B_ORYSJ  . VSEIDVNSEPAVTE . . . . . TGP . SRDQ . . PAEPPAVTPGANDGFWQFLTEQP
HFA6A_ORYSJ  LVQQIDCLASPS . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA6B_ORYSJ  LVEPMQFVEH . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA4D_ORYSJ  YPTQADVNSEIA . SS . . . . . TDT . SQDG . . TSETEASHGP . TNDVFWERFLTETP
HFC1A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC1B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC2A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC2B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB2A_ORYSJ  EGADFDGDEDEVEEDDERERHAARR . . . . . VVREGKVRRTIETSLDLDVLAISVR . AAAA
HFB4B_ORYSJ  . . . . . LMELDSPHSPPPPPKTPATDGG . . . . . D . T . . . . . VKLFGVSL . . H . . . . . GR
HFB4D_ORYSJ  K . RRVQLVQEDEGDEQGGSEG . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB2B_ORYSJ  . GGDD . . . . . DHA . ATVKAEPMDGRPHG . . . . . KDEQSAETQAWPIRPRPVYQPIR . ACNGY
HFB2C_ORYSJ  . GGEDQAEHGGADVPEAADPHAGGGGGSSTEASPEHPWIYRPTPMYHAVRPTCNGP
HFB1_ORYSJ   FGVLLDDTHGAATKRKRACEAAAASE . . . . . RPKIMIRIGEPW . . . . . VSVP . . . . . SSGP
HFB4C_ORYSJ  . . . . . P . . . . . PPQQHLAGESGGEAGN . . . . . SSAARSSAPT KLFVHLSAAP . . . . . CGAG
HFB4A_ORYSJ  . . . . . TLLALRLPRTTEKINEVSGGGG . . . . . S . . . . . TKLFGVHLSADEQ . TSSGA

                                440      450      460      470      480
HFA1D_ARATH  V . P . . . . . DNMDSTPVDNETEQEQNGWDKTKHMDNLTQQMGLLSPETLDSLQRNP . . . .
HFA1_ORYSJ   L . SVDNDEVDSGVLDQKETQQGNGWTRAKENMANLTEQMGLLS . . . . . SHHTG . . . .
HFA2B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2E_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2D_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA2A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA9_ORYSJ   L . SV . . . . . QDYDFPQLEQDCLME . . . . . AQYNSNPNQYADVITEA . . . . .
HFA3_ORYSJ   QQAYGSLVSDPYLMEMANKPEKFWELDFQALDDGDLQDKCIDDPALQQQRGNMNS
HFA5_ORYSJ   G . CSETEEASSGLRDTDSREQMENRQAYDHSRNDREDVQLK . . . . .
HFA4B_ORYSJ  GSSDAHQEAQSERRDGGNKVDEMKSGDRQHLWGWKRNVEQITEKLGLLTSTEXT . . . .
HFA6A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFA6B_ORYSJ  RSCLDSESERQESPKDDVKA . . . . . ELGNGFHH . . . . . REKVDQITEQMGLHSAEQLHT
HFA4D_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC1A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC1B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC2A_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFC2B_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB2A_ORYSJ  A . . . . . RPPGASRDRKSSVS . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB4B_ORYSJ  K . KRAHRDDDDGVHDQGVSEV . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB4D_ORYSJ  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB2B_ORYSJ  EYDRAGSDQDGSNST . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB2C_ORYSJ  . . DRAGSDQDGSSSQTMGPGEF . . . . . DDLQKMMVVQSNFVMHWRSECGSGVRGFW
HFB1_ORYSJ   A . . . . . RCGGDN . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
HFB4C_ORYSJ  S . KRASPEEHPPTSPATKPRLV . . . . . LCCDLLSLTVAPSSSSQQQLSAASSPTSTS . .
HFB4A_ORYSJ  S . KRKRSPPQEPPTSPAPKRTL . . . . . VEHSEL . . . . . . . . . . . . . . . . .

```

Figure 4.S13 Sequence alignment of Heat shock proteins of *Oryza sativa* against *Arabidopsis thaliana* HsFA1d.

Multiple sequence alignment was constructed using full length sequences using BLAST. The alignment was depicted using Esript v.3. The AHA motif is highlighted in light pink. DNA binding domain (grey), HR-A region (blue), HR-B region (orange) and HR-A/B domain (pink) are indicated on the top of the alignment by continuous lines. The position of R181 in *Arabidopsis* HsFA1d is indicated with a pink arrow.

Table 4.S1 Accession numbers for CRY1 and the Heat Shock Factor proteins used in structural predictions. Proteins used in Yeast-two-hybrid and BiFC assays are respectively in bold and underline.

Class	HsFs	Accession Numbers	Length aa
Class A	HsFA1a	P41151	495
	HsFA1b	O81821	481
	HsFA1d	Q9LQM7	485
	<u>HsFA1e</u>	Q9SCW5	468
	HsFA2	O80982	345
	<u>HsFA3</u>	Q8GYY1	412
	HsFA4a	O49403	401
	HsFA4c	Q9FK72	345
	HsFA5	Q94BZ5	466
	HsFA6a	Q1PDN3	282
	HsFA6b	Q9LUH8	406
	HsFA7a	Q9SV12	272
	HsFA7b	Q9M1V5	282
	HsFA8	Q9S7U5	374
	HsFA9	Q9LVW2	331
Class B	HsFB1	Q96320	284
	HsFB2a	Q9SCW4	299
	<u>HsFB2b</u>	Q9T0D3	377
	HsFB3	O22230	244
	HsFB4	Q9C635	348
Class C	<u>HsFC1</u>	Q9LV52	330

<u>CRY1</u>	Q43125	681
--------------------	--------	-----

Table 4.S2 Protein annotation summary of *Oryza sativa* Heat shock Factor proteins used in alignments.

Class	HsFs	Accession Numbers	Length aa
Class A	HSFA1	Q84T61	506
	HSFA2C	Q338B0	358
	HSFA2E	Q6F388	357
	HSFA2B	Q6VBB2	372
	HSFA2A	Q84MN7	376
	HSFA2D	Q8H7Y6	359
	HSFA3	Q6H6Q7	498
	HSFA4B	Q94J16	440
	HSFA4D	Q93VB5	459
	HSFA5	Q6K6S5	475
	HSFA6A	Q5Z6A4	331
	HSFA6B	Q657C0	402
	HSFA9	Q10PR4	410
Class B	HSFB1	Q67TP9	302
	HSFB2C	Q652B0	454
	HSFB2A	Q7XRX3	305
	HSFB2B	Q6Z9C8	390
	HSFB4D	Q10KX8	305
	HSFB4B	Q7XHZ0	310
	HSFB4C	Q67U94	394
	HSFB4A	Q6Z9R8	380
Class C	HSFC1A	Q6VBA4	339
	HSFC1B	Q942D6	250
	HSFC2B	Q0DBL6	278
	HSFC2A	Q6EUG4	298

Table 4.S3 Information on the Heat shock proteins factor 3 used in alignments.

Groupe	Species	Accession Numbers
Monocotyledons	<i>Ananas comosus</i>	A0A199VJT9
	<i>Carex littledalei</i>	A0A833VEI7
	<i>Cocos nucifera</i>	A0A8K0HZE8
	<i>Dichantheium oligosanthes</i>	A0A1E5W589
	<i>Elaeis guineensis</i>	A0A6I9QQ63
	<i>Elaeis guineensis</i>	A0A6I9SBX5
	<i>Oryza sativa</i>	Q6H6Q7
	<i>Panicum miliaceum</i>	A0A3L6QHX9
	<i>Panicum miliaceum</i>	A0A3L6RPC4
	<i>Phoenix dactylifera</i>	A0A8B7MXU0
	<i>Phoenix dactylifera</i>	A0A8B8J036
	<i>Phoenix dactylifera</i>	A0A8B9A151
	<i>Striga hermonthica</i>	A0A9N7NDG0
	<i>Triticum turgidum</i>	A0A9R1R5G4
	<i>Triticum turgidum</i>	A0A9R1RKC3
<i>Triticum urartu</i>	M7Z7D6	
Groupe	Species	Accession Numbers
Dicotyledons	<i>Abrus precatorius</i>	A0A8B8MCE5
	<i>Actinidia chinensis</i>	A0A2R6RXZ9
	<i>Actinidia rufa</i>	A0A7J0E9W3
	<i>Actinidia rufa</i>	A0A7J0GJ34
	<i>Arabidopsis lyrata</i>	D7LWT0
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q8GYY1
	<i>Arachis duranensis</i>	A0A6P4CH48
	<i>Cajanus cajan</i>	A0A151U3C3
	<i>Cicer arietinum</i>	A0A1S2Y0Z5
	<i>Cinnamomum micranthum</i>	A0A3S3R997
	<i>Coffea arabica</i>	A0A6P6SIY6
	<i>Coffea arabica</i>	A0A6P6SUB3
	<i>Coffea arabica</i>	A0A6P6SUI0
	<i>Cucumis melo</i>	A0A1S3CP18
	<i>Cucumis melo</i>	A0A5A7TRT7
	<i>Cucurbita maxima</i>	A0A6J1IZ42
	<i>Cucurbita maxima</i>	A0A6J1L2Q9
	<i>Durio zibethinus</i>	A0A6P5Z4L7
<i>Durio zibethinus</i>	A0A6P6AQU4	

<i>Glycine soja</i>	A0A445FII6
<i>Glycine soja</i>	A0A445HGD5
<i>Glycine soja</i>	A0A445IIR9
<i>Glycine soja</i>	A0A445LE43
<i>Gossypium australe</i>	A0A5B6UBB9
<i>Gossypium hirsutum</i>	A0A1U8HR92
<i>Gossypium hirsutum</i>	A0A1U8I003
<i>Gossypium hirsutum</i>	A0A1U8JMF3
<i>Helianthus annuus</i>	A0A251SQY0
<i>Heracleum sosnowskyi</i>	A0AAD8IR43
<i>Heracleum sosnowskyi</i>	A0AAD8N1P8
<i>Herrania umbratica</i>	A0A6J1ARS9
<i>Herrania umbratica</i>	A0A6J1AST2
<i>Hibiscus syriacus</i>	A0A6A2YMK7
<i>Hibiscus trionum</i>	A0A9W7H4R4
<i>Hibiscus trionum</i>	A0A9W7MDF1
<i>Medicago truncatula</i>	A0A072U293
<i>Medicago truncatula</i>	A0A072VJU9
<i>Medicago truncatula</i>	A0A072VKE1
<i>Medicago truncatula</i>	A0A072VKS2
<i>Medicago truncatula</i>	A0A072VQ54
<i>Medicago truncatula</i>	G7ICS1
<i>Medicago truncatula</i>	G7J7P1
<i>Medicago truncatula</i>	G7JSS3
<i>Medicago truncatula</i>	G7KDN6
<i>Nelumbo nucifera</i>	A0A1U8BE46
<i>Nicotiana attenuata</i>	A0A1J6ILS5
<i>Nicotiana glauca</i>	A0A1U7VVI4
<i>Nicotiana tabacum</i>	A0A1S4AB66
<i>Nicotiana tabacum</i>	A0A1S4CCN0
<i>Olea europaea</i>	A0A8S0R3K0
<i>Olea europaea</i>	A0A8S0R6I6
<i>Olea europaea</i>	A0A8S0RUZ2
<i>Phtheirospermum japonicum</i>	A0A830BL07
<i>Populus alba</i>	A0A4U5QW19
<i>Populus euphratica</i>	A0AAJ6TSK1
<i>Prunus avium</i>	A0A6P5S6G0
<i>Prunus yedoensis</i>	A0A314XZ37

<i>Pyrus ussuriensis</i>	A0A5N5FX54
<i>Pyrus ussuriensis</i>	A0A5N5I7S5
<i>Raphanus sativus</i>	A0A6J0KBU9
<i>Rhodamnia argentea</i>	A0A8B8NI32
<i>Rhodamnia argentea</i>	A0A8B8NJ63
<i>Salix koriyanagi</i>	A0A9Q0V7V7
<i>Salix viminalis</i>	A0A9Q0V600
<i>Senna tora</i>	A0A834TB68
<i>Senna tora</i>	A0A834W3F2
<i>Sesamum alatum</i>	A0AAE2CEN4
<i>Sesamum alatum</i>	A0AAE2CS54
<i>Sesamum angolense</i>	A0AAE1WF34
<i>Sesamum angolense</i>	A0AAE1WMW8
<i>Sesamum indicum</i>	A0A6I9V1I9
<i>Sesamum indicum</i>	A0A8M8V3T8
<i>Solanum lycopersicum</i>	D1M7W9
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZS57
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZS59
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZS60
<i>Solanum tuberosum</i>	M0ZS62
<i>Spinacia oleracea</i>	A0A9R0HYF2
<i>Striga asiatica</i>	A0A5A7PM99
<i>Thalictrum thalictroides</i>	A0A7J6X7A5
<i>Trifolium pratense</i>	A0A2K3PKB2
<i>Tripterygium wilfordii</i>	A0A7J7CTT1
<i>Tripterygium wilfordii</i>	A0A7J7DNB0
<i>Tripterygium wilfordii</i>	A0A7J7DW00
<i>Vigna radiata</i>	A0A1S3UYB2
<i>Ziziphus jujuba</i>	A0A6P6FLJ7

Table 4.S4 Primers used in this study.

Primer for mutations		5'-3'
CRY1 PHR R211A	Fw	GCTGCAGCTTGGTCTCCTGGATGG
	Rv	CAAGCTGCAGCCAGAAGTGCATTGC
CRY1 PHR R211E	Fw	GCTGAGGCTTGGTCTCCTGGATGG
	Rv	CAAGCCTCAGCCAGAAGTGCATTGC
CRY1 PHR K332A	Fw	CTATTTGCGCCGCATGGAGGCAAGGCCGG
	Rv	CCATGCGGCGAAATAGTTCTCATCCACAGCC
CRY1 PHR K332E	Fw	CTATTTGCGAGGCATGGAGGCAAGGCCGG
	Rv	CCATGCCTCGAAATAGTTCTCATCCACAGCC
CRY1 PHR K335A	Fw	GGGCATGGCTTCCTGAAC
	Rv	CCATGCCCTTACGTATTCACC
CRY1 PHR K335E	Fw	GGGAATGGCTTCCTGAAC
	Rv	CCATTCCCTTACGTATTCAC
CRY1 PHR W352A	Fw	GTTAGCTGCTACTGGTTGG
	Rv	GTAGCAGCTAACTCTCTCATC
CRY1 PHR R435A	Fw	GGGCATGGCTTCCTGAAC
	Rv	CCATGCCCTTACGTATTCACC
CRY1 PHR R435E	Fw	GGGAATGGCTTCCTGAAC
	Rv	CCATTCCCTTACGTATTCAC
HsFA3 (Δ 160-220)	Fw	GCGCATGTGTTGAAGTTCCTCATTTTCTATCTCAATTC
	Rv	GAGATAGAAAATGAGGAACTTCAACACATGCGC
HsFA1e R126E	Fw	GTAGAGTTGAGGCAGCAAC
	Rv	CAACTCTACAAGTTCCTGC
HsFA3 (Δ 168-228)	Fw	CCAAAGCCAAGGGTCAAACCGGGTTTCTTGG
	Rv	CAAGAAACCCCGGTTTGACCCTTGGCTTGG
HsFA3 E173A	Fw	GATTGCGAAGCTGAGGAAAGAGCG
	Rv	CTTCGCAATCTCTCCTCCAACCTCAG
HsFA3 E173R	Fw	GATTCGTAAGCTGAGGAAAGAGCG
	Rv	CTTACGAATCTCTCCTCCAACCTCAG
HsFA3 K174A	Fw	GAGGCACTGAGGAAAGAGCG
	R	CAGTGCCTCAATCTCTCCTC
HsFA3 K177A	Fw	GGGCAGAGCGGCGTGCATTG
	Rv	CTCTGCCCTCAGCTTCTCAATC
HsFA3 E178A	Fw	GAAAGCTCGGCGTGCATTGATG
	Rv	CCGAGCTTTCCTCAGCTTC
HsFA3 E188A	Fw	GTTAGGCTTCAGCAGCAAAGC
	Rv	GAAGTGCAACCATTTCTCCTCC
HsFA3 E188R	Fw	GTTGCACTTCAGCAGCAAAGC

	Rv	GAAGCCTAACCATTTCCTCC
HsFB2b K249E	Fw	GATGACAGAGCTTAAAGGATTGTATGCGAATATC
	Rv	CTTTAAGCTCTGTCATCTCTTTCCTCAATCG
HsFC1 R129E	Fw	GATCGAAGAGTTAAAAGAAGAGCAGAGGGAG
	Rv	CTTTAACTCTTCGATCTCCCTCACAATC
Primer for pRSF vectors 5'-3'		
CRY1 PHR (1-508)	Fw	GAAGATCCGGACGGCGAAGAGGGATCC ATGCTGGTTCTGTATCTGG
	Rv	GGAATTCTTATCCTTGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCC
HsFA1a (1-495)	Fw	GAAGATCCGGACGGCGAAGAGGGATCC ATGGACGGTGTACCGGCGGAG
	Rv	CGGAGCTCGAATTCGGATCTCAGGATCCCTAGTGTCTGTTTCT GATGTGAGAGAC
HsFA1b (1- 481)	Fw	GAAGATCCGGACGGCGAAGAGGGATCC ATGGAATCGGTTCCCGAATC
	Rv	CTCGAATTCGGATCCTTGCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGAT CC
HsFA1d (1- 485)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCCATGGATGTGAGCA AAGTAACCACA
	Rv	GTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCAAGGATTTGCCTTGAG AGATC
HsFA1e (1-468)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCCATGGGAACGGTTTG CGAATCTGTAGCG
	Rv	GCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCATTCTGAGAGC ATCTGATGTGAGAAG
HsFA3 (1-412)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCCATGAGCCCAAAA AAGATGCTG
	Rv	GTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCCTAAGGATCATTATTGGC GTATT
HsFA4c (1-345)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCCATGGATGAAAATA ATGGAGGTTCA
	Rv	GTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCAAGAAGCTTTCTCTGTA ATGTT
HsFA6a (1- 282)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCCATGGATTATAACCT TCCAATTCCA
	Rv	GTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTTATATAAAATGTTCCACT AAATC
HsFA6b (1-282)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCCATGGATCCTTCATT TAGGTTTCATT
	Rv	GTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTTAATTAGTGTGTGAACTA GAACC
HsFA7a (1-272)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCC ATGATGAACCCGTTTCTCCCGGAAGG
	Rv	GCTTGTCGACGGAGCTCGAATTCGGATCC TTAGGAGGTGGAAGCCAACTCTCATCACTAAG
HsFA9 (1-331)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGATTTCCAGGGATCC ATGACGGCAATTCCAAACGTCGTCG

	Rv	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCGGATCC CTACTCTATCTCTATCCTCCCATTACATCC
HsFB2b (1-377)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGATCC ATGCCGGGGGAACAAACCGGAG
	Rv	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCGGATCC TCATTTTCCGAGTTCAAGCCACGACCC
HsFB3 (1-244)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGATCC ATGGAAGATGCTGGTGAACATTTACGGTG
	Rv	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCGGATCC TCATTCAAGTTTTACTCCGAACAACCTTAAGCC
HsFC1 (1-330)	Fw	GGTACCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGATCC ATGGAGGACGACAATAGTAACAACAACAAC
	Rv	GCTTGTGACGGAGCTCGAATTCGGATCC CTAAAAGCCACCTCGAAACAGAGAAAATGG
Primer for Bimolecular Fluorescence assays 5'-3'		
CRY1 (1-508)-nYFP	Fw	CGCCCTTGCTCACCATGCCGCCGCCGCTCCTTCTTCGGATCCGT TC
	Rv	GCCCTTGCTCACCATGCCGCCGCCGCTCCTTCTTCGGATCCGT CTC
HsFA1d-cYFP	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGGATGTGAGCAAAGTAACCAC CTTCTGCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCAGGATTTGCCTTG
	Rv	AGAGATC
HsFA1e -cYFP	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGGGAACGGTTTGCGAATC CTGCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCGCTTTTCTGAGAGCATCTG
	Rv	ATGTGAG
HsFA3-cYFP	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGACTCTTGACCCGGTCATC CTGCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCAGGATCATTATTGGCG
	Rv	TATTATC
HsFB2b-cYFP	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGCCGGGGGAACAAACC CTTCTGCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCGCTTTTCCGAGTTCAA
	Rv	GCCACG
HsFC1-cYFP	Fw	CCATTTACGAACGATAGCCATGGAGGACGACAATAGTAACAAC CTTCTGCTTGTCGGCCATGCCGCCGCCAAAGCCACCTCGAA
	Rv	ACAG
Primer for Yeast-two-hybrid * 5'-3'		
pGADT7	Fw	CCAGATTACGCTCATATAGGTACCGAAAACCTTGTATTTCC GTATCTACGATTCATCTGCAGCTCGAGTGCGGCC
	Rv	GTATCTACGATTCATCTGCAGCTCGAGTGCGGCC
pGBKT7	Fw	CTCAGAGGAGGACCTGCATGGTACCGAAAACCTTGTATTTCC GCTGCAGGTCGACGGAACCCCTCGAGTGCGGCCG
	Rv	GCTGCAGGTCGACGGAACCCCTCGAGTGCGGCCG

*All Yeast-two-Hybrid construction were amplified from the pRSF vector and cloned into Y2H vectors

Table 4.S5 Stability Change ($\Delta\Delta G$) according to mCSM prediction.

Positive $\Delta\Delta G$ values ($\Delta\Delta G > 0$) indicate stabilizing mutations, whereas negative values ($\Delta\Delta G < 0$) correspond to destabilizing effects. ($> +2$: Strongly stabilizing; $+2.0$ to $+0.5$: Moderately stabilizing; -0.5 to $+0.5$: Neutral; -0.5 to -2.0 : Moderately destabilizing; < -2.0 : Strongly destabilizing) The predicted change in protein stability ($\Delta\Delta G$, kcal·mol⁻¹) is computed as the difference between mutant and wild-type folding free energies. Small absolute $\Delta\Delta G$ values ($|\Delta\Delta G| < 0.5$ kcal·mol⁻¹) are generally considered neutral or within the prediction error.

Proteins	Mutation	$\Delta\Delta G$, kcal·mol ⁻¹
HsFA1e	R162E	-0.047
HsFA3	E173A	-0.914
	E173R	0.074
	K174A	-0.435
	K177A	-0.296
	E178A	-0.861
	E188A	-0.541
	E188R	-0.969
HsFB2b	K249E	0.251
HsFC1	R129E	0.103
CRY1 (PDB : 1U3C)	R211A	0.002
	R211E	-0.156
	K332A	-0.434
	K332E	0.026
	R335A	-2.124
	R335E	-1.57
	W352A	-1.203
	R435A	-1.217
	R435E	-0.193

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Débutée en 2019, cette thèse s'inscrit dans une période charnière marquée, à partir de 2021 par l'avènement d'AlphaFold, qui a profondément révolutionné la vitesse d'acquisition de structures protéiques, permettant d'approfondir la compréhension tridimensionnelle des interactions protéines-protéines ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'étude des voies impliquées dans la croissance et la réponse au stress de hautes températures.

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, les prédictions d'AlphaFold ont mis en évidence une forte conservation de l'architecture tridimensionnelle de la protéine SLY1 à travers différentes espèces cultivées (Figure 2.S1). Cette structure canonique est composée de sept hélices α (Figure 2.1D et 2.S1) comprenant les motifs hautement conservés GGF et LSL (Figure 2.1C, 2.1D, 2.1G et 2.1H) qui ont historiquement permis d'identifier le rôle de la protéine dans la voie des gibbérellines (Fu *et al.*, 2004). Nos résultats mettent en évidence que trois hélices α forment le motif F-box en N-terminal (Figure 2.1D) responsable de l'interaction avec ASK1 (Fu *et al.*, 2004). Une hélice centrale (hélice α 4) adjacente au motif F-box agit comme une colonne vertébrale de la structure, et 3 hélices α additionnelles situées dans la région C-terminale se compactent les unes contre les autres et participent à la reconnaissance des protéines DELLA (Figure 2.1D). Avant la détermination récente de la structure d'AtSLY1 par cryo-microscopie électronique (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025), nos modèles obtenus par AlphaFold v.2 nous ont permis de revenir sur la contribution obligatoire de sa co-expression avec son partenaire ASK1 pour augmenter sa solubilité *in vitro* (Li *et al.*, 2017). Notre analyse structurale a aussi permis d'identifier les régions critiques des deux protéines qui compliquent leur expression dans un système hétérologue bactérien. Les profils d'hydrophobicité d'AtASK1 et d'AtSLY1, obtenus par les analyses de Kyte et Doolittle (Figure 2.1A et 2.1B), indiquent que l'extrémité C-terminale d'ASK1 essentielle à l'interaction et la stabilisation des motifs F-box (Kim *et al.*, 2020) présente une surface hydrophobe critique accessible au solvant autour de l'hélice α 5 (pic 100) (Figure 2.1A). Le profil d'hydrophobicité de SLY1 révèle quant à lui, une face hydrophobe du motif F-box et une région C-terminale hydrophobe avec deux pics majoritaires au niveau du motif GGF à proximité de l'hélice α 5 ainsi que du motif LSL de l'hélice α 7 (Figure 2.1B et Figure 2.S2). Bien que ASK1 camoufle en partie la surface du motif F-box hydrophobe d'AtSLY1 (Figure 2.1E), le reste de la protéine expose toujours la majorité de sa surface au solvant, suggérant que les surfaces GGF et LSL forment ensemble la principale surface hydrophobe exposée qui compromet la stabilité et la solubilité du complexe ASK1/SLY1 (Figure 2.1F).

Dans le but de produire un complexe ASK1/SLY1 soluble et stable *in vitro*, les deux protéines ont été coexprimées chez *E. coli*. Cependant, les profils d'élution obtenus par chromatographie d'exclusion de taille indiquent une dissociation du complexe lors de la purification (Figure 2.S5). Afin d'éviter leur dissociation, ASK1 et SLY1 ont été fusionnées physiquement par un espaceur glycine-sérine. Cette stratégie a conduit, en chromatographie d'exclusion stérique, à un profil d'élution compatible avec la présence de populations oligomériques (Figure 2.S6B et 2.S6C), suggérant la formation d'assemblages croisés impliquant à la fois des molécules d'ASK1 et des molécules de SLY1 issues de monomères distincts de la protéine de fusion (Figure 2.S8). ASK1 semble également pouvoir contribuer à la formation de ces structures par homodimérisation. Des travaux antérieurs ont montré que l'orthologue DdSKPA1 d'AtASK1 est capable de former des dimères stables à forte concentration *in vitro* (Figure 2.S9) (Kim et al., 2020). Ces dimères reposent sur la mobilisation de la surface hydrophobe de l'hélice $\alpha 5$ (pic 100) des protéines SKP engagées dans le recrutement du motif F-box (Figure 2.S9). L'alignement comparatif entre les séquences de DdSKPA1 et d'AtASK1 (Figure 2.S9C), ainsi que la prédiction des dimères d'AtASK1 modélisés par AlphaFold que nous avons réalisé (Figure 2.S10), révèlent une forte conservation des résidus entre les espèces, suggérant un comportement similaire chez les protéines ASK d'*Arabidopsis thaliana*. Par ailleurs, nous avons émis l'hypothèse selon quoi SLY1 serait également capable de contribuer à l'oligomérisation par formation d'homodimère de SLY1. Le modèle structural de dimères d'AtSLY1 en complexe avec ASK1 présenté dans le chapitre 2 (Figure 2.2A-B) met en évidence des interfaces compatibles avec une interaction entre deux monomères de SLY1 impliquant son hélice $\alpha 5$. La flexibilité d'hélice $\alpha 7$ de la version ancestrale de SLY1 chez *Marchantia polymorpha* (Ji et al., 2023) nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle le décompactage de la structure expose plus facilement l'hélice $\alpha 5$ (Figure 2.S13) où les déterminants moléculaires du pic GGF sont enfouis (Figure 2.S13A, 2.S13C et 2.2A) menant à la formation de dimères centrés sur l'hélice $\alpha 5$ (Figure 2.2A). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les états oligomériques de la protéine fusionnée ASK1-SLY1 sont compatibles avec des mécanismes ancestraux de régulation de l'activité des sous unités des SCF, analogues à ceux proposés pour la dimérisation de DdSKP1 (Li et al., 2017). Cette régulation impliquerait un masquage des interfaces d'interaction en absence de gibbérelline afin de contribuer au contrôle de l'activité de la machinerie d'Ubiquitination.

Notre analyse de la structure prédite de SLY1 nous permet d'identifier l'hélice $\alpha 5$ comme centrale à la stabilisation et la compaction des hélices $\alpha 6$ et $\alpha 7$ grâce à ces résidus hydrophobes enfouis (Figure 2.2A). Nos résultats suggèrent que la protéine SLY1 tronquée de l'hélice $\alpha 7$ garde ainsi une certaine capacité à la reconnaissance des protéines DELLA *in vivo* (Figure 2.2C-D). L'hélice $\alpha 5$ jouerait un rôle de colle moléculaire permettant d'interagir avec DELLA par les déterminants hydrophobes du pic GGF (Figure 2.2E-F). Néanmoins, une délétion équivalente chez le riz n'a pas permis de maintenir un phénotype sauvage

(Gomi *et al.*, 2004), même si l'interaction entre SLY1/DELLA a lieu comme le montre nos résultats (Figure 2.2D), la déletion de l'hélice $\alpha 7$ de la structure de SLY1 impacte la configuration du substrat dans le complexe SCF^{SLY1}/DELLA/GID1(GA) (Figure 2.2G). DELLA ne se retrouve plus dans une configuration permettant l'ubiquitination de la lysine cible et donc sa dégradation, ce qui serait une possible hypothèse de la provenance du phénotype nain observé chez de tels mutants. Ces données nous ont motivé à reconstituer *in silico* le complexe complet de la machinerie d'ubiquitination, pour explorer l'organisation spatiale des unités du complexe SCF^{SLY1}/DELLA/GID1(GA). Cette approche, absente du chapitre 2, est développée ici afin de compléter notre compréhension globale du mécanisme structural. Nous avons été en mesure de modéliser la structure du SCF^{SLY1}/RGA/GID1(GA) complète par l'alignement des structures élucidées ASK1/SLY1/RGA/GID1(GA) de *Arabidopsis thaliana* (Islam *et al.*, 2025) et SKP1/CUL1/RBX1/E2/Ub* d'*Homo sapiens* (Baek *et al.*, 2020) sur le module SKP/F-box hautement conservé entre les espèces (Figure 5.1).

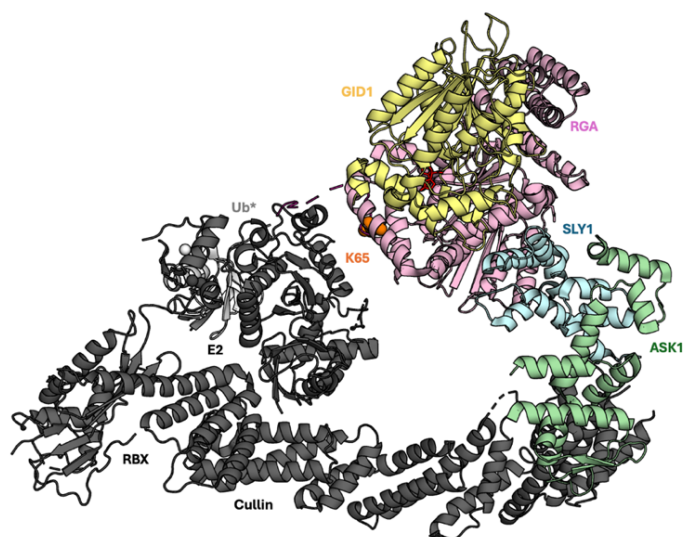


Figure 5.1 Organisation structurale du complexe SCFSLY1/DELLA/GID1(GA).

Représentation tridimensionnelle du complexe SCF/SLY1, obtenue par alignement structurale des modules ASK1/Fbox des complexes SKP1/CUL1/RBX1/E2/Ub* d'*Homo sapiens* (PDB 6TTU) et ASK1/SLY1/RGA/GID1(GA) d'*Arabidopsis thaliana* (PDB 9O4K) afin de reconstruire l'architecture complète du complexe. ASK1 est coloré en vert, SLY1 en bleu, DELLA en rose, GID1 en jaune, la Gibbérelline en rouge, la lysine K65 ciblée est représentée en sphères orange. Les autres composantes du SCF, (Cullin, RBX, E2) sont en gris foncé. L'ubiquitine chargée (Ub*) est en gris clair en arrière gauche de la structure. L'attaque nucléophile menant au transfert de l'ubiquitine activée vers la lysine cible de DELLA est représenté en magenta.

Cet alignement positionne la E2 chargée dans une orientation compatible avec un transfert direct de l'ubiquitine vers la lysine 65 du domaine DELLA de RGA. Bien que le site d'Ubiquitination n'ait à ce jour pas encore été identifié, la K65 de la protéine DELLA RGA fait partie d'un motif canonique de sumoylation

conservée chez les protéines DELLA (Figure A.1). La sumoylation de ce résidu augmente la stabilité des protéines RGA *in vitro* (Conti *et al.*, 2014) et pourrait agir comme un mécanisme protecteur, bloquant physiquement l'accès de la machinerie à la lysine cible, stabilisant la protéine DELLA et inhibant la croissance.

En complément des résultats présentés dans le chapitre 2, nous rapportons également de nouvelles données quantitatives préliminaires rendues possibles par la mise en place d'une stratégie de purification dénaturante qui permet d'éviter la formation d'oligomères de la fusion ASK1-SLY1. Cette stratégie consiste essentiellement en l'ajout de guanidine 6 M dans les tampons de lyse et de chromatographie d'affinité pour récupérer un maximum de protéines exprimées. L'éluât final est ensuite dialysé jusqu'à complète élimination de la guanidine (Palmer et Wingfield, 2012), ce qui favorise un repliement lent avant une dernière étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille (Figure A.2). RGL1 a également été produite de manière recombinante selon un protocole de purification détaillé en annexe (Figure A.3) afin de quantifier par résonance des plasmons de surface l'affinité entre la protéine ASK1-SLY1 fusionnée et RGL1.

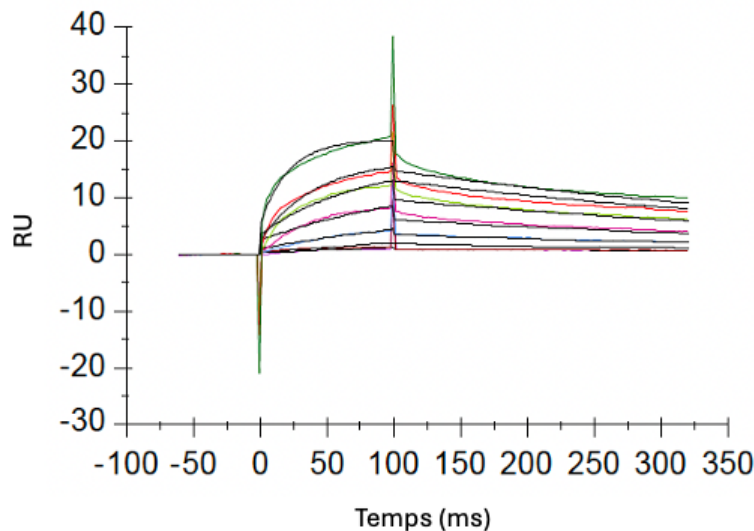


Figure 5.2 Analyse de l'interaction entre ASK1-SLY1 et RGL1 par résonance des plasmons de surface.

Sensogramme représentant l'interaction entre la protéine fusionnée ASK1-SLY1 immobilisée sur la puce et l'analyte RGL1. Les constantes cinétiques d'association k_a : 8922, k_d : 0,002232 et KD : $2,5 \times 10^{-7}$ ont été déterminées par ajustement des courbes expérimentales selon le modèle Langmuir 1 :1.

Nos résultats suggèrent premièrement que les protéines recombinantes fusionnées ASK1-SLY1 sont actives après renaturation, et présentent une affinité pour RGL1 sauvage (KD $2,5 \times 10^{-7}$) (Figure 5.2). Bien que ces données soient prometteuses, les purifications de SLY1 et DELLA sont contraignantes, les résultats sont difficilement répétables et obtenus en $n=1$. Nous avons ré-évalué la stratégie d'expression hétérologue

native de la co-expression de SLY1 dans le chapitre 2. L'ajout d'étiquette de solubilité de type maltose binding protéine (MBP) connue pour augmenter d'avantage la solubilité (Costa *et al.*, 2014) a permis de compenser la faible solubilité de la protéine (Figure 2.3). Nos résultats suggèrent que la co-expression d'ASK1 a permis de stabiliser la région N-terminale de SLY1, tandis que l'ajout d'une étiquette MBP sur l'un ou l'autre des partenaires, a contribué à améliorer la solubilité globale du complexe (Figure 2.3). Cependant, la validation de l'activité des protéines provenant de cette stratégie d'expression et purification n'a jamais pu être réalisée car l'appareil de résonance des plasmons de surfaces était fréquemment hors d'usage.

Dans la continuité de ce travail, les stratégies d'expression et de purification *in vitro* des protéines SLY1 et RGL1 fournissent le matériel pour caractériser leur interaction. Cette caractérisation se fera à l'aide d'approches biophysiques quantitatives nécessitant de faibles quantités de protéines, telles que la résonance des plasmons de surface ou la polarisation de fluorescence. Les données obtenues permettront d'informer sur la stabilité et la dynamique du complexe, ouvrant la voie à la conception rationnelle de nouveaux mutants gain de fonction, dont l'impact pourra ensuite être évalué *in planta*, notamment chez des espèces céréalières telles que *Oryza sativa*, *Zea mays* et *Triticum aestivum*.

Dans le troisième chapitre de cette thèse, AlphaFold nous a permis de mettre en évidence le comportement oligomérique du domaine PHR du cryptochrome CRY1. Notre modèle suggère que CRY1 forme des tétramères selon les interfaces « Head to Head » et « Head-to-Toe » (Figure 3.1D), un comportement similaire à celui identifié sur la structure tridimensionnelle élucidée par cryo-EM du tétramère de CRY2 (Shao *et al.*, 2020). Nos analyses des alignements de séquence de CRY1 et CRY2 (Figure 3.S1) ainsi que les alignements de structure des tétramères des deux cryptochromes (Figure 3.1D) ont permis d'identifier des résidus sur les deux interfaces qui semblent responsables de ce comportement oligomérique (Table 3.S3 et Figure 3.2A-C). Parmi eux, nous avons retrouvé les résidus W352 et R442 localisés à l'interface H-T du domaine PHR de CRY1 (Figure 3.2C) analogues aux résidus W339 et R439 précédemment identifiés comme responsable de la formation du tétramère actif de CRY2 *via* l'interface H-T (Shao *et al.*, 2020). Des expériences de double hybride chez la levure couplées à une mesure de l'expression du gène rapporteur de la β -galactosidase suggèrent que les substitutions W352A et R442A chez CRY1 compromettent la stabilité du tétramère (Figure 3.2D). En revanche, la substitution W377A augmente l'oligomérisation de CRY1 (Figure 3.2D), un résultat cohérent avec la mutation analogue CRY2^{W374} identifié comme capable de favoriser un état photo activé de CRY2 plus encline à former des dimères H-T. Ensemble, nos résultats suggèrent un mécanisme d'oligomérisation conservé entre les cryptochromes d'*Arabidopsis thaliana*. Il est important toutefois de souligner que ce comportement est démontré uniquement pour une forme tronquée

de CRY1 dépourvue de la queue C-terminale, l'analogie proposée avec le comportement de CRY2 doit donc être interprétée avec prudence.

AtCRY1 se distingue de AtCRY2 par la présence d'une longue queue C-terminale intrinsèquement désordonnée dont la taille varie chez la majorité des CRY1 orthologues (Brautigam *et al.*, 2004; Parico et Partch, 2020; Shao *et al.*, 2020). La nature désordonnée de cette région ne permet pas de prédire sa position relative par rapport au domaine PHR avec AlphaFold (Figure 3.1B). Néanmoins la structure élucidée de CRY1 de *Drosophila melanogaster* avait permis d'identifier un mécanisme selon lequel la CTT s'ordonne en une 22^e hélice α qui s'arrime sur la poche de fixation du FAD (Figure 3.3B) (Czarna *et al.*, 2013; Parico et Partch, 2020). Une analyse structurale non exhaustive absente du chapitre 3 de structures de CRY1 prédites par AlphaFold, est développée ici afin de généraliser le modèle du mécanisme de positionnement de la CTT sur le domaine PHR. Cette recherche a mené à l'acquisition de modèles AlphaFold des protéines CRY1 des champignons *Gibberella subglutinans* et *Beauveria bassiana*, chez qui la CTT semble s'ordonner en une 22^e hélice α qui se loge cette fois-ci sur la face opposée à la cavité du FAD (Figure 5.3). Un alignement structural réalisé sur les protéines CRY1 de la *Drosophila*, *Gibberella*, *Beauveria* avec le complexe élucidé MmCRY1-HsPER2 (PDB 6OF7) suggère que la protéine PER2 compétitionne directement avec les déterminants moléculaires qui autorisent ces deux positionnements alternatifs de la CTT sur le domaine PHR (Figure 5.3). Ces données sont cohérentes avec celles mesurées par polarisation de fluorescence qui montrent la compétition *in vitro* entre PER2 et la CTT de CRY1 (Parico *et al.*, 2020). Nos résultats provenant de l'analyse comparative des séquences des CTT de *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* et *Arabidopsis thaliana* présentés dans le chapitre 3 (Figure 3.3A) et élargis aux espèces *Gibberella subglutinans* et *Beauveria bassiana* dans le cadre de cette discussion de thèse (Figure 5.4) indiquent une conservation partielle des déterminants moléculaires qui permettent l'arrimage de l'hélice α_{22} sur le domaine PHR de *Drosophila* chez *Arabidopsis*.

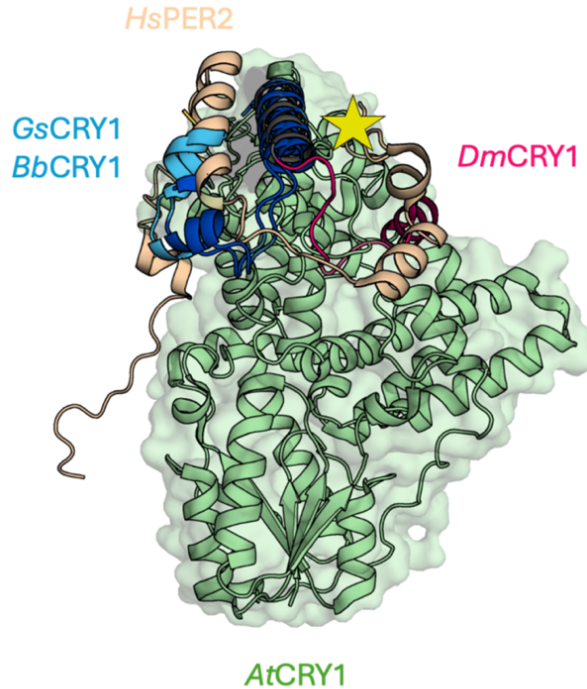


Figure 5.3 Positionnement alternatif de la queue C-terminale de CRY1 sur le domaine PHR.

Représentation structurale du domaine PHR de AtCRY1 (PDB 1U3C), mettant en évidence les différences de positionnement des hélices $\alpha 22$ de *Gibberella subglutinans*, *Beauveria bassiana* coloré en fonction des valeurs de pLDTT attribué par la modélisation AF et *Drosophila melanogaster* (PDB 4K03) en rose. La dernière hélice du domaine PHR est indiquée par une étoile jaune. La position de PER2 humain, issue du complexe MmCRY1-HsPER2 (PDB 6OF7), est alignée sur AtCRY1.

À l'inverse, les 3 SliM identifiés comme hautement conservés au sein des CTT de plantes (Wang et Lin, 2025), sont absentes chez les autres espèces de notre alignement (Figure 5.4). Ces résultats suggèrent alors l'absence des déterminants moléculaires menant à la conservation d'un mécanisme de positionnement de la CTT sur le domaine PHR. Néanmoins, la nature des SliM et la grande diversité de ces motifs prédits sur les CTT modifient cette perspective (Wang et Lin, 2025), indiquant qu'un nombre restreint de résidus conservés, peut suffire à moduler un comportement mécanistique de la CTT vis-à-vis du domaine PHR.



Figure 5.4 Alignement comparatif des séquences des queues C-terminales de cryptochromes.

Cet alignement met en évidence la divergence marquée des déterminants moléculaires associés aux hélices $\alpha 22$ (*Gibberella subglutinans*, *Beauveria bassiana* coloré en bleu et *Drosophila melanogaster* en rose) dont la différence de positionnement par rapport au domaine PHR a été observée dans la (Figure 10). Les courts motifs linéaires (SLiM) d'*Arabidopsis* sont indiqués par des encadrés.

Avant de confronter les résultats du chapitre 3 à des données complémentaires non présentées dans le dit chapitre, un bref rappel de la structure du complexe AtCRY2/AtBIC2 d'*Arabidopsis* s'impose afin d'offrir un cadre structural de référence pour l'interprétation des analyses. La protéine BLUE LIGHT INHIBITOR 2 (BIC2) s'insère transversalement sur le domaine PHR de CRY2 au niveau de l'interface H-T devant le résidu W349 et à proximité de R439 afin de moduler l'état oligomérique des protéines CRY (Just *et al.*, 2025; Ma *et al.*, 2020; Palayam *et al.*, 2021). L'alignement structural du complexe AtCRY2/AtBIC2 avec la structure élucidée du cryptochrome de la mouche présente dans le chapitre 3 (Figure 3.S3) ainsi qu'avec les structures prédites des champignons présentés dans cette section comme nouvelles données complémentaires (Figure 5.5), montrent une proximité entre les hélices $\alpha 22$ des CRY et BIC2. Cette proximité des éléments structuraux permet de spéculer sur un mode de positionnement de la CTT le long du sillon transversal vers le résidu W352 de l'interface H-T. Selon ce modèle que nous proposons, la CTT d'AtCRY1 pourrait alors agir comme un capuchon moléculaire, qui camoufle les résidus W352 et R442 (Figure 5.6).

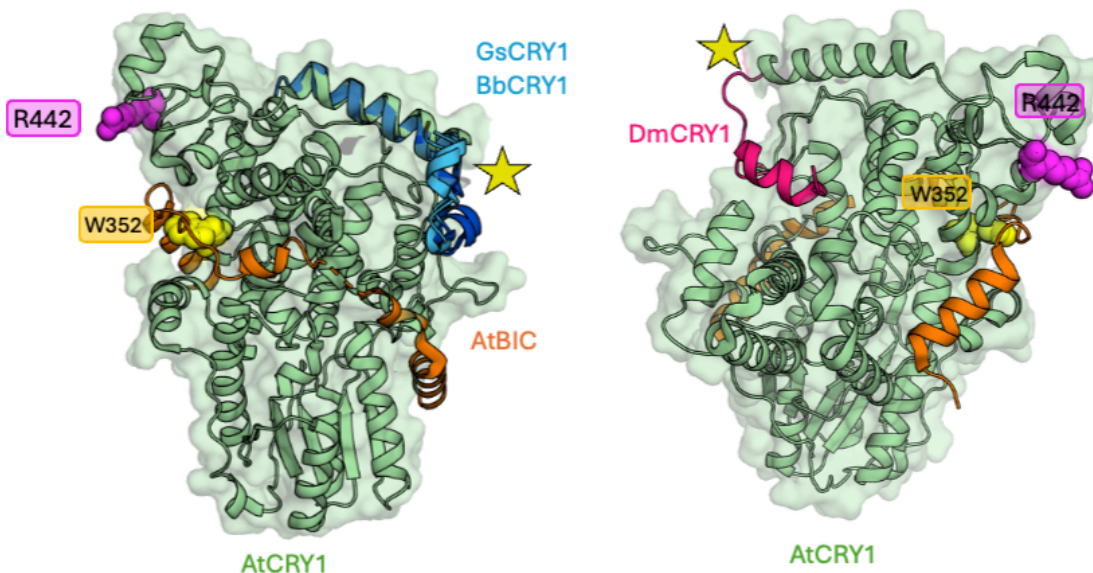


Figure 5.5 Proximité de l'hélices $\alpha 22$ de CRY1 avec BIC2.

Représentation structurale du domaine PHR de AtCRY1 (PDB 1U3C), mettant en évidence les différences de positionnement des hélices $\alpha 22$, à gauche de *Gibberella subglutinans*, *Beauveria bassiana* (coloré en fonction des valeurs de pLDTT attribué par modélisation AlphaFold) et à droite de *Drosophila melanogaster* (PDB 4K03) (coloré en rose). La dernière hélice du domaine PHR est indiquée par une étoile jaune. La position de BIC2, issue du complexe AtCRY2-AtBIC2 (PDB 6K8K), est alignée sur AtCRY1, BIC2 passe de manière transversale au PHR devant le résidu W352. Cet alignement illustre la proximité entre l'hélices $\alpha 22$ de CRY1 et BIC2 laissant imaginer à un emplacement pour le reste de la CTT.

À cela s'ajoute nos résultats de prédictions structurales du complexe CRY1/HsFA1d présentés dans le chapitre 3 qui semblent indiquer une compétition du trimère de HsFA1d pour l'interface H-T au niveau du résidu W352 de CRY1 (Figure 3.4A). Les substitutions en alanine des résidus W352A et R442A augmentent significativement l'affinité de HsFA1d pour CRY1 dans des tests de double hybride chez la levure présentés dans le chapitre 3 (Figure 3.4B). Nos résultats suggèrent donc une compétition au niveau des résidus W352 et R442 pour l'arrimage de la CTT, pour la formation de dimères actifs de CRY1 et l'interaction avec les facteurs de choc thermiques HsfA1d. Nous proposons un modèle selon lequel ces mutations pourraient donc défavoriser les oligomères H-T ou bien relâcher la contrainte exercée par la CTT sur le domaine PHR, exposant l'interface H-T dans les deux cas. Plusieurs observations structurales chez les cryptochromes d'organismes photosynthétiques renforcent ce modèle selon lequel, la photo-activation du FAD mène à la dissociation de la CTT sur la région α/β en N-terminale ce qui favorise la formation de dimère H-H et conduit à la formation d'interaction avec les facteurs de transcription *via* l'interface H-T (Goett-Zink *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

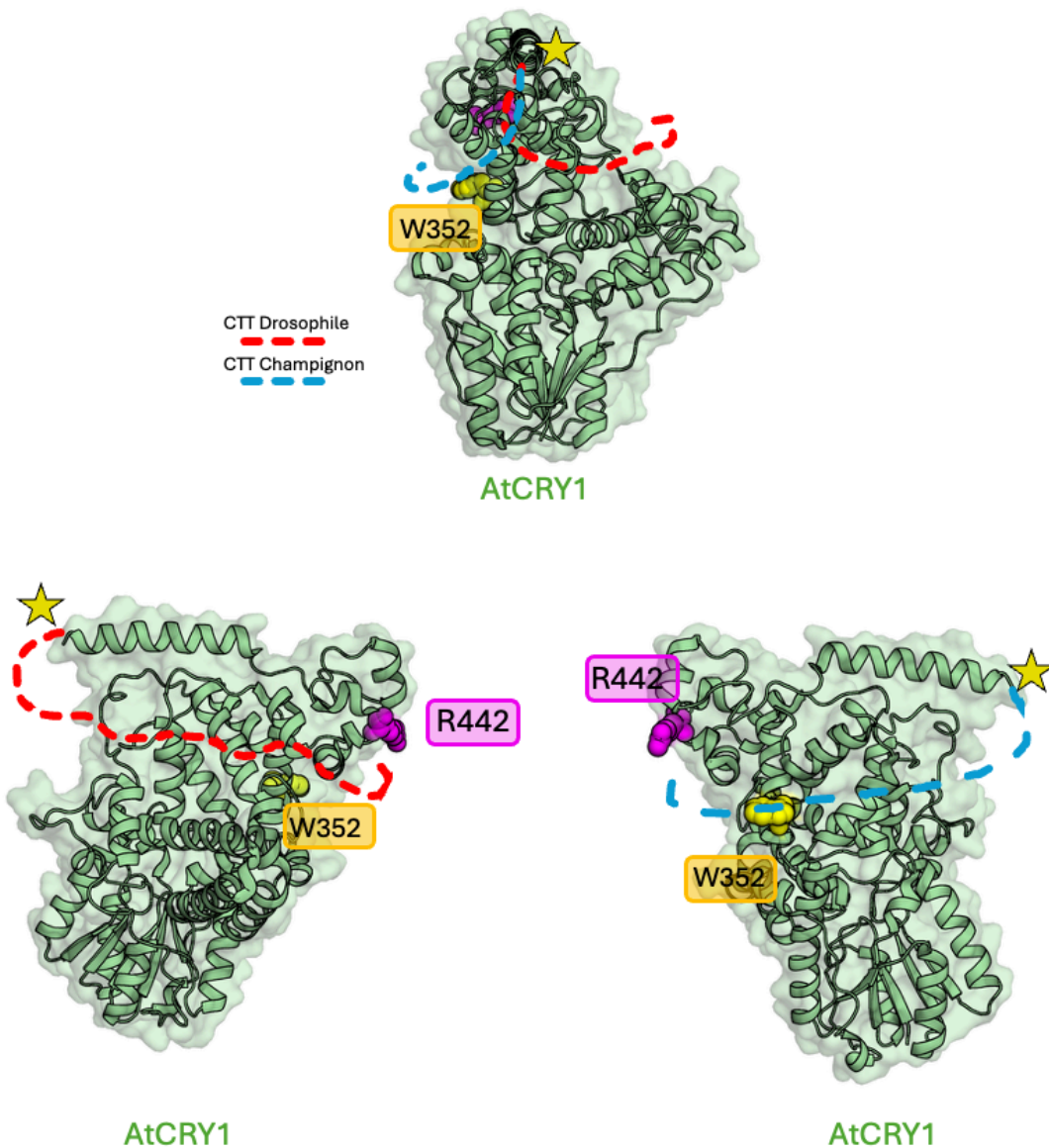


Figure 5.6 Modèles de régulation de W352 et R442 du domaine PHR par la queue d'AtCRY1.

La structure du domaine PHR d'AtCRY1 est représentée en mode cartoon et en surface, en vert pâle. Les résidus R442 et W352 d'AtCRY1, précédemment impliqués dans l'oligomérisation du domaine PHR des cryptochromes, sont représentés sous forme de sphères, respectivement en magenta et en jaune. La CCT d'AtCRY1 est montrée selon deux conformations distinctes afin d'illustrer la variabilité structurale observée entre les espèces. En bleu, la CCT adopte une organisation inspirée des modèles prédits par AlphaFold pour les cryptochromes fongiques, s'enroulant partiellement autour du domaine PHR. En rouge, la CCT mime la configuration observée chez *Drosophila*, se repliant différemment et occupant une position alternative autour du PHR.

Dans la continuité de ce travail, une analyse comparative exhaustive sur des prédictions structurales AlphaFold de CRY1 issues d'un large éventail d'espèces permettrait d'identifier des comportements structuraux conservés, malgré le caractère non prédictif de la région C-terminale désordonnée. Cette approche offrirait un cadre pour cartographier, au sein de la CTT, les résidus impliqués dans le camouflage de l'interface H-T du domaine PHR, et concevoir des mutants de la CTT conduisant à un état actif de CRY1 indépendamment. De tels variants, limiteraient la dimérisation provenant de la tronquature complète de la CTT tout en préservant les déterminants moléculaires fonctionnels des motifs SLiM. Ces nouveaux mutants pourraient être évalués par des tests d'interaction en double hybride chez la levure avec HsFA1d, avant une validation fonctionnelle *in planta*.

Le quatrième chapitre de cette thèse s'appuie sur les prédictions structurales d'AlphaFold pour caractériser les déterminants moléculaires à la base de l'interaction entre CRY1 et HsFA1d. Nos résultats du modèle généré entre les deux protéines a permis de proposer un mode d'interaction entre un monomère de CRY1 et un trimère du facteur de choc thermique HsFA1d (Figure 4.1A). Nos tests de complémentarité bimoléculaire de fluorescence nous confirme que le domaine PHR de CRY1 interagit physiquement avec la région HR-A du domaine HR-A/B du trimer de HsFA1d (Figure 4.1A et Figure 4.S9B) ce qui concorde avec la première mise en évidence d'une interaction entre ces protéines (Gao *et al.*, 2023). Les tests de double hybride chez la levure par « spot essay » présentés dans l'étude préliminaire identifiant une interaction physique entre CRY1 et HsFA1d (Gao *et al.*, 2023), ont mis en évidence la potentielle contribution de la CTT isolée dans l'interaction avec les facteurs de choc thermique (Gao *et al.*, 2023). Le caractère intrinsèquement désordonné de la CTT nous empêche la résolution structurale fiable de cette région par AlphaFold (Figure 4.S2), ce qui ne nous a pas permis d'approfondir la question. Néanmoins, considérant la présence et la diversité des nombreux motifs courts (SLiM) présents sur la CTT des CRY végétale (Wang et Lin, 2025), il est fort probable que des motifs additionnels contribuent au recrutement du trimère de HsFA1d ou à la stabilisation du complexe CRY1/HsFA1d.

Au-delà des modèles que nous proposons de l'interaction entre CRY1 et la sous-famille HsFA1 (Figure 4.1A et 4.S7), nous montrons que CRY1 interagit avec de multiples HsF des classes A et C selon des tests de double hybride chez la levure et de complémentarité bimoléculaire de fluorescence (Figure 4.1C et 4.1D). La semi-conservation des résidus dans la région HR-A semble moduler fortement la force et la nature de l'interaction avec le cryptochrome (Figure 4.1C et 4.3). Nous proposons ici que l'interaction au niveau de la région HR-A à proximité du lien entre les domaines DBD et OD est critique pour influencer en condition de stress l'orientation des domaines DBD sur des HSE de géométries variables (Feng *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2023).

Afin d'explorer cette avenue à l'échelle génomique, nous proposons sur la base des données de ChIP-seq obtenues pour HsFA1d seul ou le complexe CRY1-HsFA1d (Gao *et al.*, 2023) de cartographier et comparer les HSE de l'ADN d'*Arabidopsis thaliana*. L'identification éventuelle de tels HSE atypiques pourrait ensuite être validée expérimentalement, par la conception d'HSE synthétiques testés *in vitro*, et des mutants du linker reliant le domaine DBD au domaine OD pour influencer l'interaction afin d'établir un lien direct entre organisation structurale du complexe, géométrie de l'ADN et régulation transcriptionnelle.

D'ailleurs, parmi les gènes corégulés par le complexe CRY1-HsFA1d on trouve le gène AT2G01570 qui code pour la protéine RGA (Gao *et al.*, 2023). Il est tentant de spéculer d'une part que RGA est exprimée pour moduler la croissance végétale suite à un stress et d'autre part, nos données préliminaires de double hybride chez la levure, en simple réplicat et absentes du chapitre 4, montrent que RGL1 serait en mesure d'interagir physiquement avec des HsF de classes A, B et C malgré l'absence actuelle d'un modèle structural prédictif clair issu d'AlphaFold (Figure 5.7 et Figure A.4). Une compréhension de la stœchiométrie du complexe entre les deux protéines ou la prise en compte de cofacteurs, tels que l'ADN, apparaissent nécessaires pour évaluer d'autres hypothèses moléculaires favorisant la stabilité de l'interaction ou des rapprochements sur la chromatine.

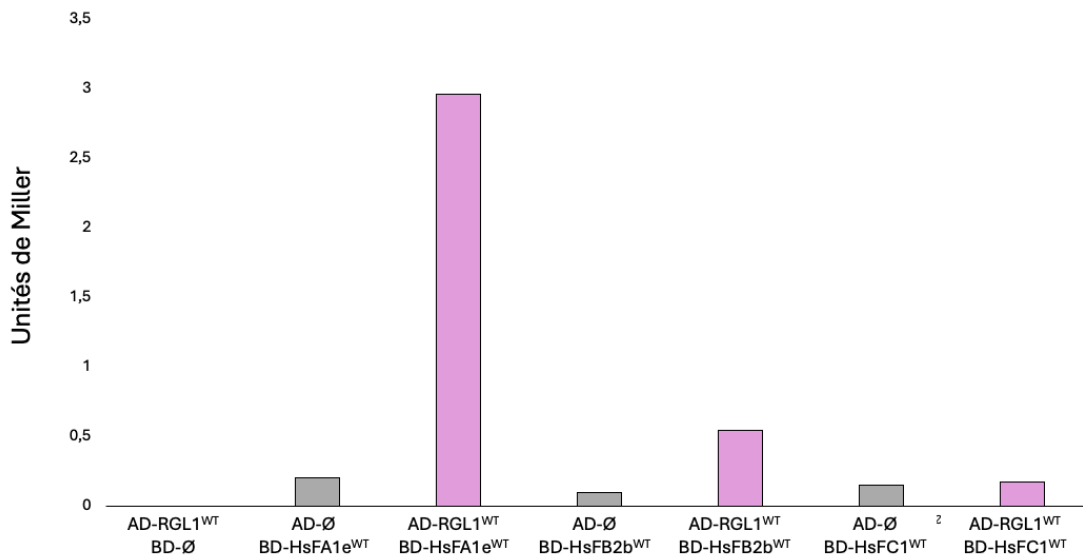


Figure 5.7 Mise en évidence d'une interaction entre RGL1 et les facteurs de choc thermique par test de double hybride chez la levure.

Les interactions entre les différentes protéines impliquées ont été évaluées par test de double hybride chez la levure, en mesurant l'activité du gène rapporteur (β -galactosidase) exprimé en unité de Miller. Les valeurs représentent un unique réplicat. Les contrôles de vecteurs vides sont représentés en gris.

Parmi les HsF avec lesquelles CRY1 interagit, HsFA3 se distingue par une affinité particulièrement élevée par mesure de l'activité de la β -galactosidase dans des tests de double hybride chez la levure (Figure 4.1C). Nos résultats suggèrent que l'interface est stabilisée par des interactions π -cations engagées entre la région HR-A de HsFA3 avec le résidu W352 du cryptochrome (Figure 4.5C et 4.5D) ainsi que par la formation de deux ponts salins formés par HsFA3^{E173} et HsFA3^{E188} à chaque extrémité de la région HR-A (Figure 4.4C et 4.4D). Nos analyses comparatives des séquences illustrent que ces résidus clés sont conservés chez les dicotylédones mais fréquemment substitués chez les monocotylédones, suggérant une adaptation évolutive (Figure 4.6A-B). La présence d'une charge négative en position C-terminale, unique à HsFA3 (E188) (Figure 4.3A) parmi les HsF d'Arabidopsis, pourrait jouer un rôle majeur dans la stabilisation de l'interface CRY1/HsFA3 et dans la modulation fine de la mémoire de la réponse thermique (Friedrich *et al.*, 2021). Nous avons observé cette interaction par BiFC majoritairement dans le noyau sous forme de *puncta* (Figure 4.4B), une distribution rappelant celle de structures nucléaires associées aux photos-corps de CRY1 (Liu *et al.*, 2024; Lyon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Wang et Lin, 2025). Cette spécificité suggère une voie CRY1/HsFA3 dédiée à la coordination de réponses transcriptionnelles nucléaires. Par ailleurs, HsFA3 forme également des hétérotrimères avec plusieurs autres HsF de la classe A, renforçant l'idée d'une capacité transcriptionnelle et de sensibilité des réponses thermiques (Friedrich *et al.*, 2021). Les mutants HsFA1e^{R162E} et HsFC1^{R129E}, pour lesquels la substitution mime la charge négative en position 188 augmente fortement l'interaction avec CRY1 selon des mesures de l'activité du gène rapporteur dans des tests de double hybride chez la levure (Figure 4.6C), confirment cette hypothèse, tandis que l'absence d'effet chez HsFB2b^{K249E} (Figure 4.6C) pourrait refléter des contraintes structurelles particulières aux HsF de classe B. Dans ce contexte, nos données prédisent que le résidu E188 constitue une cible privilégiée pour la création de mutants gain de fonction chez les autres HsF de Class A et C, notamment chez les monocotylédones (Figure 4.S13).

Au-delà des chapitres principaux de cette thèse, des résultats complémentaires ont enrichi notre compréhension de la régulation de la croissance chez la plante. Des prédictions supplémentaires issues d'AlphaFold ont permis de proposer un cadre structural inédit identifiant des déterminants moléculaires reliant les voies de signalisation des gibbérellines de la perception de la lumière et de la réponse au choc thermique. La voie des gibbérellines peut être régulée en amont par les cryptochromes lors de la photomorphogenèse. CRY1 joue le rôle de garde-fou de la croissance, et interagit physiquement avec GID1 et DELLA pour séquestrer les deux protéines bloquant la croissance de manière réversible (Xu *et al.*, 2021; Zhong *et al.*, 2021), mais les déterminants moléculaires à la base de ces interactions restent encore inconnus. Dans cette section, nous proposons des modèles prédictifs par modélisations AlphaFold des interactions CRY1/DELLA et CRY1/GID1. Dans le contexte CRY1/DELLA la modélisation par AlphaFold montre que

le motif L(K/R)XI hautement conservé à travers les monocotylédones et dicotylédones (Figure 5.8A) et prédit comme motif impliqué dans des interactions avec d'autres protéines de la voie des GA (Sun *et al.*, 2010b) serait le déterminant majeur permettant le rapprochement des deux protéines (Figure 5.8B). Le modèle tridimensionnel obtenu par AlphaFold montre également un rapprochement entre le domaine GRAS de RGL1 et le domaine PHR de CRY1, néanmoins ces rapprochements ne sont pas reportés dans les données du PAE (Figure 5.8C). Cette différence est probablement due à un problème de modélisation d'interfaces faibles ou transitoires, ou bien à une stoechiométrie différente des partenaires, avenue qui devra être explorée à l'aide de modèles AlphaFold complémentaires ou des approches biophysiques telles que la titration calorimétrique isotherme. Néanmoins, l'interaction entre les protéines sauvages a été validée dans un système de double hybride chez la levure couplé à la mesure de l'activité enzymatique du gène rapporteur (β -galactosidase). Cette activité est perdue à la suite de la substitution en alanine du motif L(K/R)XI chez RGL1, ce qui conforte l'hypothèse structurale (Figure 5.8D).

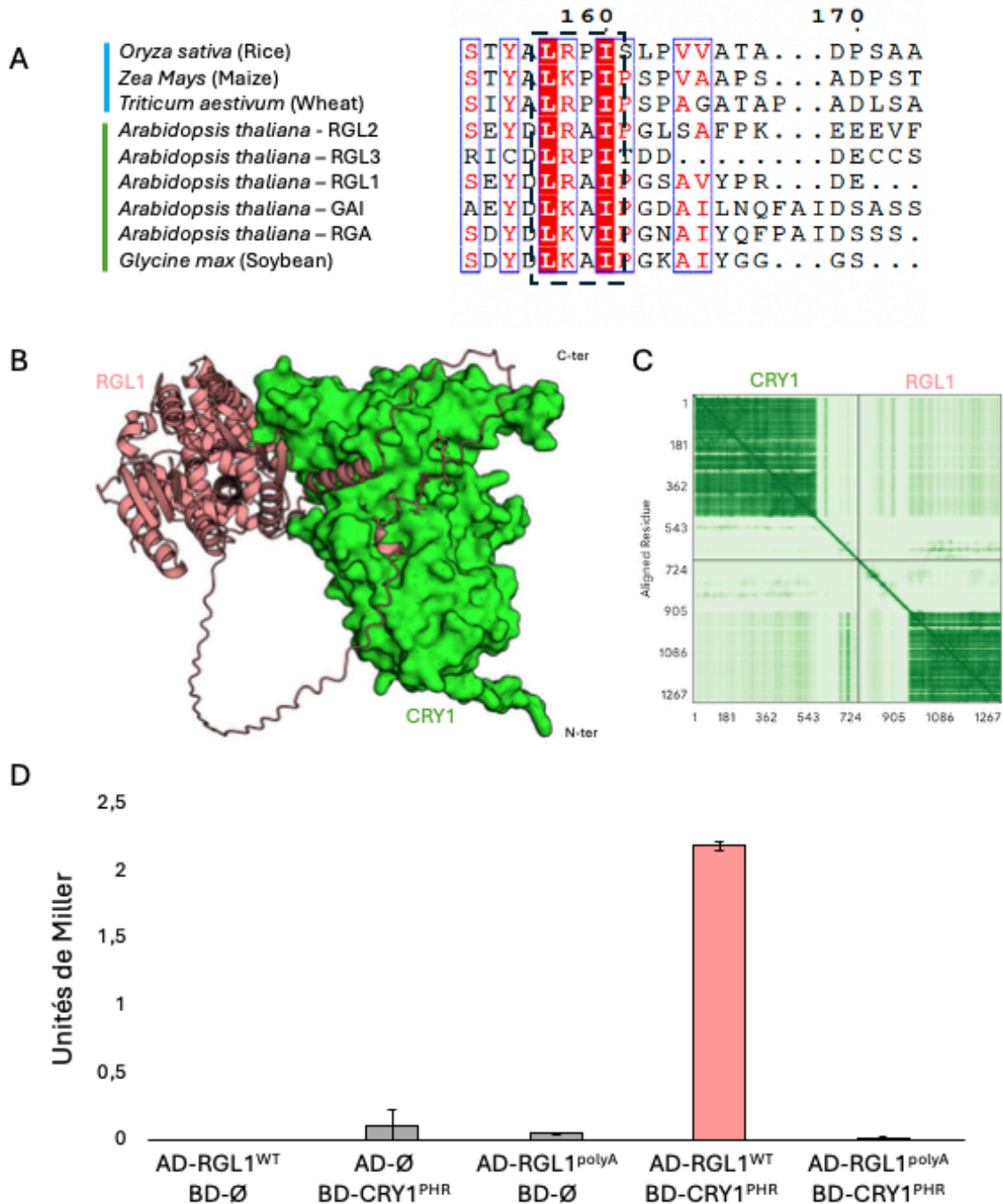


Figure 5.8 Base structurale de l'interaction entre CRY1 et RGL1.

(A) Alignement de séquences mettant en évidence la conservation du motif L(K/R)XI (encadré en pointillé chez les monocotylédones (en bleu) et chez les dicotylédones (en vert)). (B) Modèle structural du complexe CRY1-RGL1 prédit par AlphaFold, illustrant l'organisation spatiale du motif L(K/R)XI dans l'interaction avec le cryptochrome. (C) PAE associé au modèle AF indiquant le niveau de confiance pour l'interface CRY1/RGL1. (D) Analyse des interactions par test de double hybride chez la levure en mesurant l'activité de la β -galactosidase exprimée en unité de Miller. Les contrôles de vecteurs vides sont représentés en gris. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de n=3 expériences indépendantes.

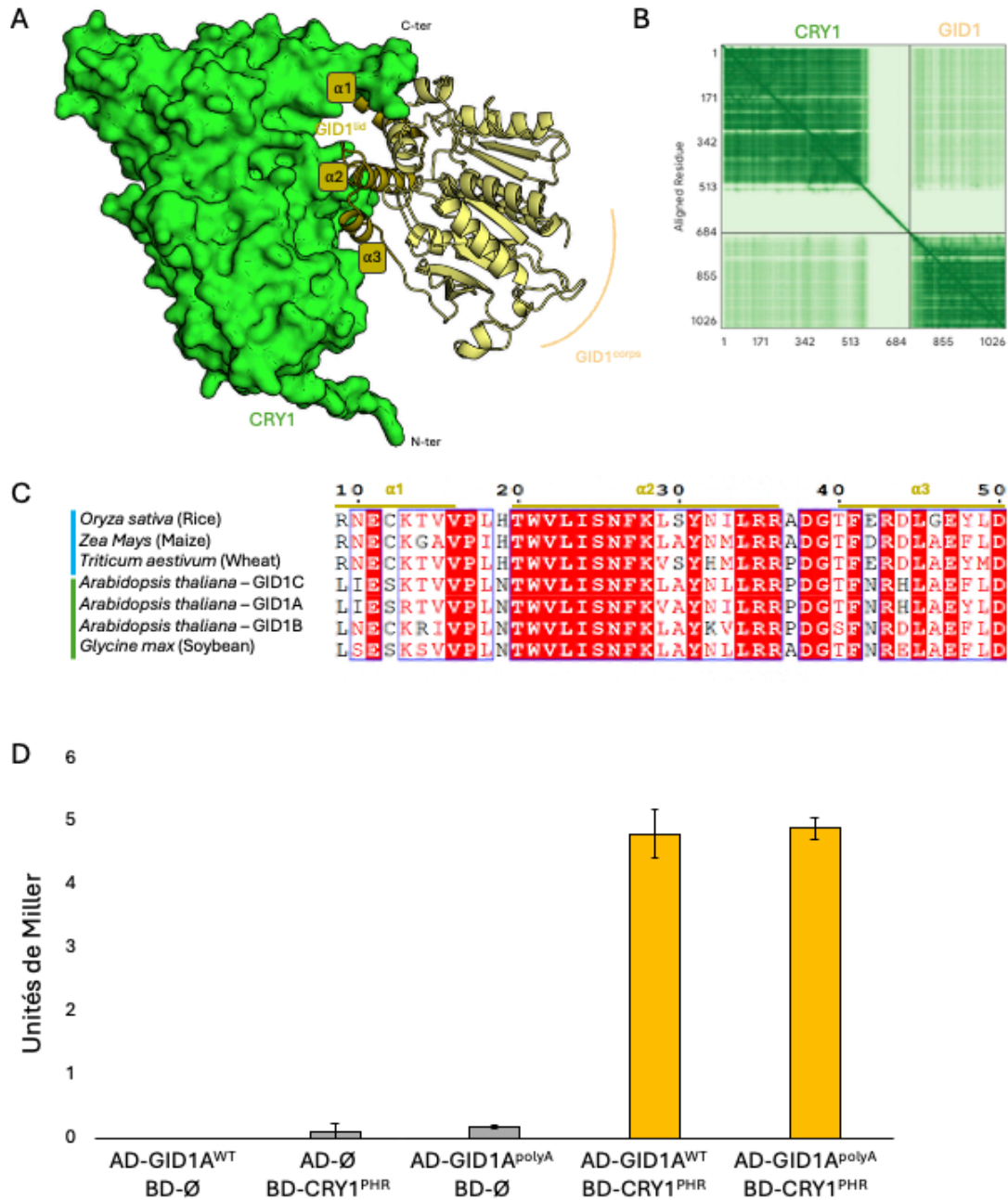


Figure 5.9 Base structurale de l'interaction entre CRY1 et GID1.

Alignement de séquences mettant en évidence la conservation de l'hélice $\alpha 3$ de GID1 chez les monocotylédones (en bleu) et chez les dicotylédones (en vert). (B) Modèle structural du complexe CRY1-GID1 prédit par AlphaFold, illustrant l'organisation spatiale de l'hélice dans l'interaction avec le cryptochrome. (C) PAE associé au modèle AF indiquant le niveau de confiance pour l'interface CRY1-GID1. (D) Analyse des interactions par test de double hybride chez la levure, en mesurant l'activité de la β -galactosidase exprimée en unité de Miller. Les contrôles de vecteurs vides sont représentés en gris. GID1A^{polyA} correspond à une substitution en alanine de l'hélice $\alpha 3$. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de $n=3$ expériences indépendantes.

Dans le contexte CRY1/GID1, les données structurales montrent des rapprochements entre le domaine PHR de CRY1, le couvercle et le corps de GID1 (Figure 5.9A et 9B), avec une contribution majeure de la part de l'hélice $\alpha 3$ du couvercle. La forte conservation des déterminants moléculaires de l'hélice $\alpha 3$ du couvercle chez les monocotylédones et les dicotylédones renforce l'hypothèse de leur implication dans l'interface d'interaction avec le domaine PHR de CRY1 (Figure 5.9C). L'interaction entre les protéines sauvages a été validée dans un système de double hybride chez la levure (Figure 5.9D). La substitution en alanine de cette hélice α , ne semble pas conduire à une perte d'interaction avec le cryptochrome, cela pourrait s'expliquer par une contribution majoritaire du corps de GID1 dans l'interaction.

Des prédictions par modélisation AlphaFold et analyses comparatives complémentaires, non présentées dans les chapitres précédents de cette thèse, ont permis de proposer un mécanisme nouveau d'autorégulation de l'activité des répresseurs de croissance DELLA. Les structures cristallines de dimères de protéines GRAS (Hirano *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016) nous ont guidé dans l'exploration d'un mode de dimérisation des protéines DELLA. De nouvelles prédictions par modélisation AlphaFold nous ont mené à l'observation de la formation de dimères *via* la région α/β , ainsi que *via* la coiffe hélicoïdale (Figure 5.10). Néanmoins, aucun de ces modèles ne correspond strictement aux positionnements observés dans les structures cristallines AtSHR-AtSCR (Hirano *et al.*, 2017) ou OsCL7- OsCL7 (Li *et al.*, 2016). Ces variations pourraient s'expliquer par la faible conservation des résidus impliqués dans la dimérisation des protéines GRAS au sein des protéines DELLA (Figure A.1).

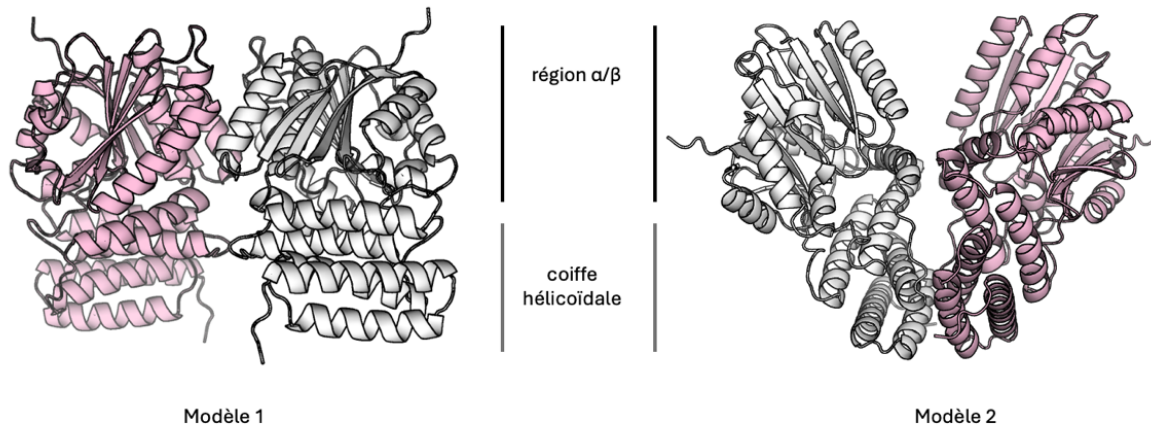


Figure 5.10 Modèles de dimérisation de RGL1 générés par AlphaFold.

Structure tridimensionnelle d'homodimère de RGL1 *via* la région α/β en C-terminal (à gauche) et *via* la coiffe hélicoïdale en N-terminal (à droite). Le domaine DELLA n'est pas représenté pour alléger la figure.

Nos résultats de double hybride chez la levure soutiennent néanmoins l'idée d'un comportement oligomérique entre les protéines RGL1 (AD-RGL1^{WT} + BD-RGL1^{WT}) mais le mode de dimérisation reste

inconnu (Figure 5.11). Dans ce contexte de dimérisation des protéines RGL1, la délétion des motifs courts Δ DELLA ou Δ TVHYNP nécessaire à la reconnaissance de GID1, a conduit à l'augmentation respective de près de 4 et 1,5 fois de l'activité enzymatique liée au gène rapporteur de la β -galactosidase par rapport aux mesures des protéines sauvages (Figure 5.11). Néanmoins, les contrôles négatifs suggèrent que cette augmentation ne provient pas de la dimérisation des RGL1. Nous suggérons que la délétion des motifs entraîne l'exposition des domaines de transactivation présents dans l'extrémité N-terminale des protéines DELLA (Figure 11). Cette activité transcriptionnelle semble être donc camouflée chez la protéine sauvage. Il est tentant de penser que le domaine intrinsèquement désordonné en N-terminal de RGL1, se replie sur le domaine GRAS *via* ces deux motifs afin de camoufler les TAD et inhiber l'activité trans-activatrice.

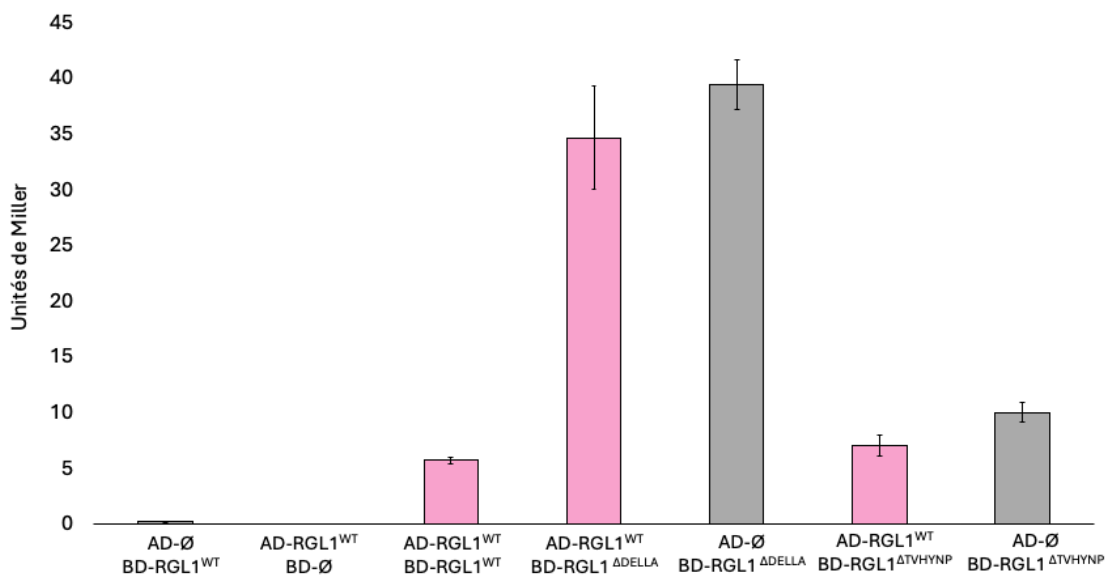


Figure 5.11 Mise en évidence de la dimérisation des protéines RGL1 par test de double hybride chez la levure.

Les interactions entre les différentes protéines impliquées ont été évaluées par test de double hybride chez la levure, en mesurant l'activité du gène rapporteur (β -galactosidase) exprimée en unité de Miller. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type de n=3 expériences indépendantes. Les contrôles de vecteurs vides sont représentés en gris.

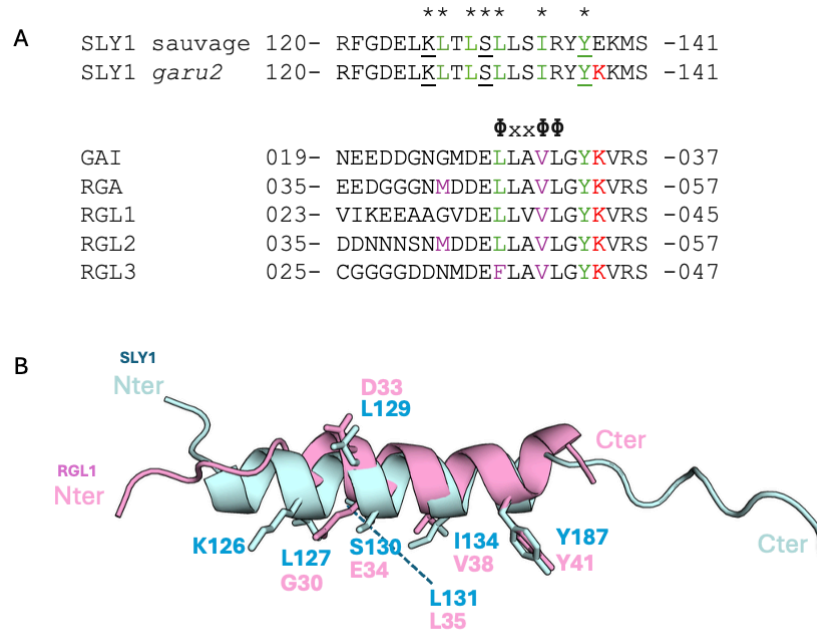


Figure 5.12 Analogie entre les l'hélice $\alpha 7$ de SLY1 et l'hélice $\alpha 1$ de DELLA.

(A) Alignement comparatif des séquences de l'hélice $\alpha 7$ de SLY1 et des hélices $\alpha 1$ de la région désordonnée en N-terminale des protéines DELLA. Les résidus de SLY1 impliqués dans l'interaction avec le domaine GRAS de DELLA sont indiqués par un (*). Les résidus impliqués dans des interactions hydrophobes sont en vert, et ceux impliqués dans la formation de pont hydrogènes sont soulignés. Les résidus conservant des propriétés physico-chimiques similaires sont en mauve. Le résidu E138K responsable du gain de fonction du mutant *garu2* est indiqué en rouge. La position du motif de transactivation est indiquée au-dessus des séquences d'hélices $\alpha 1$. (B) Alignement structural et comparaison de la projection des chaînes latérales des résidus de l'hélice $\alpha 7$ de SLY1 et de l'hélice $\alpha 1$ de la région désordonnée en N-terminale de RGL1.

La comparaison des séquences primaires de l'hélice $\alpha 1$ des 5 répresseurs (GAI, RGA, RGL1, RGL2 et RGL3) à l'hélice $\alpha 7$ de SLY1, a permis de mettre en évidence une semi-conservation des résidus impliqués dans l'interaction avec le domaine GRAS de DELLA (Figure 5.12A). De plus, l'alignement des structures secondaires de l'hélice $\alpha 1$ de DELLA et de l'hélice $\alpha 7$ de SLY1 révèle une disposition spatiale similaire des chaînes latérales de ces résidus (Figure 5.12B). Il est à nouveau tentant de spéculer que le domaine DELLA interagit avec le domaine GRAS de la même manière que SLY1. Néanmoins, cette interaction mènerait à l'auto-inhibition de l'activité trans-activatrice par engagement du motif D-E-L-L-A à l'emplacement où SLY1 s'insère. Ce modèle rejoint les résultats de double hybride chez la levure entre SLY1^{E138K} et RGL1 ^{Δ DELLA} (Δ DELLVVLGYKVRSSDMA) en absence de GID1 et de GA pour lesquels la délétion de 17 aa permet à SLY1 d'interagir en contournant la nécessité du récepteur GID1 et de l'hormone (Sheerin et al., 2011). On observe d'ailleurs en C-terminal de l'alignement réalisé plus tôt (Figure 5.12A) que le résidu glutamate en position 138 de SLY1 correspond à une lysine chez les différentes protéines DELLA. Ce résidu

à cet emplacement de la structure n'est donc pas sans rappeler la mutation gain de fonction de SLY1^{E138K} qui améliore l'interaction entre SLY1 et RGL1 conduisant à une croissance exacerbée (Fu *et al.*, 2004; Sheerin *et al.*, 2011). La structure élucidée avait montré que la substitution E138K forme un pont salin avec le résidu glutamate 297 de RGA augmentant l'affinité des protéines (Dahal *et al.*, 2025; Islam *et al.*, 2025). La présence naturelle d'une lysine à cette position constituerait un atout, en renforçant l'affinité du domaine DELLA lorsqu'il est associé au domaine GRAS en formant un pont salin équivalent avec le résidu glutamate conservé du domaine GRAS, ce qui permettrait de concurrencer efficacement l'arrimage de SLY1 sur ce même domaine. Ensemble, ces données nous permettent de proposer un modèle selon lequel le domaine intrinsèquement désordonné en N-terminal des protéines DELLA se replie sur le domaine GRAS *via* les motifs D-E-L-L-A et T-V-H-Y-N-P afin de camoufler les TAD inhibant l'activité trans-activatrice tout en compétitionnant avec SLY1 pour l'interface en question.

Dans la continuité de cette étude, nous proposons de tester par essais de double hybride chez la levure de nouveaux mutants capable de perturber la dimérisation médiée par la région α/β du domaine GRAS de RGL1 afin de maintenir une surface d'interaction accessible pour le domaine DELLA ou SLY1. Sur cette base, des tests de double hybride supplémentaires permettraient ensuite d'évaluer l'impact de domaines GRAS mutés, sur l'interaction avec le domaine DELLA isolé, afin de valider le modèle d'autorégulation proposé. L'identification de mutants gain ou perte de fonction offrirait un atout pour moduler la dynamique et la compétition de cette surface d'interaction vis-à-vis du domaine DELLA ou de SLY1 et donc les réponses de croissance.

CONCLUSION

AlphaFold a transformé la biochimie structurale en accélérant considérablement l'accès à des hypothèses qui demandent des années en validation expérimentale, jouant le rôle de catalyseur d'hypothèses afin de les valider rapidement par des méthodes de biochimie classique.

Ainsi, au cours de cette thèse, les modélisations d'AlphaFold ont constitué un cadre central pour l'analyse des structures des protéines individuelles (DELLA, SLY1, CRY1 et HsF), de leurs comportements oligomériques et des déterminants moléculaires critiques favorisant les interactions protéines-protéines. Ces approches ont permis d'affiner les modèles actuels des voies de signalisations en proposant une lecture mécanistique intégrant les voies des gibbérellines, de la perception de la lumière bleue et de la réponse au choc thermique. Sur la base de ces informations structurales, nous avons développé et optimisé des protocoles d'expression et de purification des protéines RGL1 et SLY1, ouvrant la voie à des stratégies de caractérisation thermodynamique de leurs interactions *in vitro*. Dans cette optique, le recours à des méthodes biophysiques nécessitant de faibles quantités de protéines, telles que la polarisation de fluorescence, représente une voie particulièrement prometteuse pour approfondir l'étude des interactions identifiées.

Ce travail a également mis en lumière le rôle central des régions intrinsèquement désordonnées des protéines DELLA et CRY1 dans leur régulation physiologique, en proposant des modèles d'auto-régulation *in vivo*. Les prédictions structurales ont en outre permis d'examiner en détail l'interface d'interaction entre le domaine PHR de CRY1 et les protéines HsF, fournissant des indices moléculaires sur les modalités de reconnaissance et de stabilisation de ces complexes. L'analyse de la variabilité naturelle des séquences des membres de la famille HsF a conduit à l'identification de déterminants fonctionnels exploitables, permettant le développement de mutants gain de fonction dans un contexte agronomique chez le riz, et ouvrant ainsi des perspectives concrètes d'amélioration des performances des plantes sous contraintes environnementales.

Guidé par les prédictions d'AlphaFold, ce travail met en évidence que les protéines des voies des gibbérellines, de la lumière bleue et de la réponse au choc thermique s'interconnectent au sein de la cellule, et pourraient conjointement contribuer à conférer une thermo-tolérance accrue chez les plantes. Nos données ont contribué à affiner les modèles actuels de signalisation en révélant des points d'interconnexion inattendus entre des voies considérées comme distinctes.

Néanmoins, les prédictions structurales issues d'AlphaFold fournissent des modèles tridimensionnels structurellement plausibles mais statiques. Ces modèles limitent la compréhension des états transitoires, de

la plasticité des régions intrinsèquement désordonnées, pourtant centrales dans la régulation des interactions protéines-protéines étudiées dans cette thèse. Les contraintes inhérentes au nombre maximal de résidus modélisables, l'existence de conformations alternatives, la formation d'assemblages oligomériques, ainsi que la compétition entre interfaces d'interaction, constituent autant de paramètres susceptibles de moduler les mécanismes proposés et doivent être considérés avec prudence dans l'interprétation des modèles structuraux. Pris ensemble, ces éléments soulignent la nécessité de considérer les approches de double hybride, de BiFC et de modélisation structurale non comme des démonstrations définitives, mais comme des outils générateurs d'hypothèses. La validation de ces hypothèses requiert le recours à des méthodes omiques, quantitatives et dynamiques complémentaires, capables de caractériser d'autres partenaires, mesurer les affinités et les cinétiques. Enfin, il apparaît essentiel de tester ces modèles *in planta*, afin d'évaluer dans quelle mesure les interactions et mécanismes proposés se traduisent par des phénotypes mesurables concrets. Cette étape constitue un passage clé pour relier les cadres structuraux et moléculaires proposés aux fonctions biologiques de la plante.

ANNEXE A

PROTOCOLE POUR L'ANALYSE LC-MS/MS D'UNE PROTÉINE EXTRAITE SUR GEL SDS-PAGE

La bande d'intérêt a été excisée à partir de gels SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, puis découpées en fragments. Après une série de lavages au bicarbonate d'ammonium (50 mM) et de déshydratations à l'acétonitrile afin d'éliminer les contaminants et le colorant, les protéines ont été réduites par le dithiothréitol (DTT, 10 mM, 45 min à 56 °C) puis alkylées par l'iodoacétamide (IAA, 55 mM, 30 min à température ambiante à l'obscurité). Les fragments de gel ont ensuite été déshydratés avec de l'acétonitrile et réhydratés avec une solution de 10 µg/ml de trypsine dans 20 mM ABC, suivie d'une digestion enzymatique réalisée pendant la nuit à 37 °C. Les peptides générés ont été extraits successivement à l'aide de solutions d'acétonitrile et d'acide formique, puis évaporé à sec et reconstitués dans une solution aqueuse d'acide formique (0,1 %). L'analyse a été effectuée par chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), en utilisant une colonne C18 et un gradient croissant d'acétonitrile. Les données ont été acquises en mode d'acquisition dépendante des données (DDA) et analysées à l'aide de logiciels OneOmics (Sciex).

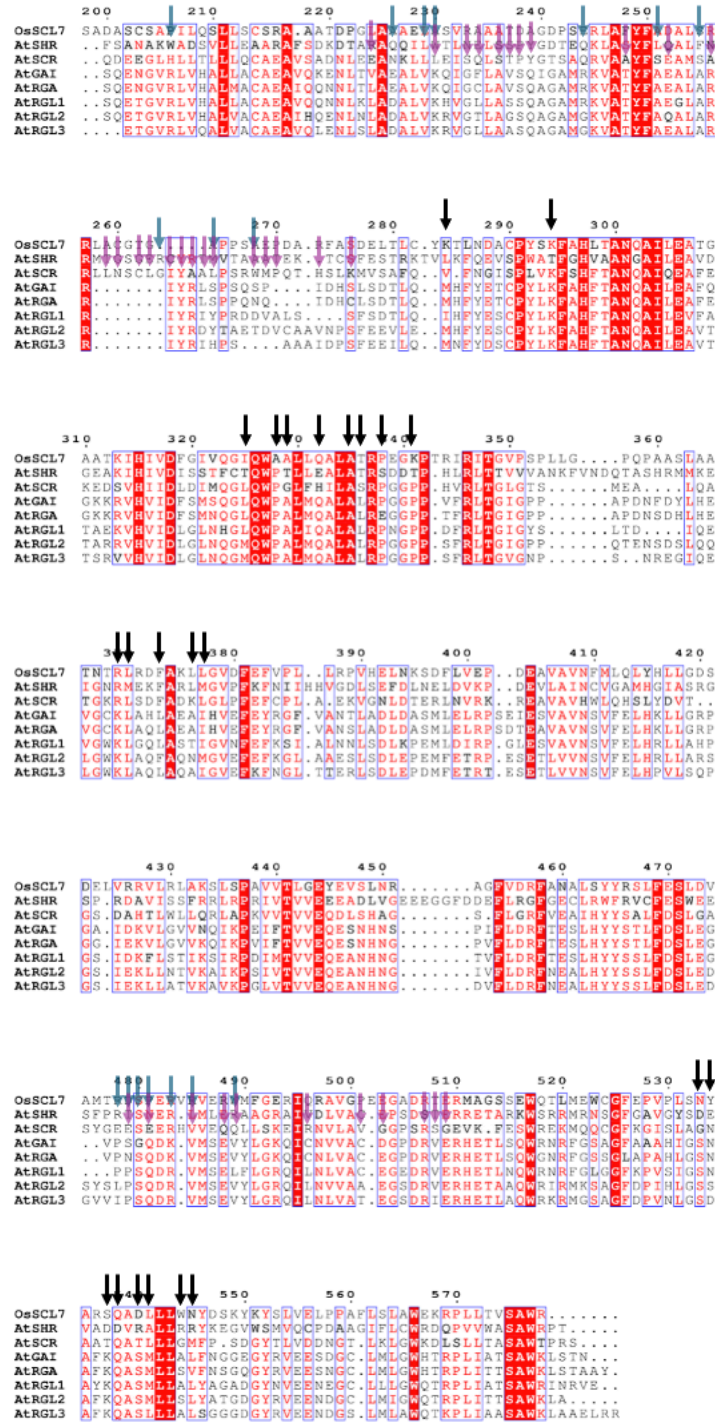


Figure A. 1 Alignement comparatif des séquences primaires des protéines de la famille GRAS et des protéines DELLA.

Les déterminants moléculaires impliqués dans la formation d'hétérodimères sont indiqués par des flèches bleues (SHR) ou mauves (SCR), tandis que ceux impliqués dans la formation d'homodimères sont signalés par des flèches noires (OsSCL7). La lysine ciblée par la sumoylation chez les protéines DELLA est indiquée par une flèche orange.

ANNEXE C
PURIFICATION D'EXCLUSION DE TAILLE DE ASK1-SLY1 DÉNATURÉE

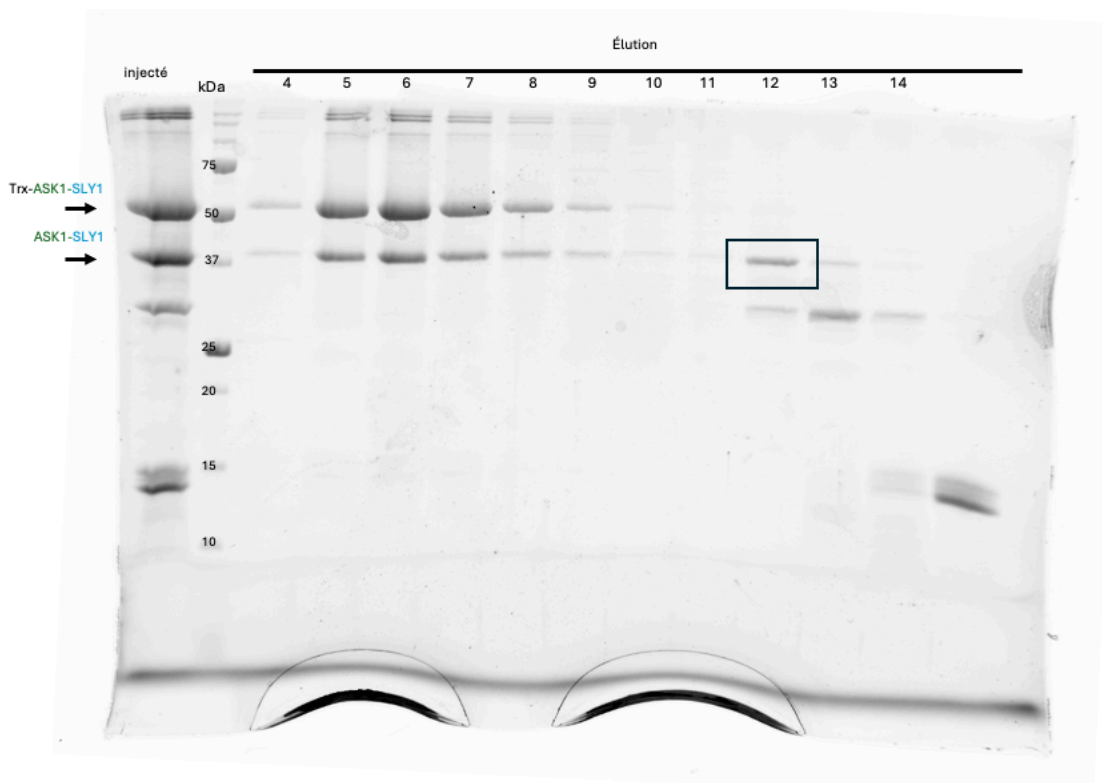


Figure A. 2 Purification de la protéine de fusion ASK1-SLY1 par chromatographie d'exclusion de taille.

La protéine de fusion ASK1-SLY1 a été initialement purifiée par chromatographie d'affinité en conditions dénaturantes (6 M de guanidine). Après renaturation par dialyse, l'étiquette de solubilité a été clivée par la protéase TEV. La protéine a ensuite été repurifiée par chromatographie d'exclusion de taille afin d'isoler une population monomérique en conditions natives.

ANNEXE D
PURIFICATION D'EXCLUSION DE TAILLE DE RGL1

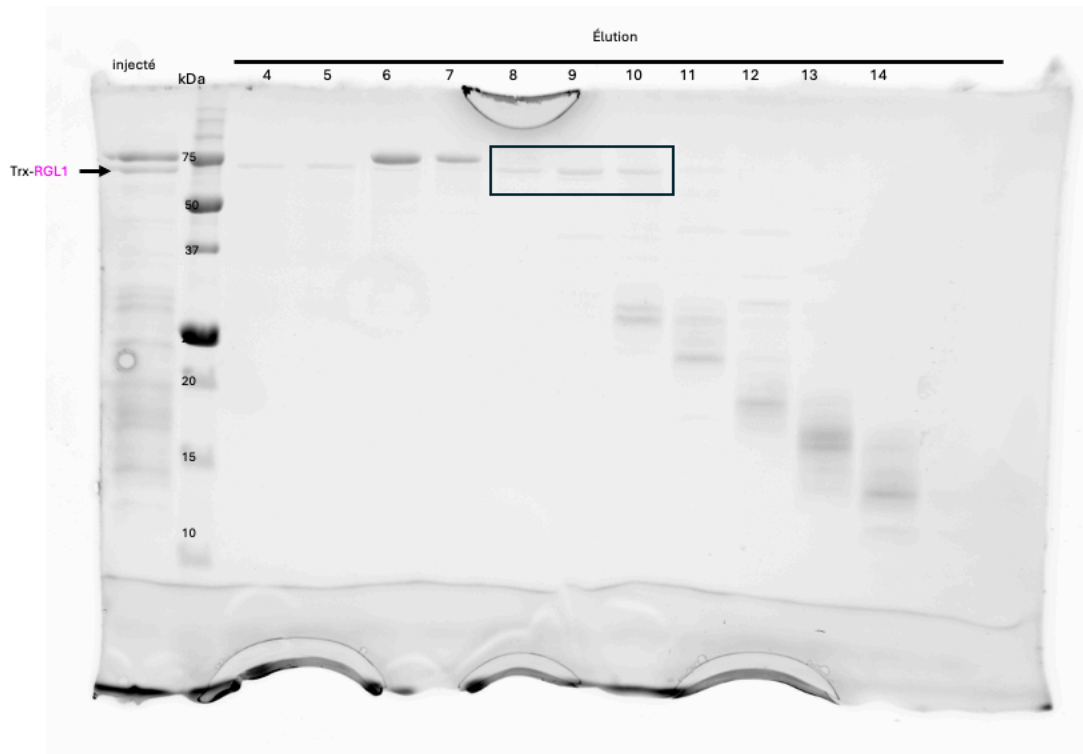


Figure A. 3 Purification et isolement de Trx::RGL1 par chromatographie d'exclusion de taille.
La protéine Trx::RGL1 a été purifiée par chromatographie d'exclusion de taille pour isoler une population monomérique native.

ANNEXE E
PRÉDICTION PAR ALPHAFOLD D'INTÉRACTION ENTRE RGL1 ET LES HSF

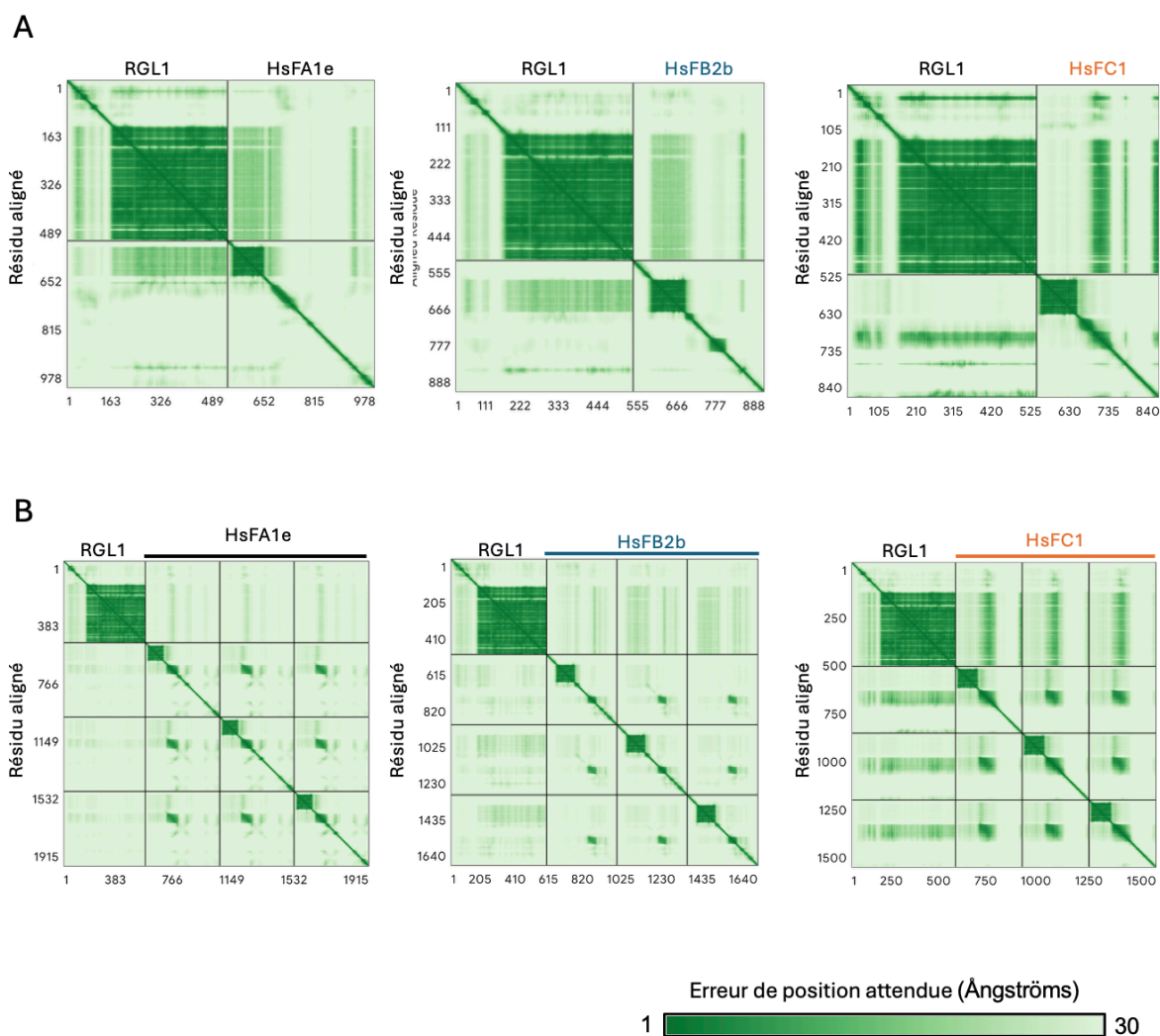


Figure A. 4 Modélisation par AlphaFold de l'interaction entre RGL1 et les protéines HsF d'*Arabidopsis thaliana* en état monomérique ou trimérique.

Représentations des PAE générés pour les interactions protéine-protéine entre RGL1 et HsFA1e, HsFb2b ou HsFC1 à l'état monomérique (A), ou trimérique (B).



Plant SUMO E3 Ligases: Function, Structural Organization, and Connection With DNA

Souleimen Jmii and Laurent Cappadocia*

Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

Protein modification by the small ubiquitin-like modifier (SUMO) plays an important role in multiple plant processes, including growth, development, and the response to abiotic stresses. Mechanistically, SUMOylation is a sequential multi-enzymatic process where SUMO E3 ligases accelerate SUMO conjugation while also influencing target identity and interactions. This review explores the biological functions of plant SUMO E3 ligases [SAP AND MIZ1 DOMAIN-CONTAINING LIGASE (SIZs), METHYL METHANESULFONATE-SENSITIVITY PROTEIN 21 (MMS21s), and PROTEIN INHIBITOR OF ACTIVATED STAT-LIKE (PIALS)] in relation to their molecular activities and domains. We also explore the sub-cellular localization of SUMO E3 ligases and review evidence suggesting a connection between certain SUMO E3 ligases and DNA that contributes to gene expression regulation.

Keywords: SUMOylation, SUMO E3 ligases, abiotic stress, structure-function analysis, DNA-binding proteins

OPEN ACCESS

Edited by:

Harjo A. Hellmann,
Washington State University,
United States

Reviewed by:

Derek Gingerich,
University of Wisconsin–Eau Claire,
United States

Xi Huang,

Xiamen University, China

*Correspondence:

Laurent Cappadocia
cappadocia.laurent@uqam.ca

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 11 January 2021

Accepted: 22 March 2021

Published: 09 April 2021

Citation:

Jmii S and Cappadocia L (2021)
Plant SUMO E3 Ligases: Function,
Structural Organization, and
Connection With DNA

INTRODUCTION

SUMOylation is a reversible post-translational modification found in all eukaryotes that regulates protein activity, stability, localization as well as protein-protein interactions through their conjugation with small ubiquitin-like modifier (SUMO; Celen and Sahin, 2020). SUMOs are small proteins (10–15 kDa) that possess a conserved β -grasp structure composed of a five-stranded β -sheet that wraps around a central α helix (Figure 1A). They structurally resemble to Ubiquitin although their sequence similarity with Ubiquitin is limited (Cappadocia and Lima, 2018). SUMOylation contributes to numerous biological functions and it has been associated to stress responses in multiple organisms (Kurepa et al., 2003; Enserink, 2015; Seifert et al., 2015). In plants, SUMOylation is rapidly triggered by multiple stresses such as heat, drought, and salt stress (Kurepa et al., 2003; Augustine and Vierstra, 2018; Benloch and Lois, 2018). In molecular terms, SUMOylation consists in the formation of a covalent isopeptide bond between the C-terminal end of SUMO and the lysine residue of a protein target. This conjugation is mechanistically similar to Ubiquitin conjugation and it requires the sequential activity of an E1-activating enzyme, an E2-conjugating enzyme, and E3-ligases that bring the activated E2 (E2-SUMO) in close proximity to substrates (Figure 1B; Cappadocia and Lima, 2018).

Throughout the years, two main models have emerged for protein SUMOylation. On the



Pseudophosphorylation of *Arabidopsis* jasmonate biosynthesis enzyme lipoxygenase 2 *via* mutation of Ser⁶⁰⁰ inhibits enzyme activity

Received for publication, October 5, 2022, and in revised form, January 7, 2023. Published, Papers in Press, January 10, 2023.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102898>

Diljot Kaur^{1,2}, Sonia Dorion², Souleimen Jmii³, Laurent Cappadocia³, Jacqueline C. Bede^{1,*}, and Jean Rivoal^{2,*}

From the ¹Department of Plant Science, McGill University, Quebec, Canada; ²Institut de Recherche en Biologie Végétale, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada; ³Département de Chimie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Quebec, Canada

Edited by Sarah E. O'Connor

Contribution : Prédiction et analyse des structures de Lipoxygénase 13S et 9S. Interprétation l'implication de la phosphorylation de la Serine 600 chez AtLOX2 sur l'accessibilité du substrat à la poche catalytique.

APPENDICE C
CONTRIBUTION SECONDAIRE D'ARTICLES II


Received: 3 February 2025 | Revised: 24 May 2025 | Accepted: 29 May 2025

DOI: 10.1002/pro.70197

RESEARCH ARTICLE



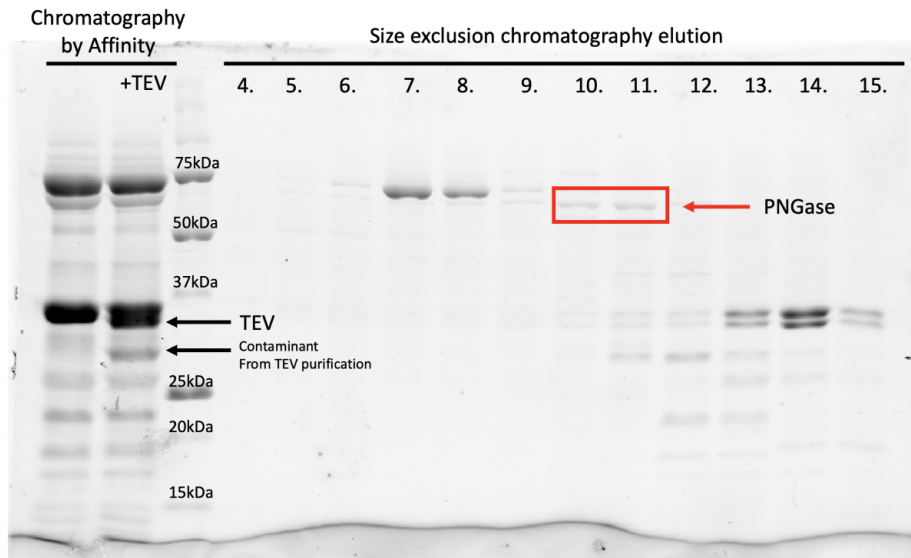
The dual-coding gene *SLC35A4* protects against oxidative stress

Ikram Ajala^{1,2,3}  | **Imadeddine Tiaiba**^{1,2,3} | **Benoît Grondin**^{1,2,3} |
Damien Lipuma^{1,2,3} | **Souleimen Jmii**^{3,4} | **Hiba Benlyamani**^{1,2} |
Laurent Cappadocia^{2,3,4}  | **Benoît Vanderperre**^{1,2,3} 

Contribution : Expression et purification de la protéine alternative SLC35A4 dans un système recombinant. Les protéines ainsi purifiées ont été injectées chez le lapin auprès de la compagnie Midimap pour récupérer le sérum et les anticorps pour une application biotechnologique (Western blot, Immunoprécipitation *etc.*)

APPENDICE D
PARTICIPATION À DES PROJETS DE RECHERCHES I

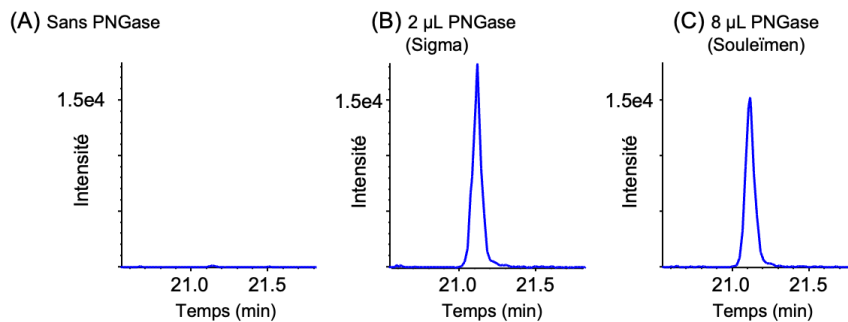
- Expression et purification de Peptide:N-glycosidase F (PNGase-F)



Titre : Gel SDS PAGE 15% présentant la chromatographie d'exclusion de taille de la PNGase-F.

Contribution : Expression et purification de PNGase-F dans un système hétérologue chez *E.coli*. La PNGase-F une enzyme qui catalyse la réaction de déglycosylations des protéines, elle est utilisée ici afin de remplacer une PNGase-F commerciale de la marque SIGMA dans la méthodologie de préparation des échantillons pour identifier des sites de glycosylation par spectrométrie de masse.

Séquence de la protéine α 1-acid glycoprotein 1 (P02763):
 MALSWLTVLSLLPLEAQIPLCANLVPVITNATLDRITGKWFYIASAFRNEEYNKSVQEIQATFFYFTPNKTEDT
 IFLREYQTRQDQCIYNTTYLNVQRENGTISRIVGGQEHFALLILRDTKTYMLAFDVNDEKNWGLSVYADKPET
 TKEQLGEFYEALDCLRIPKSDVVYTDWKKDKCEPLEKQHEKERKQEEGE
 N: sites N-glycosylés connus

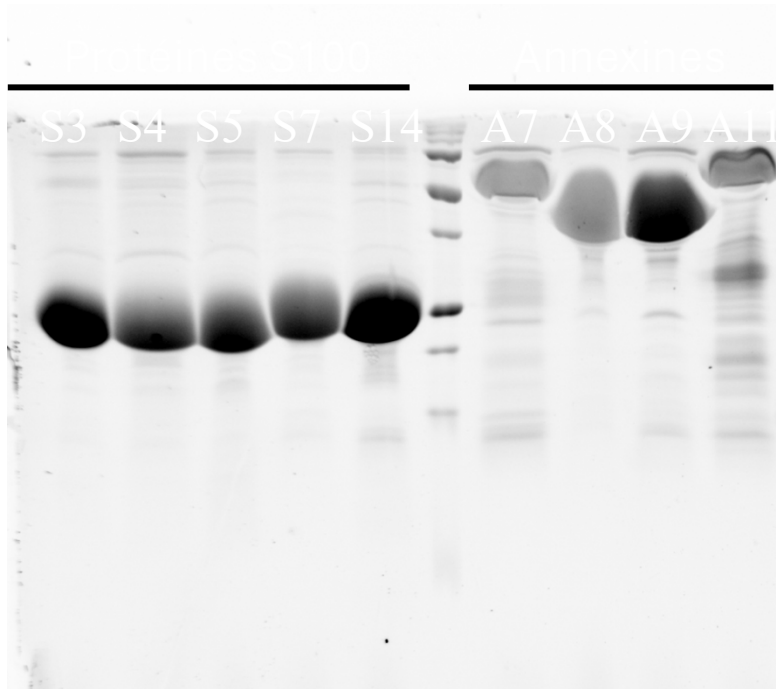


Titre : Essais comparatifs de l'activité enzymatique entre une PNGase-F commerciale et une PNGase-F recombinante provenant de la purification présenté précédemment.

Le peptide QDQCIYN*TTYLNVQR est un peptide tryptique issu de la protéine α 1-acid glycoprotein 1 qui contient un site N-glycosylé connu. La protéine standard α 1-acid glycoprotein 1 a été digérée avec la trypsine puis déglycosylée avec les deux PNGase (laboratoire Cappadocia et Sigma) avant l'analyse par LC-MS/MS. La PNGase permet de déglycosyler le site, L'utilisation de 8 μ L de la PNGase produite par le laboratoire Cappadocia permet d'obtenir une activité similaire à l'enzyme achetée commercialement (Sigma).

APPENDICE E
PARTICIPATION À DES PROJETS DE RECHERCHES II

- Expression et purification de protéines des familles des Annexines et S100



Titre :Gel SDS PAGE 15% présentant quelques résultats de purifications par chromatographie d'affinité des protéines S100 et Annexines.

Contribution : Construction des vecteurs d'expression des protéines S100 et Annexines à partir d'ADNc produit par RT-PCR. Expression et purification de protéines des familles des Annexines et S100 dans un système hétérologue chez *E.coli*. Ces protéines ont comme but d'être utilisées comme standard interne pour des analyses de spectrométrie de masse.

Titre : Tableau récapitulatif des résultats d'identification par spectrométrie de masse des 17 protéines (S100 et Annexines) produites par expression hétérologues chez *E.coli*.

Accession number	Protein name	Gene	Coverage(%)	#Peptides	#Unique	Average Mass
P04083	Annexin A1	ANXA1	90	135	133	38714
Q9UJ72	Annexin A10	ANXA10	98	168	164	37278
P50995	Annexin A11	ANXA11	70	111	106	54390
P08758	Annexin A5	ANXA5	98	208	196	35937
P20073	Annexin A7	ANXA7	59	106	102	52739
P13928	Annexin A8	ANXA8	83	158	2	36881
Q5VT79	Annexin A8-like protein 1	ANXA8L1	86	183	27	36879
O76027	Annexin A9	ANXA9	89	242	242	38364
P31949	Protein S100-A11	S100A11	87	59	59	11740
Q99584	Protein S100-A13	S100A13	86	41	41	11471
Q9HCY8	Protein S100-A14	S100A14	93	76	76	11662
P29034	Protein S100-A2	S100A2	81	50	49	11117
P33764	Protein S100-A3	S100A3	100	70	70	11713
P26447	Protein S100-A4	S100A4	89	64	64	11729
P33763	Protein S100-A5	S100A5	80	58	57	10744
P06703	Protein S100-A6	S100A6	84	32	31	10180
P31151	Protein S100-A7	S100A7	83	54	27	11471

APPENDICE F
PARTICIPATION À DES PROJETS DE RECHERCHES III

- Expression et purification de facteurs neurotrophes dérivés de la glie (GDNF).

Contribution : Expression et purification dénaturante à la Guanidine, des protéines GDNF de *Homo sapiens* et *Mus musculus* dans un système d'expression hétérologue chez *E.coli*. Ces protéines ont comme but d'être utilisées comme standard en spectrométrie de masse.

À cause de la forte concentration en guanidine dans les échantillons, ces purifications ont été faites à l'aveugle. La concentration de protéine a été estimée par la méthode de Bradford, avant d'être diluée et digérée à la Trypsine avant analyse par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse.

P39905_Glial cell line-derived neurotrophic factor OS=*Homo sapiens* 86% *Sequence coverage*

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPEEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMPEDYDPQFDDV
MDFIQATIKRLKRSPDKQMAVLPRRERNRQAAAANPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNVT
DLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILKNLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDL SFLDD
NLVYHILRKHSAKRCGCI

P48540_Glial cell line-derived neurotrophic factor OS=*Mus musculus* 77% *Sequence coverage*

MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRLEAPAEDHSLGHRRVFPALTSDSNMPEDYDPQFDD
VMDFIQATIKRLKRSPDKQAAALPRRERNRQAAAASPENSRGKGRRGQRGKNRGCVLTAIHLNV
TDLGLGYETKEELIFRYCSGSCESAETMYDKILKNLSRSRRLTSDKVGQACCRPVAFDDDL SFLD
DNLVYHILRKHSAKRCGCI

BIBLIOGRAPHIE

- Abatzoglou JT et Williams AP (2016) Impact of anthropogenic climate change on wildfire across western US forests. *Proceedings of the National Academy of sciences* 113: 11770-11775.
- Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP et Genschik P (2008) Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology* 18: 656-660.
- Ahammed GJ, Li X, Zhou J, Zhou Y-H et Yu J-Q (2016) Role of hormones in plant adaptation to heat stress. Dans *Plant hormones under challenging environmental factors*. Springer Netherlands, 2016. 1-21..
- Allen M, Dube OP, Solecki W, Aragón-Durand F, Cramer W, Humphreys S et Kainuma M (2018) Special report: Global warming of 1.5 C. *Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)* 677: 393.
- Altschul SF et Lipman DJ (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87: 5509-5513.
- Ariizumi T, Lawrence PK et Steber CM (2011) The role of two F-box proteins, SLEEPY1 and SNEEZY, in Arabidopsis gibberellin signaling. *Plant Physiology* 155: 765-775.
- Asano K, Hirano K, Ueguchi-Tanaka M, Angeles-Shim RB, Komura T, Satoh H, Kitano H, Matsuoka M et Ashikari M (2009) Isolation and characterization of dominant dwarf mutants, Slr1-d, in rice. *Molecular Genetics and Genomics* 281: 223-231.
- Ashikari M, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Datta S, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M et Khush GS (2002) Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, GA20 oxidase (GA20ox-2), led to the rice 'green revolution'. *Breeding Science* 52: 143-150.
- Baek K, Krist DT, Prabu JR, Hill S, Klügel M, Neumaier L-M, von Gronau S, Kleiger G et Schulman BA (2020) NEDD8 nucleates a multivalent cullin–RING–UBE2D ubiquitin ligation assembly. *Nature* 578: 461-466.
- Bechtold U et Field B (2018) *Molecular mechanisms controlling plant growth during abiotic stress*. Oxford University Press UK,
- Bouard W, Ouellet F et Houde M (2024) Modulation of the wheat transcriptome by TaZFP13D under well-watered and drought conditions. *Plant Molecular Biology* 114: 16.
- Brautigam CA, Smith BS, Ma Z, Palnitkar M, Tomchick DR, Machius M et Deisenhofer J (2004) Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 12142-12147.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2763-2788.

- Cao D, Hussain A, Cheng H et Peng J (2005) Loss of function of four DELLA genes leads to light-and gibberellin-independent seed germination in Arabidopsis. *Planta* 223: 105-113.
- Casal JJ et Balasubramanian S (2019) Thermomorphogenesis. *Annual review of plant biology* 70: 321-346.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y-J et Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760-765.
- Cassani E, Bertolini E, Cerino Badone F, Landoni M, Gavina D, Sirizzotti A et Pilu R (2009) Characterization of the first dominant dwarf maize mutant carrying a single amino acid insertion in the VHYNP domain of the dwarf8 gene. *Molecular Breeding* 24: 375-385.
- Chen Y, Hu X, Liu S, Su T, Huang H, Ren H, Gao Z, Wang X, Lin D et Wohlschlegel JA (2021) Regulation of Arabidopsis photoreceptor CRY2 by two distinct E3 ubiquitin ligases. *Nature communications* 12: 2155.
- Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., & Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), 9578-9582.
- Claeys H et Inzé D (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant physiology* 162: 1768-1779.
- Conti L, Nelis S, Zhang C, Woodcock A, Swarup R, Galbiati M, Tonelli C, Napier R, Hedden P et Bennett M (2014) Small ubiquitin-like modifier protein SUMO enables plants to control growth independently of the phytohormone gibberellin. *Developmental cell* 28: 102-110.
- Correddu D, Montaña López JdJ, Vadakkedath PG, Lai A, Pernes JI, Watson PR et Leung IK (2019) An improved method for the heterologous production of soluble human ribosomal proteins in Escherichia coli. *Scientific Reports* 9: 8884.
- Cost R (2025) Integrative approaches to enhance reproductive resilience of crops for climate-proof agriculture. *Plant stress* 15: 100704.
- Costa S, Almeida A, Castro A et Domingues L (2014) Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology* 5: 63.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M et Brenner SE (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* 14: 1188-1190.
- Czarna A, Berndt A, Singh HR, Grudziecki A, Ladurner AG, Timinszky G, Kramer A et Wolf E (2013) Structures of Drosophila cryptochrome and mouse cryptochrome1 provide insight into circadian function. *Cell* 153: 1394-1405.

- Dahal P, Wang Y, Hu J, Park J, Forker K, Zhang Z-L, Sharma K, Borgnia MJ, Sun T-p et Zhou P (2025) Structural insights into proteolysis-dependent and-independent suppression of the master regulator DELLA by the gibberellin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 122: e2511012122.
- DeOliveira CC et Crane BR (2024) A structural decryption of cryptochromes. *Frontiers in chemistry* 12: 1436322.
- Dill A, Jung H-S et Sun T-p (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 14162-14167.
- Dill A, Thomas SG, Hu J, Steber CM et Sun T-p (2004) The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *The Plant Cell* 16: 1392-1405.
- Doh JK, White JD, Zane HK, Chang YH, López CS, Enns CA et Beatty KE (2018) VIPER is a genetically encoded peptide tag for fluorescence and electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: 12961-12966.
- Due Tankmar M, Reichel M, Arribas-Hernández L et Brodersen P (2023) A YTHDF–PABP interaction is required for m6A-mediated organogenesis in plants. *EMBO reports* 24: e57741.
- Dündar G, Ramirez VE et Poppenberger B (2025) The heat shock response in plants: new insights into modes of perception, signaling, and the contribution of hormones. *Journal of Experimental Botany* 76: 1970-1977.
- EMBL (2025) Dans PAE: A measure of global confidence in AlphaFold2 predictions. Récupéré le 5 janvier 2026 de <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/alphafold/inputs-and-outputs/evaluating-alphafolds-predicted-structures-using-confidence-scores/pae-a-measure-of-global-confidence-in-alphafold-predictions/>
- Engels JM et Thormann I (2020) Main challenges and actions needed to improve conservation and sustainable use of our crop wild relatives. *Plants* 9: 968.
- Evenson RE et Gollin D (2003) Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *science* 300: 758-762.
- FAO (1996) Dans Lessons from the green revolution: towards a new green revolution. Récupéré le 5 janvier 2026 de <https://www.fao.org/4/w2612e/w2612e06a.htm>
- FAO (2017) Dans The future of food and agriculture – Trends and challenges. Récupéré le 5 janvier 2026 de <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/2e90c833-8e84-46f2-a675-ea2d7afa4e24/content>
- Feng N, Feng H, Wang S, Punekar AS, Ladenstein R, Wang D-C, Zhang Q, Ding J et Liu W (2021)

- Structures of heat shock factor trimers bound to DNA. *IScience* 24:
- Finn RD, Clements J et Eddy SR (2011) HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research* 39: W29-W37.
- Fields, S., & Song, O. K. (1989). A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature*, 340(6230), 245-246.
- Fletcher C, Ripple WJ, Newsome T, Barnard P, Beamer K, Behl A, Bowen J, Cooney M, Crist E et Field C (2024) Earth at risk: An urgent call to end the age of destruction and forge a just and sustainable future. *PNAS nexus* 3: pgae106.
- Fragkostefanakis S, Schleiff E et Scharf K-D (2025) Back to the basics: the molecular blueprint of plant heat stress transcription factors. *Biological Chemistry*
- Friedrich T, Oberkofler V, Trindade I, Altmann S, Brzezinka K, Lämke J, Gorke M, Kappel C, Sokolowska E et Skirycz A (2021) Heteromeric HSFA2/HSFA3 complexes drive transcriptional memory after heat stress in Arabidopsis. *Nature communications* 12: 3426.
- Fu X, Richards DE, Fleck B, Xie D, Burton N et Harberd NP (2004) The Arabidopsis mutant sleepy1gar2-1 protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *The Plant Cell* 16: 1406-1418.
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Katsumi M, Phinney BO, Gaskin P, MacMillan J et Takahashi N (1988) The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (D8) of maize accumulates native gibberellins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 9031-9035.
- Fukazawa J, Ohashi Y, Takahashi R, Nakai K et Takahashi Y (2021) DELLA degradation by gibberellin promotes flowering via GAF1-TPR-dependent repression of floral repressors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 33: 2258-2272.
- Gagne JM, Downes BP, Shiu S-H, Durski AM et Vierstra RD (2002) The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proceedings of the national academy of sciences* 99: 11519-11524.
- Ganjave SD, Srivastava M, Nakrani P, Mishra V et Wangikar PP (2025) Effect of thioredoxin tag, oxidizing environment, and temperature on the global metabolome of E. coli strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1-18.
- Gao J, Zhang R, Zheng L, Song L, Ji M, Li S, Wang J, Yang J, Kang G et Zhang P (2023) Blue light receptor CRY1 regulates HSFA1d nuclear localization to promote plant thermotolerance. *Cell reports* 42:
- Gao P, Yoo S-H, Lee K-J, Rosensweig C, Takahashi JS, Chen BP et Green CB (2013) Phosphorylation of the cryptochrome 1 C-terminal tail regulates circadian period length. *Journal of Biological Chemistry* 288: 35277-35286.

- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD et Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Dans *The proteomics protocols handbook*.
- Goett-Zink L et Kottke T (2021) Plant cryptochromes illuminated: a spectroscopic perspective on the mechanism. *Frontiers in Chemistry 9*: 780199.
- Goett-Zink L, Toschke AL, Petersen J, Mittag M et Kottke T (2021) C-terminal extension of a plant cryptochrome dissociates from the β -sheet of the flavin-binding domain. *The journal of physical chemistry letters 12*: 5558-5563.
- Gomi K, Sasaki A, Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Kitano H et Matsuoka M (2004) GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *The Plant Journal 37*: 626-634.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z-L, Powers SJ, Gong F, Phillips AL, Hedden P et Sun T-p (2006) Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in Arabidopsis. *The Plant Cell 18*: 3399-3414.
- Guo M, Liu J-H, Ma X, Luo D-X, Gong Z-H et Lu M-H (2016) The plant heat stress transcription factors (HSFs): structure, regulation, and function in response to abiotic stresses. *Frontiers in plant science 7*: 114.
- Han X, Huang X et Deng XW (2020) The photomorphogenic central repressor COP1: conservation and functional diversification during evolution. *Plant Communications 1*:
- Hao Y, Zhang X, Liu Y, Ma M, Huang X, Liu H et Zhang P (2023) Cryo-EM structure of the CRY2 and CIB1 fragment complex provides insights into CIB1-mediated photosignaling. *Plant communications 4*:
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R et Fujita M (2013) Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences 14*: 9643-9684.
- He Z, Webster S et He SY (2022) Growth-defense trade-offs in plants. *Current Biology 32*: R634-R639.
- Hedden P (2003) The genes of the Green Revolution. *TRENDS in Genetics 19*: 5-9.
- Hedden P et Sponsel V (2015) A century of gibberellin research. *Journal of plant growth regulation 34*: 740-760.
- Hernández-García J, Briones-Moreno A, Dumas R et Blázquez MA (2019) Origin of gibberellin-dependent transcriptional regulation by molecular exploitation of a transactivation domain in DELLA proteins. *Molecular Biology and Evolution 36*: 908-918.
- Hernández-García J, Serrano-Mislata A, Lozano-Quiles M, Úrbez C, Nohales MA, Blanco-Touriñán N, Peng H, Ledesma-Amaro R et Blázquez MA (2024) DELLA proteins recruit the Mediator complex subunit MED15 to coactivate transcription in land plants. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences 121: e2319163121.

Heywood V, Casas A, Ford-Lloyd B, Kell S et Maxted N (2007) Conservation and sustainable use of crop wild relatives. *Agriculture, ecosystems & environment 121*: 245-255.

Hirano K, Asano K, Tsuji H, Kawamura M, Mori H, Kitano H, Ueguchi-Tanaka M et Matsuoka M (2010) Characterization of the molecular mechanism underlying gibberellin perception complex formation in rice. *The Plant Cell 22*: 2680-2696.

Hirano K, Nakajima M, Asano K, Nishiyama T, Sakakibara H, Kojima M, Katoh E, Xiang H, Tanahashi T et Hasebe M (2007) The GID1-mediated gibberellin perception mechanism is conserved in the lycophyte *Selaginella moellendorffii* but not in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell 19*: 3058-3079.

Hirano Y, Nakagawa M, Suyama T, Murase K, Shirakawa M, Takayama S, Sun T-p et Hakoshima T (2017) Structure of the SHR–SCR heterodimer bound to the BIRD/IDD transcriptional factor JKD. *Nature plants 3*: 1-10.

Hoecker U (2017) The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling. *Current opinion in plant biology 37*: 63-69.

Hua Z et Vierstra RD (2011) The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual review of plant biology 62*: 299-334.

Hussain A, Cao D, Cheng H, Wen Z et Peng J (2005) Identification of the conserved serine/threonine residues important for gibberellin-sensitivity of Arabidopsis RGL2 protein. *The Plant Journal 44*: 88-99.

Islam S, Park K, Xia J, Kwon E et Kim DY (2025) Structural insights of gibberellin-mediated DELLA protein degradation. *Molecular Plant*

Ito S et Klmura J (1931) Studies on the 'bakanae' disease of the Rice-plant.

Ivarsson Y et Jemth P (2019) Affinity and specificity of motif-based protein–protein interactions. *Current opinion in structural biology 54*: 26-33.

Jacob P, Hirt H et Bendahmane A (2017) The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant biotechnology journal 15*: 405-414.

Jaiswal V, Kakkar M, Kumari P, Zinta G, Gahlaut V et Kumar S (2022) Multifaceted roles of GRAS transcription factors in growth and stress responses in plants. *Iscience 25*: 105026

Ji Z, Belfield EJ, Zhang S, Bouvier J, Li S, Schnell J, Fu X et Harberd NP (2023) Evolution of a plant growth-regulatory protein interaction specificity. *Nature Plants 9*: 2059-2070.

Jmii S, Bouard W, Marcotte G, Plamondon J et Cappadocia L The CRY1-HsF predicted interaction interface serves as a molecular platform for bioengineering or selecting modulating mutants.

Frontiers in Plant Science 16: 1712571.

- Jmii S, Bouard W, Marcotte G, Plamondon J et Cappadocia L (2025) The CRY1-HsF predicted interaction interface serves as a molecular platform for bioengineering or selecting modulating mutants. *Frontiers in Plant Science* 16: 1712571.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A et Potapenko A (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *nature* 596: 583-589.
- Just A, Niemann N, Gnau P, Kock D, Heimerl T, Essen L-O, Batschauer A et Morgner N (2025) Mechanistic insight into the oligomerisation of Arabidopsis CRY1 and its inhibition by BIC1. *bioRxiv* 2025.2010. 2006.680677.
- Kerppola, T. K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu. Rev. Biophys.*, 37(1), 465-487
- Khoury CK, Brush S, Costich DE, Curry HA, De Haan S, Engels JM, Guarino L, Hoban S, Mercer KL et Miller AJ (2022) Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop diversity. *New Phytologist* 233: 84-118.
- Kim HW, Eletsky A, Gonzalez KJ, Van Der Wel H, Strauch E-M, Prestegard JH et West CM (2020) Skp1 dimerization conceals its F-box protein binding site. *Biochemistry* 59: 1527-1536.
- King KE, Moritz T et Harberd NP (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159: 767-776.
- Koornneef M et Van der Veen J (1980) Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *Theoretical and Applied genetics* 58: 257-263.
- Kumar A, Muthuramalingam P, Kumar R, Tiwari S, Verma L, Park S et Shin H (2025) Adapting Crops to Rising Temperatures: Understanding Heat Stress and Plant Resilience Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 26: 10426.
- Kumar M, Michael S, Alvarado-Valverde J, Mészáros B, Sámano-Sánchez H, Zeke A, Dobson L, Lazar T, Örd M et Nagpal A (2022) The eukaryotic linear motif resource: 2022 release. *Nucleic acids research* 50: D497-D508.
- Kumar N, Dale R, Kemboi D, Zeringue EA, Kato N et Larkin JC (2018) Functional analysis of short linear motifs in the plant cyclin-dependent kinase inhibitor SIAMESE. *Plant physiology* 177: 1569-1579.
- Lam D (2011) How the world survived the population bomb: Lessons from 50 years of extraordinary demographic history. *Demography* 48: 1231-1262.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF et McCoy JM (1993) A thioredoxin gene

- fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Bio/technology* 11: 187-193.
- LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA et McCoy JM (2000) [21] Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli. Dans *Methods in enzymology*. Vol 326. Elsevier.
- Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, Lo J, Harberd NP et Peng J (2002) Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes & development* 16: 646-658.
- Li H, Yao R, Ma S, Hu S, Li S, Wang Y, Yan C, Xie D et Yan J (2017) Efficient ASK-assisted system for expression and purification of plant F-box proteins. *The Plant Journal* 92: 736-743.
- Li P, Cheng H, Kumar V, Lupala CS, Li X, Shi Y, Ma C, Joo K, Lee J et Liu H (2022) Direct experimental observation of blue-light-induced conformational change and intermolecular interactions of cryptochrome. *Communications biology* 5: 1103.
- Li S, Zhao Y, Zhao Z, Wu X, Sun L, Liu Q et Wu Y (2016) Crystal structure of the GRAS domain of SCARECROW-LIKE7 in *Oryza sativa*. *The Plant Cell* 28: 1025-1034.
- Li Z, Zhang L, Wang A, Xu X et Li J (2013) Ectopic overexpression of SlHsfA3, a heat stress transcription factor from tomato, confers increased thermotolerance and salt hypersensitivity in germination in transgenic Arabidopsis. *PloS one* 8: e54880.
- Lin C (2000) Plant blue-light receptors. *Trends in plant science* 5: 337-342.
- Lin C et Shalitin D (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual review of plant biology* 54: 469-496.
- Liu HC, LIAO HT et CHARNG YY (2011) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant, cell & environment* 34: 738-751.
- Liu Q, Liu W, Niu Y, Wang T et Dong J (2024) Liquid–liquid phase separation in plants: Advances and perspectives from model species to crops. *Plant Communications* 5: 100663
- Liu S, Wang Q, Zhong M, Lin G, Ye M, Wang Y, Zhang J et Wang Q (2025) The CRY1–COP1–HY5 axis mediates blue-light regulation of Arabidopsis thermotolerance. *Plant Communications* 6: 101264
- Lu B, Li W, Zhang Y et Chen J (2025) Origin and evolution of the blue light receptor cryptochromes (CRY1/2) in aquatic angiosperms. *Plant Physiology* 197: kiae568.
- Lyon AS, Peebles WB et Rosen MK (2021) A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nature reviews Molecular cell biology* 22: 215-235.
- Ma L, Wang X, Guan Z, Wang L, Wang Y, Zheng L, Gong Z, Shen C, Wang J et Zhang D (2020)

- Structural insights into BIC-mediated inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Nature Structural & Molecular Biology* 27: 472-479.
- Magori S et Citovsky V (2011) Hijacking of the host SCF ubiquitin ligase machinery by plant pathogens. *Frontiers in plant science* 2: 87.
- McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun T-p et Steber CM (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *The Plant Cell* 15: 1120-1130.
- Medina E, Kim S-H, Yun M et Choi W-G (2021) Recapitulation of the function and role of ROS generated in response to heat stress in plants. *Plants* 10: 371.
- Miller, K. E., Kim, Y., Huh, W. K., & Park, H. O. (2015). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis: advances and recent applications for genome-wide interaction studies. *Journal of molecular biology*, 427(11), 2039-2055.
- Mirzabaev A, Kerr RB, Hasegawa T, Pradhan P, Wreford A, von der Pahlen MCT et Gurney-Smith H (2023) Severe climate change risks to food security and nutrition. *Climate Risk Management* 39: 100473.
- Murase K, Hirano Y, Sun T-p et Hakoshima T (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456: 459-463.
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S et Kobayashi M (2006) Identification and characterization of Arabidopsis gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880-889.
- Nelson SK et Steber CM (2016) Gibberellin hormone signal perception: down-regulating DELLA repressors of plant growth and development. *Annual Plant Reviews, Volume 49: Gibberellins, The* 153-188.
- Nelson SK et Steber CM (2017) Transcriptional mechanisms associated with seed dormancy and dormancy loss in the gibberellin-insensitive sly1-2 mutant of Arabidopsis thaliana. *PloS one* 12: e0179143.
- Network, Y. I. (2008). High-Quality binary protein interaction map of the. *science*, 1158684(104), 322.
- Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A et Scharf K-D (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell stress & chaperones* 6: 177.
- O'Shea C, Staby L, Bendsen SK, Tidemand FG, Redsted A, Willemoës M, Kragelund BB et Skriver K (2017) Structures and short linear motif of disordered transcription factor regions provide clues to the interactome of the cellular hub protein radical-induced cell death1. *Journal of Biological Chemistry* 292: 512-527.

- Ohad, N., & Yalovsky, S. (2010). Utilizing bimolecular fluorescence complementation (BiFC) to assay protein–protein interaction in plants. In *Plant developmental biology: methods and protocols* (pp. 347-358). Totowa, NJ: Humana Press.
- Ohama N, Kusakabe K, Mizoi J, Zhao H, Kidokoro S, Koizumi S, Takahashi F, Ishida T, Yanagisawa S et Shinozaki K (2016) The transcriptional cascade in the heat stress response of Arabidopsis is strictly regulated at the level of transcription factor expression. *The Plant Cell* 28: 181-201.
- Ohama N, Sato H, Shinozaki K et Yamaguchi-Shinozaki K (2017) Transcriptional regulatory network of plant heat stress response. *Trends in plant science* 22: 53-65.
- Palayam M, Ganapathy J, Guercio AM, Tal L, Deck SL et Shabek N (2021) Structural insights into photoactivation of plant Cryptochrome-2. *Communications Biology* 4: 28.
- Palmer I et Wingfield PT (2012) Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. *Current protocols in protein science* 70: 6.3. 1-6.3. 20.
- Parico GCG et Partch CL (2020) The tail of cryptochromes: an intrinsically disordered cog within the mammalian circadian clock. *Cell Communication and Signaling* 18: 182.
- Parico GCG, Perez I, Fribourgh JL, Hernandez BN, Lee H-W et Partch CL (2020) The human CRY1 tail controls circadian timing by regulating its association with CLOCK: BMAL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117: 27971-27979.
- Park J, Nguyen KT, Park E, Jeon J-S et Choi G (2013) DELLA proteins and their interacting RING finger proteins repress gibberellin responses by binding to the promoters of a subset of gibberellin-responsive genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* 25: 927-943.
- Pearce S, Saville R, Vaughan SP, Chandler PM, Wilhelm EP, Sparks CA, Al-Kaff N, Korolev A, Boulton MI et Phillips AL (2011) Molecular characterization of Rht-1 dwarfing genes in hexaploid wheat. *Plant physiology* 157: 1820-1831.
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ et Pelica F (1999) ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *nature* 400: 256-261.
- Phinney B (1983) The Biochemistry and physiology of gibberellins.
- Phokas A et Coates JC (2021) Evolution of DELLA function and signaling in land plants. *Evolution & Development* 23: 137-154.
- Pires DE, Ascher DB et Blundell TL (2014) mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures. *Bioinformatics* 30: 335-342.
- Piskurewicz U et Lopez-Molina L (2009) The GA-signaling repressor RGL3 represses testa rupture in response to changes in GA and ABA levels. *Plant signaling & behavior* 4: 63-65.

- Podolec R et Ulm R (2018) Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase. *Current opinion in plant biology* 45: 18-25.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D et Benfey PN (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal* 18: 111-119.
- Qin Q, Wang W, Guo X, Yue J, Huang Y, Xu X, Li J et Hou S (2014) Arabidopsis DELLA protein degradation is controlled by a type-one protein phosphatase, TOPP4. *PLoS Genetics* 10: e1004464.
- Ren S-x, Zou H-l, Cui J-w, Shen N, Bao H-y, Gan Q, Wang L, Lu Z-g et Jin B (2024) PeHSFA3 is essential for the heat-stress response of *Populus× euramericana*. *Industrial Crops and Products* 219: 119054.
- Resentini F, Orozco-Arroyo G, Cucinotta M et Mendes MA (2023) The impact of heat stress in plant reproduction. *Frontiers in plant science* 14: 1271644.
- Richter M et Fingerhut BP (2020) Regulatory impact of the C-terminal tail on charge transfer pathways in *Drosophila* cryptochrome. *Molecules* 25: 4810.
- Ritchie H. (2025) Dans Global cereal production has grown much faster than population in the last half-century. Récupéré le 5 janvier 2026 de <https://ourworldindata.org/data-insights/global-cereal-production-has-grown-much-faster-than-population-in-the-last-half-century>
- Robert X et Gouet P (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic acids research* 42: W320-W324.
- Santner A et Estelle M (2010) The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *The plant journal* 61: 1029-1040.
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong D-H, An G, Kitano H et Ashikari M (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896-1898.
- Sawada K (1912) Diseases of agricultural products in Japan. *Form Agric Rev* 63: 10-16.
- Scheer H, de Almeida C, Ferrier E, Simonnot Q, Poirier L, Pflieger D, Sement FM, Koechler S, Piermaria C et Krawczyk P (2021) The TUTase URT1 connects decapping activators and prevents the accumulation of excessively deadenylated mRNAs to avoid siRNA biogenesis. *Nature communications* 12: 1298.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S et Schmid B (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9: 676-682.

- Schmalen I, Reischl S, Wallach T, Klemz R, Grudziecki A, Prabu JR, Benda C, Kramer A et Wolf E (2014) Interaction of circadian clock proteins CRY1 and PER2 is modulated by zinc binding and disulfide bond formation. *Cell* 157: 1203-1215.
- Seneviratne SI, Zhang X, Adnan M, Badi W, Dereczynski C, Luca AD, Ghosh S, Iskandar I, Kossin J et Lewis S (2021) Weather and climate extreme events in a changing climate.
- Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC et Lin C (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417: 763-767.
- Shao K, Zhang X, Li X, Hao Y, Huang X, Ma M, Zhang M, Yu F, Liu H et Zhang P (2020) The oligomeric structures of plant cryptochromes. *Nature Structural & Molecular Biology* 27: 480-488.
- Sheerin DJ, Buchanan J, Kirk C, Harvey D, Sun X, Spagnuolo J, Li S, Liu T, Woods VA et Foster T (2011) Inter-and intra-molecular interactions of Arabidopsis thaliana DELLA protein RGL1. *Biochemical Journal* 435: 629-639.
- Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H et Matsuoka M (2008) Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* 456: 520-523.
- Silverstone AL, Jung H-S, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y et Sun T-p (2001) Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *The Plant Cell* 13: 1555-1566.
- Song C, Chung WS et Lim CO (2016) Overexpression of heat shock factor gene HsfA3 increases galactinol levels and oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Molecules and Cells* 39: 477-483.
- Sorger PK et Nelson HC (1989) Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59: 807-813.
- Stavang JA, Gallego-Bartolomé J, Gómez MD, Yoshida S, Asami T, Olsen JE, García-Martínez JL, Alabadi D et Blázquez MA (2009) Hormonal regulation of temperature-induced growth in Arabidopsis. *The Plant Journal* 60: 589-601.
- Sun P, Tropea JE et Waugh DS (2010a) Enhancing the solubility of recombinant proteins in Escherichia coli by using hexahistidine-tagged maltose-binding protein as a fusion partner. *Heterologous gene expression in E coli: methods and protocols* 259-274.
- Sun T et Kamiya Y (1994) The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell* 6: 1509-1518.
- Sun X, Jones WT, Harvey D, Edwards PJ, Pascal SM, Kirk C, Considine T, Sheerin DJ, Rakonjac J et Oldfield CJ (2010b) N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of interaction with GID1/gibberellic acid receptors. *Journal of Biological Chemistry* 285: 11557-11571.

- Suzuki H, Park SH, Okubo K, Kitamura J, Ueguchi-Tanaka M, Iuchi S, Katoh E, Kobayashi M, Yamaguchi I et Matsuoka M (2009) Differential expression and affinities of Arabidopsis gibberellin receptors can explain variation in phenotypes of multiple knock-out mutants. *The Plant Journal* 60: 48-55.
- Tal A (2025) The Environmental Impacts of Overpopulation. *Encyclopedia* 5: 45.
- Thöing C, Oldemeyer S et Kottke T (2015) Microsecond deprotonation of aspartic acid and response of the α/β subdomain precede C-terminal signaling in the blue light sensor plant cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* 137: 5990-5999.
- Thomas SG et Sun T-p (2004) Update on gibberellin signaling. A tale of the tall and the short. *Plant physiology* 135: 668-676.
- Tomita M (2024) Genomics-Driven Development of Jukkoku_sd1-introgressed Isogenic Rice Koshihikari USDA 201000072. *Crop Breeding, Genetics and Genomics* 6: e240002. 10.20900/cbgg20240002.
- Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR et Sun T-p (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant physiology* 135: 1008-1019.
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GT, Hedden P, Bhalerao R et Bennett MJ (2008) Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nature cell biology* 10: 625-628.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T-y, Hsing Y-iC, Kitano H et Yamaguchi I (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698.
- UN DESA (2022) Dans World Population Prospects 2022. Récupéré le 5 janvier 2026 de https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf
- Van De Velde K, Thomas SG, Heyse F, Kaspar R, Van Der Straeten D et Rohde A (2021) N-terminal truncated RHT-1 proteins generated by translational reinitiation cause semi-dwarfing of wheat Green Revolution alleles. *Molecular Plant* 14: 679-687.
- Von Arnim A, Deng X-W et Stacey M (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 221: 35-43.
- von Der Goltz J, Dar A, Fishman R, Mueller ND, Barnwal P et McCord GC (2020) Health impacts of the green revolution: Evidence from 600,000 births across the developing world. *Journal of health economics* 74: 102373.
- Wang F et Deng XW (2011) Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell research* 21: 1286-1294.

- Wang Q, Zuo Z, Wang X, Gu L, Yoshizumi T, Yang Z, Yang L, Liu Q, Liu W et Han Y-J (2016) Photoactivation and inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Science* 354: 343-347.
- Wang X, Jiang B, Gu L, Chen Y, Mora M, Zhu M, Noory E, Wang Q et Lin C (2021) A photoregulatory mechanism of the circadian clock in Arabidopsis. *Nature plants* 7: 1397-1408.
- Wang X et Lin C (2025) The two action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* 30: 775-791.
- Wang X, Wang Q, Han YJ, Liu Q, Gu L, Yang Z, Su J, Liu B, Zuo Z et He W (2017) A CRY–BIC negative-feedback circuitry regulating blue light sensitivity of Arabidopsis. *The Plant Journal* 92: 426-436.
- Wang X, Wang Q, Nguyen P et Lin C (2014) Cryptochrome-mediated light responses in plants. Dans *The enzymes*. Vol 35. Elsevier.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C et Bordoli L (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research* 46: W296-W303.
- Wen C-K et Chang C (2002) Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *The Plant Cell* 14: 87-100.
- Wild M, Davière J-M, Cheminant S, Regnault T, Baumberger N, Heintz D, Baltz R, Genschik P et Achard P (2012) The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *The Plant Cell* 24: 3307-3319.
- Xu P, Chen H, Li T, Xu F, Mao Z, Cao X, Miao L, Du S, Hua J et Zhao J (2021) Blue light-dependent interactions of CRY1 with GID1 and DELLA proteins regulate gibberellin signaling and photomorphogenesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 33: 2375-2394.
- Xu P, Guo Q, Pang X, Zhang P, Kong D et Liu J (2020) New insights into evolution of plant heat shock factors (Hsfs) and expression analysis of tea genes in response to abiotic stresses. *Plants* 9: 311.
- JSTOR. (2022) Dans IPCC special report on climate change and land. Récupéré le 5 janvier 2026
- Yang H-Q, Wu Y-J, Tang R-H, Liu D, Liu Y et Cashmore AR (2000) The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103: 815-827.
- Yang J, Li L, Li X, Zhong M, Li X, Qu L, Zhang H, Tang D, Liu X et He C (2023) The blue light receptor CRY1 interacts with FIP37 to promote N⁶-methyladenosine RNA modification and photomorphogenesis in Arabidopsis. *New Phytologist* 237: 840-854.
- Yang Z, Liu B, Su J, Liao J, Lin C et Oka Y (2017) Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants. *Photochemistry and Photobiology* 93: 112-127.

- Yano K, Aya K, Hirano K, Ordonio RL, Ueguchi-Tanaka M et Matsuoka M (2015) Comprehensive gene expression analysis of rice aleurone cells: probing the existence of an alternative gibberellin receptor. *Plant Physiology* 167: 531-544.
- Yoshida H et Matsuoka M (2025) The molecular structure of the master growth regulator in plants emerges into the spotlight. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 122: e2519807122.
- Yoshida H, Tanimoto E, Hirai T, Miyanoiri Y, Mitani R, Kawamura M, Takeda M, Takehara S, Hirano K et Kainosho M (2018) Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E7844-E7853.
- Yoshida T, Ohama N, Nakajima J, Kidokoro S, Mizoi J, Nakashima K, Maruyama K, Kim J-M, Seki M et Todaka D (2011a) Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression. *Molecular Genetics and Genomics* 286: 321-332.
- Yoshida Y, Murakami A et Tanaka K (2011b) Skp1 stabilizes the conformation of F-box proteins. *Biochemical and biophysical research communications* 410: 24-28.
- Yu J, Du T, Zhang P, Ma Z, Chen X, Cao J, Li H, Li T, Zhu Y et Xu F (2024) Impacts of high temperatures on the growth and development of rice and measures for heat tolerance regulation: A review. *Agronomy* 14: 2811.
- Yu X, Sayegh R, Maymon M, Warpeha K, Klejnot J, Yang H, Huang J, Lee J, Kaufman L et Lin C (2009) Formation of nuclear bodies of Arabidopsis CRY2 in response to blue light is associated with its blue light-dependent degradation. *The Plant Cell* 21: 118-130.
- Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ et Pagano M (2002) Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416: 703-709.
- Zhong M, Zeng B, Tang D, Yang J, Qu L, Yan J, Wang X, Li X, Liu X et Zhao X (2021) The blue light receptor CRY1 interacts with GID1 and DELLA proteins to repress GA signaling during photomorphogenesis in Arabidopsis. *Molecular Plant* 14: 1328-1342.
- Zhu M-D, Zhang M, Gao D-J, Zhou K, Tang S-J, Zhou B et Lv Y-M (2020) Rice OsHSFA3 gene improves drought tolerance by modulating polyamine biosynthesis depending on abscisic acid and ROS levels. *International journal of molecular sciences* 21: 1857.
- Zoltowski BD, Vaidya AT, Top D, Widom J, Young MW et Crane BR (2011) Structure of full-length Drosophila cryptochrome. *Nature* 480: 396-399.