Évaluation de la fluidité de la membrane plasmique avec la sonde fluorescente di-4-ANEPPDHQ

Adaptation de la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) sur cellules végétales en suspension

Christophe Der [1]

Résumé : Au cours de l'interaction entre plantes et microorganismes, la membrane plasmique joue un rôle essentiel dans l'organisation précoce des mécanismes de réactions de défense mises en place par la plante. L'équipe *Dynamique membranaire et réponse aux stress biotiques*, de l'UMR *Plante-Microbe-Environnement*, s'intéresse aux modifications des propriétés du plasmalemme des cellules végétales dans ce type d'interactions. La fluidité membranaire est une de ces propriétés. La technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser, a été adaptée à l'étude des variations de la fluidité de la membrane plasmique de cellules BY-2 de tabac en suspension, marquées par une sonde fluorescente, la di-4-ANEPPDHQ, s'insérant dans un des feuillets de la membrane plasmique. Nous proposons ici un protocole optimisé d'acquisition et d'analyse des données issues de cette méthodologie FRAP.

Mots-clés : FRAP, fluidité membranaire, cellules BY-2, membrane plasmique, di-4-ANEPPDHQ

Introduction

La diminution de l'utilisation des intrants et le développement de nouvelles méthodes culturales plus respectueuses de l'environnement passent par une meilleure connaissance des mécanismes de réactions de défense développés par les plantes quand elles sont attaquées par des agents pathogènes.

Au cours de ces interactions entre plantes et microorganismes, la membrane plasmique est l'un des principaux acteurs de la mise en place des étapes précoces de réactions de défense de la plante entière. En effet, cette membrane ne constitue pas seulement une frontière entre le milieu extracellulaire et intracellulaire, elle joue aussi un rôle crucial dans la détection des modifications environnementales et dans la transmission de l'information intracellulaire. Des molécules de microorganismes peuvent être ainsi reconnues au niveau du plasmalemme de l'hôte et déclencher toute une série de réactions, permettant la mise en place d'une résistance des plantes vis-à-vis des agresseurs (Boller et Felix, 2009).

De par son organisation, la membrane plasmique est une structure très dynamique. C'est pourquoi l'équipe *Dynamique membranaire et réponse aux stress biotique*s de l'UMR *plante-microbe-environnement*, s'intéresse aux conséquences des interactions entre les cellules végétales et les microorganismes sur les propriétés de la membrane plasmique, et en particulier sur la fluidité membranaire.

[1] UMR1088 - PME - plante microbe environnement - INRA –F-21065 Dijon ✉ christophe.der@dijon.inra.fr

Pour évaluer la fluidité membranaire, nous avons suivi la mobilité latérale d'une molécule fluorescente, la di-4-ANEPPDHQ, par des expériences de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Fluorescent recovery after photobleaching ou FRAP).
Pour la mise en œuvre de cette technique, il a été nécessaire de mettre au point un protocole qui prend en compte les propriétés de la sonde fluorescente et permet d'éviter les difficultés inhérentes aux caractéristiques de notre modèle d'étude : des cellules BY-2 de tabac cultivées en suspension, sous agitation et non-adhérentes.

Nous décrivons ici un protocole d'acquisition et d'analyse des données de FRAP, utilisables sur des cellules végétales en suspension.

1. Matériels et méthodes

1.1 Culture des cellules

Les cellules de *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2) sont cultivées dans le milieu Murashige et Skoog (Murashige *et al*., 1962), pH 5.6 complété avec 1 $mg.l^{-1}$ de thiamine-HCl, 0,2 $mg.l^{-1}$ d'acide 2,4 dichlorophenylacetique, 100 $mg.l^{-1}$ myo-inositol, 30 $g.l^{-1}$ de sucrose, 200 $mg.l^{-1}$ de KH_2PO_4 et 2 $g.l^{-1}$ de MES, sous lumière continue (200 $\mu E\ m^{-2}\ sec^{-1}$) et sous agitation rotative (140 rpm).

1.2 Microscope confocal à balayage laser

Nous avons utilisé un microscope droit confocal à balayage laser Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un laser Argon (longueur d'onde d'excitation 488 nm). Les images sont réalisées avec un objectif HCX PC apo CS 40x/1.25-0.75 à immersion à huile. L'émission de fluorescence est récupérée dans une plage de longueur d'ondes de 510 à 700 nm.

1.3 Sonde fluorescente : la di-4-ANEPPDHQ

La di-4-ANEPPDHQ ou 1-[2-Hydroxy-3-(N,N-di-methyl-N-hydroxyethyl) ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-napthyl] vinyl] pyridinium dibromide est une sonde styryl qui a été développée pour détecter des changements de potentiel transmembranaire (Obaid *et al.*, 2004). Elle est aussi utilisée pour mettre en évidence des domaines lipidiques membranaires enrichis en stérols (Jin *et al.*, 2006 ; Roche *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009).
Sa haute affinité pour les membranes lui permet de se charger facilement dans la membrane plasmique, en s'insérant dans l'un des feuillets. Sa double charge positive retardant le passage du feuillet externe au feuillet interne, l'internalisation cellulaire de cette sonde n'est pas immédiate (Jin *et al.*, 2006). Le marquage se fait donc en quelques secondes et de façon spécifique à la membrane plasmique (**figure 1**).
Du point de vue de sa fluorescence, cette molécule peut être excitée avec un simple photon dans le bleu (Jin *et al.*, 2006). Elle n'est pratiquement pas fluorescente en dehors de la membrane plasmique (Jin *et al.*, 2006), d'où son bon ratio signal/bruit. Dans les cellules BY2 équilibrées dans le milieu I2 (§ 1.4), avec une excitation au laser argon à 488 nm, le pic d'émission se situe entre 570 et 590 nm. Dans nos expériences, pour éviter les perturbations spectrales de la sonde dues aux changements biophysiques de la membrane plasmique, nous avons choisi une bande d'émission assez large (510 à 700 nm).

La di-4-ANEPPDHQ (molecular probes) est préparée en solution stock à 1,5 mM dans du dyméthylsulfoxyde (DMSO), et utilisée à la concentration finale de 1,5 µM.

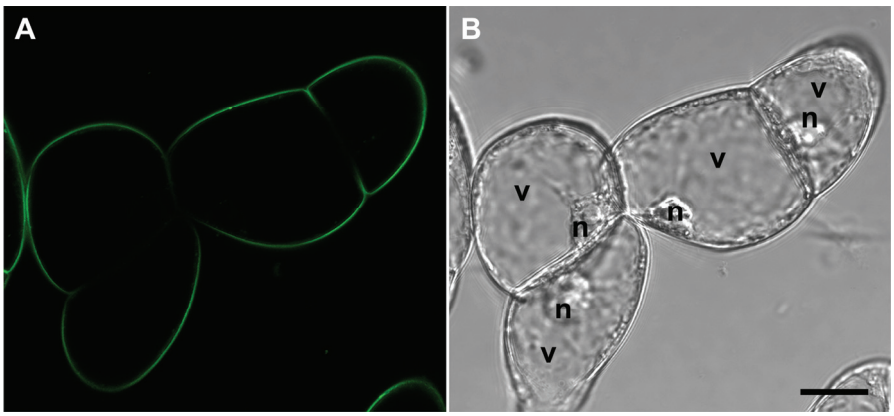

Figure 1 : *Marquage de cellules BY-2 de tabac avec la sonde di-4-ANEPPDHQ.*
(A) fluorescence de la sonde au niveau de la membrane plasmique, excitation à 488 nm ;
(B) les mêmes cellules analysées par contraste interférentiel différentiel (DIC).
(n) noyau, (v) vacuole, la barre représente 20 µm.

1.4 Préparation et marquage des cellules

Les expériences sont réalisées sur des cellules en suspension BY-2 de tabac âgées de 7 jours, filtrées et remises en suspension à raison de 1 g pour 10 ml de tampon I2 (tampon MES 2 mM, pH 5,8 contenant 175 mM mannitol, 0,5 mM $CaCl_2$, 0,5 mM K_2SO_4), sous agitation rotative (140rpm) pendant 3h.
Un ml de cellules est prélevé et marqué avec la sonde di-4-ANEPPDHQ 1,5µM durant environ 60 secondes. Les cellules sont ensuite centrifugées manuellement (avec une vitesse inférieure à 100 g). Le surnageant est éliminé et remplacé par du tampon I2.

1.5 Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ou FRAP

1.5.a Principe

La technique de FRAP consiste à photo-détruire les fluorophores (destruction de la fluorescence) d'une zone limitée **(figure 2A et B)**, par une courte et forte illumination laser puis de mesurer le retour de la fluorescence dans cette zone (**figure 2C**), à condition que les fluorophores puissent diffuser à travers l'échantillon. Ce retour de fluorescence est dû au remplacement des molécules photoblanchies par des molécules intactes venant des zones environnantes.
La cinétique de retour de fluorescence est représentée sous forme de courbes (**figure 3**) à partir desquelles sont déduits le temps de demi-recouvrement (temps mis pour retrouver la moitié de la fluorescence finale) et la fraction mobile (part des molécules fluorescentes diffusant).
Dans notre cas, la fluidité de la membrane plasmique est étudiée grâce à l'examen de la mobilité latérale (ou diffusion) d'une sonde fluorescente incorporée dans la membrane plasmique.

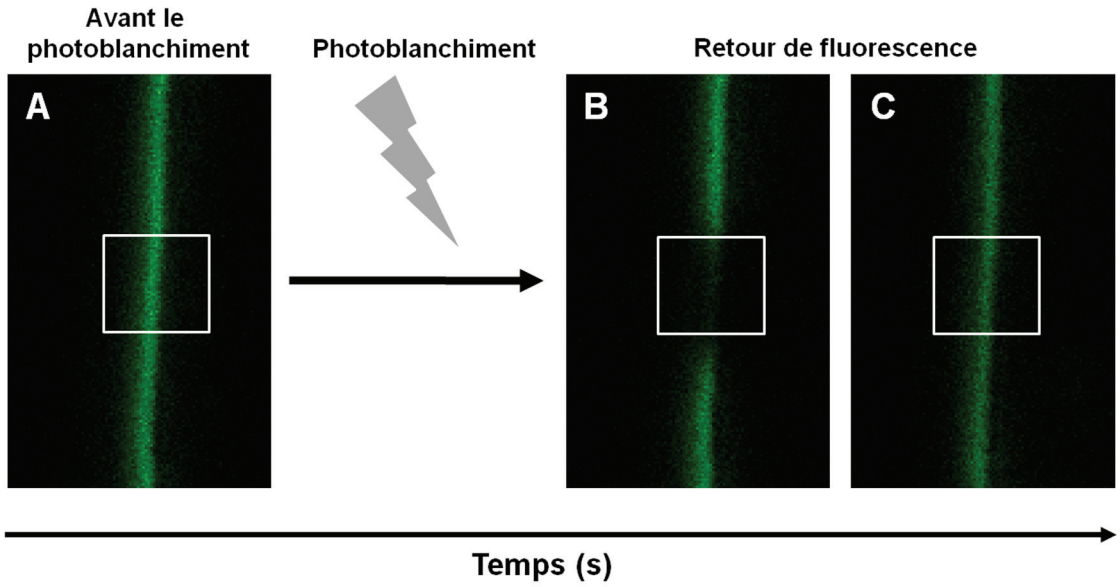

Figure 2 : *Principe du FRAP. La sonde fluorescente incorporée dans la membrane plasmique (A) est photoblanchie dans une zone donnée (B, carré à bordure blanche). Le retour de fluorescence dans cette zone est observé (C) dans le temps*

1.5.b Acquisition des données (tableau1)

Pour réaliser des expériences de FRAP et obtenir des données exploitables sur des cellules en suspension, il faut tenir compte de leur non-adhésion à la lame ou à la lamelle, et donc des possibles mouvements qui peuvent en résulter. Pour maintenir les cellules dans un état physiologique convenable, il est aussi nécessaire de limiter le temps passé entre lame et lamelle. Enfin, pour comparer les expériences entre elles, il est important qu'elles se déroulent toutes dans les mêmes conditions.

- **Réglage du laser**

Le laser est utilisé à deux intensités : l'une pour le photoblanchiment, l'autre pour l'acquisition des données sur le retour de fluorescence.
Dans le premier cas, l'intensité doit être assez forte pour détruire le fluorophore.
Dans le second cas, elle doit fournir les informations nécessaires tout en étant la plus faible possible, afin : i) d'éviter de photoblanchir l'échantillon par le balayage laser lors des prises de vue successives ; ii) de ne pas saturer le signal, ce qui perturberait le traitement des données,
Dans nos expériences, avec la concentration de sonde utilisée, une puissance de laser de 8 % est suffisante pour obtenir un bon marquage de la membrane plasmique (figure 1A).

- **Choix des cellules**

Il faut identifier les cellules d'intérêt et faire une mise au point dans la zone où la membrane plasmique apparaît dans une section la plus transversale possible (figure 2). Il est préférable de ne réaliser le FRAP que sur une ou deux cellules par lame afin d'éviter tout stress dû au temps passé entre lame et lamelle.

- **Choix de la zone d'intérêt (ROI : region of interest) à photoblanchir**

Afin de focaliser le laser sur une région donnée, et augmenter l'efficacité du blanchiment, nous réalisons un zoom x16 sur la membrane.
La ROI est définie comme un carré de 2 µm x 2 µm. Cette surface permet de prendre la largeur de la membrane et une bordure de chaque côté, pour limiter les effets d'éventuels mouvements latéraux de la cellule.
Une zone contrôle de même surface est délimitée. Cette zone ne sera pas photoblanchie, mais subira le même nombre de balayages laser, pour réaliser les prises de vue, que la zone blanchie. Elle servira donc de témoin pour évaluer le blanchiment dû aux prises de vue. Il est recommandé de la positionner sur la membrane plasmique d'une cellule indépendante, proche de la cellule subissant le photoblanchiment.

- **Vitesse de balayage et taille de l'image**

La vitesse de balayage du laser peut avoir une grande incidence sur les résultats : une vitesse trop lente peut augmenter le photoblanchiment, un balayage trop rapide donne un ratio signal sur bruit moins bon. Il est donc important de bien définir cette vitesse de balayage en choisissant judicieusement le format d'acquisition des images et le moyennage de celles-ci. Plus une image est grande, ou plus elle est moyennée, plus la durée de balayage augmente.

Tableau 1 : *Conditions expérimentales d'acquisition des données de FRAP sur cellules BY-2*

Objectif	40x NA 1.25 à immersion à huile
Zoom	x 16
Format des images	512 x 512 pixels
Longueur d'onde d'excitation	488 nm
Longueur d'onde d'émission	510-700 nm
Intensité du laser pour le pré et le post-blanchiment	8 %
Intensité du laser pour le blanchiment	100 %
Forme et taille de la ROI	Carré de 2 µm x 2 µm
Vitesse de balayage	800 Hz
Moyennage des images	aucun
Pré-blanchiment	5 images x 0,828 s
Blanchiment	1 image x 0,828 s
Premier Post-blanchiment	10 images x 1,828 s
Deuxième Post-blanchiment	10 images x 9,828s

- **Détermination du nombre de données à récupérer**

L'expérience de FRAP se décompose en 3 phases :

- le préblanchiment (**figure 2A**) permet de définir l'intensité de fluorescence de départ (Fi) dans les ROI ;

-le blanchiment (**figure 2B**) correspond au blanchiment proprement dit. Une des 2 zones est aveuglée en poussant la puissance laser au maximum ;

-le post-blanchiment (**figure 2C**) correspond au retour de la fluorescence dans la zone blanchie. Il est nécessaire d'optimiser le nombre d'images pour avoir le maximum d'informations sans continuer à photoblanchir les cellules par le nombre de prises de vue et d'éviter de laisser les cellules trop longtemps entre lame et lamelle. La première partie de la courbe est la plus importante, c'est à ce moment qu'il convient de récupérer le maximum de

données. Plus on s'approche du plateau (**figure 3**), plus les points peuvent être espacés. Nous avons donc défini 2 fréquences d'enregistrement des valeurs (**tableau 1**).

1.5.c Analyse des données

- **Estimation des paramètres**

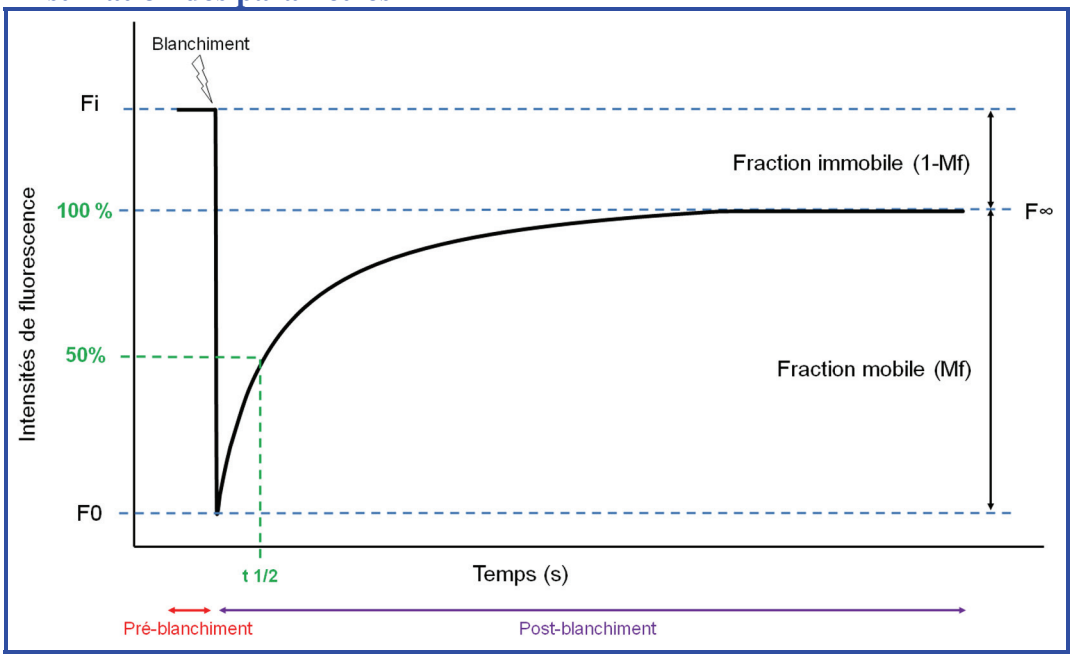

Figure 3 : *courbe de recouvrement de fluorescence. Fi, F0 et F∞ étant respectivement les intensités de fluorescence avant le blanchiment, immédiatement après le blanchiment et à l'équilibre, $t_{1/2}$ représente le temps de demi-recouvrement de la fluorescence.*

.le temps de demi-recouvrement ou $t_{1/2}$ correspond au temps nécessaire à la récupération de 50% de l'intensité au plateau (asymptote) de recouvrement de la fluorescence (F∞) (**figure 3**). La courbe expérimentale est ajustée (Feder *et al.*, 1996) à l'aide de la formule :

$$F(t) = (F0 + F\infty \times (t / t1/2)) / (1+(t / t1/2)) \quad (1)$$

On en déduit le F0, F∞ et $t_{1/2}$, F∞ correspondant au plateau du recouvrement de fluorescence, F0 étant l'intensité immédiatement après le blanchiment (**figure 3**).

.la fraction mobile ou Mf: certaines molécules fluorescentes ne diffusent pas, elles constituent la fraction immobile. La fraction mobile est donc représentée par : 1-fraction immobile. Elle est estimée par la formule :

$$Mf = (F\infty - F0) / (Fi - F0) \quad (2)$$

où Fi est l'intensité du pré-blanchiment (**figure 3**).

.la normalisation selon la méthode d'Axelrod *et al.* (1976) où le plateau est considéré à 100%. Elle permettra de comparer les courbes entre elles. Elle est calculée avec la formule :

$$Fn(t) = (F(t) - F0) / (F\infty - F0) \quad (3)$$

avec F(t) intensité de fluorescence au temps t dans la ROI blanchie.

2. Exemple de traitement d'une courbe

Les courbes présentées à la **figure 4A** ont été obtenues avec les conditions décrites dans la partie « matériels et méthodes ». Sur la courbe de la zone blanchie, la fluorescence chute après le blanchiment, puis revient régulièrement pour atteindre un plateau, alors que l'intensité de fluorescence dans la zone non-blanchie reste stable.
À partir de ces données, dans un premier temps, seule la partie correspondant au retour de la fluorescence est prise en compte. La courbe brute est alors ajustée avec la formule (1) (**figure 4B**). À partir de cette courbe ajustée, trois paramètres sont déduits : le F0, le F∞ et le $t_{1/2}$ (**figure 4C**). Avec les données brutes, le F0 et le F∞, la courbe peut être normalisée selon la formule (3) (**figure 4E**) et pourra ainsi être comparée à d'autres courbes. La fraction mobile est déduite à partir de la formule (2) (**figure 4D**).

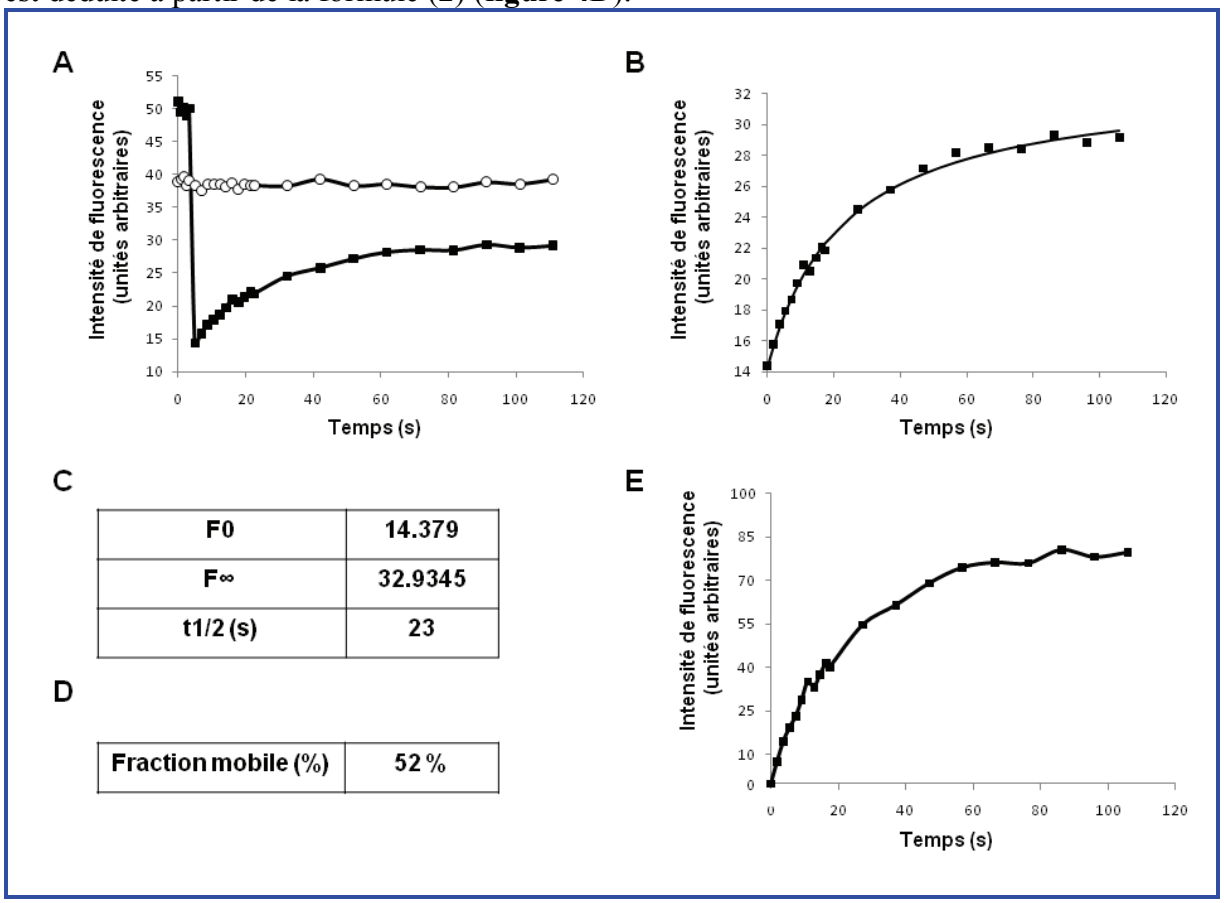

Figure 4 : *exploitation de données de FRAP. (A) données brutes, (○) zone témoin n'ayant pas subie de photo-blanchiment, (■) zone ayant été blanchie ; (B) courbe ajustée selon la formule (1) ; (C) paramètres déduits de la courbe ajustée, F0 pour l'intensité du premier point après le blanchiment, F∞ pour l'intensité au plateau, et $t_{1/2}$ pour le temps de demi-recouvrement de la fluorescence ; (D) fraction mobile calculée à partir des paramètres de la courbe et de la formule (2) ; (E) courbe normalisée par la formule (3)*

Conclusion

Le protocole décrit ici permet d'estimer la fluidité de la membrane plasmique des cellules BY-2 de tabac en suspension par la technique de FRAP.

En outre, de par ses propriétés, la sonde di-4-ANEPPDHQ s'avère être un bon marqueur pour ce type d'expérience : elle est stable, spécifique de la membrane plasmique et elle possède un bon ratio signal/bruit.
Toutefois, le FRAP est une méthode sensible à la moindre perturbation au cours de l'acquisition de données. Il convient donc de faire tous les contrôles nécessaires mentionnés et de répéter les expériences afin de s'assurer de leur reproductibilité.
Grâce à ce protocole, nous avons également pu étudier l'action de molécules, purifiées à partir de microorganismes, sur la membrane plasmique, telle la filipine III complexant les stérols (Bonneau *et al.*, 2010). À l'avenir, d'autres molécules pourront être testées sur des cellules en suspension, aussi bien sur notre modèle que sur des cellules autres que les BY-2.

Bibliographie

Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E., Webb W.W., (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophysical Journal 16: 1055-1069

Boller T., Felix G., (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual Review of Plant Biology 60: 379-406

Bonneau L., Gerbeau-Pissot P., Thomas D., Der C., Lherminier J., Bourque S., Roche Y., Simon-Plas F., (2010) Plasma membrane sterol complexation, generated by filipin, triggers signaling responses in tobacco cells. Biochimica et Biophysica Acta 1798 :2150-2159

Feder T.J., Brust-Mascher I., Slattery J.P., Baird B., Webb W.W., (1996) Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. Biophysical Journal 70: 2767-2773

Jin L., Millard A.C., Wuskell J.P., Dong X., Wu D., Clark H.A., Loew L.M., (2006) Characterization and application of a new optical probe for membrane lipid domains. Biophysical Journal. 90: 2563-2575

Liu P., Li R.L., Zhang L., Wang Q.L., Niehaus K., Baluska F., Samaj J., Lin J.X., (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. Plant Journal 60: 303-13

Murashige T., Skoog F., (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497

Obaid A.L., Loew L.M., Wuskell J.P., Salzberg B.M. (2004) Novel naphthylstyryl-pyridium potentiometric dyes offer advantages for neural network analysis. Journal of Neuroscience methods 134: 179-190

Roche Y., Gerbeau-Pissot P., Buhot B., Thomas D., Bonneau L., Gresti J., Mongrand S., Perrier-Cornet J.-M., Simon-Plas F. (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. FASEB Journal 22: 3980-3991