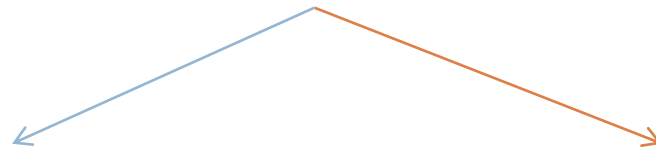


Cartographie de la fluidité des
membranes de
spores de *Bacillus subtilis* par imagerie
de fluorescence résolue dans le
temps

Pauline Loison, Neveen Hosny, Marina Kuimova,
Jean-Marie Perrier-Cornet

Microviscosité

- Pourquoi étudier la viscosité cellulaire?
 - La viscosité est un des paramètres majeurs déterminant la vitesse de diffusion et de réaction
 - Importance dans les processus biologiques (transport, signalisation,...)



Changement de viscosité membranaire (ou cytoplasmique): relié à des maladies et dysfonctionnement cellulaire (athérosclérose, diabète, cancer...)

Relation entre viscosité / intégrité membranaire et survie aux perturbations pour de nombreux microorganismes

Méthodes d'étude de la viscosité

□ Méthodes d'études à l'échelle cellulaire

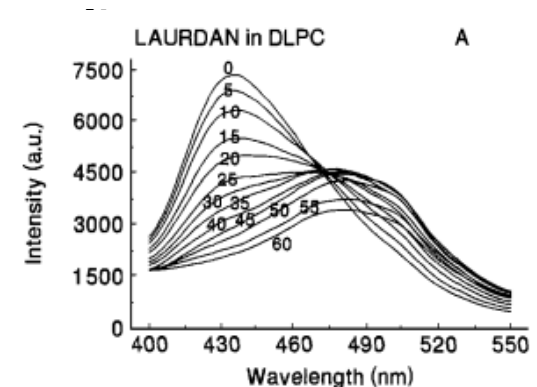
➤ *Basées sur la fluorescence:*

- Anisotropie de fluorescence
- Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)
- Spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS)

- Sondes sensibles à leur environnement
 - Laurdan, Rouge Nile, ... (sensible à la polarité, la phase lipidique, ...)
 - **rotors moléculaires (sensible à la viscosité)**

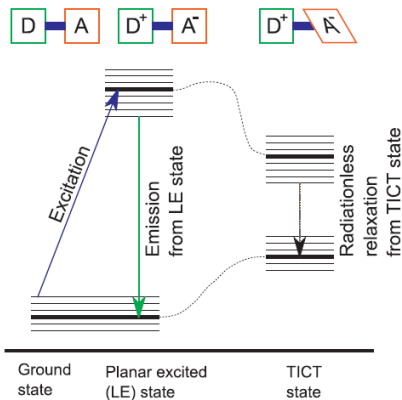
➤ *Autres méthodes:*

- Résonance paramagnétique électronique (ESR)
- Microscopie à force atomique (AFM)



Rotors moléculaires: principe

Rotor moléculaire = sondes fluorescentes qui ont la capacité de subir un mouvement intramoléculaire de rotation à l'état excité.



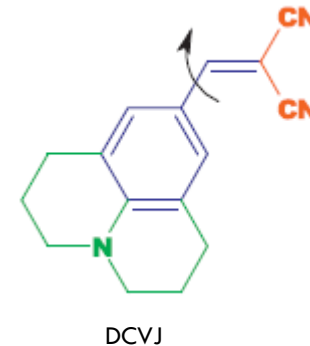
Extension du diagramme de Jablonski pour les rotors moléculaires (Haiddeker and Theodorakis, 2010)

Deux voies de désexcitations « concurrentes »:

- relaxation non fluorescente à partir de l'état de torsion (TICT)
- émission de fluorescence à partir de l'état excité « plan » (LE)

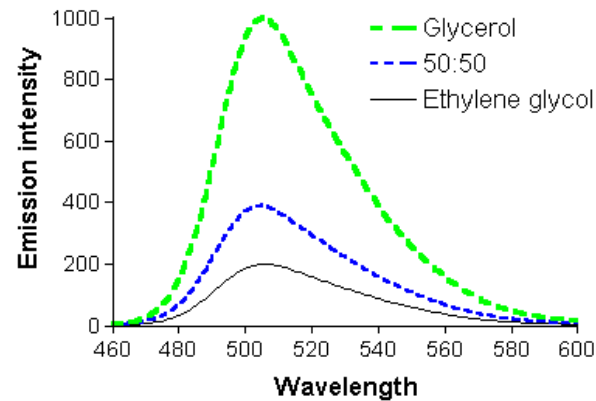
Solvants visqueux: ↗ barrière d'énergie entre état excité LE et état TICT → dépendance de la formation de l'état TICT par rapport à la microviscosité de l'environnement

→ le rendement quantique de fluorescence augmente dans les solvants de plus haute viscosité



Rotors moléculaires: principe

Ainsi → émission de fluorescence est dépendante de la viscosité de l'environnement:



Spectre d'émission du DCVJ dans des solutions de viscosités différentes (Haidekker et al, Chem & Biochem 2001)



Cependant: mesures basées sur l'intensité de fluorescence → incertitudes liées aux variations locales de concentration, de propriétés optiques du milieu,....

Approche
ratiométrique

Approche en
temps de vie

Rappels sur la fluorescence dans le temps

Fluorescence caractérisée par

→ Spectre d'émission

→ Temps de vie de fluorescence (τ) → temps moyen pendant lequel le fluorochrome reste à l'état excité avant de revenir à l'état fondamental. Apparent si un échantillon est excité par des impulsions lasers courtes ($< 10^{-9}$ s).

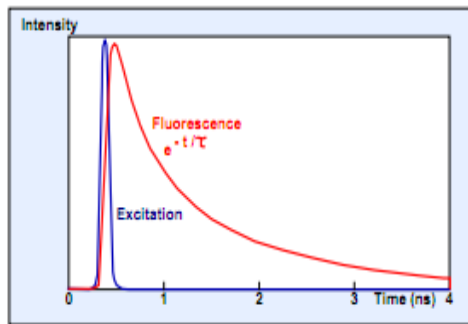


Fig. 1: Decay of the fluorescence (red) after excitation with a short light pulse (blue)

Source: Becker & Hickl, user manual FLIM system

L'imagerie par durée de vie de fluorescence (FLIM) permet de créer une cartographie de la viscosité dans un environnement donné

Varie selon le fluorophore

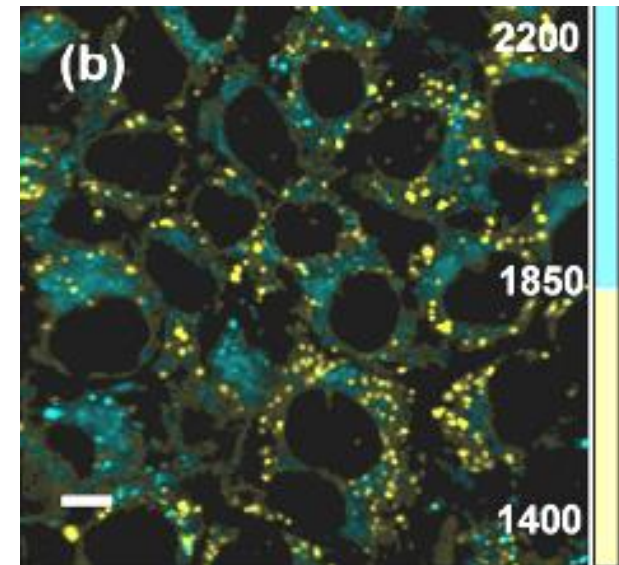
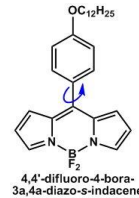
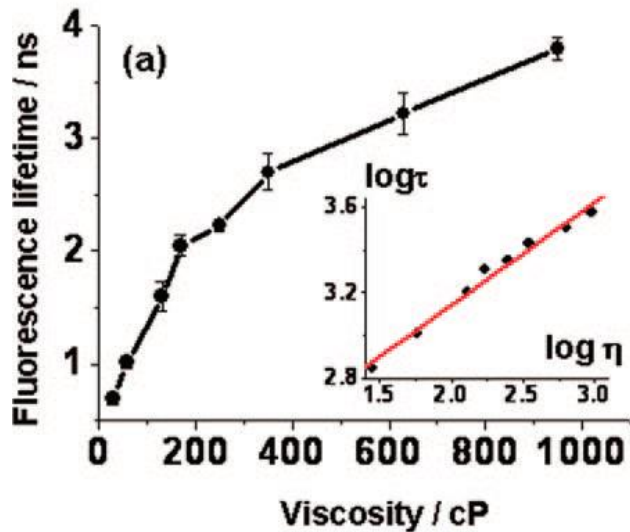
Varie selon l'environnement du fluorophore (pH,, **viscosité**...)

Indépendant de la concentration

Pour les rotors: bonne corrélation entre τ et viscosité

Exemples d'application: mesure de microviscosités intracellulaires

Kuimova et al., : développement d'un rotor moléculaire hydrophobe → mesure de la viscosité intracellulaire de cellules humaines(lignée SK-OV-3)



→ Temps de vie entre 1.4 et 2.2 ns → possibilité de différencier des organites intracellulaires : distribution « ponctuée » (≈ 160 cP) et domaine hydrophobe plus diffus dans le cytoplasme (≈ 260 cP)

→ Haute viscosité des organites → implication importante pour les vitesses de réaction intracellulaire

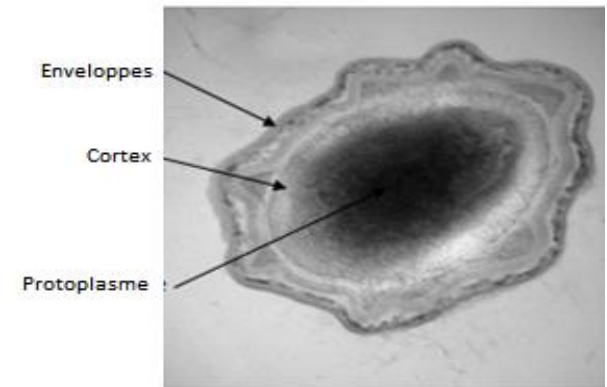
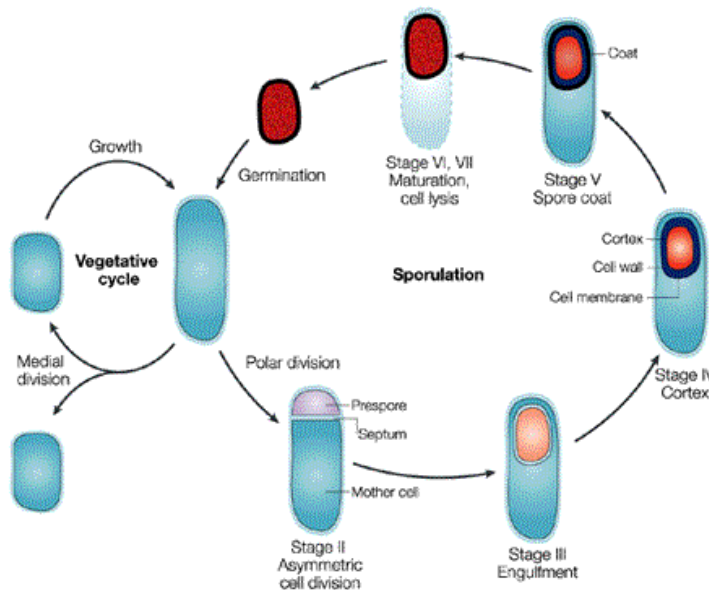
Application à la spore bactérienne

La sporulation

Environnement défavorable (stress nutritif,...)



Activation de la sporulation : résistance à de nombreux stress

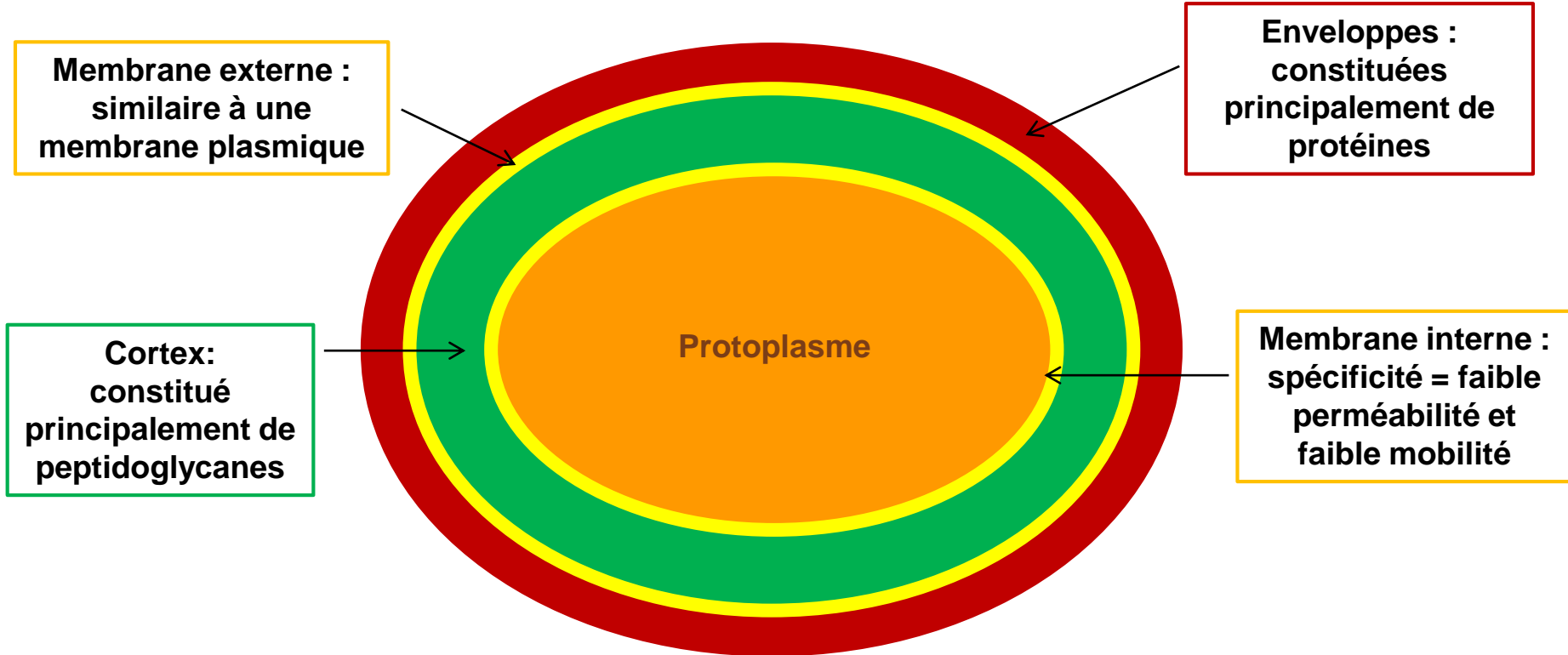


Spore de *Bacillus subtilis* (Données personnelles)

Nature Reviews | Microbiology

Schématisation de la sporulation et germination de *B. subtilis* (Errington, 2003)

Structure de la spore de *Bacillus subtilis*



Structure de la spore bactérienne (d'après Setlow *et al.*, 2004) Taille $\approx 1\mu\text{m}$

- Structure très compartimentée en relation avec son extrême résistance
 - Difficile d'obtenir des informations sur les structures les plus internes
 - Comment ces différentes structures évoluent en condition de stress ?

Nécessité de développer des nouveaux outils

Une structure difficile à marquer

□ Etudes déjà réalisées:

○ DPH :

Sur spores déjà formées: Spores plus « rigides » que cellules végétatives.
Quelles structures sont marquées, où se localise la sonde?

Ishihara et al., 1999, *Cell Biochemistry and Function*

○ FRAP :

Insertion de la sonde en cours de sporulation: Faible mobilité de la membrane interne. Pas de visualisation?

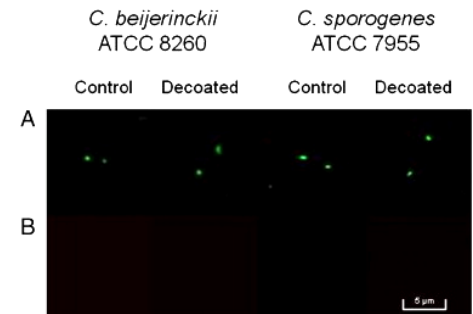
Cowan, A. E., et al., 2004, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

○ LAURDAN en biphoton (sur spores de *Clostridium*) :

Membrane interne= haut degré d'ordre des lipides, exclusion de l'eau

Hofstetter, S., et al., 2012, *Journal of Microbiological Methods*

Difficultés d'étude
Peu d'imagerie



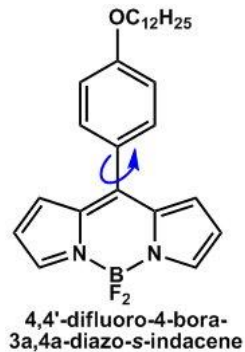
Utilisation d'un rotor moléculaire en temps de vie

- Signal indépendant de la concentration en sonde dans les structures
- Spore bactérienne constituée de nombreuses couches = Possibilité d'attribuer **une** viscosité à **une** structure
- Utilisation d'une sonde hydrophobe pour étudier au mieux les membranes de la spore

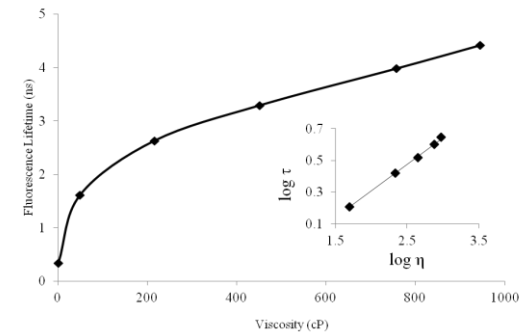
Cartographie de la viscosité des structures hydrophobes de la spore bactérienne

Application à la spore bactérienne

Collaboration avec le laboratoire de M. Kuimova : utilisation du rotor Bodipy C₁₂



Validation de l'utilisation de la sonde avec notre système FLIM (Système Picoquant relié au confocal Nikon)



- Impossibilité de marquer directement les spores : structures « imperméables »
→ Insertion de la sonde avant la sporulation pour atteindre les structures les plus internes

Insertion de la sonde

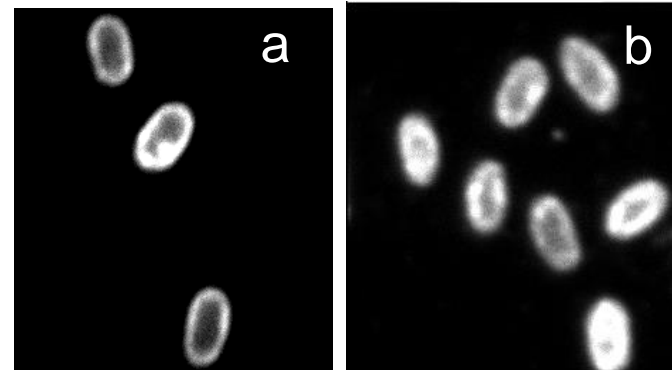
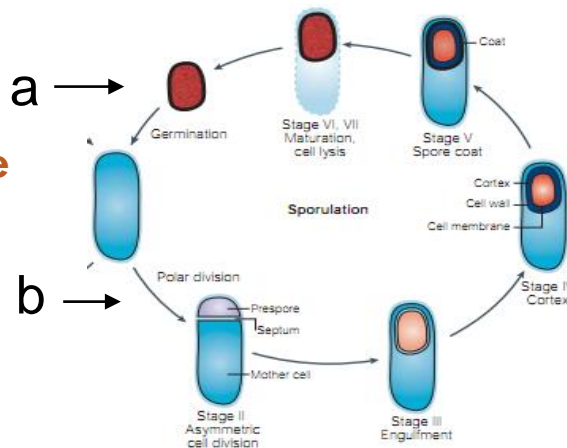
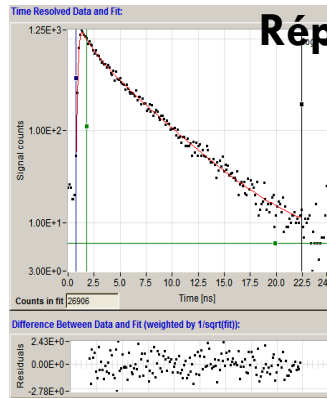
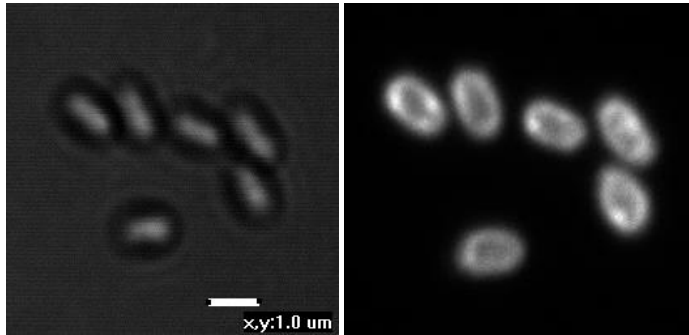
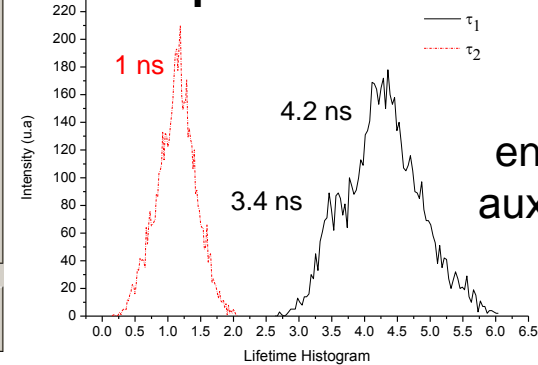


Image en intensité de spores marquées avant (b) ou après (a) la sporulation

Application à la spore bactérienne



Réponse biexponentielle



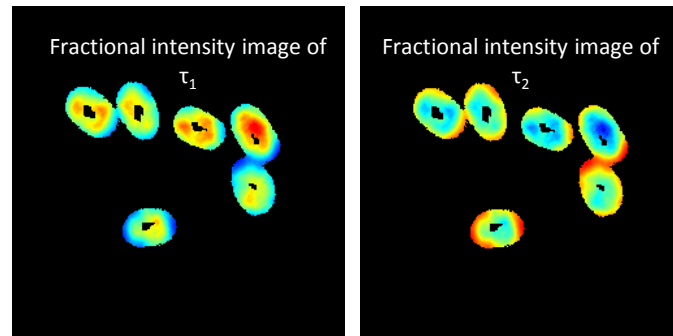
$2 \tau = 2$
environnements
aux viscosités \neq ?

τ_1 = temps de vie long
 τ_2 = temps de vie court

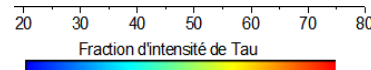
Cartographie de ces τ (τ_1
et τ_2) dans la spore



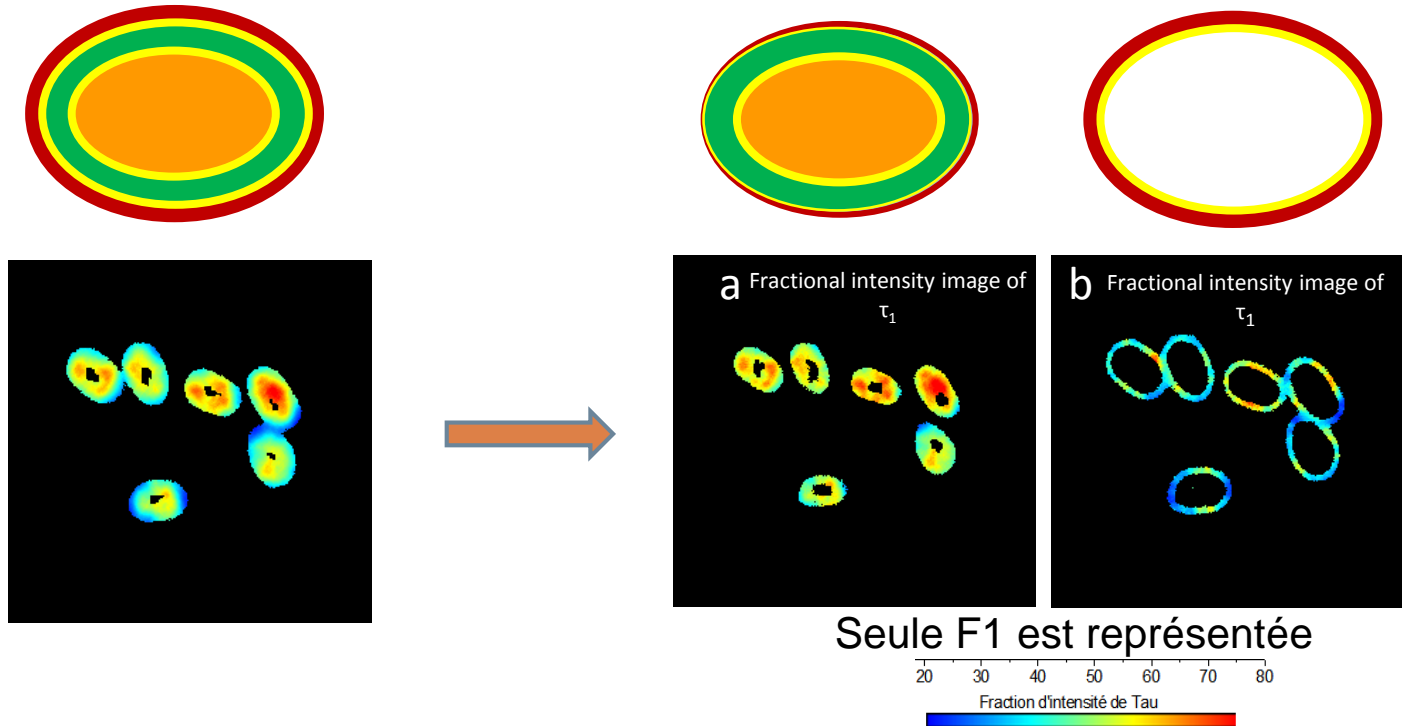
Fraction importante de τ_1
(F_1) localisée dans les
parties centrales



Fraction importante de τ_2
(F_2) localisée dans les
parties périphériques



Séparation des composantes par analyse d'images



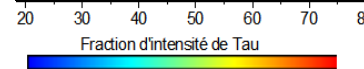
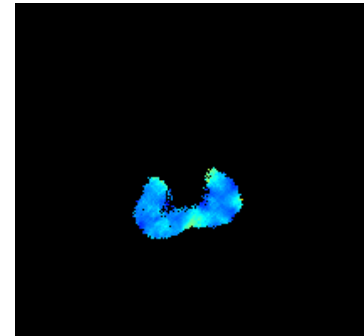
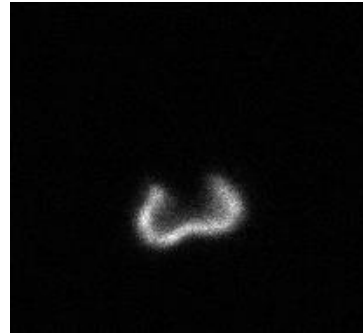
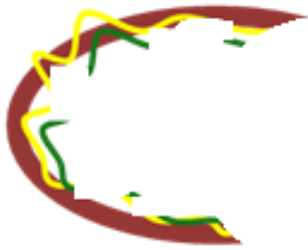
τ_1 : répartition forte dans la partie centrale et valeur inchangée (4.1 ns)
répartition faible dans la partie périphérique et valeur plus faible (3.2 ns)
→ **Relié aux deux membranes?**

τ_2 : répartition forte en périphérie , valeur inchangée (1 ns) → **lié aux enveloppes de la spore ?**

Utilisation de spores « modifiées »

❑ Valider les hypothèses soulevées par l'analyse d'image:

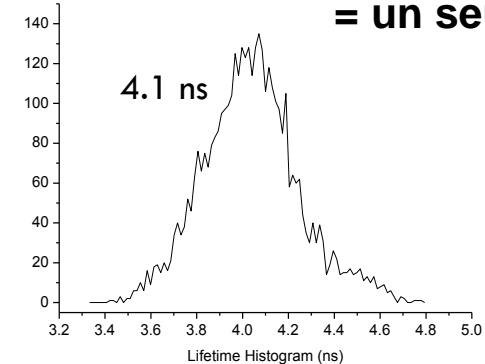
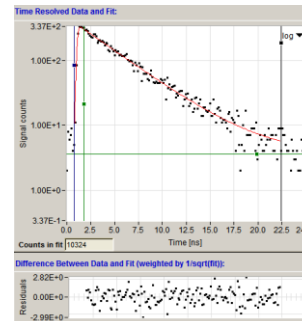
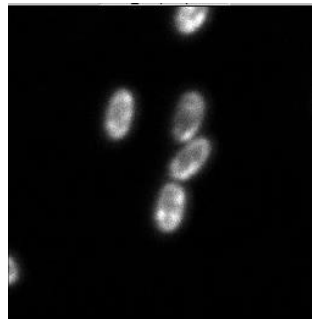
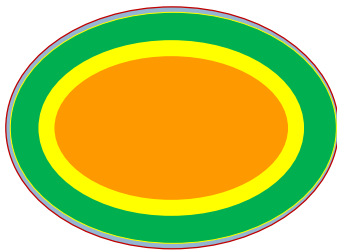
1) Résidus d'enveloppe:



Fraction de τ_1 (F1)
faible (F2 forte)



2) Utilisation de mutants produisant des spores sans enveloppe:



Réponse
monoexponentielle
= un seul τ !!

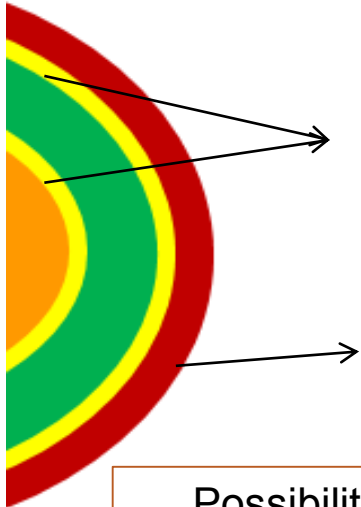
Utilisation de spores « modifiées »

- Enveloppe: τ_2 (court) est prédominant
- Spores sans enveloppe : 1 seul temps de vie \rightarrow valeur = τ_1 dans les spores entières

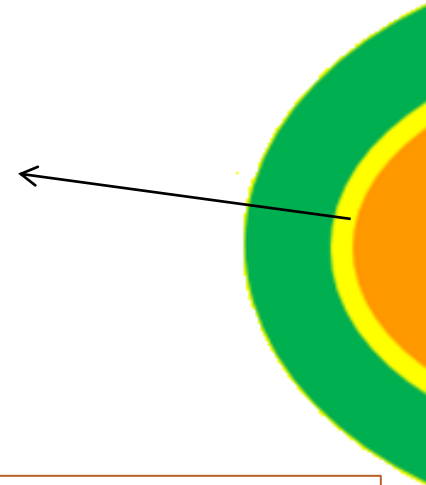
τ_2 serait lié aux enveloppes de la spore.
 τ_1 serait plutôt relié aux membranes avec 2 contributions (membrane externe et interne)



Spore entière



Spore mutante



τ ou τ_1 : sonde localisée dans les membranes :
Membrane interne = haute viscosité ($\approx 2x +$) que la membrane externe \rightarrow cohérente avec la faible perméabilité et mobilité de la membrane

τ_2 : sonde localisée dans les enveloppes .
Faible « viscosité » comparée aux membranes

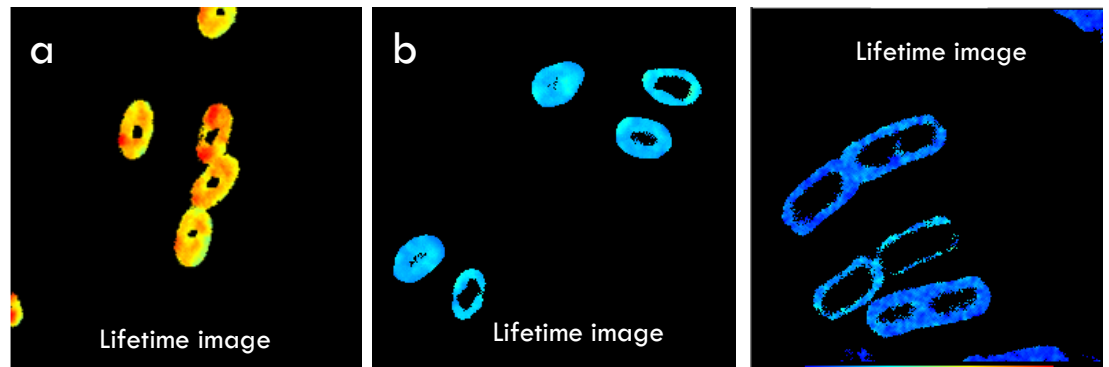
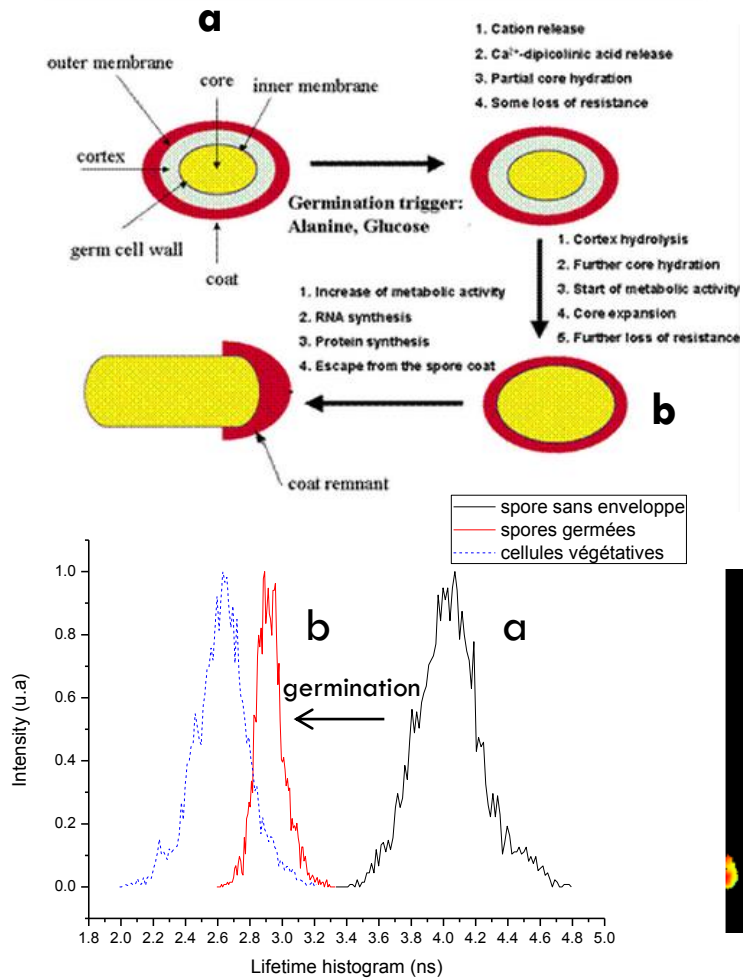
Possibilité d'attribuer et de visualiser des viscosités dans les structures sporales !

Evolution de la viscosité : germination

Ajout de germinants sur des **spores sans enveloppes** pour visualiser l'évolution de la viscosité

Diminution de la viscosité par ≈ 2.8

Retour à une viscosité permettant une plus importante mobilité et perméabilité

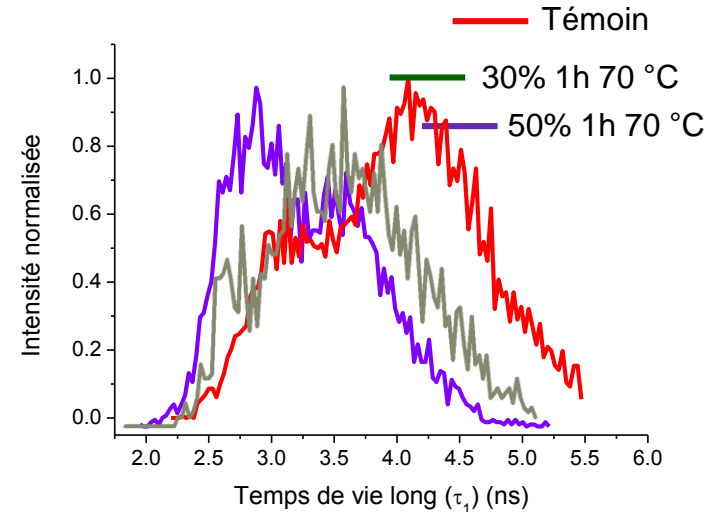
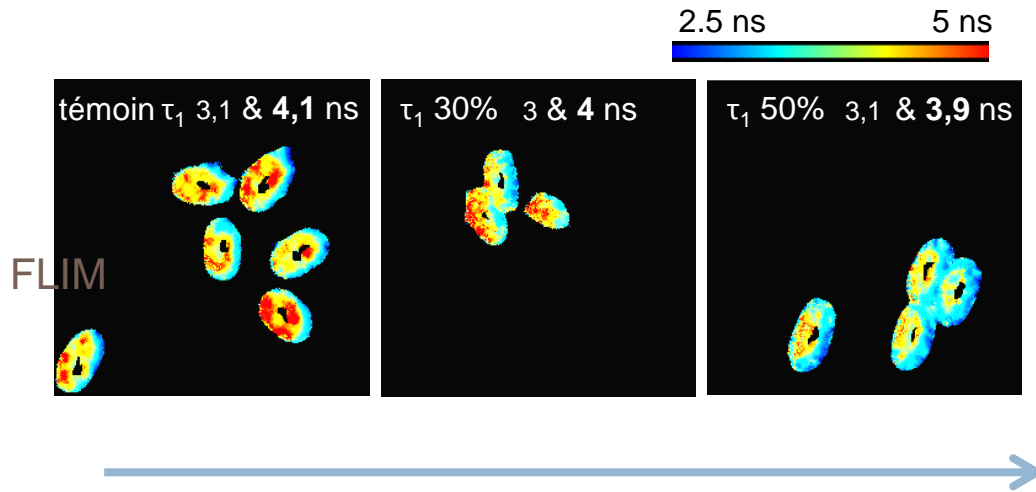


2.3 ns

4.6 ns

(cellules végétatives, marquées en croissance)

Action de l'éthanol à chaud



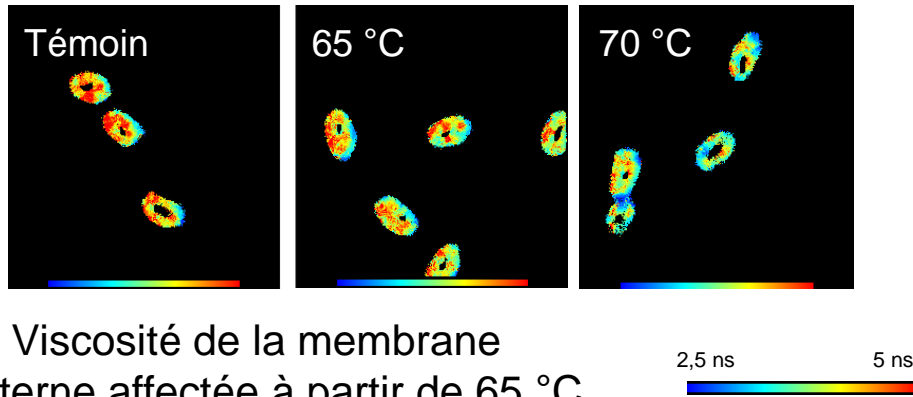
- Globalement ↗ de la viscosité membranaire
- ↘ de la proportion en valeur proche de 3 ns: 17% → 25% → 40%
- Désorganisation membranaire provoquée par l'éthanol
- Retour de la viscosité de la MI vers des valeurs plus proche d'une membrane classique

→ Relation avec la perméabilisation ?

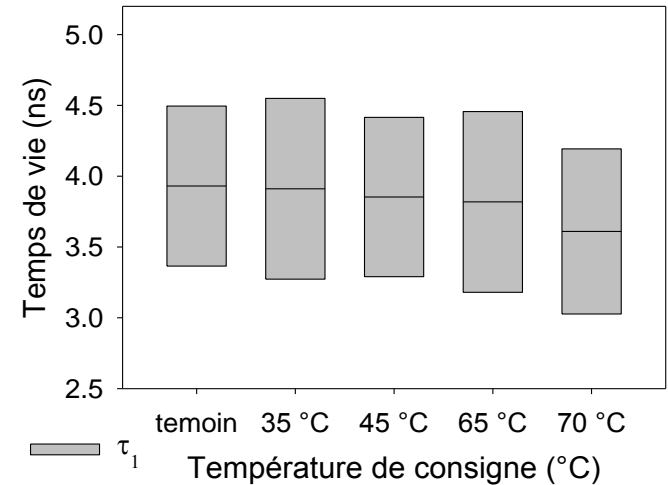
→ Reliée à une inactivation ?

Action de la température seule

20



➤ Viscosité de la membrane interne affectée à partir de 65 °C



- Température : - Peu d'effet sur la viscosité de la membrane interne
- Perméabilisation des structures externes (cortex) → modification structurale ?

Conclusions- perspectives

- Rotor moléculaire/FLIM = outil approprié pour étudier des viscosité dans des environnements biologiques : cellules / structures de la spore
- Permet de différentier des signaux sur des distances inférieures à résolution optique
- Possibilité de cartographier des environnements
- Spore : Structure interne possédant une haute viscosité = probablement la membrane interne → retour à une viscosité classique lors de la germination
 - Effet de stress connus pour perturber les barrières de perméabilités?
(Effet de l' éthanol par exemple)



Remerciements:



Pauline Loison



Marina Kuimova



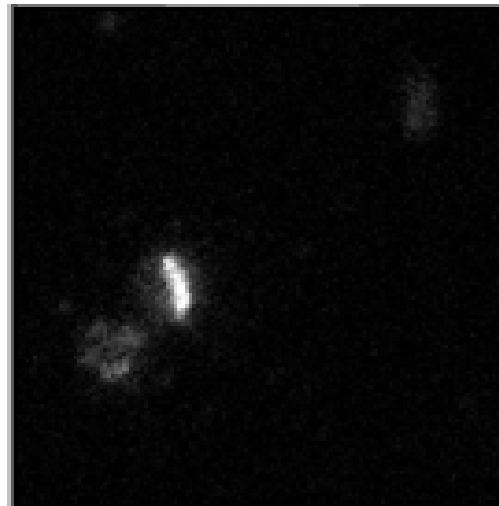
Neveen Hosny



Merci de votre attention



Spores entières



Spores mutantes sans
enveloppe