

Utilisation de la technique de FRAP pour évaluer la fluidité de la membrane plasmique de cellules végétales en suspension

5^{èmes} Journées Scientifiques et Techniques du Réseau des Microscopistes INRA, Dijon

13 Novembre 2014

Equipe Dynamique Membranaire et Interactions Plantes Microorganismes

UMR 1347 Agroécologie - Pôle Mécanismes et Gestions des Interactions Plantes Microorganismes



Agroécologie
Dijon
Unité de Recherche



PLAN

Contexte

Modèle d'étude
Thématique de l'équipe
Contraintes de l'expérimentation

Technique de Redistribution de Fluorescence après Photoblanchiment *Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)*

Principe
Choix de la sonde fluorescente
Préparation des cellules
Paramètres d'acquisition des données
Analyse des données

Résultats

Conclusions

CONTEXTE

MODELE TABAC / CRYPTOGEINE

Cryptogéine :

- sécrétée par un Oomycète *Phytophthora cryptogea*
- éliciteur protéique de réaction de défense chez le Tabac

CONTEXTE

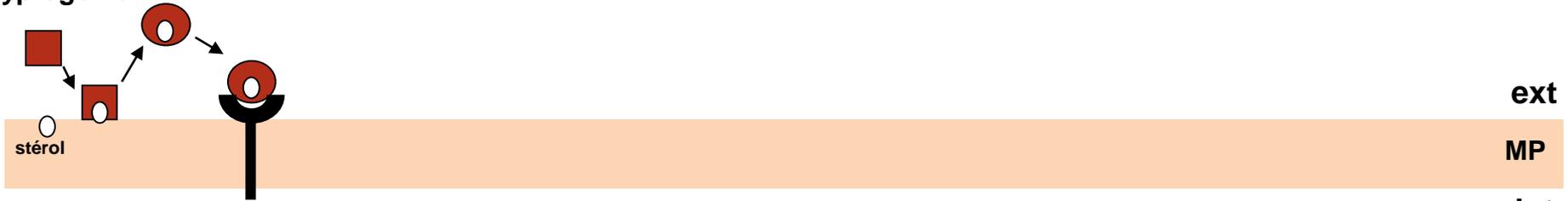
MODELE TABAC / CRYPTOGEINE

- Cryptogéine :**
- sécrétée par un Oomycète *Phytophthora cryptogea*
 - éliciteur protéique de réaction de défense chez le Tabac

Evènements précoces déclenchés par la cryptogéine au niveau de la membrane plasmique (MP)

Chargement en stérols
et fixation sur "récepteur"

cryptogéine



CONTEXTE

MODELE TABAC / CRYPTOGEINE

- Cryptogéine :**
- sécrétée par un Oomycète *Phytophthora cryptogea*
 - éliciteur protéique de réaction de défense chez le Tabac

Evènements précoces déclenchés par la cryptogéine au niveau de la membrane plasmique (MP)

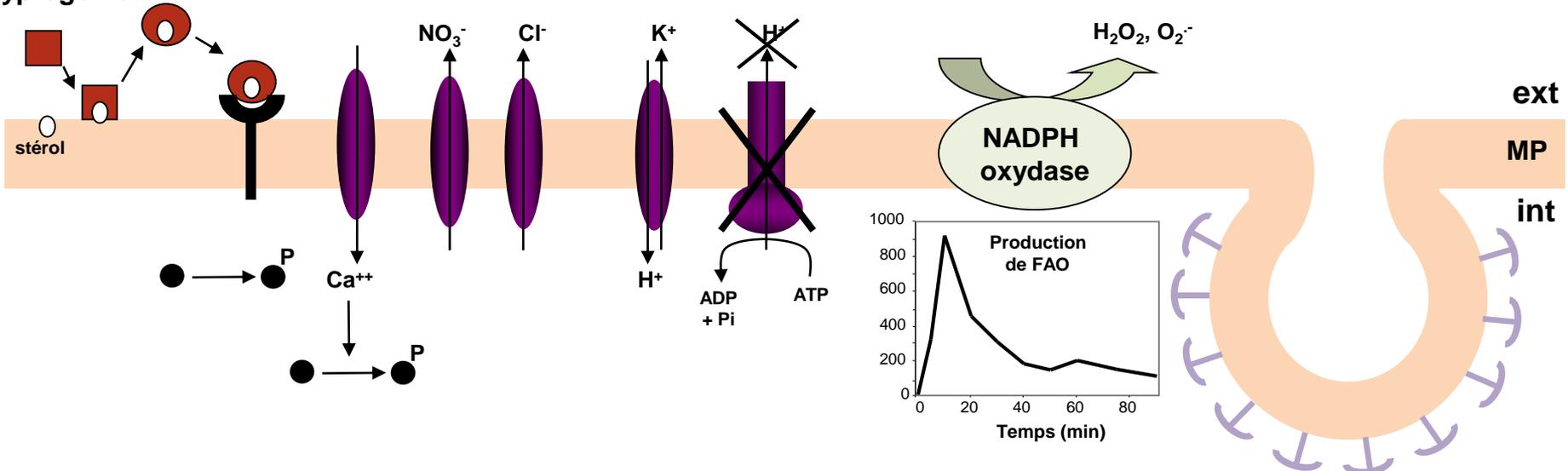
Chargement en stérols
et fixation sur "récepteur"

Phosphorylations,
Flux d'ions,
alcalinisation extracellulaire,
etc...

Production transitoire de
Formes Actives de l'Oxygène

Stimulation de
l'endocytose
à clathrine

cryptogéine



CONTEXTE

THEMATIQUE de l'équipe

Les évènements précoces déclenchés par la cryptogéine sont associés à la membrane plasmique

Rôle essentiel dans la mise en place des réactions de défense

Porte, organise et régule l'activité d'acteurs essentiels de la signalisation

Modifications des propriétés de la MP de cellules de Tabac élicitées par la cryptogéine

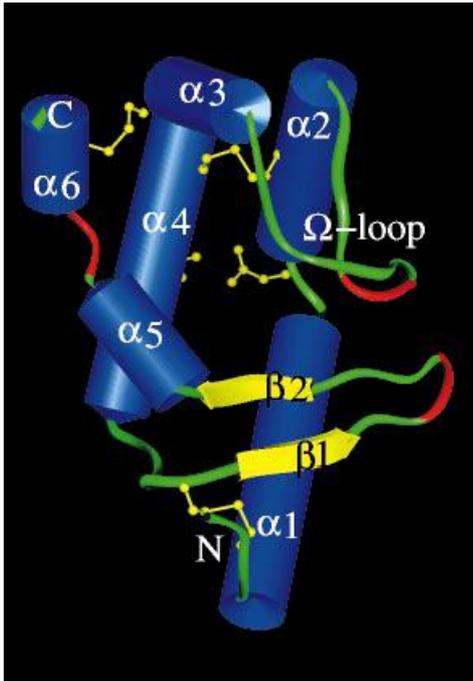
FLUIDITE MEMBRANAIRE

Mobilité latérale d'une sonde fluorescente par FRAP

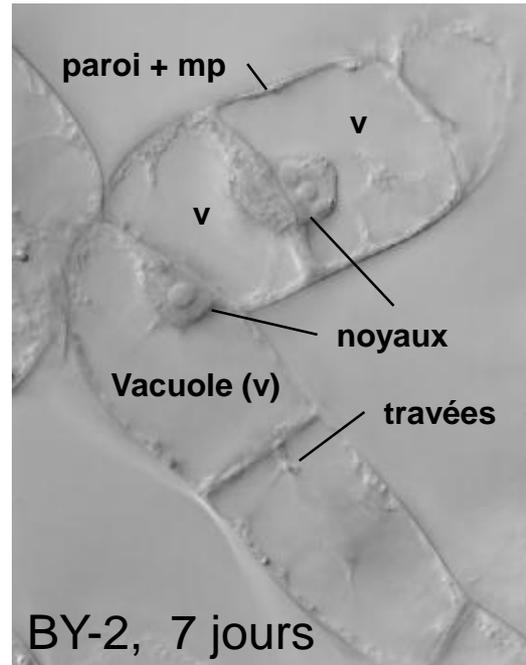
CONTEXTE

CONTRAINTES EXPERIMENTALES

Cryptogéine purifiée



Cellules de *Nicotiana tabacum*
Bright Yellow 2 (BY-2)



CLSM Leica SP2
+ laser argon à 488nm
+ module FRAP

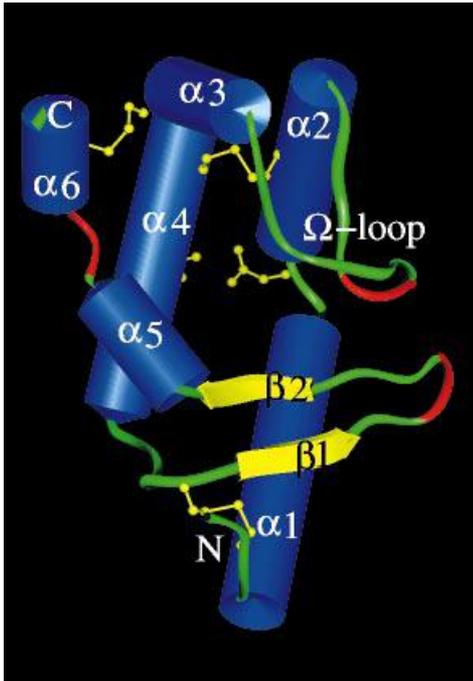


Etude de l'action précoce de la cryptogéine (5min)

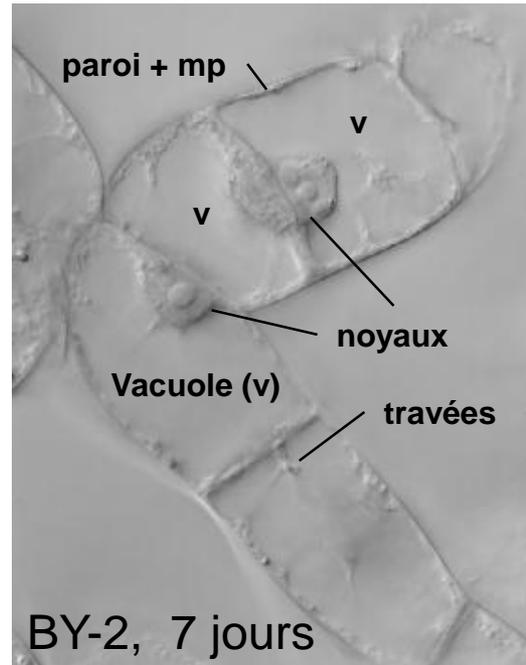
CONTEXTE

CONTRAINTES EXPERIMENTALES

Cryptogéine purifiée



Cellules de *Nicotiana tabacum*
Bright Yellow 2 (BY-2)



CLSM Leica SP2
+ laser argon à 488nm
+ module FRAP



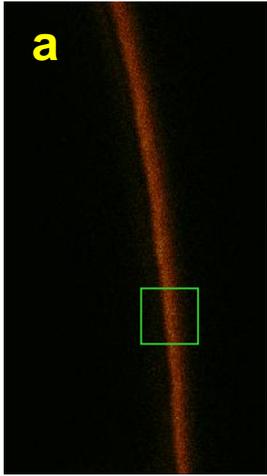
Etude de l'action précoce de la cryptogéine (5min)

- cellules en suspension → Adapter volume
- besoin d'agitation pour oxygénation → Prélever au moment de l'observation
- ↳ Limiter la durée de l'observation

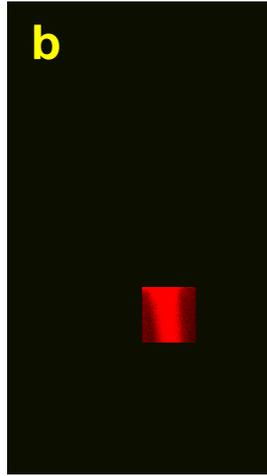
FRAP

PRINCIPE

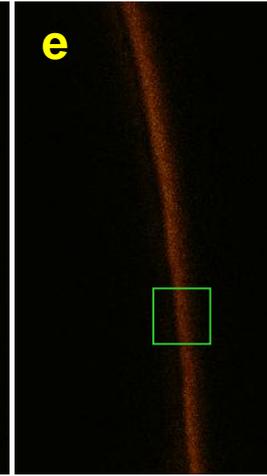
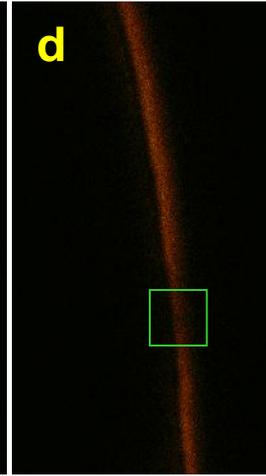
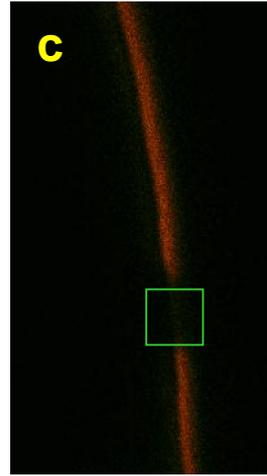
Pré-
photoblanchiment



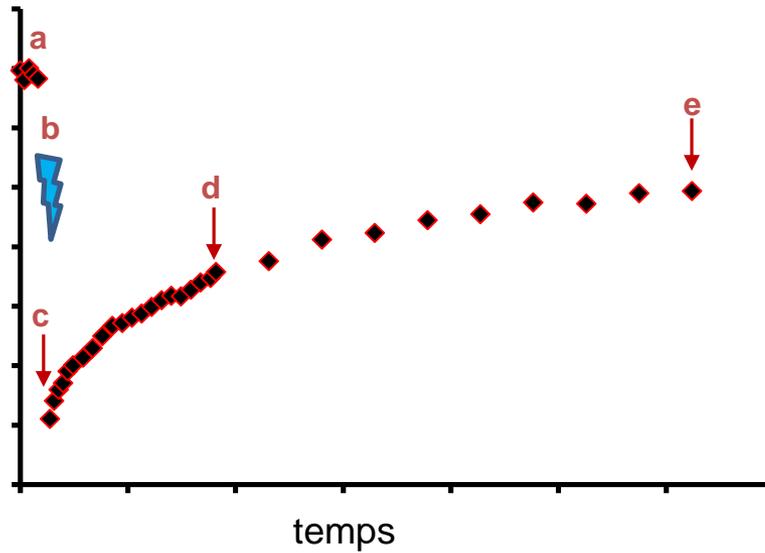
Photoblanchiment



Retour de fluorescence



Intensité de fluorescence

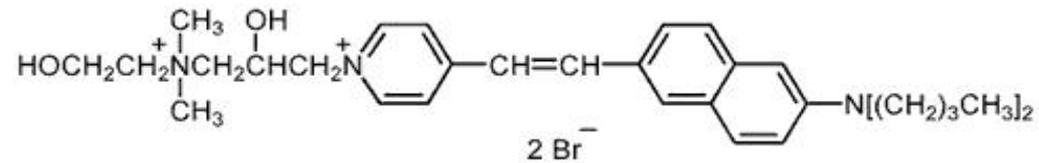


FRAP

SONDE FLUORESCENTE

di-4-ANEPPDHQ

1-[2-Hydroxy-3-(N,N-di-methyl Nhydroxyethyl) ammoniopropyl]-4-[β-[2-(di-n-butylamino)-6-napthyl] vinyl] pyridinium dibromide



Utilisation

Détection des changements de potentiel membranaire

(Obaid *et al*, 2004),

Détection du degré d'ordre membranaire de cellules animales et végétales

(Jin *et al* 2005, 2006, Roche *et al* 2008, Liu *et al* 2009, Owen *et al* 2012, Kamerbeek *et al* 2013, Dinic *et al* 2013, Gerbeau-Pissot *et al* 2014)

FRAP

SONDE FLUORESCENTE - Propriétés

Très faible toxicité

(Obaid *et al*, 2004; Owen *et al*, 2007)

Soluble dans l'eau

(Jin *et al*, 2006)

Haute affinité pour les membranes

(Jin *et al* 2006)

Insertion rapide dans le feuillet externe de la MP

(Jin *et al*, 2006, Dinic *et al*, 2013)

Le marquage se fait en quelques secondes et de manière spécifique à la MP

Fluoresce très peu hors MP

(Obaid *et al* 2004, Jin *et al*, 2005, 2006)

Peu de bruit dans le cytosol

(Owen *et al*, 2012)

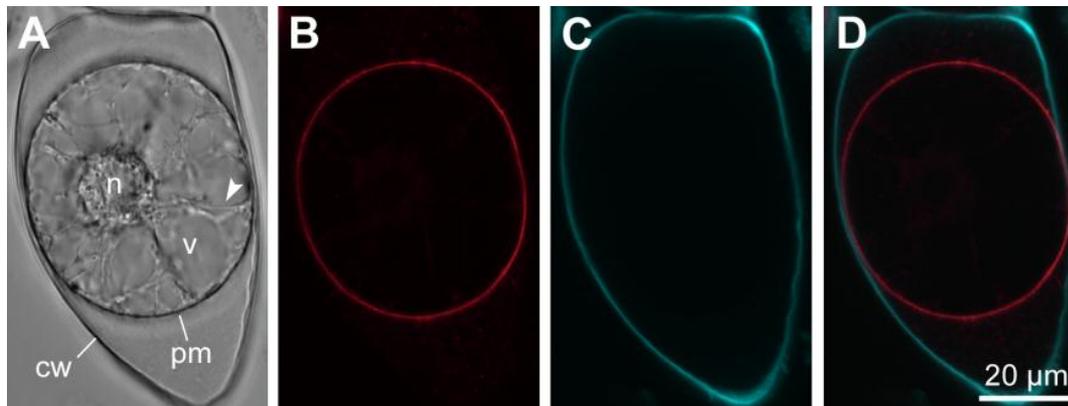
Bon ratio signal/bruit

Internalisation non immédiate

(Obaid *et al* 2004, Jin *et al* 2006, Dinic *et al* 2013)

Passage de la paroi et utilisée chez les plantes

(Liu *et al*, 2009, Gerbeau-Pissot *et al* 2014).



FRAP

SONDE FLUORESCENTE - Propriétés

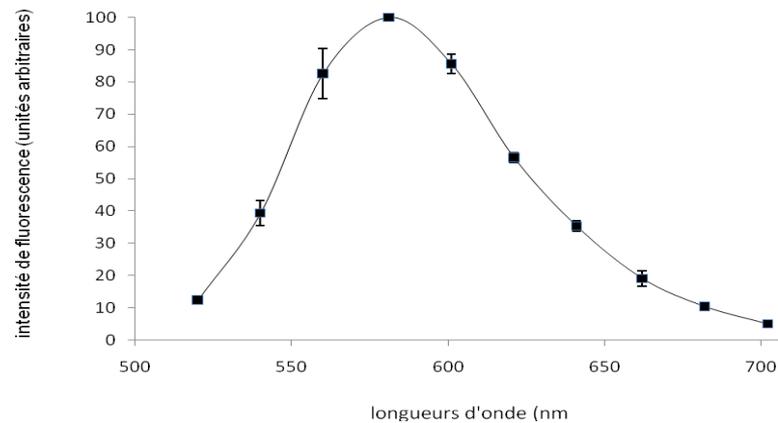
Excitée avec un simple photon dans le bleu (laser argon à 488nm), imagée par microscopes confocaux standards

(Jin *et al*, 2005, 2006, Owen *et al* 2012)

Déplacement de Stokes important quand intégration à la MP

(Jin *et al* 2006)

Large spectre d'émission



Fort rendement quantique

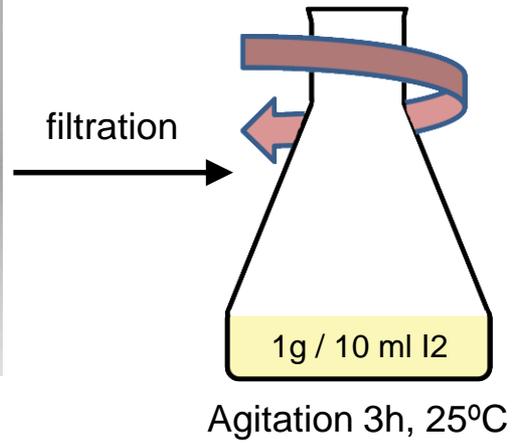
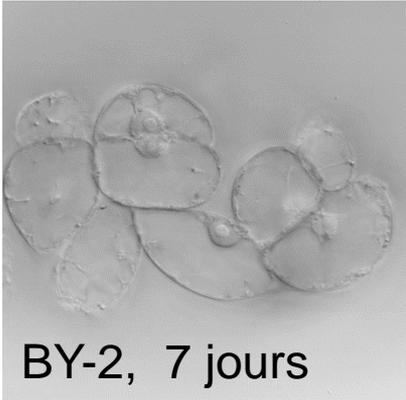
(Jin *et al* 2006)

Relativement photostable

(Owen 2007 *et al*)

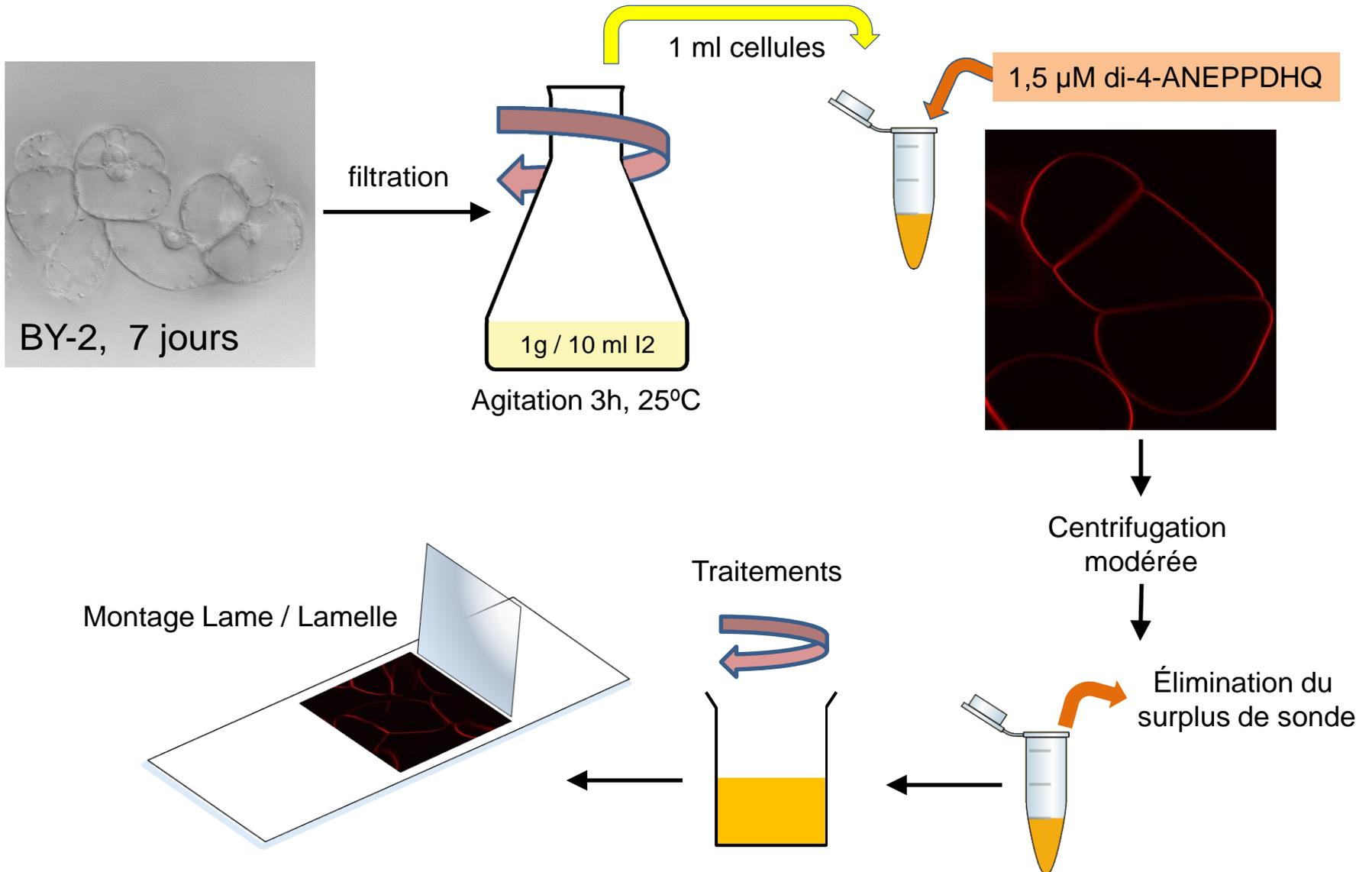
FRAP

PREPARATION DES CELLULES



FRAP

PREPARATION DES CELLULES



FRAP

ACQUISITION DES DONNEES

Réglage du laser:

-une puissance pour photoblanchir \longrightarrow forte

-une puissance pour le retour de fluorescence \longrightarrow faible

- i) éviter de photoblanchir pendant l'acquisition des données
- ii) ne pas saturer le signal
- iii) améliorer la profondeur de blanchiment

large bande d'émission (510 à 700 nm)

FRAP

ACQUISITION DES DONNEES

Réglage du laser:

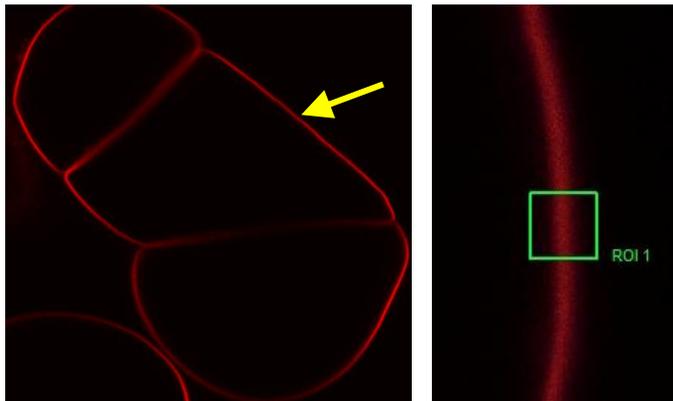
-une puissance pour photoblanchir \longrightarrow forte

-une puissance pour le retour de fluorescence \longrightarrow faible

- i) éviter de photoblanchir pendant l'acquisition des données
- ii) ne pas saturer le signal
- iii) améliorer la profondeur de blanchiment

large bande d'émission (510 à 700 nm)

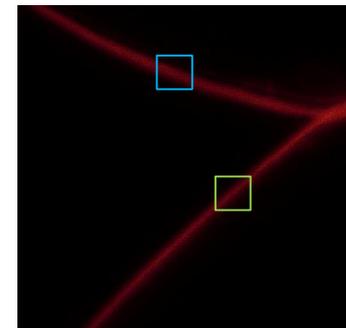
Choix de la zone d'intérêt (ROI)



ROI témoin:

non photoblanchie
même nombre de prises de vue

\hookrightarrow évaluer photoblanchiment d'acquisition



FRAP

PARAMETRES IMPORTANTS

Photoblanchiment
Ratio signal/bruit
Efficacité du photoblanchiment

Objectif	40x NA 1.25 immersion huile
Longueur d'onde d'excitation	488 nm
Longueur d'onde d'émission	510 – 700 nm
Puissance laser pré et post blanchiment	8 %
Puissance laser photo-blanchiment	100 %
Forme et taille de la ROI	Carré de 2 x 2 μm
Format des images	512 x 512 pixels
Moyennage	aucun
Vitesse de balayage	800 Hz
Zoom	x16

Optimiser les conditions

FRAP

NOMBRE de DONNEES à ACQUERIR

Pré-blanchiment

intensité de fluorescence de départ
fluctuation de la fluorescence

Blanchiment

Post-blanchiment

- maximum d'informations
- minimum de photoblanchiment
- minimum de temps entre lame et lamelle



Définir 2 parties de retour de fluorescence

phases	Nombre d'images	Temps entre chaque image
Pré-blanchiment	3	0.8 s
blanchiment	1	0.8s
Post-blanchiment 1	10	1.8 s
Post-blanchiment 2	10	9.8 s

FRAP

ANALYSE DES RESULTATS

Snapp et al. 2003, Current Protocols in Cell Biology

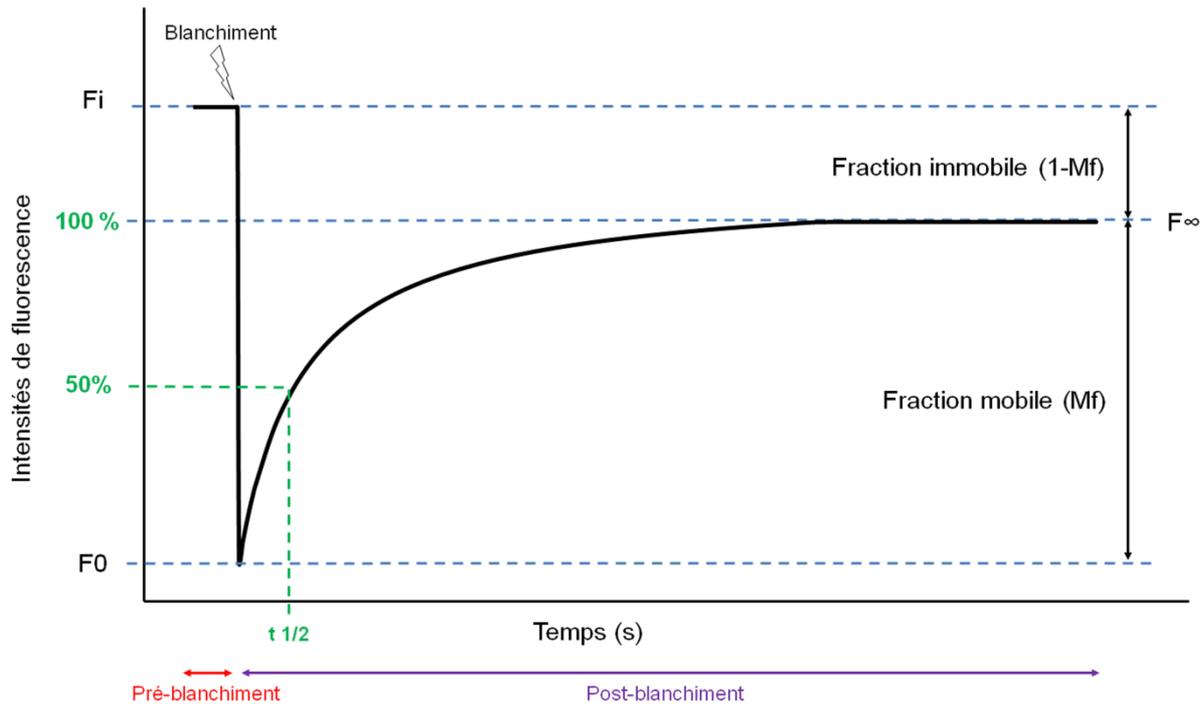
Corrections données brutes:

- bruit de fond
- photoblanchiment d'acquisition

} Données des zones témoins

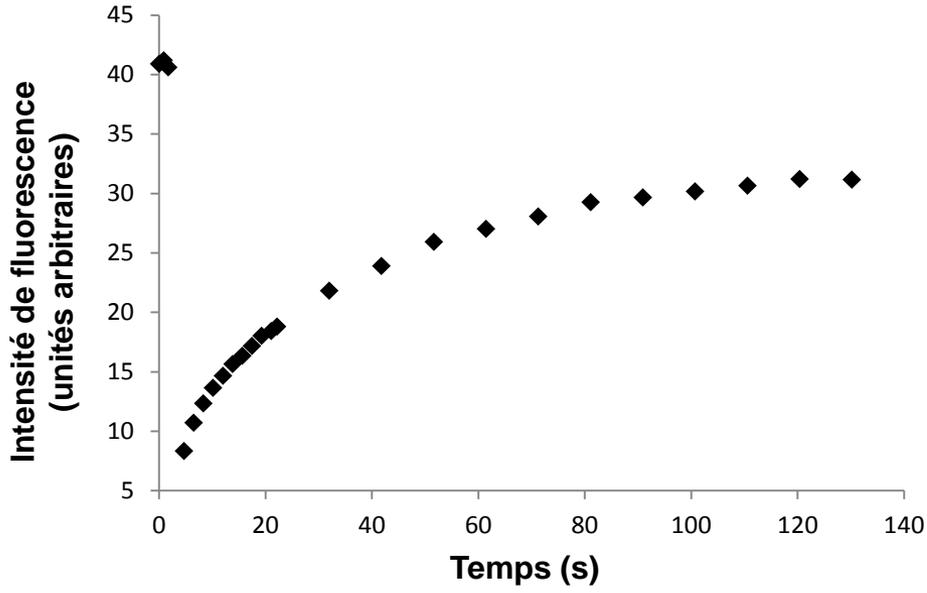
$T_{1/2}$: temps de demi-recouvrement

M_f : la fraction mobile



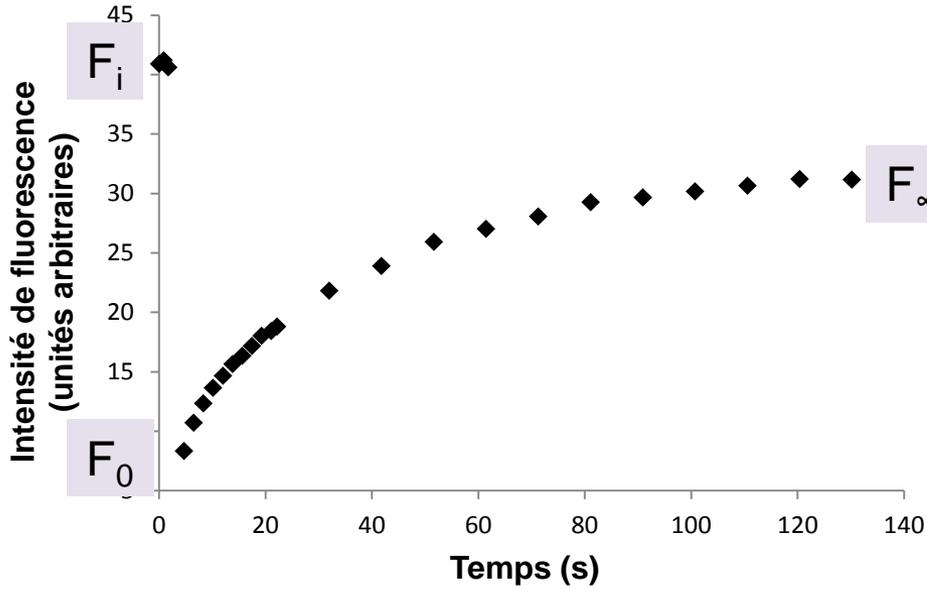
FRAP

ANALYSE DES RESULTATS

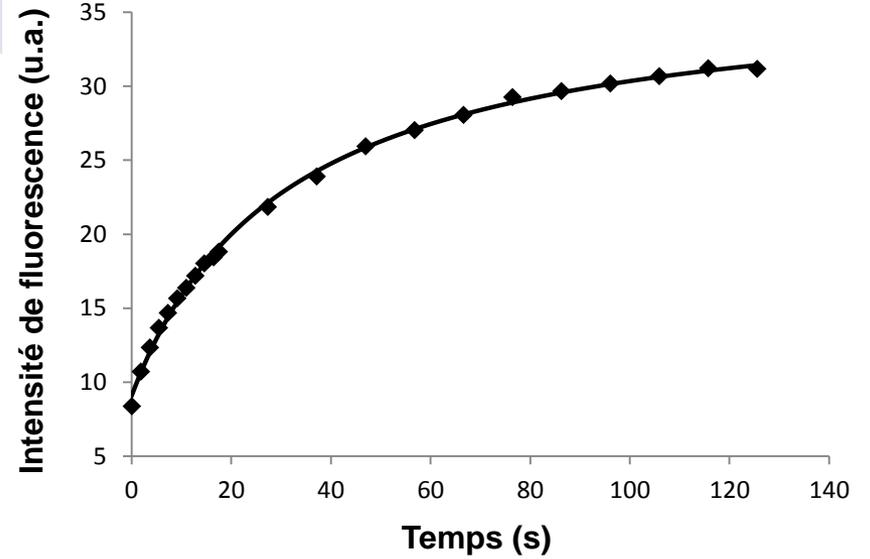


FRAP

ANALYSE DES RESULTATS



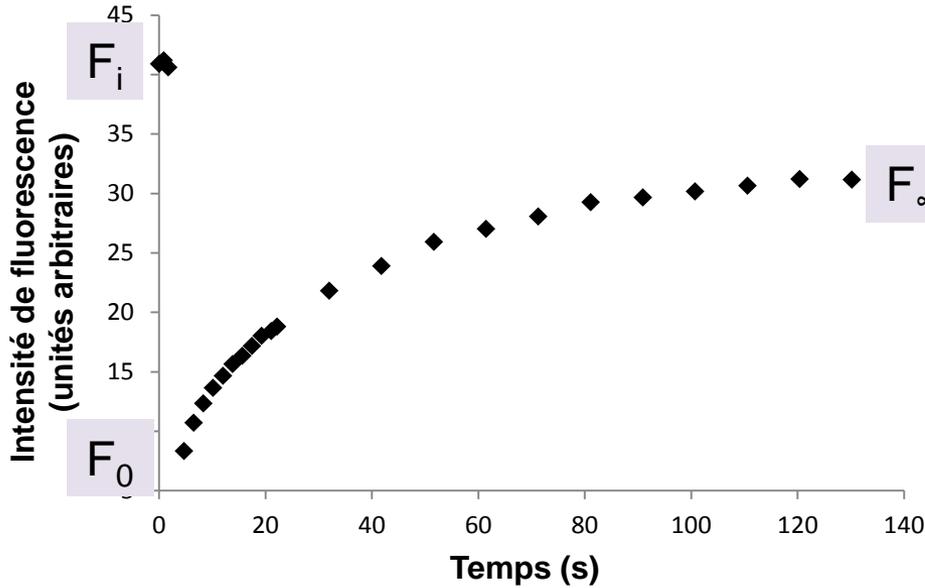
$$F(t) = (F_0 + F_{\infty} \times (t / t_{1/2})) / (1 + (t / t_{1/2}))$$



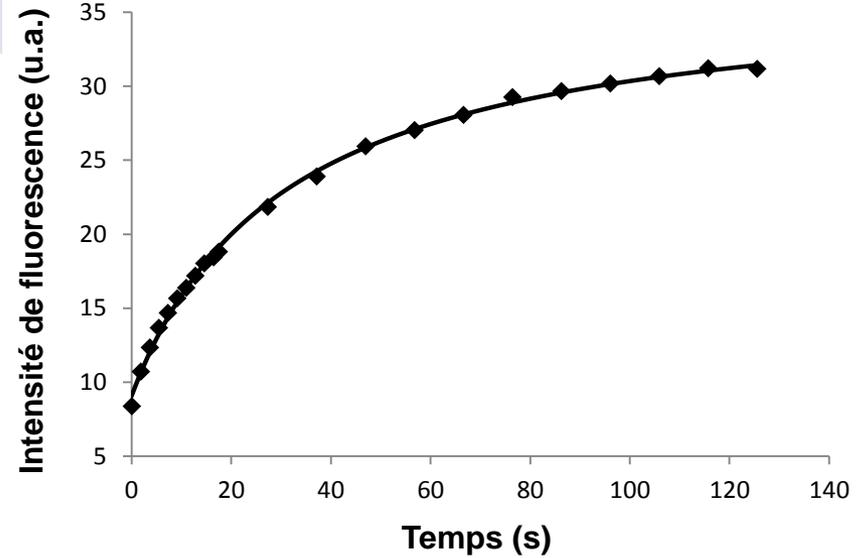
F_0	9,1
F_{∞}	36
$t_{1/2}$ (s)	31

FRAP

ANALYSE DES RESULTATS



$$F(t) = (F_0 + F_\infty \times (t / t_{1/2})) / (1 + (t / t_{1/2}))$$



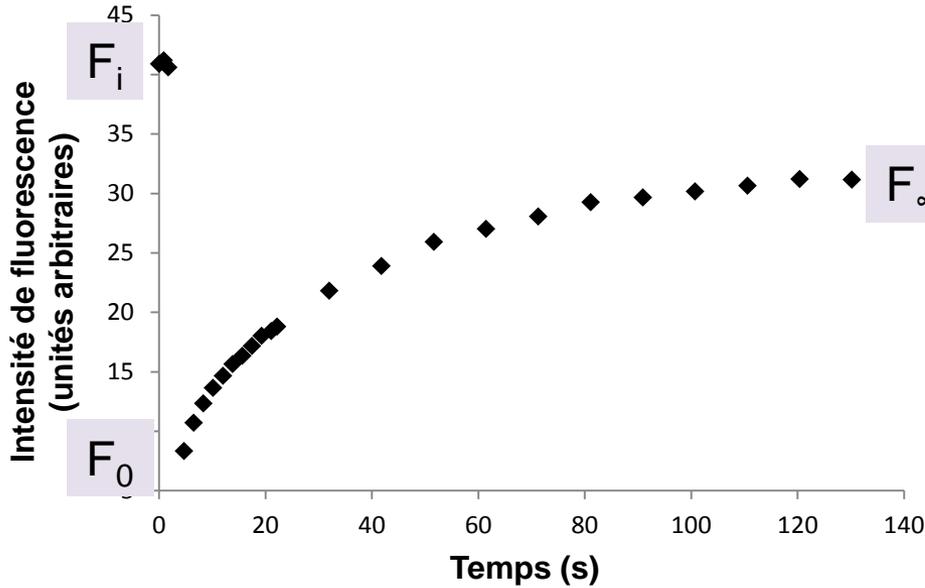
F_0	9,1
F_∞	36
$t_{1/2}$ (s)	31

$$Mf = (F_\infty - F_0) / (F_i - F_0) \times 100$$

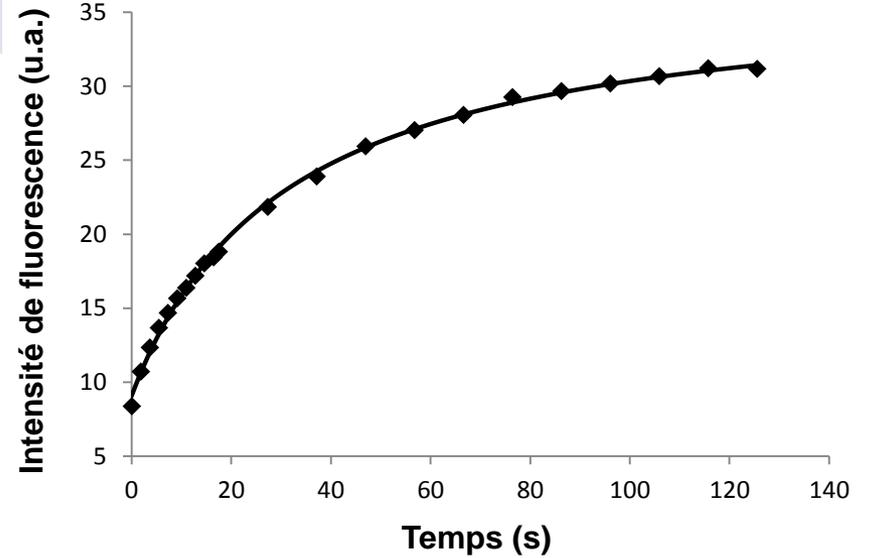
Mf (%)	87
--------	----

FRAP

ANALYSE DES RESULTATS



$$F(t) = (F_0 + F_{\infty} \times (t / t_{1/2})) / (1 + (t / t_{1/2}))$$



F_0	9,1
F_{∞}	36
$t_{1/2}$ (s)	31

$$Mf = (F_{\infty} - F_0) / (F_i - F_0) \times 100$$

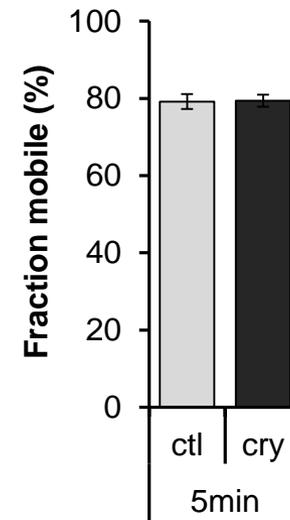
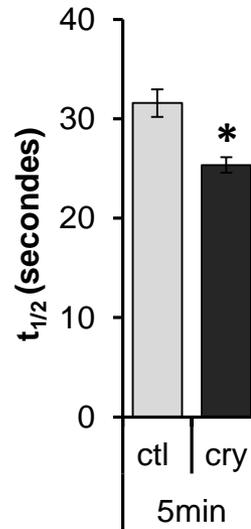
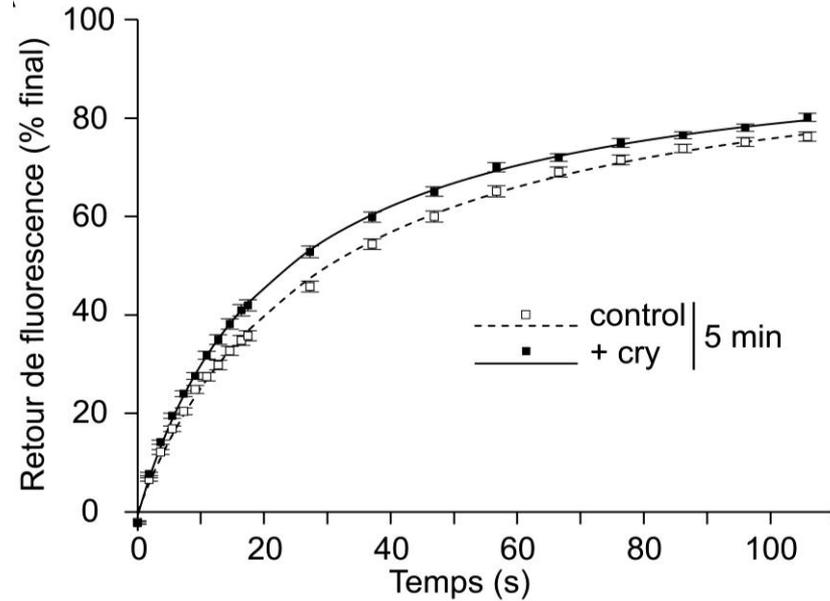
Mf (%)	87
--------	----

Normalisation des courbes

$$Fn(t) = (F_{(t)} - F_0) / (F_{\infty} - F_0) \times 100$$

FRAP

La CRYPTOGEINE modifie-t-elle la FLUIDITE du PLASMALEMME ?

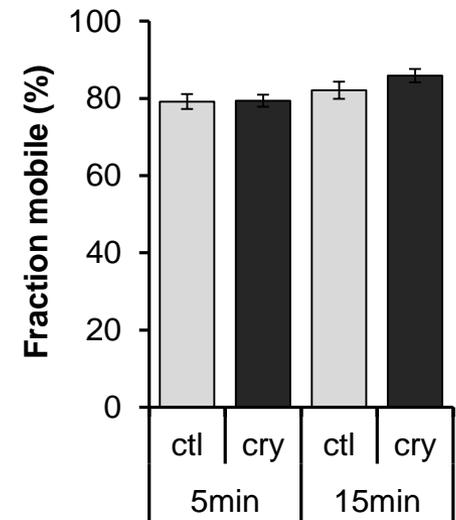
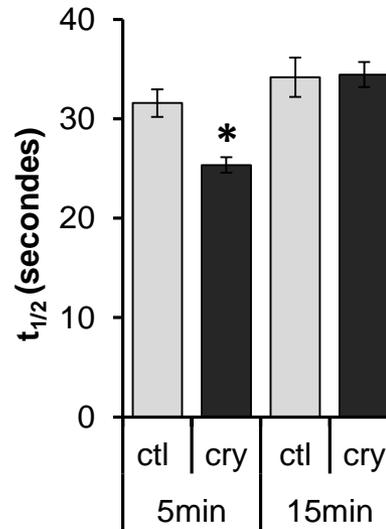
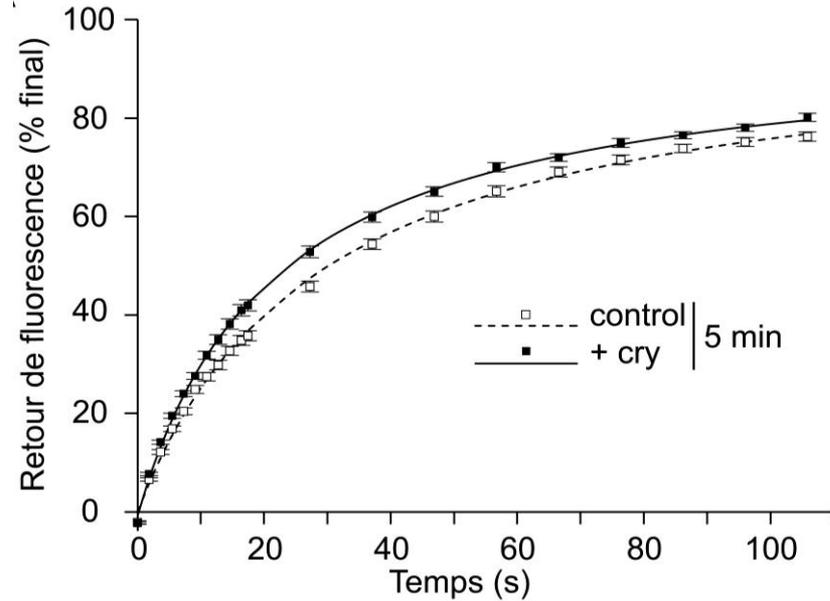


La cryptogéine:

augmente fluidité PM

FRAP

La CRYPTOGEINE modifie-t-elle la FLUIDITE du PLASMALEMME ?

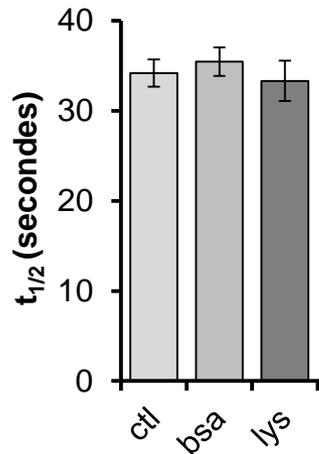
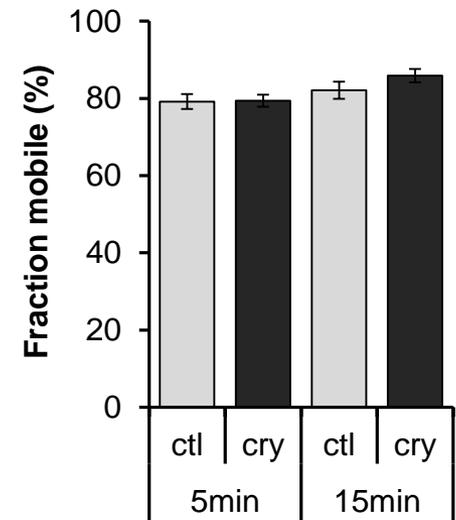
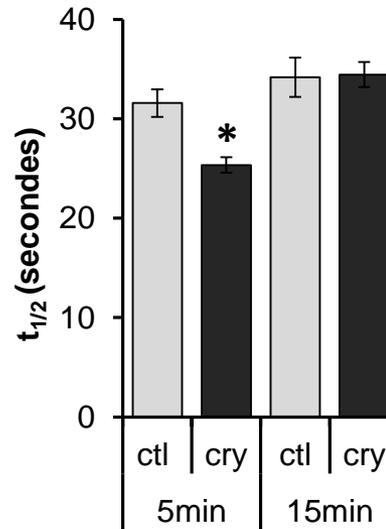
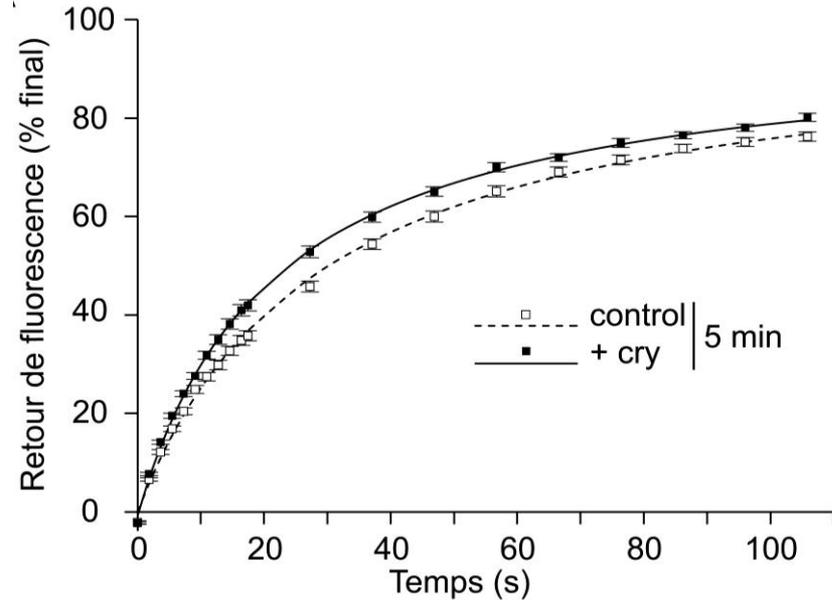


La cryptogéine:

→ augmente fluidité PM
→ transitoirement

FRAP

La CRYPTOGEINE modifie-t-elle la FLUIDITE du PLASMALEMME ?

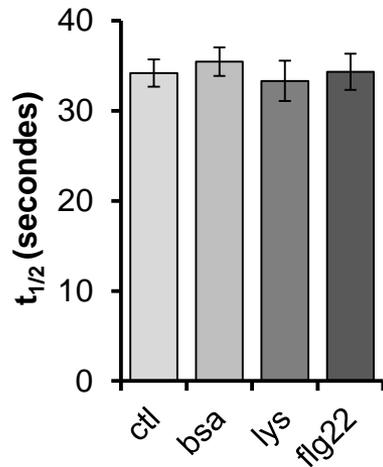
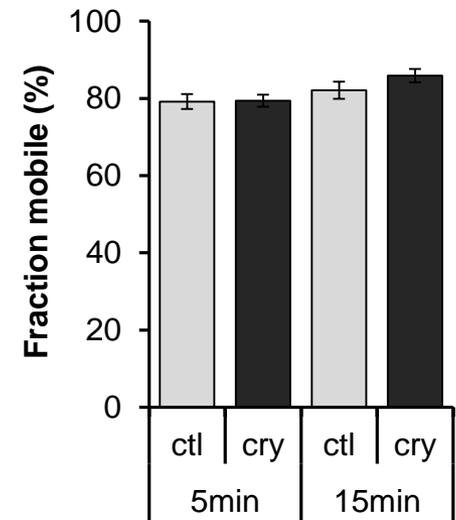
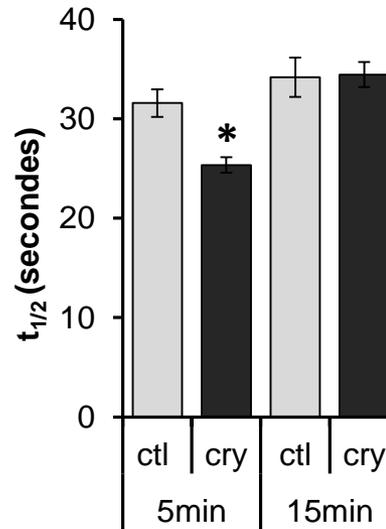
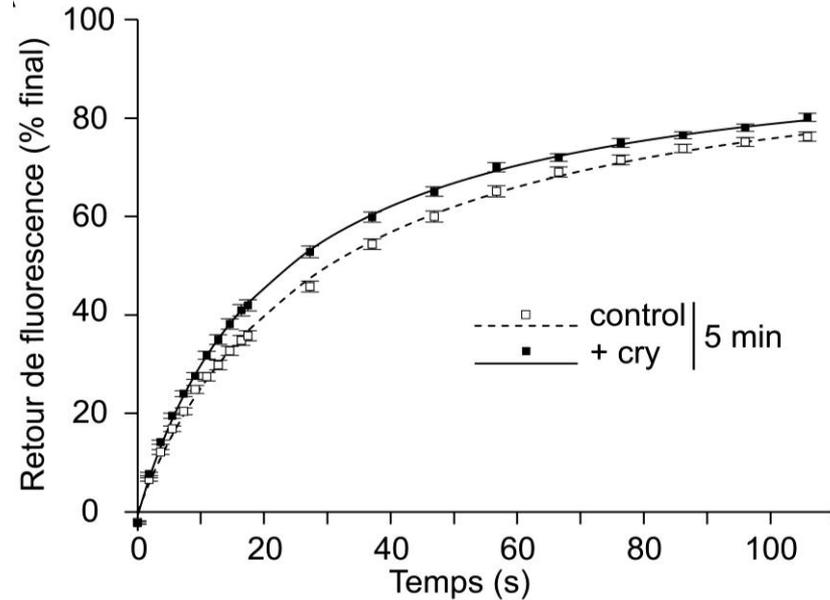


La cryptogéine:

augmente fluidité PM
transitoirement

FRAP

La CRYPTOGEINE modifie-t-elle la FLUIDITE du PLASMALEMME ?



La cryptogéine:

- augmente fluidité PM
- transitoirement
- spécifiquement

CONCLUSIONS

Points positifs

La sonde **di-4-ANEPPDHQ**: bon marqueur pour les expériences de FRAP
(stable, spécifique MP, bon ratio signal/bruit)

Protocole utilisé permet : d'estimer des retours de fluorescence
de comparer ces retours dans différentes conditions

Limites

La comparaison des $t_{1/2}$ ne peut être faite que dans les mêmes conditions d'acquisition et un même système expérimental (Snapp et al, 2003)

Dans notre système d'étude, un grand nombre de données sont non-exploitable,
→ beaucoup de temps passé à acquérir données