

Utilisation d'une sonde Cameleon:  
mise en œuvre et application dans la  
visualisation des oscillations calciques  
en microscopie confocale

Mireille Chabaud

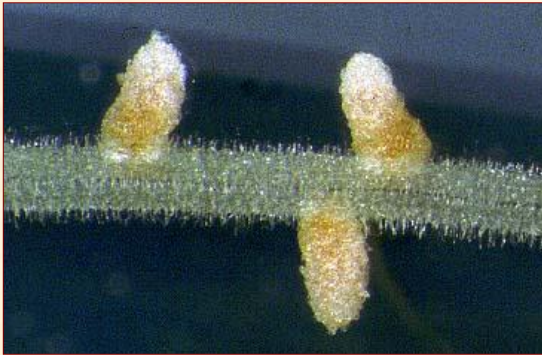
Laboratoire des Interactions  
Plantes Microorganismes (LIPM)

CNRS-INRA Toulouse

# Les légumineuses interagissent avec des micro-organismes symbiotiques

## ➤ symbiose fixatrice d'azote avec *Rhizobium*

- acquisition d'azote
- organogénèse nodulaire



## ➤ Symbiose endomycorhizienne

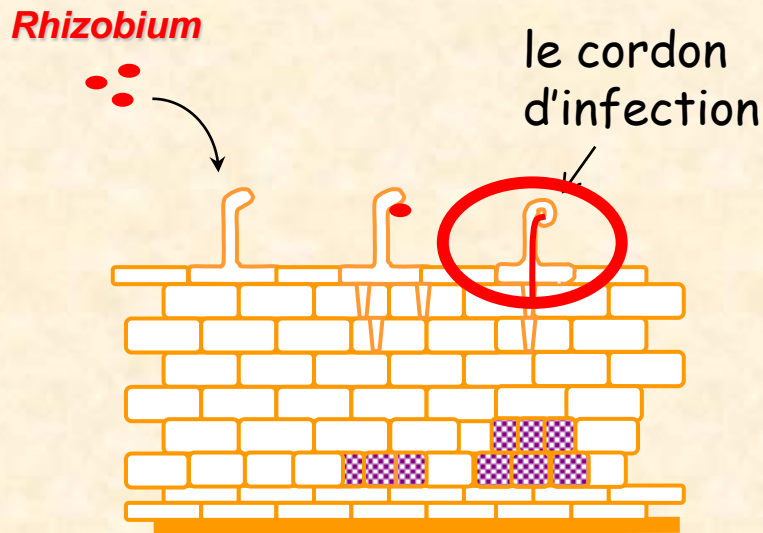
- acquisition de Phosphate
- au sein de structures fongiques: les arbuscules



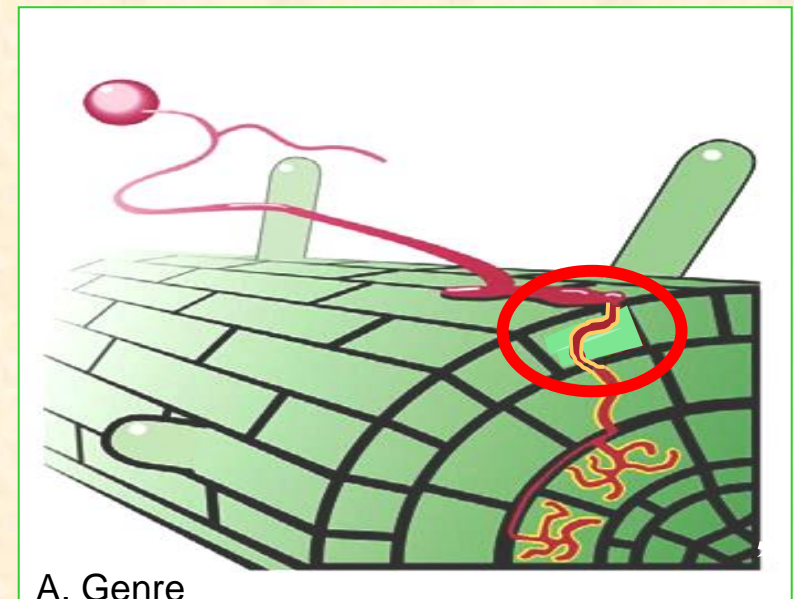
Les micro-organismes symbiotiques pénètrent  
à l'intérieur des cellules racinaires  
sans déclencher des réactions de défense de la plante:  
**Reconnaissance et accueil** des micro-organismes symbiotiques

# L'infection épidermique **intracellulaire** des micro-organismes symbiotiques racinaires (chez la luzerne annuelle)

## Interaction avec *Rhizobium*



## Interaction avec les champignons endoMycorhiziens à Arbuscules (AM)



- Quels sont les **signaux** échangés ?
- Quels sont les **mécanismes cellulaires et moléculaires** mis en place par la plante pour reconnaître et accueillir ces micro-organismes bénéfiques à son développement ?
- Quel est le rôle du **Calcium** dans la signalisation?

# La signalisation calcique est-elle impliquée dans le processus infectieux symbiotique ?

Interaction avec *Rhizobium*

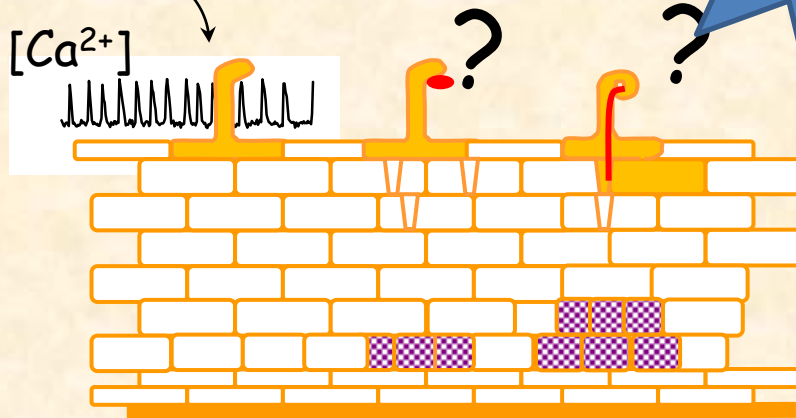
Interaction avec champignons AM

Rôle essentiel  
d'une  
 $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-Kinase

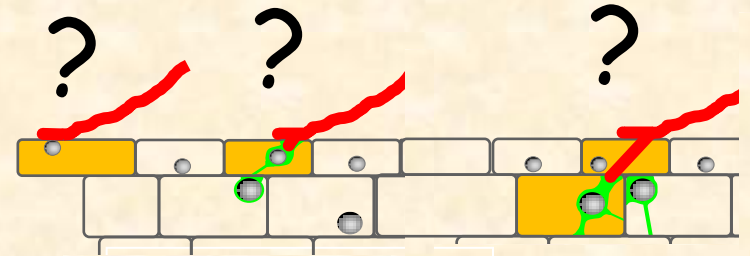
*Rhizobium*

Facteurs de  
Nodulation

$[\text{Ca}^{2+}]$



Hyphe fongique



Nécessité d'observer:  
les changements de concentration en calcium  
dans une cellule individuelle en cours d'infection,  
au sein d'un organe vivant.

# Comment observer les variations en Calcium dans une cellule vivante, en cours d'infection ?

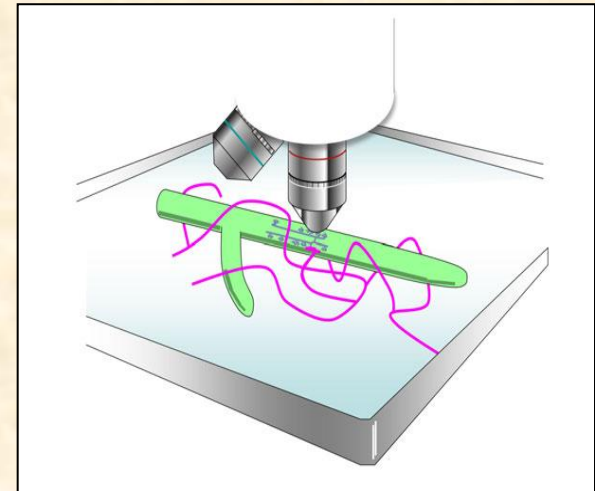
## COUPLER:

-un marqueur fluorescent de la concentration calcique dans les cellules: les sondes **Cameleons**

Miyawaki et al. 1997



-un système d'observation du processus d'infection *in vivo*  
(plante ou racine entière vivante inoculée)  
en microscopie confocale



# Choix de la sonde fluorescente/luminescente

## avantages

## inconvénients

### Les colorants (Fluo3, Fura-2)

- excellente dynamique (40 pour le Fluo3)
- pas besoin de transformation

- injection dans les cellules
- Pb de compartimentation et fuites
- toxicité

### L'aequorine

- introduit par transgénèse
- possibilité d'adressage
- excellente dynamique (10 000)
- pas d'excitation nécessaire\*

- ajout de co-facteur (coelentrazine)
- visualisation au niveau cellulaire difficile
- signal faible

### Les cameleons

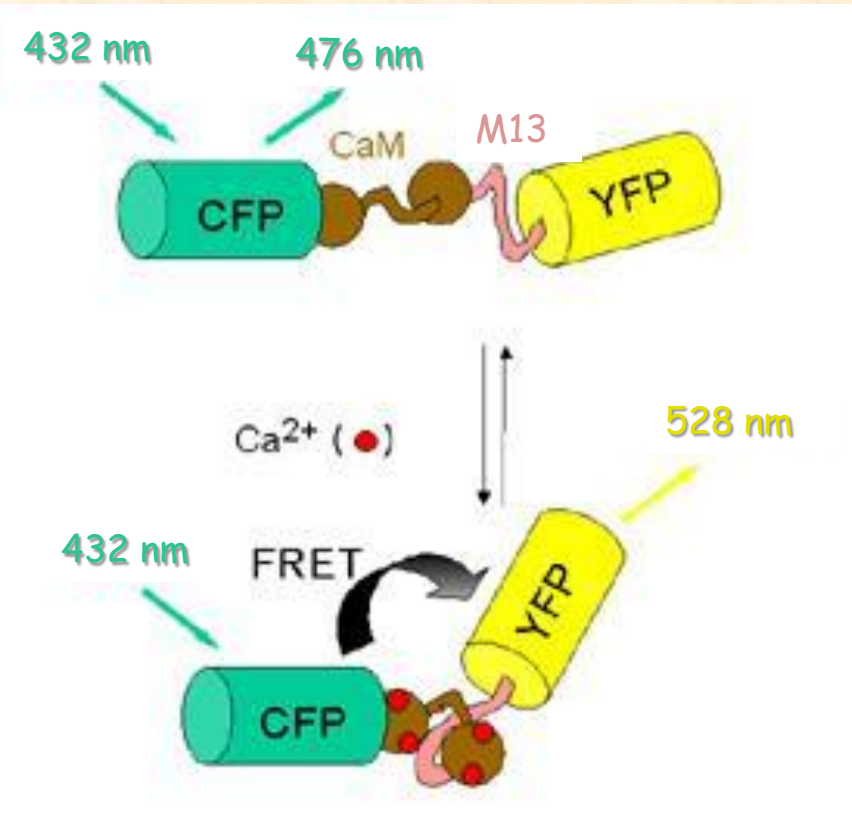
- signal fort
- introduit par transgénèse
- possibilité d'adressage
- mesure *in vivo*, au niveau cellulaire

- dynamique assez faible (2-7)

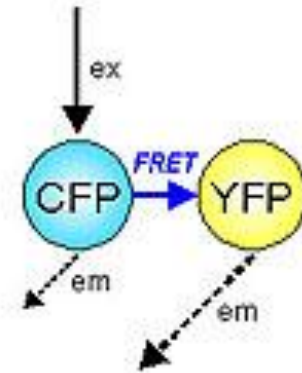
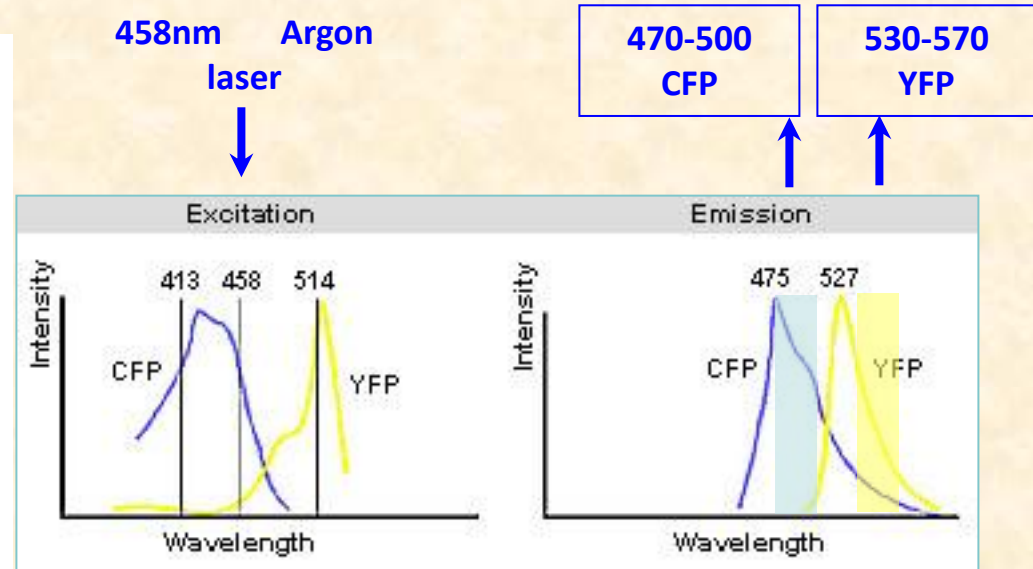
### Les sondes Geco

- dynamique forte (16)

# Les sondes « Cameleon »: le principe de FRET



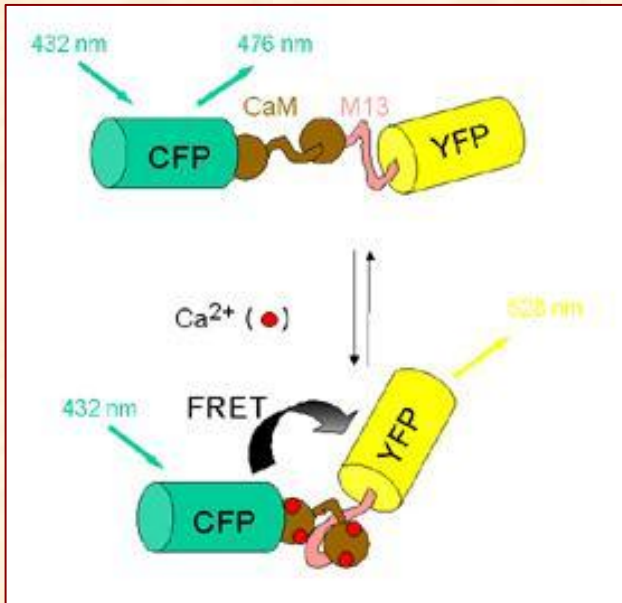
Miyawaki et al 1997



Le rapport YFP/CFP est corrélé à la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$

# Quelques paramètres des sondes Cameleon

Mutations ciblées ou aléatoires de la CFP et YFP



-**la sensibilité au pH:** meilleure stabilité et moins sensible au pH: YC2.1 (Miyawaki 1999)

-**la dynamique:** version permutée de YFP: Venus YC3.60 5 fois plus dynamique (Nagai, 2004)

$$\text{Dynamique} = (F_{\max} - F_{\min}) / F_{\min}$$

-**l'affinité au calcium:** variable (utile pour certains compartiment tel que le reticulum endoplasmique à forte concentration en Ca)

-**le domaine de liaison au calcium** variable: éviter les interactions avec la calmoduline endogène

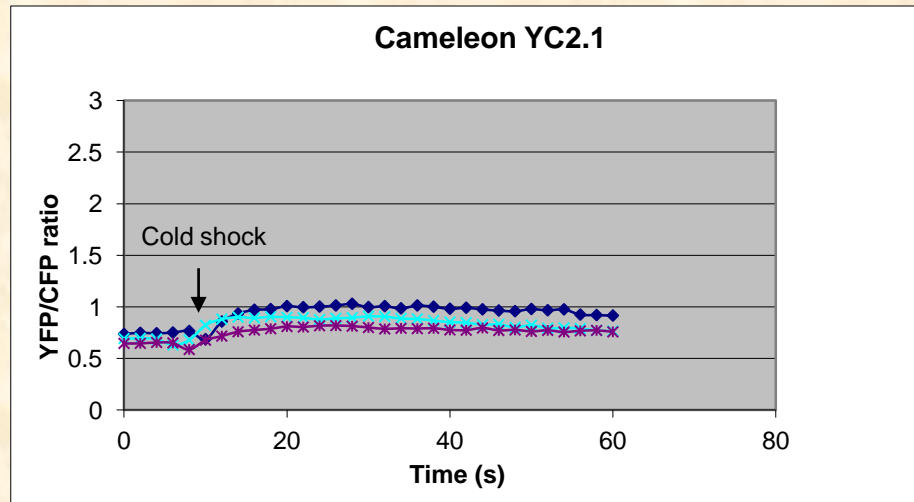
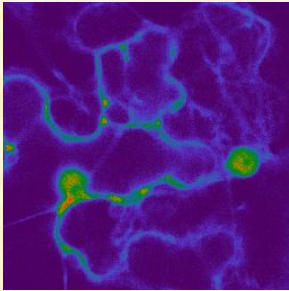
-**l'adressage:** cytoplasme, noyau, peroxisome

**Domaine de recherche en progression constante**

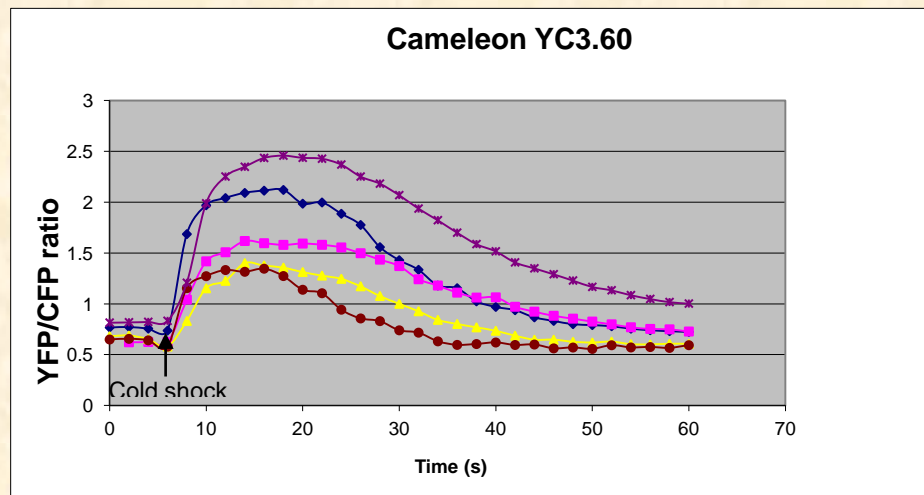
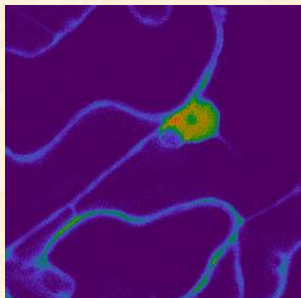


# Comparaison des sondes chez *N. benthamiana*

## Application d'un choc froid

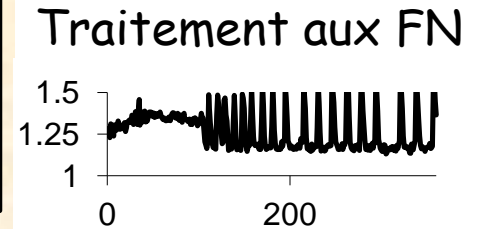
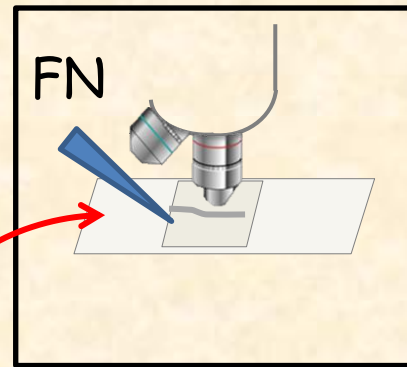
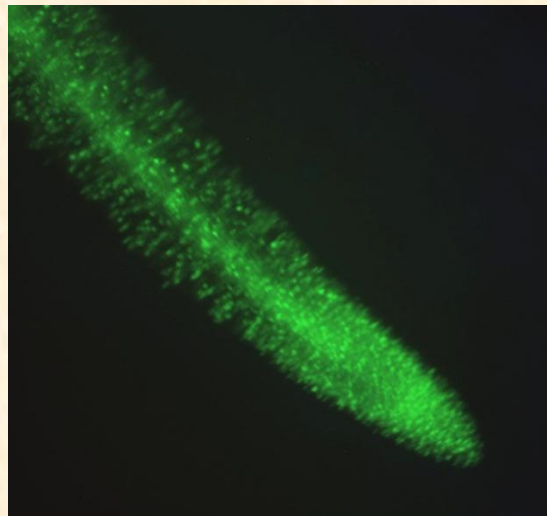
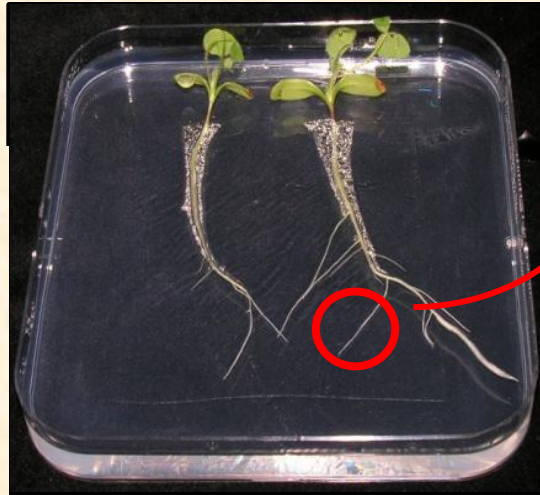


YC3.60 est plus dynamique que YC2.1



# Visualisation des oscillations calciques induites par les Facteurs de nodulation (Facteurs Nod) dans les noyaux des poils racinaires

Plantule transgénique exprimant une sonde fluorescente cameleon adressée au noyau: NUP-YC2.1



Prise d'image au microscope confocal-  
mesure de FRET et  
représentation du ratio  
de fluorescence

# Réglage pour la prise d'image

★ laser Argon 458 nm  
(faible puissance 9h-11h)

★ CFP: émission: 470-500 nm  
YFP: émission: 535-590 nm

★ PMT1/2: autour de 600-800  
PMT3= fond clair

★ réglage en fausses couleurs  
pour éviter la saturation

★ objectif 40x longue distance-immersion à eau/ ou objectif air

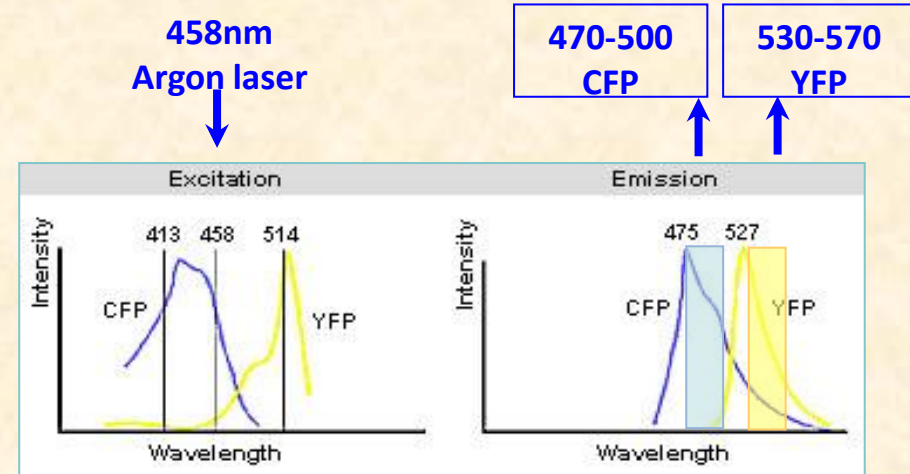
★ 512x512, 400mH  
(on peut réduire la résolution pour gagner du temps sur les images)

★ Li2/ Ave1 (deux mesures immédiates et moyennées par ligne)-temps d'image=3s

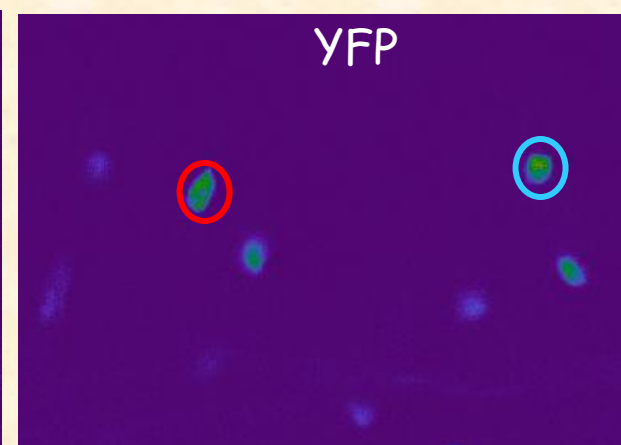
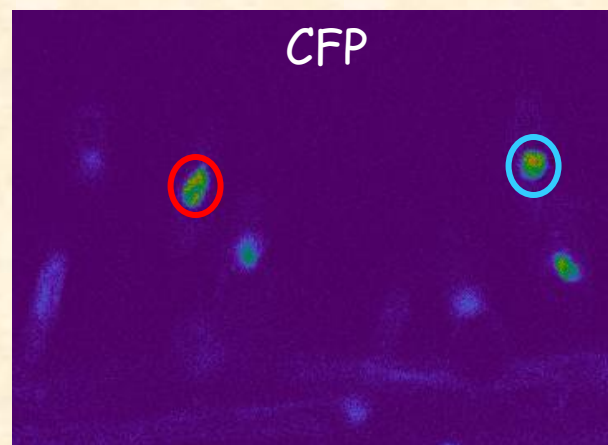
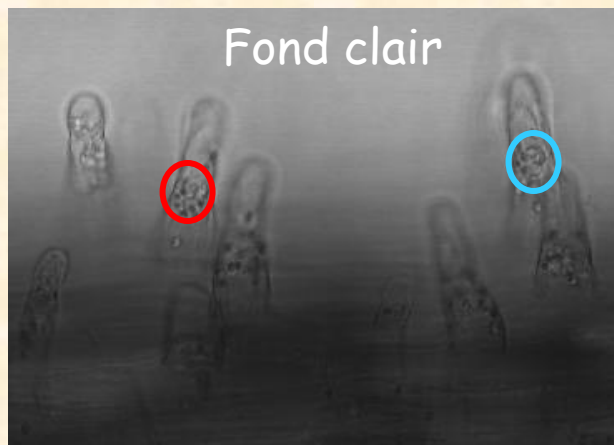
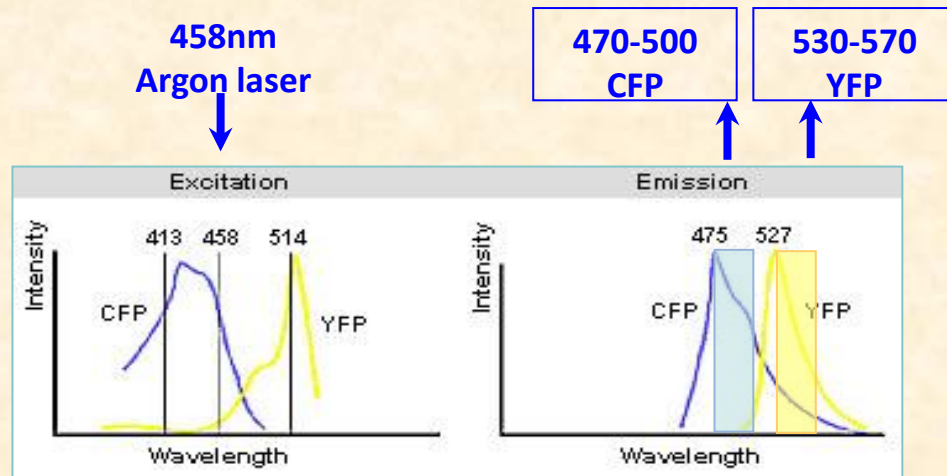
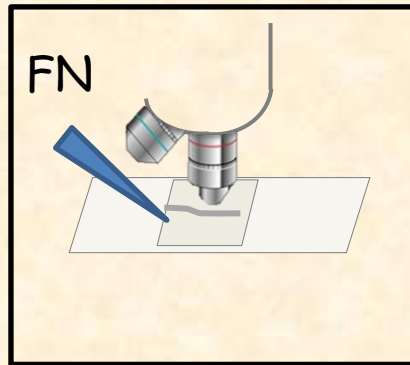
★ images toutes les 5s pendant 10 min (ou plus: jusqu'à 1h possible)

★ expan beam: 3

★ pinhole: airy 4 (récupère plus de fluorescence-moins de « confocalité »)



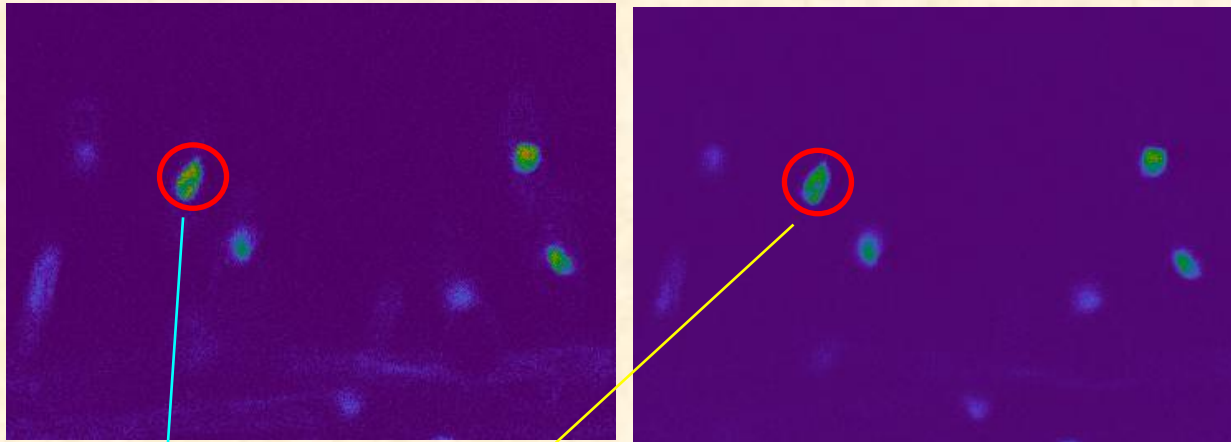
# Enregistrement des fluorescences CFP/YFP en fausses couleurs, toutes les 5s



★ Extraction des données sous Image J: enregistrement de la quantité de fluorescence CFP et YFP d'une ou plusieurs régions d'intérêt (sélection manuelle autour des noyaux)

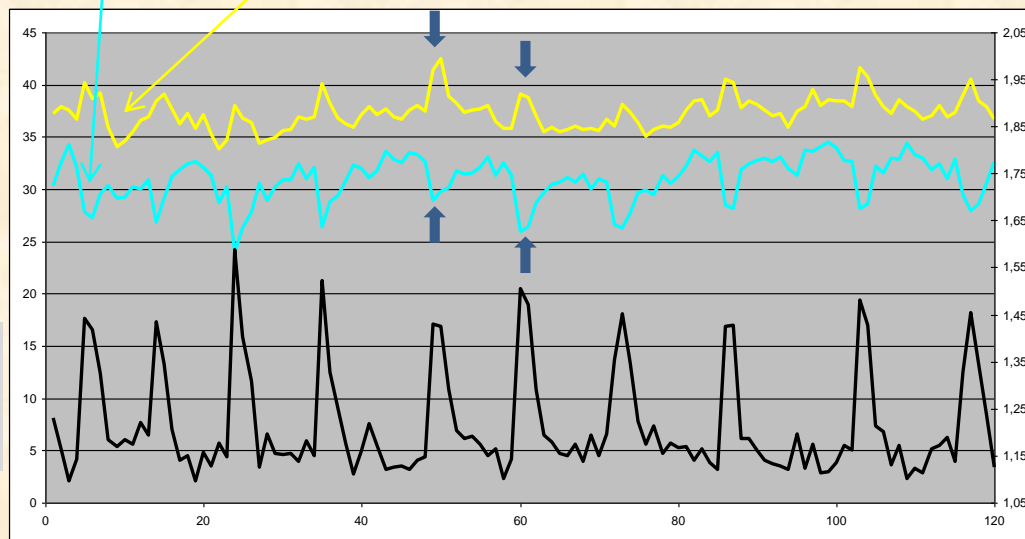
★ Calcul sous Excel du ratio de fluorescence et représentation graphique

# Représentation graphique de la quantité de fluorescence dans un noyau au cours du temps



CFP

YFP



Rapport  
YFP/CFP

120 images,  
toutes les  
5s = 10min

# Comment observer les variations en Calcium dans une cellule vivante, en cours d'infection ?

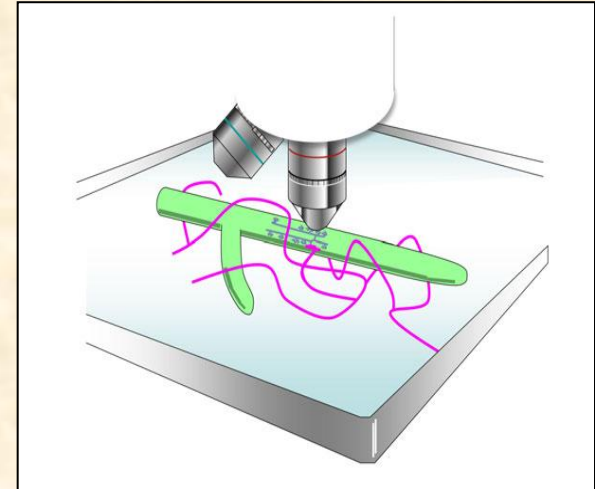
## COUPLER:

-un marqueur fluorescent de la concentration calcique dans les cellules: les sondes **Cameleons**

Miyawaki et al. 1997

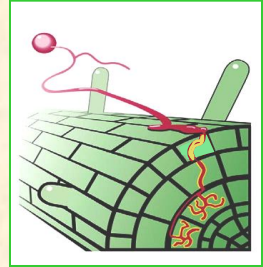


➔ Un **système d'observation du processus d'infection *in vivo***  
(plante ou racine entière vivante inoculée)  
en microscopie confocale



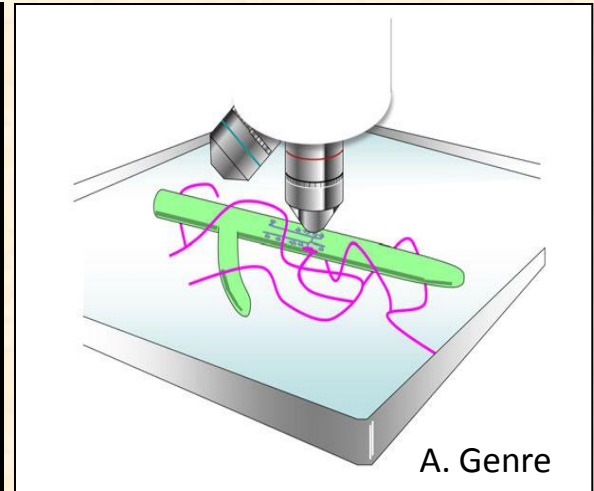
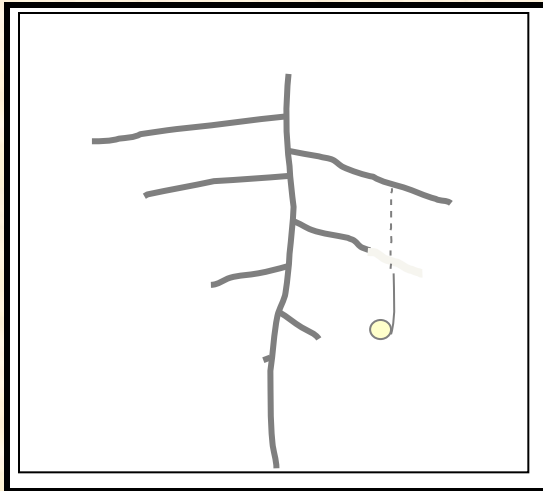
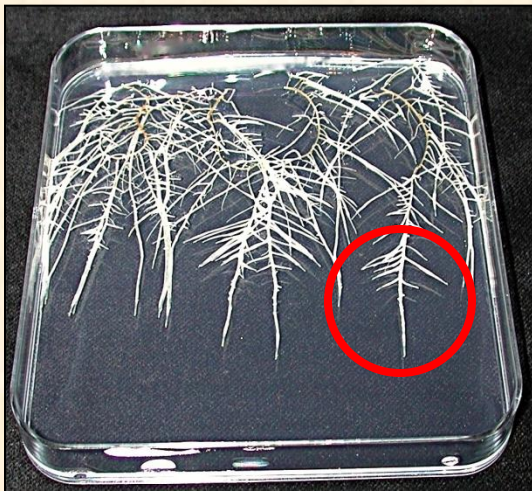
# Systeme experimental d'etudes *in vivo* du processus endosymbiotique compatible avec l'observation en microscopie confocale

✦ Production de racines transgeniques exprimant la sonde cameleon

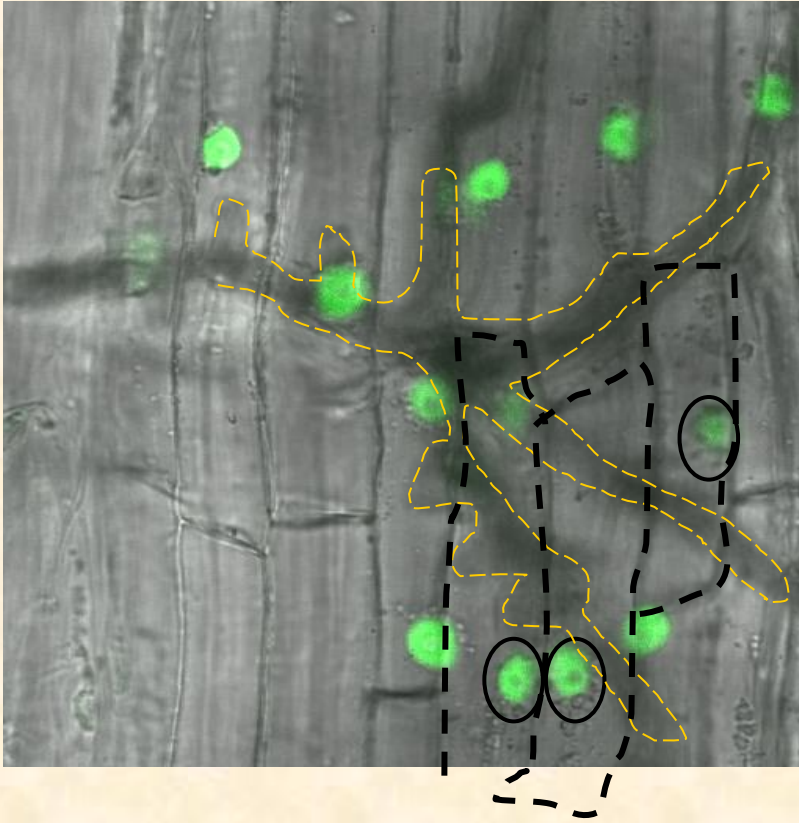


✦ Inoculation ciblée avec une spore prégermée de *Gigaspora gigantea* naturellement fluorescent

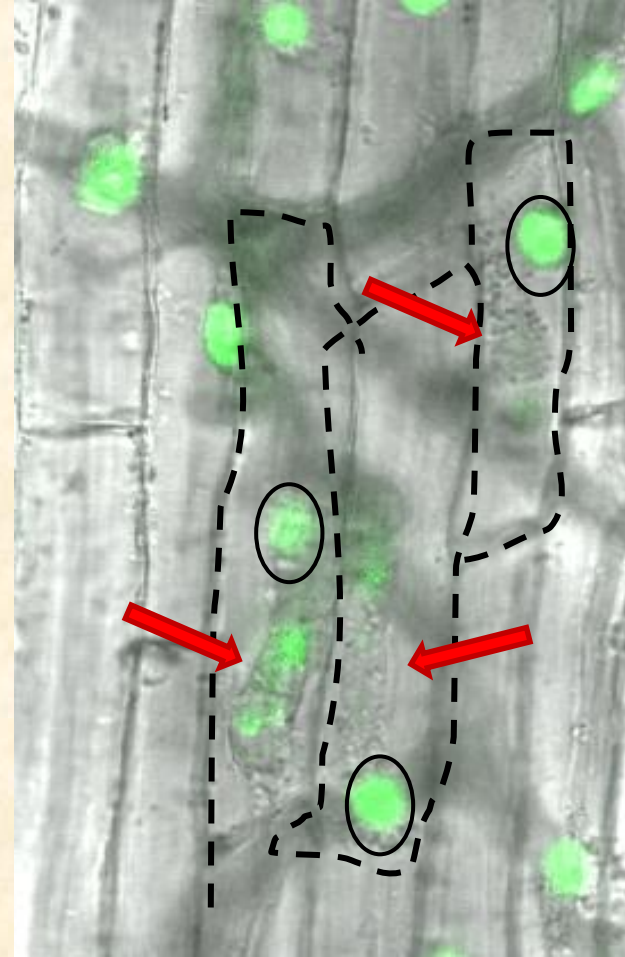
✦ Microscopie confocale en utilisant une membrane « Biofolie » et un objectif longue distance à immersion à eau



# Inoculation des racines par un champignon mycorhizien 1ères étapes de l'infection dans l'épiderme racinaire



T0

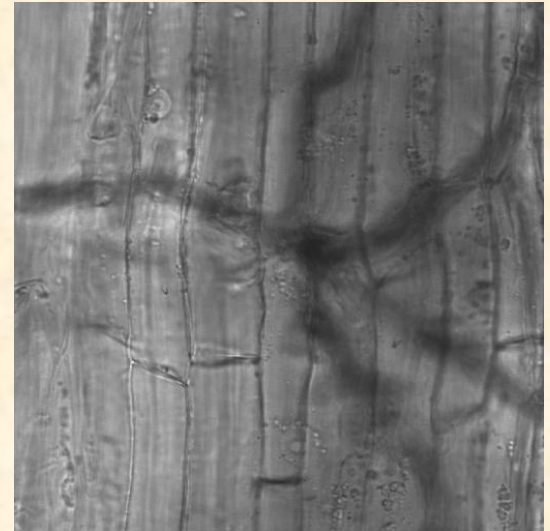
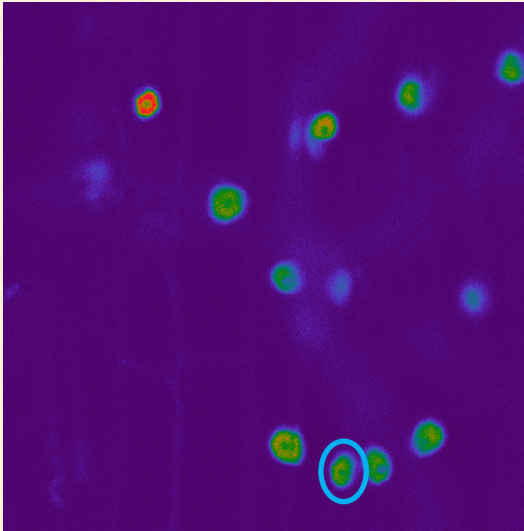
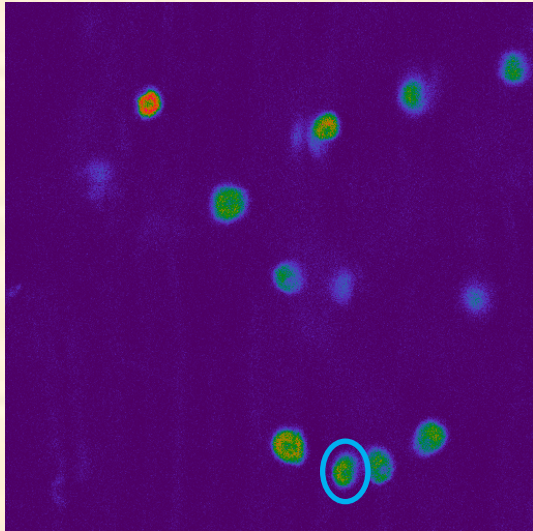


T0+3h15

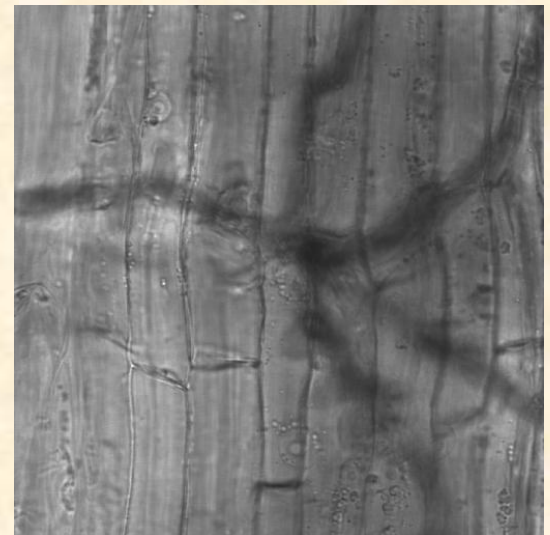
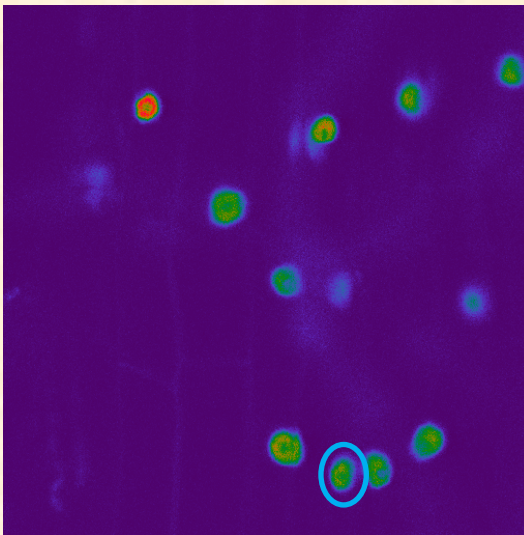
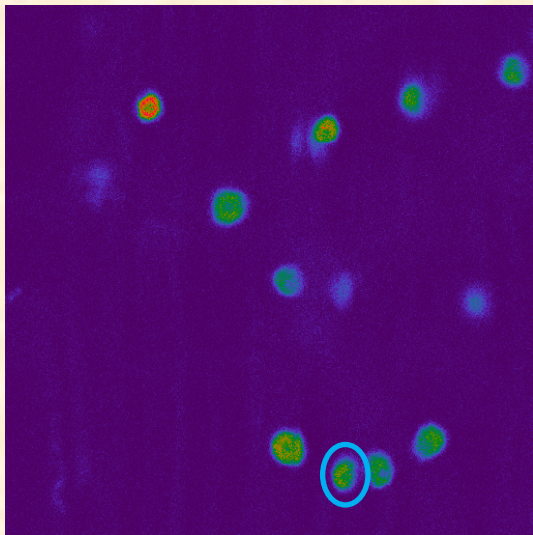


Enregistrement de la fluorescence CFP et YFP dans des cellules en cours d'infection, images toutes les 5s, et calcul du rapport YFP/CFP au cours du temps

T0

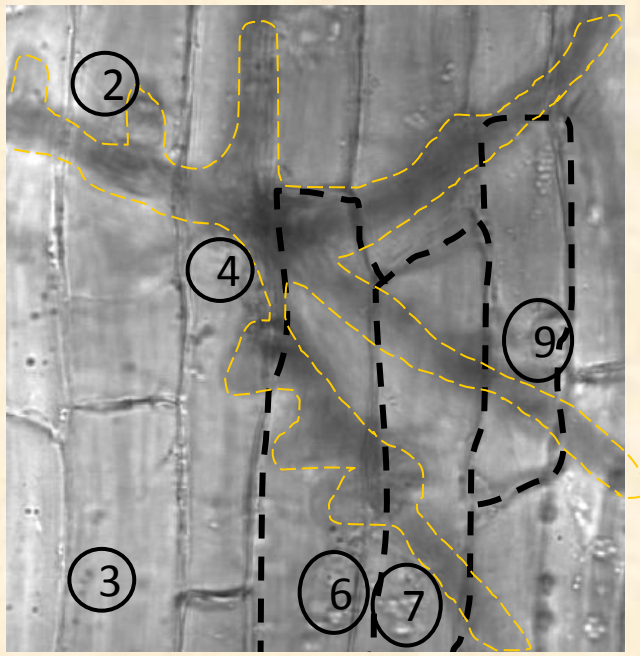


T0  
+5s

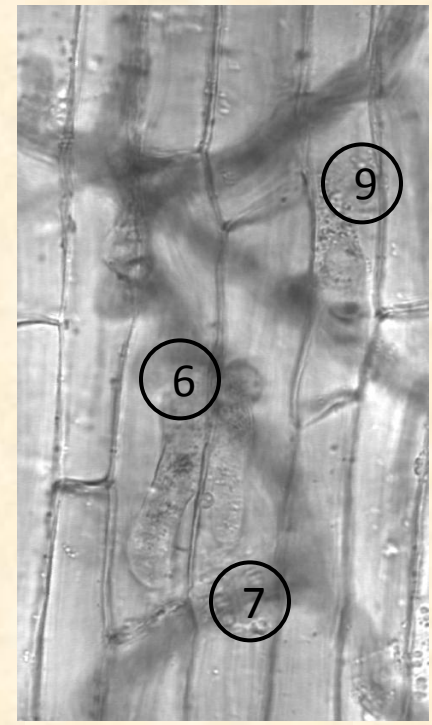


T0 +10s....

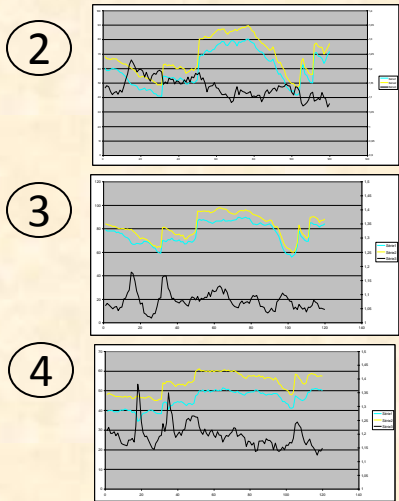
T0



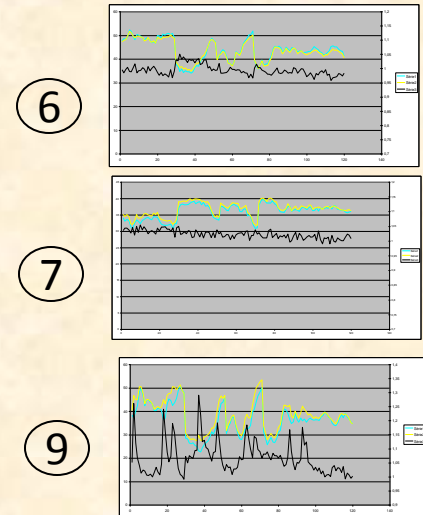
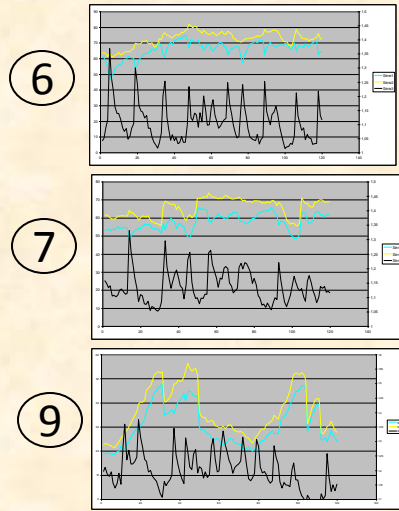
T0 + 3h



A proximité du champignon



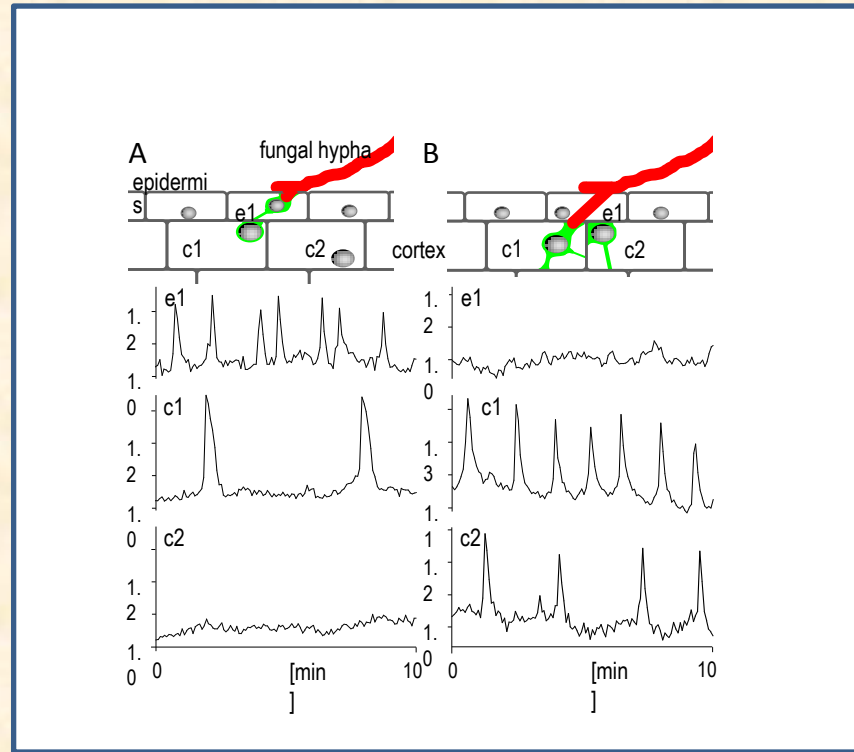
Préparation à l'infection



Cellules infectées

Infection en cours

# Oscillations calciques et infection symbiotique: un phénomène finement régulé



Sieberer et al., 2012

- ➔ Oscillations de faible fréquence associées à la proximité du micro-organisme
- ➔ Oscillations de forte fréquence associées à l'entrée du micro-organisme dans la cellule
- ➔ Arrêt des oscillations une fois la cellule infectée

## Etude de la signalisation calcique au cours de l'infection symbiotique grâce à l'utilisation d'une sonde Cameleon nucléaire

- La sonde Cameleon permet de mesurer les variations de Calcium dans une **cellule individuelle en cours de développement**
- La sonde Cameleon nucléaire permet de suivre simultanément les mouvements nucléaires dans la cellule
- La sonde cytoplasmique permet de suivre les modifications du cytoplasme (pont cytoplasmique en préparation à l'infection)

### Points techniques:

- peu de bleaching
- Utilisation du rapport de fluorescence: pallie les changements de fluorescence liés au changement de focus
- Les sondes Cameleon CFP/YFP peuvent être couplées à l'observation d'un marqueur fluorescent rouge.

# Remerciements

A microscopic image of plant tissue, likely a leaf cross-section, showing elongated cells with thick cell walls. Several bright green fluorescent spots are visible, primarily in the upper and middle sections of the image, indicating the presence of a specific marker or protein.

## LIPM

David Barker  
Joëlle Fournier  
Bjorn Sieberer  
Ton Timmers

## Plate forme Imagerie

Alain Jauneau  
Cécile Pouzet  
Yves Martinez  
Aurélie Le Ru